ESTUDIO COMPARADO ENTRE LA UTILIZACIÓN DE DIMETILSULFÓXIDO O GLICEROL COMO CRIOPROTECTORES EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO DE TRES RAZAS CATALANAS

A. Francesch y A. Fontgibell
IRTA - Centre de Mas Bové - Unitat de Genètica Avícola - Apartat 415 - 43280 REUS
amadeu.francesch@irta.es

INTRODUCCIÓN

El IRTA ha estado desarrollando un programa de conservación de razas de gallinas 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 el poder mantener semen congelado es una garantía en el mantenimiento de variabilidad genética. Basándose en ello este trabajo se centró en estudiar el efecto crioprotector del dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol (GLY) al congelar semen de gallo de tres razas catalanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron un total de cuatro ensayos con 125 gallinas y 12 gallos de cada una de las razas Penedesenca Negra, Prat Leonada y Empordanesa Roja.

El semen se obtuvo por masaje dorso-abdominal (Francesch, 1995) y se trasladó a una cámara a 5°C donde se prepararon las muestras después de haber obtenido un homogenado del semen de los 12 gallos en cada raza. Fue disuelto con el disolvente descrito por Lake and Ravie (1984). Se estableció una solución control que no contenía crioprotector, otra incorporaba DMSO y otra GLY, quedando la concentración de las muestras en 8,07 % (v/v) de GLY o 4,0 % (v/v) de DMSO. La proporción semen/disolvente fue 1:3. Para congelarlo se depositó en viales de 1,2 ml a dosis de 0,6 ml. Los viales fueron introducidos en *racks*. Así dispuestos se introdujeron en un baño de hielo y alcohol durante 25´ a –25°C, seguidamente fueron introducidos al nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a las 24 horas en un baño de alcohol a 5°C agitando los *racks* durante 5´ (Lake and Stewart, 1978). Cuando se realizaron centrifugaciones estas fueron a 2.000 r.p.m. (400 g), 5 °C y durante 15´.

En las inseminaciones (Francesch, 1995) se administró todo el contenido de un vial por gallina. La recogida de huevos fértiles se realizó desde el segundo día después de la inseminación hasta el octavo. Se determinó la fertilidad (fértiles/totales*100) a los tres días de incubación tras observar la presencia de embrión.

Para los análisis estadísticos se utilizó el procedimiento GLM del programa SAS. Los % se transformaron a arcsin $\sqrt{(\%/100)}$. La separación de LS-means se hizo con un test de la t de Student. Se aceptó un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Ensayo n° 1. Se estudió el efecto de los crioprotectores sobre la fertilidad del semen sin ser congelado reduciendo o no su concentración por centrifugación. En cada una de las 9 repeticiones se inseminaron 4 gallinas por raza y tratamiento. En cada repetición se prepararon seis muestras de 2 ml cada una para cada raza (2 CONTROL, 2 con DMSO y 2 con GLY). Una de cada tipo se almacenó a 5°C hasta que la otra fue centrifugada. A las que se iban a centrifugar se añadieron 3 ml de solución control. Se centrifugaron todas a la vez. Se eliminó el sobrenadante y se añadió solución control hasta conseguir 2 ml. Se incubaron 2.000 huevos distribuidos más o menos a partes iguales por repetición, raza y tratamiento. La fertilidad fue analizada considerando el efecto de la raza, el del tratamiento, el de la centrifugación y las interacciones entre estos factores.

Ensayo n° 2. Se estudió la movilidad espermática (espermatozoides vivos / espermatozoides totales * 100) antes y después de la congelación. En cada una de los 8 repeticiones se prepararon tres muestras de semen de cada raza (1 CONTROL, 1 con DMSO

y 1 con GLY). Para el contaje de espermatozoides móviles se utilizó un hemocitómetro de Bücker realizando diluciones 1:4000. La control se evaluó recién obtenido el semen y las otras fueron primero congeladas. La movilidad fue analizada considerando el efecto de la raza, el del tratamiento y la interacción entre ambos.

Ensayo nº 3. Se estudió la fertilidad del semen después de haber sido congelado en nitrógeno líquido y realizando una única inseminación. En cada una de las 19 repeticiones se inseminaron 2 gallinas por raza y tratamiento. En cada repetición se prepararon para cada raza 2 muestras CONTROL, 2 con DMSO y 2 con GLY. Las muestras control se inseminaron inmediatamente. Las muestras con DMSO se administraron a continuación de la descongelación y en las muestras con GLY se intentó reducir la presencia de éste mediante diluciones sucesivas (Lake *et al.*, 1981) y centrifugación. Se incubaron 1.700 huevos distribuidos más o menos a partes iguales entre repeticiones, razas y tratamientos. La fertilidad fue analizada considerando el efecto de la raza, el del tratamiento, el del día posterior a la inseminación y las interacciones entre estos factores.

Ensayo nº 4. Se estudió la fertilidad del semen después de haber sido congelado, pero inseminando durante tres días consecutivos. Se hizo con raza Prat. En cada una de las 4 repeticiones se inseminaron 5 gallinas por tratamiento. En cada repetición se prepararon 5 muestras CONTROL, 5 con DMSO y 5 con GLY. El resto fue igual al tercer ensayo pero inseminando tres días consecutivos con el semen congelado. Se incubaron 360 huevos distribuidos aproximadamente a partes iguales entre repeticiones y tratamientos. La fertilidad fue analizada considerando el efecto del tratamiento, el del día posterior a la primera inseminación y la interacción entre ambos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan resultados del **ensayo 1** en lo que interesa destacar en este trabajo. Aparecieron diferencias significativas de fertilidad entre tratamientos, pero este factor interaccionó con el efecto de centrifugar o no las muestras, pues como podemos observar la fertilidad bajó al centrifugar el CONTROL y las muestras con DMSO, pero aumentó en las muestras con GLY. La presencia de DMSO contribuyó en bajar la fertilidad, que no fue recuperada reduciendo su presencia por centrifugación y la de GLY prácticamente anuló la fertilidad como en (Lake and Ravie, 1984), que se recuperó muy ligeramente centrifugando.

Tabla 1. LS-means ± Std-err de los porcentajes globales de fertilidad de semen de gallo de las razas catalanas habiendo utilizado dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol (GLY), o ninguno en los disolventes y habiendo centrifugado (CEN) o no (NO CEN) las muestras.

	CONTROL	DMSO	GLY
NO CEN	70,18±3,53 a,1	51,44±3,61 a,2	2,50±3,61 a,3
CEN	57,44±6,11 b,1	28,36±3,53 b,2	7,37±3,53 b,3

Los valores con distinta letra dentro de una columna y los valores con distinto número dentro de una fila presentan diferencias significativas (P≤ 0,05).

En el **ensayo 2** no se obtuvieron diferencias significativas de movilidad espermática entre razas, pero sí entre tratamientos independientemente de la raza. El CONTROL fue el que manifestó una movilidad superior (**77,16±1,99 %**) y en el semen congelado destacaron las muestras que contenían GLY con una movilidad doble (**58,06±1,99 %**) respecto de las que contenían DMSO (**26,67±1,99 %**). Con todo ello quedó claro que el GLY manifestó un mejor comportamiento crioprotector que el DMSO coincidiendo con Lake *et al.* (1984) y Maeda *et al.* (1984).

En la tabla 2 se presentan resultados del **ensayo 3**. Se obtuvieron diferencias significativas de fertilidad entre razas y entre tratamientos, con una interacción significativa entre el tratamiento y el día posterior a la inseminación. La raza Prat fue la que mostró mejor fertilidad, pero las diferencias entre razas no dependieron ni del tratamiento, ni del día posterior a la inseminación. La interacción indicada vendría a decirnos que las diferencias de fertilidad entre los días posteriores a la inseminación dependieron del tratamiento, pues en el control la fertilidad del segundo día fue inferior a la de los demás días, mientras que cuando el semen fue congelado con DMSO la fertilidad del segundo y tercer días fue superior que en el resto de los días y cuando se congeló con GLY la fertilidad del segundo día fue superior a la del resto de los días. En una visión general quedó claro que la fertilidad global utilizando semen congelado fue muy inferior al CONTROL, del orden de 75 unidades, pero es de destacar el pico de fertilidad obtenido el segundo día posterior a la inseminación. Visto también de forma general cabe destacar que la fertilidad global obtenida utilizando DMSO como crioprotector fue muy similar a la obtenida utilizando GLY, pero de aquél según el ensayo 1 no se había tenido que reducir su presencia mediante diluciones y centrifugación.

Tabla 2. LS-means ± Std-err de los porcentajes globales de fertilidad desde el 2° al 8° días posteriores a la inseminación (d.p.i.) de semen de gallo de las razas catalanas congelado con dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol (GLY) como crioprotectores frente a semen no congelado (CONTROL).

d.p.i.	CONTROL	DMSO	GLY
2°	68,22±3,46 a,1	21,88±3,58 c,1	14,59±3,59 c,1
3°	93,25±3,84 a,2	12,92±3,67 c,1,2	4,85±3,78 b,c,2
4°	90,45±3,84 a,2	1,97±3,55 b, 3	8,72±3,93 b,1,2
5°	89,34±3,82 a,2,4	3,12±3,67 b,2,3	4,65±3,90 b,2
6°	86,00±3.76 a,2,3	3,44±3,52 b,2,3	3,51±3,56 b,2
7°	79,49±3,65 a,3,4	2,89±3,56 b,2,3	5,75±3,80 b,1,2
8°	78,79±3,70 a,3	3,12±3,72 b,2,3	4,06±4,23 b,2
Media	**83,64±1,41**	**7,05±1,37**	**6,58±1,44**

Los valores con distinta letra en una fila y los valores con distinto número en una columna presentan diferencias significativas (P≤ 0,05).

En el **ensayo 4** se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos pero no entre los días posteriores a la inseminación, ni que las diferencias entre tratamientos dependieran del día posterior. Las diferencias entre la fertilidad del semen recién obtenido (**89,76±4,79 %**) y el congelado también fueron importantes pero aquí la inseminación en tres días consecutivos cuando el crioprotector fue DMSO (**26,01±4,79%**) mejoró los resultados respecto al ensayo 3, lo que supuso un incremento global de fertilidad en unas 20 unidades, pero cuando el crioprotector fue GLY (**7,14±4,79%**) prácticamente no mejoró. Mejores resultados con DMSO también los han aportado Lake y Ravie (1984) y Sexton *et al.* (1978).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Francesch, A. (1995). Selecciones Avícolas. Vol. XXXVII (1): 30 - 33. **Francesch, A. (1997 a).** Arte Avícola, 18: 13 – 16. **Francesch, A. (1997 b).** Catalunya Rural i Agrària, 36 : 16 – 20. **Lake P. E. and J.M. Stewart. (1978).** British Poultry Science, 19: 187-194. **Lake P. E., O. Ravie and J. McAdam. (1981).** British Poultry Science, 22:71-77. **Lake P. E. and O. Ravie. (1984).** British Poultry Science, 25: 145-150. **Sexton, T.J., R.B. Buckland, and R. López (1978).** Poultry Science 57: 550 – 552. **Maeda, T., T. Terada and Y. Ysutsumi. (1984).** Poultry Science, 25: 547 – 553.