

CREACIÓN DE UN BANCO DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE RAZAS ESPAÑOLAS DE GALLINAS

Inf. Veterinaria, 2011: 11-12, 24-26



Julián Santiago Moreno • Investigador Titular del INIA.
Director del Departamento de Reproducción Animal.



Jose Luis Campo Chavarri. • Investigador Titular del INIA.
Director de la Estación Avícola Experimental El Encín.

En 1975 el grupo de mejora genética aviar del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria -INIA- inició un programa de conservación *in vivo* de razas españolas de gallinas en la estación experimental avícola "El Encín", que incluía el estudio genético y la posible utilización de las mismas, con un tamaño efectivo de población suficiente para preservarlas de la amenaza de su sustitución por los híbridos comerciales más productivos -Campo y Orozco 1982; Campo 1998-. Simultáneamente, se fue dando un carácter dinámico al programa de conservación, debido a la importancia creciente de la producción de calidad alternativa a la industrial, lo que suponía una recuperación de las razas autóctonas bien adaptadas a los sistemas de producción sobre yacija o al aire libre, y con una mayor resistencia a las enfermedades.

Recientemente, y con objeto de garantizar la preservación de estas razas ante posibles amenazas de índole sanitario, como la gripe aviar, se está creando un banco de semen como complemento al programa de conservación *in vivo* de razas de gallinas españolas del INIA -Santiago-Moreno y col., 2011-. El desarrollo de este banco de germoplasma se viene ejecutando en el marco de las Acciones de Apoyo a la Conservación de los Recursos Genéticos de Interés

Agroalimentario, gestionado por el INIA, a través del proyecto RZ-2009-CO2.

A pesar de la importancia de los bancos de germoplasma para la preservación de razas autóctonas locales de gallinas, los "stocks" actuales de semen congelado a nivel internacional son muy escasos. Hasta ahora solo hay tres bancos nacionales de semen conge-

lado: EEUU con 4 razas y 2 cruces, Holanda con 11 razas, y Francia con 2 razas y 16 líneas -Blesbois y Brillard, 2007-. El banco de semen del programa de conservación de gallinas españolas del INIA supone uno de los más importantes en el panorama internacional, estando caracterizado por incluir un número de razas a preservar superior a los establecidos en otros países para esta especie. Concretamente, el banco incluye material espermático de 12 razas españolas de gallinas: Castellana Negra, Prat Leonada, Prat Blanca, Vasca Roja



Gallo de raza Andaluza Perdiz, perteneciente al programa de conservación del INIA.

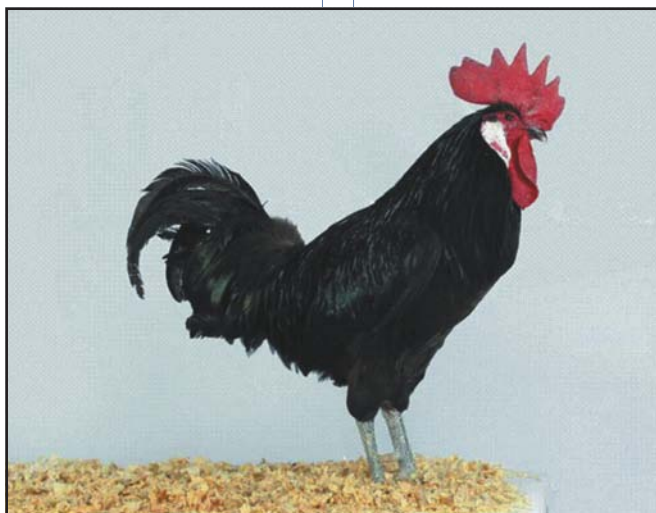
Barrada, Villafranca Roja, Andaluza Azul, Andaluza Franciscana, Andaluza Perdiz, Leonesa Parda, Menorquina Negra, Leonesa India, y Española Cara Blanca. Además, y dentro del programa de conservación del INIA, se han incluido las razas sintéticas Castellana Codorniz y Castellana Codorniz Plateada, así como una línea de Leghorn Blanca y un "tester" genético -Trigueña

Recesiva- importado de la Universidad de Massachusetts en 1975.

A diferencia que en el pavo, el empleo de la inseminación artificial en gallinas con semen refrigerado ha tenido una menor difusión. Sin embargo, la congelación seminal ha tenido un mejor desarrollo debido a una mejor respuesta del espermatozoide de gallo que el del pavo a los procesos de criopreservación, debido, en parte, a su mayor resistencia al shock frío. No obstante,

la aplicación práctica de la inseminación artificial con semen congelado dista mucho todavía de la situación en otras especies domésticas, como el bovino, dado la variabilidad en la fertilidad obtenida, la falta de normalización entre laboratorios de protocolos de criopreservación eficaces, y el requerimiento de varias inseminaciones -generalmente 2 inseminaciones semanales, durante 15 días- para obtener resultados de fertilidad aceptables. La idiosincrasia del espermatozoide aviar, así como la peculiar fisiología reproductiva en esta especie determina diferencias importantes a la hora de abordar el desarrollo de tecnologías reproductivas. Destacar, en este sentido, que los espermatozoides eyaculados en la vagina, en una cubrición natural, se irán almacenando en las espermatecas -túbulos de almacenamiento espermático del tracto genital femenino- ubicadas en la unión utero-vaginal, desde donde se irán liberando durante una media de 14 días -periodo de duración media de la fertilidad de un eyaculado de gallo- hasta alcanzar el *infundibulum* donde se produce la fertilización del ovocito -Etches 1996.

Uno de los principales handicaps de la criopreservación lo supone el hecho de que algunos crioprotectores, como el glicerol, pueden interferir el almacenamiento de los espermatozoides en las espermatecas, lo que determina que el semen así congelado requiera de un lavado previo para retirar el glicerol, dificultando el uso práctico de la inseminación artificial. Esto ha determinado la necesidad de valorar la utilización de otros crioprotectores como la dimetilacetamida -DMA-. La característica del ciclo sexual de la gallina también ha supuesto diferencias notables en el uso de las tecnologías reproductivas. Así, a diferencia que en los mamíferos, la inseminación no se realiza



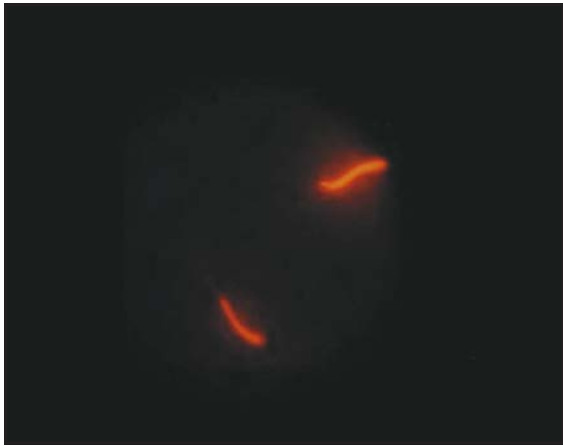
Gallo de raza Castellana Negra, perteneciente al programa de conservación del INIA.

con celos sincronizados y alrededor del momento de la ovulación, sino que se requieren, para semen congelado, varias inseminaciones en hembras que usualmente realizan una puesta diaria de huevos -ovulación diaria-. Además, la inseminación en aves requiere que un elevado número de espermatozoides se mantenga viable durante un largo periodo de tiempo -de 1 a 3 semanas- dentro de las espermatecas. Incluso con semen fresco, sólo el 1-2% de los espermatozoides alcanza dichos

túbulos, por lo que es esperable que la criopreservación afecte severamente el número de espermatozoides capaces de alcanzar las espermatecas. Otros factores limitantes de la criopreservación lo suponen la elevada sensibilidad a los efectos de una dilución excesiva y la morfología filiforme, que determina mayor sensibilidad



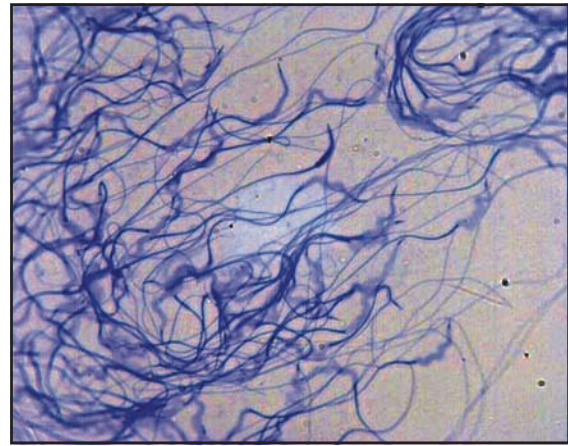
Recogida seminal en el gallo.



Espermatozoides de gallo teñidos con Yoduro de Propidio (microscopía de fluorescencia).

al estrés osmótico y a daños mecánicos -por ejemplo pipeteado y centrifugación-. Las diferentes alteraciones espermáticas que conlleva el ciclo congelación-descongelación incluyen modificaciones del glicocálix espermático -con la subsiguiente afectación del paso espermático por las espermatecas e interacción con el huevo-, un compromiso de la producción de ATP por parte de la mitocondria debido a alteraciones ultraestructurales de la misma, distensión del plasmalema, desplazamiento irreversible de organelas celulares, mitocondrias hinchadas, descondensación nuclear, rotura espermática -generalmente de la cola-, colas de látigo y porciones intermedias hinchadas. Muchas de estas alteraciones se producen como consecuencia de los cambios osmóticos acontecidos durante el ciclo de congelación y descongelación espermática -Bakst y Sexton 1979.

El banco de semen de razas españolas de gallinas del INIA está concebido como un instrumento de conservación dinámico y permanente, en el que se integra, de forma periódica y continuada, el material genético de ejemplares de gran valor desde el punto de vista genético y de resistencia al estrés. Los objetivos que se abordan, en el contexto del desarrollo del banco de semen, incluyen el establecimiento de criterios de selección de gallos donantes de semen, la influencia del componente racial en la congelabilidad, la optimización de diluyentes mediante el testaje de nuevos aditivos, la adecuación de crioprotectores y del tiempo de equilibrado requerido, la evaluación de distintas rampas de congelación, el análisis de la influencia de los factores medioambientales -fotoperiodo, temperatura, alimentación, sistema de manejo- en la congelabilidad espermática, y la interacción del componente sanitario -por ejemplo parasitosis- con el estatus endocrino -concentraciones plasmáticas de testosterona- en la respuesta celular al proceso de congelación-descongelación.



Espermatozoides de gallo teñidos con Azul de Anilina (microscopía de contraste de fases).

Uno de los puntos clave en el desarrollo del banco lo supone la adecuada selección de los animales donantes de semen -Santiago-Moreno y col., 2009a-. Para la selección de los gallos donantes se tienen en cuenta, en primer lugar, sus caracteres sexuales secundarios -tamaño de la cresta y de las barbillas-, y la respuesta a la técnica de masaje para la obtención del material seminal que, a su vez, está relacionada con la libido del gallo. La técnica de recogida seminal consiste en un masaje dorso-lumbar y a nivel de la cloaca que permite extraer el órgano copulador y la obtención, mediante ordeño, del semen. Los seminogramas para la selección de animales donantes se realizan sobre un mínimo de 3 eyaculados por animal. Los criterios mínimos de selección pueden variar con la raza, edad y la estación del año de recogida. Por ejemplo, el volumen seminal puede oscilar de 0,1 a 0,6 ml, pero se descartarán como donantes aquellos animales que den volúmenes inferiores a 0,25 ml. Otro criterio de selección a partir de los parámetros seminales, pero teniendo en cuenta los mencionados factores de variación, lo constituye la concentración espermática, tal que nunca serían susceptibles de selección animales con concentraciones inferiores a 300×10^6 espermatozoides/ml. También se descartarían como donantes aquellos animales con parámetros de motilidad inferiores al 50%, valores de integridad de membrana plasmática inferiores al 50%, menos del 75% de acrosomas íntegros, o índices de morfoanomalías superiores al 30%.

No obstante, en la interpretación de los correspondientes seminogramas debe tenerse en consideración la influencia de la estacionalidad en la actividad reproductiva de estas razas, que suelen mantenerse en condiciones de fotoperiodo y temperatura natural. En este sentido, los parámetros cuantitativos -volumen y concentración- son los más afectados, presentando los mayores valores



Inseminación artificial intraoviductal.

en invierno -enero-marzo- y primavera -abril-junio-, coincidiendo con el incremento del fotoperiodo -Santiago-Moreno y col., 2009b-. Por ejemplo, estudios recientes, realizados en nuestro laboratorio, muestran que en el gallo de raza Castellana Negra la concentración espermática pasa de valores de $1600-1700 \times 10^6$ espermatozoides/ml en invierno y primavera, a concentraciones de $700-900 \times 10^6$ espermatozoides/ml, en verano -de julio a septiembre- otoño -de octubre a diciembre-. Igualmente, el volumen eyaculado es máximo en invierno y primavera, con valores medios de 0,2 ml, pero hay individuos excepcionales que llegan a dar hasta 1 ml de semen. Cabe destacar, que en el gallo la relación tamaño testicular/tamaño corporal es muy superior a la de muchos mamíferos, de ahí los elevados volúmenes seminales que se pueden llegar a obtener en relación, por ejemplo, con algunos pequeños rumiantes. Además del fotoperiodo, la temperatura juega un papel determinante de la calidad seminal. En los periodos más calurosos -habitualmente en julio-, la integridad de membrana plasmática de espermatozoides se ve usualmente afectada en gallos mantenidos en condiciones ambientales naturales. Por otro lado, los periodos de bajas temperaturas pueden afectar la calidad seminal en términos de una reducción de la motilidad espermática. Finalmente, se recomienda un testaje de la capacidad fertilizante de aquellos gallos con seminogramas aptos, mediante la inseminación artificial, con semen fresco diluido, de un mínimo de 10 gallinas, realizándose una única inseminación por gallina. Se considera aceptable una fertilidad mínima del 80%.

Aquellos gallos considerados como donantes pasan a un régimen de recogida de semen semanal, en el que

se mantendrán hasta los 2-3 años de vida. El material espermático puede congelarse en pelets, o en pajuelas, si bien factores de índole sanitario y de identificación pueden hacer más recomendable el uso de envasado en pajuelas, para el mantenimiento en nitrógeno líquido a -196°C . El tipo de velocidad de enfriamiento -congelación ultra-rápida, rápida o lenta- o el tipo de crioprotector que se utilice -por ejemplo DMA o glicerol- también determinarán respectivas ventajas o desventajas para un tipo de envasado u otro -pelets o pajuelas- (Blesbois y col., 2007).

Bibliografía

Bakst M.R., Sexton T.J. 1979. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *J. Reprod. Fert.* 55:1-7.

Blesbois E., Brillard J.P. 2007. Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal* 1:1472-1481.

Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D., Coquerelle G., Rault P., Tixier-Boichard M. 2007. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French Avian Cryobank. *Poult. Sci.* 86:555-564.

Campo J.L., Orozco F. 1982. Conservation and genetical study of Spain chicken breeds -6-. Pages 88-93 in Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid. Editorial Garsi, Madrid.

Campo J.L. 1998. Conservation and genetic study of Spanish chicken breeds -28-. Pages 155-158 in Proc. 6th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Armindale, Australia. Univ. New England, Armindale, New South Wales, Australia.

Etches R.J., 1996. *Reproduction in poultry*. 1st Ed. CAB International, Wallingford, UK.

Santiago-Moreno J., López-Sebastián A., Castaño C., Coloma M.A., Gómez-Brunet A., Prieto M.T., Campo J.L. 2009a. Sperm variables as predictors of fertilizing capacity in Black Castellana roosters for donor's selection in Genome Resource Banking. *Span. J. Agric. Res.* 7:555-562.

Santiago-Moreno J., Castaño C., Coloma M.A., Gómez-Brunet A., Toledano-Díaz A., López-Sebastián A., Campo J.L. 2009b. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range. *Poult. Sci.* 88:2661-2669.

Santiago-Moreno J., Castaño C., Toledano-Díaz A., Coloma M.A., López-Sebastián A., Prieto M.T., Campo J.L. 2011. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish Poultry Breeds Cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult. Sci.* 90: 2047-2053. ●