

INFLUENCE OF BREED AND INSEMINATION TEMPERATURE ON FERTILITY OF CHILLED COCK SEMEN

Bernal^{1*}, B., Váradi², E., Drobnyák², A., Liptói², K., Santiago-Moreno³, J., de Kovel⁴, C., Hiemstra¹, S.J., Woelders¹, H. and Végi², B.

¹Netherlands Genetic Resources Centre, Wageningen University & Research, Animal Breeding and Genomics, P.O. Box 338, 6700 AH, Wageningen, The Netherlands; ²Dept. of Genetic Conservation - Small Animal Science and Breeding, National Centre for Biodiversity and Genetic Conservation, H-2100 Gödöllő, Hungary; ³Dept. of Animal Rep., INIA-CSIC, 28040 Madrid, Spain; ⁴Biometris, Wageningen University & Research, POBox 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

*berenice.bernaljuarez@wur.nl / berenice.bernal.juarez@gmail.com

INTRODUCTION

Cryopreservation of cock semen includes a cooling/chilling phase to prolong its viability prior to freezing (Elomda *et al.*, 2024). However, a previous study (Bernal *et al.*, 2024) showed that fertility in Leghorn hens (LG) decreased from 48.2% with fresh semen (Hungarian Yellow breed, HA) undiluted (SP), to 3.7% with semen chilled at 5°C for one hour and diluted (SR). In a second phase, the use of fresh diluted (uncooled) semen increased fertility from 3.7% to 55.4%, while with SP it increased to 71.4%. This study examines whether the temperature of in-semination or the breed of the females affects the loss of fertility with chilled semen.

MATERIAL AND METHODS

Semen from HA cocks (4 pools from the same 10 animals), diluted 1:1 with ASG diluent (Animal Sience Group, Woelders, 2021) and cooled to 5°C for one hour, was used. Two groups of 10 HA hens were inseminated with the resulting aliquots (in contrast to the study by Bernal *et al.* (2024) which used LG hens): one with semen cooled to 5°C (SR) and one with semen cooled to 5°C but heated to ≈ 20°C before insemination (SR+C). A third group of hens was inseminated with fresh (not chilled) undiluted semen (SP). Four intravaginal inseminations were performed with 250 µL of SR or SR+C and approximately 60 µL of SP (≈ 180 million sperm/hen) spaced 2-3 days apart over 2 weeks, and egg collection from the second day after the first insemination until three days after the last insemination. Fertility was determined by candling after 7 days of incubation. Results were analysed with Chi-square and FDR ($\alpha = 0.05$). The maintained fertility ratio (MFR) = (SR fertility/SP fertility) × 100 was also calculated. The sperm variables evaluated post-insemination were motility (CASA), viability (SYBR-Green), DNA integrity (TUNEL) and acrosome integrity (methylene blue). An ANOVA test was used after data transformation and verification of homogeneity of variances to identify differences between groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of sperm variables showed no significant difference between SP, SR and SR+C. Insemination results indicated a significant decrease ($p < 0.05$) in fertility from 45.2% with SP to 19.5% with SR, similar to what was observed by Bernal *et al.* (2024) with LG hens. However, insemination temperature did not influence the decrease in fertility, as there was no significant difference between SR (19.5%) and SR+C (17.4%). The PFM in HA hens (43.1%) was 5.6 times higher than that obtained by Bernal *et al.*, 2024 with LG hens (7.7%) which could suggest that some breeds are more capable of maintaining fertility in chilled semen than others.

CONCLUSION

Semen cooling reduced fertility. Although insemination temperature had no effect, the PFM of YH hens was higher than in LG hens (Bernal *et al.*, 2024). Inseminations with equal numbers of sperm in both breeds will confirm whether this difference is due to breed.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

• Elomda, A.M., Mehaisen, G.M.K., Stino, F.K.R., Saad, M.F., Ghaly, M.M., Partyka, A., Abbas, A.O., Nassar, F.S. 2024. Poult. Sci. 103:1-9. - Woelders, H. 2021. In Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols - Bernal, B., Vegi, B., Váradi, E., Drobnyák, Á., Liptói, K., Santiago-Moreno, J., Hawken, R., de Kovel, C., Hiemstra, S.J., Woelders, H. 2024. In 60th Anniversary Meeting of Society for Low Temperature Biology, 12. Manchester.

Acknowledgements: European Union, project 101109983-CRYOCHICK, HORIZON-MSCA-2022-PF-01.

INFLUENCIA DE LA RAZA Y LA TEMPERATURA DE INSEMINACIÓN EN LA FERTILIDAD DEL SEMEN DE GALLO REFRIGERADO

Bernal^{1*}, B., Váradi², E., Drobnyák², A., Liptoi², K., Santiago-Moreno³, J., de Kovel⁴, C., Hiemstra¹, S.J., Woelders¹, H. y Végi², B.

¹Centro de Recursos Genéticos de Países Bajos, Wageningen University & Research, Animal Breeding and Genomics, P.O. Box 338, 6700 AH, Wageningen, Países Bajos; ²Dpto. de Conservación Genética – Ciencia y Cría de Pequeños Animales. Centro Nacional para la Biodiversidad y la Conservación Genética, H-2100 Gödöllő, Hungría; ³Dpto. Rep. Animal, INIA-CSIC, 28040 Madrid, España;

⁴Biometris, Wageningen University & Research, POBox 16, 6700 AA Wageningen, Países Bajos

*berenice.bernaljuarez@wur.nl / berenice.bernal.juarez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen de gallo incluye una fase de enfriamiento/refrigeración para prolongar su viabilidad antes de la congelación (Elomda *et al.*, 2024). Sin embargo, un estudio previo (Bernal *et al.*, 2024) mostró que la fertilidad en gallinas Leghorn (LG) disminuyó de 48,2% con semen fresco (raza Húngara Amarilla, HA) sin diluir (SP), a 3,7% con semen refrigerado a 5°C durante una hora y diluido (SR). En una segunda fase, el uso de semen fresco diluido (sin refrigerar) elevó la fertilidad del 3,7% al 55,4%, mientras que con SP aumentó al 71,4%. Este estudio analiza si la temperatura de inseminación o la raza de las hembras afecta la pérdida de fertilidad con semen refrigerado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó semen de gallos HA (4 pools de los mismos 10 animales), diluidos 1:1 con diluyente ASG (Animal Science Group, Woelders, 2021) y enfriados a 5°C por una hora. Con las alícuotas resultantes se inseminaron dos grupos de 10 gallinas HA (a diferencia del estudio de Bernal *et al.* (2024) que usó gallinas LG): uno con semen refrigerado a 5°C (SR) y otro con semen refrigerado a 5°C, pero calentado a ≈20°C antes de ser inseminado (SR+C). Un tercer grupo de gallinas se inseminó con semen fresco (no refrigerado) sin diluir (SP). Se realizaron cuatro inseminaciones intravaginales con 250 µL de SR o SR+C y aproximadamente 60 µL de SP (≈180 millones de espermatozoides/gallina) con espacio de 2-3 días en 2 semanas, y recolección de huevos desde el segundo día tras la primera inseminación hasta tres días después de la última. La fertilidad se determinó por ovoscopia a los siete días de incubación. Los resultados se analizaron con Chi-cuadrado y FDR ($\alpha = 0,05$). También se calculó la proporción de fertilidad mantenida (PFM) = (fertilidad SR/fertilidad SP) × 100. Las variables espermáticas evaluadas post-inseminación fueron motilidad (CASA), viabilidad (SYBR-Green), integridad del ADN (TUNEL) e integridad del acrosoma (azul de metileno). Se utilizó un test ANOVA tras la transformación de los datos y la verificación de la homogeneidad de varianzas para identificar diferencias entre los grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las variables espermáticas no mostró ninguna diferencia significativa entre SP, SR y SR+C. Los resultados de inseminación indicaron una disminución significativa ($p < 0,05$) de la fertilidad, pasando de 45,2% con SP a 19,5% con SR, similar a lo observado por Bernal *et al.* (2024) con gallinas LG. Sin embargo, la temperatura de inseminación no influyó en la disminución de la fertilidad, ya que no hubo diferencias significativas entre SR (19,5%) y SR+C (17,4%). La PFM en las gallinas HA (43,1%) fue 5,6 veces mayor que la obtenida por Bernal *et al.*, 2024 con gallinas LG (7,7%) lo que podría sugerir que existen razas más capaces de mantener la fertilidad de semen refrigerado que otras.

CONCLUSIÓN

La refrigeración del semen redujo la fertilidad. Aunque la temperatura de inseminación no tuvo efecto, la PFM de las gallinas YH fue mayor que en las LG (Bernal *et al.*, 2024). Inseminaciones con igual número de espermatozoides en ambas razas confirmará si esta diferencia es debida a la raza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Elomda, A.M., Mehaisen, G.M.K., Stino, F.K.R., Saad, M.F., Ghaly, M.M., Partyka, A., Abbas, A.O., Nassar, F.S. 2024. *Poult. Sci.* 103:1-9.
- Woelders, H. 2021. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*.
- Bernal, B., Vegi, B., Váradi, E., Drobnyák, Á., Liptoi, K., Santiago-Moreno, J., Hawken, R., de Kovel, C., Hiemstra, S.J., Woelders, H. 2024. In *60th Anniversary Meeting of Society for Low Temperature Biology*, 12. Manchester.

Agradecimientos: Unión Europea, proyecto 101109983-CRYOCHICK, HORIZON-MSCA-2022-PF-01