



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

LUIS FELIPE
PÉREZ GARCÍA

Tesis doctoral

Técnica de inseminación
artificial en gallinas
reproductoras: selección de
machos, uso de diluyentes,
parámetros de inseminación y
viabilidad económica

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Medicina y Sanidad Veterinaria

TESIS DE DOCTORADO

**TÉCNICA DE INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL EN GALLINAS
REPRODUCTORAS: SELECCIÓN DE
MACHOS, USO DE DILUYENTES,
PARÁMETROS DE INSEMINACIÓN
Y VIABILIDAD ECONÓMICA**

Luis Felipe Pérez García

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
Y SANIDAD VETERINARIA**

LUGO

2023

D./Dña. **Luis Felipe Pérez García**

Título de la tesis: **Técnica de inseminación artificial en gallinas reproductoras: selección de machos, uso de diluyentes, parámetros de inseminación y viabilidad económica**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo, 10 de enero de 2023.**

Firma electrónica

D./Dña. **Alejandro Fernández Fernández**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Técnica de inseminación artificial en gallinas reproductoras: selección de machos, uso de diluyentes, parámetros de inseminación y viabilidad económica**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Luis Felipe Pérez García**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 10 de enero de 2023**

Firma electrónica

D./Dña. **Luis Vázquez Sande**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Técnica de inseminación artificial en gallinas reproductoras: selección de machos, uso de diluyentes, parámetros de inseminación y viabilidad económica**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Luis Felipe Pérez García**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 10 de enero de 2023**

Firma electrónica

D./Dña. **Victor Pereira Lestayo**

En condición de: **Tutor/a**

Título de la tesis: **Técnica de inseminación artificial en gallinas reproductoras: selección de machos, uso de diluyentes, parámetros de inseminación y viabilidad económica**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Luis Felipe Pérez García**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 10 de enero de 2023**

Firma electrónica

D. Luis Felipe Pérez García

Título de la tesis: **Técnica de inseminación artificial en gallinas reproductoras: selección de machos, uso de diluyentes, parámetros de inseminación y viabilidad económica**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) No tengo ningún conflicto de intereses en relación con mi tesis de doctoramiento.

En Lugo, 10 de enero de 2023.

AGRADECIMIENTOS

Al comenzar este proyecto en el año 2015, se presentaban delante de mí más dudas e incertidumbres que certezas, en relación al desarrollo y buen término del mismo. Durante este tiempo han sido muchos los momentos de ilusión, de trabajo, de esfuerzo e incluso algunos de desánimo, pero sin duda tengo que dar gracias a Dios por haber podido llegar finalmente a la conclusión de este proyecto. La elaboración de una tesis no se logra de manera individual, si no que han sido muchas las personas y empresas que de una u otra forma han colaborado conmigo en este proyecto y a las que debo dar las gracias en este momento.

A Coren, por haberme dado la oportunidad de iniciar este proyecto y haberme apoyado durante todo el proceso de elaboración del mismo. Sin duda tengo que agradecer a muchas de las personas que integran esta cooperativa, empezando por la dirección de la misma en la figura de D. Manuel Gómez Franqueira y siguiendo por la dirección de producción, personal técnico de reproductoras, personal de plantas de incubación y granjeros. Sin el apoyo de todos ellos no hubiese sido posible realizar este trabajo. Para mí es un honor poder formar parte de esta gran familia.

A mis directores de tesis Alejandro Fernández y Luis Vázquez por haberme guiado y acompañado durante el largo camino de la elaboración de esta tesis.

A Jesús Méndez por sus comentarios y sugerencias que me han servido para mejorar el resultado final de este proyecto.

A IMV por el apoyo técnico y material que me han prestado desinteresadamente durante la realización de los ensayos.

A Aviagen por las imágenes y figuras cedidas para la elaboración de esta tesis.

A nivel personal, tengo que dar las gracias en primer lugar a mi mujer Sandra, por el apoyo total, absoluto e incondicional que siempre me ha brindado durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Nunca hubiese podido llevar a cabo este proyecto sin su ayuda, comprensión y ánimo. Sin duda soy un hombre afortunado por tenerla a mi lado.

A mis hijas Claudia y Esther por ser cada día la razón para seguir adelante.

A mis padres Samuel y Esther por haber sido siempre para mí un ejemplo de vida.

A mis hermanas, familiares, amigos y compañeros que de una u otra manera siempre me han animado y ayudado durante el tiempo de elaboración de esta tesis.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ABREVIATURAS

ATP	adenosín trifosfato
ASMA	automated sperm morphometry analysis
CASA	computer assisted semen analysis
cm	centímetro
FAO	Food and Agriculture Organization
GPS	grand parent stock
GGPS	grand grand parent stock
h	hora
kg	kilogramo
kcal	kilocaloría
kDa	kilodalton
l	litro
mm	milímetro
min	minuto
ml	mililitro
mOs	miliosmo
MSI	índice de motilidad espermática
PS	parent stock
RAE	Real Academia Española
S	siglo
s	segundo
SQI	índice de calidad espermática
UE	Unión Europea

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1.- RESEÑA HISTÓRICA DE LA AVICULTURA EN ESPAÑA	7
1.2.- SITUACIÓN DE LA AVICULTURA DE CARNE EN ESPAÑA.....	8
1.3.- TIPOS DE GALLINAS Y GALLOS EN LA AVICULTURA INDUSTRIAL .	10
1.4.- APARATO REPRODUCTOR DE LAS AVES	13
1.4.1.- Aparato reproductor de la hembra	13
1.4.1.1.- Ovario.....	13
1.4.1.2.- Oviducto.....	15
1.4.2.- Aparato reproductor del macho.....	17
1.4.2.1.-Testículos	18
1.4.2.2.- Vías deferentes	19
1.4.2.3.- Órgano copulador.....	19
1.5.- FECUNDACIÓN DE LA GALLINA.....	20
1.5.1.- Monta natural	20
1.5.2.- Inseminación artificial.....	23
1.6.- EVALUACIÓN Y FACTORES DE CALIDAD DEL SEMEN	25
1.6.1.- Evaluación de la calidad del semen	26
1.6.1.1.- Volumen del eyaculado.....	27
1.6.1.2.- Concentración de espermatozoides	27
1.6.1.3.- Viabilidad de los espermatozoides.....	28
1.6.2.- Factores que influyen en la calidad del semen.....	29
1.7.- MANEJO DEL HUEVO INCUBABLE.....	31
1.7.1.- Medidas de manejo de huevo incubable.....	33
1.8.- DETERMINACIÓN DE HUEVOS FÉRTILES	35
1.8.1.- Huevo fresco	36
1.8.2.- Huevo parcialmente incubado 1-5 días	36
1.8.3.- Huevo parcialmente incubado a 8-10 días	37
2. OBJETIVOS	39

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	43
3.1.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	45
3.2.- EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN.....	52
3.3.- CONSERVACIÓN DE SEMEN FRESCO: USO DE DILUYENTES	58
3.4.- MOMENTO Y FRECUENCIA DE INSEMINACIÓN.....	64
3.5.- INCUBABILIDAD, HUEVO FÉRTIL Y DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD	66
3.5.1.- Factores nutricionales	66
3.5.2.- Factores sanitarios	68
3.5.3.- Factores de manejo	69
3.5.4.- Factores de incubación	70
3.5.5.- Determinación de la fertilidad del huevo	72
4. CAPÍTULO I: “SELECCIÓN DE MACHOS REPRODUCTORES EN MANADAS DE GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS”	75
4.1.- INTRODUCCIÓN.....	77
4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	79
4.2.1.- Animales	79
4.2.2.- Manejo de los animales	81
4.2.3.- Reactivos para la preparación de las muestras	83
4.2.4.- Equipos y material	83
4.2.5.- Clasificación de los animales	84
4.2.6.- Inseminación.....	84
4.2.7.- Manejo y análisis del huevo incubable.....	85
4.2.8.- Análisis estadístico	86
4.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL	89
4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.4.1.- Análisis individuales de la calidad del semen	91
4.4.2.- Relación entre la motilidad progresiva y la fertilidad	92
4.4.3.- Resultados económicos de la selección de gallos.....	94
5. CAPÍTULO II: “EMPLEO DE DILUYENTES VS. EMPLEO DE SEMEN FRESCO EN LA INSEMINACIÓN DE GALLINAS REPRODUCTORAS DE ESTIRPE PESADA”	99
5.1.- INTRODUCCIÓN	101

5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	103
5.2.1.- Animales	103
5.2.2.- Manejo de los animales	104
5.2.3.- Reactivos para la preparación de las muestras	104
5.2.4.- Equipos y material.....	105
5.2.5.- Inseminación	105
5.2.6.- Manejo y análisis del huevo incubable	106
5.2.7.- Análisis estadístico.....	107
5.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	109
5.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
5.4.1.- Fertilidad obtenida con semen puro y diluido.....	111
5.4.2.- Resultados económicos del empleo de diluyentes	113
6. CAPÍTULO III: “INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA DE INSEMINACIÓN Y DEL TIEMPO POST EXTRACCIÓN DE SEMEN FRESCO SOBRE LA FERTILIDAD DE GALLINAS REPRODUCTORAS DE ESTIRPES PESADA, SEMIPESADA Y LIGERA”	117
6.1.- INTRODUCCIÓN.....	119
6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	121
6.2.1.- Animales	121
6.2.1.1.- Estirpes pesadas	121
6.2.1.2.- Estirpes semipesadas.....	122
6.2.1.3.- Estirpes ligeras	122
6.2.1.4.- Selección de los gallos y gallinas.....	123
6.2.2.- Manejo de los animales	125
6.2.3.- Equipos y material.....	127
6.2.4.- Prueba de frecuencia de inseminación	127
6.2.4.1.- Inseminación	127
6.2.4.2.- Manejo y análisis del huevo incubable	128
6.2.5.- Prueba de tiempos de inseminación post extracción.....	129
6.2.5.1.- Inseminación	129
6.2.5.2.- Manejo y análisis del huevo incubable	130
6.2.6.- Prueba de frecuencia de inseminación y de tiempos de inseminación post extracción con semen diluido	131
6.2.6.1.- Inseminación	132
6.2.6.2.- Manejo y análisis del huevo incubable	132
6.2.7.- Análisis estadístico.....	132

6.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL	135
6.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	137
6.4.1.- Fertilidad tras la inseminación a diferentes frecuencias. 137	
6.4.1.1.- Gallinas de estirpe pesada: <i>Ross Pm3</i>	137
6.4.1.2.- Gallinas de estirpe semipesada: <i>Hubbard JA57</i> ...	139
6.4.1.3.- Gallinas de estirpe ligera: <i>Lohmann Brown</i>	141
6.4.1.4.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación a diferentes frecuencias	143
6.4.2.- Fertilidad tras la inseminación a diferentes tiempos post extracción del semen	144
6.4.2.1.- Gallinas de estirpe pesada: <i>Ross Pm3</i>	144
6.4.2.2.- Gallinas de estirpe semipesada: <i>Hubbard JA57</i> ...	146
6.4.2.3.- Gallinas de estirpe ligera: <i>Lohmann Brown</i>	147
6.4.2.4.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación a diferentes tiempos post extracción.....	149
6.4.3.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintas frecuencias y tiempos post extracción del semen.....	150
6.4.3.1.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintas frecuencias	150
6.4.3.2.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintos tiempos post extracción	153
6.4.3.3.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación con semen diluido a diferentes frecuencias y tiempos post extracción	155
7. CONCLUSIONES.....	157
8. DECLARACIONES PARA USO DE IMÁGENES.....	161
9. BIBLIOGRAFÍA.....	165

RESUMEN

RESUMEN

La inseminación artificial es una técnica ampliamente empleada en muchas producciones animales. En el caso de las aves, su uso es habitual en especies como los pavos, pero poco estudiada y empleada en gallinas, sobre todo a nivel de producción industrial. En esta Tesis se evaluaron los principales aspectos de esta técnica que presentan influencia en los resultados productivos en gallinas reproductoras, valorando su aplicación en una granja de producción industrial.

Primeramente, se ensayó el empleo del sistema CASA para seleccionar los mejores machos de un lote en función de la motilidad progresiva de sus espermatozoides. Posteriormente se procedió a inseminar lotes de hembras con semen procedente de estos machos y se evaluó la fertilidad media obtenida. Los resultados indicaron que existía una relación estadísticamente significativa entre la motilidad progresiva de los espermatozoides y la fertilidad real de las gallinas. De esta manera se confirmó como válido el sistema CASA como método de evaluación y selección de machos. Tras la valoración económica de la implementación de esta técnica en la explotación comercial de gallinas reproductoras se comprobó que resulta económicamente viable.

En un segundo estudio se valoraron las diferencias existentes en la fertilidad obtenida en la inseminación artificial empleando semen puro y semen diluido. Se concluyó que no existían diferencias significativas entre el uso de semen puro y semen diluido con *Poultry Media*[®] (IMV Technologies), mientras que las diferencias si fueron significativas con el empleo de *Fertimax*[®] (M.I.O Biologie). Asimismo, tras un análisis de costes se concluyó que la utilización de diluyentes resultaba económicamente viable en condiciones de producción comercial de gallinas reproductoras.

Se evaluó la eficacia de la inseminación en lotes de gallinas reproductoras a diferentes frecuencias con semen fresco empleado inmediatamente tras su extracción. Se estudió la inseminación diaria y a intervalos de 2 días, hasta un máximo de 18 días. Los datos obtenidos mostraron una relación significativa entre las diferentes frecuencias de inseminación y las fertilidades obtenidas, tanto en gallinas reproductoras de estirpe pesada, semipesada o ligera. Asimismo, se pudo comprobar que los límites temporales entre inseminaciones a partir de los cuales se observaba una bajada significativa de la fertilidad, fueron de 9 días en reproductoras de estirpe pesada, 6 días en la estirpe semipesada y 8 días en gallinas de estirpe ligera.

Se valoró también el efecto del tiempo que transcurre entre la extracción del semen y la inseminación de las hembras, estudiándose la inseminación inmediata tras la obtención del semen hasta los 27 min post extracción, a intervalos de 3 min. Se observó que no existe relación entre el tiempo que transcurre entre la extracción del semen y la inseminación con la fertilidad obtenida en gallinas de estirpes pesada, semipesada y ligera.

Finalmente, en reproductoras de estirpe ligera, se determinó la influencia del empleo de diluyente sobre el intervalo entre inseminaciones y sobre el efecto del tiempo extracción del semen-inseminación. Así se observó que existían las mismas relaciones entre la frecuencia de inseminación y la fertilidad final obtenida en estas que reproductoras que cuando se empleó semen sin diluir.

Palabras clave: gallinas reproductoras, estirpes, gallos, inseminación, fertilidad, diluyente, tiempos, frecuencias.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- RESEÑA HISTÓRICA DE LA AVICULTURA EN ESPAÑA

La avicultura es la rama de la ganadería que se encarga de la cría, reproducción y engorde de las aves domésticas con fines económicos, científicos o recreativos.

Históricamente, los primeros datos de los que se tienen noticia sobre avicultura, datan de la época del Egipto faraónico (1500 A.C.) en donde se recogen informaciones sobre el empleo de aves como fuente de alimentación e incluso de los primeros intentos en el uso de incubación artificial, aunque sin duda muy rudimentaria.

Tras los egipcios, tanto griegos como romanos profundizaron en el estudio de la cría de aves y prueba de ello son los textos en los que se recogen referencias a estas actividades.

En relación a autores procedentes de lo que actualmente es España, cabe destacar a Columela, escritor nacido en Gades (actual Cádiz) al inicio de la era cristiana. Columela escribió su obra *De Rustica* compuesta por 12 volúmenes y en la que se recoge, concretamente en el libro VIII, indicaciones sobre la cría y cuidado de las aves.

En el siglo XII, Ibn Al Awan (1802), escritor andalusí nacido en la actual Sevilla, escribe un tratado de agricultura conocido como *Libro de la agricultura* y en su segundo volumen hace referencia a las aves de corral, su manejo y enfermedades.

En 1513, Gabriel Alonso de Herrera publica en Toledo *Obra de Agricultura*, compuesta por 6 volúmenes, en cuyo volumen quinto se recogen aspectos sobre el cuidado de animales de granja entre los que se encuentran las aves de corral.

En 1781, el aragonés Francisco Dieste y Buil publica su obra *Tratado económico*, con un capítulo específico titulado *Crianza de gallinas y considerables utilidades que producen a su dueño* en el que se tratan aspectos relacionados con la avicultura.

En 1844, Nicolás Casas de Mendoza, veterinario protagonista de la reforma y modernización de la veterinaria en España, publica *Tratado de la cría de aves de corral* en el que aborda de la cría de aves con criterios zootécnicos más modernos.

A finales del S XIX, comienzan en varios países europeos los primeros intentos de convertir la avicultura en un sistema productivo más industrial. En España se importa la primera incubadora procedente de Francia en 1877. En 1896 se funda en España la Real Escuela de Avicultura y se empieza a editar de forma periódica la publicación *La avicultura práctica*, orientada al desarrollo de la avicultura en nuestro país.

Durante la primera mitad del S. XX es cuando se sientan las bases de la actual avicultura moderna con la mejora de los piensos y de la alimentación, lo que permitió plantearse por primera vez la crianza industrial de aves. Es en este siglo, cuando se empiezan a seleccionar las diferentes estirpes de aves según su aptitud, bien sea para producir huevos o para producir carne. Así mismo, en la segunda mitad de este siglo se desarrollan las diferentes vacunas que permiten proteger a las aves de las enfermedades más importantes.

Todos estos avances, posibilitan que la avicultura industrial moderna se desarrolle de forma definitiva en el mundo y en España, hasta llegar a ser una de las principales actividades ganaderas en la actualidad.

1.2.- SITUACIÓN DE LA AVICULTURA DE CARNE EN ESPAÑA

La avicultura comercial de carne en España es uno de los sectores productivos importantes dentro de la producción final ganadera en el año 2020. Así, según datos del Ministerio de Ganadería, Pesca y Alimentación (2020), el porcentaje del valor de la producción avícola de carne dentro de la producción final ganadera es del orden del 12,24 %, solo por detrás del porcino con un 42,78 % y el bovino con un 15,29 %. Si esto lo llevamos a la producción final agraria de este mismo año 2020, vemos que su porcentaje se sitúa en el 5 %. Estos datos nos indican que el sector de la avicultura de carne en España es un sector productivo con un peso importante.

En cuanto al número de explotaciones de avicultura en España, tenemos que, en enero del año 2020, había un censo de 19.633 explotaciones en activo. De estas, 7.116 eran explotaciones pollos y gallinas. Dentro de estas, las explotaciones de carne registradas en España en el año 2020, eran un total de 5.528, de las cuales 33 correspondían con granjas de selección, 335 granjas de multiplicación, 4.986 granjas de producción y 174 granjas de cría.

En 2020 el número de aves sacrificadas en España fue de un total de 800.617.000, de las cuales la gran mayoría corresponden a pollos broiler. Si lo traducimos a toneladas producidas por peso canal, tenemos 1.717.880 toneladas totales, de las cuales nuevamente la mayoría se corresponden con pollo broiler (1.400.215 broilers).

En cuanto a las producciones de carne de ave por comunidades autónomas, Andalucía (25,5 %), Cataluña (21,5 %) y Galicia (13,3 %) son las tres comunidades con mayor producción en el conjunto de España.

Es interesante observar así mismo que la producción de carne de aves en toneladas ha ido en aumento durante los últimos años. Así en 1986 la producción total en toneladas fue de 759.551 y en 2020 ascendió a 1.717.880 toneladas (2,26 veces más). Así mismo observamos que el porcentaje de carne de broiler sobre el total, ha pasado del 90,8 % en 1986 al 81,5 % en 2020, lo que nos indica que se ha ido diversificando el mercado de carne de ave con nuevas producciones y con el incremento de otras que ya existían, pero eran más minoritarias.

Dentro de la UE, España se sitúa en el segundo puesto en cuanto a toneladas de carne de ave producida con un 12,7 % del total, solo superada por Polonia (19,9 %). Si nos referimos solamente a carne de pollo, vemos que España se sitúa también en el segundo puesto con un 12,9 % sobre el total, por detrás de Polonia (20,3 %). Estos datos reflejan que, dentro de la Unión Europea, la producción de la avicultura de carne en España tiene también un papel destacado.

A nivel mundial, la UE ocupa el cuarto puesto en producción de carne de pollo con un 12,5 % del total solo por detrás de USA (20,5 %), China (14,8 %) y Brasil (14 %).

En cuanto al balance de exportaciones e importaciones de carne de ave en España, podemos observar que en el año 2020 se han exportado 241.169 toneladas y se han importado 218.582 toneladas, lo que convierte a España en exportadora neta, si bien está próxima al equilibrio. El destino principal tanto de las importaciones como de las exportaciones de carne de ave en España es la UE. Si consideramos la evolución histórica de las importaciones y exportaciones desde el año 1986 hasta el 2020, se comprueba que España ha pasado de ser un importador neto de carne en 1986 (15.973 toneladas importadas y 5.860 toneladas exportadas) a un exportador neto en 2020.

Todos estos datos, nos indican que el sector de la producción de carne de ave en España tiene una importancia capital dentro de las demás producciones ganaderas y su evolución es creciente.

1.3.- TIPOS DE GALLINAS Y GALLOS EN LA AVICULTURA INDUSTRIAL

El origen de la gallina moderna que conocemos en la actualidad, se remonta a animales salvajes que vivían en el sureste asiático sobre el 8000 AC. Hay diferentes teorías sobre cual fue realmente el antecesor de la gallina moderna. Algunos como Darwin (1868), creían que las gallinas eran originarias de una sola especie, otros como Alessandro Ghigi (1912), sostenían que eran producto del cruce de diversas especies.

Actualmente, la teoría mas aceptada es que la gallina moderna descende del cruce de 4 especies: *Gallus gallus*, *Gallus lafayette*, *Gallus someratii* y *Gallus varius*.

Lo que si parece claro es que eran animales originarios del sureste asiático y que comenzaron a ser domesticados alrededor del 8000 AC. Se cree que existió más de un foco de domesticación de estos animales. Posteriormente se fueron extendiendo hacia el oeste y llegaron a Europa a través de Persia y Egipto (Barroeta et al., 2011)

En el transcurso de los siglos, se han ido seleccionando animales y realizando diferentes cruzamientos hasta conseguir hoy en día 2.629 distintas razas de gallinas reconocidas (FAO, 2021).

La gallina es un animal de doble aptitud productiva: cárnica y huevos. Estas dos aptitudes son antagónicas en un mismo animal, así tenemos que animales muy ponedores de huevos producen poca carne

y viceversa. Durante el proceso de selección de las distintas razas de gallinas, se fueron seleccionando las mismas orientándolas a estas dos aptitudes productivas y obteniendo 3 tipos diferentes de aves en relación a su aptitud productiva: aptitud cárnica (pesadas y semipesadas), aptitud huevo (de huevo blanco y huevo moreno) y aptitud mixta (carne y huevo)

Los sistemas industriales de producción avícola, se caracterizan por usar animales muy seleccionados genéticamente. Así, en la avicultura intensiva no se acostumbra a utilizar razas puras sino híbridos comerciales con rendimientos superiores a las razas puras.

Existen en la actualidad, un pequeño número de empresas que controlan la práctica totalidad de las líneas híbridas comerciales. Estas empresas poseen su pool de líneas puras con las que realizan los diferentes cruzamientos y selecciones para poder ofrecer finalmente, un híbrido comercial capaz de obtener los máximos rendimientos productivos para los que ha sido diseñado. El origen concreto de los animales que integran las líneas puras de estas empresas no se conoce abiertamente, si bien se cree que tienen como base la White Legorn, Plymouth Rock, New Hampshire y White Cornish.

Estas empresas seleccionan a las aves en función de múltiples criterios de selección según el producto que demanda el mercado y el tipo de producción a la que se pretenda dedicar ese animal (producción de huevo o de carne). Así, por ejemplo, si las aves se dedican a la producción de carne, se seleccionan factores relacionados con esto como: índice de conversión, rendimiento de pechuga, calidad de patas, resistencia frente a enfermedades, etc. Si por el contrario se pretende obtener un animal dedicado a la producción de huevos, los criterios de selección serán: número de huevos producidos, tamaño de huevo, calidad de cáscara, color de la cáscara, etc.

En estas empresas, a partir de sus líneas puras, se van obteniendo piramidalmente los lotes de las denominadas *bisabuelas* o *GGP*. A su vez, de estos lotes de bisabuelas surgen los lotes de las denominadas *abuelas* o *GP*, que serán las encargadas de producir los lotes de *reproductoras* o *PS*.

En relación a la selección genética de estos animales en el caso de producción de carne, existe la gran dificultad de conciliar los

caracteres productivos que se busca en la descendencia de las reproductoras con los caracteres productivos que se buscan en las mismas reproductoras. Así, en el pollo de engorde se tratan de buscar parámetros como un bajo índice de conversión, alta velocidad de crecimiento o aumento del porcentaje de pechuga en relación al peso vivo del animal, mientras que en las reproductoras se buscan parámetros como el aumento del número de huevos producidos y una buena fertilidad de los mismos. Estos parámetros son en muchos casos antagónicos, por lo que el trabajo de selección para obtener un producto balanceado no resulta sencillo en absoluto.

Como ejemplo de líneas genéticas de reproductoras comerciales pesadas, podemos mencionar a la hembra *Ross Pm3* junto con el cruce de macho *Ross 308*. Estas aves son gallinas pesadas de aptitud puramente cárnica, que se caracterizan por producir pollos de rápido crecimiento, con índices de conversión bajos y pesos altos a los 45 días. Los índices productivos esperados de estas gallinas son de 173 huevos incubables acumulados a las 60 semanas de vida y un peso esperado a esa misma edad de 3,283 kg. Los machos son gallos pesados con un peso esperado a 60 semanas de 4,079 kg y diseñados para el cruce con gallinas pesadas. Son animales que producen pollitos orientados a la producción industrial e intensiva.

Como ejemplo de líneas genéticas de reproductoras semipesadas, podemos mencionar la hembra *Hubbard JA57* junto con el macho *Redbro* de la misma empresa genética. Estos animales son aves orientadas a la producción de pollo de carne de crecimiento lento. La producción esperada de las gallinas a 60 semanas es de 204 huevos incubables acumulados y un peso de la hembra de 2,220 kg. El macho empleado en el cruce es un macho semipesado con un objetivo de peso a 60 semanas de 4,5 kg. Los pollos producidos por estas aves son pollos de aptitud cárnica, pero de crecimiento más lento que los anteriormente descritos. Se suelen utilizar para la producción de pollo campero con salida al exterior.

Por último, como ejemplo de líneas genéticas de reproductoras ligeras orientadas a la producción de gallinas ponedoras podemos mencionar a la hembra *Lohmann Brown* junto con el macho *Lohmann Brown*, ambos de la empresa de genética Lohmann. Estas aves son

aves ligeras, que alcanzan pesos mucho menores que las dos estirpes anteriores, pero que tienen una gran capacidad de producción de huevos. Así, se espera que las gallinas a 60 semanas produzcan 216 huevos incubables acumulados y pesen 1,945 kg. En relación al macho, se espera un peso a 60 semanas de 2,990 kg. Los pollitos producidos por estos animales se utilizarán como futuras ponedoras de huevo comercial.

1.4.- APARATO REPRODUCTOR DE LAS AVES

La reproducción de la gallina, viene condicionada por la unión de gametos masculinos y femeninos para la formación del embrión que originará al individuo tras la eclosión. Las hembras y los machos presentan aparatos reproductores diferenciados que se describen a continuación (Castelló et al., 1989).

1.4.1.- Aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra es impar, ya que solo se presenta con su forma funcional en el lado izquierdo del cuerpo (Figura 1). El aparato reproductor derecho inicia su desarrollo durante las primeras fases embrionarias, pero rápidamente deja de desarrollarse y es totalmente vestigial en los animales adultos.

El aparato reproductor de la hembra presenta dos partes bien diferenciadas, el ovario y el oviducto, que tienen funciones diferentes:

1.4.1.1.- Ovario

El ovario es la gónada de la hembra, se sitúa en el lado izquierdo del cuerpo del animal, en la región sublumbar, próxima al riñón izquierdo, saco aéreo abdominal izquierdo, pulmón y debajo de la aorta y vena cava posterior. Está sujeto al techo de la cavidad abdominal por el ligamento mesoovárico y tejido conectivo. Su forma en aves adultas es similar a un racimo de uvas con 7-8 folículos con yema en diferente grado de formación y desarrollo.

El ovario presenta una triple función como formador de gametos femeninos, formador de yemas y formador de hormonas.

El ovario es el encargado de elaborar los gametos femeninos que darán lugar a la formación del embrión al unirse con los

espermatozoides del macho. El número de oocitos potenciales en un ovario de una gallina ronda los 3.000, la mayoría de los cuales no van a pasar de tamaño microscópico. Cuando la hembra nace, ya presenta en su ovario todos estos oocitos.

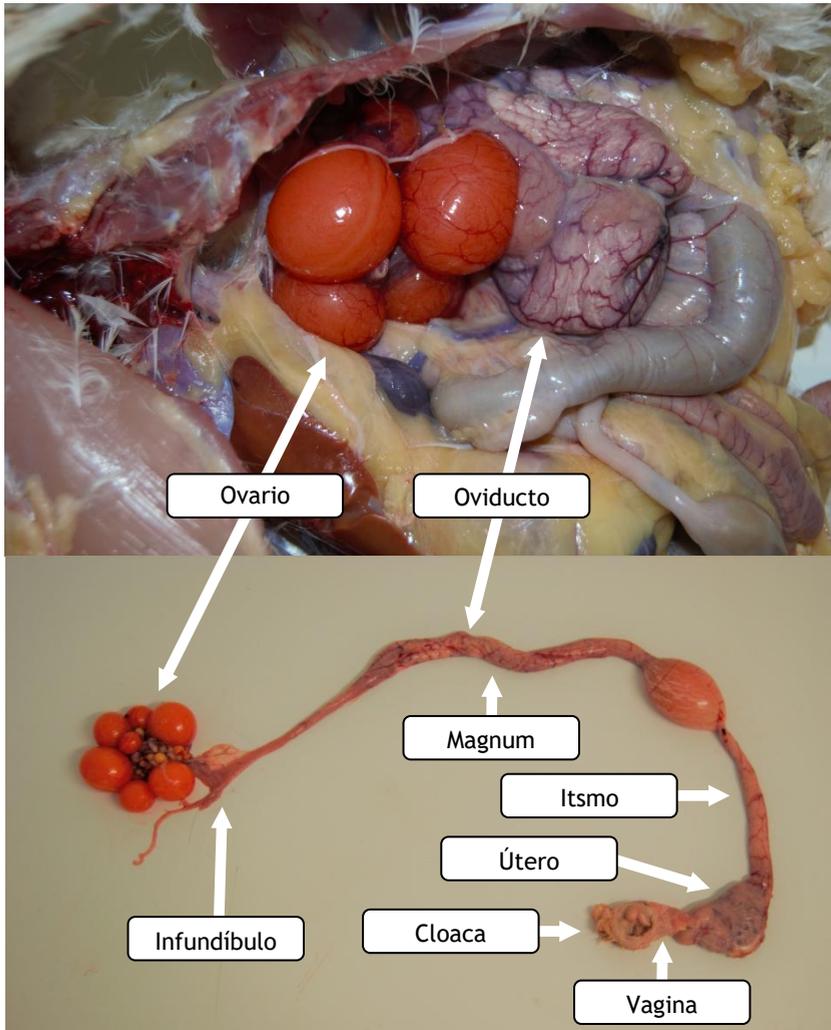


Figura 1. Aparato reproductor de la gallina.

El ovario será el órgano responsable de la formación de la yema que acompañará al embrión. Los constituyentes de la yema son aportados por nutrientes que llegan al ovario vía sanguínea (Etches, 1984). Podemos distinguir en la formación de la yema 3 periodos bien diferenciados:

- Fase de crecimiento lento: comprende desde el nacimiento hasta los 4-5 meses de edad del animal, momento en el que se irán depositando nutrientes hasta formar una yema de apenas 1 mm de diámetro.
- Fase de crecimiento intermedio: se produce en aquellos folículos seleccionados para producir un huevo, período en el que se depositan más nutrientes hasta conseguir un tamaño próximo a los 4 mm, durando hasta 60 días
- Fase de crecimiento rápido: se produce una rápida deposición de nutrientes durante 6-14 días previamente a la ovulación alcanzando la yema su tamaño definitivo de varios centímetros.

Como formador de hormonas femeninas, el ovario, bajo la influencia de las hormonas hipofisarias, formará tres tipos de esteroides sexuales (Bell et al., 1971):

- Estrógenos (estrona y estradiol): intervienen en el crecimiento del oviducto, síntesis de proteínas y lípidos de las diferentes partes del huevo, formación de la cáscara e implantación de los comportamientos de oviposición, así como la aparición de los caracteres sexuales secundarios en la hembra.
- Andrógenos: actúan estimulando la aparición de caracteres sexuales secundarios, así como en el desarrollo del oviducto y del hueso medular.
- Progesterona: regula los ritmos de ovulación y de oviposición, así como el comportamiento de puesta, el desarrollo del oviducto y la síntesis de proteínas del albumen.

1.4.1.2.- Oviducto

El oviducto es un órgano tubular hueco de aproximadamente unos 70 cm de longitud, replegado sobre si mismo, que se encuentra localizado en la cavidad abdominal, en su lado superior izquierdo. La

función del oviducto es recoger el folículo desprendido del ovario y formar la clara, las membranas y la cáscara del futuro huevo.

Dentro del oviducto se diferencian las siguientes partes:

- **Infundíbulo:** En la primera parte del oviducto y está próxima al ovario, aunque no sujeta al mismo. Presenta forma de embudo con pliegues en su interior y su función fundamental es la de captar los folículos maduros que se han desprendido del ovario próximo. Su longitud es de 6-8 cm aproximadamente y el tiempo de tránsito por esta parte es de aproximadamente 15 min.
- **Mágnum:** es la siguiente parte del oviducto y la más larga del mismo con una longitud aproximada de unos 35 cm. En su interior presenta una mucosa rica en células secretoras. Su función principal será la de formar la clara. El tiempo de tránsito por esta zona es de 3 h aproximadamente.
- **Istmo:** es la siguiente porción del oviducto con una longitud de aproximadamente 6-10 cm. A diferencia del magnum, el istmo presenta pocas células secretoras y si muchas fibras musculares. La función principal del istmo es la formación de las membranas de la cáscara. El tiempo de tránsito es de 1 h y 15 min aproximadamente.
- **Útero:** esta es una región de aproximadamente 12 cm de longitud y con forma de bolsa. Es una zona muy vascularizada y rica en células secretoras. La función de esta porción del oviducto es la de sintetizar la cáscara. La longitud del útero es de unos 10 cm aproximadamente y su tiempo de tránsito es de 18-22 h.
- **Unión útero-vaginal:** es una zona de transición entre el útero y la siguiente zona que es la vagina. Esta zona es importante ya que aquí aparecen unas estructuras particulares formadas por invaginaciones de la mucosa denominadas nidos espermáticos (Figura 2). En estos nidos espermáticos se alojarán parte de los espermatozoides aportados por el macho tras la monta y permanecerán viables durante varios días con el fin de poder fertilizar varios huevos.



Figura 2. Nidos espermáticos en el oviducto de una gallina (imagen cedida y con el permiso de Aviagen SAU).

- Vagina: es un órgano alargado con potentes fibras musculares lisas. Es la parte final del oviducto y su función está relacionada con el proceso de expulsión del huevo ya formado. La longitud de la vagina está alrededor de los 7 cm aproximadamente con un tiempo de tránsito de apenas unos minutos.

1.4.2.- Aparato reproductor del macho

El aparato reproductor del macho es un conjunto de órganos destinados a producir espermatozoides viables y conducirlos desde los testículos al órgano copulador para poder realizar la monta y posterior fecundación del óvulo en la hembra con el fin de originar un embrión viable.

El aparato genital masculino (Figura 3), a diferencia del femenino, es par en las aves, y está constituido por tres partes bien diferenciadas:

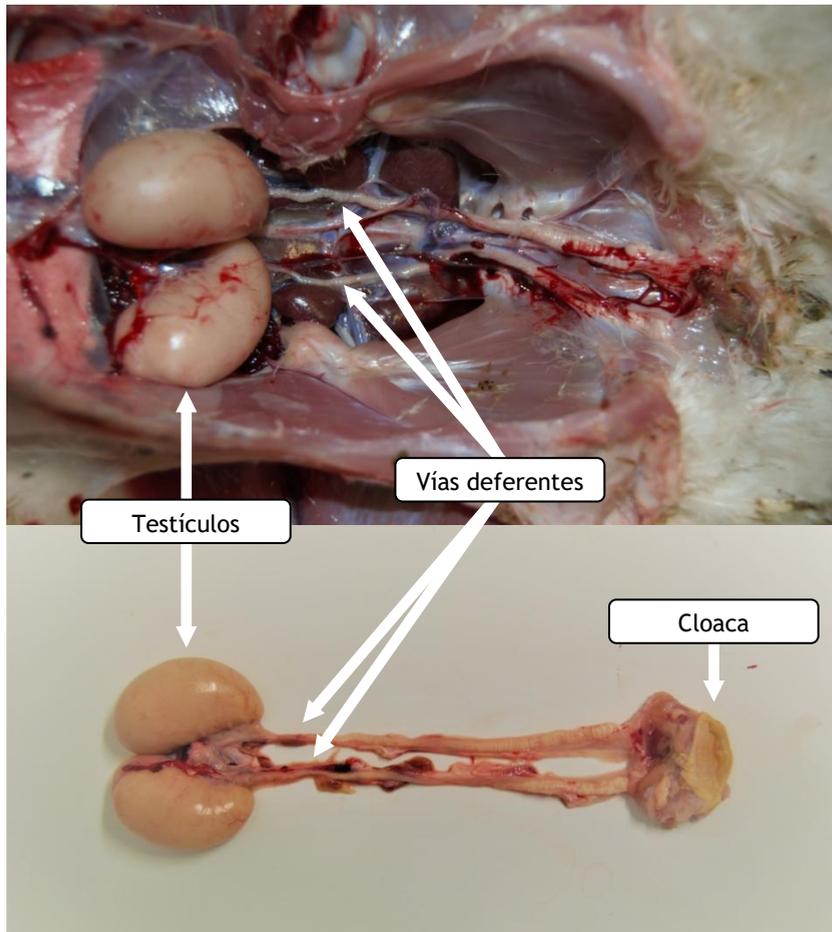


Figura 3. Aparato reproductor del gallo.

1.4.2.1.-Testículos

Los testículos en el macho de las aves, son órganos internos, pares y próximos a la base de los pulmones y los riñones. Presentan forma de judía de tamaño variable dependiendo de factores como la edad, estado corporal, época del año, etc.

Los testículos se encuentran suspendidos de la cavidad abdominal por un ligamento denominado mesorquio. Los testículos están protegidos a su vez por una cápsula conjuntiva de dos capas que les da protección y consistencia. De esta cápsula parten hacia el interior una

serie de tabiques o septos que dividen al testículo en lobulillos. Dentro de estos lobulillos se localizará el denominado parénquima testicular que es la parte formadora de gametos de la glándula. El parénquima testicular a su vez está formado por dos partes:

- Parénquima tubular: formado por los túbulos seminíferos y que ocupa la gran mayoría del volumen glandular. En el interior de estos túbulos seminíferos es donde se produce la espermatogénesis.
- Parénquima intertubular: formado por una red vascular y linfática, una red nerviosa y las denominadas células de Leydig encargadas de secretar esteroides sexuales (fundamentalmente testosterona)

1.4.2.2.- Vías deferentes

Los túbulos seminíferos encargados de producir los espermatozoides, convergen en la denominada *rete testis* y de ahí pasaran a los conductos eferentes, canal epididimario y finalmente a los conductos deferentes que discurren paralelos a los uréteres durante unos 10-15 cm hasta alcanzar las vesículas espermáticas.

La función de estas vías espermáticas será la de conducir los espermatozoides producidos en el testículo hasta el órgano copulador, así como la de terminar la maduración de los mismos y servir de zona de almacenamiento.

1.4.2.3.- Órgano copulador

Los gallos no tienen un órgano copulador propiamente dicho. Presentan una serie de pliegues redondeados en la zona de la cloaca que en el momento de la monta aumentan de tamaño formando una especie de canal que conduce el semen desde las vesículas espermáticas al interior del oviducto de la hembra.

En el caso de la gallina no se produce una verdadera penetración, si no un contacto entre las cloacas del macho y de la hembra.

1.5.- FECUNDACIÓN DE LA GALLINA

La fecundación de las hembras es un objetivo básico en las producciones de gallinas reproductoras ya que son la base de la obtención de huevo fértil apto para incubar.

En este sentido, podemos destacar dos sistemas principales en la avicultura moderna de reproducción para conseguir la fecundación de las hembras: la monta natural y la inseminación artificial

1.5.1.- Monta natural

Es la forma más extendida de conseguir la fecundación de las hembras. El proceso de monta natural tiene como principales ventajas en relación a la inseminación artificial que es una forma más simple y natural de conseguir la fecundación. Con animales sexualmente maduros, se produce este comportamiento de forma natural al juntar machos y hembras en una misma nave. Con el empleo de la monta natural se requiere menor inversión en instalaciones y requiere menor gasto en mano de obra que una nave de inseminación artificial.

El comportamiento de monta natural en la gallina pasa por diferentes fases. Comienza con el comportamiento de cortejo del macho hacia la hembra, en el que el macho realiza una especie de danza alrededor de la hembra formando círculos y bajando una de sus alas, concretamente la que se dirige hacia el interior del círculo que describe al bailar alrededor de la hembra. Posteriormente la hembra se agacha y abre ligeramente sus alas, lo que le indica al macho que está receptiva. En la siguiente fase, el macho monta a la hembra y se agarra con el pico a la cresta de la hembra o a las plumas o piel del cuello cercano a la cabeza, a la vez que se intenta asir con sus dedos a la base de las alas de la hembra (Figura 4).

Posteriormente el macho realiza movimientos rápidos y cortos y repetitivos con sus patas sobre el dorso de la hembra y termina el apareamiento cuando ambos componentes de la pareja juntan sus cloacas, momento en el que el macho libera el semen que pasará a la vagina de la hembra a través de la cloaca.



Figura 4. Monta natural.

Existen numerosos factores que van a influir en el mayor o menor éxito de fecundación de la hembra con el sistema de monta natural. Así podemos destacar como factores que influyen los siguientes:

- Ratio machos/hembras dentro de la manada: es importante controlar el número de machos en relación al número de hembras presentes en la nave de producción. Un exceso de machos derivará en problemas sociales y agresividad de los machos, lo que hará que las gallinas estén menos receptivas a las montas y por consiguiente la fertilidad total del lote decaiga. Así mismo, si reducimos demasiado el ratio machos/hembras presentes en la nave, la fertilidad total también se verá disminuida al no lograr ser montadas todas las hembras o por lo menos en un número de montas por hembra no adecuado que nos permita mantener la fertilidad total. El ratio adecuado macho/hembra dentro de la nave de producción

dependerá de diversos factores, pero como norma general podemos decir que al traslado de los animales a la nave de producción se alojará un 9,5-10 % de machos y se irá disminuyendo este porcentaje hasta el 7 % al final de la vida del lote.

- **Edad:** la edad es un factor que influye de manera decisiva en la fertilidad media del lote de reproductores. Así, a medida que los animales van aumentando en edad se observa una disminución de las tasas de fertilidad total del lote ya que se produce una disminución de la actividad sexual de los animales, una disminución del número de cubriciones efectivas, una disminución de la cantidad y calidad de los espermatozoides y una menor fertilidad de las hembras. La curva de fertilidad total típica en un lote de reproductores describe una curva que asciende rápidamente en las primeras semanas post traslado a la granja de puesta y desciende luego lentamente, pero de forma constante todas las semanas hasta el fin del ciclo productivo. Los valores de fertilidad media son muy variables dependiendo de numerosos factores como estirpe, condiciones ambientales, manejo, etc., pero podemos indicar que, como valores generales, las fertilidades medias se moverán entre un 90-95 % en pico hasta valores cercanos al 50 % al final del ciclo.
- **Condiciones ambientales:** las condiciones ambientales son un factor que juega un papel decisivo en la fertilidad media del lote. Al ser la monta natural un comportamiento propio y natural de los animales, todo aquello que perturbe y genere una situación de estrés o falta de confort a los animales, producirá un descenso de la fertilidad media del lote. Dentro de estas condiciones ambientales englobamos desde el correcto suministro y acceso a la comida y la bebida, hasta las condiciones de temperatura, humedad, corrientes de aire, niveles de gases nocivos (dióxido de carbono, amoníaco), iluminación, estado de las camas, etc.
- **Condición física de los animales:** La condición física de los animales va a influir también en la fertilidad media del lote al

influir en la monta natural. Así, animales que presentan un sobrepeso importante verán disminuida tanto su actividad sexual como tendrán así mismo un número mayor de montas fallidas al tener dificultades para completar con éxito la monta. Animales con niveles importantes por debajo del peso objetivo, también originarán menores fertilidades del lote al tener menor cantidad y calidad de semen y ser animales menos dominantes con lo que se producirán un menor número y frecuencia de montas. También cualquier defecto que se produzcan en los aplomos del macho, se traducirá en una menor frecuencia y éxito de las montas, reduciéndose la fertilidad total del lote. Una pobre cobertura de plumas en la zona dorsal de las hembras también se va a traducir en una disminución de las montas, al rechazar las hembras al macho por causarles este dolor cuando realiza la monta.

- Comportamientos anormales: las gallinas son animales sociales y de costumbres que aprenden comportamientos que una vez insaturados son difíciles de revertir. En este sentido se pueden producir a veces comportamientos de agresividad por parte de los machos (relacionados con otros problemas descritos con anterioridad) y que harán que las hembras muestren miedo o poca receptividad a la monta. Esto tendrá influencia decisiva en la fertilidad media del lote al reducirse el número total de montas y si no se soluciona rápidamente la situación, las aves aprenderán este comportamiento y será muy difícil poder revertir la situación.

1.5.2.- Inseminación artificial

La inseminación artificial es otra de las opciones para poder conseguir la fecundación de las hembras reproductoras.

Es una práctica menos extendida que la monta natural y su empleo presenta mayor interés en fases anteriores a las reproductoras como lotes de abuelas, bisabuelas o líneas puras en los diferentes procesos de selección genética.

Las principales ventajas de una granja de inseminación artificial en relación a una de monta natural son una mayor tasa de fertilidad

media total del lote, al no depender del comportamiento de los animales para realizar la fecundación de la hembra. Esto se hace especialmente visible a partir de la mitad de producción del ciclo y sobre todo en las fases finales del mismo. Otra ventaja de la inseminación artificial es una mayor versatilidad de producción, ya que permite la utilización de diversos tipos de machos con un mismo tipo de hembra con el fin de obtener diferentes tipos de pollo. Esto permite la posibilidad de tener una sola nave de producción con distintos machos y obtener de estos diferentes productos sin tener que tener distintas naves para cada uno (como sería en la monta natural).

Para la realización del proceso de inseminación, se precisará de personal especializado y entrenado para poder realizar la misma. Precisaremos al menos de personal que proceda a la extracción manual de semen a los machos, personal que insemine a las hembras depositando el semen extraído con anterioridad de los machos y personal que sujete a la hembra mientras se produce la inseminación propiamente dicha.

Antes de iniciar el proceso de inseminación, se deben preparar o entrenar a los machos para poder extraerles el semen de forma manual. El adiestramiento de los machos deberá comenzar unas 2-3 semanas antes de iniciar el aprovechamiento del semen. En este periodo se comenzará a masajear el abdomen y el dorso de los machos y posteriormente estos masajes se irán haciendo más intensos y culminando con una suave presión en la zona de las vesículas seminales y de la cloaca con los dedos pulgar e índice. Se ha de evitar en todo momento someter al macho a cualquier estrés innecesario que influiría negativamente el comienzo de su producción de semen. Las primeras veces el semen será escaso y de mala calidad e irá mejorando a medida que se repita esta práctica (Santiago, 2010).

Cuando los machos estén entrenados y listos para realizar la inseminación, el operario procederá a extraer el semen del macho con la técnica descrita con anterioridad. El eyaculado del macho se recogerá en un recipiente adecuado para tal fin. El semen del macho ha de ser blanco perla y se tendrá especial cuidado en que no lleve ninguna impureza (heces especialmente), que no tenga restos de

sangre o cualquier coloración anormal. Si esto sucediese se deberá desechar.

La frecuencia de extracción varía según las necesidades de producción, pero como norma general tendremos como objetivo hacer entre 2-3 extracciones a cada gallo en una semana, dejando al menos un día de descanso entre extracciones.

Una vez que tenemos el semen se procederá a sujetar a la gallina con cuidado por las patas y alas con el fin de inmovilizarla y mostrar al inseminador la zona de la cloaca.

En esta situación, el inseminador retirará hacia atrás la cola de la hembra y hará una suave presión alrededor de la cloaca con el fin de dejar a la vista el orificio de inicio de la vagina (Donoghue y Wishart, 2000). Posteriormente se introducirá la cánula de inseminación en el interior de la vagina disminuyendo la presión ejercida sobre la zona para que la vagina vuelva a su situación natural y se procederá a introducir la cánula unos 5 cm recta y los últimos 2,5 cm dirigiendo la cánula hacia abajo y ligeramente hacia la izquierda con un pequeño giro de muñeca. Una vez introducida la totalidad de la cánula de inseminación se procederá a liberar la dosis de semen necesaria y se retirará de nuevo con cuidado la cánula. Finalmente, el operario que sujetaba a la hembra deberá dejarla de nuevo en el suelo con cuidado para evitar el reflujo del semen depositado con anterioridad.

1.6.- EVALUACIÓN Y FACTORES DE CALIDAD DEL SEMEN

El semen se define según la RAE como el conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana.

El semen está compuesto por dos partes bien diferenciadas que son los espermatozoides y el plasma seminal (Tabla 1).

Tabla 1. Características del semen de gallo (Garner, 2002).

Volumen de eyaculado	0,2-0,5 ml
Concentración espermática	3.000-7.000 millones/ml
Movilidad espermática	60-80 %
Morfología espermática normal	85-90 %
Proteína	1,8-2,8 g/100ml

Los espermatozoides se definen como la parte del semen con capacidad de fecundar el ovocito de la hembra para formar un embrión. Los espermatozoides del gallo tienen forma alargada y en ellos se pueden apreciar tres regiones bien diferenciadas: cabeza (con forma filamentososa, mide de 12 a 13 micras y en ella se sitúa el núcleo en el que se contienen los cromosomas), pieza intermedia (porción rica en mitocondrias y de 4 micras de longitud) y cola (parte distal con una longitud de 100 micras, se encarga de la motilidad del mismo).

La segunda parte del semen es el denominado plasma seminal, que se define como el conjunto de secreciones procedentes de las diferentes glándulas del aparato genital del macho y que tendrán como objetivo asegurar la supervivencia de los espermatozoides desde su formación hasta su fusión con el ovocito de la hembra (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes del plasma seminal del gallo (Etches, 1996).

Componente	Concentración (mM)
Glucosa	0,18 mM
Cl ⁻	46 mM
Na ⁺	145 mM
K ⁺	13 mM
Ca ⁺	1,4 mM
Glutamato	75 mM
Lactato	3,7 mM
Piruvato	0,3 mM
Alfa-cetoglutarato	0,4 mM
Carnitina	3,2 mM
Acetil carnitina	0,5-2,0 mM
Proteína	8 mM

1.6.1.- Evaluación de la calidad del semen

El objetivo fundamental en la evaluación de la calidad del semen en relación a la técnica de inseminación artificial, es poder predecir la capacidad real de fertilización de los espermatozoides presentes en el mismo.

En este sentido, tenemos diferentes índices que nos dan información de la calidad del semen obtenido de un gallo reproductor, destacando tres: volumen del eyaculado, concentración de espermatozoides y viabilidad de los mismos.

1.6.1.1.- Volumen del eyaculado

Con este parámetro medimos la cantidad de semen obtenido de un macho reproductor. El volumen se puede obtener mediante el uso de recipientes graduados para tal fin o indirectamente por su peso ya que su densidad es muy parecida a la del agua (Sauver y Reviers, 1992).

1.6.1.2.- Concentración de espermatozoides

La concentración de espermatozoides en un eyaculado nos permitirá estimar la cantidad de espermatozoides presentes en el mismo por ml y poder determinar la dosis necesaria a aplicar por hembra con el fin de tener éxito en el proceso de inseminación artificial.

Los métodos para evaluar la concentración de espermatozoides actualmente disponibles son:

- Métodos directos: aquellos en los que se evalúa la cantidad de espermatozoides en un volumen fijo de muestra contando los espermatozoides presentes en la misma. Se suelen usar hematímetros y se precisa que los espermatozoides están muertos para evitar migraciones, se tienen que aplicar diluciones sobre el semen puro y se precisa de un tiempo de decantación de la muestra para que los espermatozoides lleguen al suelo de la cámara de contaje. El mayor inconveniente de este método es la lentitud y dificultad de realizar estos contajes.
- Métodos indirectos: aquellos en los que se evalúa la cantidad de espermatozoides presentes en un volumen fijo de muestra, utilizando la capacidad de dispersión de la luz debido a la presencia de espermatozoides en la misma. Se precisa el empleo de un fotómetro para realizar las mediciones. Se debe hacer una lectura de una muestra sin semen (blanco) y

posteriormente de semen diluido. Con las lecturas obtenidas en el fotómetro se puede estimar de una forma bastante precisa la concentración de espermatozoides por ml de semen. El mayor inconveniente de estas técnicas es que debemos asegurarnos de que la muestra de semen no presente impurezas (restos de heces, sangre, etc.) ya que la presencia de cualquier sustancia ajena al semen nos puede desvirtuar los resultados

1.6.1.3.- Viabilidad de los espermatozoides

En este apartado se agrupan aquellos métodos que permiten no solamente medir cuantos espermatozoides hay en una muestra, si no determinar cuantos de ellos son realmente viables para poder fecundar el huevo y originar un embrión viable.

Aquí podemos mencionar varios métodos como es el de la motilidad masal del semen, que mide la motilidad global de los espermatozoides presentes en el semen del gallo. Este análisis se puede realizar visualmente de forma directa, pero con resultados variables según el observador. También se puede realizar utilizando aparatos mas especializados que son capaces de cuantificar el movimiento de los espermatozoides. Son procedimientos más caros y complejos pero que arrojan datos más objetivos.

Otro método es el de la determinación de la motilidad individual que mide la motilidad individual de los diferentes espermatozoides presentes en la muestra. Aquí se va a determinar no solo los espermatozoides móviles, si no aquellos que se mueven de la manera adecuada para poder realizar su función de fecundación de manera correcta. La cantidad de espermatozoides que presenten una motilidad adecuada en relación a los espermatozoides presentes, nos dará información acerca de la calidad del semen que estamos evaluando.

El método de evaluación de malformaciones espermáticas nos permitirá identificar aquellos espermatozoides que presenten cualquier tipo de malformación que los hace no aptos para la fecundación. La cantidad de espermatozoides con malformaciones en relación a la cantidad total de los mismos en la muestra, nos dará información sobre la calidad del semen que estamos evaluando. En este sentido, podemos destacar la citometría de flujo. Esta técnica se basa en hacer

pasar a los espermatozoides por un fino tubo sobre el que incide un haz de luz laser. La luz dispersada por el paso de los mismos es recogida por sensores que nos permiten determinar el número de espermatozoides presente en la muestra, así como el porcentaje de espermatozoides vivos y ciertas características de los mismos como el tamaño y la forma.

Otras técnicas indirectas de evaluación de la calidad del semen son las de reducción de colorantes, en las que se determina la reducción de ciertos colorantes como la resazurina o el azul de metileno que se añaden a la muestra a evaluar. Se precisa de condiciones de pH, temperatura y concentración de espermatozoides muy estandarizadas.

A partir de los años 80 del pasado siglo, aparecen los sistemas CASA (Computer Assisted Semen Analysis), que son sistemas basados en el análisis informático de imágenes. Estos sistemas nos permiten obtener distintos parámetros de movilidad espermática que describen detalladamente los movimientos de los espermatozoides, permitiendo su clasificación en base a umbrales de velocidad y tipo de trayectorias bien definidas. Los resultados obtenidos se basan en valores numéricos y no subjetivos, lo que permite la comparación de resultados entre muestras que utilicen el mismo sistema, incrementándose así las posibilidades de estandarizar los resultados. Son sistemas de evaluación del semen que ofrecen una alta precisión, reproductibilidad de resultados objetivos, fácil manejo y mayor rapidez frente a los métodos manuales (Ammann y Katz, 2004).

1.6.2.- Factores que influyen en la calidad del semen

Los factores que van a tener influencia en la calidad del semen producido por un gallo son múltiples y variados. Así, aunque existen muchos, podemos destacar los siguientes:

- **Edad:** una vez que el macho comienza a producir semen y empieza a mejorar la calidad del mismo tendiendo un pico máximo entre las 28-30 semanas de vida. Posteriormente, la calidad del semen irá disminuyendo de forma paulatina hasta el sacrificio, de forma más notable a partir de la semana 35-40 de vida del animal. Con la edad disminuye el volumen de

eyaculado, la motilidad de los espermatozoides, la concentración espermática total y aumentan las anomalías espermáticas (Juarez-Carachatea, 2018).

- **Tamaño de los testículos:** La calidad del semen está relacionada con el tamaño testicular y este se relaciona a su vez con el peso del macho. Animales con pesos por debajo del estándar y conformación corporal pobre, tendrán un tamaño testicular bajo con peor producción de semen (Tabla 3). Animales con sobrepeso y exceso de conformación corporal tendrán también tamaños testiculares por debajo de lo esperado. Sin embargo, animales con peso dentro del estándar y buena conformación corporal tendrán tamaños testiculares óptimos.

Tabla 3. Comparación entre del tamaño testicular en gallos de diferentes pesos y conformaciones a las 35 semanas de vida (Jhon Powley, 2008).

3,2 kg (pobre conformación)	27 g
4,8 kg (buena conformación)	43 g
5,3 kg (exceso de conformación)	29 g

- **Ambiente:** las condiciones de temperatura idóneas para la correcta producción de semen se encuentran entre los 15 y 25 °C. Por debajo de los 15 °C puede disminuir el número de espermatozoides si los gallos no puedan alimentarse correctamente para mantener sus necesidades a esas temperaturas bajas. Por el contrario, si pasamos de 25 °C sí que se verá una disminución de la producción de espermatozoides, siendo mas evidente cuando superamos los 30 °C (Sauver y Reviers, 1992).
- **Variabilidad individual:** Existe una variabilidad individual entre individuos del mismo origen y de la misma recría. En situaciones normales podemos encontrar coeficientes de variación de 20-30 que pueden aumentar con la edad (Sauver y Reviers, 1992).
- **Sistemas de manejo del semen en inseminación artificial:** Podemos influir de manera indirecta en la calidad resultante

del semen recogido del macho para inseminación artificial. Cualquier aspecto que incida en una mala praxis en el manejo del semen una vez extraído del gallo, resultara en una menor calidad del semen. Así podemos destacar contaminación de la muestra sacada (por restos de heces, sangre, plumas, etc.), almacenamiento a temperaturas bajas, tiempo excesivo tras la extracción y la aplicación, uso de sustancias espermicidas (restos de detergentes y desinfectantes en los recipientes que estarán en contacto con las muestras), etc.

1.7.- MANEJO DEL HUEVO INCUBABLE

El huevo incubable contiene en su interior un embrión vivo resultado de la fecundación del huevo por parte del macho. El correcto manejo de este huevo, desde que la hembra lo pone hasta que se incuba, es fundamental para tratar de reducir al máximo la mortalidad embrionaria y obtener así el máximo número de pollitos viables totales por número de huevo fértil producido.

Como un primer objetivo a lograr en un buen manejo del huevo incubable, está el de tratar de frenar el desarrollo embrionario antes de que se produzca la incubación del huevo. Esto se conseguirá disminuyendo la temperatura del huevo por debajo de los 23 °C con el uso de cámaras de conservación adecuadas que mantendrán al huevo a temperatura y humedad relativa constante. Es importante, no solo bajar la temperatura del huevo, si no también evitar oscilaciones de la misma para que no se produzcan inicios y paradas del desarrollo embrionario que originarán mortalidades embrionarias asociadas.

Como segundo objetivo a la hora de considerar el manejo del huevo incubable, tendremos el de evitar contaminaciones del mismo. Se busca evitar que bacterias presentes en el exterior del huevo puedan acceder al interior del mismo para colonizarlo y provocar la muerte del embrión. Esto se logrará conservando íntegras todas las barreras que de forma natural presenta el huevo para lograr este objetivo (Álvarez-Solano, 2015). Estas barreras naturales son las siguientes (Figura 5):

- Cutícula: cubierta delgada y transparente de naturaleza proteica que recubre la cáscara. Permite el paso de gases a

través de ella, pero no de microorganismos. La cutícula no es sólida en el momento de la puesta y se endurece tras los 2-3 primeros minutos después de la puesta. Este es un periodo crítico en relación a las posibles contaminaciones bacterianas, ya que antes de su endurecimiento, la cutícula no es totalmente funcional y por tanto en ambientes con una elevada carga microbiana, se puede producir una contaminación del interior del huevo.

- **Cáscara:** entramado sólido de naturaleza fundamentalmente mineral, con un 96 % de sales de calcio. Protege al embrión y las estructuras internas asociadas de agresiones del exterior (tanto mecánicas como biológicas). Presenta múltiples poros en su superficie para permitir el intercambio gaseoso y la pérdida de humedad del embrión durante el desarrollo del mismo. Estos poros están protegidos por la cutícula, pero son potenciales puntos de entrada de gérmenes si se producen pérdidas de integridad de la misma. Así mismo, cualquier daño que se produzca en la cáscara (fisuras, roturas, etc.) serán también puntos de riesgo para la entrada de patógenos al interior del huevo.

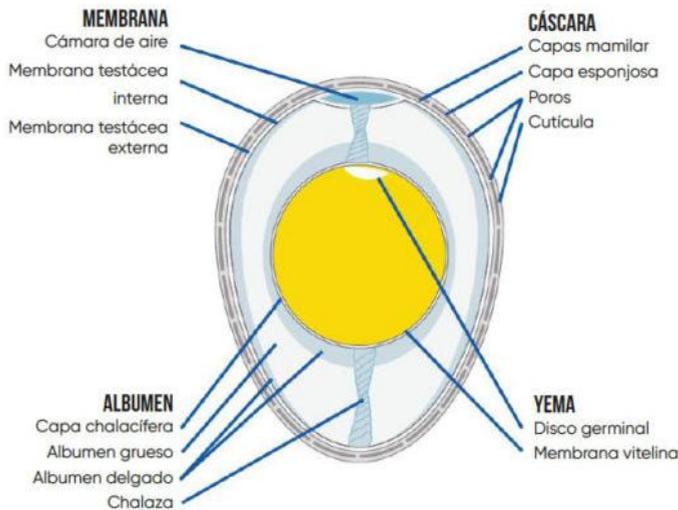


Figura 5. Estructura del huevo (imagen cedida y con el permiso de Aviagen SAU).

- Membranas de la cáscara: son dos y se sitúan por debajo de la cáscara y están compuestas mayoritariamente por fibroproteínas y polisacáridos. Sirven de base a la cáscara y representan una nueva barrera a los microorganismos que pudiesen alcanzar este punto procedente del exterior.
- Proteínas de la albúmina: dentro de la albúmina, tenemos presentes lisozimas y globulinas con propiedades antibacterianas.

1.7.1.- Medidas de manejo de huevo incubable en granja

De acuerdo a los objetivos citados con anterioridad, existen una serie de medidas para el correcto manejo del huevo incubable en una nave de producción de reproductoras entre las que cabe destacar en primer lugar la limpieza de nidales. Antes de cualquier otra consideración en cuanto a recogida de huevo incubable en granja, debemos asegurarnos que los nidales donde van a realizar la puesta las aves se encuentren limpios y secos. El objetivo de esta medida es disminuir al máximo posible la carga microbiana en el lugar donde se depositen los huevos. A tal fin se deberá revisar diariamente al final de la jornada el estado de cada nidal y limpiar aquellos que no estén en condiciones. Igualmente se deberá implementar un programa de limpieza y mantenimiento de los nidales de forma programada y periódica con el fin de tener siempre controlada la carga microbiana en ellos.

Otro aspecto importante a tener en cuenta será la frecuencia de recolección. Así se deben realizar recolecciones del huevo puesto por las gallinas lo más frecuentemente posible. Al menos se deberán realizar 4 recogidas a lo largo del día, procurando que no se recoja más del 30 % del volumen de puesta diario en cada una de estas recogidas. Es importante que al final de la jornada nos aseguremos de que no queden huevos sin recoger en la nave. El objetivo de la recolección es que no pasen más de 3 h desde que la gallina pone el huevo hasta que es desinfectado y almacenado en la cámara de almacenamiento correspondiente.

Una tercera medida a llevar a cabo será la separación del huevo de suelo. Si bien nuestro objetivo será no tener puesta en el suelo,

siempre hay un porcentaje de aves que pondrán sus huevos directamente en el suelo y no en el nidal. Este huevo tendrá una mayor carga bacteriana al ser puesto directamente en el suelo y por tanto será más susceptible de presentar problemas de contaminación. Por esta razón, este tipo de huevo se deberá recoger siempre de forma separada del huevo de nidal y nunca se mezclará con este. La frecuencia de recogida de este tipo de huevo deberá ser incluso mayor que la del huevo de nidal normal.

La selección del huevo incubable es también otra medida a tomar en relación al correcto manejo del huevo incubable. Una vez recogido el huevo producido por las gallinas, se procederá a realizar una selección del mismo descartando aquellos que no son aptos para su posterior incubación. Se deberán retirar los siguientes tipos de huevo no apto: rotos, fisurados, deformes, pequeños (menores de 45 g), dobles o sucios. Una vez eliminados los huevos no aptos para la incubación, se procederá a ir colocando los huevos aptos en bandejas, que a su vez se situarán en carros para su transporte hasta la planta de incubación. El llenado de estos carros debe hacerse siempre comenzando por la parte inferior de los mismos, con el fin de evitar que una vez que el huevo se enfríe en la bandeja, vuelva a recibir calor de huevos mas recientes que todavía no se han enfriado.

Un buen manejo del huevo incubable debe contemplar la correcta desinfección del mismo. Tras realizar la selección del huevo y descartar aquellos que nos sirven para incubar, se procederá a realizar una primera desinfección. El fin de este procedimiento es disminuir la carga bacteriana total de la superficie del huevo antes de su introducción en las máquinas de incubación. Existen diferentes métodos para realizar esta desinfección, entre los que podemos destacar: fumigación (método químico en el que se emplean diferentes productos biocidas tales como peróxidos de hidrógeno, glutaraldehídos, derivados del formol, amonios cuaternarios, etc.) o rayos ultravioletas (método físico en el que se emplean lámparas de luz ultravioleta que irradiaran toda la superficie del huevo para eliminar los microorganismos presentes en la misma).

Otra medida a tomar en relación al manejo correcto del huevo incubable, será la conservación del mismo en una cámara que

mantenga las condiciones necesarias para su correcta conservación del huevo hasta iniciarse el proceso de incubación. En esta cámara existirán equipos adecuados para conseguir las condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas. Así en relación a la temperatura podemos indicar que nunca deberá superar los 23 °C para conseguir detener el proceso de multiplicación celular del embrión hasta que se inicie la incubación.

Según el tiempo que van a estar alojados los huevos en la cámara, tenderemos que ajustar la temperatura de la misma (Tabla 4).

Tabla 4. Recomendaciones de temperatura según los días de almacenaje (Tullet, 2010).

Temperatura	Días de conservación
20-23 °C	1-3 días
15-18 °C	4-7 días
12-15 °C	> 7 días

Es importante en todo caso, mantener siempre una temperatura de 2 °C superior en la cámara de conservación respecto a la temperatura del camión de transporte y de la sala de conservación de la incubadora para evitar problemas de condensaciones en la superficie de la cáscara del huevo. Así mismo se deberán evitar corrientes directas de aire frío o caliente sobre los huevos almacenados, procedentes de los equipos de climatización de la cámara de conservación. En cuanto a la humedad relativa de la cámara de conservación, deberá de estar en un rango del 70-80 %. Humedades relativas muy bajas podrían producir deshidrataciones de los huevos y humedades relativas muy altas podrían producir problemas de condensaciones sobre la superficie de los huevos y proliferación de hongos y bacterias asociados a estas condiciones.

1.8.- DETERMINACIÓN DE HUEVOS FÉRTILES

Tras la fecundación del óvulo, el huevo tarda aproximadamente 1 día en completar su formación y ser puesto. En ese momento, el óvulo fecundado cuenta ya con unas 60.000 células que se organizan con

una forma característica que permite su identificación como huevo fértil. (Tullett, 2010).

La determinación de la fertilidad de un huevo se hace visualmente y se precisa un entrenamiento previo, sobre todo para determinar la fertilidad en estadios tempranos de incubación.

Para determinar la fertilidad del huevo se colocará el huevo en un alveolo que lo sujete con el polo fino hacia abajo. Se realizará una pequeña incisión en la cáscara del polo ancho y con la ayuda de unas tijeras se recortará una porción circular de la misma que posteriormente se retirará. Una vez retirada esta porción de la cáscara, podremos ver la yema del huevo y buscaremos las formaciones esperadas según la edad a la que realicemos el diagnóstico.

Existen al menos tres momentos en los que se puede determinar visualmente la fertilidad del huevo, utilizando huevo fresco, huevo parcialmente incubado 1-5 días y huevo parcialmente incubado a 8-10 días.

1.8.1.- Huevo fresco

Se puede determinar la fertilidad del huevo recién puesto, antes de ser incubado. Si el huevo es infértil, aparecerá sobre la superficie de la yema un blastodisco. Este blastodisco será una estructura blanquecina densa de aproximadamente 2 mm de diámetro, con forma irregular y nunca perfectamente redondeada. Alrededor de esta estructura aparecerá un área de color claro de unos 4 mm de diámetro con formaciones en forma de burbuja en su interior.

Si el huevo es fértil, aparecerá un blastodermo que se presenta con una estructura en forma de disco de unos 4 mm de diámetro. Será una estructura bien delimitada con forma de rosquilla con una parte central más transparente que en ocasiones presenta una pequeña mancha blanca en su centro.

1.8.2.- Huevo parcialmente incubado 1-5 días

La determinación de la fertilidad del huevo incubado entre 1 y 5 días tras la fecundación es un método más sencillo, con menos margen de error y que precisa menos entrenamiento que la determinación en huevo fresco.

Si el huevo es infértil, aparecerá una pequeña macha blanquecina sobre la yema, muy similar a la imagen del blastodisco que aparecía en el huevo infértil fresco.

Si el huevo es fértil, dependerá de los días de incubación las estructuras que podamos apreciar. Así con un día de incubación aparecerá sobre la yema una membrana en forma de anillo de color crema de 1 cm aproximadamente de diámetro. Con dos días de incubación aparecerá el anillo citado anteriormente por toda la superficie superior de la yema; y con tres días o más se empiezan a ver las estructuras del sistema circulatorio con claridad.

1.8.3.- Huevo parcialmente incubado a 8-10 días

Esta técnica consiste en aplicar a los huevos colocados en sus bandejas de incubación, una fuente de luz sobre uno de sus polos con el fin de detectar la presencia de los denominados huevos claros, que se corresponderán con huevos infértiles o que han sufrido abortos tempranos.

La técnica del miraje tiene como ventaja que podemos estimar la fertilidad de una muestra de huevos sin destruir huevos fértiles y por tanto sin producir mermas en la producción final de pollitos.

Como inconveniente de esta técnica, podemos indicar que la cantidad de huevos claros no se corresponde exactamente con huevos infértiles, y que algún huevo claro puede corresponderse a huevos fértiles que han detenido su desarrollo en estadios tempranos. Para poder acercarnos a los valores reales de infertilidad de la muestra, tendríamos que abrir todos los huevos claros y determinar cuantos de ellos se corresponden a infértiles reales y cuales a abortos tempranos.

Se puede realizar esta técnica aprovechando el momento de la transferencia de los huevos desde las incubadoras hasta las nacedoras (18 días de vida). El problema de realizar el miraje tan tarde, es que resultará mucho más difícil poder determinar en los huevos claros, cuales son infértiles y cuales son abortos tempranos, por los procesos de deterioro que sufre durante este tiempo el contenido del huevo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1.- OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es determinar cuáles son los principales aspectos que tienen una influencia significativa en el proceso de inseminación artificial en gallinas y evaluar su posible aplicación a la realidad productiva y económica de una granja de reproducción industrial.

2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener un método válido, objetivo y fiable para seleccionar los mejores machos reproductores de un lote.
2. Evaluar las ventajas del empleo de los machos seleccionados con anterioridad en relación a la fertilidad de las hembras inseminadas con los mismos.
3. Estudiar el efecto del uso de diluyentes seminales sobre la fertilidad de un lote de gallinas reproductoras inseminadas con técnicas de inseminación artificial, en relación al empleo de semen puro sin diluir.
4. Establecer la influencia de las diferentes composiciones de dos diluyentes seminales sobre la fertilidad de un lote de gallinas reproductoras inseminadas con técnicas de inseminación artificial.
5. Determinar la relación entre la frecuencia de inseminación y la fertilidad de un lote de gallinas reproductoras pesadas, semipesadas y ligeras y definir cuál es la frecuencia óptima de inseminación en cada uno de los casos.
6. Valorar el efecto del tiempo transcurrido entre la extracción del semen y la inseminación en un lote de gallinas pesadas, semipesadas y ligeras y determinar cuál es el periodo de

tiempo máximo que podemos mantener el semen tras su extracción sin que se vea comprometida la capacidad fertilizadora del mismo.

7. Comprobar si las técnicas de selección de machos reproductoras y el empleo de diluyentes, resultan económicamente viables en condiciones reales de producción.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial se define como el proceso de transferencia de gametos del macho hasta alcanzar el ovocito de la hembra por métodos diferentes a la monta natural mediados por el ser humano (Long y Kulkarni, 2004).

Las primeras referencias documentadas de la técnica de inseminación artificial en animales, se remontan al siglo XVIII. En esta época, Spallanzani realiza los primeros intentos de inseminación artificial y consigue obtener la primera inseminación exitosa con una perra (Walton, 1993).

El auténtico desarrollo de las técnicas de inseminación artificial en animales tiene lugar a partir de la década de los 40 del siglo XX, vinculado con trabajos de universidades de Estados Unidos (Salisbury, 1978).

Las primeras producciones a nivel comercial realizadas con las técnicas de inseminación artificial en avicultura, se realizan en Israel y Australia, pasando posteriormente a USA (Mohan et al., 2018). Estas técnicas de inseminación artificial en aves se extendieron sobre todo a los pavos, debido al problema que supone su gran dimorfismo sexual, y a las pintadas, por su acentuada variación estacional, pero no tanto a las gallinas (Billard, 1993).

En relación a las aves, los primeros intentos de extracción de semen datan de 1936. En este año, Burrows y Quinn describen el método de masaje dorso-abdominal en el gallo para la obtención de semen fresco. El método descrito consistirá en masajear el abdomen y el dorso de los machos culminando con una suave presión en la zona de las vesículas seminales y de la cloaca con los dedos pulgar e índice. (Burrows y Quinn, 1937). Este método es válido para todas las aves en general, si bien se requieren adaptaciones específicas para cada especie en concreto debido a las variaciones anatómicas de las mismas

(Fukuhara y Ohboshi, 1991). Con posterioridad, se han propuesto diferentes variaciones del método de Burrows y Quinn, aunque las bases y fundamentos del mismo se mantienen (Watson, 1978; Bask y Wishart, 1994; Francesch, 1994; Donoghoe y Wishart, 2000; Poto et al., 2007).

En la actualidad existe un gran potencial en la utilización de las técnicas de inseminación artificial, ya que estas nos permiten ejercer un mejor y más eficaz control sobre la producción y además son técnicas no excesivamente complejas en cuanto a su aplicación (Jacome y Jadira, 2005)

Existen numerosos estudios en los que se pueden apreciar las ventajas que presenta el empleo de la inseminación artificial en aves. Así, la producción de semen en aves se ve afectada tanto en su cantidad como en su cantidad por factores estacionales en las aves. La técnica de inseminación artificial nos va a permitir eliminar o al menos disminuir de forma importante estas variaciones. En el caso de producciones muy específicas como es el caso del mantenimiento y reproducción de líneas genéticas puras o de gran valor comercial, la inseminación artificial es sin duda un método de elección ideal (Etches, 1996; Pollock, 1999).

Otro factor como es el peso de los machos reproductores, se ha visto que tiene influencia en cuanto al rendimiento reproductivo del lote en condiciones de monta natural (Djermanovic et al., 2017). Con las técnicas de inseminación artificial, se pueden ver atenuadas estas diferencias.

También en relación a situaciones de conservación y recuperación de especies de aves que se encuentran en peligro de extinción, la inseminación artificial se convierte en el método de elección por las ventajas que esta presenta (Hernández et al., 2005).

Otras ventajas del empleo de las técnicas de inseminación artificial en aves son que permite la reproducción de especies comerciales que presentan un gran dimorfismo sexual que no podrían reproducirse de otra manera (como ocurre con el caso de los pavos); podemos tener un menor porcentaje de machos en la manada, pasando de un ratio macho/hembra del 7-10 % al 2-3 %; permite un menor coste de alimentación al tener menor necesidad de machos en la

manada; se consiguen amortiguar las caídas de calidad espermática en el macho o la disminución de la capacidad de almacenaje de espermatozoides en la hembra, relacionadas todas ellas con la edad; y permite disminuir la contaminación de los huevos puestos mejorando el porcentaje de aprovechamiento de los mismos (Sauveur et al., 1992).

Con el empleo de la inseminación artificial en la producción, se pueden obtener una cantidad de huevos fértiles aptos para incubar mayor que con los métodos tradicionales. Así mismo, esta técnica nos permite también llevar un mejor control sanitario de los lotes, lo que finalmente influirá en una mejor calidad del pollito obtenido (Jacome y Jadira, 2005).

Con el empleo de las técnicas de extracción de semen e inseminación artificial, podemos realizar un mayor control de los machos de la manada, con el fin de seleccionar a los más aptos para introducirlos como reproductores y eliminar a los de inferior calidad (Sauveur et al., 1992).

En los programas de selección genética en los que se evalúa la capacidad fecundante de las diferentes líneas, la inseminación artificial es la técnica indicada para su realización (Poivey et al., 2001).

Si comparamos la monta natural frente a la técnica de inseminación artificial, podemos observar una mayor variabilidad en la monta natural. Esto se debe a factores como diferencias individuales de los machos de la manada, preferencias de estos por determinadas hembras dentro del lote y diferencias en cuanto al número de montas realizadas por cada macho (Cecil y Bakst, 1990). En estudios posteriores, esto se vio corroborado al no poder observarse una clara relación entre comportamientos de monta de los machos, rasgos morfométricos de los mismos, calidad seminal y fertilidad final obtenida en sistemas de monta natural. Esto nos indica que los resultados finales en un sistema de monta natural son más variables que en un sistema de inseminación artificial (Bilcik et al., 2005). Con el empleo de la inseminación artificial, esta variabilidad se ve disminuida.

De forma natural, la fertilidad de los machos declina con la edad. También se observan variaciones de producción y calidad del semen relacionadas con la época del año. Como norma general se ha visto que en primavera se produce un aumento de producción seminal y, por el contrario, una disminución en épocas de otoño e invierno. Con el uso de la técnica de inseminación artificial, se pueden paliar o ver disminuidas estas variaciones (Sauveur et al., 1992).

En estudios realizados con gallos indígenas de Irán, se demostró que, con el aumento de la edad de los machos, se producía una disminución de la concentración espermática, disminución de la motilidad y un aumento de defectos estructurales de los espermatozoides producidos por estos gallos. Esto se traduce en una menor capacidad fecundante, circunstancia que se puede ver reducida con el uso de la técnica de inseminación artificial (Tabatabaei et al., 2010).

En estudios posteriores, se analizó la evolución de los diferentes indicadores de la calidad espermática en relación a la edad en gallos Rhode Island rojos y se concluyó que a medida que avanza la edad del gallo, los indicadores de calidad empeoran. Así, el volumen espermático, la motilidad progresiva y la concentración espermática disminuyeron con la edad y la presencia de formas anormales aumentó. Esto, unido también a la disminución del número de montas, hace que los resultados de huevo fértil obtenidos en una manada con monta natural disminuyan con la edad. Esta disminución se puede ver reducida con el uso de técnicas de inseminación artificial (Juarez-Caratachea et al., 2018).

Estudios recientes en los que se comparaban los efectos de las técnicas de inseminación artificial en reproductoras pesadas de carne, en relación a mortalidad post nacimiento, contaminación microbiológica (prevalencia de *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum* y *Mycoplasma gallisepticum*) y rendimientos productivos del pollito (índice de conversión, ganancia de peso diaria e índice de eficiencia europeo), han demostrado que la monta natural tiene mejores resultados que la inseminación artificial en estos aspectos. Dentro de la inseminación artificial, se observó que presenta mejores resultados la inseminación realizada con animales alojados en jaulas que en

suelo, relacionada sobre todo con una menor contaminación de los patógenos mencionados con anterioridad (Shabir, et al., 2020).

En cuanto a las principales desventajas que presenta la técnica de inseminación artificial, podemos citar, por un lado, la necesidad de realizar una mayor inversión en las granjas y una necesidad de mayor cantidad de mano de obra que deberá ser además cualificada (Sauveur et al., 1992).

Las técnicas de inseminación artificial requieren un manejo considerable de las aves, tanto de los machos como de las hembras. En el caso de las hembras, estas deben sujetarse y realizar presión abdominal para exponer la cloaca con el fin de depositar el semen en el orificio vaginal (Danoghoe y Wishart, 2000).



Figura 6. Técnica de inseminación vaginal en gallinas.

Existen dos métodos principales de inseminación artificial dependiendo del lugar en el que se deposite el semen. Así tenemos por un lado el método vaginal (Figura 6) y por otro el intraperitoneal. El más utilizado por ser mucho más sencillo de aplicar es el método vaginal (Aisha et al., 2010).

El lugar más indicado para realizar la inseminación en las aves es la zona media de la vagina (Figura 7). Se han descrito otras zonas en el oviducto en las que se puede depositar el semen con éxito para lograr huevos fértiles, si bien se precisan de técnicas concretas para tal fin y se obtienen resultados diversos según la zona (Muñoz, 2011).

Estudios realizados con el objetivo de observar la zona óptima de depósito de semen en la vagina de la gallina, han determinado que inseminaciones intravaginales a una profundidad de 3,5 cm dan resultados significativamente mejores en cuanto a fertilidad que inseminaciones intravaginales más superficiales realizadas a 0,5 cm de profundidad (Reinhart y Fisher, 1983).

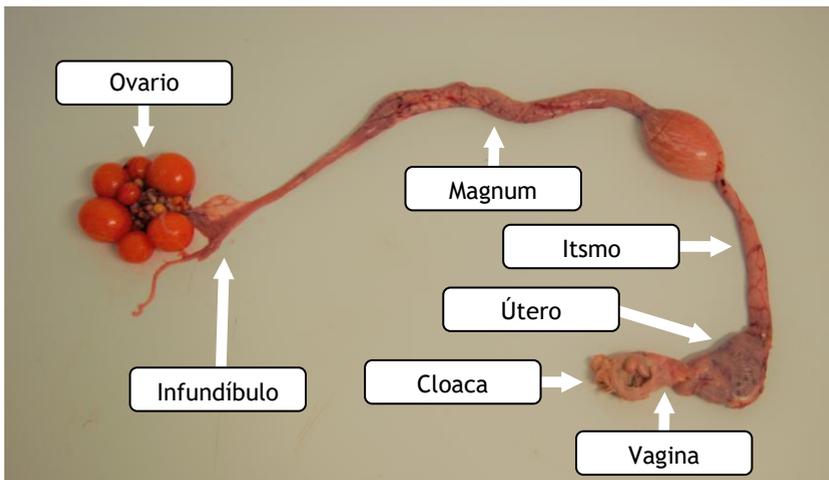


Figura 7. Aparato reproductor de la gallina.

En relación al manejo del macho, la técnica más extendida se basa en la expuesta por Burrows y Quinn (1937), con todas las variantes que han ido apareciendo posteriormente. Si queremos extraer semen de un macho con esta técnica (Figura 8), debemos tener en cuenta una

serie de consideraciones previas para garantizar la obtención de un semen de buena calidad que se pueda usar en procesos de inseminación artificial.

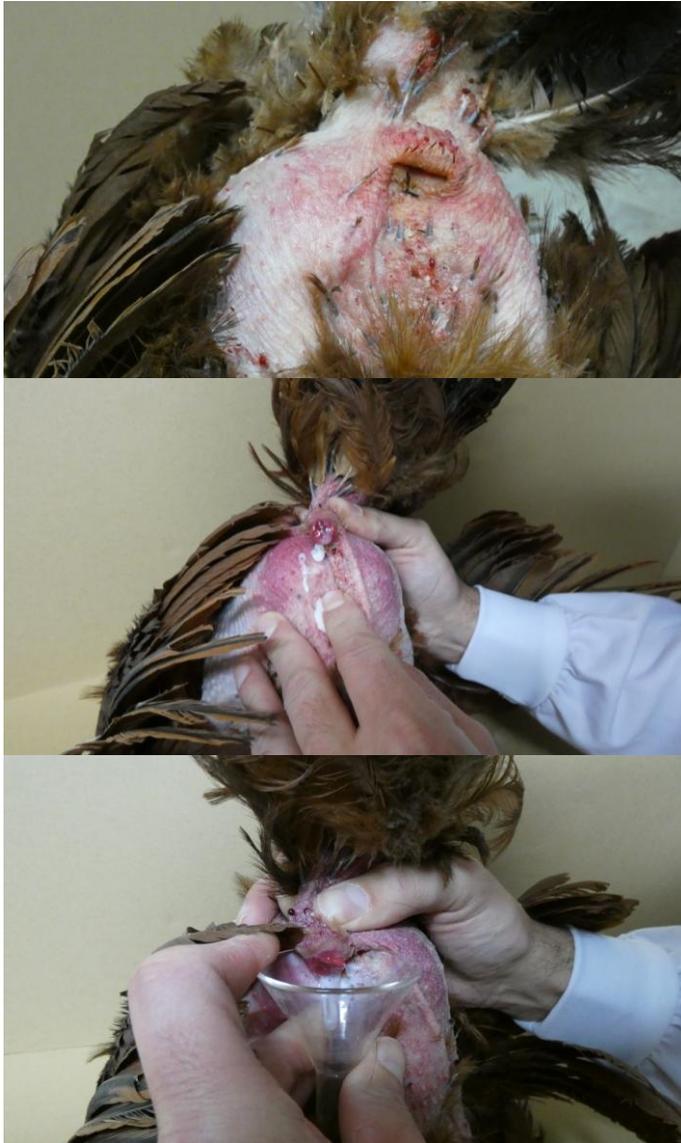


Figura 8. Técnica de extracción de semen en el gallo según Burrows y Quinn (1937).

Por un lado, se deben recortar las plumas que rodean a la zona cloacal con el fin de facilitar la recogida y limpieza del semen obtenido del macho y se debe ir acostumbrando al macho para la extracción seminal con la realización de masajes dorso abdominales, con al menos 7-10 días de antelación con respecto a la primera extracción de semen para su uso en la técnica de inseminación artificial (Santiago y Argüelles, 2010).

La técnica de masaje dorso abdominal planteada por Burrows y Quinn (1937), todavía se presenta como una técnica válida en la actualidad. En estudios recientes en los que se comparó esta técnica con la técnica de electro estimulación para la extracción de semen en gallos, se comprobó que había significativamente mejores resultados en relación a la motilidad total y progresiva de los espermatozoides obtenidos mediante el masaje dorso abdominal frente a los espermatozoides obtenidos por electro estimulación (González, 2019).

Existen diferentes estudios sobre cual es la frecuencia óptima de extracción de semen en el gallo, siendo la conclusión más extendida que la frecuencia óptima de extracción es de 2-3 veces por semana para obtener valores máximos de calidad seminal (Jacome y Jadira, 2005).

3.2.- EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN

La evaluación de la calidad del semen nos permite clasificar al semen según su calidad y esto se ha relacionado de forma positiva con la capacidad de fecundación del mismo en diferentes especies animales (Sieme et al., 2004, Vicente-Fiel et al., 2013).

La evaluación del semen, nos sirve como herramienta para determinar la calidad de los machos en un lote y poder valorar el potencial reproductivo del mismo expresado en el número de huevos fértiles obtenidos (Mohan et al., 2018). Aunque la fertilidad es una combinación de la unión del macho y de la hembra, estudios realizados con diferentes cruces de líneas comerciales de reproductores pesados de carne, sugieren que son los machos los que tienen un mayor peso en relación al mantenimiento de la fertilidad. Esto nos indica que debemos centrar los esfuerzos en seleccionar los

mejores machos de un lote, mas que las mejores hembras, para mejorar los resultados de fertilidad final del lote (Kirby et al., 1998).

De entre todos los factores que influyen en la capacidad fecundante del semen, la correcta motilidad de los espermatozoides, es el principal factor que debemos considerar (Mohan et al., 2018). Al analizar la motilidad de los espermatozoides en el eyaculado de los gallos, se puede demostrar que esta influye de manera significativa en la fertilidad del semen (Donoghue y Donoghue, 1997). La motilidad espermática es un factor que influye directamente en los resultados finales de la inseminación artificial (Larsson, 1986) y se puede tomar como un buen índice de medición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Becker, 2010). En el caso de gallos reproductores, se observó que existían diferencias de motilidad espermática entre los diferentes machos de un mismo lote, siendo los machos con bajo peso los que presentaban mayores problemas de motilidad seminal. Estos machos producían peores resultados de fertilidad en el lote, con lo que se pudo concluir que la motilidad de los espermatozoides es un predictor significativo para determinar la calidad seminal (Bowling et al., 2003). Estas conclusiones se corroboran en estudios más recientes, en los que se observa que la selección de machos basada en los parámetros de motilidad total y en los parámetros cinéticos de los espermatozoides, resultan en una mejora de la fertilidad final del lote de reproductoras cuando usamos técnicas de inseminación artificial (Tsfay et al., 2020).

En estudios realizados con pavos reproductores, se demostró que aquellos lotes inseminados con semen que contenía espermatozoides con mayor motilidad, obtenían resultados mejores en relación a la fertilidad total, frente a aquellos lotes inseminados con semen que contenía espermatozoides con menor motilidad. Este hecho demuestra que la motilidad de los espermatozoides está relacionada positivamente con la fertilidad final obtenida (King et al., 2000). Estos resultados se relacionaron en estudios posteriores con la idea de que una motilidad espermática elevada, hace que los espermatozoides sean más eficaces a la hora de viajar por el tracto reproductivo de la hembra y de alcanzar los lugares de almacenamiento y fertilización del huevo (King et al., 2000).

De manera inversa, los eyaculados que presentan una baja motilidad seminal, se han relacionado con mayores niveles de mortalidad embrionaria temprana, lo que se traduce en tasas menores de fertilidad en el lote en el caso de pavos reproductores (Manier et al., 2019).

Aunque la motilidad seminal es el principal factor a tener en cuenta para realizar una valoración de la calidad del semen, no es el único factor a considerar. Para poder hacer una evaluación de la calidad del semen más completa, se deben tener presentes ciertos factores entre los que caben destacar los siguientes: volumen de eyaculado, concentración espermática, motilidad de los espermatozoides, morfología de los espermatozoides y porcentaje de espermatozoides vivos (López, 2007).

Con todos estos factores, se pueden obtener índices que nos ayudan a definir la calidad de una muestra de semen y que tienen en cuenta varios parámetros del mismo, como es el caso del Índice de Motilidad Espermática (SMI) que mide la concentración, viabilidad y motilidad espermática del semen y nos aporta un valor que podemos relacionar con la mayor o menor calidad del semen (Mc Daniel et al., 1998).

Otro índice que puede definir la calidad espermática es el denominado Índice de Calidad Espermática (SQI) que tiene en cuenta el análisis de diferentes parámetros del semen y no solamente uno. Entre estos parámetros cabe destacar la viabilidad de los espermatozoides, su actividad y su morfología. Todo esto se relaciona positivamente con la capacidad fertilizante de los mismos (Parker et al., 2000). El SQI se relaciona de forma positiva con los resultados de fertilidad e incubabilidad de un lote de reproductoras (Parker et al., 2002, 2003, 2004). Esto es así, tanto en el caso del empleo de semen fresco como de semen almacenado hasta 16 h (Dumpala et al., 2006).

La valoración de la calidad del semen se puede realizar de forma directa utilizando microscopía óptica con el empleo de diferentes técnicas y tinciones como es el caso de la eosina-nigrosina que permite evaluar la integridad de la membrana celular de los espermatozoides. (Bakst y Cecil, 1997; Duchi et al., 2008; Klimowicz et al., 2008). El empleo de microscopía óptica para la valoración

directa de la calidad del semen presenta el inconveniente de obtener resultados variables, debido a que dependen en gran medida del criterio de la persona que esté realizando la valoración (Gadea, 1997).

La concentración espermática se puede valorar también de forma indirecta utilizando métodos de colorimetría, espectrofotometría o mediante el uso de citometría de flujo. También se puede evaluar de forma directa con la utilización de cámaras de recuento celular o bien el empleo de hemocitómetros. Todas estas técnicas de valoración indirecta presentan diferentes ventajas e inconvenientes en relación a su utilización (Matás, 1997; Cardona et al., 2008).

Otro aspecto a tener en cuenta en relación a la valoración de la calidad seminal, es la morfología de los espermatozoides presentes en el semen. La morfología de los espermatozoides aviares, tanto de las formas normales como las posibles formas anormales, se han descrito en numerosos trabajos (Bakst y Howarth, 1975; Bask, 1987). Morfologías espermáticas anormales producen una menor capacidad fecundante del semen, por lo que se ha demostrado que existe una relación directa entre la morfología del espermatozoide y su capacidad fecundante (Kruger y Coetzee, 1999).

Para estudiar la morfología espermática de una muestra seminal y valorar la cantidad de formas anormales presentes en la misma, se pueden emplear técnicas de tinción eosina-nigrosina y su observación directa a través del microscopio óptico (Bask y Cecil, 1997).

La cantidad de espermatozoides vivos y muertos en una muestra seminal también nos sirve para valorar la calidad del semen. Esto se puede realizar mediante el empleo de una tinción de eosina-nigrosina en inmersión en aceite y su observación posterior a través del microscopio óptico (Cahlah y Billard, 1998; Klimowicz et al., 2008).

Existen otros métodos con planteamientos diferentes para la valoración de la calidad espermática. Uno de estos métodos es la filtración de espermatozoides. Este método consiste en la interposición de una barrera física que dificulta el paso de los espermatozoides de la muestra seminal. La idea en la que se basa este método es que solamente los espermatozoides más resistentes y vigorosos serán capaces de atravesar esta barrera. Al cuantificar el número de espermatozoides que consiguen atravesar la barrera y si

conocemos de antemano la concentración espermática de la muestra de semen, podremos hacer una valoración de la calidad de la misma (Quintero, 2003).

Otro método descrito para la valoración seminal es el denominado test de endomosis. Este método plantea reducir la presión osmótica del medio en que se encuentra la muestra de semen a 150 mOs/kg durante 45-60 min. En esas condiciones los espermatozoides absorberán agua para tratar de equilibrar la presión osmótica de su interior con la del exterior y se producirá un enrollamiento de sus colas. Solamente los espermatozoides que presentan una correcta integridad de su membrana serán capaces de realizar este proceso. Si conseguimos cuantificar la cantidad de espermatozoides con las colas enrolladas podremos evaluar la cantidad de espermatozoides con membranas celulares íntegras y esto nos indicará la calidad de la muestra seminal (Hammersted et al., 1990; Donoghue et al., 1996; Bakst y Cecil, 1997).

La producción de L-Lactato es otro método indirecto de evaluación de la calidad seminal. La técnica se basa en el análisis de la cantidad de L-lactato presente en el plasma seminal tras ser incubada la muestra de semen. Esta cantidad de L-Lactato se relaciona con la capacidad fecundante de los espermatozoides presentes en la muestra seminal (Rigau et al., 1996; Quintero et al., 2001).

Otra prueba indirecta para evaluar la calidad seminal es la medición de la cantidad de ATP presente en la muestra seminal. La cantidad de ATP presente en el semen se relaciona con la capacidad de motilidad de los espermatozoides de la muestra. Esto se relaciona a su vez con la capacidad fecundante de los mismos (Gadea, 1997).

La determinación de la presencia y cantidad de determinadas sustancias en la muestra seminal se puede utilizar para hacer una valoración indirecta de la calidad del semen. Se ha demostrado que la cantidad de fosfolípidos presentes en los espermatozoides de gallo influyen positivamente en la motilidad de los mismos, por lo que concentraciones altas de fosfolípidos en la muestra seminal nos indican una mayor capacidad fecundante. Por el contrario, la cantidad de colesterol libre en la muestra influye de manera negativa en su calidad (Cerolini et al., 1997).

Otras técnicas de evaluación de la capacidad fecundante del semen, se basan en recuentos de incrustaciones espermáticas en la membrana perivitelina del huevo. Cuanto mayor sea el número de perforaciones de la membrana por unidad de superficie, mayor capacidad fecundante tendrá el semen. El empleo de esta técnica para evaluar la calidad del semen presenta sin embargo algunos inconvenientes que debemos tener presentes. Así, en esta técnica tendremos que tener en cuenta que no solamente estamos valorando la calidad del semen del macho, si no que también influyen las condiciones del oviducto de la hembra en relación a la supervivencia de los espermatozoides hasta alcanzar la membrana perivitelina (Birkhead et al., 1994; Bramwell et al., 1995; Bakst y Cecil, 1997).

En la actualidad existen sistemas automatizados que permiten la valoración de la calidad de una muestra seminal. Estos sistemas permiten mejorar la rapidez de las valoraciones y sobre todo van a limitar el impacto de la valoración subjetiva que se produce en las valoraciones directas por observación en el microscopio óptico. Estos sistemas se conocen en global con el nombre de ASMA (Automated Sperm Morphometry Analysis) (Hidalgo et al., 2006).

Un sistema automático para el análisis del semen es el denominado sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), desarrollado en los años 80 del S. XX. Este sistema permite analizar de forma automática parámetros como morfología, concentración, velocidad masal, velocidad lineal o velocidad curvilínea de los espermatozoides (Mortimer, 2000). Si bien los primeros sistemas CASA presentaban limitaciones, los modelos actuales han solventado muchos de estos problemas y son un método útil para la valoración de la calidad seminal de distintas especies, incluido los humanos (Mortimer et al., 2015). Se han realizado diferentes estudios con este método en distintas especies animales como por ejemplo toros (O'Connor et al. 1981), conejos (Farrell et al., 1993), cerdos (Holt et al., 1997) o pavos (Baskst y Cecil, 1992).

3.3.- CONSERVACIÓN DE SEMEN FRESCO: USO DE DILUYENTES

Se puede definir un diluyente seminal como aquel sistema amortiguador usado para mantener la viabilidad espermática del semen una vez extraído del macho (Donoghue y Wishart, 2000).

El semen de las aves es denso y viscoso de forma natural, por lo que será necesario realizar diluciones con productos diluyentes si se pretende conservar durante un tiempo y no utilizarlo inmediatamente tras su extracción (Mohan et al., 2018).

El empleo de diluyentes en el caso de semen fresco de aves, con el fin de usarlo en las técnicas de inseminación artificial, es sin duda una valiosa herramienta que abre unas mayores posibilidades al uso de esta técnica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que presenta una desventaja, ya que el empleo de diluyentes puede presentar unos mayores riesgos higiénico sanitarios para el lote de aves inseminadas (Thiber y Guerin, 2000).

Experiencias realizadas con gallinas de Guinea, en los que se evaluó el efecto del empleo de diferentes diluyentes con diferentes diluciones y periodos de conservación del semen diluido, concluyó que era positivo el uso de diluyentes a bajas tasas de dilución y que el uso de diluyentes permitía extender el tiempo de utilización del semen hasta 3 h post extracción sin que se viesen alterados de forma significativa los resultados de fertilidad del lote (Hudson et al., 2016).

Dependiendo del tiempo que transcurra desde la extracción del semen hasta su empleo en la inseminación, se recomienda el uso de diluyentes. Así, si se va a emplear semen extraído del gallo en un periodo mayor de 30 min post extracción, se recomienda sin duda el uso de diluyente. Si no se emplease diluyente en este caso, la capacidad fecundante del semen disminuiría significativamente (Muñoz, 2011).

En las diversas experiencias realizadas con el uso de diluyentes, se ha observado que el semen diluido con diluyente en el caso de las aves, puede presentar niveles de fertilidad similares al semen fresco incluso hasta varias horas tras la extracción (Donoghue y Wishart, 2000). Esta afirmación coincide con lo observado por Capote et al. (1988) en las que no se encontraron diferencias de fertilidad al emplear semen fresco y semen diluido.

Si bien es cierto que el uso de diluyentes es positivo en aquel semen que se desea conservar durante un cierto periodo de tiempo antes de su utilización en inseminación artificial, se ha comprobado que también en este semen diluido, se producen cambios con el tiempo, que deterioran la calidad del semen y reducen su capacidad fecundante al compararlo con el semen fresco recién extraído. Comparando las características de semen fresco vs semen diluido tras 24 h en gallina de guinea, se observó una reducción de la motilidad y un aumento del número de espermatozoides muertos y formas anormales, así como un aumento de pH y desaparición de colesterol en el plasma seminal. Esto se relacionó con una disminución de la capacidad fecundante del semen diluido frente al semen fresco recién extraído (Mohan et al., 2013).

Un hecho cierto es que el semen fresco va perdiendo su capacidad fecundante a medida que pasa tiempo tras su extracción. Observando la capacidad fecundante del semen fresco refrigerado a 5 °C, se ha visto que conserva dicha capacidad fecundante 4 h después de la extracción, aunque esta capacidad fecundante se ve muy reducida en relación al semen recién extraído. (Bilgili et al., 1987).

En estudios realizados para medir la cantidad de perforaciones presentes en la membrana perivitelina del huevo, tras la inseminación con semen fresco y semen almacenado 24 h in vitro en pavos, se observó que el semen fresco presentaba mayor número de agujeros. Esto se relacionó con una mejor fertilidad del semen fresco frente al almacenado (Donoghue, 1996).

Estudios más recientes, han observado que, con el uso de determinados diluyentes, podemos conseguir valores aceptables de fertilidad, incluso hasta 48 h post extracción, aunque siempre serán menores que en el caso de semen recién extraído. A partir de las 48 h post extracción, la fertilidad obtenida decae rápidamente (Mohan et al., 2017).

Otro factor que influye de manera directa en la capacidad fecundante del semen una vez se ha producido la extracción del mismo, es la temperatura a la que se mantiene en el ambiente. Se ha observado que a temperaturas bajas de 5 °C, los espermatozoides conservan la capacidad de mantener reservas de energía en forma de

ATP, no sucediendo lo mismo cuando el semen se conserva a temperaturas de 40 °C (Wambeke y Huyghebaert, 1989).

La temperatura de almacenamiento del semen de aves se debe situar entre los 2-8 °C, siendo de 7-8° C en el caso concreto de la gallina (Mohan et al., 2018).

Una vez que se extrae el semen del macho, se empiezan a desarrollar procesos de lisis y peroxidación de los lípidos de los espermatozoides. Estos procesos se traducen en alteraciones de la estructura del espermatozoide y por consiguiente de su motilidad, lo que produce una disminución de la capacidad fecundante del semen. (Blesbois et al., 1999; Douart et al., 2004). Se ha demostrado que el uso de diluyentes en semen fresco contribuye a disminuir las peroxidaciones lipídicas en los espermatozoides y por tanto son capaces de conservar por más tiempo su estructura íntegra y como consecuencia su capacidad fecundante durante más tiempo (Surai et al., 1998).

Existen diversos diluyentes con distintas composiciones, pero con un mismo objetivo que asegure una doble acción a nivel espermático. Por un lado, los diluyentes deben proveer de todos los nutrientes que sean necesarios para la supervivencia de los espermatozoides y por otro lado deben asegurar un efecto tampón del medio para evitar que este se acidifique como consecuencia del metabolismo normal de los espermatozoides (Muñoz, 2011).

El mantenimiento de los niveles de pH al utilizar diluyente es fundamental. Valores por encima o por debajo del pH objetivo del medio en el que se encuentran los espermatozoides, afectaran a la capacidad fecundante de los mismos. Así, si se produce un aumento de los niveles de pH del medio, se va a observar un aumento del metabolismo espermático y en el caso contrario, una disminución de los niveles de pH va a provocar una disminución de la motilidad de los espermatozoides (Donoghe y Wishart, 2000). El rango de pH óptimo en el que se debería situar la muestra seminal, se ha estimado que se encontraría entre el 6,8-7,4 (Sauveur et al., 1992).

Existen diferentes composiciones dentro de los diluyentes seminales, pero lo más habitual es que se traten de mezclas de diferentes sales con capacidad tampón (Santiago y Argüelles, 2010).

Aunque los diluyentes tienen bases similares en cuanto a su composición, se ha observado que las variaciones individuales de las composiciones, van a afectar a la capacidad de conservación del semen (Sexton, 1998). Así, en estudios realizados evaluando la calidad seminal tras el empleo de cuatro tipos diferentes de diluyentes, concluyeron que existían diferencias significativas entre ellos (García-Tomás et al., 2009). Los niveles de motilidad espermática, el uso del ATP, el intercambio gaseoso y el balance iónico que se producen en el semen una vez extraído, se ven alterados de diferente manera según el tipo de diluyente que empleemos y el ratio de dilución aplicada a la muestra seminal, lo que confirma la idea de que el tipo de diluyente empleado influye de manera directa en la fertilidad final del semen (Parker y Mc Daniel, 2006).

Estudios realizados comparando el uso de solución salina frente al empleo de diluyente aviar específico para aves, con muestras de semen de gallo almacenado a 4 °C durante 2 h, determinaron que con la solución salina se llegaban a obtener mejores resultados en relación a la motilidad espermática y a la cantidad de células muertas. Esto nos indica que existen variaciones de fertilidad según el diluyente que usemos (Vasicek et al., 2015).

En estudios que comparan el efecto de dos diluyentes diferentes para semen de perdiz roja, se han visto diferencias de fertilidad según el diluyente empleado, lo que viene a corroborar la idea de que variaciones en las composiciones de los diluyentes afectan a la fertilidad final del semen (Santiago-Moreno et al., 2017). En estudios más recientes, como el de Pearlin et al. (2021) en el que se comparaba la fertilidad obtenida tras inseminar gallinas con semen diluido con tres diluyentes diferentes, se comprobó la existencia de variaciones significativas en la fertilidad final obtenida.

En la composición de los distintos diluyentes para semen fresco en aves, encontramos sustancias como fosfatos, citratos y otras moléculas orgánicas. El objetivo de estas sustancias es conseguir mantener los valores de pH adecuados para garantizar la supervivencia de los espermatozoides (Donoghue y Wishart, 2000; Etches, 1996).

Otra parte importante dentro de la composición de los diluyentes seminales en aves, son aquellas sustancias que aportan energía al

espermatozoide y ayudan a controlar la presión osmótica del medio. En el caso de las aves, este punto es fundamental ya que su semen es muy denso y concentrado (Bakst, 1990).

La osmolaridad del diluyente es otro punto importante a tener en cuenta, ya que puede provocar cambios estructurales en el espermatozoide, de manera especial en la cabeza del mismo. Los valores de osmolaridad recomendados están en un rango entre 250-460 mOsm/kg H₂O a una temperatura de 5-7 °C (Bakst, 1990, Etches, 1996).

Existen estudios en los que se ha observado que sustancias como la albúmina sérica bovina ayudan a mantener buenos valores de calidad seminal a lo largo del tiempo en el semen fresco (Bakst y Cecil, 1997).

La presencia de factores dentro del diluyente con bajo peso molecular (1 kDa) se ha observado que resultan perjudiciales para el mantenimiento de una correcta estructura espermática. Por el contrario, factores con alto peso molecular (50 kDa) son capaces de producir el efecto contrario al proporcionar estabilidad a la membrana celular (Ashizwa y Katayama, 1992).

Estudios en los que se exponían los espermatozoides de pavos a una mezcla de péptidos sintéticos antes de su empleo en la inseminación, concluyen que se producen aumentos significativos de los niveles de fertilidad en el semen expuesto frente al no expuesto (Gill et al., 2000).

Asimismo, la presencia de vitamina E en el diluyente mejora la calidad del semen al reducir las peroxidaciones lipídicas que se producen de manera natural en el mismo tras su extracción (Long y Krambert, 2003).

Recientes estudios muestran que la adición de calcitriol en la composición de diluyentes seminales en aves, producen mejores niveles de motilidad espermática, así como un incremento de la viabilidad total del semen (Goodarzi et al., 2019).

Se ha observado también que la adición de sustancias como el lincopeno o el ácido elágico, mejoran la calidad del semen aviar en procesos de criopreservación, sobre todo si se presentan en forma de nanoliposomas (Najafi et al., 2018, 2019). También el empleo de

dimetilsulfóxido, etilenglicol, propanidíol presentó efectos positivos en procesos de criopreservación (Mphaphathi et al., 2016).

Si nos fijamos en la tasa de dilución de semen/diluyente que se debe emplear, podemos concluir que se debe situar entre 1:2 o 1:3 dependiendo de la especie de la que se trate. Si nos vamos a tasas superiores de dilución, podemos encontrarnos que pueden producir una disminución de la capacidad fecundante del semen (Muñoz, 2011).

Se ha observado que, en el empleo de las técnicas de inseminación artificial, se puede usar el semen puro directamente tras la extracción del mismo, o bien diluirlo a razón 1:2 con lactato ringer a 40 °C y seguirá conservando buenos resultados de fertilidad final (Jacome, 2005).

Existen estudios en los que se ha comprobado que tasas de dilución hasta 1:10 son capaces de mantener resultados de fertilidad similares al empleo de semen puro sin diluir (Weakley y Shaffner, 1952), sin embargo, en el caso concreto de los gallos, estudios posteriores han concluido que la tasa óptima de dilución de semen/diluyente es 1:2 (Pereira et al., 1999).

En estudios realizados con gallinas Withe Legorn, se ha observado que el mejor ratio de semen/diluyente para obtener los mejores resultados de fertilidad, es el 1:1, pudiendo llegar hasta diluciones 1:7 con valores aceptables de fertilidad, aunque siempre menores (Mohan et al., 2017). Otros estudios más recientes indican que diluciones por encima de 1:4 presentan diferencias significativas respecto a la fertilidad obtenida (Pearlin et al., 2021).

Un aspecto que debemos de tener presente a la hora de manejar muestras de semen y diluyentes, es la posible contaminación bacteriana de la muestra si no hacemos un manejo cuidadoso. En experiencias realizadas en semen de pavo, se ha observado que aquellas muestras en las que se encuentran bacterias, ven reducida de forma significativa la motilidad de los espermatozoides y por consiguiente la capacidad fertilizante del semen (Triplett et al., 2016).

3.4.- MOMENTO Y FRECUENCIA DE INSEMINACIÓN

Un aspecto importante en relación con la inseminación artificial, es poder definir cuál sería la frecuencia y el momento óptimo de realizar la misma, con el fin de optimizar el uso de esta técnica. Tanto la cantidad de espermatozoides presentes en la dosis seminal que se empleará en la inseminación, como la frecuencia con la que se realizan las inseminaciones, van a tener una influencia significativa en los resultados finales de fertilidad (Saint et al., 1994).

Se han realizado diferentes estudios teniendo en cuenta los resultados de fertilidad y el trabajo empleado en realizar las inseminaciones y se ha llegado a la conclusión de que, en el caso de las gallinas, una inseminación semanal es suficiente para obtener buenos resultados de fertilidad (Francesch, 1994). Asimismo, en estudios realizados en reproductoras pesadas se observó que por debajo de los 7 días entre inseminaciones, no se aprecian diferencias significativas en los valores de fertilidad (Moya et al. 1992)

Solamente el 1 % de los espermatozoides depositados en el oviducto tras una inseminación artificial, llegan a los túbulos de almacenamiento. La llegada de los espermatozoides dependerá de su motilidad y de reacciones bioquímicas establecidas entre el espermatozoide y la mucosa del oviducto. Teniendo en cuenta este dato, se han observado mejores resultados en relación con la fertilidad final, si realizamos inseminaciones más frecuentes con menores concentraciones seminales en las dosis aplicadas que si realizamos inseminaciones menos frecuentes, pero con concentraciones mayores (Billard, 1993).

En el caso de las aves, a diferencia de otras especies, los espermatozoides presentan una particularidad propia, que es la capacidad de sobrevivir dentro del tracto reproductivo de la hembra durante varios días. Esta capacidad se debe a la presencia de estructuras especiales en el oviducto de la hembra denominadas “nidos espermáticos”, que van a proporcionar las condiciones adecuadas a los espermatozoides para poder sobrevivir. Estas estructuras están fundamentalmente localizadas en el infundíbulo y la unión útero-vaginal. La capacidad de almacenamiento de estos nidos espermáticos son la base de la fertilidad en las reproductoras, pero no

se encontró una relación entre el número de nidos y la fertilidad final obtenida (Bakst et al., 2010).

Según la especie aviar de la que hablemos, la capacidad fecundante de los espermatozoides va a variar. Así tenemos espermatozoides con capacidad fecundante tras 16 días post inseminación en canarios, 21 días en gallinas y hasta 60 días en pavas. Esto hace que también varíe la frecuencia necesaria de las inseminaciones para asegurar valores adecuados de fertilidad según la especie (Muñoz, 2011).

Si nos fijamos en el tipo de curva que sigue la fertilidad en el caso de las aves, podemos observar que se dibuja una curva sigmoidea. En esta curva aparece una primera fase de ascenso, seguida por una segunda fase de meseta y una última de declive. La práctica totalidad de las aves siguen este tipo de curva, variando la duración del periodo de meseta según el tipo de ave del que estemos hablando (Muñoz, 2011). Si queremos asegurar buenos valores de fertilidad en los huevos obtenidos mediante la técnica de inseminación artificial, deberemos no superar el tiempo de meseta propio de cada especie (Muñoz, 2011). En el caso concreto de la gallina, la tasa de fertilidad máxima se alcanza tras dos días desde la inseminación. Tras estos 2 días, nos encontramos con una etapa de meseta que suele durar una semana para declinar posteriormente con rapidez. Se ha observado que a partir del día 20 post inseminación la tasa de fertilidad es prácticamente nula (Ricaurte, 2006).

La calidad del semen extraído en aves, se ve influenciada también por la frecuencia de las extracciones realizadas al macho. Así, en estudios realizados con patos blancos de Pekín, se determinó que frecuencias de extracciones superiores a los dos días de intervalo entre extracciones, producían una menor concentración espermática y un menor número de espermatozoides en cada eyaculado (Nahak et al., 2015).

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de considerar el momento adecuado en el que se debe realizar la inseminación, es la hora de la oviposición. Se ha observado que realizar la inseminación en los momentos cercanos a la oviposición, resulta contraproducente ya que se obtienen menores tasas de fertilidad. Además, esta situación

va a afectar también a los huevos que pondrá el ave con posterioridad a la inseminación y durará hasta que vuelva a ser inseminada de nuevo (Giavarini, 1991). En un estudio realizado con reproductoras pesadas, en el que se intentaba relacionar el momento de la inseminación con el momento de la oviposición, se encontró que las inseminaciones realizadas 3 h antes de la oviposición, presentaban peores resultados de fertilidad (Giesen et al., 1980). Como norma general en la gallina, se recomienda que se espere al menos 8 h tras el encendido de las luces para realizar la inseminación. Esta recomendación puede variar con otro tipo de aves (Muñoz, 2011).

3.5.- INCUBABILIDAD, HUEVO FÉRTIL Y DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD

Si tenemos como objetivo conseguir pollitos de buena calidad y que presenten bajos niveles de mortalidad en las granjas de engorde, debemos procurar obtener huevos de alta calidad y con buenos índices de fertilidad en las granjas de reproductoras (Card y Neishem, 1972).

Podemos definir el concepto de incubabilidad de un lote de huevos, como la cantidad de pollitos sanos y aptos para la crianza, obtenidos a partir de huevo fértil. Existen numerosos factores que tienen influencia en la incubabilidad, entre los que podemos destacar diferentes factores nutricionales, sanitarios, de manejo y de incubación (Vaca, 1999)

3.5.1.- Factores nutricionales

El tipo de alimentación que recibe la gallina va a tener influencia directa sobre el huevo, tanto sobre el tamaño como sobre la calidad del mismo. Esto a su vez repercute de forma directa sobre la viabilidad del pollito que va a nacer de ese huevo. Es por tanto imprescindible, asegurar una correcta nutrición del ave durante todo su periodo de vida, especialmente durante el periodo reproductivo, si queremos obtener buenos niveles de incubabilidad del lote (Rodríguez-Moya y Cruz-Bermúdez, 2017).

Deficiencias nutricionales en el alimento que reciba la gallina, traen como consecuencia la aparición de problemas de desarrollo embrionario, lo que se va a traducir en una menor incubabilidad total

del lote. Si nos fijamos en las vitaminas, podemos ver que deficiencias de las mismas producen efectos indeseados en el embrión. Así deficiencias de vitamina B12 producen alteraciones óseas y musculares, deficiencias de vitamina B2 producen problemas en el desarrollo pulmonar o deficiencias de biotina producen pobres desarrollos embrionarios (Bonilla y Díaz, 1987). Deficiencias de vitamina A producen mortalidad embrionaria temprana (48 h) y fallos en el desarrollo del aparato circulatorio. Deficiencias de vitamina D3 se asocian a problemas esqueléticos en los pollitos. Deficiencias de Vitamina E producen mortalidad embrionaria entre el día 1-3 y encefalomalacia junto con diatesis exudativa. Deficiencias de ácido pantoténico o vitamina B5 se asocian con hemorragias subcutáneas. Deficiencias de vitamina B12 producen mortalidades embrionarias entre los 8-14 días de incubación y posible aparición de edemas con dedos torcidos y acortamiento del pico. Deficiencias de vitamina B1 se asocian a mortalidades embrionarias tempranas (Leeson y Summers, 2005). Estudios realizados con suplementaciones de vitamina E en aves, indicaron efectos beneficiosos mejorando la resistencia al estrés de las aves y detectándose aumentos de los niveles de Alfa-tocoferol en el semen, asociados a una mayor resistencia al estrés oxidativo y mejorando los niveles de fertilidad (Surai et al., 2019). Dietas enriquecidas con ácidos grasos n-6 y vitamina E, demostraron mejoras en la calidad seminal, sobre todo en gallos de edad avanzada (Safari et al., 2018). La suplementación en la dieta de cantaxantina y 25-hidroxi-colecalciferol, se relaciona con mejoras en la fertilidad y eclosión de huevos incubables, así como una disminución de la mortalidad embrionaria (Becker, 2010).

Si nos fijamos en deficiencias minerales, podemos destacar que, en casos de deficiencias de calcio y fósforo, se observa mortalidad embrionaria (que será mas temprana cuanto mayor sea la deficiencia), problemas de patas cortas, mandíbula inferior acortada, edema de cuello y abdómenes prominentes. Deficiencias de zinc se asocian con alteraciones esqueléticas y pobre calidad de las plumas. Deficiencias de manganeso producen mortalidad embrionaria tardía (18-21 días) y acortamiento de la longitud de las alas (Leeson y Summers, 2005).

El empleo de drogas como la furazolidona en pavos, se relacionó con alteraciones de la espermiogénesis y calidad seminal, lo que se traduce en una disminución de la fertilidad del lote (Peralta et al., 2003).

La presencia de aflatoxinas en la dieta de las aves reproductoras, puede producir mortalidades embrionarias significativas (Pérez et al., 2007), así como disminución de la producción total de huevos (Pérez et al., 2001). Las aflatoxinas producen la supresión total o parcial de la espermatogénesis por alteraciones estructurales de los testículos en los machos (Ortatatli et al., 2002). En las hembras, estas aflatoxinas pueden producir alteraciones de los ovarios tales como arrugamiento de los folículos, separación y vacuolización de la membrana perivitelina, así como lisis del núcleo de los oocitos (Hafez et al., 1982). Todo esto se va a traducir en una disminución del número de pollitos obtenido por cada reproductora.

3.5.2.- Factores sanitarios

Cualquier proceso infeccioso que se localice en el aparato genital de la gallina es susceptible de producir alteraciones en el huevo, lo que se traducirá en una mayor mortalidad embrionaria, una menor calidad y viabilidad del pollito nacido de ese huevo y en consecuencia en una menor incubabilidad total del lote (Vidal, 2003).

Enfermedades en las aves reproductoras como bronquitis aviar, enfermedad de Newcastle o micoplasmosis, van a repercutir de forma directa en el porcentaje final de incubabilidad del lote. Asimismo, aunque de forma directa no afecten al embrión, cualquier patología o proceso infeccioso que produzca alteraciones en la absorción de los nutrientes o que interfieran en el normal desarrollo del metabolismo del ave, pueden influir en el desarrollo del embrión. Esto se traducirá nuevamente en una disminución de la incubabilidad total del lote (Vidal, 2003).

Si nos fijamos en la superficie del huevo, podemos observar que algunas de las bacterias que están presentes allí, tienen la capacidad de penetrar hacia el interior del huevo. Una vez dentro del huevo, estas bacterias pueden afectar al normal desarrollo del embrión y a la

calidad final del pollito nacido, lo que se refleja nuevamente en una disminución de la incubabilidad del lote (Calnek, 2000).

Se ha observado que situaciones de estrés sufridas por los reproductores por diversas causas (vacunaciones, manipulación excesiva de los reproductores, malas condiciones ambientales, enfermedad, etc.) afectan negativamente tanto a las producciones de huevo como a la calidad de los mismos, lo que se traduce en una disminución de la incubabilidad del lote (Rodríguez-Moya y Cruz-Bermúdez, 2017).

3.5.3.- Factores de manejo

Una de las principales causas de la pérdida de incubabilidad en un lote de reproductoras, está relacionado con un mal manejo del huevo. Manejos inadecuados del huevo recogido en granja, van a producir un aumento en el número de fisuras o roturas de la cáscara y esto afectará de forma directa a la incubabilidad del lote (Herrera y Diocelina, 2011).

Una vez recogido el huevo del nidal, se debe almacenar entre 18-20 °C y 75 % de humedad relativa, durante no más de 7 días (Bramwell, 2001). Estas condiciones para el correcto almacenamiento del huevo fértil, no deben en todo caso de estar fuera de los 15-20 °C y 75-80 % de humedad relativa (Juárez, 2014).

Si nos fijamos en el tiempo de almacenamiento del huevo fértil, podemos concluir que no debemos sobrepasar los 14 días, siendo el tiempo de almacenamiento óptimo 4 días. Tiempos de almacenamiento superiores producirán disminuciones de incubabilidad (Herrera y Diocelina, 2011). En estudios sobre los efectos del almacenamiento del huevo incubable, se observó que los embriones procedentes de huevos almacenados durante 15 días, producían menos CO₂ que los procedentes de huevos almacenados durante 4 días. Esto se relacionó con alteraciones del metabolismo del embrión como consecuencia del tiempo prolongado de almacenamiento (Fasenko, 2002).

En cuanto a la frecuencia de recogida del huevo en granja, se deben realizar al menos 4-5 recogidas de huevo repartidas durante todo el día. Una vez que se recoge este huevo, se le debe aplicar una

desinfección posterior con el fin de disminuir la carga microbiana en la superficie de la cáscara (Hernando, 1990).

Los principales contaminantes que afectan al huevo fértil son enterobacterias que se suelen depositar en la superficie del mismo (Argueta, 2004). Huevos sucios o contaminados, producen problemas no solo a ellos mismos, si no al resto de huevos y embriones alojados en una incubadora, pudiendo contaminar una planta entera (Wineland y Christopher, 1988), por lo que deberán ser desechados como huevos aptos para incubar.

El peso del huevo incubable, es otro factor a tener en cuenta como factor de manejo que influye en la incubabilidad. En este sentido, el peso del huevo se debe mantener entre los 50-65 g, debiéndose desechar aquellos huevos con pesos inferiores o superiores a estos. Huevos con pesos bajos, producen pollitos de menor tamaño y más débiles, así como huevos de mayor peso producen pollitos edematosos y con problemas de viabilidad (Rodríguez-Moya y Cruz-Bermúdez, 2017).

El grosor de la cáscara es otro factor que influye directamente en la pérdida de líquido del huevo dentro del proceso de incubación. Huevos con cáscaras muy delgadas o con alteraciones de la misma como poros, deposiciones de calcio o anomalías en su forma, deberán ser desechados para no perjudicar la incubabilidad de los mismos (Rodríguez-Moya y Cruz-Bermúdez, 2017).

3.5.4.- Factores de incubación

En el proceso de incubación del huevo fértil, encontramos varios factores que presentan influencias en el correcto desarrollo del embrión. Dentro de estos factores, los principales son: temperatura, humedad relativa, calidad del aire (CO_2/O_2), y volteo de los huevos (Sauveur et al., 1992).

De todos los factores que influyen en la incubación, la temperatura es sin duda el que mas influencia tiene. Se ha visto que las temperaturas óptimas de incubación oscilan entre los 37,5-37,7 °C en las incubadoras y los 36,1-37,2 °C en las nacedoras (Juarez, 2014). Temperaturas más elevadas que las recomendadas pueden producir mortalidad embrionaria, deshidratación del pollito y una alta

mortalidad en los primeros días de vida (López, 1985). Temperaturas menores de las recomendadas durante el proceso de incubación darán lugar a pollitos inmaduros y débiles (Vaca, 1999).

En cuanto a la humedad relativa, los niveles recomendados son de entre el 55-65 % en las incubadoras y del 65-75 % en las nacedoras. Niveles mas altos de humedad relativa que los indicados anteriormente producirán problemas al no poder eliminar de forma correcta el CO₂ producido por el metabolismo del embrión. Por otro lado, humedades relativas mas bajas producirán deshidratación embrionaria con un menor tamaño y viabilidad del pollito resultante. En ambos casos, la viabilidad total del lote se verá comprometida (Quintana, 1988).

Una correcta ventilación durante el proceso de incubación, nos va a asegurar el aporte de oxígeno necesario y la eliminación del CO₂ producido por el metabolismo del embrión en desarrollo. Los valores indicados para un correcto proceso de incubación se encuentran entre el 21-22 % de O₂ y 0,5 % de CO₂. Cuando nos desviamos de estos niveles, se va a producir un aumento de la mortalidad embrionaria y una menor viabilidad del pollito, lo que se traducirá en una menor incubabilidad del lote (López, 1985).

Otro factor que tiene influencia en el proceso de incubación, es la posición del huevo. Si se produce un mal posicionamiento de los huevos, el embrión tendrá problemas a la hora de desarrollarse y eclosionar correctamente. Esto hace que malos posicionamientos disminuyan la incubabilidad total del lote (Yoho et al., 2008).

El volteo regular del huevo durante el proceso de incubación es necesario para asegurar una buena incubabilidad. Si se realizan volteos insuficientes o mal realizados, producirán posiciones anormales del embrión con una alta mortalidad asociada (Quintana, 1988).

El tipo de máquina incubadora también influye en la incubabilidad del huevo y en la calidad final del pollito producido. Así, incubadoras de carga múltiple, en las que conviven huevos que están en diferentes etapas de desarrollo embrionario, producen pollitos de peor calidad y presentan valores menores de incubabilidad si se comparan con máquinas de carga única (Hulet, 2007, Molenaar et al.,

2010). Esto se confirmó en estudios posteriores, en los que se pudo observar una menor mortalidad embrionaria, mejor incubabilidad del lote y mejores aprovechamientos de huevo incubable (más evidente en lotes de reproductoras viejas) en huevos incubados en sistemas de carga única frente a sistemas de carga múltiple (Maekawa et al., 2014). La razón de obtener mejores resultados productivos con un sistema de carga única frente a uno de carga múltiple, es que la carga única nos permite tener dentro de la incubadora huevos en la misma fase de desarrollo embrionario, pudiendo proporcionarles las condiciones óptimas para cada fase de su desarrollo (Benet, 2010).

3.5.5.- Determinación de la fertilidad del huevo

Una vez realizada la fecundación del óvulo, el huevo seguirá formándose a lo largo del oviducto de la gallina durante un periodo cercano al día de duración. Tras la oviposición, aparecerá en el interior del huevo, un embrión con más de 60.000 células dispuestas en una estructura característica que nos va a permitir diferenciar el huevo fértil del infértil (Tullett, 2010).

Para realizar análisis que nos permitan determinar si un huevo es fértil o no, se pueden escoger diferentes estadios de desarrollo embrionario. Así se pueden realizar análisis de huevos en fresco, parcialmente incubados 1-5 días, o parcialmente incubados con más de 10 días por la técnica del miraje. Cada una de estas técnicas presentará ventajas e inconvenientes, pero la más exacta y sencilla de realizar es la del análisis de huevo parcialmente incubado 1-5 días (Tullett, 2010).

Si nos decantamos por realizar la determinación de la fertilidad en huevo fresco, debemos observar la yema del huevo. Si en la yema aparece un área blanquecina difusa de unos 2 mm de diámetro, con forma redondeada pero nunca perfectamente definida y rodeada a su vez de un área de color claro de unos 4 mm y con presencia de formaciones con forma de burbujas, estaremos ante un huevo infértil. Si en la yema aparece una estructura de unos 4,5 mm de diámetro con forma de rosquilla con el centro transparente, estaremos ante un huevo fértil (Tullett, 2010).

Para la determinación de la fertilidad de un huevo parcialmente incubado se necesita un menor entrenamiento que en el caso de un huevo fresco. Para realizar esta técnica, procederemos a la incubación durante 3-5 días del huevo y la posterior observación del interior del mismo una vez abierto por la zona en donde se encuentra la cámara de aire. Si observamos una pequeña estructura blanquecina será un huevo infértil. Si por el contrario podemos observar la presencia de distintas estructuras propias de un embrión, estaremos ante un huevo fértil (Tullet, 2010). Esta técnica es la opción más sencilla que nos permite diferenciar un huevo fértil, de uno infértil y distinguir la mortalidad embrionaria temprana (Soares, 2008).

Otro procedimiento no tan exacto como los anteriores para determinar la fertilidad de un huevo, es el proceso denominado *miraje*. En este proceso se examina huevo incubado durante varios días sobre el que se hace incidir una fuente de luz aplicada sobre la cáscara. Aquellos huevos más claros serán huevos en los que nos se ha producido desarrollo embrionario y viceversa. Está técnica no es tan exacta como las anteriores ya que no todos los huevos claros se corresponderán con huevos infértiles, aunque como ventaja de este método es que no implica la destrucción del huevo (Tullet, 2010).

4. CAPÍTULO I

***“SELECCIÓN DE MACHOS
REPRODUCTORES EN MANADAS DE
GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS”***

4. CAPÍTULO I

4.1.- INTRODUCCIÓN

Las técnicas convencionales de evaluación de la morfología y morfometría espermática, se han basado tradicionalmente en análisis subjetivos de diferentes parámetros. Esta subjetividad ha condicionado la rigurosidad de los resultados, ya que existen diferencias evidentes entre los diferentes técnicos y laboratorios que desarrollan dicho análisis. Actualmente existen distintos sistemas automáticos de evaluación espermática, con la suficiente precisión y exactitud en la valoración de los parámetros seminales, como para poder considerarlos herramientas útiles en la evaluación de la calidad de una muestra determinada.

En aves, el empleo de estas técnicas computerizadas son muy incipientes, estando poco estandarizadas y necesitando continuar con su desarrollo y puesta a punto, sobre todo en el caso de los gallos.

Uno de las mayores dificultades en el uso de estos sistemas en aves, se debe a la característica morfometría de los espermatozoides aviares, ya que la forma filiforme de su cabeza, dificulta la correcta identificación y medida de las características morfométricas de los mismos.

Actualmente, el uso del sistema CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*) provee de una herramienta muy interesante para realizar medidas de la cantidad total de espermatozoides, características morfométricas con identificación de formas anormales y mediciones cinemáticas entre las que destacan motilidad total, motilidad lineal y progresiva.

El análisis se realiza tras capturar imágenes de espermatozoides en movimiento, previamente diluidos en un medio adecuado y observados al microscopio de 100-200 aumentos. Tras la captura, la información se almacena en el sistema y se analiza por un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos

descriptores de la motilidad individual que caracterizan la linealidad, angularidad de movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide.

Los dos parámetros más comúnmente utilizados por diversos autores, son los porcentajes de motilidad total y de motilidad progresiva. Según estos parámetros, los espermatozoides se pueden clasificar en estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos.

En este estudio nos proponemos buscar un método objetivo, válido y fiable para poder seleccionar los mejores machos dentro de la población de machos de un lote de reproductoras pesadas, con el objetivo de poder quedarse solamente con los mejores a nivel reproductivo. Una vez seleccionados estos machos, comprobaremos si esto se traduce en mejores índices de fertilidad en huevos producidos por gallinas inseminadas por estos machos frente a las inseminadas por gallos clasificados como de peor calidad.

4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1.- Animales

Se utilizó para este estudio, un lote de hembras y machos reproductores pesados compuestos por machos de la estirpe *Ross 308* y hembras de la estirpe *Ross Pm3*, ambos de la casa genética Aviagen. Estos animales son aves reproductoras orientadas a la obtención de pollos de crecimiento rápido. Los pesos de estos animales están cercanos a los 3 kg para las hembras y 5 kg para los machos y se espera que produzcan algo más de 170 huevos incubables por hembra a las 60 semanas de vida de las mismas.

Tomamos 58 machos (Figura 9) escogidos de manera aleatoria dentro de un lote mayor de producción formado por 850 machos. Eran todos animales de 35 semanas de vida, procedentes de la misma recría y con pesos y conformación similares. A estos 58 machos se les realizó un análisis de calidad seminal mediante el empleo del sistema CASA-IVOS II y se clasificaron en dos grupos atendiendo al criterio de comprobar si su motilidad progresiva espermática era superior o inferior al 75 %.



Figura 9. Macho Ross 308.

Para las pruebas de inseminación se establecieron tres grupos según la motilidad progresiva espermática de los gallos que los componían.

El primer grupo de gallos estuvo formado exclusivamente por machos con motilidad progresiva por encima del 75 %. Se identificó este grupo como *Grupo machos I*. El segundo grupo de gallos estuvo formado exclusivamente por machos con motilidad progresiva por debajo del 75 %. Se denominó a este grupo como *Grupo machos II*. El tercer grupo de gallos estuvo formado por una mezcla de machos a razón de un 75 % de machos con motilidad progresiva mayor del 75 % y un 25 % de machos con motilidad progresiva menor del 75 %. Se identificó este grupo como *Grupo machos III*. Estos cuatro grupos se identificaron mediante el uso de pegatinas que identificaban cada corral con el grupo al que pertenecía.

Estos gallos se alojaron en corrales individuales de 40x50 cm con idénticas condiciones para todos los machos.



Figura 10. Hembra Ross Pm3.

En cuanto a las hembras (Figura 10), se prepararon 30 corrales de 1x1 m con 5 hembras alojadas en cada uno de ellos. El alojamiento de las hembras fue igual para todos los grupos en relación a las condiciones ambientales, de consumo de agua y pienso y de equipamiento. Las hembras se obtuvieron de un lote de producción mayor formado por 15.000 hembras, tomadas de forma aleatoria y con condiciones de peso y conformación similares. Todas las hembras tenían 35 semanas de edad y procedían de la misma recría.

Los corrales de las gallinas se identificaron según el grupo de machos con el que fueron inseminadas. Así, se diferenciaron gallinas *Grupo hembras I* que fueron aquellas gallinas inseminadas con gallos procedentes del *Grupo machos I*; *Grupo hembras II* que fueron gallinas inseminadas con gallos procedentes del *Grupo machos II* y *Grupo hembras III* que fueron aquellas gallinas inseminadas con gallos del *Grupo machos III*. Cada uno de estos grupos de gallinas, estuvo formado por 10 corrales iguales de 5 gallinas, de tal modo que cada grupo estuvo compuesto por 50 gallinas. Cada uno de estos tres grupos se identificó mediante pegatinas que identificaban cada corral con el grupo al que pertenecía.

Tanto los gallos como las gallinas de estirpe pesada empleados en este ensayo, *Ross 308* y *Ross Pm3*, respectivamente, llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (25/03/2019). Al inicio de la semana 35 de vida de los gallos (01/07/2019) se llevó a cabo la evaluación de la calidad seminal de éstos, su clasificación según la motilidad progresiva y a continuación de iniciaron las inseminaciones. La semana 46 de vida de ambos reproductores (22/09/2019) terminó su participación en las pruebas, momento a partir del cual se reincorporaron al lote original de producción.

4.2.2.- Manejo de los animales

El alimento que se les suministró durante la prueba fue pienso para reproductoras pesadas en harina fabricado por COREN S.C.G con la referencia *Reproductoras Semipesadas*[®] y cuya composición se refleja en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores nutricionales del pienso *Reproductoras Semipesadas*[®].

Parámetro analítico	Valor nutricional
Energía metabolizable aves (kcal)	2.700,000
Proteína Bruta (%)	16,200
Lisina (%)	0,817
Lisina digestible (%)	0,700
Metionina (%)	0,427
Metionina digestible (%)	0,398
Metionina +Cisteína (%)	0,710
Metionina +Cisteína digestible (%)	0,630
Treonina (%)	0,601
Treonina digestible (%)	0,500
Triptófano (%)	0,198
Triptófano digestible (%)	0,165
Extracto etéreo (%)	4,906
Almidón (%)	36,868
Cenizas (%)	13,186
Calcio (%)	3,797
Fósforo digestible (%)	0,390
Sodio (%)	0,160
Ácido Linoléico (%)	1,500

Este alimento se suministró a los animales en una única dosis diaria a las 6:00 y siempre a esa misma hora del día. Para las hembras se utilizaron 140 gramos de pienso diario y para los machos 155 gramos de pienso diario. A todos los animales que participaron en el estudio, se les suministraron las mismas cantidades de alimento.

El agua suministrada fue agua fresca y potable, higienizada con cloro. Se les suministró calculando un consumo de 280 ml por ave y día para las hembras y 310 ml por ave y día para los machos.

Las condiciones ambientales fueron iguales para todas las aves y se lograron mediante el uso de los equipos de ventilación y refrigeración existentes en la explotación.

La prueba se realizó en las instalaciones de la granja de reproductoras *Sabuxe*, propiedad del Grupo COREN S.C.G, situada en

el ayuntamiento de Amoeiro, Ourense. Esta explotación consta de dos naves iguales de 80 x 12 m, con capacidad para 30.000 hembras y 1.700 machos en total. Cuenta con toda la infraestructura anexa y los servicios necesarios para el desarrollo de su actividad diaria.

4.2.3.- Reactivos para la preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se emplearon los siguientes reactivos:

- Medio HEPES/BSA: solución tampón con albúmina sérica bovina.
- Diluyente seminal IMV, compuesto por citrato, sales, buffer biológico, glucosa, taurina, agua purificada y colorante.
- Agua destilada

4.2.4.- Equipos y material

Para la obtención de las muestras y su posterior análisis se emplearon los siguientes equipos:

- Probetas estériles para la recogida de semen fresco
- Filtro de semen
- Sistema IVOSII, sistema CASA (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) (Figura 11a)
- Fotómetro D-101 (Dinko Instruments, Barcelona, España) (Figura 11b)

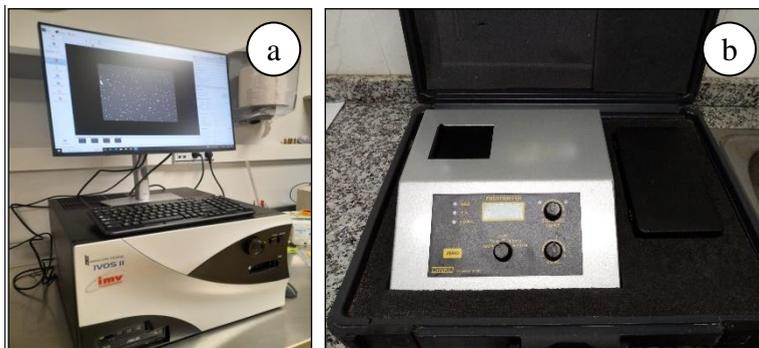


Figura 11. Sistema CASA-IVOS II (a) y fotómetro (b).

- Cámaras Leja: láminas portaobjetos de 4 celdas de 10 micras
- Micropipeta y puntas desechables
- Pistola de inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)
- Pajuelas desechables para inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)

4.2.5.- Clasificación de los gallos

Para la clasificación de machos atendiendo a su calidad como reproductores, se procedió a realizar una extracción de semen de cada macho de forma individual, siguiendo la técnica de masaje dorso-abdominal propuesta por Burrows y Quinn, 1937.

Para estos ensayos se emplearon gallos de 35 semanas de vida.

Cada muestra de semen se filtró y se hizo una dilución 1:400 para obtener una concentración final de 20-30 millones de espermatozoides por ml con diluyente aviar IMV. Se comprobó que la concentración era la adecuada una vez realizada la dilución, mediante el análisis de concentración de la muestra final por medio del empleo de un fotómetro. Para tal fin, se procedió a disolver 30 microlitos de semen diluido en 3 ml de agua destilada y se realizó la medición de transmitancia de la muestra en el fotómetro. Con los resultados obtenidos se calculó la concentración de espermatozoides de la muestra.

Inmediatamente después se tomó de esta muestra 1 microlitro y se diluyó en 200 microlitros de medio tamponado HEPES/BSA. A partir de esta última preparación se depositaron 3 microlitos en una cámara Leja de 4 celdas para evaluar en el sistema CASA- IVOS II.

Se introdujo la muestra en el sistema CASA-IVOS II y se valoraron diferentes parámetros de la muestra, utilizando finalmente los valores de motilidad total y progresiva para evaluar su fertilidad y clasificar a los machos.

4.2.6.- Inseminación

Las pruebas de inseminación se extendieron durante 12 semanas, iniciándose en la semana 35 de vida de las gallinas, hasta la semana 46

de vida de éstas, y no se repuso ningún animal en caso de producirse alguna baja durante la misma.

Se procedió a inseminar cada hembra con una frecuencia de inseminación de una vez cada 7 días. Se inseminó siempre el mismo día de la semana y a la misma hora. Se tuvo la consideración de inseminar con un mínimo de 3 h posteriores a la oviposición.

Para preparar la dosis seminal, se extrajo semen a todos los gallos de cada grupo y se procedió a homogeneizar todos los eyaculados obtenidos de los machos de cada grupo en una misma muestra. Posteriormente se realizó una inseminación vaginal de cada una de las hembras del grupo correspondiente con una dosis de 0,05 ml de semen puro obtenido de la muestra citada anteriormente.

4.2.7.- Manejo y análisis del huevo incubable

Durante la duración de la prueba se procedió a recoger de forma manual todos los huevos puestos por las gallinas los lunes, miércoles y viernes de cada semana. Se identificó cada huevo recogido con rotulador permanente con los datos de la semana de vida de la gallina y tratamiento al que pertenecía (Figura 12). Estos huevos se almacenaron en alvéolos de transporte especiales para huevo incubable y permanecieron en la cámara de conservación de la granja con unas condiciones ambientales de 19 °C y 60 % de humedad relativa hasta la llegada del camión de transporte.

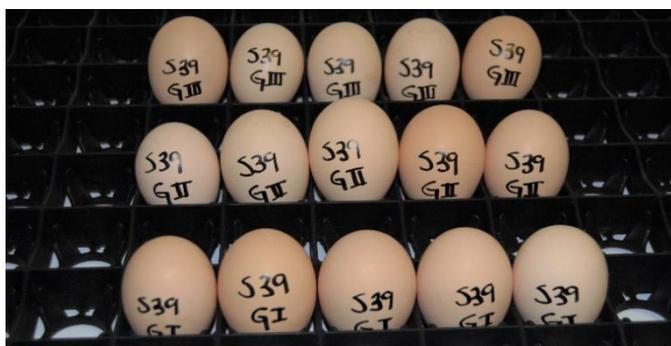


Figura 12. Marcaje de huevos incubables: semana (39) y grupo de gallinas (I, II, III).

Se introdujeron los huevos en un camión de transporte en el que se mantuvieron las mismas condiciones ambientales existentes en la cámara de almacenaje y se transportaron hasta el Centro Tecnológico de Incubación de COREN S.C.G., situado en el Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, Ourense. El transporte de los huevos siempre fue en los mismos días de la semana y a la misma hora durante el tiempo que duró la prueba.

A todos los huevos recogidos e identificados de forma individual, se les realizó un análisis embriológico para conocer cuáles de ellos eran fértiles (Figura 13). Para realizar este análisis se procedió a la apertura de todos los huevos y a la observación de la presencia o ausencia de estructuras embrionarias en los mismos.

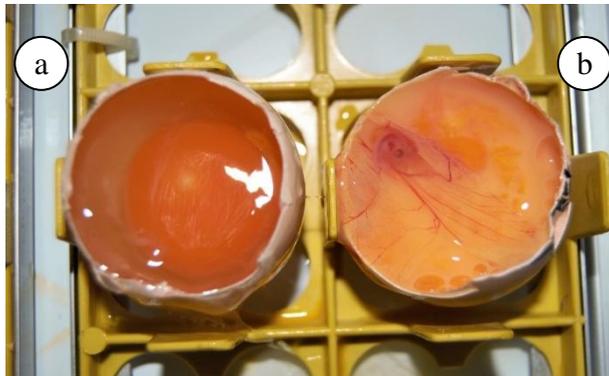


Figura 13. Análisis embriológico: huevo no fértil (a) y huevo fértil (b).

Los resultados de estos análisis se registraron por semanas, indicando el número total de huevos analizados y la cantidad de huevos fértiles por tratamiento.

Para el cálculo de la fertilidad se empleó siguiente fórmula, expresando el resultado en forma de porcentaje:

$$\text{Fertilidad (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ huevos fértiles} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ huevos totales analizados}}$$

4.2.8.- Análisis estadístico

Para establecer las diferencias significativas existentes entre las motilidades espermáticas totales, progresivas y concentración de las

muestras seminales, así como fertilidades observadas, con una distribución normal, aplicamos un estudio estadístico. En este caso se empleó la prueba ANOVA de un factor, estimándose el estadístico F y su probabilidad asociada, considerándose que las diferencias eran estadísticamente significativas si $p < 0,05$.

En las pruebas de inseminación de gallinas con los diferentes grupos de gallos, una vez determinada la existencia de diferencias entre las medias, se realizó la prueba post hoc de Duncan para determinar qué medias difieren.

Para la realización de estas pruebas estadísticas se empleó el paquete estadístico SPSS 23.0 para Windows (IBM Corporation, Nueva York, EE.UU.).

4.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

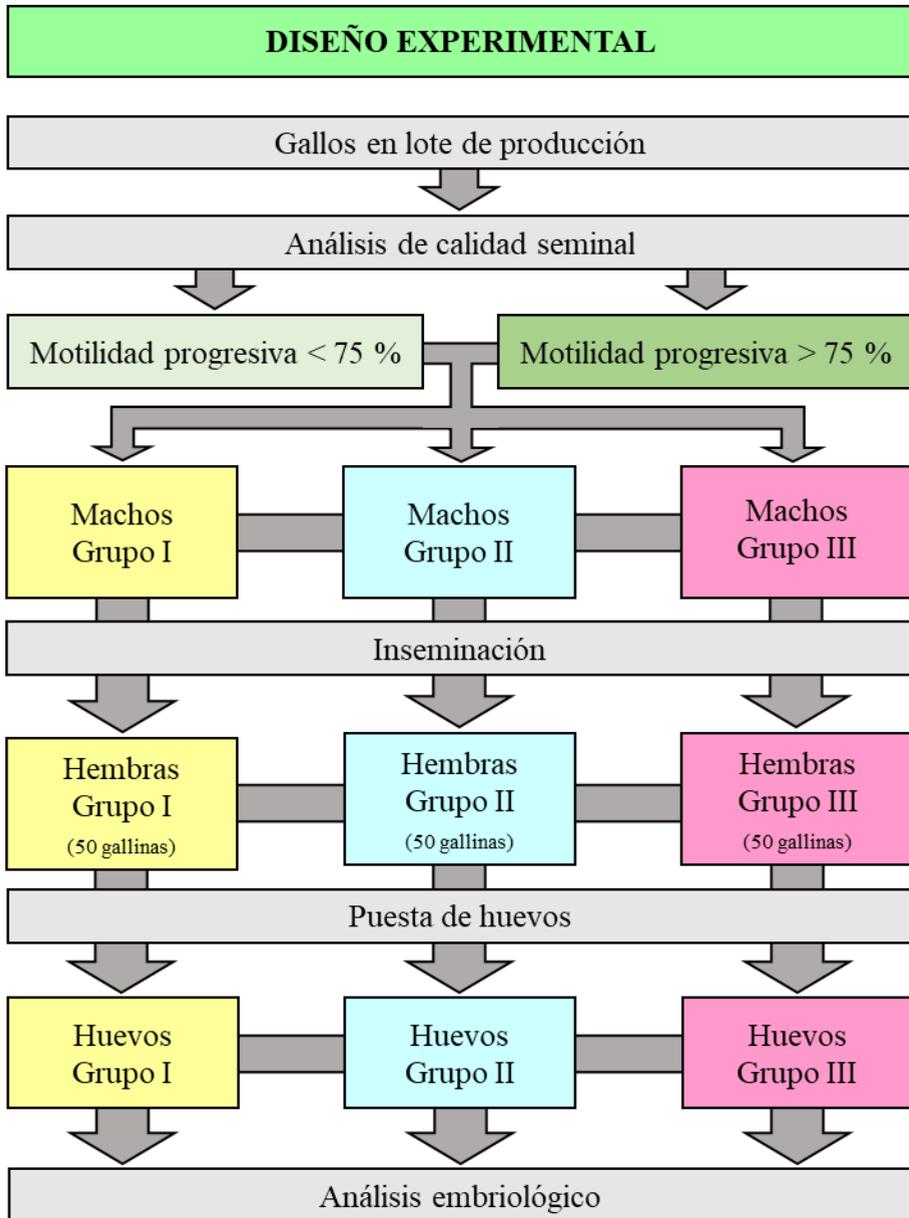


Figura 14. Diseño experimental del Capítulo I.

4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1.- Análisis individuales de la calidad del semen

Se llevaron a cabo los análisis individuales de motilidad total, motilidad progresiva y concentración del semen procedente de los 58 gallos seleccionados. Los valores medios para estos tres parámetros, sin diferenciaciones por grupos, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados obtenidos en los análisis seminales de los gallos.

Parámetro de análisis	Resultado (n= 58)
Motilidad total (%)	88,6±15,1
Motilidad progresiva (%)	68,9±19,8
Concentración media (B/ml)	3,4±1,5

Teniendo en cuenta que el factor que más influye en la capacidad fecundante de los espermatozoides es una correcta motilidad de los mismos (Mohan et al., 2018) tomamos el valor de motilidad progresiva para clasificar a los machos de este estudio. Así, fijamos como valor de corte para clasificar a los machos el 75 % de motilidad progresiva de los espermatozoides, considerando a los machos que tuvieron resultados por encima de este valor como machos más fértiles y a los que tuvieron valores inferiores al 75 % como machos menos fértiles. Este valor se tomó basándose en los resultados publicados por diversos autores para la motilidad espermática total en gallos, alcanzando valores del 70-77,5 % (Cumpa et al., 2009), 79-81 % (Plaza et al., 2015) o del 84,7-89,8 % (López, 2007). A la vista de estos resultados, se consideró que un valor de un 75 % de motilidad progresiva, englobaría al grupo de machos más fértiles.

De acuerdo a los trabajos realizados por Liu et al. (2017), entre un 8 y un 12% de los gallos reproductores son diagnosticados con baja motilidad espermática. No obstante, al aplicar el criterio de selección de nuestro estudio, se observó que 25 de los 58 gallos analizados (43,1 %) estarían en el grupo de gallos menos fértiles frente a los 33 gallos (56,9 %) que se podían clasificar como más fértiles.

Se realizó el análisis estadístico de los datos con el fin de evaluar si las diferencias encontradas en los valores de motilidad total, motilidad progresiva y concentración eran o no significativas entre ambos tipos de gallos. Los resultados se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis seminales de gallos clasificados según su motilidad progresiva.

Parámetro de análisis	Motilidad progresiva < 75 % (n= 25)	Motilidad progresiva ≥ 75 % (n= 33)	Sig.
Motilidad total (%)	78,3±19,6	96,4±1,6	***
Motilidad progresiva (%)	51,4±18,7	82,1±4,0	***
Concentración media (B/ml)	4,0±1,6	2,9±1,1	**

Sig.: Significancia estadística: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$

Según el análisis de la varianza aplicado a los datos obtenidos, encontramos que existen diferencias significativas en todos los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva y concentración entre los gallos menos fértiles y los gallos más fértiles.

Las diferencias significativas observadas entre individuos en relación a la calidad del semen de los mismos coinciden con los publicados por Bowling et al. (2003), los cuales indicaban la existencia de estas diferencias y las relacionaban, en su caso, con problemas de bajo peso corporal en los machos menos fértiles. Por todo ello, la clasificación de los gallos en función de su motilidad progresiva de acuerdo al criterio del 75 % parece ser la adecuada para la continuación del estudio.

Hidalgo (2006) recomienda el empleo de métodos automatizados para poder realizar el análisis de calidad seminal en gallos que eviten la subjetividad de los mismos, tal como el sistema CASA que hemos empleado en este estudio.

4.4.2.- Relación entre la motilidad progresiva y la fertilidad

Una vez realizado este análisis y la clasificación de los machos según su motilidad progresiva, se procedió a inseminar hembras de similares características con machos de diferente motilidad progresiva, mezclados entre sí, tal y como se ha descrito con anterioridad en el

punto 4.2.1. La idea de este procedimiento fue comprobar si la clasificación de los machos en base al porcentaje de motilidad progresiva se traducía finalmente en mejores índices de fertilidad.

La fertilidad semanal de las muestras de huevo incubable analizadas durante 12 semanas de inseminación (entre las semanas 35 a 46 de vida de las aves) se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Fertilidad obtenida en gallinas *Ross Pm3* inseminadas con gallos clasificados según su motilidad progresiva durante 12 semanas.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)		
	Grupo machos I	Grupo machos II	Grupo machos III
S35	95,2 (n= 124)	89,3 (n= 122)	90,6 (n= 127)
S36	93,7 (n= 111)	89,5 (n= 114)	90,1 (n= 121)
S37	95,0 (n= 121)	82,6 (n= 109)	89,1 (n= 119)
S38	95,7 (n= 116)	78,8 (n= 118)	89,6 (n= 125)
S39	95,7 (n= 116)	87,0 (n= 115)	89,6 (n= 115)
S40	96,4 (n= 112)	91,4 (n= 105)	87,8 (n= 115)
S41	96,1 (n= 102)	86,1 (n= 108)	90,2 (n= 112)
S42	97,1 (n= 104)	89,1 (n= 101)	90,0 (n= 120)
S43	94,3 (n= 106)	89,6 (n= 106)	92,9 (n= 113)
S44	91,9 (n= 111)	89,5 (n= 105)	92,0 (n= 113)
S45	95,0 (n= 101)	80,6 (n= 108)	82,6 (n= 109)
S46	93,3 (n= 105)	79,2 (n= 101)	87,0 (n= 108)
Promedio	95,0±1,5 (n= 1.329)	86,1±4,6 (n= 1.312)	89,3±2,6 (n= 1.397)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Según se refleja en la Figura 14, se observó que los mejores resultados de huevo fértil se obtuvieron con las gallinas inseminadas con machos pertenecientes al *Grupo machos I* (gallos con mejor motilidad progresiva, ≥ 75 %), seguidos de los machos del *Grupo machos III* (mezcla de gallos con mejor y peor motilidad progresiva) y terminando con los machos del *Grupo machos II* (gallos con peor motilidad progresiva, < 75 %),).

Hemos comprobado que existe una mejora significativa de la fertilidad de los gallos clasificados según su motilidad progresiva. De

esta manera la valoración de la calidad seminal resultó un método válido con el fin de poder seleccionar los mejores reproductores y eliminar a los de menor calidad dentro de un lote de reproductoras. Esta afirmación coincide con lo expresado por autores como Sauveur et al., (1992); Sieme et al., (2004); Vicente-Fiel et al., (2013) o Mohan et al., (2018).

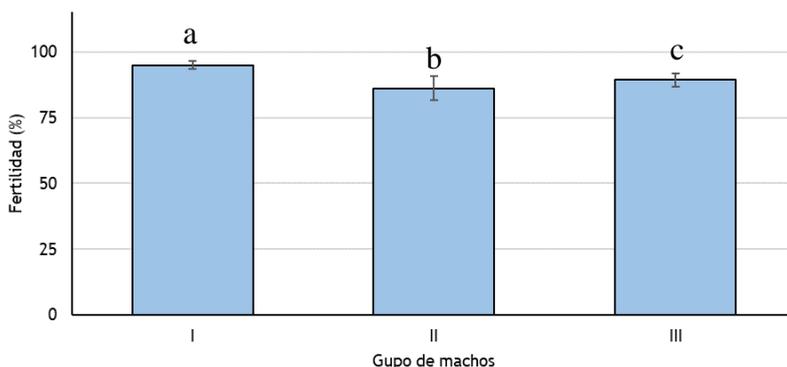


Figura 15. Fertilidad media tras la inseminación de gallinas Ross Pm3 con grupos de gallos clasificados según su motilidad progresiva (a-b-c: barras con letras diferentes, difieren significativamente).

Así, se ha demostrado que el factor de motilidad progresiva de los espermatozoides influye de manera significativa en la fertilidad del semen y en los resultados finales de fertilidad del lote (Figura 15). Esto es coincidente con lo afirmado por autores como Larsson (1986), Donoghue (1997) o Mohan (2018). Podemos afirmar que este parámetro se puede tomar como factor de análisis válido para clasificar muestras seminales dentro de los métodos de análisis seminal en gallos.

4.4.3.- Resultados económicos de la selección de gallos

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar la viabilidad económica de los resultados obtenidos en condiciones reales de producción.

Para poder llevar a cabo el análisis económico de la aplicación de la selección de gallos se realizaron las consideraciones previas que se indican en la Tabla 9.

Tabla 9. Consideraciones previas al análisis económico de la selección de gallos.

Parámetro	Valor
Porcentaje de machos eliminados	40 %
Edad de selección de machos	210 días
Cantidad de machos recriados a mayores	333 ♂
Consumo de pienso de un macho hasta los 210 días	18,95 kg
Precio kg pienso	0,27 €
Coste del programa vacunal de un macho	0,87 €
Mejora de fertilidad esperada	6 %
Tamaño lote estándar de reproductoras	10.000 ♀, 500 ♂
Tiempo de realización de análisis seminal (CASA)	10 min
Tiempo de extracción de semen por gallo	30 s
Coste por hora de un operario	12,00 €
Precio de venta de pollito	0,35 €
Pollitos producidos (por hembra en ciclo completo)	140 pollitos
Mejora de fertilidad esperada	6 %
Coste del material fungible para pruebas de calidad seminal (por muestra)	1,81 €
Coste equipo CASA IVOS II	41.580,00 €

El porcentaje de machos eliminados se extrapoló del porcentaje de machos con motilidad progresiva menor del 75 %, en la muestra de 58 animales analizados mediante el sistema CASA IVOS II.

Como edad de selección de machos se tomó el momento de realización de la selección de machos, 210 días. Los machos se trasladan desde la granja de cría en condiciones normales de producción a los 147 días y precisan de al menos 5 semanas para terminar el desarrollo y maduración testicular y comenzar la producción de semen, tras recibir el estímulo lumínico. Se le dan otras 4 semanas más para asegurarse que todos los machos se han adaptado

perfectamente a la rutina de extracción de semen y están en las condiciones óptimas para expresar todo su potencial en relación a su calidad seminal.

Se estimó en 333 el número de machos que fue necesario criar a mayores para suplir la falta de los desechados y mantener el ratio del 5 % (500 machos/10.000 hembras) para una correcta inseminación.

Consideramos una mejora de la fertilidad del 6 %, correspondiéndose este valor con la diferencia de fertilidad obtenida con las hembras inseminadas con machos del *Grupo machos I* (95,0 %) frente a la obtenida con machos del *Grupo machos III* (89,3 %).

Con todas estas consideraciones, se realizó la valoración económica teniendo en cuenta los costes y los beneficios obtenidos con la implementación de la técnica de selección de machos, obteniéndose los resultados expuestos en la Tabla 10.

Tabla 10. Valoración económica de la aplicación de la selección de gallos.

Concepto	Cálculo	Importe estimado (€)
Pienso	18,95 kg/♂ (hasta los 210 días) x 333 ♂= 6.310,35 kg 6.310,35 kg x 0,27 €/kg= 1.703,79 €	- 1.703,79 €
Vacunas	0,87 €/♂ x 333 ♂= 289,71 €	- 289,71 €
Pollitos	140 pollitos/♀ x 6 % incremento= 8,4 pollitos/♀ 10.000 ♀ x 8,4 pollitos/♀= 84.000 pollitos 84.000 pollitos x 0,35 €/pollito= 29.400,00 €	+ 29.400,00 €
Mano de obra muestreo	833 muestras x 10,00 min/muestra= 8.330 min 8.330 min= 138,83 h 138,83 h x 12,00 €/h= 1.665,96 €	- 1.665,96 €
Material fungible	833 muestras x 1,81 €/muestra = 1.507,73 €	- 1.507,73 €
Coste del equipo	Coste del equipo= 41.580,00 € Amortización= 5 ciclos 41.580,00 €/5 ciclos= 8.316,00 €/ciclo	- 8.316,00 €
Resultado final		+ 15.916,81 €

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que el empleo de las técnicas de selección de machos, en relación a la motilidad seminal de los mismos, resultaron económicamente viables en condiciones de producción estándar, para un lote de 10.000 reproductoras y 500 machos.

Si conseguimos modificar la variable del tamaño del lote, incrementando el tamaño del mismo, o bien si aumentamos el plazo asignado para la amortización del equipo, cada vez nos resultaría más rentable.

Podemos concluir, tras analizar los resultados obtenidos, que la aplicación de técnicas automáticas de valoración de la calidad seminal, resultaron útiles para la selección de machos y el incremento de los valores finales de un lote de reproductoras, teniendo en cuenta tanto los aspectos técnicos como los económicos.

5. CAPÍTULO II

***“EMPLEO DE DILUYENTES VS.
EMPLEO DE SEMEN FRESCO EN LA
INSEMINACIÓN DE GALLINAS
REPRODUCTORAS DE
ESTIRPE PESADA”***

5. CAPÍTULO II

5.1.- INTRODUCCIÓN

Con la aparición de las técnicas de inseminación artificial, se abren una serie de posibilidades nuevas a la hora de optimizar los procesos de selección y reproducción en las aves. A pesar de todas las ventajas que este tipo de técnicas nos proporcionan, uno de sus más claros inconvenientes es que una vez que se extrae el semen del macho, este va perdiendo capacidad fecundante a medida que transcurre el tiempo post extracción. En este sentido, se han estado desarrollando diversos medios que actúan como conservadores del semen fresco, manteniendo la viabilidad de los espermatozoides contenidos en él.

Las funciones principales de estos conservantes son, por un lado, mantener el pH del medio y proveer de los nutrientes necesarios a los espermatozoides con el fin de poder prolongar el tiempo de viabilidad del semen.

Con el uso de diluyentes en semen puro de ave, se ha observado que el tiempo de utilización del semen aumenta de forma significativa, llegando a detectarse capacidad fecundante del semen hasta 24-48 h post extracción.

Indirectamente, el empleo de medios conservantes o diluyentes, nos permite, además de prolongar el tiempo de vida útil del semen, optimizar el número de gallos presentes necesarios en la explotación y la cantidad de personal de inseminación necesario para poder inseminar las gallinas del lote. Esto redundará en una mayor eficacia en el proceso productivo de la granja de inseminación artificial.

Es evidente que a medida que diluimos el semen, la cantidad de espermatozoides que irán dentro de cada dosis seminal irá también disminuyendo, pudiendo resultar, finalmente, en pérdidas de fertilidad de los huevos producidos por las gallinas. La tasa de dilución debe ser la adecuada para asegurar la eficacia del diluyente, pero no excesiva.

En este sentido se considera que las tasas de dilución óptimas de semen en gallinas estarían en un ratio 1:1 ó 1:2.

A pesar de que la filosofía y el objetivo del empleo de diluyentes en inseminación artificial en aves es similar en todos los casos, no todos los diluyentes son iguales en cuanto a su composición y, por tanto, tampoco son iguales en cuanto a los resultados obtenidos en relación a la capacidad de mantener la actividad fecundante del semen en el tiempo.

Por otro lado, a pesar de las múltiples ventajas que se obtienen con el empleo de diluyentes, se ha observado que no siempre los resultados obtenidos con su uso son mejores que los obtenidos con el empleo de semen fresco.

En este estudio se propone evaluar cual es el efecto del empleo de diluyentes en semen fresco de reproductores de estirpe pesada comparándolo con el empleo de semen puro, en relación a la tasa de fertilidad obtenida de los huevos producidos por los mismos. De forma complementaria, se pretende valorar los efectos del uso de dos tipos de diluyentes (*Poultry Media*[®] y *Fertimax*[®]), que difieren en composición y pertenecientes a dos empresas distintas, en relación a la tasa de fertilidad de los huevos producidos. Finalmente, comprobaremos si el empleo de diluyentes resulta económicamente rentable en condiciones reales de producción.

5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1.- Animales

Para la realización de este estudio, se empleó un lote de hembras y machos reproductores pesados de la casa de genética Aviagen, similares a los empleados en el Capítulo I. Concretamente se emplearon gallinas de la estirpe *Ross Pm3* y gallos *Ross 308*. Estos animales pertenecen a una estirpe industrial pesada de producción de pollos de rápido crecimiento. Son aves con pesos aproximados de 3 kg y 5 kg en hembras y machos, respectivamente, y que producirán unos 170 huevos incubables por hembra a las 60 semanas de vida.

La prueba se inició con animales de 35 semanas de vida y se extendió durante 12 semanas, concretamente hasta las 46 semanas de vida de ambos reproductores.

Los gallos y las gallinas de estirpe pesada empleados en este ensayo, llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (09/04/2018). En la semana 35 de vida de los gallos y gallinas (16/07/2018) se iniciaron las inseminaciones con semen puro y diluido. En la semana 46 de vida de ambos reproductores (07/10/2018) cesaron las inseminaciones y tanto gallinas como gallos se reincorporaron al lote original de producción.

Se separaron de forma aleatoria 20 machos reproductores procedentes de un lote mayor de producción compuesto por 910 animales. Estos machos tenían la misma edad al inicio del estudio, procedían de la misma granja de cría y tenían pesos y conformaciones similares. Estos se alojaron en corrales individuales de 40x40 cm, en los que se les proporcionaron las mismas condiciones para todos los machos. No se repusieron machos nuevos en el periodo de duración de esta prueba.

En relación a las hembras, estas se alojaron en corrales de 1x1 m a razón de 5 gallinas por corral. Las condiciones de alojamiento fueron iguales para todas las gallinas del estudio y no se repusieron hembras durante el periodo en el que se realizó la prueba. Las gallinas procedían de un lote de producción formado por 15.000 aves de la misma granja de cría y con la misma edad. La selección de animales

fue aleatoria, aunque basándose en unas condiciones de peso y conformación similares.

Se repartieron los corrales de las hembras en 3 grupos distintos, cada uno de ellos formado por 10 corrales y 5 gallinas por corral, de manera que cada grupo estuvo formado por 50 gallinas.

Se definió como *P* el grupo formado por los animales inseminados con semen puro, como *IMV* el grupo formado por las gallinas inseminadas con semen diluido con *Poultry Media*[®] (laboratorios IMV Technologies) y como *FERT* el grupo formado por aquellas inseminadas con semen diluido con *Fertimax*[®] (laboratorios M.I.O Biologie). Cada corral se identificó de forma individual y permanente con pegatinas en las que se indicaba el grupo al que pertenecía.

5.2.2.- Manejo de los animales

Todos los animales de la prueba fueron alimentados con el mismo alimento y con la misma frecuencia que las reproductoras pesadas del Capítulo I, concretamente con el pienso *Reproductoras Semipesadas*[®] fabricado por COREN S.C.G. Se administró el citado pienso a razón de 140 g de alimento para las hembras y 155 g para los machos, accediendo todos los animales a las mismas cantidades de alimento.

El agua suministrada se estimó en 280 ml por hembra y día y 310 ml por macho y día. El agua se higieniza mediante el empleo de cloro.

En relación a las condiciones ambientales, estas fueron iguales para todas las aves durante todo el ensayo.

El ensayo se llevó a cabo en la explotación de reproductoras *Sabuxe*, que el grupo COREN S.C.G. posee en la localidad de Amoeiro, Ourense. Esta granja se dedica a producir huevo incubable y consta de dos naves gemelas de 80x12 metros con capacidad para alojar 30.000 hembras y 1.700 machos.

5.2.3.- Reactivos para la preparación de las muestras

Para la dilución del semen extraído de los gallos se emplearon los siguientes reactivos:

- Diluyente seminal *Poultry Media*[®], elaborado por laboratorios IMV Technologies (L'Aigle, Francia), y que estaba compuesto

por citrato, sales, buffer biológico, glucosa, taurina, agua purificada y colorante.

- Diluyente seminal *Fertimax*[®], elaborado por M.I.O Biologie (Chemillé-sur-Dême, Francia) y del cual no disponemos de su composición debido a su patente de fabricación.

5.2.4.- Equipos y material

Para la extracción del semen, su posterior evaluación e inseminación se emplearon los siguientes equipos y materiales

- Probetas estériles para la recogida de semen fresco
- Micropipeta y puntas desechables
- Pistola de inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)
- Pajuelas desechables para inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)

5.2.5.- Inseminación

Para la obtención de las muestras que se emplearon en la prueba, se procedió a extraer semen de los machos seleccionados de forma individual siguiendo la técnica de masaje dorso-abdominal propuesta por Burrows y Quinn (1937).

El semen de cada macho se recolectó directamente en probetas de vidrio estériles y posteriormente se juntó en una misma muestra para homogeneizar todos los eyaculados. Una vez obtenida esta muestra, se procedió a preparar otros tres tipos de submuestras diferentes para realizar la inseminación de cada grupo de gallinas.

Por un lado, se preparó la submuestra de semen puro, y por otro lado, la submuestra realizada con una dilución 1:1 con el diluyente *Poultry Media*[®] y la submuestra realizada con una dilución 1:1 con el diluyente *Fertimax*[®].

Las hembras fueron inseminadas una vez cada 7 días. Siempre se inseminaron las aves el mismo día de la semana y a la misma hora y siempre dejando un mínimo de 3 h post oviposición.

Se realizó una inseminación vaginal de cada una de las hembras con una dosis de 0,05 ml por ave, procedentes de las submuestras de

semen puro, semen diluido con diluyente *Poultry Media*[®] y semen diluido con diluyente *Fertimax*[®].

5.2.6.- Manejo y análisis del huevo incubable

Durante las 12 semanas que duró la prueba, se recogieron los huevos producidos por las gallinas, de forma manual, tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Asimismo todos los huevos se marcaron con rotulador permanente uno por uno identificando la semana de la prueba y el grupo de gallinas de origen (Figura 16).

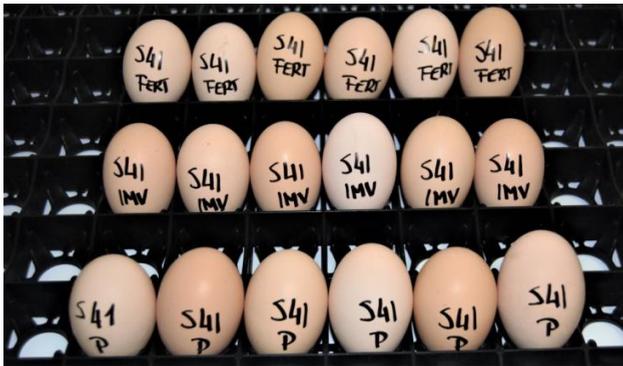


Figura 16. Marcaje de huevos incubables: semana (41) y grupo de gallinas (P, IMV, FERT).

A cada uno de los huevos se les realizó un análisis embriológico visual con el fin de determinar cuáles de ellos eran fértiles y cuáles no (Figura 17).



Figura 17. Análisis embriológico: huevos no fértiles (a) y huevos fértiles (b).

Todos los resultados de estos análisis se recopilaron por semanas en un registro en el que se contabilizó el número total de huevos analizados, así como los totales de huevos fértiles y no fértiles.

5.2.7.- Análisis estadístico

Con el fin de establecer las diferencias existentes entre las fertilidades observadas, con una distribución normal, aplicamos la prueba ANOVA de un factor, estimándose el estadístico F y su probabilidad asociada, considerándose que las diferencias eran estadísticamente significativas si $p < 0,05$.

Una vez que se determinó la existencia de diferencias entre las medias, se realizó un análisis post hoc mediante un test Duncan para determinar qué medias difieren.

Para la realización de estas pruebas estadísticas se empleó el paquete estadístico SPSS 23.0 para Windows (IBM Corporation, Nueva York, EE.UU.).

5.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

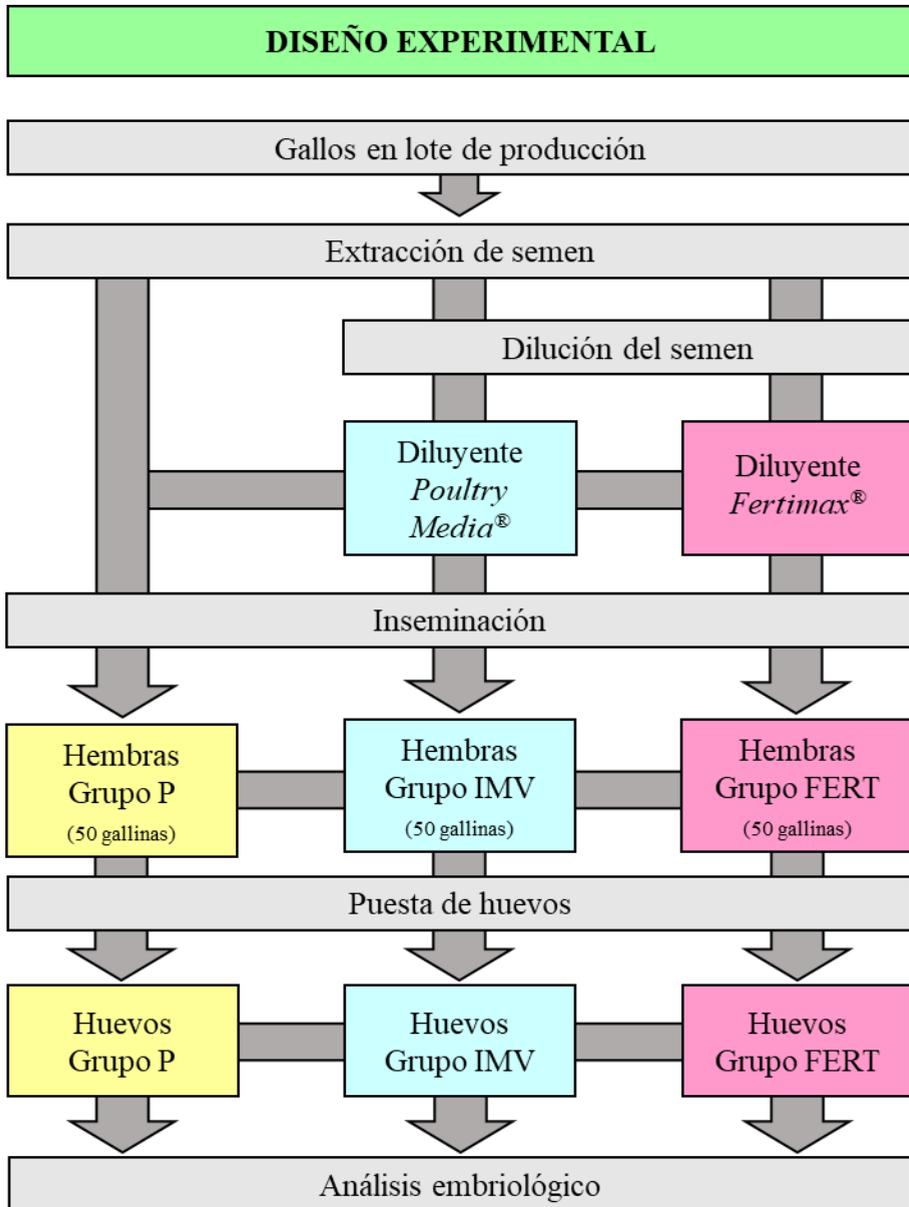


Figura 18. Diseño experimental del Capítulo II.

5.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1.- Fertilidad obtenida con semen puro y diluido

La fertilidad semanal de las muestras de huevo incubable analizadas durante 12 semanas de inseminación con semen puro y semen diluido con *Poultry Media*[®] y *Fertimax*[®] se muestran en la Tabla 11. Estas pruebas de inseminación se realizaron entre las semanas 35 y 46 de vida de las gallinas.

Tabla 11. Fertilidad obtenida en gallinas *Ross Pm3* inseminadas con semen puro y diluido durante 12 semanas.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)		
	Puro (P)	<i>Poultry Media</i> [®] (IMV)	<i>Fertimax</i> [®] (FERT)
S35	96,4 (n= 111)	92,8 (n= 111)	90,4 (n= 94)
S36	95,7 (n= 139)	90,8 (n= 109)	89,7 (n= 126)
S37	94,6 (n= 112)	81,7 (n= 109)	82,9 (n= 123)
S38	96,5 (n= 113)	98,0 (n= 100)	85,7 (n= 112)
S39	96,1 (n= 103)	95,1 (n= 102)	89,7 (n= 116)
S40	95,9 (n= 97)	90,9 (n= 99)	89,5 (n= 114)
S41	96,4 (n= 111)	95,1 (n= 103)	93,5 (n= 124)
S42	96,9 (n= 97)	95,3 (n= 107)	94,6 (n= 130)
S43	93,3 (n= 105)	94,2 (n= 104)	92,9 (n= 112)
S44	94,3 (n= 105)	94,6 (n= 92)	91,1 (n= 112)
S45	94,1 (n= 102)	94,2 (n= 104)	91,9 (n= 111)
S46	98,1 (n= 103)	97,2 (n= 107)	89,5 (n= 114)
Promedio	95,7±1,3 (n= 1.298)	93,3±4,3 (n= 1.247)	90,1±3,2 (n= 1.388)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Al evaluar la fertilidad media obtenida con el empleo de semen puro y con semen diluido con *Poultry Media*[®] y *Fertimax*[®] con diluciones 1:1, se observaron variaciones entre los valores de fertilidad obtenidos para cada grupo (Figura 19). A los resultados obtenidos para la fertilidad media se les aplicó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre los

diferentes grupos y la prueba post hoc de Duncan para determinar qué medias difieren.

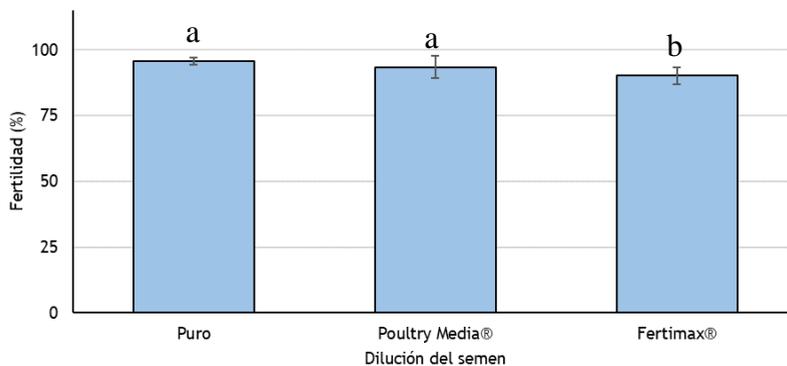


Figura 19. Fertilidad media tras la inseminación de gallinas Ross Pm3 con semen puro y diluido (a-b: barras con letras diferentes, difieren significativamente).

Según estos resultados, pudimos observar una significativa menor fertilidad con el semen diluido con *Fertimax*[®] (90,1 %) respecto a la que se obtiene con el semen puro (95,7 %) y con la dilución con *Poultry Media*[®] (93,3 %).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo indicado por autores como Donoghe y Wishart (2000), en relación al hecho de que el empleo de diluyentes en el semen aviar es un método eficaz y útil a la hora de su uso en técnicas de inseminación artificial en gallinas, pudiendo obtenerse niveles de fertilidad similares con semen fresco y semen diluido. En este sentido, hemos podido comprobar que no existen diferencias significativas de fertilidad cuando usamos semen puro y semen diluido, en el caso del diluyente *Poultry Media*[®].

Estos resultados también coinciden con los expresados por Capote et al. (1988) que no encontraron diferencias significativas en la fertilidad final obtenida al inseminar reproductoras ligeras con semen puro y con semen diluido. Asimismo, Sexton (1977) indicaba que utilizando diluyente seminal se podían mantener niveles de fertilidad similares al semen puro con diluciones de hasta 1:4.

El ratio de dilución se puede incrementar hasta 1:10 según los datos obtenidos por Wheackley y Shaffner (1954), aunque estudios

más recientes de Pearling et al. (2021) sugieren que una dilución superior al 1:4 produce diferencias significativas en los resultados de fertilidad.

Por otro lado, al haber observado diferencias en los resultados obtenidos entre los dos diluyentes empleados en el estudio, podemos concluir qué variaciones en la composición de los diferentes diluyentes, pueden influir directamente en los resultados de fertilidad obtenidos. Esta afirmación coincide con lo expresado por Weakley y Shaffner (1952) los cuales observaron diferencias significativas en la fertilidad al emplear como diluyente clara de huevo y una mezcla de suero salino con polimixina.

Rowell et al. (1960) encontraron diferencias significativas en la fertilidad al usar semen puro y semen diluido con glicina. Estudios más recientes como los llevados a cabo por Sexton (1998), Vasiccek et al. (2015) o Santiago-Moreno et al. (2017) demostraron la existencia de diferencias de fertilidad según el tipo de diluyente utilizado.

Por último, los estudios de Pearlin et al. (2021) coinciden con los resultados obtenidos en este estudio, ya que también detectaron diferencias significativas de fertilidad entre tres tipos de diluyentes.

5.4.2.- Resultados económicos del empleo de diluyentes

Una vez analizados los datos a nivel técnico, procedimos a determinar la posible viabilidad económica del empleo de diluyentes en condiciones reales de producción.

Esta evaluación económica se ha estimado para un lote de producción estándar compuesto por 10.000 hembras y 500 machos, eliminando el 50% de éstos últimos gracias a la dilución 1:1 del semen extraído.

Para poder realizar este análisis se tuvieron en cuenta las consideraciones reflejadas en la Tabla 12.

Tabla 12. Consideraciones previas al análisis económico del empleo de diluyentes para el semen de los gallos.

Parámetro	Valor
Porcentaje de machos eliminados	50 %
Edad de inicio de las inseminaciones	175 días
Vida productiva útil del lote	455 días
Tamaño lote estándar de reproductoras	10.000 ♀, 500 ♂
Tiempo de extracción de semen por gallo	30 s
Extracciones de semen por gallo y semana	2 extracciones
Dosis semen por gallina e inseminación	0,05 ml
Dilución semen:diluyente	1:1
Precio del ml de diluyente	0,378 €
Coste de mano de obra por hora	12,00 €
Precio del kg de pienso	0,27 €
Precio del m ³ de agua	1,24 €
Consumo medio diario de pienso por gallo	155 g
Consumo medio diario de agua por gallo	311 ml

Una vez tenidas en cuenta estas consideraciones previas, se realizó el análisis económico, obteniéndose los costes y los beneficios del empleo de diluyente, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 13.

El beneficio resultante del uso de un diluyente seminal es de 1.176,41 € con respecto a un sistema de fertilización puro. Por lo que a la vista de estos resultados y teniendo en cuenta el uso de un producto que proporcione una efectividad similar al semen fresco, como en el caso del *Poultry Media*[®], supondría una reducción notable de los costes productivos, ofreciendo una ventaja competitiva en el sector del pollo, que ya se aplica en la explotación de otras aves, concretamente, del pavo.

Tabla 13. Valoración económica de la aplicación de la dilución del semen en la inseminación artificial de las gallinas.

Concepto	Cálculo	Importe estimado (€)
Pienso	$0,155 \text{ kg/día}/\sigma \times 280 \text{ días/ciclo} = 43,40 \text{ kg}/\sigma$ $43,40 \text{ kg}/\sigma \times 250 \sigma = 10.850 \text{ kg pienso}$ $10.850 \text{ kg} \times 0,27 \text{ €/kg} = 2.562,98 \text{ €}$	+ 2.929,50 €
Agua	$0,311 \text{ l/día} \times 280 \text{ días/ciclo} = 87,08 \text{ l}/\sigma$ $87,08 \text{ l}/\sigma \times 250 \sigma = 21.770 \text{ l}$ $21.770 \text{ l} \times 0,00124 \text{ €/l} = 26,99 \text{ €}$	+ 26,99 €
Mano de obra extracción semen	$30 \text{ s} \times 2 \text{ extracciones/semana} = 60 \text{ s}/\sigma/\text{semana}$ $60 \text{ s}/\sigma/\text{semana} = 1 \text{ min}/\sigma/\text{semana}$ $250 \sigma \times 1 \text{ min}/\sigma/\text{semana} = 250 \text{ min/semana}$ $250 \text{ min/semana} \times 40 \text{ semanas} = 10.000 \text{ min} = 166,66 \text{ h}$ $166,66 \text{ h} \times 12,00 \text{ €/h} = 1.999,92 \text{ €}$	+ 1.999,92 €
Diluyente	$0,025 \text{ ml diluyente/ave} \times 10.000 \text{ ♀} = 250 \text{ ml diluyente}$ $250 \text{ ml diluyente} \times 40 \text{ semanas/ciclo} = 10.000 \text{ ml}$ $10.000 \text{ ml} \times 0,378 \text{ €/ml} = 3.780,00 \text{ €}$	- 3.780,00 €
Resultado final		+1.176,41 €

6. CAPÍTULO III

***“INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA DE
INSEMINACIÓN Y DEL TIEMPO POST
EXTRACCIÓN DE SEMEN FRESCO
SOBRE LA FERTILIDAD DE GALLINAS
REPRODUCTORAS DE ESTIRPES
PESADA, SEMIPESADA Y LIGERA”***

6. CAPÍTULO III

6.1.- INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en aves, presenta grandes oportunidades de crecimiento dentro del sector avícola. El empleo de estas técnicas, permite alcanzar en la actualidad altos niveles productivos junto con una optimización del trabajo del personal de las explotaciones. Con la utilización de la inseminación artificial, se obtienen niveles de fertilidad más constantes durante todo el ciclo productivo con una disminución del número de machos necesarios dentro de la explotación.

El sistema tradicional de monta natural, es difícil de controlar debido a factores sanitarios, zootécnicos, alimenticios y muchas veces económicos. Con el empleo de las técnicas de inseminación artificial en aves, se pueden tener controlados de manera más eficiente estos factores, obteniéndose huevos para incubar con un alto porcentaje de fertilidad, mejor control sanitario y, finalmente, pollitos con una mayor calidad.

Los espermatozoides almacenados en las glándulas del oviducto de la hembra, pueden sobrevivir en ellas y ser liberados conservando su poder fecundante durante un periodo de hasta 21 días en el caso de la gallina. Este período se denomina periodo fértil.

Se ha observado que la tasa de fecundación máxima de los huevos alcanza su nivel más alto el segundo día tras la inseminación y se mantiene próximo a ese nivel en una meseta que dura una semana aproximadamente, y que desciende posteriormente con rapidez siguiendo una curva sigmoideal, para pasar a ser nulo a partir de los 20 días post inseminación. De acuerdo a estos datos, es preciso que el intervalo entre inseminaciones no supere la duración del periodo de meseta.

Por otro lado, se han descrito cambios importantes en la composición del semen una vez que se ha extraído del macho. Dichos cambios son consecuencia directa del metabolismo de los espermatozoides presentes en el semen y de las reacciones que tienen lugar entre las distintas sustancias que componen el semen (peroxidaciones lipídicas, aumentos del pH, disminuciones de la cantidad de ATP, etc.).

Todas estas reacciones que se producen en el semen una vez que es extraído del macho, influyen de manera directa en la capacidad fecundante del mismo. A medida que se aumenta el tiempo que transcurre entre la extracción del semen y su introducción dentro del oviducto de la gallina por medio de las técnicas de inseminación artificial, se va produciendo una pérdida de la capacidad fecundante del mismo.

En este estudio nos proponemos determinar cuál es la frecuencia óptima de inseminación para un lote de gallinas reproductoras, intentando conciliar el nivel máximo de fertilidad obtenido en los huevos producidos por las gallinas con el coste de la inseminación.

Por otro lado, se analiza cómo influye el tiempo que transcurre desde que se extrae el semen hasta que se introduce en la gallina, en relación a la fertilidad obtenida en los huevos producidos por las gallinas, con el fin de intentar determinar el periodo máximo de conservación del semen fresco antes de su utilización, sin que disminuya su capacidad fecundante de forma significativa.

Este estudio se lleva a cabo con tres líneas genéticas diferentes con el fin de incluir todas las variedades de producción existentes de forma habitual en el mercado.

6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1.- Animales

Para la realización de este estudio se utilizaron aves pertenecientes a tres grupos o estirpes de producción diferentes: gallinas pesadas de aptitud cárnica y crecimiento rápido, gallinas semipesadas de aptitud cárnica y crecimiento lento y gallinas ligeras de aptitud puesta.

6.2.1.1.- Estirpes pesadas

Para las estirpes de gallinas pesadas de crecimiento rápido se utilizaron hembras *Ross Pm3* y machos *Ross 308* de la compañía de genética Aviagen (Figura 20). Estas son gallinas orientadas a la producción de pollos de crecimiento rápido con pesos altos a los 45 días e índices de conversión bajos.

La producción a 60 semanas de vida de la gallina, se espera que sea de 173 huevos incubables y un peso de 3 kg. El macho es un macho diseñado para el cruce con este tipo de gallinas pesadas y se espera que tenga un peso a 60 semanas de vida de 5 kg. Los pollos producidos por esta estirpe de gallinas se utilizan para la producción industrial intensiva de pollo.



Figura 20. Hembra *Ross Pm3* (a) y macho *Ross 308* (b).

6.2.1.2.- Estirpes semipesadas

Para las estirpes de gallinas semipesadas de crecimiento lento, se utilizaron gallinas *Hubbard JA57* y machos *Redbro*, de la casa de genética Hubbard (Figura 21). Estos animales son aves orientadas a la producción de pollo de carne de crecimiento lento.

La producción esperada de las gallinas a 60 semanas es de 204 huevos incubables acumulados y un peso de la hembra de 2,220 kg. El macho empleado en el cruce es un macho semipesado con un objetivo de peso a 60 semanas de 4,5 kg.

Los pollos producidos por estas aves son de aptitud cárnica, pero de crecimiento más lento que los anteriormente descritos. Se suelen utilizar para la producción de pollo campero con salida al exterior.



Figura 21. Hembra *Hubbard JA57* (a) y macho *Hubbard Redbro* (b).

6.2.1.3.- Estirpes ligeras

Para las gallinas ligeras de aptitud puesta, se utilizaron gallinas y machos *Lohmann Brown*, de la casa de genética Lohmann (Figura 22). Estas son aves ligeras que alcanzan pesos mucho menores que las dos estirpes anteriormente descritas, pero que tienen una gran capacidad de producción de huevo.

Así, se espera que las gallinas a 60 semanas produzcan 245 huevos incubables acumulados y pesen 1,945 kg. En relación al macho, se espera un peso a 60 semanas de 2,990 kg.

Los pollitos producidos por estos animales se utilizarán como futuras ponedoras de huevo comercial.



Figura 22. Hembra *Lohmann Brown* (a) y macho *Lohmann Brown* (b).

6.2.1.4.- Selección de los gallos y gallinas

En el caso de los gallos se seleccionaron 20 machos de cada estirpe de forma aleatoria procedentes de un lote de mayor tamaño compuesto por 950 individuos. Estos procedían todos del mismo grupo de recría, tenían la misma edad y presentaban conformaciones y pesos similares. Se alojaron en corrales individuales de 40x40 cm con las mismas condiciones para todos los machos que intervinieron en el estudio. Durante la duración del mismo, no se repusieron machos nuevos.

Para la selección de las gallinas de los ensayos se separaron 50 hembras procedentes de un lote mayor de producción formado por 15.000 animales en el caso de *Ross Pm3* y 18.000 en los casos de *Lohmann Brown* y *Hubbard JA57*. Todas las hembras presentaron pesos y conformaciones similares y procedían de la misma recría.

Las hembras se alojaron en corrales colectivos de 5 aves por corral. Las dimensiones de los mismos fueron de 1x1 m, siendo todos los corrales y las condiciones de los mismos, iguales para todas las aves. No se repusieron animales nuevos durante el tiempo de duración de la prueba.

En las pruebas de inseminación correspondientes a los ensayos de tiempo post extracción cada corral se identificó con letras T1, T2, T3 y así sucesivamente hasta el T10. En el caso de pruebas de frecuencia de inseminación se identificaron los corrales con las letras F1, F2, y sucesivos hasta F10. La identificación de los corrales se realizó por medio del uso de pegatinas. Todos los animales se comenzaron a testar con 36 semanas de vida, coincidiendo con su pico de fertilidad máximo, y se prolongaron las pruebas de inseminación hasta la semana 45 de vida.

Para el desarrollo de las diferentes pruebas de inseminación se emplearon los siguientes lotes de reproductoras:

- Estirpe pesada *Ross Pm3*: los gallos y gallinas de este lote llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (03/04/2017), iniciándose las inseminaciones correspondientes a estos ensayos el día 17/07/2017 (semana 36 de vida de las reproductoras) y terminando su participación en las pruebas el día 08/10/2017 (semana 45 de vida de las reproductoras), momento a partir del cual se reincorporaron al lote original de producción.
- Estirpe semipesada *Hubbard JA5*: los gallos y gallinas de este lote llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (08/02/2016), iniciándose las inseminaciones correspondientes a estos ensayos el día 23/05/2016 (semana 36 de vida de las reproductoras) y terminando su participación en las pruebas el día 31/07/2016 (semana 45 de vida de las reproductoras), momento a partir del cual se reincorporaron al lote original de producción.
- Estirpe ligera *Lohmann Brown*: para las pruebas de inseminación con semen puros los gallos y gallinas de este lote llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (11/01/2016), iniciándose las inseminaciones correspondientes a estos ensayos el día 25/04/2016 (semana 36 de vida de las reproductoras) y terminando su participación en las pruebas el día 03/07/2016 (semana 45 de vida de las reproductoras), momento a partir del cual se reincorporaron al lote original de producción. Los ensayos de inseminación con

semen diluido en gallinas estirpe ligera se llevaron a cabo en 2020. De esta manera, los gallos y gallinas para este ensayo llegaron a la explotación de producción con 21 semanas de vida (18/05/2020), iniciándose las inseminaciones correspondientes a estos ensayos el día 31/08/2020 (semana 36 de vida de las reproductoras) y terminando su participación en las pruebas el día 08/11/2020 (semana 45 de vida de las reproductoras), momento a partir del cual se reincorporaron al lote original de producción.

6.2.2.- Manejo de los animales

Las pruebas de este ensayo se realizaron en las explotaciones *Vales* y *Sabuxe*, propiedad de COREN S.C.G, ambas situadas en el ayuntamiento de Amoeiro, Ourense. La granja *Vales* (ensayos con estirpe semipesada, *Hubbard JA57*) posee dos naves de 110 x 12 m y 90 x 12 m, con una capacidad total de 35.000 hembras reproductoras y 1.960 machos. La granja *Sabuxe* (ensayos con estirpe pesada, *Ross Pm3*, y ligera, *Lohmann Brown*) cuenta con dos naves gemelas de 80 x 12 metros, con capacidad para alojar 30.000 hembras y 1.700 machos reproductores en total. Ambas explotaciones disponen de todos los equipamientos e instalaciones necesarias para el desarrollo normal de su actividad.

En relación con el alimento suministrado, se emplearon diferentes piensos en harina, según la reproductora que se tratase, todos ellos fabricados por COREN S.C.G.

Para las gallinas *Ross Pm3* y sus machos, así como para las gallinas *Hubbard JA57* y sus machos, se utilizó pienso con referencia *Reproductoras Semipesadas*[®]. En el caso de las gallinas *Lohmann Brown* y sus machos se empleó un pienso con referencia *Reproductoras Especial*[®].

El alimento se suministró a los animales una vez al día, a las 6:00 horas y siempre a la misma hora durante el desarrollo de la prueba.

La composición de los piensos *Reproductoras Semipesadas*[®] y *Reproductoras Especial*[®] se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores nutricionales de los piensos *Reproductoras Semipesadas*[®] y *Reproductoras Especial*[®].

Parámetro analítico	Valor nutricional	
	<i>Reproductoras Semipesadas</i> [®]	<i>Reproductoras Especial</i> [®]
Energía metabolizable (kcal)	2.700,000	2.750,000
Proteína bruta (%)	16,200	17,522
Lisina (%)	0,817	0,910
Lisina digestible (%)	0,700	0,769
Metionina (%)	0,427	0,488
Metionina digestible (%)	0,398	0,454
Metionina +Cisteína (%)	0,710	0,782
Metionina +Cisteína digestible (%)	0,630	0,690
Treonina (%)	0,601	0,675
Treonina digestible (%)	0,500	0,561
Triptófano (%)	0,198	0,204
Triptófano digestible (%)	0,165	0,177
Extracto etéreo (%)	4,906	5,158
Almidón (%)	36,868	36,599
Cenizas (%)	13,186	13,213
Calcio (%)	3,797	3,801
Fósforo digestible (%)	0,390	0,363
Sodio (%)	0,160	0,149
Ácido Linoléico (%)	1,500	1,703

Las cantidades de alimento se estimaron en 140 g para las gallinas *Ross Pm3* y 155 g para los machos *Ross 308*; 135 g para las hembras *Hubbard JA57* y 145 g para los machos *Hubbard Redbro*; y 120 g las hembras *Lohmann Brown* y 125 g los machos *Lohmann Brown*. Todos los animales tuvieron acceso a la misma cantidad de alimento.

El agua suministrada era potable, fresca e higienizada por medio de cloro. Se calcularon unos consumos de 280 ml/día para las hembras *Ross Pm3* y 310 ml/día para sus machos. Para las hembras *Hubbard JA57* se calcularon consumos de 270 ml/día y 290 ml/día para sus machos. Para las hembras *Lohmann Brown* se calcularon 240 ml/día y 250 ml/día para sus machos.

6.2.3.- Equipos y material

Para la realización de estas pruebas se emplearon los siguientes materiales, equipos y reactivos, todos ellos relacionados con la inseminación de las gallinas:

- Probetas estériles para la recogida de semen fresco
- Micropipeta y puntas desechables
- Pistola de inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)
- Pajuelas desechables para inseminación aviar IMV (IMV Technologies, L'Aigle, Francia)

6.2.4.- Prueba de frecuencia de inseminación

El desarrollo de las pruebas de frecuencia de inseminación se realizó de igual manera en las tres estirpes de reproductoras incluidas en los ensayos: *Ross Pm3*, *Hubbard JA57* y *Lohmann Brown*.

6.2.4.1.- Inseminación

La extracción de semen se realizó de forma individual a cada uno de los machos, siguiendo la técnica basada en la descrita por Burrows y Quinn (1937). Cada eyaculado se recogió en una probeta y posteriormente se mezclaron todos con el fin de homogeneizarlos.

Se procedió a realizar las inseminaciones con las frecuencias reflejadas en la Tabla 15.

Tabla 15. Frecuencias y número de inseminaciones en cada corral de ensayo.

Identificación corral	Frecuencia de inseminación	Inseminaciones totales
F1	diaria	77 inseminaciones
F2	2 días	39 inseminaciones
F3	4 días	19 inseminaciones
F4	6 días	13 inseminaciones
F5	8 días	10 inseminaciones
F6	10 días	10 inseminaciones
F7	12 días	7 inseminaciones
F8	14 días	6 inseminaciones
F9	16 días	5 inseminaciones
F10	18 días	5 inseminaciones

Teniendo en cuenta que los ensayos se prolongaron durante 10 semanas se calculó el número de inseminaciones totales necesarias para el desarrollo de cada una de las pruebas con diferentes frecuencias.

Las hembras se inseminaron siempre a la misma hora del día dejando al menos 3 h tras la oviposición. Se utilizó una dosis de semen de 0,05 ml/ave.

6.2.4.2.- Manejo y análisis del huevo incubable

Los huevos producidos por las gallinas alojadas en cada uno de los corrales se recogieron de forma individual tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) y se identificaron cada uno de ellos, tal como se muestra en la Figura 23, con rotulador permanente indicando la semana de vida de la gallina (36 a 45) y el tipo de corral de procedencia (frecuencia de inseminación).



Figura 23. Marcaje de huevo incubable en los ensayos de frecuencia de inseminación.

Todos estos huevos fueron colocados en alvéolos destinados para la recolección y transporte de huevo incubable y almacenados en la cámara de conservación de la explotación a 19 °C y 60 % de humedad relativa. Posteriormente se trasladaron al Centro Tecnológico de Incubación de COREN S.C.G., situado en el Parque Tecnológico de

Galicia, San Ciprián de Viñas, Ourense. Para este transporte se utilizó un camión habilitado para tal fin que conservó los parámetros existentes en la cámara de conservación de la granja. El transporte de estos huevos se realizó siempre el mismo día de la semana y a la misma hora.

Los huevos recibidos en el Centro Tecnológico de Incubación, se sometieron a un análisis embriológico para determinar cuáles de ellos eran huevos fértiles y cuáles no (Figura 24). Los resultados de estos análisis se recogieron en una tabla donde se anotaron el número de huevos analizados, así como el número de fértiles y no fértiles.



Figura 24. Análisis embriológico de los huevos obtenidos en los ensayos de frecuencia de inseminación.

6.2.5.- Prueba de tiempos de inseminación post extracción

El desarrollo de las pruebas de tiempos de inseminación post extracción del semen se realizó de igual manera en las tres estirpes de reproductoras incluidas en los ensayos: *Ross Pm3*, *Hubbard JA57* y *Lohmann Brown*.

6.2.5.1.- Inseminación

De los machos seleccionados, se procedió a extraer semen de cada uno de ellos siguiendo el método de extracción propuesto por Burrows y Quinn (1937). Posteriormente se mezclaron todos los

eyaculados obtenidos de los machos con el fin de homogeneizar todo el semen extraído. La muestra resultante se mantuvo en un termo con agua a 40 °C durante todo el periodo de inseminación.

Las hembras fueron inseminadas una vez cada 7 días, siempre el mismo día de la semana, comenzando a la misma hora y guardando siempre un mínimo de 3 h post oviposición. Se utilizó una dosis de semen de 0,05 ml/ave.

Se procedió a realizar las inseminaciones a diferentes tiempos de inseminación post extracción del semen en los gallos, tal y como se indica en la Tabla 16. Teniendo en cuenta que los ensayos se prolongaron durante 10 semanas y que se inseminaron las gallinas cada 7 días el número de inseminaciones totales necesarias para el desarrollo de cada una de las pruebas fue de 10.

Tabla 16. Tiempo de inseminación post extracción y número de Inseminaciones en cada corral de ensayo.

Identificación corral	Tiempo de inseminación post extracción	Inseminaciones totales
T1	Inmediato	10 inseminaciones
T2	3 min	10 inseminaciones
T3	6 min	10 inseminaciones
T4	9 min	10 inseminaciones
T5	12 min	10 inseminaciones
T6	15 min	10 inseminaciones
T7	18 min	10 inseminaciones
T8	21 min	10 inseminaciones
T9	24 min	10 inseminaciones
T10	27 min	10 inseminaciones

6.2.5.2.- Manejo y análisis del huevo incubable

Al igual que en los ensayos de frecuencia de inseminación, los huevos producidos por las gallinas alojadas, en cada uno de los corrales, se recogieron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Estos huevos se marcaron de forma individual con un rotulador permanente (Figura 25), indicando en cada huevo la semana

de vida de las reproductoras (36-45) y el tipo de corral de procedencia (tiempo de inseminación post extracción).

Los huevos se almacenaron en alvéolos de transporte especiales para huevo incubable y se alojaron en la cámara de conservación de la explotación con condiciones ambientales controladas de 19 °C y 60 % de humedad relativa. Los huevos fueron transportados hasta el Centro Tecnológico de Incubación de COREN S.C.G. en Ourense. Se empleó un camión de transporte en el que se conservaron las mismas características ambientales que había en la cámara de conservación de la granja. Este transporte se realizó siempre en los mismos días de la semana y a la misma hora durante todo el tiempo que duró la prueba.



Figura 25. Marcaje de huevo incubable en los ensayos de tiempos de inseminación post extracción.

Para determinar el número de huevos fértiles, se les realizó un análisis embriológico procediendo a la apertura de los mismos y a la observación de la presencia o ausencia de estructuras embrionarias.

Los resultados de estos análisis se registraron por semanas indicando el número total de huevos analizados y la cantidad de huevos fértiles.

6.2.6.- Prueba de frecuencia de inseminación y de tiempos de inseminación post extracción con semen diluido

Tal y como se pudo comprobar en el capítulo II de esta Tesis no se observaron diferencias significativas con el empleo del diluyente

Poultry Media[®] (laboratorios IMV Technologies, L'Aigle, Francia), frente al empleo de semen puro.

Tomado como base esta afirmación, se volvió a reproducir el mismo experimento con gallinas ligeras de estirpe *Lohmann Brown* con el fin de evaluar el efecto del tiempo post extracción y la frecuencia de inseminación sobre la fertilidad obtenida, esta vez utilizando semen diluido con el diluyente *Poultry Media*[®].

6.2.6.1.- Inseminación

El procedimiento de extracción de semen de los machos, así como la posterior inseminación de las hembras, fueron similares a los descritos con anterioridad en los correspondientes epígrafes de este capítulo correspondientes a las pruebas de frecuencia de inseminación y tiempos de inseminación post extracción, con la diferencia del empleo de diluyente *Poultry Media*[®]. Para realizar la dilución, se procedió a emplear una mezcla de semen puro y diluyente a razón de 1:1. Posteriormente se inseminaron a las aves con una dosis de 0,05 ml/ave.

6.2.6.2.- Manejo y análisis del huevo incubable

El manejo y análisis del huevo incubable fue el mismo que el descrito en los apartados de este capítulo correspondientes a las pruebas de inseminación con semen puro a distintas frecuencias y tiempos de inseminación post extracción.

6.2.7.- Análisis estadístico

Para conocer la relación entre la fertilidad y los diferentes tiempos de inseminación post extracción del semen y las frecuencias de inseminación, se determinó la relación causa-efecto entre la variable dependiente (fertilidad) y las variables independientes (tiempo post extracción y frecuencia de inseminación).

Se evaluó el ajuste de las fertilidades obtenidas a una regresión segmentada, ajustando en cada intervalo los datos a una recta y calculando el límite entre los segmentos (punto de corte).

Las correlaciones entre las diferentes fertilidades y los tiempos y frecuencias de inseminación, se procesaron empleando el programa

estadístico R Studio versión 4.0.4 (RStudio, Boston, EE.UU.), evidenciando diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

6.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

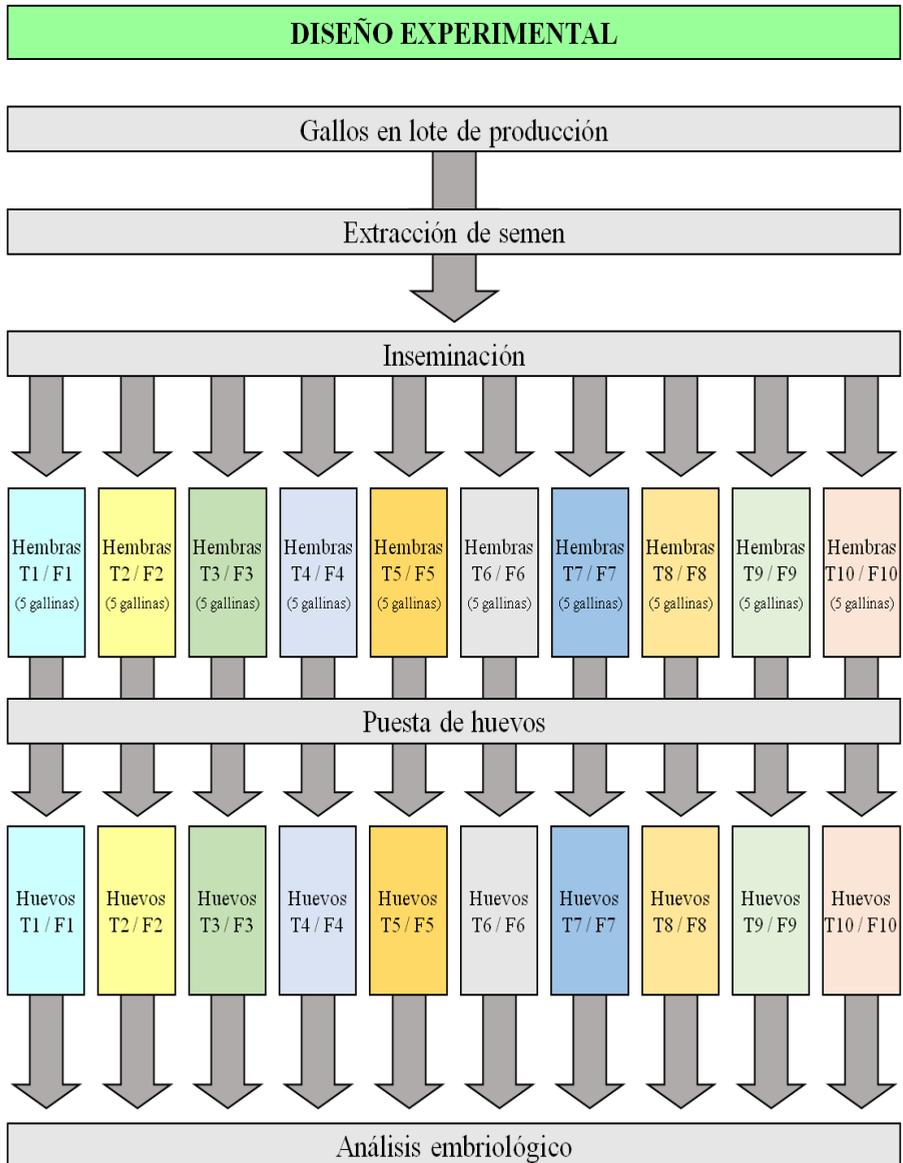


Figura 26. Diseño experimental del Capítulo III.

6.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1.- Fertilidad tras la inseminación a diferentes frecuencias

Para determinar la fertilidad media obtenida durante las 10 semanas que duró el estudio se realizó el análisis embriológico de los huevos producidos por las gallinas de las estirpes *Ross Pm3* (estirpe pesada), *Hubbard JA57* (estirpe semipesada) y *Lohmann Brown* (estirpe ligera).

6.4.1.1.- Gallinas de estirpe pesada: *Ross Pm3*

En la Tabla 17 se muestra la fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe pesada tras su inseminación a diferentes frecuencias.

Tabla 17. Fertilidades semanales y promedio obtenidas durante los ensayos de inseminación a distinta frecuencias en gallinas *Ross Pm3*.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	diaria	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
S36	100,0 (n= 10)	90,9 (n= 11)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 10)	83,3 (n= 6)	100,0 (n= 11)	90,9 (n= 11)	81,8 (n= 11)	75,0 (n= 12)	50,0 (n= 6)
S37	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 10)	87,5 (n= 8)	100,0 (n= 10)	77,8 (n= 9)	54,5 (n= 11)	54,5 (n= 11)	58,3 (n= 12)	33,3 (n= 12)
S38	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 9)	87,5 (n= 8)	76,9 (n= 13)	100,0 (n= 12)	69,2 (n= 13)	84,6 (n= 13)	70,0 (n= 10)	81,8 (n= 11)
S39	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 8)	100,0 (n= 12)	80,0 (n= 10)	100,0 (n= 12)	85,7 (n= 14)	36,4 (n= 11)	16,7 (n= 12)
S40	87,5 (n= 8)	90,0 (n= 10)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 9)	80,0 (n= 10)	72,7 (n= 11)	66,7 (n= 9)	90,9 (n= 11)	70,0 (n= 10)	60,0 (n= 10)
S41	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 8)	87,5 (n= 8)	100,0 (n= 12)	81,8 (n= 11)	75,0 (n= 8)	30,0 (n= 10)	84,6 (n= 13)	53,8 (n= 13)	66,7 (n= 9)
S42	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 8)	87,5 (n= 8)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 8)	100,0 (n= 10)	83,3 (n= 12)	77,8 (n= 9)	90,9 (n= 11)	10,0 (n= 10)
S43	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 8)	88,9 (n= 9)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 10)	75,0 (n= 8)	54,5 (n= 11)	77,8 (n= 9)	63,6 (n= 11)	0,0 (n= 4)
S44	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 5)	100,0 (n= 7)	100,0 (n= 6)	100,0 (n= 8)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 9)	0,0 (n= 11)	55,6 (n= 9)
S45	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 8)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 8)	100,0 (n= 11)	90,9 (n= 11)	80,0 (n= 10)	84,6 (n= 13)	0,0 (n= 13)	83,3 (n= 12)
Promedio	97,9±4,5 (n= 97)	98,1±4,0 (n= 89)	96,4±5,8 (n= 89)	97,5±5,3 (n= 88)	92,2±10,2 (n= 99)	87,1±12,1 (n= 102)	72,9±22,4 (n= 109)	82,2±11,7 (n= 113)	51,8±30,8 (n= 114)	45,7±29,5 (n= 95)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Como se puede observar en la Figura 27, la fertilidad media de los huevos producidos por las gallinas de estirpe pesada *Ross Pm3*, cuando son inseminadas a distintas frecuencias, decae a medida que aumenta el periodo entre inseminaciones.

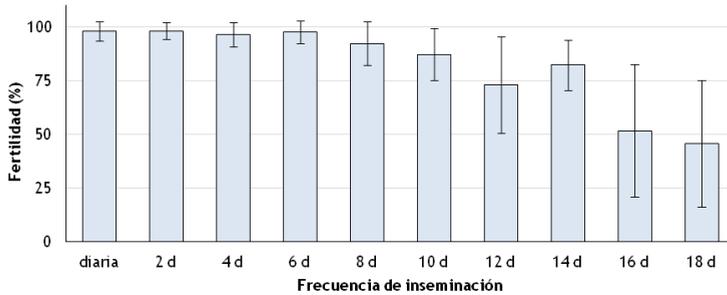


Figura 27. Fertilidad media obtenida en gallinas *Ross Pm3* inseminadas a distintas frecuencias.

Posteriormente, se realizó el correspondiente análisis estadístico de estos datos con el objetivo de determinar si las fertilidades obtenidas con las diferentes frecuencias de inseminación en gallinas de estirpe pesada *Ross Pm3* se ajustaban a un modelo lineal discontinuo y, en ese caso, determinar cuál era el punto en el que se producía un cambio de tendencia en su evolución (*broken line*).

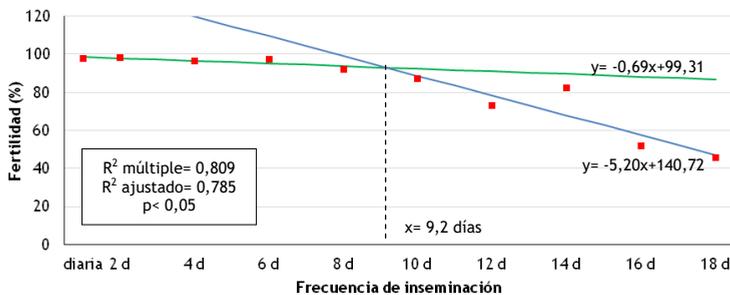


Figura 28. Ajuste al modelo lineal discontinuo de la fertilidad de gallinas *Ross Pm3* tras la inseminación a distintas frecuencias.

Se comprobó que la frecuencia de inseminación está estadísticamente relacionada con las fertilidades obtenidas en gallinas

de estirpe pesada *Ross Pm3* ($p < 0,05$), según se muestra en la Figura 28. Al analizar los puntos de corte de ambas rectas, pudimos determinar que en gallinas *Ross Pm3* a partir de los 9,2 días post inseminación, se produce un descenso significativo de la fertilidad.

6.4.1.2.- Gallinas de estirpe semipesada: *Hubbard JA57*

La fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe *Hubbard JA57* inseminadas con diferentes frecuencias se muestra en la Tabla 18, referenciando cada valor de fertilidad a cada una de las semanas de vida de estas aves.

Tabla 18. Fertilidades semanales y promedio obtenidas durante los ensayos de inseminación a distinta frecuencias en gallinas *Hubbard JA57*.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	diaria	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
S36	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 16)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	69,2 (n= 13)	92,3 (n= 13)	66,7 (n= 12)	43,8 (n= 16)	42,9 (n= 14)
S37	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 11)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 12)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 16)	94,4 (n= 18)	81,3 (n= 16)
S38	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 15)	92,3 (n= 13)	92,3 (n= 13)	84,6 (n= 13)	72,7 (n= 11)	78,6 (n= 14)	58,3 (n= 12)	75,0 (n= 12)	82,4 (n= 17)
S39	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 15)	50,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	73,3 (n= 15)	46,2 (n= 13)
S40	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 14)	90,9 (n= 11)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 15)	92,3 (n= 13)	100,0 (n= 16)	81,8 (n= 11)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 19)
S41	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 9)	84,6 (n= 15)	100,0 (n= 11)	92,9 (n= 14)	90,0 (n= 10)	40,0 (n= 15)	84,6 (n= 13)
S42	100,0 (n= 15)	91,7 (n= 12)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 13)	84,6 (n= 13)	83,3 (n= 12)	58,3 (n= 12)	91,7 (n= 12)	90,9 (n= 11)
S43	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 11)	75,0 (n= 8)	90,0 (n= 10)	77,8 (n= 9)	75,0 (n= 4)	54,5 (n= 11)	100,0 (n= 7)
S44	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 10)	93,8 (n= 16)	100,0 (n= 12)	93,3 (n= 15)	66,7 (n= 9)	100,0 (n= 14)	35,7 (n= 14)
S45	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 16)	54,5 (n= 11)	100,0 (n= 14)
Promedio	100,0±0,0 (n= 141)	99,2±2,6 (n= 137)	97,6±3,9 (n= 138)	98,5±3,1 (n= 113)	92,5±8,6 (n= 135)	90,9±11,8 (n= 121)	86,2±15,0 (n= 136)	79,7±17,1 (n= 115)	72,0±22,5 (n= 138)	76,4±25,2 (n= 138)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Al igual que sucedía en las gallinas de estirpe pesada, la fertilidad media de los huevos producidos por las gallinas de estirpe semipesada

Hubbard JA57, decae a medida que aumenta el periodo entre inseminaciones (Figura 29).

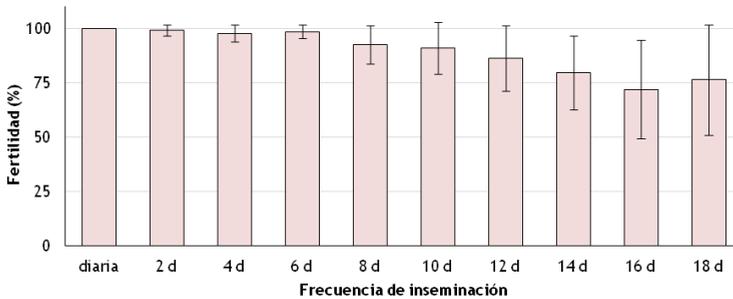


Figura 29. Fertilidad media obtenida en gallinas *Hubbard JA57* inseminadas a distintas frecuencias.

Se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico para comprobar si las fertilidades obtenidas con las diferentes frecuencias de inseminación en gallinas de estirpe semipesada *Hubbard JA57* se ajustaban a un modelo lineal discontinuo y, en ese caso, determinar cuál era el punto en el que se producía un cambio de tendencia en su evolución (*broken line*).

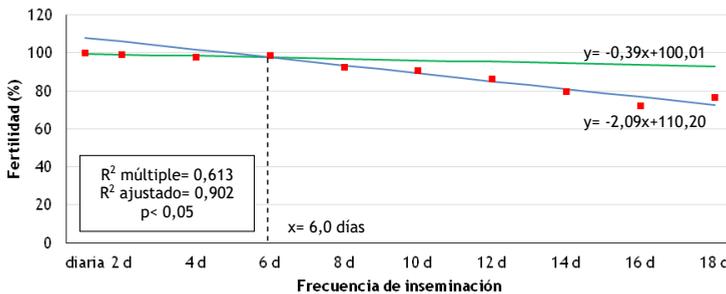


Figura 30. Ajuste al modelo lineal discontinuo de la fertilidad de gallinas *Hubbard JA57* tras la inseminación a distintas frecuencias.

Se evidenció que la frecuencia de inseminación influye significativamente sobre la fertilidad que se obtiene en gallinas de estirpe semipesada *Hubbard JA57* ($p < 0,05$). Asimismo, al analizar los puntos de corte de ambas rectas, pudimos determinar que en estas

gallinas *Hubbard JA57* a partir de los 6,0 días post inseminación, se produce un descenso significativo de la fertilidad (Figura 30).

6.4.1.3.- Gallinas de estirpe ligera: *Lohmann Brown*

A continuación, en la Tabla 19, se muestra la fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe ligera cuando éstas son inseminadas a diferentes frecuencias. La fertilidad se referencia a cada una de las semanas de vida de las aves.

Tabla 19. Fertilidades semanales y promedio obtenidas durante los ensayos de inseminación a distinta frecuencias en gallinas *Lohmann Brown*.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	diaria	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
S36	100,0 (n= 18)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 15)	94,4 (n= 18)	94,1 (n= 17)	94,4 (n= 18)	70,6 (n= 17)	50,0 (n= 18)	37,5 (n= 16)
S37	88,9 (n= 18)	94,4 (n= 18)	83,3 (n= 18)	93,8 (n= 16)	72,2 (n= 18)	100,0 (n= 18)	70,6 (n= 17)	77,8 (n= 18)	94,4 (n= 18)	88,9 (n= 18)
S38	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	94,4 (n= 18)	72,2 (n= 18)	75,0 (n= 16)
S39	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 18)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	83,3 (n= 18)	100,0 (n= 16)	93,8 (n= 16)	41,2 (n= 17)
S40	100,0 (n= 16)	94,4 (n= 18)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 15)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 18)	77,8 (n= 18)	92,9 (n= 14)	72,2 (n= 18)	100 (n= 17)
S41	88,9 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	93,3 (n= 15)	94,4 (n= 18)	93,8 (n= 16)	66,7 (n= 18)	86,7 (n= 15)	66,7 (n= 18)	23,5 (n= 17)
S42	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 17)	93,8 (n= 16)	42,9 (n= 14)	60,0 (n= 15)	88,9 (n= 18)	100 (n= 15)
S43	100,0 (n= 17)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 15)	88,9 (n= 18)	94,4 (n= 18)	77,8 (n= 18)	73,3 (n= 15)	38,9 (n= 18)	81,3 (n= 16)
S44	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 17)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	66,7 (n= 18)	73,3 (n= 15)	100 (n= 18)	44,4 (n= 18)
S45	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 17)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 17)	94,1 (n= 17)	88,9 (n= 18)	85,7 (n= 14)	35,3 (n= 17)	100,0 (n= 18)
Promedio	97,8±4,7 (n= 172)	97,7±2,9 (n= 167)	97,8±5,4 (n= 177)	96,7±3,5 (n= 149)	94,4±8,7 (n= 177)	97,0±3,1 (n= 173)	76,9±16,4 (n= 175)	81,5±12,5 (n= 157)	71,2±23,6 (n= 177)	69,2±29,6 (n= 168)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

La fertilidad media observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown*, cuando éstas son inseminadas a distintas frecuencias, decae a medida que aumenta el

periodo entre inseminaciones (Figura 31), tal y como ocurre en las restantes estirpes incluidas en el estudio.

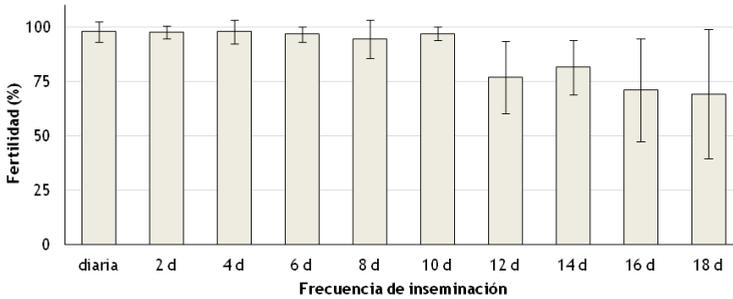


Figura 31. Fertilidad media obtenida en gallinas *Lohmann Brown* inseminadas a distintas frecuencias.

Mediante análisis estadístico se determinó si la fertilidad de las gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* inseminadas con diferentes frecuencias se ajustaban a un modelo lineal discontinuo y, de ser el caso, determinar cuál era el punto en el que se producía un cambio de tendencia en su evolución (*broken line*).

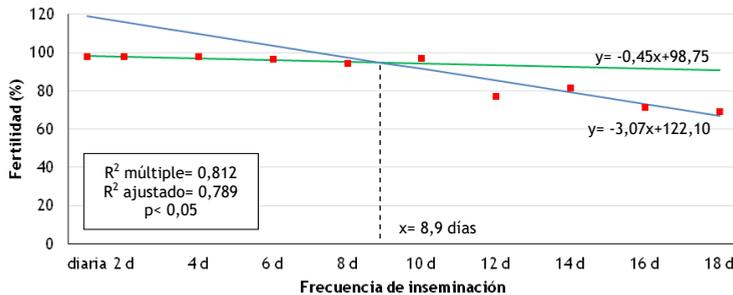


Figura 32. Ajuste al modelo lineal discontinuo de la fertilidad de gallinas *Lohmann Brown* tras la inseminación a distintas frecuencias.

Se demostró que la frecuencia de inseminación está estadísticamente relacionada con la fertilidad de gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* ($p < 0,05$). Asimismo, los puntos de corte de ambas rectas determinaron que se produce un descenso significativo de la fertilidad a partir de los 8,9 días post extracción (Figura 32).

6.4.1.4.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación a diferentes frecuencias

Los resultados obtenidos en relación a la frecuencia de inseminación y su efecto sobre la fertilidad final, coincidieron con lo expuesto por autores como Saint et al. (1994), cuando afirmaban que la frecuencia con la que se realizan las inseminaciones tiene una influencia significativa en los resultados finales de fertilidad. Ha quedado demostrado en este estudio que a medida que espaciamos las frecuencias de las inseminaciones, los resultados finales de fertilidad presentan descensos significativos.

Asimismo, nuestros resultados coinciden con Ricaurte (2006), cuando afirmaba que aproximadamente tras la primera semana post inseminación, la fertilidad final decae con rapidez, siendo prácticamente muy reducida a partir del día 20 post inseminación.

También comprobamos que, en las gallinas, existe un periodo de meseta tras la inseminación, en el que se mantienen los valores de fertilidad. Estos resultados coinciden también con lo afirmado por Muñoz (2011), cuando indicaba que no se debe superar el periodo de meseta propio de cada especie si queremos asegurar buenos valores de fertilidad mediante el uso de la técnica de inseminación artificial.

Francesc (1994), afirmó que, en el caso de la gallina, era suficiente una inseminación semanal para asegurar buenos resultados de fertilidad. Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos.

Así mismo, nuestros resultados son coherentes con los obtenidos por Moya et al. (1992), los cuales observaron que no existían diferencias significativas en la fertilidad obtenida en gallinas reproductoras pesadas, inseminando cada 5 o 7 días.

Muñoz (2011) también afirmó que dependiendo de la especie de ave de la que se trate, los espermatozoides presentan una mayor o menor capacidad fecundante. En nuestro caso, hemos determinado la existencia de estas diferencias entre distintas estirpes de gallinas. Asimismo, pudimos afirmar que no se debe superar el límite de los 9 días entre una y otra inseminación para gallinas pesadas, de 6 días para gallinas semipesadas y de 8 días para gallinas ligeras. En caso contrario se provocará una bajada significativa de la fertilidad en el lote de reproductoras. Estos resultados difieren con el estudio de Van

Key y Siegel (1976) en el que afirmaban que el intervalo entre inseminaciones en reproductoras pesadas podría extenderse hasta los 10 días sin encontrar diferencias significativas en cuanto a los niveles de fertilidad obtenidos con dosis de 0,05 ml/ave.

6.4.2.- Fertilidad tras la inseminación a diferentes tiempos post extracción del semen

6.4.2.1.- Gallinas de estirpe pesada: *Ross Pm3*

A continuación (Tabla 20) se muestra la fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe pesada *Ross Pm3* tras su inseminación con semen de diferente tiempo post extracción.

Tabla 20. Fertilidades semanal y promedio obtenidas en los ensayos con gallinas *Ross Pm3* inseminadas con semen de distinto tiempo post extracción.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min
S36	91,7 (n= 12)	90,0 (n= 10)	83,3 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 11)	90,0 (n= 10)	90,0 (n= 10)	80,0 (n= 10)	90,9 (n= 11)	100,0 (n= 11)
S37	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	72,7 (n= 11)	90,9 (n= 11)	81,8 (n= 11)	90,9 (n= 11)	81,8 (n= 11)	90,0 (n= 10)	92,3 (n= 13)	100,0 (n= 12)
S38	100,0 (n= 10)	81,8 (n= 11)	91,7 (n= 12)	90,0 (n= 10)	90,9 (n= 11)	84,6 (n= 13)	100,0 (n= 10)	92,3 (n= 13)	71,4 (n= 7)	100,0 (n= 13)
S39	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 8)	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 10)	91,7 (n= 12)	88,9 (n= 9)	70,0 (n= 10)	100,0 (n= 10)
S40	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 4)	92,9 (n= 14)	90,0 (n= 10)	91,7 (n= 12)	83,3 (n= 12)	81,8 (n= 11)	90,0 (n= 10)	80,0 (n= 10)	92,9 (n= 14)
S41	100,0 (n= 11)	60,0 (n= 5)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 10)	70,0 (n= 10)	77,8 (n= 9)	80,0 (n= 10)	77,8 (n= 9)	83,3 (n= 12)	72,7 (n= 11)
S42	91,7 (n= 12)	87,5 (n= 8)	92,3 (n= 13)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 9)	84,6 (n= 13)	100,0 (n= 12)	75,0 (n= 8)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 11)
S43	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 6)	81,8 (n= 11)	100,0 (n= 9)	88,9 (n= 9)	80,0 (n= 10)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 9)	90,9 (n= 11)	88,9 (n= 9)
S44	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 6)	91,7 (n= 12)	80,0 (n= 10)	75,0 (n= 8)	83,3 (n= 12)	81,8 (n= 11)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 10)	88,9 (n= 9)
S45	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 6)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 7)	100,0 (n= 7)	88,9 (n= 9)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 6)	91,7 (n= 12)	77,8 (n= 9)
Promedio	96,8±4,1 (n= 114)	91,9±13,1 (n= 78)	89,8±8,4 (n= 121)	95,1±7,0 (n= 103)	89,8±11,0 (n= 99)	86,3±6,4 (n= 109)	90,7±8,8 (n= 109)	89,4±9,3 (n= 93)	87,1±10,6 (n= 108)	92,1±10,1 (n= 109)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Como se puede observar (Figura 33), la fertilidad media de los huevos producidos por las gallinas de estirpe *Ross Pm3*, cuando éstas son inseminadas con semen de distinto tiempo post extracción, posee diversas variaciones a lo largo de todo el periodo de estudio.

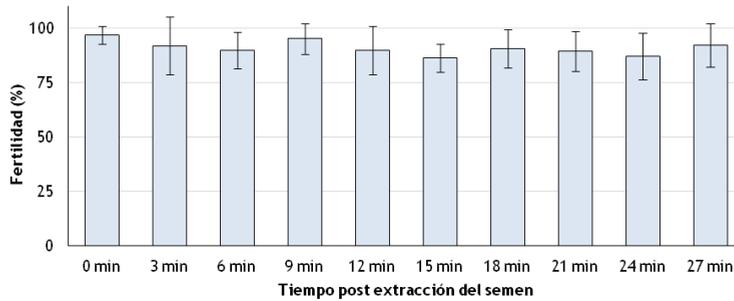


Figura 33. Fertilidad media obtenida tras la inseminación de gallinas *Ross Pm3* con semen de distinto tiempo post extracción.

Después de la realización del análisis estadístico para determinar si las fertilidades obtenidas con las inseminaciones con semen de diferente tiempo post extracción comprobamos que esta fertilidad no se ajustaba a un modelo lineal discontinuo en gallinas de estirpe pesada *Ross Pm3* (Figura 34).

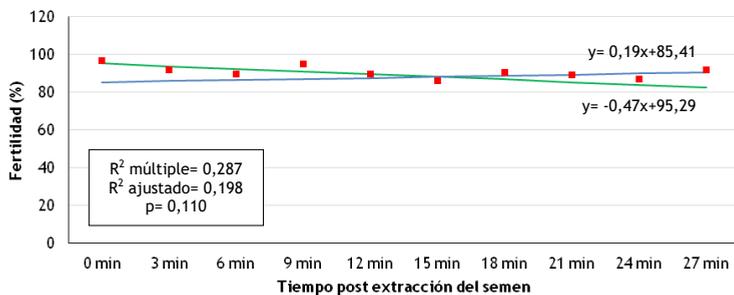


Figura 34. Ajuste al modelo lineal discontinuo de fertilidad en gallinas *Ross Pm3* tras inseminación con semen de distinto tiempo post extracción.

6.4.2.2.- Gallinas de estirpe semipesada: *Hubbard JA57*

La fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe *Hubbard JA57* inseminadas diferentes tiempos post extracción del semen se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Fertilidades semanal y promedio obtenidas en los ensayos con gallinas *Hubbard JA57* inseminadas con semen de distinto tiempo post extracción.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min
S36	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S37	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 16)	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 13)
S38	92,3 (n= 13)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	92,9 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 7)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 15)	85,7 (n= 14)
S39	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 15)	69,2 (n= 13)
S40	100,0 (n= 17)	93,8 (n= 16)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 14)	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)
S41	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 9)	100,0 (n= 9)	83,3 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 12)
S42	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 12)
S43	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 10)	92,3 (n= 13)	100,0 (n= 10)	100,0 (n= 12)	90,9 (n= 11)	100,0 (n= 12)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 7)	100,0 (n= 7)
S44	100,0 (n= 14)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 13)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 11)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	91,7 (n= 12)
S45	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 13)	91,7 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 16)	93,3 (n= 15)	92,9 (n= 14)
Promedio	97,1±5,0 (n= 142)	98,0±3,2 (n= 139)	98,6±3,0 (n= 133)	98,5±3,3 (n= 134)	98,6±4,5 (n= 129)	99,1±2,9 (n= 114)	100,0±0,0 (n= 128)	95,5±5,6 (n= 143)	98,5±3,2 (n= 131)	94,0±10,0 (n= 124)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Al igual que sucedía en las gallinas de estirpe pesada, la fertilidad media de las gallinas de estirpe semipesada *Hubbard JA57*, presenta variaciones aleatorias a lo largo del periodo de estudio (Figura 35).

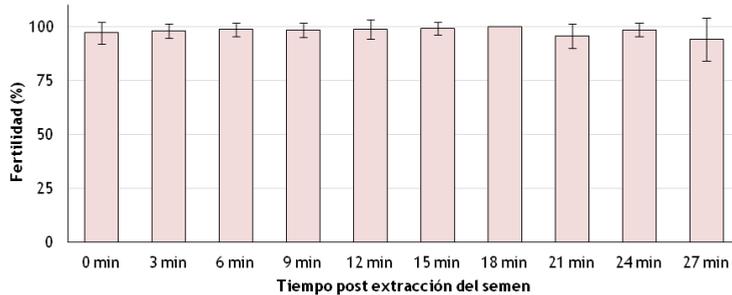


Figura 35. Fertilidad media obtenida tras la inseminación de gallinas *Hubbard JA57* con semen de distinto tiempo post extracción.

El análisis estadístico de las fertilidades obtenidas en gallinas *Hubbard JA57* inseminadas con semen de diferente tiempo post extracción puso de manifiesto que esta fertilidad no se ajustaba a un modelo lineal discontinuo (Figura 36).

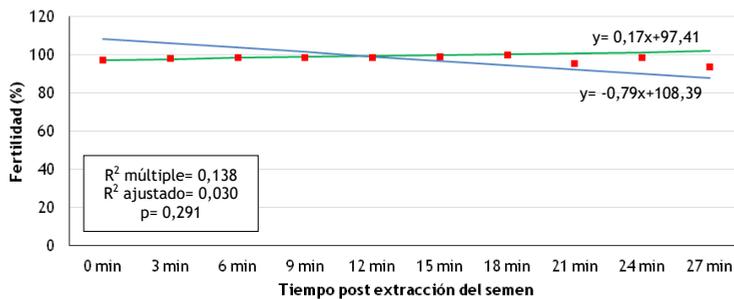


Figura 36. Ajuste al modelo lineal discontinuo de fertilidad en gallinas *Hubbard JA57* tras inseminación con semen de distinto tiempo post extracción.

6.4.2.3.- Gallinas de estirpe ligera: *Lohmann Brown*

En la Tabla 22, se muestra la fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe ligera cuando éstas son inseminadas a diferentes tiempos post extracción del semen.

Tabla 22. Fertilidades semanal y promedio obtenidas en los ensayos con gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen de distinto tiempo post extracción.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min
S36	94,1 (n= 17)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 16)	94,1 (n= 17)	94,1 (n= 17)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 18)	94,4 (n= 18)	58,8 (n= 17)	87,5 (n= 16)
S37	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	94,1 (n= 17)	94,1 (n= 17)	86,7 (n= 15)	100,0 (n= 15)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 17)	94,4 (n= 18)
S38	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 15)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 17)	94,1 (n= 17)	94,4 (n= 18)	94,4 (n= 18)
S39	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	93,3 (n= 15)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 14)	92,3 (n= 13)	92,9 (n= 14)	93,8 (n= 16)	94,1 (n= 17)
S40	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 15)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 15)	88,9 (n= 18)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 18)
S41	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 13)	94,4 (n= 18)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 17)
S42	100,0 (n= 18)	88,9 (n= 18)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 16)	88,9 (n= 18)	100,0 (n= 18)
S43	100,0 (n= 17)	93,3 (n= 15)	93,3 (n= 15)	100,0 (n= 13)	93,3 (n= 15)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 12)	100,0 (n= 18)	83,3 (n= 18)	94,1 (n= 17)
S44	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	94,1 (n= 17)	100,0 (n= 17)
S45	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 18)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 15)	100,0 (n= 17)	100,0 (n= 16)	100,0 (n= 18)	88,9 (n= 18)	93,8 (n= 16)
Promedio	98,8±2,5 (n= 175)	97,6±4,1 (n= 172)	98,7±2,7 (n= 166)	98,2±3,0 (n= 150)	95,6±4,4 (n= 156)	98,1±3,0 (n= 163)	98,7±2,8 (n= 151)	96,5±4,0 (n= 167)	89,7±12,0 (n= 173)	95,8±4,1 (n= 172)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

La fertilidad observada en los huevos producidos por las gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* (Figura 37), cuando éstas son inseminadas con distintos tiempos post extracción del semen, varía a lo largo de todo el periodo de estudio, tal y como ocurre en las restantes estirpes incluidas en el estudio.

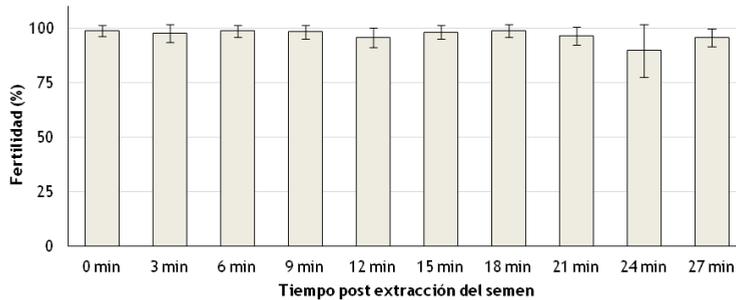


Figura 37. Fertilidad media obtenida tras la inseminación de gallinas *Lohmann Brown* con semen de distinto tiempo post extracción.

Tras la realización del análisis estadístico para determinar si las fertilidades obtenidas con las inseminaciones con semen de diferente tiempo post extracción en gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* comprobamos que esta fertilidad no se ajustaba a un modelo lineal discontinuo (Figura 38).

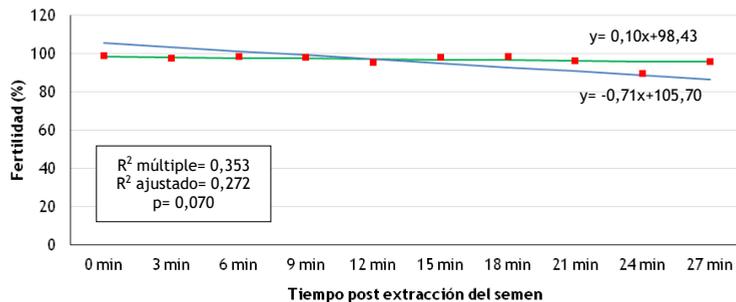


Figura 38. Ajuste al modelo lineal discontinuo de fertilidad en gallinas *Lohmann Brown* tras inseminación con semen de distinto tiempo post extracción.

6.4.2.4.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación a diferentes tiempos post extracción

Existen diversos estudios que concluyen que el paso del tiempo tras la extracción de la muestra seminal, incide de manera directa en los resultados de la fertilidad final obtenida. En este sentido autores como Muñoz (2011) nos habla de disminuciones significativas de la capacidad fecundante del semen tras 30 min post extracción. Bigili et al. (1987) observaron estas disminuciones de fertilidad a

medida que transcurría el tiempo tras la extracción del semen. También Donoghue (1996), habla de una menor cantidad de perforaciones en la membrana perivitelina en embriones de pavo con semen almacenado tras 24 h post extracción frente a semen fresco, lo que se relacionó con menores tasas de fertilidad final. Chalah y Billard (1998), observaron también disminuciones significativas en la capacidad fecundante del semen tras 24 h post extracción.

Teniendo en cuenta estos resultados previos, en este estudio trabajamos sobre la hipótesis de que, a mayor intervalo de tiempo entre la extracción de semen y la inseminación de la gallina, obtendríamos peores resultados de fertilidad, si bien nos fijamos un intervalo de tiempo menor del empleado en estos estudios previos, concretamente 27 min como máximo. Según nuestros resultados, esta hipótesis no se ha podido demostrar, ya que, si bien se han obtenido variaciones entre los valores de fertilidad obtenidos, estos no presentan la tendencia esperada, ni otra que podamos definir claramente. Estas conclusiones se han repetido además para los tres tipos de gallinas reproductoras estudiados.

Según lo observado, en el caso de semen fresco, y para un intervalo de tiempo de 0 a 27 min desde la extracción de semen hasta la inseminación de la gallina, no pudimos afirmar que exista una relación directa entre tiempo post extracción y una teórica pérdida de fertilidad.

6.4.3.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintas frecuencias y tiempos post extracción del semen

6.4.3.1.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintas frecuencias

En la Tabla 23 se muestran la fertilidad semanal y la fertilidad media final observada en los huevos producidos por las gallinas *Lohmann Brown* (estirpe ligera) cuando éstas son inseminadas con semen diluido a distintas frecuencias.

Tabla 23. Fertilidad semanal y promedio de gallinas *Lohmann Brown* inseminadas a distintas frecuencias con semen diluido.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	diaria	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
S36	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)
S37	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	64,3 (n= 14)	92,9 (n= 14)	64,3 (n= 14)	0,0 (n= 14)	35,7 (n= 14)
S38	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	78,6 (n= 14)	92,9 (n= 14)	85,7 (n= 14)	64,3 (n= 14)	50,0 (n= 14)
S39	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	42,9 (n= 14)	21,4 (n= 14)	71,4 (n= 14)
S40	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	78,6 (n= 14)	71,4 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)	7,1 (n= 14)
S41	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	28,6 (n= 14)	71,4 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S42	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	71,4 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	85,7 (n= 14)	78,6 (n= 14)
S43	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	78,6 (n= 14)	57,1 (n= 14)	78,6 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S44	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	78,6 (n= 14)	0,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	21,4 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S45	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	0,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	28,6 (n= 14)
Promedio	99,3±2,2 (n= 154)	97,9±3,4 (n= 154)	99,3±2,2 (n= 154)	97,9±3,4 (n= 154)	98,6±4,5 (n= 154)	81,4±9,0 (n= 154)	71,5±38,6 (n= 154)	74,3±24,6 (n= 154)	61,4±34,2 (n= 154)	66,4±34,0 (n= 154)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Al comparar estos resultados con los obtenidos con semen puro, según se refleja en la Figura 39, se observó que apenas existen variaciones en los resultados de huevo fértil en las gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con una frecuencia inferior a 7 días, tanto con semen puro como diluido. A partir de ese momento, la fertilidad conseguida con semen diluido en gallinas *Lohmann Brown* desciende.

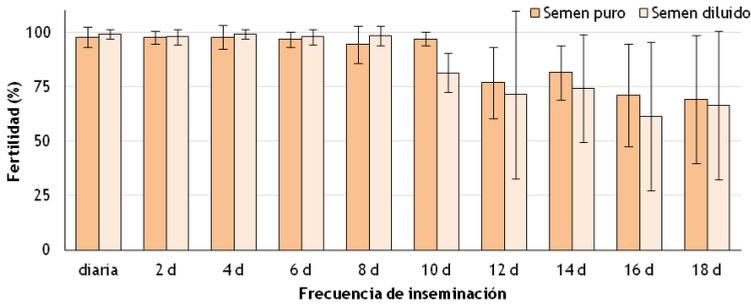


Figura 39. Fertilidad media tras la inseminación de gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido y puro y a distintas frecuencias.

Se realizó un análisis estadístico para comprobar que la fertilidad de las gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido, a diferentes frecuencias, se ajustaba a un modelo lineal discontinuo.

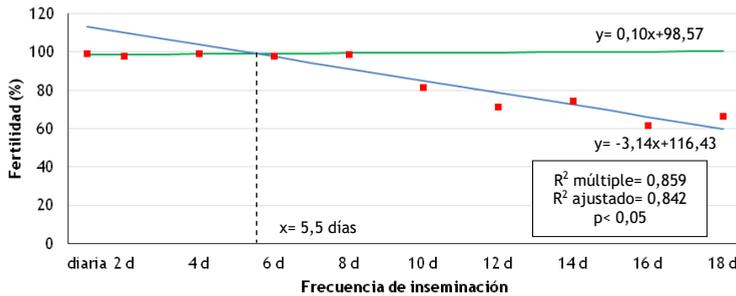


Figura 40. Ajuste al modelo lineal discontinuo de la fertilidad de gallinas *Lohmann Brown* tras la inseminación a distintas frecuencias con semen diluido.

Así se demostró que la frecuencia de inseminación con semen diluido está estadísticamente relacionada con las fertilidades obtenidas en gallinas de estirpe ligera ($p < 0,05$). También pudimos determinar que se produce un descenso significativo de la fertilidad en gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido a partir de los 5,5 días post extracción (Figura 40). Así, a la vista de estos resultados podemos afirmar que el empleo de semen diluido en gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* implica que éstas se deban inseminar a periodos más cortos que cuando se emplea semen puro.

6.4.3.2.- Empleo de semen diluido en inseminaciones a distintos tiempos post extracción

Las fertilidades observadas en los huevos producidos por las gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido y con diferentes tiempos post extracción se recogen en la Tabla 24.

Tabla 24. Fertilidad semanal y promedio de gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido con distinto tiempo post extracción.

Semana de vida	Fertilidad semanal (%)									
	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min
S36	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S37	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S38	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S39	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	78,6 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)
S40	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	78,6 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)
S41	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S42	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S43	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	85,7 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S44	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)
S45	100,0 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	92,9 (n= 14)	78,6 (n= 14)	100,0 (n= 14)	100,0 (n= 14)	85,7 (n= 14)	92,9 (n= 14)	100,0 (n= 14)
Promedio	96,4±5,0 (n= 154)	97,9±3,4 (n= 154)	97,9±4,8 (n= 154)	95,0±5,9 (n= 154)	94,3±9,4 (n= 154)	95,0±7,6 (n= 154)	95,0±6,8 (n= 154)	96,4±6,1 (n= 154)	93,6±5,3 (n= 154)	98,6±3,0 (n= 154)

n: número de huevos evaluados mediante análisis embriológico

Si confrontamos estos resultados de fertilidad de las gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido frente a la fertilidad que se obtiene con semen puro, en ambos casos empleando semen de diferente tiempo post extracción, comprobamos que las variaciones no se corresponden con ningún patrón (Figura 41).

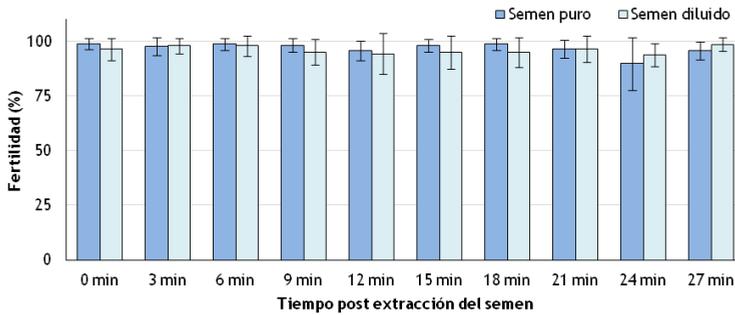


Figura 41. Fertilidad media tras la inseminación de gallinas *Lohmann Brown* inseminadas con semen diluido y puro y con distintos tiempos post extracción.

El análisis estadístico para determinar si las fertilidades obtenidas en gallinas de estirpe ligera *Lohmann Brown* con las inseminaciones con semen de diferente tiempo post extracción demostró que esta fertilidad no se ajustaba a un modelo lineal discontinuo (Figura 42).

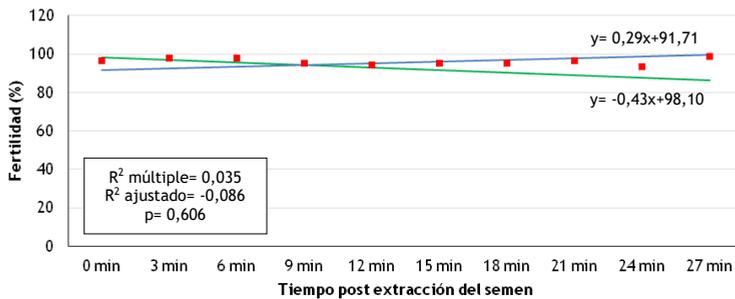


Figura 42. Ajuste al modelo lineal discontinuo de fertilidad en gallinas *Lohmann Brown* tras inseminación con semen diluido de distinto tiempo post extracción.

En relación a los resultados obtenidos al inseminar gallinas *Lohmann Brown*, destacar que el tiempo que se tarda en inseminar a las gallinas tras la extracción del semen no presenta ningún efecto sobre la fertilidad, ni cuando se trata de semen puro ni de semen diluido.

6.4.3.3.- Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos de inseminación con semen diluido a diferentes frecuencias y tiempos post extracción

Los resultados obtenidos en este estudio, corroboran los obtenidos con anterioridad al emplear semen sin diluir.

En el caso de la frecuencia de inseminación, podemos observar que si espaciamos el tiempo entre inseminaciones se produce de nuevo una disminución significativa de la fertilidad obtenida. En el caso concreto de emplear semen diluido con diluyente IMV, es a partir del quinto día entre inseminaciones cuando se produce un cambio de tendencia en la curva, a diferencia de lo sucedido con el empleo de semen puro que fue de 8,9 días. Estos datos nos sugieren que no deberíamos sobrepasar el límite de los 5,5 días para maximizar los resultados de fertilidad. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo expresado por autores como Francesch (1994) en donde afirmaba que el intervalo entre inseminaciones en gallinas a nivel práctico no debería exceder de una semana para obtener buenos resultados de fertilidad. También se ha comprobado que con el uso de diluyente, la fertilidad de las gallinas inseminadas mantiene una curva con forma de meseta, tal y como afirmaba Muñoz (2011).

En relación con los tiempos de inseminación post extracción, los resultados obtenidos nos llevan a afirmar que no existe una relación clara entre el tiempo post extracción y la fertilidad obtenida, en el intervalo de 27 min post extracción y empleando semen diluido con diluyente IMV. Estos datos corroboran los obtenidos anteriormente al emplear semen sin diluir en la prueba.

Asimismo, los datos obtenidos con semen diluido, nos reafirman en las conclusiones a las que llegamos en el capítulo de empleo de diluyentes. De igual forma, otros autores ya indicaron que el empleo de semen diluido es capaz de obtener resultados similares a los obtenidos con semen puro sin diluir (Capote et al., 1998; Donoghe y Wishart, 2000; Hudson et al., 2016).

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1.- Existen diferencias individuales en la calidad espermática entre machos de una misma población comprobándose que existe una correlación positiva entre la fertilidad obtenida en las gallinas y el porcentaje de motilidad progresiva del semen de los gallos. Se evidenció que la motilidad progresiva es un criterio adecuado para realizar una selección de machos reproductores.

2.- El sistema CASA es un método válido, objetivo y fiable para seleccionar los mejores machos reproductores de un lote y presenta ventajas técnicas y económicas evidentes.

3.- La fertilidad obtenida en gallinas inseminadas inmediatamente empleando semen diluido difiere significativamente según la composición de los diluyentes, aunque se pueden obtener resultados similares a cuando se emplea semen fresco con determinados diluyentes.

4.- El empleo de diluyentes seminales para la inseminación artificial de gallinas es un método económicamente rentable.

5.- La frecuencia de inseminación influye significativamente en la fertilidad de gallinas de estirpe pesada, semipesada y ligera.

6.- El límite del tiempo entre inseminaciones con semen fresco para que no se vea afectada la fertilidad final de las gallinas se sitúa en 9 días para gallinas de estirpe pesada, 6 días en gallinas semipesadas y 8 días en reproductoras ligeras.

7.- No existe relación entre la fertilidad de las gallinas de estirpe pesada, semipesada o ligera obtenida en los primeros 27 minutos transcurridos tras la extracción del semen, tanto al inseminar estas gallinas con semen puro como con semen diluido.

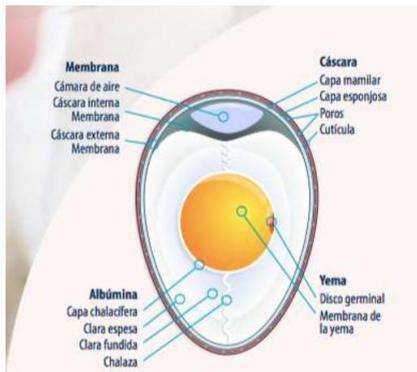
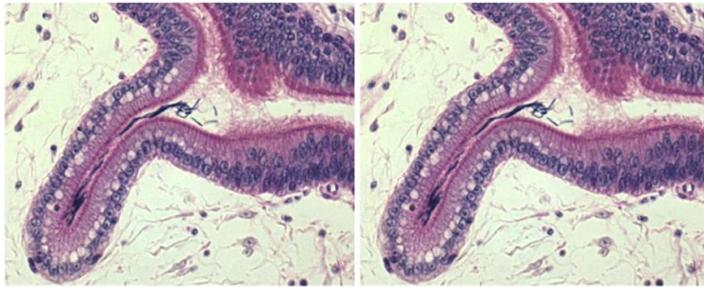
8.- Cuando se emplea semen diluido para la inseminación de gallinas de estirpe ligera, el tiempo máximo entre inseminaciones se reduce a 5 días.

8. DECLARACIONES PARA USO DE IMÁGENES

Por la presente:

Luis Canela Urizar en representación de Aviagen SAU con el cargo de sales manager:

Autorizo la utilización de las siguientes fotografías y gráficos para incorporarlas en la tesis doctoral de Luis Felipe Pérez García



Dichas fotografía y gráficos cuenta con la autorización de los autores (Murray Bakst y Alex Chang)

CANELA
URIZAR
LUIS JESUS
16020942Q

Firmado digitalmente por
CANELA URIZAR
LUIS JESUS -
16020942Q
Fecha: 2022.11.22
12:26:54 +01'00'

9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aisha, K. y Zain, U.A. (2010). A review article in artificial insemination in poultry. *World's Poultry Journal*, 6: 26-35
- Alonso Herrera, G. (1513). *Obra de Agricultura*. Imprenta Real. Madrid, España. 1818. 354 pp.
- Álvarez-Solano, N.F. (2015). *Identificación de la calidad de la cáscara de huevo fértil e incidencia en el porcentaje de nacimiento mediante la detección del peso específico en reproductoras pesadas Cobb Avian 48*. Estudio de evaluación. Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia.
- Ammann, R.P. y Katz, D.F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25 (3): 317-325.
- Argueta, F.M.G. (2004). *Comparación de dos productos (formaldehído y paraformaldehído) usados en la desinfección de cama de nidos en granja de aves reproductoras y el efecto de cada uno sobre el porcentaje de incubabilidad*. Tesis Doctoral. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala.
- Ashizawa, K. y Katayama, S. (1992). Maintenance of motility of fowl spermatozoa in vitro is prolonged by a low molecular weight factor derived from cultured chick embryo cell. *Journal of Reproduction & Infertility*, 95: 685-691.
- Bakst, M. R. y Cecil, H. (1992). Effect of agitation and temperature changes on turkey sperm viability after twenty-four-hour storage. *Poultry Science*, 71: 395-397.
- Bakst, M.R. y Cecil, H.C. (1997). *Techniques for semen evaluation, semen storage and fertility determination*. Ed Poultry Science Association. Illinois, USA.

- Bakst, M.R. y Wishart, G.J. (1994). Proceeding. *First int. Symposium on the artificial insemination of poultry*. Ed Poultry Science Association. Illinois, USA
- Bakst, M.R., Donogue, A.M., Yoho, D.E., Moyle, J.R., Whipple, S.M., Camp, M.J., Liu, G.Q. y Bramwell, R.K. (2010). Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. *Poultry Science*, 89: 896-992.
- Bakst, M.R. (1987). Anatomical basis of sperm storage in the avian oviduct. *Scanning Microscopy*, 1: 1257-1266.
- Bakst, M.R. (1990). Preservation of avian cells. *Poultry Breeding and Genetics*, 1: 91-108.
- Bakst, M.R. y Howarth, B. (1975). The head, neck and mid piece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. *Biology Reproduction*, 12: 632-640.
- Barroeta, A.C., Izquierdo, D. y Pérez, J.F. (2011). *Manual de avicultura*. Departament de Ciència Animal i del Aliments, Unitat de Ciència Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona (España). 60 pp.
- Becker, P. (2010). *Cantaxantina y 25 hidroxicolecalciferol, sus efectos sobre los aspectos reproductivos de los gallos*. Curso de maestrado. Universidad Federal Sta. María. Brasil.
- Bell, D. y Freeman, B. (1971). *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl*. Vol 3. Academic Press. New York (USA). 601 pp.
- Bennet B. (2010). Single stage vs. multi stage. The customer newsletter of jamesway incubator company. Disponible en: <http://www.jamesway.com/images/stories/hatchtalk/june2010.pdf>
- Bigili, S., Sexton, J. y Renden, J. (1987). Fluorometry of poultry semen influence of dilution of storage on Chicken spermatozoa viability and fertility. *Poultry Science*, 66: 2032-2035.

- Bilcik, B., Estevez, I. y Russek-Cohen, E. (2005). Reproductive Success of Broiler Breeders in Natural Mating Systems: The Effect of Male-Male Competition, Sperm Quality, and Morphological Characteristics. *Poultry Science*, 84: 1453-1462.
- Billard, J.P. (1993). Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poultry Science*, 65: 923-928.
- Birkhead, T., Sheldon, B. y Fletcher, F. (1994). A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *Journal Reproduction Fertile*, 101: 353-361.
- Blesbois, E., Grasseau, I. y Hermier, D. (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 °C. *Theriogenology*, 52: 25-334.
- Bonilla, O. y Díaz, O. (1987). Elementos básicos para el manejo de animales de granja: Aves. *EUNED*, 1: 46-57. San José, Costa Rica.
- Bowling, E.R., Froman, D.P., Davis, A.J. y Wilson, J.L. (2003). Attributes of broiler breeder males characterized by low and high sperm mobility. *Poultry Science*, 82: 1796-1801.
- Bramwell, R.K., Marks, H.L. y Howarth, B. (1995). Quantitative determination of spermatozoa penetration of perivitelline layer of the hen's ovium as assessed on oviposited eggs. *Poultry Science*, 74: 1875-1883.
- Bramwell, R.K. (2001). Caring for hatching eggs prior to incubation. *Avian Advice*, 3: 2-4.
- Brillard, J. P. (1983). Aspectos prácticos de la inseminación artificial de las hembras-gallinas, pintadas y pavos. *Selecciones avícolas*, 25(1): 17-27.
- Burrows, W.H. y Quinn, P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 23: 15-20.
- Calnek, B.W. (2000). *Enfermedades de las aves*. Ed Manual Moderno. México. 1110 pp.

- Capote, M., Aguado, E., Moya, A. y Pérez, E. (1988). Uso del semen puro y diluido en la fertilidad de la gallina. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 15: 53-57.
- Card, L.E. y Nesheim, M.C. (1972). *Poultry Production*. Baillere Tindall, London.
- Cardona-Maya, W., Berdugo, J. y Cadavid, A. (2008). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urología*, 32: 443-445.
- Casas de Mendoza, N. (1844). *Tratado de la cría de las aves de corral, de las abejas, gusano de la seda, cochinilla, grana, quermes y de los peces*. Imprenta José Redondo Calleja. Madrid, España. 500 pp.
- Castelló, J.A., Lleonart, F, Campo, J.L. y Orozco, F. (1989). *Biología de la gallina*. Editorial Tecnograf, Barcelona, España. 305 pp.
- Cecil, H.C. y Bakst, M.R. (1990). Effect of the presence of hens on the semen production of male breeders' turkeys. *Poultry Science*, 69: 1003-1005.
- Cerolini, S., Kelso, K., Noble, R.C., Speake, B.K., Pizzi, F. y Cavalchini, L.G. (1997). Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biology Reproduction*, 57: 976-980.
- Chalah, T. y Billard, J. (1998). Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence. *Theriogenology*, 50: 487-493.
- Columela, L.J. (1824). *De Rustica. (Traducción al castellano de José María Álvarez de Sotomayor)*. Imprenta de D. Miguel de Burgos. Madrid, España.
- Cumpa, M.G. y Pomahuali, J. (2009). Evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad del semen del gallo. *Anales científicos UNALM*, 70(1): 27-37.
- Darwin, C. (1868). *The variation of animals and plants under domestication*. John Murray, Londres.

- Dieste y Buil, F. (1781). *Tratado económico*. Imprenta de la Real Sociedad Aragonesa de Amigos del País. Zaragoza, España. 277 pp.
- Djermanovic, V., Mitrovic, S. y Milojevic, M. (2017). Effect of bodyweight of laying hens on production traits of broiler parents. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 33(2): 201-209.
- Donoghe, A.M., Gardner, D.L., Donoghue, D.J. y Jonson, L.A. (1996). Assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 46: 153-163.
- Donoghue A. M. y Donoghue D.J. (1997). Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. *Poultry Science*, 76: 1440-1445.
- Donoghue, A. M. y Wishart, G.J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 213-232.
- Donoghue, A.M. (1996). The effect of twenty-four hours in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. *Poultry Science*, 75: 1035-1038.
- Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Labbe, C. y Blesbois, E. (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 1: 1-13.
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B. y Poto, A. (2008). Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. *VIII congreso de la sociedad española de agricultura ecológica*. Bullas, Murcia. España.
- Dumpala, P.R., Parker, H.M. y Mc Daniel, C.D. (2006). Similarities and differences between the sperm quality index and sperm mobility index of broiler breeder semen. *Poultry Science*, 85: 2231-2240.

- Dumpala, P.R., Parker, H.M. y Mc Daniel, C.D. (2006). The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *International Journal of Poultry Science*, 5(9): 838-845.
- Dumpala, P.R., Parker, H.M. y Mc Daniel, C.D. (2006). The sperm quality index from fresh semen predicts chicken semen quality after storage. *International Journal of Poultry Science*, 5(9): 850-855.
- Etches, J.R. (1984). *Maduration of ovarian follicles in reproductive of poultry*. Poultry Science Symposium n° 17. Ed. British Poultry Science Ltd. Edimburgo, Reino Unido.
- Etches, J.R. (1996). Artificial insemination. *Reproduction in poultry*, 1: 234-261. Ed. International C. Ontario, Canada.
- Farrell, P.B., Foote, R.H., Simkin, M.E., Clegg, E.D. y Wall, R.J. (1993). Relationship of semen quality, number of sperm inseminated and fertility in rabbits. *Journal of Andrology*, 14: 464-471.
- Fasenko, G.M., Robinson, F.E., Segura, J.C., Feddes, J.R. y Oullette, C.A. (2002). Long term hatching egg storage alters the metabolism of broiler embryos. *Journal of Poultry Science*, 80: 62.
- Francesch, A. (1994). Inseminación artificial en gallinas. *Selecciones Avícolas*, 37: 30-33.
- Fukuhara, N. y Ohboshi, S. (1991). Simple and rapid cryopreservation of rooster spermatozoa. *Low Temperature Medicine*, 17: 128-131.
- Gadea, J. (1997). *Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de concentración seminal, pruebas químicas y el test homólogo de penetración*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España.

- García-Tomás, M., Dahmani, Y., Francesch, A. y Gómez-Rincón, C. (2009). Calidad seminal en gallo: efecto del tiempo de conservación y del diluyente. *XII Jornadas sobre producción animal*, 2: 744-746. Córdoba, España.
- Ghigi, A. (1912). L`hybridisme dans la génèse des races domestiques d'oiseaux. *Génétique*.
- Giavarini, I. (1991). Ventajas de la inseminación artificial aplicadas a la avicultura. *Rivista di Avicoltura*, 60: 17-23.
- Giesen, A.F., Mc Daniel, G.R. y Sexton, T.J. (1980). Effect of time of day of artificial insemination and oviposition-insemination interval on the fertility of broiler breeders' hens. *Poultry Science*, 59: 2544-2549.
- Gill, S.P., Donogue, A.M. y Amann, R.P. (2000). Exposure of turkey sperm to a synthetic peptide before insemination increases fertility. *Poultry Science*, 79: 426-429.
- González, O.A. (2019). *Comparación de 2 técnicas de obtención de eyaculado en Gallus gallus domesticus*. Tesis de grado. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.
- Goodarzi, P., Akhlaghi, A., Zamir, M.J., Jafarzadeh, M.R.J., Habibi, M., Daryabari, H., Saemi, F. y Peebles, E.D. (2019). Sperm characteristics of Chukar partridge (*Alectoris Chukar*) breeders as affected by the addition of calcitriol to the semen extender. *Poultry Science*, 98: 3292-3297.
- Hafez, H., Megalla, S., Abdell-Fattah, H. y Kamel, Y. (1982). Aflatoxin and aflatoxicosis. II. Effects of aflatoxin on ovaries and testicles in mature domestic fowls. *Mycopathology*, 77: 137-139.
- Hammersted, R.H., Graham, J.K. y Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11: 73-78.
- Hernández, P., Fernández, R. y Rodríguez, S. (2005). Obtención y congelación de semen de gallo doméstico usando un diluyente con glutamato de sodio. *Revisión Salud Animal*, 27: 124-128.

- Hernando, A.A. (1990). Factores que influyen sobre el huevo incubable. *Selecciones Avícolas*, 32: 295-298.
- Herrera, A. y Diocelina, R. (2011). *Influencia del tiempo de almacenamiento previo a la incubación sobre el desarrollo embrionario, incubabilidad y calidad del pollito finquero*. Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I. y Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the sperm class analyser. *Theriogenology*, 66: 996-1003.
- Holt, C., Holt, W., Moore, H., Reed, H. y Curnock, R. (1997). Objectively measured board sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, 18: 312-323.
- Hudson, G.H., Omprakash, O.V. y Premavilli, K. (2016). Effect of semen diluents, dilution rates and storage periods on live and abnormal spermatozoa of pearl guinea fowls. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11: 411-416.
- Hulet, R. (2007). Symposium: managing the embryo for performance managing incubation: where are we and why? *Poultry Science*, 86: 1017-1019.
- Ibn Al Awam. (1802). *Libro de Agricultura*. Traducción al castellano de José Antonio Banqueri. Estudio preliminar y notas de J.H. Hernández y E. García. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 1988. 2 volúmenes.
- Jacome, S. y Jadira, B. (2005). Sistema de producción en aves pesadas por inseminación artificial. *Vademecum avícola*, 1: 12-20.
- Juárez, M.A. (2014). *Aspectos críticos del manejo y almacenamiento del huevo fértil*. Departamento de Medicina y Zootecnia. Universidad Autónoma de México. México.
- Juárez-Caratachea A., Jiménez-Aguilar, S., Gutiérrez-Vázquez, E. y Segura-Correa J.C. (2018). Efecto de la edad sobre la calidad del semen en gallos Rhode Island rojos. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 11: 11-18.

- King, L.M., Kirby, J.D., Froman, T.S., Sontegard, T.S., Harry, D.E., Darden, J.R., Marini, P.J., Walker, R.M., Rhoads, M.L. y Donoghue, A.M. (2000). Efficacy of sperm mobility assessment in commercial flocks and the relationships of sperm mobility and insemination dose with fertility in turkeys. *Poultry Science*, 79: 1797-1802.
- Kirby, J.D., Tressler, C.J. y Kirby, Y.K. (1998). Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poultry Science*, 77: 1688-1694.
- Klimowicz, M.D., Nizanski, W., Batkowski, F y Savic, M.A. (2008). The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). *Theriogenology*, 70: 78-82.
- Kruger, T.F. y Coetzee, K. (1999). The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Reproduction*, 5: 172-178.
- Larsson, K. (1986). *Current therapy in theriogenology*. Ed Morrow. Philadelphia, USA.
- Lesson, S. y Summers, J.D. (2005). *Commercial poultry nutrition*, 3rd edition. Univerity Books. Guelp, Ontario, Canada.
- Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Bai, H., Xue, F., Xu, S., Xu, H., Shi, L., Yang, N., Chen, J. (2017). Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in chicken testis with extreme sperm motility. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Long, A. y Kulkarni, G. (2004). An effective method for improving the fertility of glycerol exposed poultry semen. *Poultry Science*, 83: 1594-1601.
- Long, J.A. y Krambert, M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82: 1802-1807.

- López, F. (2007). *Influencia de la edad de las progenitoras sobre la calidad espermática y tasa de fertilidad en aves Rhode Island Red*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- López, M. (1985). *Explotación comercial de aves*. Ed. Albatros. Rep. Argentina.
- Maekawa, M.D., Reyna, S.P., Alba, C.M. y Gonzales, G.E. (2014). Comparación del sistema de incubación de etapa única vs etapa múltiple sobre los parámetros productivos de huevos de reproductora de carne de tres edades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25 (4): 494-503.
- Manier, M.K., Welch, G., Van Nispen, C., Baskt, M.R. y Long, J. (2019). Low-mobility sperm phenotype in domestic turkey: impacto n sperm morphometry and early embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*, 54: 613-621.
- Matás, C. (1997). *Análisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España.
- McDaniel, C.D., Hannah, J.L., Parker, H.M., Smith, T.W., Schultz, C.D. y Zumwalt, C.D. (1998). Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. 1. Effects of altering sperm quality and quantity on the sperm motility index. *Poultry Science*, 77: 888-893.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2021). *El sector de la avicultura de carne en cifras: Principales indicadores económicos 2020*. Subdirección General de Productos Ganaderos y Agrarios, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. 89 pp. España.

- Mohan, J., Khanday, J.M., Singh, R.P. y Tyagi, J.S. (2013). Effect of storage on the physic-biochemical characteristics and fertility of guinea flow semen. *Advances in Animal and Veterinary Scsiences*, 1: 65-68.
- Mohan, J., Sharma, S.K., Kolluri, G. y Dhama, K. (2018). History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *World's Poultry Science Journal*, 74: 475-478.
- Mohan, J., Sharma, S.K., Kolluri, G., Gopi, M., Tyagi, J.S. y Singh, R.P. (2017). Effect various dilution rates on fertilizing ability of chicken spermatozoa using CARI diluent. *Proceedings of 34 Indian Poultry Science Association conference*. Bengaluru, India, 61 pp.
- Molenaar R., Reijrink, I., Meijerhof, M. y Van der Brand, H. (2010). Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12: 137-148.
- Mortimer, S.T. (2000). CASA - practical aspects. *Journal of Andrology*, 21: 515-524.
- Mortimer, S.T., Van der Horst, G. y Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 17: 545-553.
- Moya, A., Montes, J.R., Espino, F. y García, I. (1992). Efecto de la frecuencia de inseminación sobre la fertilidad e incubabilidad de gallinas reproductoras pesadas. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 19: 54-57.
- Mphaphathi, M.L., Seshoka, M.M., Luseba, D., Sutherland, B. y Nedambale, T.L. (2016). The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5: 132-139.
- Muñoz, D. (2011). Inseminación artificial en aves. Disponible en: <http://sites.google.com/site/aviariodocastro/inseminación-artificial-en-aves>

- Nahak, A.K., Giri, S.C., Mohanty, D. N., Mishra, P.C. y Dash, S.K. (2015). Effect of frequency of collection on seminal characteristics of white pekin duck. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4: 70-73.
- Najafi, A., Taheri, R.A., Mehdiopour, M., Farnoosh, G. y Martínez-Pastor, F. (2018). Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder rooster. *Animal Reproduction Science*, 195: 168-175
- Najafi, A., Taheri, R.A., Mehdiopour, M., Martínez-Pastor, F., Rouhollahi, A.A. y Nourani, M.R. (2019). Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. *Poultry Science*, 98: 440-446.
- O'Connor, M.T., Amann, R.P. y Saacke, R.G. (1981). Comparisons of computer evaluation of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *Journal of Animal Science*, 53: 1368-1376.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). Sistema de Información Sobre la Diversidad de los Animales Domésticos. (2021). Disponible en: <https://www.fao.org/dad-is/es/>
- Ortatatli, M., Ciftci, M. K., Tuzcu, M. y Kaya, A. (2002). The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Research in Veterinary Science*, 72 (1): 29-36.
- Parker, H.M. y McDaniel, C.D. (2002). Selection of young broiler breeders for semen quality improves hatchability in an industrial field trial. *Journal of Applied Poultry Research*, 11: 520-259.
- Parker, H.M. y McDaniel, C.D. (2004). The optimum semen dilution for the sperm quality index that is most predictive of broiler breeder fertility. *International Journal Poultry Science*, 3: 588-592.

- Parker, H.M. y McDaniel, C.D. (2006). The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange and ionic balance of broiler breeder sperm. *Poultry Science*, 85: 106-116.
- Parker, H.M., Yeatman, J., Frank, L. y McDaniel, C. (2002). Fertility of broiler breeders following categorization by the optibreed sperm quality index when hens inseminated with a constant number of sperm. *Poultry Science*, 81: 239-245.
- Parker, H.M., Yeatman, J., Schultz, C.D., Zumwalt C.D. y McDaniel C. (2000). Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. Selection of young broiler breeder roosters for the sperm quality index increases fertile egg production. *Poultry Science*, 79: 771-777.
- Pearlin, V.B., Mohan, J., Tyagi, J.S., Gopi, M., Kolluri, G., Prabakar, G. y Shanmathy, M. (2021). Efficiency of different diluents and dilution rates on the fertilization potential of chicken spermatozoa. *Indian Journal of Animal Research*, 55(2): 139-144.
- Peralta, M.F., Mazzo, R.D. y Vivas, A.B. (2003). Efecto de la furazolidona sobre las funciones espermatogénica y endocrina de testículos de pavo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 1: 63-78.
- Pereira, F.E., Militao, S.F., Lourenço, G.A. y Rosa, P.S. (1999). Comparação de diluentes, diluições, e tempo de armazenamento do semen sobre fertilidade, eclodibilidade e nascimento de pintos em matrizes pesadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28: 1239-1244.
- Pérez, M., Ascanio, E., Bracho, J., Román, R., Arrieta, D. y Rincón, H. (2007). Mortalidad embrionaria en pollitos causada por aflatoxina B1 transmitida vía transovárica. *Revista Científica FCV-LUZ*. XVII. (3): 275-279.
- Pérez, M., Soto, J., Román, R., Angulo, I., Arrieta, D. y Valeris, R. (2001). Efectos de la aflatoxina B1 sobre la producción de huevos de consumo. *Revista Científica FCV-LUZ*, XI: 337-341.

- Plaza, D.M., Martín, M.P., Tapia, J.A., Ortega, F.C., Balao, S.C. y Peña, F.J. (2015). Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS ONE*, 10(9): e0138777.
- Poivey, J., Cheng, Y., Rouvier, R., Tai, C., Wang, C. y Lui, H. (2001). Genetic parameters of reproductive traits in brown tsaiya ducks artificially inseminated with semen Muscovy drakes. *Poultry Science*, 80: 703-709.
- Pollock, L.D. (1999). A geneticist perspective from within a broiler primary breeder company. *Poultry Science*, 78: 414-418.
- Poto, A., Duchi, N., Galián, M., Alcaraz, F., Almela, L. y Peinado, B. (2007). Entrenamiento del gallo murciano a la recogida de semen mediante masaje dorsal. Estudio de la calidad seminal. *I Congreso Nacional de Zootecnia*. Madrid, España.
- Quintana, J. (1998). *Avitecnia*, 4ª edición. Ed. Trillas, México.
- Quintero, A., Rivera, M., Rigau, T. Rodríguez-Gil, J.E. 2001. Optimización de los parámetros de motilidad espermática porcina mediante agrupamiento jerárquico. *ITEA*, 22: 832-834.
- Quintero, A. (2003). *Estudio sobre dinámica de poblaciones en semen de caballo, cerdo y conejo*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, UAB. Barcelona, España.
- Reinhart, B.S. y Fiser, P.S. (1983). Evaluation of artificial insemination techniques on fertility in laying hens. *Poultry Science*, 62: 2285-2287.
- Ricaurte, S. (2006). Importancia de un buen manejo de la reproducción en avicultura. *Revista Electrónica Veterinaria*. Bogotá, Colombia.
- Rigau, T., Piedrafita, J., Reverter, A. y Rodríguez-Gil, J.E. (1996). The ratio of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Animal Reproduction Science*, 43: 161-172.

- Rodríguez-Moya, J. y Cruz-Bermúdez, A.I. (2017). Factores que afectan la incubabilidad de huevo fértil en aves de corral. *Nutrición Animal Tropical*, 11: 16-37.
- Rowell, J.G. y Cooper, D.M. (1960). Some effects of diluting cock semen. *Poultry Science*, 39(6): 1381-1389.
- Safari, R. Shariatmandari, F., Sharafi, M., Karimi Torshizi, M.A. y Shahverdi, A. (2018). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Ross breeders roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of ω -3: ω -6 fatty acids. *Poultry Science*, 97: 4113-4121.
- Saint, J.M., Gaucher, P. y Paillat, P. (1994). Artificial insemination in houbara bustards influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100: 93-103.
- Salisbury, G. W., Van Denmark, N.L. y Lodge, J.R. (1978). *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. 2nd ed. W.H. Freeman Co., San Francisco.
- Santiago, H. y Argüelles, M. (2010). Inseminación Artificial en Aves, Departamento de Industrias Pecuarias. Recinto universitario de Mayaguez. Disponible en: <https://academic.uprm.edu/hsantiago/AVIAN%20AI.pdf>
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A. Eteso, M.C., López-Sebastián, A., Villaverde-Morcillo, S., Dávila, S.G., Gil, M.G. y Blesbois, E. (2017). Successful chilling of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) sperm for use in artificial insemination. *Poultry Science*, 96: 4068-4074.
- Sauveur, B., Reviers, M. y Buxadé-Carbó, C. (1992). *Reproducción de las aves*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid (España). 350 pp.
- Sexton, T.J. (1977). A New Poultry semen extender. 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Science*, 56(5): 1443-1446.
- Sexton, T.J. (1988). Comparison of commercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5° C. *Poultry Science*, 67: 131-134.

- Shabir, M., Mehmood, S., Mahmud, A. y Riaz, A. (2020). Effects of different mating strategies in broiler breeder during peak and postpeak phase on subsequent broiler performance. *Poultry Science*, 99: 3501-3510.
- Sieme, H., Katila, T. y Klug, E. (2004). Effect of semen Collection practices on sperm characteristics before and after storage and fertility of stallions. *Theriogenology*, 61: 769-784.
- Soares, R. (2008). Diagnóstico embrionario: Una importante herramienta de ayuda en la planta de incubación. *Selecciones Avícolas*, 4: 23-26.
- Surai, P., Wishart, G., Maldjian, A. Noble, R. y Sparks, L. (1998). Lipid peroxidation in avian semen: protective effect of seminal plasma. *Poultry Science*, 39: 557-562.
- Surai, P. Kochish, I., Romanov, M. y Griffin, D. (2019). Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: the case of vitamin E. *Poultry Science*, 98: 4030-4041.
- Tabatabaei, S., Chaji, M. y Mohammadabai, T. (2010). Correlation between age of rooster and semen quality in Iranian indigenous broiler breeder chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 195-198.
- Tesfay, H.H., Sun, Y., Li, Y., Shi, L., Fan, J., Wang, P., Zong, Y., Ni, A., Ma, H., Mani, A.I. y Chen, J. (2020). Comparative studies of semen quality traits and sperm kinematic parameters in relation to fertility rate between 2 genetic groups of breed lines. *Poultry Science*, 99: 6139-6146.
- Thiber, A. y Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62: 233-251.
- Triplett, M.D., Parker, H.M., C.D. McDaniel y Kiess, A.S. (2016). Influence of 6 different intestinal bacteria on Beltsville Small White turkey semen. *Poultry Science*, 95:1918-1926.
- Tullet, S. (2010). *Investigación de las prácticas de incubación*. Aviagen. 47 pp.

- Vaca, L. (1999). *Producción avícola*. EUNED. San José, Costa Rica.
- Van Key, H.P. y Siegel, P.B. (1976). A revised artificial insemination schedule for broiler breeder hens. *Poultry Science*, 55: 725-728.
- Vasicek, J., Kuzelova, L., Kulikova, B. y Chrenek, P. (2015). Effect of diluent and storage time on sperm characteristics of rooster insemination doses. *Avian Biology Research*, 8: 26-41.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Hidalgo, C.O., Silvestre, M.A., Arrebola, F. y Yaníz, J.L. (2013). A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). *Theriogenology*, 79: 436-442.
- Vidal, A. (2003). *Enfermedades infectocontagiosas de las reproductoras*. Instituto de investigaciones avícolas, La Habana, Cuba.
- Walton, A. (1993). *The Technique of Artificial Insemination*. Imperial Bureau Animal Genetics. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Wambeke, F. y Huyghebaert, G. (1989). Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. *Poultry Science*, 30: 461-469.
- Watson, P.F. (1978). Artificial breeding of non-domestic animals. *Symposia of the Zoological Society of London*. 43, Academic Press, London.
- Weakley, C.E. y Shaffner, C.S. (1952). The fertilizing capacity of diluted chicken semen. *Poultry Science*, 31(4): 650-653.
- Wineland, M. y Christopher, C. (1998). *Contaminación de los huevos fértiles*. (Trad. R del Pino). Universidad del Estado de Carolina del Norte, Estados Unidos.
- Yoho, D., Moyle, J., Swaffar, A. y Bramwell, R. (2008). Effect of incubating poor quality broiler breeder hatching eggs on overall hatchability and hatch of fertile. *Poultry Science*, 87: 148.



La inseminación artificial es una técnica ampliamente empleada en muchas producciones animales. En el caso de las aves, su uso es habitual en los pavos, pero está poco estudiada y empleada en gallinas.

En esta Tesis se evalúan los diversos aspectos de esta técnica que presentan influencia en los resultados productivos, valorando su aplicación en la producción industrial: el sistema CASA como técnica de selección de los mejores machos según la motilidad progresiva de los espermatozoides, las diferencias existentes en la fertilidad obtenida en la inseminación artificial con semen puro y diluido, la eficacia de la inseminación en gallinas reproductoras a diferentes frecuencias con semen fresco y la relación entre la fertilidad y el tiempo que transcurre entre la extracción del semen y la inseminación de las hembras.