

ESTUDI DE LA MILLORA EN L'ÚS DE MASCLES D'INSEMINACIÓ ARTIFICIAL EN CONILLS

TESI DOCTORAL

Mónica García Tomás, FACULTAT DE BIOLOGIA, UNIVERSITAT DE BARCELONA, Barcelona 2006

Directors:

Maria Mercedes Piles Rovira, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Torre Marimon

Josep Sánchez Carralero, Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

Aquesta memòria ha estat escrita i presentada com un dels requisits per a optar al grau de Doctor en Biologia

Barcelona, 12 de setembre de 2006

La doctoranda

Mónica García Tomás

Els directors de tesis

Maria Mercedes Piles Rovira

Josep Sánchez Carralero

Tesi adscrita al programa de Fisiologia (2001-2003) del Departament de Fisiologia de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi ha estat realitzada dins el projecte d'investigació INIA SC 00-011 i finançada amb el projecte UB 56.5.48.000.00 689.05 i una beca F.P.I de la Generalitat de Catalunya.

Hechos son amores y no buenas razones, totes les persones que durant aquests gairebé 5 anys han passat per la meva vida han fet i deixat empremta. Algunes d'elles m'han influenciat a nivell acadèmic i tècnic, ensenyant-me altres maneres de fer i plantejar les coses; altres han compartit amb mi vivències personals i la seva opinió i el seu gust per la gastronomia, art, literatura, música, televisió, jocs, geografia i

Tot això m'ha fet més oberta de ment i, per tant amb més opcions per enfrontar la vida i respectar la manera com els altres l'enfronten.

Així que gràcies:

A Santi, Marta, Pere, Toni, Moi, Anna, Erika, "el" Santi, Kelly, Diego, Núria. Ells m'han ajudat en el laboratori, m'han aconsellat i m'han contagiats el seu optimisme.

A la Dolors i al Ginés, sempre disposats a contestar dubtes i a ajudar-me a sobreviure dins el sempre desconegut món del "papeleo".

Als companys de la Unitat de Cunictura: Oscar, Núria, Carme, Lliber, Lluís, Alex, Oriol, Josep per la seva ajuda tant en el maneig diari dels animals com en els dies concrets de control.

A tota la gent de la Universitat Autònoma Metropolitana_Iztapalapa de Mèxic.

A Agustin Blasco, José Vicente, Teresa Mitjavila, Manel López-Bejar i M^a Jesus Martínez de Osaba per les seves opinions, comentaris i suggerències.

Als meus directors de tesi, Maria Mercedes Piles i Josep Sánchez tots dos es van topar inesperadament amb una doctoranda i tots dos van acceptar el treball que significa formar-la i dirigir-la.

A Mireia i M^a Jose, sempre amb mi.

A Míriam, per les seves opinions sempre encertades i els seus consells objectius.

A la meva família. Gràcies per estar on esteu. Vosaltres sou en gran part responsables de la persona que sóc. I

Al Jordi, perquè sempre ha respectat les meves pors i m'ha ajudat a superar-les, perquè ha acceptat el camí que he escollit tot i que és molt crític i coneix les expectatives que comporta, i perquè aniria a qualsevol lloc del món perquè jo fes el que m'agrada.

CONTINGUT

Els treballs realitzats en aquesta tesi han estudiat l'efecte de factors genètics sobre diversos aspectes relacionats amb l'eficàcia en l'ús dels mascles d'inseminació artificial: la maduració sexual, la qualitat i producció seminal, la fertilitat i la prolificitat dels mascles. A continuació es presenta un resum dels resultats.

La maduració sexual s'ha estudiat utilitzant una línia seleccionada per velocitat de creixement (Caldes) i una línia seleccionada per mida de la llodrigada al deslletament (Prat); aquestes dues línies seleccionades per diferent aptitud es van utilitzar esperant poder observar amb una major claredat l'existència de diferències en la maduració sexual dels mascles degudes al genotip.

En un primer treball es va estudiar l'efecte de la línia i l'estació de naixement sobre el patró de desenvolupament del pes viu i diversos marcadors sexuals de tipus morfològic, relacionats amb la mida dels testicles i epidídim i amb la composició tissular dels testicles. Les variables estudiades van ser: pes viu, longitud de testicle, amplada de testicle, pes de testicle, volum de testicle, longitud d'epidídim, amplada d'epidídim, pes d'epidídim, volum d'epidídim, percentatge de túbuls seminífers amb llum, percentatge de túbuls seminífers amb presència d'espermàtides elongades, percentatge de túbuls seminífers amb presència d'espermatozous i diàmetre del túbul seminífer. Quatre components principals (CP) van explicar el 79% de la variació total observada. La majoria de les variables macroscòpiques del testicle i de l'epidídim es van agrupar en dos conjunts no relacionats amb les variables microscòpiques, que són indicadors de maduresa funcional del mascle, a una edat donada.

Les dues línies estudiades van mostrar uns perfils de desenvolupament similars per a totes les variables considerades, presentant els canvis més rellevants a edats joves i essent afectades de la mateixa manera per les condicions ambientals. El percentatge de túbuls seminífers amb llum i amb presència d'espermatozous a les 20 setmanes de vida va ser baix (70% i 40%, respectivament). Així, a aquesta edat caldria aplicar un ritme d'extracció més extensiu o no usar els mascles, especialment en el cas de mascles nascuts durant l'estació càlida. La línia Caldes tenia un major pes viu i un menor volum del testicle (tant en termes absoluts com relatius al pes corporal) que la línia Prat, mentre que no es van observar diferències degudes al genotip per a les variables microscòpiques.

Es va observar un efecte significatiu de l'estació de naixement sobre totes les variables excepte el percentatge de túbuls seminífers amb llum i amb presència d'espermatozous. Els valors absoluts i els valors relatius al seu propi valor a l'estat adult de les variables pes viu, volum de testicle i el volum de epidídim i de variables relacionades amb la ma-

duració funcional van ser menors en animals nascuts en l'estació càlida. El creixement del volum del testicle i el volum de l'epidídim va resultar endarrerit en els animals nascuts en l'estació càlida. Per tant l'efecte de l'estació de naixement s'hauria de tenir present en futurs estudis per a unes anàlisis més precises i també per a establir l'edat al començament de la vida reproductiva dels mascles així com el ritme reproductiu aplicat a l'inici d'aquesta.

Amb l'objecte d'estudiar la maduració sexual a partir de noves variables, en un segon treball es van mesurar els canvis relacionats amb l'edat i l'efecte de la línia i de l'estació de naixement en marcadors de desenvolupament de tipus molecular relacionats amb l'estrès oxidatiu: concentració de testosterona, formació del radical anió superòxid, activitat de l'enzim superòxid dismutasa, activitat de l'enzim catalasa i els nivells de substàncies reactives a l'àcid thiobarbitúric. Els canvis més importants es van observar a edats primerenques i podrien ser explicats per canvis en l'estructura i funció testicular. També per a aquest conjunt de variables les dues línies van mostrar uns nivells i uns perfils de desenvolupament similar, i es van veure afectades de manera similar per les condicions ambientals. Es va trobar un efecte significatiu de l'estació de naixement sobre la formació de radical anió superòxid i les activitats dels enzims antioxidants. Aquestes diferències s'haurien de tenir presents en el disseny experimental de futurs estudis.

L'efecte de factors genètics sobre la producció i qualitat seminal, la fertilitat i la prolificitat dels mascles s'ha estudiat mitjançant l'ús de mascles adults que pertanyien a dues línies seleccionades per velocitat de creixement (Caldes i R) i als creuaments recíprocs entre ambdues línies (Caldes x R i R x Caldes). Aquestes línies són àmpliament utilitzades en el sector productor cunícola, dins l'esquema de creuaments a tres vies, com productores de mascles terminals.

Primer es va realitzar un anàlisi de components principals i de correlacions fenotípiques per examinar la variabilitat i les relacions existents entre les variables qualitatives i quantitatives del semen de conill estudiades. Els quatre primers components principals (CP) van explicar un 62% de la variació total: 23%, 18%, 12% i 8%, respectivament. Els percentatges de viabilitat (Vi), normalitat acrosòmica (NAR), normalitat morfològica (Nr), anormalitat de cua (T) i anormalitat de coll-part intermèdia (Nm) van ser les variables predominants en el primer CP. La motilitat massal (Mm), motilitat individual (Mi), pH, concentració (Cn) i nombre d'espermatozous totals per ejaculat (TSE) es van localitzar en el segon CP. Els percentatges de espermatozous amb presència de gota citoplasmàtica proximal i distal (Dp i Dd), NAR, Vi i Nr van ser les variables predominants en el tercer i el volum (V) va definir el quart. La repetibilitat també va ser estimada per als mateixos caràcters mostrant uns valors moderats per a la majoria dels caràcters. Els valors més alts (al voltant de 0.45) van correspondre al V, Mm, Mi, Cn, Nr i Dp i els valors més baixos (al voltant de 0.10) al H i Nm. La repetibilitat del primer ejaculat va ser més gran que la del segon per al pH, Mm, Mi, H, Dp i Dd.

En un segon treball es van estimar l'efecte del tipus genètic i els paràmetres de creuament sobre les variables ja esmentades més 5 noves variables: presència de gel (G), presència d'orina (U), presència de precipitats de carbonat càlcic (CC), utilitat de l'ejaculat (UE), motilitat útil (UM). Es van observar diferències entre tipus genètics en variables qualitatives de l'ejaculat (UE, G, CC, UM), en variables de producció (V, Cn, TSE) i en variables de qualitat de l'espermatozou (Vi, NAR, Nr, Nm, Dp, Dd). Tot i que els resultats obtinguts no permeten tenir una visió clara de les

característiques dels tipus genètics, es podria concloure que els mascles Caldes tenen una major producció de semen però aquest és de pitjor qualitat que el produït pels mascles Caldes x R i els mascles R, que en general presentava millors característiques. Es van trobar diferències importants en els efectes genètics directes, les quals van ser favorables a la línia Caldes per a la Cn i el TSE, i desfavorables per a la CC, Nm i Dp. També es van observar diferències en Vi i NAR favorables a la línia R, però aquestes van ser més petites. Per altra part, es van trobar diferències en els efectes genètics materns importants i favorables a la línia Caldes per al V i la línia R per a la U, UM, Cn, TSE, Nm, Mi i Mm. Finalment, es va trobar un alt percentatge de heterosi per a les variables Dp i Dd.

L'efecte del tipus genètic i els paràmetres de creuament sobre la fertilitat i la prolificitat del mascle, i la relació entre el rendiment reproductiu i diversos caràcters de qualitat seminal van ser investigats en el darrer treball. Es van trobar diferències significatives entre els mascles purs favorables per al tipus R i entre els mascles creuats favorables al tipus Caldes x R. Les diferències entre línies en els efectes genètics materns van ser importants i favorables al tipus R per a la fertilitat. L'heterosi per a la fertilitat va ser importat, però desfavorable. Finalment, es va obtenir una petita relació entre totes les característiques de qualitat seminal i la fertilitat i la prolificitat, quan aquestes eren estudiades mitjançant un model bivariant que incloïa el tipus genètic de mascle i cadascuna d'aquestes variables. Quan s'utilitzava un model de regressió múltiple es van trobar dos models per a explicar la fertilitat que incloïen el percentatge d'espermatozous amb anomalies de coll-part intermèdia (NAP), motilitat individual (IM), percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica (NSP), el tipus genètic de mascle i el percentatge d'espermatozous viables (Vi) en un model o el percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica (NAR) en l'altre model; IM va tenir un efecte positiu important, mentre que l'efecte del NAP va ser petit i negatiu. Ambdós models, però, explicaven una petita part de la variació total observada. Quan es va analitzar el nombre de nascuts vius el model de regressió múltiple incloïa les variables la motilitat massal (MM), el percentatge d'espermatozous amb anomalies de cua (TAP) i el tipus genètic de mascle, de les quals MM i TAP tenien un petit efecte significatiu. La motilitat individual i el percentatge d'espermatozous amb presència de gota citoplasmàtica distal (DD) van ser relacionats amb el nombre de nascuts morts, però només DD tenia un efecte significatiu encara que pràcticament despreciable.

Abstract

The works carried out in this thesis have studied the effect of the genotype on several aspects related to the reproductive efficiency of the males of artificial insemination: the sexual maturation, the production and quality semen, and the fertility and the prolificacy of males. Immediately an abstract of the results is presented.

The sexual maturation has been studied using a line selected by growth rate (Caldes) and a line selected for litter size at weaning (Prat); these two lines selected by different aptitude were used waiting to observe with more lightness the existence of differences in the sexual maturation of the males due to the genotype.

In the first work it has been studied the effect of the line and birth season on the development profile of live weight and several sexual morphological markers, related to testis and epididymis size and to the tissular composition of testis. The following variables were studied: live weight, testis length, testis width, testis weight, testis volume, epididymis length, epididymis width, epididymis weight, epididymis volume, percentage of seminiferous tubules with presence of lumen, percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids, percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa and diameter of seminiferous tubules. Four principal components (PC) explained 79% of the observed total variation. Most of the macroscopical variables of testis and epididymis were grouped in two sets which were non-related with variables measuring active spermatogenesis, which are important to know functional maturity of male, at a specific age.

Caldes and Prat lines showed similar developmental profiles for all variables studied, which showed major changes at young ages and were affected by environmental conditions in the same manner. The percentage of seminiferous tubules with lumen and with presence of spermatozoa at 20 weeks of age was small (70% and 40%, respectively). Thus, at this age males should be used at a low reproductive rhythm or not used at all, especially in the case of males born during the warm season. Caldes line had higher live weight and lower testis volume (in absolute values and in relative values to the body weight) than Prat line. No differences were found for microscopic variables of testes between lines.

Significant effect of the birth season was found for all variables except for the percentage of seminiferous tubules with lumen and with presence of spermatozoa. The absolute values and the values relatives to its own value at the adult stage of the variables live weight, testis volume, epididymis volume and in variables related to the functional maturity were lower in animals born in the warm season. The growth of testis volume and epididymis volume was delayed in animals born in the warm season. Therefore, the effect of birth season should be taken into account in future studies

for a more precise analysis and also to establish the age at the beginning of the reproductive life of males as well as the reproductive rhythm used at this time.

In the second work age related changes, the effect of line and the effect of birth season have been studied on plasma testosterone concentration, superoxide anion radical formation, superoxide dismutase activity, catalase activity and thiobarbituric acid reacting substances level in testis of rabbits. Major changes in the oxidative metabolism were observed at an early age and could be explained by the concomitant changes in testicular structure and function. Both lines showed similar developmental profiles and levels for all the variables studied, which were affected in the same manner. Significant seasonal variations were found in O_2^- , SOD and CAT. These differences should take into account in the experimental design of futures studies.

The effect of genetic factors on the semen production and quality traits, the fertility and the prolificacy of males has been studied through the use of adult males that belonged to two lines selected by growth rate (Caldes and R) and to the reciprocal cross between both lines (Caldes x R and R x Caldes). Males of these lines are widely used as terminal males in the three way scheme that was used in rabbit production.

The first study has analysed the variability, using a principal component analysis, and phenotypic correlations between some of the variables defining the production and quality semen studied. The four first principal components (PC) explained 62% of the total variation: 23%, 18%, 12% and 8%, respectively. The percentage of viability (Vi), acrosomal normality (NAR), morphological normality (Nr), abnormality of tail (T) and abnormality of neck-midpiece intermediate (Nm) were the predominant variables in the first PC. The mass motility (Mm), individual motility (Mi), pH, concentration (Cn) and number of total spermatozoa per ejaculate (TSE) were located in the second. The percentage of spermatozoa with presence of proximal and distal cytoplasmic drops (Dp and Dd), NAR, Vi and Nr were the predominant variables in the third PC and the volume (V) described the fourth. The repeatability was also estimated for the same characters showing moderate values for the majority of the characters. The highest values (about 0.45) corresponded to the V, Mm, Mi, Cn, Nr and Dp and the lowest values (about 0.10) in the H and Nm. The repeatability of the first ejaculated was greater than that of the second for the pH, Mm, Mi, H, Dp and Dd.

In a second work it was estimated the effect of the genetic type and the crossbreeding parameters on the same semen production and quality traits as before and on five new variables: presence of gel plugs (G), urine (U), calcium carbonate deposits (CC), number of useful ejaculates (UE) and useful Mi (UM). Differences between genetic types were found in traits defining ejaculate quality (UE, G, CC, UM), production (V, Cn, TSE) and spermatozoa quality (Vi, NAR, Nr, Nm, Dp, Dd). Results obtained did not show a clear picture about genetic type characteristics, it seemed that Caldes genetic type had higher production semen but with worse quality with respect to males Caldes x R and males R, which showed better characteristics. There were important differences in direct genetic effects, which were favourable to the line Caldes for the Cn and the TSE and unfavourable for the CC, Nm and Dp. Also were observed differences in Vi and NAR favourable to the line R, but these differences were smaller. Differences were found in the maternal ge-

netic effects, which were important and favourable to the line Caldes for the V and to the line R for the U, UM, Cn, TSE, Nm, Mi and Mm. Finally, a high percentage of heterosis was found for the variable Dp and Dd.

The effect of the genetic type and the crossbreeding parameters on the fertility and the prolificacy of males, and the relationships among the reproductive performance and several characters of seminal quality were investigated in the last work. Significant differences between pure males, which were favourable to the type R, and among the crossbred males, favourable to the type Caldes x R, were found. There were differences between lines in the maternal genetic effects for fertility, which were important and favourable to the type R. It has been found an important but unfavourable heterosis for fertility. Finally, a small relationship between some semen characteristics and fertility and prolificacy was obtained when reproductive parameters were studied with a bivariate model that included the genetic type of male and one semen trait. When it has been used a model of regression multiple to explain the fertility, two models of regression were obtained that included the percentage of spermatozoa with anomalies of neck-midpiece (NAP), individual motility (IM), percentage of spermatozoa with morphological normality (NSP), the genetic type of male and the percentage of viable spermatozoa (Vi) in a model or the percentage of spermatozoa with acrosomal normality (NAR) in the other model; IM had an important positive effect, while the effect of the NAP was small and negative. Both models, however, explained a small part of the observed total variation. When it has been analysed the number of kits born alive, the model of regression multiple included the variables mass motility (MM), the percentage of spermatozoa with anomalies of tail (TAP) and the genetic type of male, but only MM and TAP had a small significant effect. The individual motility and percentage of spermatozoa with presence of distal cytoplasmic drops (DD) were related with the number of born dead, but only DD had a significant effect although negligible.

Résumé

Les travaux réalisés dans cette thèse ont étudié l'effet du génotype sur plusieurs aspects rattachés avec l'efficacité reproductive des mâles d'insémination artificielle : la maturation sexuelle, la production et qualité du semant, et la fertilité et la prolificité du mâle. Tout suite on montre un résumé des résultats.

La maturation sexuelle a été étudiée utilisant une ligne sélectionnée par la vitesse de croissance (Caldes) et une ligne par taille de portée au sevrage (Prat) ; ces deux lignes sélectionnées par différente aptitude ont été utilisées en attendant d'observer avec une majeure clarté l'existence de différences dans la maturation sexuelle des mâles dues au génotype.

Dans un premier travail la maturation a été évaluée sur le poids vif et marqueurs sexuels de type morphologique, rattachés à la mesure des testicules et des épидидymes, et avec la composition tissulaire des testicules. Les variables étudiées étaient : poids vif, la longueur du testicule, la largeur du testicule, le poids du testicule, le volume du testicule, la longueur du épидидyme, la largeur du épидидyme, le poids du épидидyme, le volume du épидидyme, le pourcentage de tubules séminifères avec lumen, le pourcentage de tubules séminifères avec présence d'spermatides elongates, le pourcentage de tubules séminifères avec présence d'spermatozoïdes et le diamètre du tubule séminifère. Quatre composants principaux ont expliqué le 79% de la variation totale observée. La majorité des variables macroscopiques des testicules et des épидидymes ont été groupées en deux conjoints non rattachés avec les variables microscopiques, lesquelles sont importantes pour connaître la maturation fonctionnelle du mâle, à un age spécifique.

Les deux lignes étudiées ont montré patron de développement similaires pour toutes les variables considérées, en présentant les changements les plus remarquables à des âges jeunes, et ont été affectées de la même façon par les conditions de l'environnement. Le pourcentage des tubules séminifères avec du lumen et avec présence des spermatozoïdes a été petit (70% et 40%, respectivement). Ainsi, à cette âge il aurai besoin d'appliquer un rythme d'extraction plus extensive o no utiliser pas les mâles, spécialement avec les mâles nés pendant la saison chaude. La ligne Caldes avait un majeur poids vif et un inférieur volume du testicule (en valeurs absolutes et en valeurs relatives au poids vif) que la ligne Prat, tandis qu'on n'a pas observé de différences dues au génotype pour les variables microscopiques.

Il va être observé un effet significatif de la saison de naissance sur toutes les variables excepte pour le pourcentage de tubules séminifères avec du lumen et avec présence d'spermatozoïdes. Les valeurs absolutes et les valeurs relati-

ves à la valeur à l'état adulte des variables poids vif, volume du testicule, volume du épидидyme et des variables rattachées avec la maturation fonctionnelle vont être plus petits dans les animaux nés à la saison chaude. La croissance du volume du testicule et du volume du épидидyme va résulter retardataire dans les animaux nés à la saison chaude. Pour tant il aurai besoin de tenir présent l'effet de la saison de naissance dans futures études pour obtenir des analyses plus précises et pour établir l'âge du commencement la vide reproductive des mâles et aussi du rythme d'extraction du semant au commencement de cette vide.

Dans le but d'étudier la maturation sexuelle à partir de nouvelles variables, en un deuxième travail se sont analysés les changements rattachés avec l'âge et l'effet de la ligne et de la saison de naissance sur des marqueurs de développement de type moléculaire rattachés au stress oxydant : concentration de testostérone, formation du radical anion superoxide, activité de la superoxide dismutase, activité de la catalase et niveaux des substances réactives au acide thibarbiturique. Les changements les plus importants ont été observés à des âges précoces et pourraient être expliqués par des changements dans la structure et fonction testiculaire. Aussi pour cet conjoint de variables les deux lignes ont montré des niveaux et des profiles de développement similaire, lesquelles ont été affectées de la même façon pour les conditionnes de l'environnement. Il va être trouvé un effet significatif de la saison de naissance sur la formation du radical anion superoxide et les activités des enzymes antioxydants. Il aurai besoin de tenir présent ces différences dans le dessin expérimental de futures études.

L'effet de facteurs génétiques sur la production et qualité séminale, la fertilité et la prolificité des mâles a été étudié au moyen de l'usage de mâles adultes qui appartenaient à de deux lignes sélectionnées par vitesse de croissance (Caldes et R) et aux croisements réciproques entre les deux lignes (Caldes x R et R x Caldes). Ces lignes sont largement utilisées dans le secteur producteur cunicole, dans le schéma de croisements à trois voies, comme des productrices de mâles terminales.

D'abord on a réalisé une analyse de composants principaux et de corrélations phénotypiques pour examiner les relations existantes entre quelques des variables qualitatives et quantitatives du sperme du lapin étudiées. Les quatre premiers composants principaux (CP) ont expliqué un 62% de la variation totale observée: 23%, 18%, 12% et 8%, respectivement. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants (Vi), de spermatozoïdes ayant une intégrité acrosomique (NAR), de spermatozoïdes normaux (Nr), d'anomalies morphologiques du col/pièce intermédiaire (Nm) et du flagelle (T) du sperme sont les variables prédominantes dans la première CP. La motilité d'ensemble et individuelle (Mm, Mi), le pH, la concentration (Cn) et nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (TSE) sont localisés dans la seconde. Le pourcentage de spermatozoïdes avec une gouttelette cytoplasmique proximale et distale (Dp, Dd), Vi, NAR et Nr sont les caractéristiques prédominantes dans la troisième et le volume (V) définit la quatrième. La repetibilité a aussi été estimée pour les mêmes caractères montrant des valeurs modérées pour la plupart des caractères. Les valeurs les plus hautes (autour de 0.45) ont correspondu au V, Mm, Mi, Cn, Nr et Dp et les valeurs les plus basses (autour de 0.10) à l'H et Nm. La repetibilité du premier éjaculé a été plus grande que celle du deuxième pour le pH, Mm, Mi, H, Dp et Dd.

Dans un deuxième travail on a estimé l'effet du type génétique et les paramètres de croisement sur les caractères de production et qualité séminale avant définies et sur cinq nouvelles variables : présence du gel (G), urine (U), dépôts de carbonate calcaïque (CC), nombre d'éjaculâtes utiles (UE) et motilité utile (UM). On a trouvé différences entre des types génétiques sur les caractères qui définissent la qualité des éjaculâtes (UE, G, CC, UM), la production (V, Cn, TSE) et la qualité des spermatozoïdes (Vi, NAR, Nr, Nm, Dp, Dd). Les résultats obtenus ne permettaient pas de tenir à vision claire sur les différences entre types génétiques, mais il paraît que les mâles Caldes ont une meilleure production du semant mais de pire qualité que les mâles Caldes x R et R, lesquels montrent en général meilleures caractéristiques. Ils sont trouvées des différences importantes dans les effets génétiques directs, lesquelles ont été favorables à la ligne Caldes pour la Cn et le TSE et défavorables pour la CC, Nm et Dp. On a aussi observé différences en Vi et NAR favorables à la ligne R, mais celles-ci ont été plus petites. Des différences dans les effets génétiques maternels se sont trouvées importantes et favorables à la ligne Caldes pour le V et la ligne R pour U, UM, Cn, TSE, Nm, Mi et Mm. Finalement, un haut pourcentage s'est trouvé d'hétérosis pour les variables Dp et Dd.

L'effet du type génétique et les paramètres de croisement sur la fertilité et la prolificité des mâles, et la relation entre le rendement reproductif et plusieurs caractères de qualité séminale ont été étudiés dans le dernier travail. Des différences significatives en fertilité se sont trouvées entre les mâles purs, favorables pour le type R, et entre les mâles croisés, favorables au type Caldes x R. Les différences entre des lignes dans les effets génétiques maternels ont été importantes et favorables au type R pour la fertilité. L'hétérosis pour la fertilité a été importé, mais défavorable. Finalement, on a obtenu une petite relation entre toutes les caractéristiques de qualité séminale et la fertilité et la prolificité quand la fertilité était étudié à partir d'un modèle bivariant qui inclurait le type génétique du mâle et une variable du semant. Quand il était utilisé un modèle de régression multivariant on trouvait deux modèles de régression qui incluraient le pourcentage de spermatozoïdes avec des anomalies du col/pièce intermédiaire (NAP), motilité individuelle (IM), pourcentage de spermatozoïdes avec de la normalité morphologique (NSP), le type génétique de mâle et le pourcentage de spermatozoïdes vivants (Vi) en un modèle ou le pourcentage de spermatozoïdes avec de la normalité acrosomique (NAR) dans l'autre modèle; IM a eu un effet positif important, tandis que l'effet du NAP a été petit et négatif. Les deux modèles, cependant, expliquaient une petite partie de la variation totale observée. Quand on analysait le nombre de nés vifs, le modèle de régression multiple inclurait les variables motilité d'ensemble (MM), le pourcentage de spermatozoïdes avec des anomalies de queue (T) et le type génétique de mâle, mais uniquement MM et T avaient un petit effet significatif. La motilité individuelle et le pourcentage de sperme avec une présence de gouttelette cytoplasmique distale (DD) ont été rattachés avec le nombre de nés morts, mais seulement DD avait un effet significatif bien que négligeable.

Capítol 1
INTRODUCCIÓ GENERAL

Un dels objectius de les granges comercials i especialment dels centres d'inseminació artificial és la producció d'un elevat nombre de dosis seminals amb capacitat de fecundar la femella a un mínim cost, la qual cosa implica l'ús de mascles d'elevada eficàcia reproductiva així com un maneig adequat dels mateixos. L'eficàcia reproductiva dels mascles ve determinada per la producció i qualitat del semen, entenent qualitat com la capacitat que té el semen de prenyar una femella, i està afectada per factors genètics, ambientals i de maneig. En aquesta tesi s'ha estudiat l'efecte de factors genètics sobre diferents aspectes relacionats amb la fisiologia de la reproducció del mascle.

A continuació es presenta una revisió dels treballs publicats en els darrers anys en relació al mascle i la seva capacitat reproductiva. En primer lloc es fa una breu descripció de l'aparell reproductor del mascle i un repàs dels estudis realitzats en relació a les variables utilitzades com a marcadors del desenvolupament sexual. Seguidament es descriu el paper de la inseminació artificial en el sector cunícola i el maneig del semen. Finalment es defineixen els principals caràcters que descriuen la producció i qualitat del semen, els factors que els afecten i la relació que tenen amb la fertilitat al mateix temps que es discuteixen els resultats obtinguts per diferents investigadors.

1.1 Fisiologia de la reproducció del mascle

1.1.1 Breu descripció de l'aparell reproductor del mascle, i dels processos d'espermatogènesi i fertilització

Aquest apartat conté un resum bàsic sobre l'anatomia de l'aparell reproductor del mascle, el procés d'espermatogènesi i el procés de la fertilització, i ha estat realitzat a partir de diverses revisions (Guraya, 1980; Amann i Schanbacher, 1983; Urry, 1984; Styne, 1994;) i llibres de text (Sánchez, 1997; Rossell, 2000; Hafez, 2002). La inclusió d'aquest apartat té com a objectiu definir sintèticament les diferents estructures i processos relacionats amb la fisiologia de la reproducció del mascle que són esmentats posteriorment en altres apartats de la introducció i en la discussió d'aquesta tesi.

1.1.1.1 Testicle. Espermatogènesi. Espermatozou

Els testicles són òrgans parells, estan allotjats en l'escrot i envoltats per la càpsula testicular, teixit connectiu dens i fibrós dividit en tres capes (túnica vaginalis, túnica albugínia i túnica vasculosa), i tenen dues funcions bàsiques: la secreció de testosterona i altres hormones a través del procés d'esteroidogènesi, i la producció d'espermatozous a través del procés d'espermatogènesi.

L'esteroidogènesi té lloc fonamentalment a les cèl·lules de Leydig localitzades al teixit intersticial, que envolta els túbuls seminífers. L'espermatogènesi es dona en els túbuls seminífers, els quals es caracteritzen per estar dividits funcionalment en dues parts: el compartiment basal, que conté els espermatogonis i els espermatòcits de primer ordre, i el compartiment luminal, que conté els espermatòcits de segon ordre, les espermàtides i els espermatozous. Les cèl·lules de Sertoli, les úniques cèl·lules somàtiques dins els túbuls seminífers, s'estenen des del compartiment basal fins al compartiment luminal i formen una barrera molt selectiva, anomenada bar-

L'espermatogènesi ha estat definida com la suma de les transformacions que resulten en la formació d'espermatozous a partir d'espermatogonis, mentre es manté el nombre d'espermatogonis (Courot i col., 1970 citat per Amann i Schanbacher, 1983). Tot el procés té lloc dins els túbuls seminífers i comprèn tres etapes, que de manera simplificada són:

- 1) Espermatocitogènesi: a partir dels espermatogonis es produeixen cèl·lules en una primera fase de diferenciació, els espermatòcits primaris.
- 2) Divisió meiòtica dels espermatòcits primaris per a formar espermatòcits secundaris.
- 3) Espermiogènesi: és la fase de diferenciació final. La divisió dels espermatòcits secundaris produeix les espermatides, i aquestes per un procés de diferenciació sense proliferació cel·lular donaran lloc als espermatozous, cèl·lules morfològica i funcionalment molt especialitzades. A nivell morfològic es distingeixen fonamentalment 3 parts: el cap, la peça de connexió o coll i la cua (Figura 1.1.2).

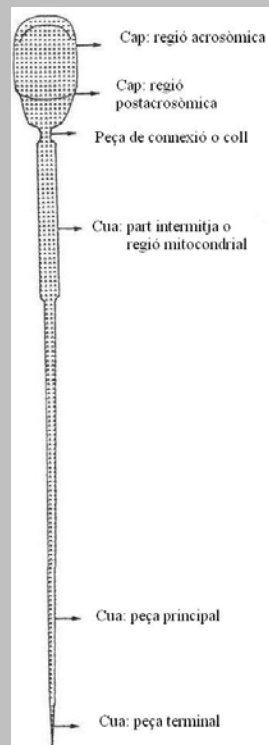


Figura 1.1.2: Dibuix d'un espermatozou (Bonet i col., 2000).

En el cap es troben el nucli i l'acrosoma, vesícula que es disposa per sobre del nucli en forma de caputxa. El coll és la regió que abasta des de la base del cap fins al primer mitocondri de la peça intermèdia. La cua es caracteritza per presentar una estructura anomenada axonema i per estar dividida en tres parts: la peça intermèdia o mitocondrial, la peça principal i la peça terminal. L'axonema és una estructura formada per microtúbuls, en una conformació de 9 + 2, que ocupa l'eix central de la cua i que travessa les tres peces en què es divideix aquesta. La peça intermèdia s'estén des de la part distal de la peça de connexió fins a l'*annulus* o anell de Jensen i es caracteritza per presentar la beina mitocondrial (formada per una gran quantitat de mitocondris allargats). La peça principal és el segment més llarg de la cua, s'estén des de l'anell de Jensen fins a l'extrem proximal de la peça terminal, en aquesta la beina mitocondrial és substituïda per una beina fibrosa. La peça terminal és la secció més curta de la cua.

1.1.1.2 Epidídim i glàndules annexes

L'epidídim és un òrgan format per tres regions diferenciades anatòmica i funcionalment: el cap, el cos i la cua (Figura 1.1.3) i està cobert únicament per la túnica vaginalis. El cap i el cos de l'epidídim estan involucrats en la maduració dels espermatozous, mentre que la cua té una funció d'emmagatzematge.

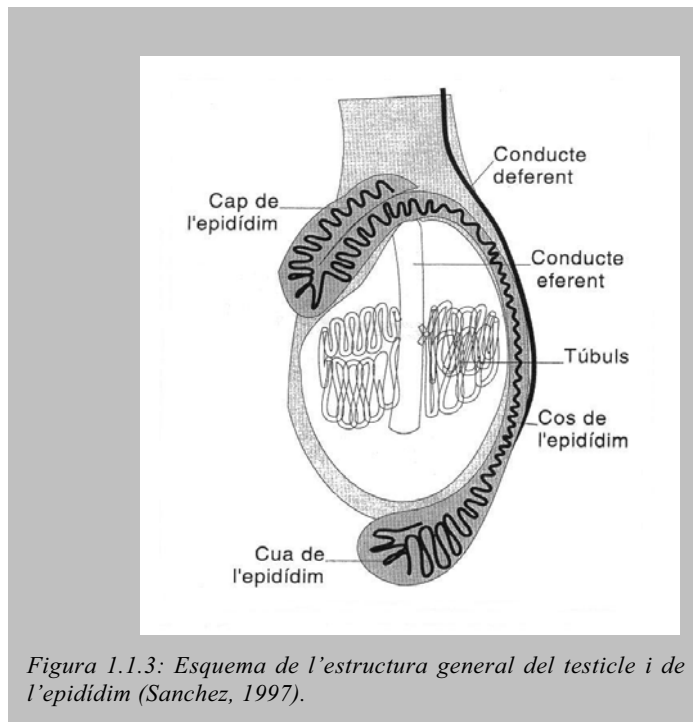
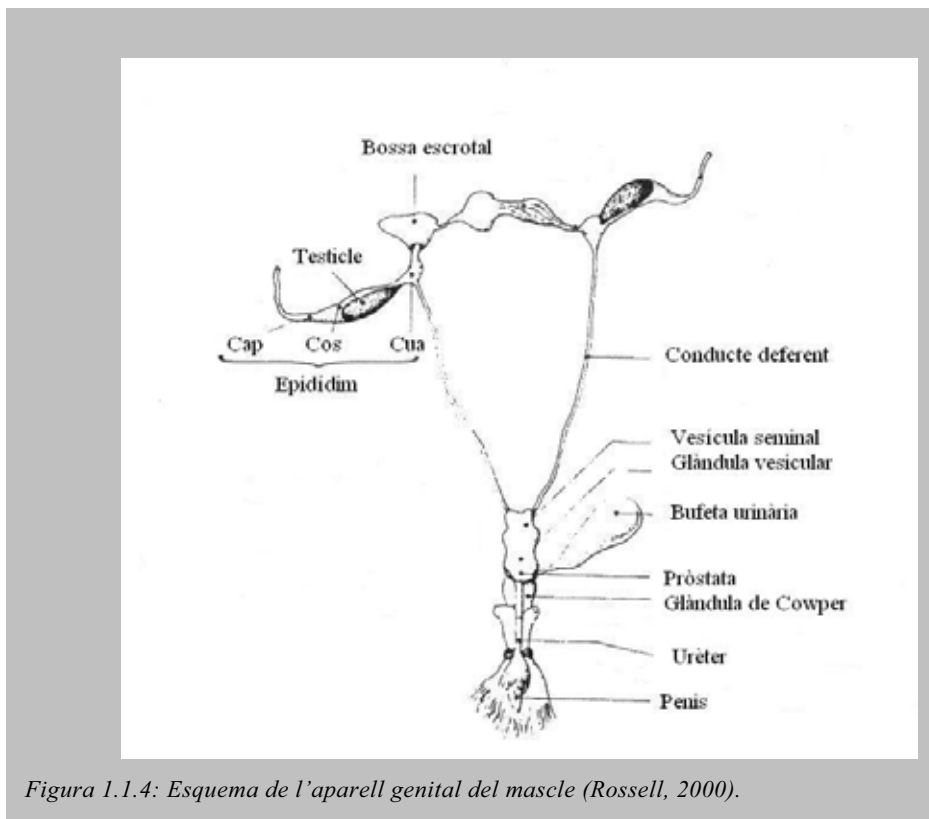


Figura 1.1.3: Esquema de l'estructura general del testicle i de l'epidídim (Sanchez, 1997).

Els espermatozous que surten dels túbuls seminífers arriben a l'epidídim a partir del conducte eferent present a la zona del cap, viatgen pel cos per tal d'experimentar la darrera etapa de maduració abans de deixar l'aparell reproductor masculí, arriben a la cua on són emmagatzemats, i finalment surten de l'epidídim a partir del conducte deferent, que connecta la cua amb la vesícula seminal. El semen lliurat pels mascles és una suspensió cel·lular dels espermatozous en un líquid, anomenat plasma seminal, format per una petita porció de líquid tubular i per les secrecions de les diferents parts del tracte reproductor masculí, les glàndules accessorïes: glàndules ampul·lars, vesiculars i bulbouretrals i la pròstata (Figura 1.1.4).



1.1.1.3 Fertilització

La maduració que es dona durant el trànsit dels espermatozous per l'epidídim suposa l'adquisició de moviment sostingut lineal, canvis en la morfologia, canvis en les característiques de la membrana plasmàtica, pèrdua d'aigua, pèrdua de la gota citoplasmàtica, etc. A partir d'aquesta maduració l'espermatozou adquireix capacitat fecundant, però encara haurà d'experimentar un procés final de maduració que comprèn la capacitació, durant

el seu pas per l'aparell reproductor femení, i la reacció acrosòmica, en entrar en contacte amb el gàmeta femení (Figura 1.1.5).

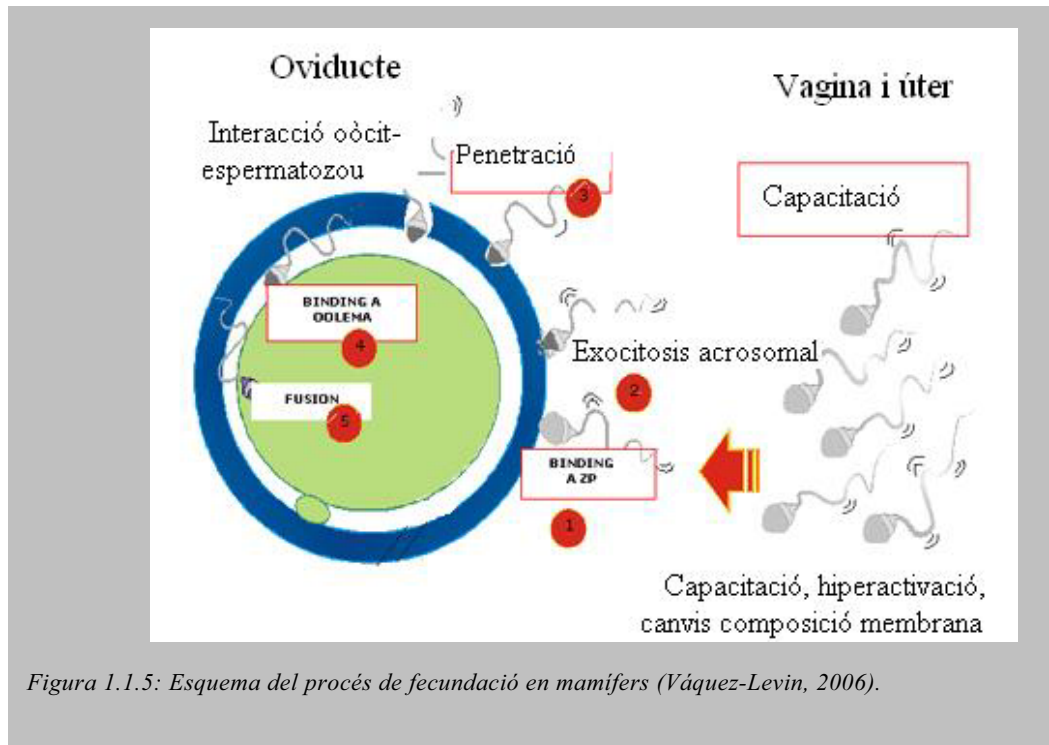


Figura 1.1.5: Esquema del procés de fecundació en mamífers (Vázquez-Levin, 2006).

Amb la capacitat els espermatozous presenten canvis en la membrana plasmàtica en la regió anterior del cap, els quals donaran lloc a canvis en el patró de motilitat dels espermatozous (adquisició d'un moviment molt ràpid i pèrdua de linealitat) i permetran la reacció acrosòmica.

La reacció acrosòmica implica un trencament i fusió de la membrana plasmàtica amb la membrana externa de l'acrosoma, l'alliberament de vesícules plenes d'enzims i l'exposició de la membrana interna de l'acrosoma (Figura 1.1.6). Amb l'alliberació dels enzims l'espermatozou podrà penetrar per les cobertes externes de l'òocit (Figura 1.1.7), dissolent la capa de la granulosa i permetent l'accés a la zona pel·lúcida, on s'establirà el contacte entre ambdues cèl·lules. L'espermatozou es fixarà forta i irreversiblement i travessarà la zona pel·lúcida fins a entrar en contacte amb la membrana vitel·lina, en aquest moment es fusionaran les dues membranes i s'incorporarà el cap de l'espermatozou en l'oooplasma (Figura 1.1.5).

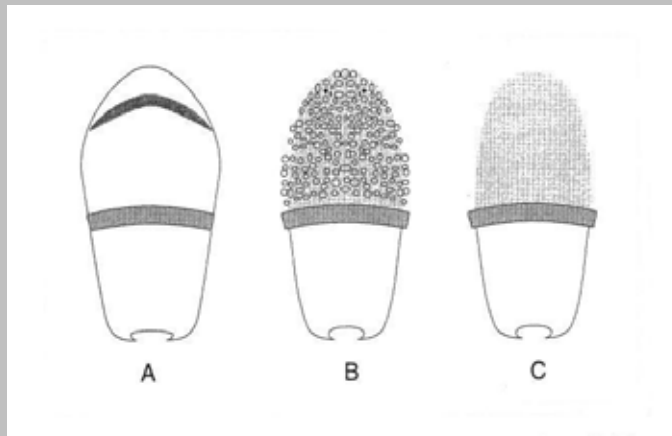


Figura 1.1.6: Reacció de l'acrosoma. A) Abans d'iniciar-se la transformació. B) Formació de les vesícules per fusió de les membranes. C) El cap de l'espermatozou un cop finalitzada la reacció (Sánchez, 1997).

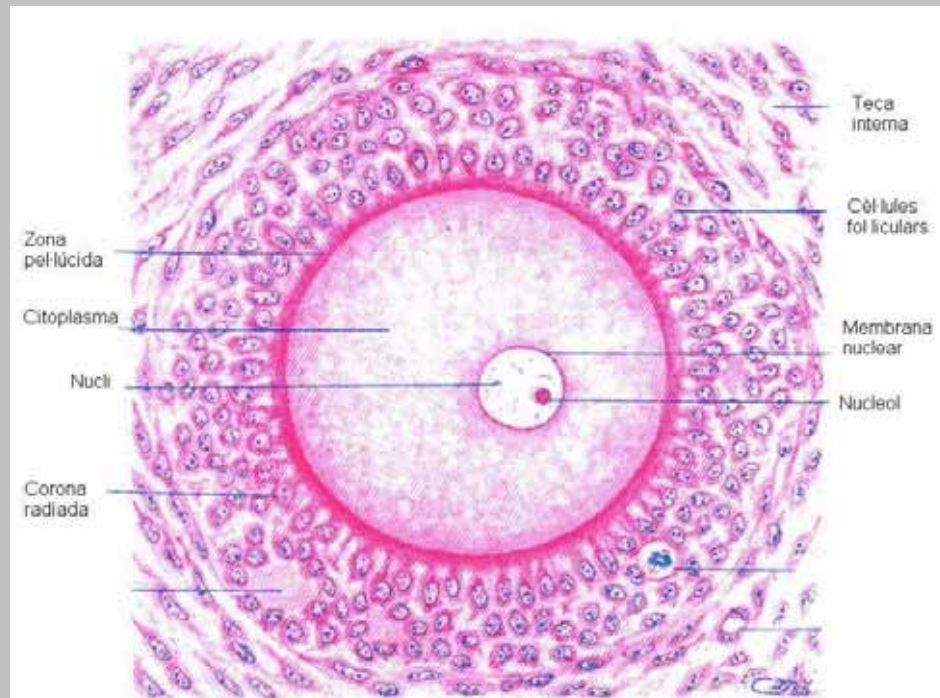


Figura 1.1.7: Esquema d'un oòcit (Eroschenko, 2004)

1.1.2 Desenvolupament sexual

El control de la reproducció ve regulat per l'eix hipotalàmic-hipopisari-gonadal (Figura 1.1.8). El factor alliberador de les gonadotrofines (GnRH) és el factor hipotalàmic que actua sobre les cèl·lules gonadotròfiques de la hipòfisi i estimula la síntesi i secreció de l'hormona estimuladora dels fol·licles (FSH) i l'hormona luteïnitzant (LH). En el testicle l'LH actua sobre les cèl·lules de Leydig estimulant la producció d'andrògens. L'FSH actua sobre les cèl·lules de Sertoli estimulant la producció de proteïna fixadora dels andrògens (ABP) i d'inhibina, la transformació de la testosterona en dihidrotestosterona i estrògens, la proliferació dels espermatogonis, etc.

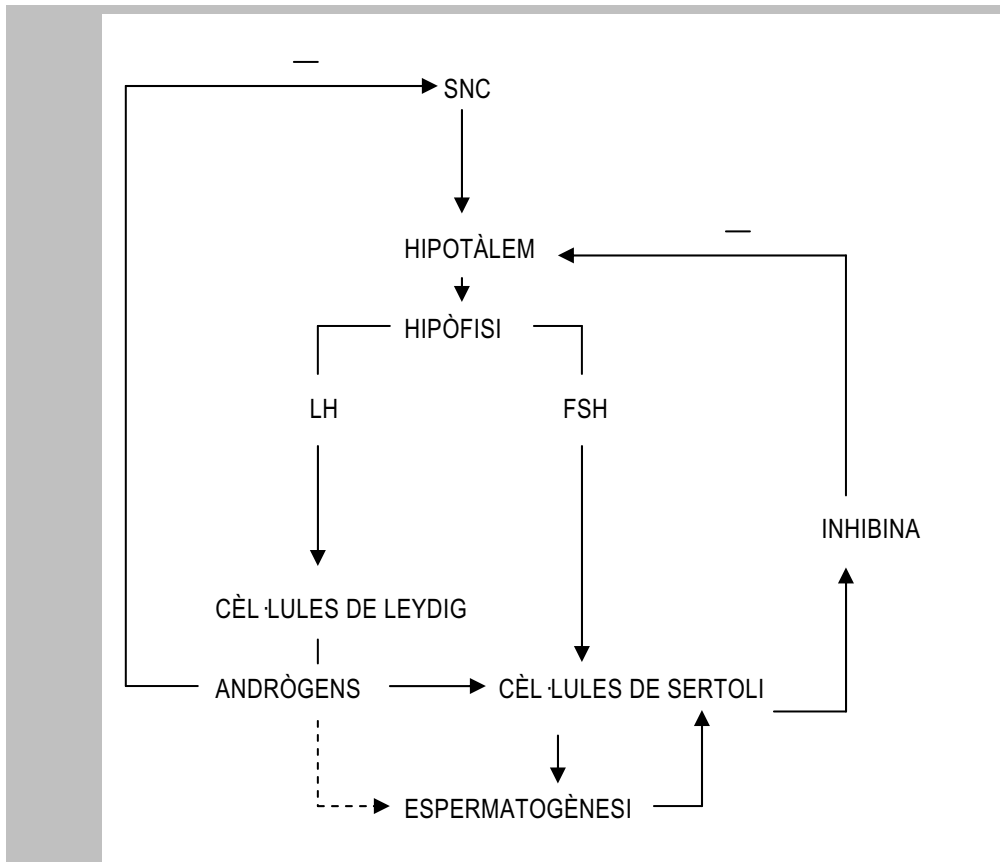


Figura 1.1.8: Regulació endocrina de l'activitat testicular (Sánchez, 1997).

L'inici de l'espermatogènesi es produeix a partir d'un canvi en la pulsilitat de la GnRH que dona lloc a un increment en l'amplitud i freqüència de les pulsacions de l'LH. Seguidament la concentració de testosterona cir-

culant incrementa, les cèl·lules de Sertoli es diferencien i formen la barrera hematotesticular, i es produeix la maduració progressiva dels espermatogonis. Posteriorment, l'eix hipotàlem-hipòfisi incrementa la seva sensibilitat als andrògens produïts per les cèl·lules de Leydig, i a la inhibina, produïda per les cèl·lules de Sertoli, i s'estableix el control definitiu de la pulsilitat de l'LH i la FSH per retroalimentació negativa.

El desenvolupament sexual del mascle ha estat normalment estudiat a partir dels canvis observats en patró de desenvolupament de diferents indicadors de la maduració de l'aparell reproductor, els quals es poden dividir en marcadors morfològics i marcadors moleculars.

1.1.2.1 Marcadors morfològics

Els marcadors de la maduració sexual més comunament utilitzats en diverses espècies (Shinckel i col., 1983; Salhab i col., 2001; Lunstra i Cundiff, 2003; Mandal i col., 2004) han estat variables de tipus macroscòpic relacionades amb l'anatomia del testicle: pes, volum i mida (longitud, amplada i/o circumferència escrotal). Aquestes variables han estat força relacionades amb el nivell de maduració sexual del testicle, ja que amb el inici de l'espermatogènesi es produeix un increment exponencial en el nombre i la mida de les cèl·lules germinals que es considera que és el responsable del marcat augment en el pes i la mida dels testicles (Salisbury i col., 1978 citat per Salhab i col., 2001). Variables de tipus microscòpic relacionades amb la histologia del testicle com el diàmetre del túbul seminífer, el nombre i mida de les cèl·lules somàtiques i germinals, l'aparició de les espermatides elongades i dels espermatozous en el túbul seminífer, etc., també han estat utilitzades com a indicadors d'una maduració sexual funcional (Shinckel i col., 1983; Tegegne i col., 1991). I s'ha observat que aquestes variables estan moderadament correlacionades amb les variables anatòmiques (Shinckel i col., 1983; Chemes, 2001), per tant donen una informació addicional sobre la maduració funcional dels testicles.

En conills, el procés d'espermatogènesi, l'edat a la què apareixen els diferents tipus de cèl·lules germinals en els túbuls seminífers i la pubertat ja han estat estudiats des de fa algun temps (Berger i col., 1982; Macedo i Miguel, 1986; Iczkowski i col., 1991; Alvariño, 1998), existint un moderat desacord entre els autors tant respecte la maduració dels túbuls seminífers i el procés d'espermatogènesi (aparició dels espermatogonis, inici de l'activitat meiòtica, formació del lumen, aparició dels espermatozous, etc.) com respecte la determinació del moment en què els mascles adquireixen la maduresa sexual, definida com el moment en què un mascle és usat per a la reproducció i produeix resultats considerats satisfactoris pel sector industrial (Brito i col., 2002). Les diferències observades podrien indicar que el patró de creixement dels marcadors de la maduració sexual i la pubertat estan afectats per factors genètics i/o ambientals. Caldria, però, realitzar un estudi on es comparessin diverses races o línies de conill per a confirmar l'efecte de factors genètics sobre aquestes variables. En braus, diversos autors han trobat diferències entre races respecte al patró de desenvolupament d'algunes variables macroscòpiques (mida del testicle, circumferència escrotal) i d'algunes variables microscòpiques (di-

àmetre del túbul seminífer, aparició de les espermàtides elongades o dels espermatozous en els túbuls) (Tegne i col., 1991; Lunstra i Cundiff, 2003).

La selecció per velocitat de creixement pot també modificar el patró de creixement (en conills, Blasco i col., 2003 i Piles i col., 2003) i podria retardar la maduració sexual. Schinckel i col. (1983), al comparar línies seleccionades de porc que diferien en la tasa d'ovulació i la velocitat de creixement, observaven que la línia seleccionada per creixement magre presentava major pes corporal, testicles més petits, menor nombre de túbuls seminífers amb espermatogènesi, menor diàmetre tubular i adquiria el mateix grau de desenvolupament testicular a edat més avançada, suggerint que la selecció per velocitat de creixement podria resultar en un increment de l'edat de pubertat i un desenvolupament testicular més lent.

Quant a l'efecte de factors ambientals, s'han observat variacions estacionals en alguns caràcters reproductius d'animals adults: producció i qualitat seminal (Theau-Clement i col., 1995; Lavara i col., 2000), la mida del testicle (Carson i Amann, 1972) i concentració de testosterona plasmàtica (Boiti i col., 1992; Chiericato i col., 1994). No s'ha trobat dins la literatura publicada informació respecte l'efecte de factors ambientals sobre el patró de desenvolupament sexual.

1.1.2.2 Marcadors moleculars relacionats amb l'estrès oxidatiu

El paper de l'estrès oxidatiu en la funció reproductiva del mascle ha guanyat una considerable atenció en els darrers temps tant per a completar el diagnòstic de la qualitat i producció de semen com per a la millora del coneixement dels processos de maduració sexual.

L'estrès oxidatiu es defineix com un desequilibri entre les espècies reactives d'oxigen (ROS) i la capacitat antioxidant d'un sistema biològic (Engelhart i col., 1998).

El terme ROS inclou tant les espècies radicalàries o radicals lliures ($O_2\cdot^-$, $OH\cdot$), que són molècules o fragments de molècules que contenen un o més electrons desaparellats en el seu orbital més extern, com les espècies no radicalàries (H_2O_2 , ozó, etc.) derivades de l' O_2 (Taula 1.1.1). Les ROS es caracteritzen per la seva elevada reactivitat i capacitat de formar altres radicals lliures per reaccions en cadena, aquesta propietat els converteix en compostos molt inestables (Halliwell i Gutteridge, 1999), capaços d'oxidar components cel·lulars vitals i macromolècules com el DNA, proteïnes, carbohidrats i lípids.

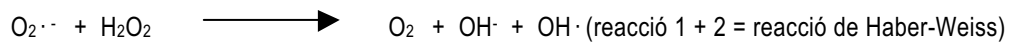
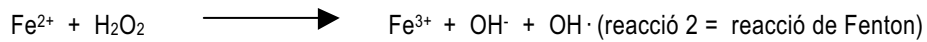
TAULA 1.1.1: ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN. (HALLIWELL I GUTTERIDGE, 1999)

<i>Radicals</i>	<i>No radicals</i>
Superòxid ($O_2^{\cdot -}$)	Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
Hidroxil (OH^{\cdot})	Àcid hipoclorit ($HOCl$)
Peroxil (RO_2^{\cdot})	Ozò (O_3)
Alcoxil (RO^{\cdot})	Oxigen singlet
Hidroperoxil (HO_2^{\cdot})	Peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$)

Totes les cèl·lules aeròbiques són productores de ROS. L'activitat metabòlica de les cèl·lules es tradueix en despesa d'energia i consum d'oxigen. La reducció de l'oxigen a aigua pot produir-se per dues vies:

- 1) Sistema citocrom oxidasa, el qual redueix l'oxigen a aigua sense produir compostos intermedis. Aquesta és la via habitual i correspon a aproximadament el 90-95% d'oxigen consumit en el teixits.
- 2) Reducció univalent de l'oxigen, a partir de la qual es produeixen els ROS. Correspon al 5-10% d'oxigen consumit pels teixits (Halliwell, 1994). Les fonts a partir de les quals es produeix l'anió superòxid en els organismes aeròbics es poden resumir en: enzimàtiques, reaccions d'autooxidació, proteïnes hemo, bacteris, reticle endoplasmàtic i la cadena mitocondrial de transport electrònic. Aquesta última és probablement la font de $O_2^{\cdot -}$ in vivo més important, la producció de ROS es dona a partir d'alguns components inicials de la cadena mitocondrial. S'ha suggerit que aproximadament un 1-3% del O_2 reduït en la mitocòndria pot formar $O_2^{\cdot -}$ amb uns nivells fisiològics de O_2 .

La reactivitat química de les ROS varia. L'anió superòxid ($O_2^{\cdot -}$) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) són dues espècies reactives molt importants capaces de produir radicals hidroxil (OH^{\cdot}) en presència de ferro, a partir de la reacció de Haber-Weiss. Aquesta espècie reactiva pot iniciar la lipoperoxidació, que és el deteriorament oxidatiu dels àcids grassos poliinsaturats presents a les membranes cel·lulars. Això comporta l'alteració de la fluïdesa de dites membranes comprometent la seva integritat i funcionalitat. La formació del OH^{\cdot} està descrita per les següents reaccions:



Les reaccions en cadena que provoca el radical OH^\cdot suposen l'acumulació de productes finals de la lipoperoxidació. La lipoperoxidació es determina indirectament a través d'aquests productes finals, anomenats substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARs). Els TBARs mesuren principalment malondialdehid (MDA) que és un producte final estable de la lipoperoxidació (Figura 1.1.9).

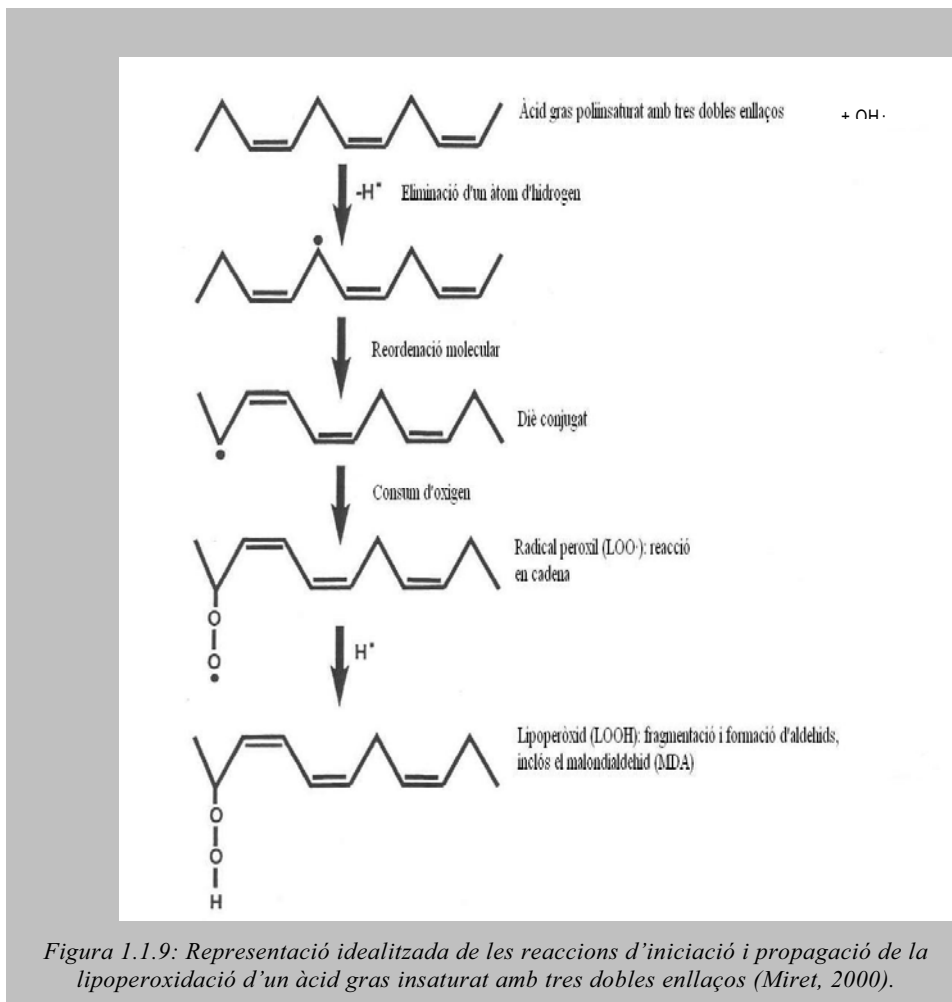
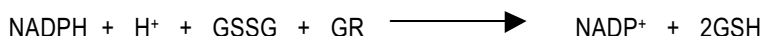
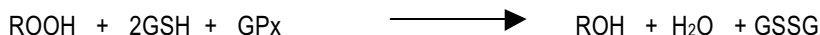


Figura 1.1.9: Representació idealitzada de les reaccions d'iniciació i propagació de la lipoperoxidació d'un àcid gras insaturat amb tres dobles enllaços (Miret, 2000).

El $\text{OH}\cdot$ és una molècula molt reactiva i un cop format el dany que pugui produir és gairebé inevitable. Així, la majoria d'organismes aeròbics han desenvolupat mecanismes antioxidants enzimàtics (superòxid dismutasa, catalasa, glutatió peroxidasa) i no enzimàtics (vitamines A, C i E; àcid úric, albúmina, bilirubina, etc.) de protecció en contra de l'estrès oxidatiu dirigits a evitar la formació d'aquest radical.

A nivell enzimàtic, els primers enzims involucrats són la superòxid dismutasa citosòlica (Cu-Zn SOD) i la mitocondrial (Mn SOD), aquests dos enzims transformen l'anió superòxid (O_2^-) en peròxid d'hidrogen (H_2O_2), el qual és metabolitzat a H_2O més O_2 a partir de la catalasa (CAT) o la Se-glutatió peroxidasa (Gpx). Aquests mecanismes antioxidants són necessaris per evitar la lipoperoxidació de les membranes. A continuació s'esquematitzen les reaccions esmentades:



El paper de les ROS i els enzims antioxidants en relació a la reproducció masculina ha estat majoritàriament estudiat en ejaculats, plasma seminal i espermatozous madurs. En aquest sentit, Baumber i col. (2000) han trobat una disminució de la motilitat d'espermatozous de cavall incubats amb xantina-xantina oxidasa; Kelso i col. (1997) en braus han observat canvis en la composició lipídica dels espermatozous i del plasma seminal amb l'edat, associats a una disminució en el plasma seminal d'enzims antioxidants (glutatió peroxidasa i superòxid dismutasa); mentre que en semen fresc de conill la suplementació amb vitamina E i vitamina C en la dieta reduïa les concentracions de TBARs en el plasma i la producció de radicals lliures (Castellini i col., 2000; Yousef i col., 2003), i millorava la qualitat del semen fresc (Yousef i col., 2003) o del semen congelat (Castellini i col., 2002). Encara que una gran producció de ROS esdevé en efectes negatius sobre l'espermatozou, alguns autors han mostrat que una producció controlada sembla afectar positivament la funció espermàtica i que una moderada lipoperoxidació és necessària per maximitzar la capacitat fecundant dels espermatozous. Rivlin i col. (2004) van trobar que baixes concentracions de H_2O_2 eren beneficioses per a la capacitat d'espermatozous de braus, i de Lamirande i Gagnon (1993) van mostrar que un tractament amb $\text{O}_2^{\cdot -}$ o H_2O_2 induïa la capacitat i la hiperactivació d'espermatozous humans. D'altra banda, els espermatozous i el plasma seminal de diferents mamífers presentaven activitat CAT (Jeulin i col., 1989; Foote i col., 2000). Sembla, doncs, que l'estrès oxidatiu ha d'estar ben controlat, ja que el desequilibri existent entre les ROS i els sistemes antioxidants pot resultar en un dany de l'espermatozou i infertilitat.

Quant als testicles, aquests són òrgans que produeixen ROS durant el desenvolupament de les cèl·lules germinals sota condicions fisiològiques normals (Mruk i col., 2002). L'espermatogènesi comporta una gran activitat metabòlica, degut als processos de proliferació i diferenciació cel·lulars, la qual cosa es tradueix en una important despesa d'energia i consum d'oxigen que provoquen la formació de ROS. L'alta concentració en àcids grassos poliinsaturats que presenten els testicles (Davis i col., 1966) i la producció de ROS els converteixen en un teixit molt susceptible a danys per peroxidació lipídica. Diversos autors han trobat en diferents espècies animals l'expressió i l'activitat de diferents enzims antioxidants (CAT, Cu-Zn SOD, Mn SOD i Sèl·lutatió peroxidasa) en el testicle (Ihrig i col., 1974; Bauché i col., 1994; Gu i Hecht, 1996; Zini i Schlegel, 1996) a partir dels quals s'estableix un control de les ROS, evitant els efectes negatius sobre l'espermatogènesi i la funcionalitat dels espermatozous (ambdues causes comunes d'infertilitat masculina). Gu i Hecht (1996), en ratolí, i Samanta i col. (1999), en rata, van observar que el sistema antioxidant en el testicle, a diferència d'altres òrgans i teixits, es caracteritza per presentar alts nivells d'expressió i activitat de SOD i baixos nivells de CAT i GHS-Px. Aquest patró ha estat relacionat amb un paper específic del H₂O₂ en l'espermatogènesi (Peltola i col., 1992; Samanta i col., 1999), és possible que fos necessari un petit estrès oxidatiu en algun moment del procés d'espermatogènesi.

La testosterona, marcador de la funcionalitat del testicle molt utilitzat en els estudis relacionats amb la maduració sexual, ha estat relacionada amb la producció de ROS (Peltola i col., 1996; Chainy i col., 1997; Aydilek i col., 2004), encara que els resultats són contradictoris.

Els estudis realitzats fins al moment indiquen un paper important de l'estrès oxidatiu en la funció reproductiva dels mascles. Tanmateix, no hi ha estudis on s'hagi relacionat directament la presència o els nivells de ROS en els ejaculats amb la fertilitat, ni l'efecte que suposaria una disrupció de l'equilibri ROS-enzims antioxidants durant el desenvolupament sexual sobre el procés d'espermatogènesi i la posterior capacitat fecundant dels animals. Tampoc s'ha trobat en la literatura treballs on s'estudii l'efecte de factors genètics i/o ambientals sobre aquestes variables.

1.2 Inseminació artificial

La inseminació artificial (IA) és la tècnica més antiga i més comunament usada dins la reproducció assistida d'animals i humans, i segons Foote (1996) constitueix un exemple notable de l'èxit de la combinació entre ciència bàsica i ciència aplicada.

Aquesta tècnica sorgeix cap principis-mitjans del segle XX, però fins als anys 80 del segle passat ha estat restringida als nuclis de selecció ramaders. La millora en el camp dels diluents, el processat i la criopreservació del semen, les innovacions en el disseny de contenidors eficients de packaging i emmagatzematge i la millora en els mètodes d'avaluació de la qualitat del semen han permès igualar els resultats de fertilitat aconseguits per la IA amb els obtinguts a partir de la munta natural. Un cop assolida la fertilitat exigida pels ramaders es produeix una introducció a gran escala d'aquesta tecnologia en les granges comercials, la qual ha anat associada a canvis estructurals lligats a la grandària i la especialització de les granges.

Existeixen diverses revisions sobre l'estat de la IA en diferents espècies (porquí, Willens 1978 i Singleton 2001; conill, Morrell 1995; vaquí de llet, Vishwanath 2003). Totes elles coincideixen amb les avantatges que ofereix la IA (guany genètic, control de malalties, ràpida reposició d'estocs, ...). Alhora, malgrat les dades que aporten Vishwanath (2003) i Singleton (2001), en totes elles queda evidenciada la manca d'informació i estadístics oficials sobre el sector i la seva evolució (nombre de centres d'inseminació, nombre de dosi produïdes, nombre d'inseminacions, nombre de granges que apliquen inseminació, ...). Aquesta falta d'informació entra en contradicció amb la claredat amb què la IA s'ha implantat en tots els sectors ramaders.

1.2.1 Ús de la inseminació artificial en el sector cunícola

La producció de traspatí de conill es remunta al segle XIX. Tanmateix, la producció intensiva de conill és bastant "jove" en comparació amb la producció de porcs, aus i ramat boví. El començament del desenvolupament professional és força recent a la majoria dels països europeus. La cunicultura industrial va iniciar-se a finals dels anys 70 i no és fins als anys 80-90 que el protagonisme de les explotacions modernes a Europa es fa evident.

A Espanya és a partir de 1984 que el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) comença a realitzar enquestes nacionals referides al sector de la cunicultura. Però no trobem cap referència a l'ús de la IA fins a l'enquesta de 2003 (MAPA, 2005). A les taules 1.2.1 i 1.2.2 podem veure els canvis que ha tingut l'estructura productiva de les explotacions espanyoles entre 1999 i 2003. S'observa un petit decrement (8 %) en el nombre de granges que pertanyen a l'estrat I (menys de 100 places de mares) i un increment (8 %) en el nombre de granges incloses als estrat IV i V (de 400 a 799 places o de més de 800 places, respectivament). A la taula 1.2.3 es pot observar com l'increment en el mida de les explotacions ha anat lligat a l'ús de la IA, les comunitats de Navarra i Balears exemplifiquen clarament aquest fet.

La major especialització de les granges es pot intuir a partir de l'anàlisi de les despeses en les explotacions (Taula 1.2.4 i 1.2.5). Al comparar les dues taules s'observa que l'any 2003 presenta un major desglossament de les despeses i l'aparició de dos grups nous: despeses per semen i inseminació i despeses per mà d'obra. Analitzant les despeses de mà d'obra en valors absoluts s'observa que les comunitats amb més despeses per a aquest concepte són aquelles que tenen un major nombre de grans explotacions juntament amb un alt percentatge en l'ús de la inseminació.

L'increment de la mida i l'especialització de les explotacions i els avenços tècnics experimentats al voltant dels anys 80-90 han donat lloc a l'aparició d'un nou sistema de maneig reproductiu, anomenat maneig en bandes, per al qual en molts casos resulta indispensable la inseminació artificial. L'organització reproductiva en bandes consisteix en l'agrupació de les cubricions o inseminacions del conjunt de femelles reproductores en un dia determinat, això permet a la seva vegada allotjar juntes les femelles que es troben en el mateix estat fisiològic. Aquest sistema requereix la sincronització del zel de les femelles i la inducció de l'ovulació. El control del zel pretén estimular el creixement fol·licular ovàric i la receptivitat de la femella, i pot realitzar-se a partir de mètodes de maneig (control de la temperatura, fotoperíode, alimentació, ús de la bioestimulació) o a partir de mètodes hormonals. La inducció de l'ovulació es realitza a partir de mètodes hormonals i és del tot necessària en el conill quan s'aplica de tècnica de la IA degut a que la femella presenta una ovulació induïda pel coït.

L'organització en bandes presenta clares avantatges des del punt de vista industrial. D'una banda redueix el temps invertit al any per femella i augmenta el nombre de quilos de conill produït per hora de treball (Taula 1.2.6), d'altra banda permet realitzar buits sanitaris regularment, millorant les condicions d'higiene i desinfecció.

TAULA 1.2.1: ESTRUCTURA PRODUCTIVA DE LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 1999 (MAPA, 2003).

	<i>Estrat I</i>		<i>Estrat II</i>		<i>Estrat III</i>		<i>Estrat IV</i>		<i>Estrat V</i>		<i>Total</i>	
	<i>20-99 places</i>		<i>100-199 places</i>		<i>200-399 places</i>		<i>400-799 places</i>		<i>≥ 800</i>			
Comunitat Autònoma	¹ N	¹ Y	¹ N	¹ Y	¹ N	¹ Y	¹ N	¹ Y	¹ N	¹ Y	¹ N	¹ Y
Galícia	34	1951	64	9144	164	42975	67	32568	17	21420	346	108058
Astúries	31	1442	17	2248	33	8633	7	3355	4	4800	92	20478
Cantàbria	46	2720	30	4185	41	10541	13	6710	2	1900	132	26056
País Bascó	1	80	16	2180	32	9180	18	11220	8	7300	75	29960
Navarra	19	925	16	2321	35	9620	18	9395	6	8500	94	30761
La Rioja	4	120	6	717	15	4155	21	11080	6	5850	52	21922
Aragó	130	7451	158	21159	242	64738	99	49085	26	31077	655	173510
Catalunya	1731	68471	598	75893	544	144229	247	125229	52	53999	3172	467821
Illes Balears	32	1268	6	610	1	380	2	1000	1	950	42	4208
Castella i Lleó	50	2979	97	13118	131	35339	61	31303	10	11186	349	93925
Madrid	11	339	6	700	2	500	0	0	1	1000	20	2539
Castella-la Manxa	44	2251	54	7238	93	25986	83	45898	112	267370	386	348743
València	145	7487	154	20648	167	43783	56	28558	15	19560	537	120036
Múrcia	16	841	13	1607	22	6320	14	7470	3	3450	68	19688
Extremadura	6	396	3	345	8	2154	7	3987	3	4079	27	10961
Andalusia	51	2367	42	5553	50	13605	22	11125	15	29059	180	61709
Canàries	61	2348	20	2554	15	4293	8	3320	2	2200	106	14715
Espanya	2412	103436	1300	170220	1595	426431	743	381303	283	473700	6333	1555090

¹ N: nombre d'explotacions, Y: nombre de places

TAULA 1.2.2: ESTRUCTURA PRODUCTIVA DE LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003 (MAPA, 2005).

	<i>Estrat I</i>		<i>Estrat II</i>		<i>Estrat III</i>		<i>Estrat IV</i>		<i>Estrat V</i>		<i>Total</i>	
	<i>20-99 places</i>		<i>100-199 places</i>		<i>200-399 places</i>		<i>400-799 places</i>		<i>≥ 800</i>		<i>1N</i>	<i>1Y</i>
Comunitat Autònoma	<i>1N</i>	<i>1Y</i>	<i>1N</i>	<i>1Y</i>	<i>1N</i>	<i>1Y</i>	<i>1N</i>	<i>1Y</i>	<i>1N</i>	<i>1Y</i>	<i>1N</i>	<i>1Y</i>
Galícia	9	583	30	4309	125	34885	89	45282	27	34127	280	119186
Astúries	82	3317	25	3183	39	10383	15	7620	4	7700	165	32203
Cantàbria	7	226	5	600	14	3640	10	5638	5	6300	41	16404
País Bascó	108	3968	24	3110	45	12840	25	14770	15	21600	217	56288
Navarra	2	115	6	790	20	5510	17	9325	13	19400	58	35140
La Rioja	2	85	2	290	9	2495	12	6210	5	4500	30	13580
Aragó	78	4527	110	14897	218	58572	105	51550	24	32102	535	161648
Catalunya	953	41958	384	49560	435	119027	255	129819	81	98974	2108	439338
Illes Balears	43	1779	8	810	1	380	2	1000	1	950	55	4919
Castella i Lleó	78	4668	121	16605	154	41967	93	47886	20	21861	466	132987
Madrid			1	100					1	1200	2	1300
Castella-la Manxa	29	1468	47	6201	85	23817	68	36932	53	119040	282	187458
València	29	1382	79	10719	161	44465	131	65110	57	82485	457	204161
Múrcia	17	841	17	2156	20	6146	14	7510	3	3100	71	19753
Extremadura	5	361	4	534	6	1905	4	2215	2	2578	21	7593
Andalusia	58	2582	37	5078	58	16338	26	12630	12	13250	191	49878
Canàries	69	3077	16	2030	27	6541	12	5855	3	3005	127	20508
Espanya	1569	70937	916	120972	1417	388911	878	449352	326	472172	5106	1502344

¹N: nombre d'explotacions, Y: nombre de places

TAULA 1.2.3: TIPUS DE REPRODUCCIÓ I MANEIG DE GRANGES CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003 (MAPA, 2005).

Comunitat Autònoma	Tipus de reproducció						Maneig en bandes			
	% EMN	% YMN	% EIA	% YIA	% EMN_IA	% EMB	% Banda única	% Dues bandes	% Tres bandes	% Banda setmanal
Galícia	39,0	32,7	56,6	67,3	4,4	65,8	83,2	11,7	2,2	2,8
Astúries	77,9	57,9	19,5	42,1	2,6	19,5	33,3	40,0		26,7
Cantàbria	69,2	43,2	30,8	56,8		76,9	5,0	35,0	50,0	10,0
País Vascó	51,2	45,3	48,8	54,7		53,7	31,8	27,3	22,7	18,2
Navarra			100,0	100,0		100,0	100,0			
La Rioja	39,3	42,6	50,0	57,4	10,7	75,0	28,6	23,8	33,3	14,3
Aragó	49,3	39,9	44,1	60,1	6,6	47,6	31,8	48,8	12,9	6,5
Catalunya	76,3	49,0	20,0	51,0	3,7	26,8	10,8	25,7	25,5	38,0
Illes Balears	100,0	100,0								
Castella i Lleó	40,4	26,5	55,4	73,5	4,3	43,4	13,4	54,2	17,6	14,8
Madrid	25,0	1,6	75,0	98,4		50,0		100,0		
Castella-la Manxa	58,8	44,4	39,9	55,6	1,3	37,3	2,3	48,3	20,7	28,7
València	50,9	28,9	43,9	71,1	5,2	61,5	7,1	30,8	18,8	43,3
Múrcia	66,7	50,1	18,7	49,9	14,7	28,0			28,6	71,4
Extremadura	94,7	93,6		6,4	5,3	21,1				100,0
Andalusia	69,9	64,2	26,3	35,8	3,8	39,7			45,2	54,8
Canàries	88,4	74,6	8,9	25,4	2,7	14,4	14,3	14,3	33,3	38,1
Espanya	62,5	39,7	33,3	60,3	4,2	39,4	25,1	29,9	18,9	26,1

EMN: explotacions amb munta natural, YMN: llodrigons nascuts de munta natural, EIA: explotacions amb inseminació artificial, YIA: llodrigons nascuts d'inseminació artificial, EMN_IA: explotacions amb munta natural i inseminació artificial, EMB: explotacions amb maneig en bandes.

TAULA 1.2.4: DESPESES (MILERS DE PESETES) EN LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 1999 (MAPA, 2003).

Comunitat Autònoma	CR	CA	DS	CM_MR	E	CRMI	CC	Ass	AD	Total
Galícia	77621	1324497	82151	24568	34082	18096	11649	4670	10379	1587712
Astúries	13555	221832	18177	4697	5066	3179	1803	4385	12728	285422
Cantàbria	11440	290942	25829	23510	7060	9448	7954	19106	1645	396934
País Vascó		8633								8633
Navarra	11263	329264	32655	14151	19322	2865	870	2215		412604
La Rioja	10533	270157	34004	4557	10291	5407	1750	2687	10039	349424
Aragó	70060	1545519	142000	36457	53492	21306	20500	32575	73835	1995742
Catalunya	158239	3788059	237445	106886	153189	66629	12115	25027	100042	4647612
Illes Balears	715	32065	1227	1228	1259	510	490	390	200	38083
Castella i Lleó	51774	1005886	45775	15676	36813	9574	5797	7389	5858	1184543
Madrid	234	7728	526	390	478	119	199	90	84	9848
Castella-la Manxa	34805	2697700	292874	95475	146876	45150	10391	10408	81147	3414826
València		17550	972	1620	1296	675	162			22275
Múrcia	6746	259561	7927	7040	4148	2877	2930	595	2626	294448
Extremadura	3583	111513	9617	3363	5595	1891	2086	1734	3205	142588
Andalusia	28724	453479	32156	14659	24416	11831	33894	26006	23241	648406
Canàries	14311	138747	15887	94076	3172	3409	3291	1027	2339	276258
Espanya	493602	12503130	979221	448333	506554	202967	115882	138304	327366	15715358

CR: Compra de reproductores, CA: Consum d'aliments, DS: Despeses sanitàries, CM_MR: Compra de mobiliari i material ramader, E: Energia, CRMI: Conservació i reparació de màquines i instal·lacions, CC: Conservació de construccions, Ass: Assegurances, AD: Altres despeses.

Comunitat Autònoma	CR	CA	E	SDIA	DS	Llits i nius	PN	CRMI	CC	Ass	Mà obra	AD	ICI	ICC	Total
Galícia	448	10618	197	618	386	84	168	107	49	21	1338	136	56	10	14236
Astúries	120	2671	52	128	157	58	55	21	47	30	108	23	26	19	3516
Cantàbria	68	1083	24	49	66	9	11	11	2	201	186	3	10	4	1727
País Valencià	14	1600	48	66	131	15	13	39	10	16	946	42	47	0	2990
Aragó	268	5604	258	491	472	81	100	93	27	196	2226	463	122	16	10418
Catalunya	752	28421	651	928	1242	335	382	665	385	442	5180	425	187	43	40038
Illes Balears		214	61		39		36	24		10	327	0			711
Castella i Lleó	540	9111	397	929	371	89	175	125	60	91	1688	92	136	26	13830
Madrid	5	9	3	82	8	0	0	0		1	26				134
Castella-la Manxa	1077	13213	459	693	836	82	133	88	91	62	2218	100	167	2	19220
València	808	14513	460	818	517	148	198	229	192	109	1628	131	70	24	19844
Múrcia	29	1110	34	18	113	5	14	7		8	20	4			1362
Extremadura	24	440	26		18	1	8	8	25	3	78	8	6	1	645
Andalusia	67	2868	108	80	188	15	36	36	42	14	1357	21	31		4860
Canàries	162	1151	60	52	145	13	59	41	14	19	224	36	21		1996
Espanya	4695	97434	2947	5030	4913	1020	1435	1527	960	1324	18607	1569	880	146	142487

CR: Compra de reproductores, CA: Consum d'aliments (pinso, fenc i aigua), E: Energia, SDIA: semen i despeses d'inseminació artificial, DS: Despeses sanitàries, PN: productes de neteja, CRMI: Conservació i reparació de màquines i instal·lacions, CC: Conservació de construccions, Ass: Assegurances, AD: Altres despeses, ICI: interessos de capital immobilitzat, ICC: interessos de capital circulat.

TAULA 1.2.5: DESPESES (MILERS D'EUROS) EN LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003 (MAPA, 2005).

TAULA 1.2.6: INFLUÈNCIA DE L'ORGANITZACIÓ EN BANDES SOBRE EL TREBALL PER FEMELLA I LA PRODUCCIÓ PER HORA TREBALLADA (ALVARINO, 1998).

<i>Sistema de producció</i>	<i>Hores / femelles i any</i>	<i>Kg / hora treball</i>
Banda única (42 dies)	4,06	28,9
Banda única (35 dies)	5,79	25,8
Banda cada 3 setmanes	5,45	22,6
Banda cada 2 setmanes	5,77	20,6
Una o dues bandes setmana	6,41	19,6
Sense bandes	-	16,7
Font	ITAVI	TENCHNA

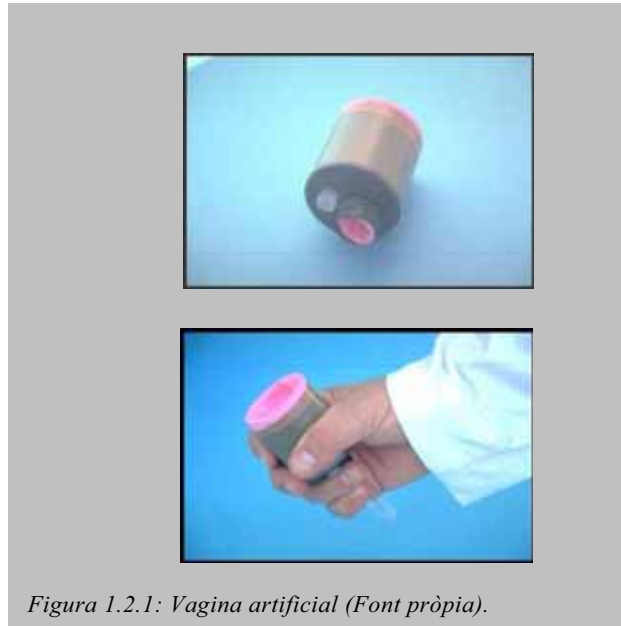
La utilització de la IA també ha possibilitat una millora de la productivitat de les explotacions, ja que ha permès reduir el temps dedicat a la reproducció, una de les tasques més complexes en la producció cunícola, i incrementar la disponibilitat de gàbies per a mares fins a un 10%, al reduir o eliminar els mascles. L'ús de mascles d'alt valor genètic per creixement i índex de conversió permet augmentar el pes dels llodrigons a l'edat de la venda i reduir el nombre de quilos de pinso de carn produïda. Vicente (2001) exposava que l'ús de semen de mascles de la línia R (velocitat de creixement promig de 51g entre 28 i 63 dies) sobre femelles creuades d'aptitud maternal va donar llodrigons amb 1.9 a 2 Kg entre els 57 i 60 dies d'edat. Això va suposar un increment entre 125 i 175 g respecte a l'ús de mascles no seleccionats. Tot i que les avantatges en l'ús de mascles seleccionats es donen tant en munta natural com en inseminació artificial, aquesta darrera s'ha convertit en una important eina de difusió genètica. En porcs, Singleton (2001) també associa l'àmplia difusió de mascles genèticament superiors i la disminució del cost per femella muntada a l'augment en l'ús de la IA.

1.2.2 Maneig del semen

1.2.2.1 Recollida del semen

L'extracció del semen en el conill es dona en la gàbia del mascle mitjançant una vagina artificial (VA) (Figura 1.2.1). La VA és un receptacle que proporciona a l'òrgan copulador els estímuls tèrmics, mecànics i d'elasticitat necessaris per a què es produeixi l'ejaculació (Alvariño, 1998). En el moment de la recollida la VA està a uns 45-50 °C. Una temperatura superior donarà lloc a ejaculats amb orina i podrà produir lesions en el penis de l'animal, mentre que amb una temperatura inferior no existirà prou estímul i el mascle no ejacularà.

En general els mascles s'adapten molt bé a la recollida amb vagina artificial i el percentatge de rebuig al seu ús és molt baix (Brun i col., 2002a, b; Theau-Clement i col., 2003).



1.2.2.2 Valoració i dilució de l'ejaculat

L'ejaculat és sotmès a una valoració macroscòpica i microscòpica. La valoració macroscòpica es realitza a partir de l'observació directa de l'ejaculat en el tub col·lector, i s'examina el volum, el color i l'aspecte. La valoració microscòpica es duu a terme mitjançant un microscopi òptic i, en la rutina dels centres d'IA, es valoren normalment la motilitat i la concentració.

Un cop valorat, el semen considerat de bona qualitat serà diluït. La dilució del semen té com a objectius fonamentals augmentar el volum seminal per poder inseminar un major nombre de femelles a partir d'un ejaculat, i proporcionar un medi favorable per a la supervivència dels espermatozous in vitro. Els diluents utilitzats es caracteritzen per tenir substàncies nutritives necessàries per al metabolisme dels espermatozous (glucosa o fructosa), contenir substàncies tampó (TRIS) per mantenir el pH final a 6.8-7, presentar una pressió osmòtica isotònica amb el semen (290-340 mOsm/Kg), antibiòtics per mantenir els espermatozous lliures de substàncies i/o organismes infecciosos i, en el cas del semen destinat a la congelació, per presentar diversos crioprotectors (Vicente, 2001). Avui dia es disposa de diversos diluents específics per a conill dividits en dos grans grups, els diluents líquids (MA24, Laboratorios Ovejero, Lleó; GALAP, IMV Technologies, Saragossa; UPV, UPV, València; KUBUS, Kubus S.A, Madrid; etc.) i els diluents sòlids (Cunigel, IMV Technologies, Saragossa; Speermy, INRASAT, Tarragona; etc.).

El rati de dilució dependrà del nombre mínim d'espermatozous necessaris en cada dosi, el qual vindrà donat pel tipus de conservació a la que es sotmeti el semen. Les dosis utilitzades per a la inseminació amb semen fresc o refrigerat oscil·len entre 4×10^6 i 30×10^6 d'espermatozous (Alvariño i col., 1996, Viudes-de-Castro i col., 1998, Castellini i Lattaioli, 1999). La variació en el nombre d'espermatozous inseminats pot explicar-se per les diferents condicions en què s'han dut a terme els treballs (semen fresc o refrigerat, femelles receptives o no receptives, femelles lactants o no lactants, etc.).

La dosi més freqüentment usada a nivell comercial la de 20×10^6 d'espermatozous o bé la dilució 1:10. El semen destinat a la congelació es dilueix normalment entre dues i deu vegades (1:2 i 1:10) (Alvariño, 1998).

1.2.2.3 Conservació de l'ejaculat

En el sector cunícola una gran part de les inseminacions fetes en granja comercial utilitzen semen fresc (fins a 12 hores després de la recollida) o semen refrigerat (24 fins a 48 hores després de la recollida a 16-18°C) resultant un percentatge de fertilitat al voltant del 60-80% i una prolificitat similar a la de la munta natural (Vicente, 2001). Molts autors han estudiat l'efecte del increment del temps de conservació (24-96 hores a 16-18°C) sobre la qualitat i capacitat fecundant del semen de conill, i han observat que a partir de les 48h de conservació es produeix una marcada disminució del percentatge d'espermatozous mòbils i un increment del percentatge d'espermatozous no viables i amb acrosomes danyats (Roca i col., 2000; Rosato *et al.*, 2006) i una disminució de la fertilitat i prolificitat (López y Alvariño, 1998; Roca i col., 2000), la qual cosa fa necessari augmentar la concentració de la dosi d'inseminació amb el temps de conservació.

El procés de congelació provoca un estrès tèrmic, un estrès osmòtic i un estrès mecànic que són els responsables d'un increment de la mortalitat dels espermatozous juntament amb canvis en les membranes, similars

als produïts durant el procés de capacitació, i d'altres danys que afecten al transport del semen pel tracte reproductiu femení (Watson, 2000). Això dóna lloc a una disminució del percentatge de fertilitat en la major part de les espècies de mamífers, la qual cosa és normalment compensada a partir de la inseminació amb un major nombre d'espermatozous o bé a partir de l'ús de semen fresc o refrigerat.

En el conill s'han desenvolupat diferents diluents i protocols de congelació. En alguns treballs s'han usat el rovell d'ou més DMSO o acetamida, com a crioprotectors, juntament amb protocols de congelació consistents en un període de 4-5 hores a 5°C més 15 minuts a -110°C abans de dipositar les mostres en nitrogen líquid (Hanada i Nagase, 1980; Chen i col., 1989). Viudes-de-Castro i Vicente (1996) han utilitzat DMSO més sacarina com a crioprotectors i un protocol de congelació més ràpid, consistent en 30 minuts a 5°C més 15 minuts a -30°C abans de deixar les mostres en nitrogen líquid. Aquests autors van observar uns resultats de fertilitat i prolificitat similars als obtinguts a partir de inseminacions amb semen fresc. Tot i aquests resultats, en general els resultats de fertilitat i prolificitat obtinguts a partir de inseminacions amb semen congelat de conill no són comparables als obtinguts amb semen fresc o refrigerat (Moce i Vicente, 2002; Moce i col., 2003; Viudes-de-Castro, 2005; Si i col., 2006). La disminució de la qualitat i capacitat fecundant dels espermatozous es produeix en el segon pas del procés de congelació, al sotmetre els espermatozous a -30°C durant 30 minuts (Moce i Vicente, 2002). A partir d'aquests resultats el mateix grup d'autors es plantegen una millora del procés de congelació, basant-se en un mètode àmpliament usat en bovins i ovins que consisteix en la col·locació de la mostra a una certa distància (4-5 cm) dels vapors de nitrogen líquid durant un temps determinat (10-20 minuts) (Arriola i Foote, 1987; Tuli i Hollitz, 1994). Moce i col. (2003) han observat uns resultats de fertilitat i prolificitat millors amb una congelació mitjançant vapor de nitrogen líquid (5 cm durant 10 minuts) respecte a l'ús d'una congelació a -30°C durant 30 minuts, tot i això els resultats aconseguits no són comparables als obtinguts amb semen fresc. Aquests resultats ha estat corroborats per Viudes-de-Castro i col. (2005). Una altra tècnica de congelació utilitzada recentment ha estat la congelació direccional que consisteix en moure el semen a una velocitat constant a través un gradient de temperatura (5 a -50°C). Aquesta tècnica a més de controlar el gradient de temperatura millora la supervivència dels espermatozous (en marrà, Gacitua i Arav, 2005) i permet treballar amb volums de semen més grans (2-10 ml respecte als 0.25-0.5 ml amb què es treballa habitualment) cosa que facilita el maneig i provoca un estrès mecànic menor (en conill, Si i col., 2006). Malgrat la millora en el maneig i la qualitat dels espermatozous sembla que els resultats de fertilitat són similars obtinguts amb tècniques de congelació convencionals (en conill, Si i col., 2006).

La descongelació del semen normalment es fa a 37-40°C durant 15-30 segons, tot i que alguns autors han observat una millor motilitat dels espermatozous descongelats quan s'ha aplicat una descongelació més ràpida (en marrà, Salamon i Maxwell, 2000). Moce i col. (2003) al treballar amb dues temperatures de descongelació van detectar que el semen descongelat a 50°C durant 10-12 segons donava millors resultat de prolificitat que el semen descongelat a 70°C.

1.3 Característiques que defineixen la producció i qualitat del semen i la seva avaluació

La producció i qualitat seminal és descrita habitualment a través d'un ampli rang de característiques.

1.3.1 Característiques de l'ejaculat

L'aspecte i el color són les primeres valoracions que es fan d'un ejaculat. La valoració és subjectiva, observant l'ejaculat dins el tub col·lector. A partir d'aquestes característiques es fa una primera tria dels ejaculats.

1.3.1.1 Aspecte

S'avalua la presència o absència de gel (molt freqüent en rosegadors i lagomorfs), la presència o absència d'orina i la presència o absència de dipòsits de carbonat càlcic (caràcter només observat en algunes línies de conill).

La presència d'orina en els ejaculats s'ha relacionat amb un maneig inadequat durant el procés d'extracció de semen, més concretament a una inapropiada temperatura de la VA. La orina, al ser un líquid hipoosmòtic en relació amb el semen, afecta negativament la viabilitat dels espermatozous per aquest motiu els ejaculats amb presència d'orina són sempre eliminats. En conill, aproximadament entre un 7-11 % dels ejaculats recollits són descartats per presentar orina (Theau-Clement i col., 2003; Brun i col., 2002b).

Els factors que provoquen la presència de dipòsits de carbonat càlcic en els ejaculats no es coneixen. No es descarta un component genètic ni tampoc un maneig inadequat durant el procés d'extracció. Donat que aquests dipòsits provenen de la bufeta de l'orina és possible pensar que la extracció del semen amb una VA massa freda o calenta provocarà la seva presència en l'ejaculat. La principal raó per a l'eliminació dels ejaculats amb dipòsits de carbonat càlcic és la dificultat que presenten per a la valoració de la motilitat i concentració. Actualment s'estan descartant un alt percentatge d'ejaculats (16 %, dades pròpies) sense conèixer si aquests dipòsits afecten negativament altres característiques de la qualitat seminal i la fertilitat, tot i que línies que presenten una alta incidència d'aquest caràcter tenen un percentatge de fertilitat amb munta natural similar a línies sense cap incidència.

1.3.1.2 Color

El color òptim de l'ejaculat de conill és el blanc nacrat, a partir de la coloració s'avalua la possible presència de pus, sang o fems en l'ejaculat. No hi ha dades publicades sobre la incidència d'eliminació dels ejaculats pel color.

1.3.1.3 Volum

S'avalua directament sobre el tub graduat de recollida, després d'eliminar el gel. El volum d'un ejaculat de conill pot oscil·lar entre 0.3 i 1 ml (Alvariño, 1998).

1.3.1.4 Concentració

La concentració és la característica més utilitzada per a conèixer la funcionalitat testicular, i el seu assaig és un pas essencial en el diagnòstic i avaluació de la fertilitat masculina.

La millora en l'eficiència d'un programa d'inseminació artificial dins la producció animal implica l'obtenció d'un elevat nombre de dosis. La concentració és la principal característica de la dosi d'inseminació i necessita d'una precisa mesura, ja que una concentració subestimada pot implicar un augment del cost de la dosi i l'emascament de problemes reproductius dels mascles, mentre que una sobreestimació donaria lloc a que s'inseminés un nombre d'espermatozous menor al recomanable (a una dilució donada) o bé que s'afegís més diluent (a una concentració donada), en aquest darrer cas podria quedar afectada la motilitat dels espermatozous (Castellini i col., 2002).

La tècnica de comptatge més freqüentment utilitzada, tant a nivell humà (Eustache i col., 2001) com a nivell animal (en porcs, Vianna i col., 2004; en braus, Evenson i col., 1993), ha estat el recompte amb hematocitòmetre. Aquest és un mètode objectiu i de baix cost, tanmateix demanda major temps d'anàlisi (aproximadament 15 minuts per mostra) degut a que es necessiten diverses mesures de cada mostra per a obtenir una bona precisió (Eustache i col., 2001; Christensen i col., 2004).

La densimetria, basada en el grau de turbidesa de l'ejaculat, i l'espectrofotometria, basada en mesures de densitat òptica, són tècniques més ràpides però que estan força afectades per la presència de cèl·lules de descamació i leucòcits o brutícia procedent del moment de la recollida. Aquestes tècniques han estat utilitzades en porcs, i en aquest sentit Vianna i col. (2004), en un estudi sobre l'eficiència de diferents tècniques de mesura de la concentració espermàtica, conclouen que, en relació la cambra de comptatge de Neubauer, la

tècnica d'espectrofotometria subestimava la concentració mentre que la tècnica de densimetria la sobreestimava.

Els sistemes CASA (computer assisted semen analysis) són ràpids, fàcils d'usar i repetibles, però tendeixen a incloure en el comptatge cèl·lules somàtiques, cèl·lules espermàtiques immadures, brutícia i gotes citoplasmàtiques. El seu ús, doncs, per a l'avaluació de la concentració ha estat molt discutit en moltes espècies, perquè en molts casos es produeix una sobreestimació de la concentració (Verstegen i col., 2002; Evenson i col., 1993).

La citometria de flux és una altra tècnica descrita per a la determinació de la concentració espermàtica. La base d'aquesta metodologia és la tinció selectiva dels caps dels espermatozous amb una tinció fluorescent del DNA, i la barreja de la mostra amb una concentració coneguda de microesferes fluorescents. A partir de la concentració de microesferes presents al tub de comptatge, del número d'espermatozous comptats i coneixent les dilucions dutes a terme es calcularà la concentració espermàtica. Aquesta és una tècnica precisa, repetible, ràpida i de fàcil maneig, però la principal avantatge és la capacitat de diferenciar entre els espermatozous i altres partícules (cèl·lules somàtiques, cèl·lules de descamació, gotes de greix, ...), les quals interfereixen en altres protocols de comptatge. La principal desavantatge és el seu elevat preu. L'ús de la citometria de flux per a la mesura de la concentració ha estat estudiada en semen boví, oví, porquí, humà, i també en el semen rates i conills (Christensen i col., 2004). Les tincions més comunament usades són el iodur de propidi (fluorescent vermell DNA específic que no és capaç de penetrar membranes intactes) i/o el SYBR-14 (fluorescent que actua com indicador de membranes intactes). En conills, Theau-Clement i col. (2005) avaluaven la correlació entre un aparell (NucleoCounter SP-100), basat en la fluorescència del iodur de propidi (IP), i la cambra de comptatge Thoma, i trobaven una correlació entre les mesures obtingudes pels dos mètodes molt alta (0.96). En braus, Christensen i col. (2004) també van estudiar la relació entre un citometre de flux (FACSCount AF) i la cambra de comptatge de Bürker-Türk, i van observar un coeficient de determinació de 0.99. En ambdós estudis conclouïen que la tinció fluorescent era una eina ràpida, simple, repetible i eficaç per a l'avaluació de la concentració seminal.

1.3.1.5 Composició bioquímica de l'ejaculat

El plasma seminal està format per una petita porció de líquid tubular i per les secrecions de les diferents glàndules accessòries. Aquest líquid és el diluent natural dels espermatozous i pot contenir factors que influeixin en la fertilitat dels mascles.

1.3.2 Característiques qualitatives dels espermatozous

1.3.2.1 Motilitat

La motilitat és essencial per al transport de l'espermatozou a través del tracte genital femení i per a la fertilització, alhora que està relacionada amb la integritat estructural de l'espermatozou.

El percentatge d'espermatozous mòbils és probablement la característica més comunament valorada en la rutina de la indústria de la inseminació artificial.

L'anàlisi de la motilitat pot fer-se de forma subjectiva o mitjançant sistemes CASA.

L'anàlisi de la motilitat de forma subjectiva és un dels més usats degut a la seva rapidesa a l'hora d'obtenir resultats, la facilitat amb que s'aprèn i al seu baix cost. El principal problema ve donat per la subjectivitat que implica l'ús d'escala arbitràries per valorar el moviment dels espermatozous i la impossibilitat de poder comparar resultats procedents de diferents estudis. Dins l'anàlisi subjectiu de la motilitat s'ha de diferenciar entre motilitat massal i motilitat individual. La primera valora el moviment ondulatori de la massa d'espermatozous i es mesura sobre semen sense diluir, la segona fa referència al percentatge d'espermatozous mòbils amb moviment progressiu i es determina sobre semen diluït.

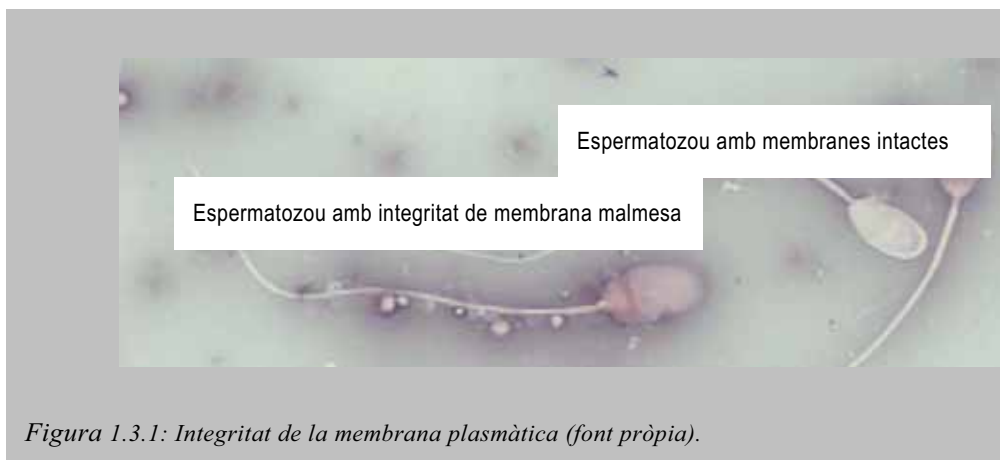
L'anàlisi del semen assistit per ordinador va ser proposat per Dott i Foster als anys 20 del segle passat (veure revisió Verstegen, 2002). Tot i l'anàlisi objectiu de la qualitat del moviment dels espermatozous que aporten aquests sistemes, el seu ús no està encara generalitzat degut al cost de l'equipament i a la necessitat d'una bona estandardització i validació de les mesures. La eficàcia i precisió d'aquests sistemes dependrà enormement de l'experiència dels usuaris, de la optimització del processat inicial del semen i de la calibració, validació i estandardització de l'equip. Verstegen (2002) mostra la diversitat d'equips que existeixen i la variació en la definició dels paràmetres inicials (setups), que són necessaris per a discriminar entre els espermatozous i altres partícules presents en els ejaculats. En conills, també s'observa una gran diversitat en la definició dels setups (Castellini i Lattaioli, 1999; Lavara i col., 2005). A partir dels sistemes CASA es poden obtenir una gran quantitat de paràmetres de motilitat, els més comunament usats són: la velocitat curvilínia (VCL), la velocitat lineal (VAP), la velocitat rectilínia (VSL), l'índex de linealitat (LIN), l'índex de rectitud (STR), amplitud del desplaçament lateral del cap (ALH) i freqüència de batuda del cap (BFC). Degut a la gran quantitat de variables que són generades per definir el moviment espermàtic es fa molt difícil la interpretació dels resultats, és per això que la majoria dels treballs es queden en una caracterització de les variables sense donar cap visió biològica d'aquestes ni de les seves relacions. Tots aquests paràmetres haurien de servir per definir el patró de

moviment espermàtic característic de cada espècie, el qual es podria usar de referència en estudis sobre l'efecte de diferents factors sobre el moviment o en la caracterització dels espermatozous hiperactivats, etc.

1.3.2.2 Integritat de la membrana plasmàtica

La integritat i la funcionalitat de la membrana plasmàtica és molt important tant pel metabolisme espermàtic com per a què es puguin produir els canvis en les seves propietats que són necessaris per a la capacitació, la reacció acrosòmica i la correcta unió de l'espermatozou a la superfície de l'òocit (Brito i col., 2003).

L'estudi de la integritat de la membrana plasmàtica pot fer-se a nivell estructural o a nivell funcional. La integritat estructural és avaluada mitjançant tincions vitals les quals mesuren la capacitat que tenen els colorants per travessar les membranes, signe de què estan morfològicament alterades (Figura 1.3.1). Aquestes tincions han estat utilitzades per analitzar el semen de moltes espècies diferents i se n'han descrit un gran nombre. La tinció amb eosina-nigrosina (Bamba, 1988) ha estat emprada durant moltes dècades i és la més freqüent en la medició de la viabilitat en microscopis de camp clar. Les tincions per a microscopis fluorescents s'han desenvolupat més recentment, la més usada és la tinció amb SYBR-14 (fluorescent que actua com indicador de membranes intactes) combinat amb IP (fluorescent vermell DNA-específic que no és capaç de penetrar membranes intactes). La citometria de flux també ha estat utilitzada per a valorar la integritat de la membrana plasmàtica. Aquests mètodes estimen el percentatge d'espermatozous viables però no poden avaluar la seva funcionalitat.



La integritat funcional és avaluada a partir del test d'endosmosi, descrit per Drevious i Eriksson (1966) en braus i estudiat més endavant en aquesta i altres espècies. Aquest test es basa en la capacitat que tenen les membranes de permetre el transport selectiu de molècules. Quan els espermatozous són exposats a condicions

hiposmòtiques l'aigua del medi tendeix a entrar en l'espermatozou per tal de restablir l'equilibri osmòtic donant lloc a un increment del volum de l'espermatozou i a què la membrana plasmàtica s'infla. La capacitat que té l'espermatozou de suportar l'estrès osmòtic és assumida com un signe de què el transport d'aigua a través de la membrana es dona amb normalitat, i per tant és un senyal d'integritat de la membrana i de normal funcionalitat (Jeyendran i col., 1984). Quan els espermatozous estan danyats o inactius l'aigua passa a través de la membrana sense que s'observi una acumulació en el citoplasma ni un enrinxolament del flagel.

Alguns treballs mostren l'existència d'una correlació significativa i positiva entre els resultats obtinguts a partir del test hiposmòtic i els obtinguts a partir de tincions vitals. En mostres fresques d'espermatozous humans Jeyendran i col. (1984) obtenien una correlació positiva i moderada (0.52) entre la tinció vital eosina-Y i el test hiposmòtic. Brito i col. (2003) en semen fresc de braus trobaven correlacions moderades entre la tinció amb eosina-nigrosina o la tinció amb SYBR-14 més IP i el test hiposmòtic (0.55 i 0.59, respectivament) i una correlació molt alta entre les dues tincions vitals (0.93); en canvi Correa i Zavos (1994) en semen congelat-descongelat de brau mostraven una correlació molt alta (0.81) entre la tinció eosina-nigrosina i el test hiposmòtic. Es podria justificar una menor correlació entre els tests en mostres fresques per la major presència en aquestes d'espermatozous amb membranes morfològicament normals però no funcionals, capaces encara prevenir l'entrada de colorant però incapaces de suportar l'estrès osmòtic. En aquest sentit Siemieniuch i col. (2005), avaluant la viabilitat d'espermatozous de porc procedents de semen fresc i congelat mitjançant una tinció SYBR-14 més IP, van detectar un 72 % d'espermatozous amb integritat estructural de membrana en semen fresc mentre que en semen congelat només van observar un 40 %.

1.3.2.3 Qualitat de l'acrosoma

L'acrosoma és una vesícula que es troba sobre el nucli de l'espermatozou en forma de caputxa.

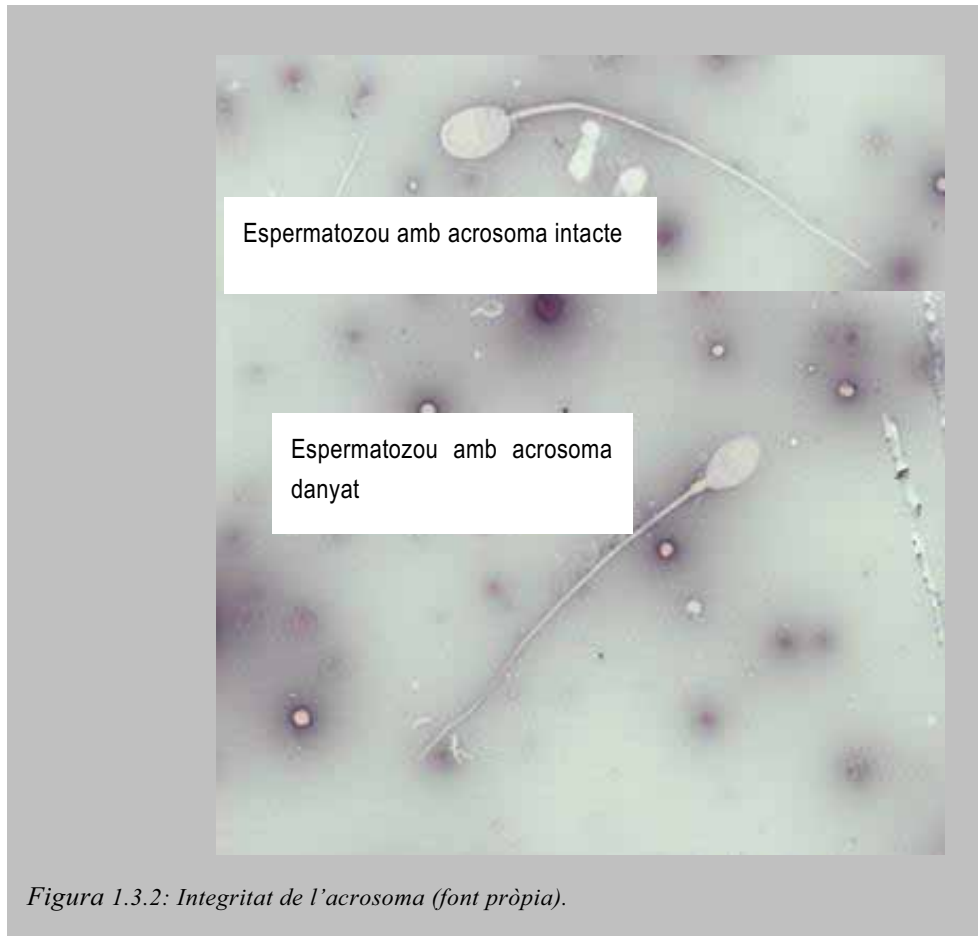
L'estudi de la qualitat de l'acrosoma es pot realitzar a partir de tècniques relacionades amb la morfologia de l'acrosoma o mitjançant tècniques que usen marcadors de membrana.

Tècniques morfològiques:

I) Microscopia electrònica: és el millor mètode per a estimar l'estat de l'acrosoma (Zeginiadou i col., 2000; Casey i col., 1993), però no s'usa rutinàriament perquè requereix un equipament molt car i personal qualificat.

II) Microscopia òptica: aquest mètode és molt usat degut a la seva simplicitat i baix cost, alhora presenta una bona correlació amb la microscopia electrònica. L'estat de l'acrosoma és determinat mitjançant mi-

croscopi de camp clar i tincions específiques dels acrosomes dels espermatozous (triple tinció blau de tripà més marró de Bismarck més rosa de Bengala, la tinció amb plata, la tinció amb eosina-nigrosina) (Figura 1.3.2). En espècies amb acrosomes grans també es pot usar una fixació amb glutaraldheid al 0.2% i microscopi amb contrast de fase.



Tècniques de marcadors de membrana:

l) Lectines marcades amb fluorescent: les lectines són glicoproteïnes que s'uneixen específicament a l'acrosoma. Amb aquesta tècnica són fàcilment distingibles els caps espermàtics amb acrosoma reaccionat dels caps amb acrosomes no reaccionats. Les lectines més comunament usades han estat *Pisum sativum* aglutinina (Cross i col., 1986), que s'uneix als continguts acrosomals quan l'espermatozou encara no ha dut a terme la reacció acrosòmica, i cacauet aglutinina (Mortimer i col., 1987), que s'uneix a la membrana acrosomal externa.

II) Anticossos: l'estat de l'acrosoma també pot mesurar-se a partir de l'ús d'anticossos específics de components de l'acrosoma (Wolf i col., 1985). La principal desavantatge és que el treball amb anticossos és molt laboriós.

III) Clortetraciclina (veure revisió Zeginiadou i col., 2000): la tècnica es basa en l'autofluorescència d'aquest compost i en la seva capacitat per unir-se a les membranes. El principal problema que presenta és la inestabilitat de la fluorescència més enllà de les primeres hores.

1.3.2.4 Anomalies morfològiques

Barth i Oko (1989, citat per Bonet i col., 2000), en semen de vaquí, i Bonet i col. (2000), en semen de porquí, fan esment a dos tipus de classificació: anomalies en funció de la morfologia externa i anomalies en funció del lloc on s'han originat. Les primeres es divideixen en cefàliques o de la cua, i poden presentar-se en tres modalitats segons la forma o trajectòria, la grandària o el nombre. Les segones es divideixen en primàries, originades en el testicle al llarg de l'espermatogènesi o de l'espermioogènesi, i en secundàries, que són aquelles desenvolupades a l'epidídim al llarg del procés de maduració espermàtica. En general les malformacions cefàliques i les malformacions de mida i de nombre de la cua solen tenir un origen primari, mentre que les malformacions de trajectòria de la cua presenten un origen secundari. Barth i Oko (1989, citat per Bonet i col., 2000) i Bonet i col. (2000) estan en desacord quant a la classificació dels espermatozous amb presència de gotes citoplasmàtiques, els primers consideren les gotes com a anomalies de la cua mentre que per als segons són un senyal d'immaduresa i no una morfoanomia.

En conills, Kuzminsky i col. (1996) dividien els espermatozous en quatre categories: normals, amb anormalitats de cap, amb anormalitats de cua i espermatozous trencats. Aquesta classificació, ja usada per altres autors (Radnai i col., 1988; Boussit, 1989), fou adoptada de la classificació desenvolupada per a braus i porcs. Perez-Sanchez i col. (1996), també en conills, classificaven les morfoanomalies en funció del lloc de l'espermatozou que es veia afectada: defecte de cap, defecte de part intermèdia, defecte de cua i múltiples defectes (espermatozous amb més d'un defecte).

En homes, Ombelet i col. (1995) fan una revisió sobre la morfologia espermàtica i la seva relació amb la fertilitat. En aquesta revisió queda patent que hi ha un gran acord entre els autors referent a la relació entre les anomalies espermàtiques i la subfertilitat masculina, però no existeix consens respecte a la definició d'un espermatozou anormal. En humana el primer criteri de classificació per a la morfologia espermàtica va ser establert per MacLeod and Gold (1951, citat per Ombelet i col., 1995), als anys 80 l'organització Mundial de la Salut va publicar una guia sobre l'anàlisi de semen i cap a finals dels 80 sorgeixen dos criteris de classificació més estrictes anomenats criteri de Düsseldorf i criteri estricte de Tygerberg (veure Taula 1.3.1).

TAULA 1.3.1: DESCRIPCIÓ DE LA MORFOLOGIA ESPERMÀTICA PER ELIASSON (1971), L'ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (OMS, 1980-1987), CRITERI ERICTE DE TIGERBERG (KRUGER, 1986; MENKVELD, 1990) I OMS (1992). OMBELET ET AL. (1995).

	<i>Eliasson (1971)</i>	<i>OMS (1980-1987)</i>	<i>Kruger (1986) Menk- veld (1990)</i>	<i>OMS (1992)</i>
Cap				
Forma	Regular, oval	Regular, oval	Pla, oval	Oval
Acrosoma	No definit	>1/3 de la longitud	40-70 % del cap	40-70 % del cap
L	3-5 µm	3-5 µm	3-5 µm	4-5.5 µm
A	2-3 µm	2-3 µm	2-3 µm	2.5-3.5 µm
a : l ràtio	No definit	0.5-0.67	0.60-0.67	0.57-0.67
Formes borderline	Normal	Normal	Anormal	normal
Part intermèdia	l = 5-7 µm a = 1 µm	l = 7-8 µm <1/3 amplada del cap. Regular i recta	l=1.5x longitud del cap a ≤ 1 µm	Regular, inserida a 90° de l'eix longitudinal del cap
Gotes citoplasmàtiques	< 1/2 mida del cap	No definit	< 1/2 mida del cap	< 1/3 mida del cap
Cua	No definit	l ≥ 45 µm	l = 45 µm	no trencada
Valor de tall per la nor- malitat	> 40 %	> 50 %	> 14 %	> 30 %

l: longitud, a: amplada

La valoració del percentatge de formes anormals pot fer-se de forma visual o a partir de sistemes basats en l'anàlisi d'imatges.

Per a avaluar de forma visual els espermatozous anormals s'utilitzen tincions (eosina-nigrosina, per exemple) que són observades sota microscopi de camp clar (Figura 1.3.3), o bé les mostres són fixades en glutaraldehid i observades sota microscopi amb contrast de fase.

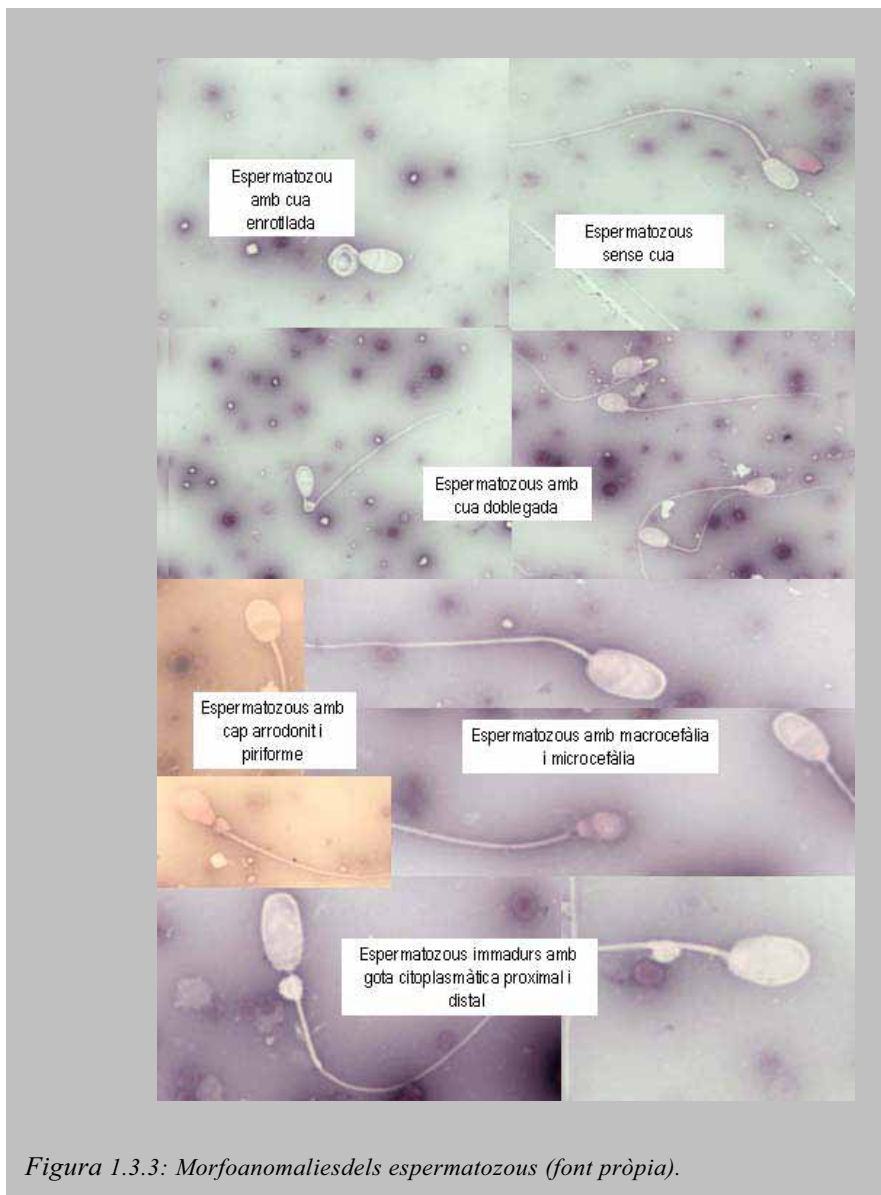


Figura 1.3.3: Morfoanomalies dels espermatozous (font pròpia).

Existeixen un gran nombre de factors (maneig de la mostra, tinció, experiència dels tècnics, diferències en la interpretació, ...) que poden afectar l'assaig de la morfologia donant lloc a una àmplia variació de resultats i dificultant la interpretació acurada de les dades. En aquest sentit, Zaini i col. (1985) van establir que aquesta variació podia presentar un rang de 40-60 %, demostrant una baixa repetibilitat del mètode visual i establint la necessitat de tècniques objectives, precises i repetibles.

Als anys 90 la introducció de sistemes d'anàlisi de morfometria espermàtica (ASMA) donava la solució al problema de subjectivitat dels mètodes visuals. El sistema consisteix en un microscopi, una càmera de vídeo, un ordinador i un software de morfologia. Els software presenta un seguit d'especificacions sobre la grandària (longitud, amplada, àrea i perímetre) i la forma del cap (el·lipticitat, rugositat, elongació, regularitat), i sobre mesures en la peça intermèdia (amplada, àrea, distància entre l'eix major del cap i la peça intermèdia, ...) que permeten el reconeixement dels espermatozous. La precisió dels sistemes ASMA, a l'igual que els sistemes CASA, ve donada per la correcta estandardització de les variables analítiques (espècie-específiques), la qual

depèn d'una preparació adequada de la mostra (rentat, fixació, tinció) i d'un correcte anàlisi d'imatge. Així doncs, Hidalgo i col. (2005) van estudiar sobre semen de cavall l'efecte de tres procediments de tinció sobre la precisió del sistema d'anàlisi i l'efecte del nombre d'espermatozous analitzat per a obtenir un assaig representatiu, i van concloure que per a obtenir una objectiva i precisa mesura sobre la morfometria era recomanable analitzar 100 espermatozous tenyits amb Harris' Haematoxylin. En conill, Gravance i Davis (1995) van estudiar la bondat de dos tipus de preparació del semen i de dues tincions en relació a l'optimització de l'ús del sistema ASMA, i van observar que la preparació de la mostra influïa sobre els errors en el reconeixement dels espermatozous i que en funció de la tinció usada es produïen diferents errors en la digitalització de les mostres.

Els sistemes ASMA no permeten estudiar les anomalies de la cua, per tant no permeten detectar anomalies d'origen secundari, que com ja s'ha dit estan relacionades a problemes en la maduració dels espermatozous durant el seu trànsit per l'epidídim. Per tant, en espècies on el tipus més freqüent d'anormalitat és el de cua, i dins aquest el de trajectòria de la cua (conill, Kuzmiski i col., 1996) aquests sistemes podrien no ser del tot útils.

Dels paràgrafs anteriors es dedueix que hi ha un gran interès per tal d'establir una correcta estandardització del processat i anàlisi de les mostres alhora que cal un consens en l'ús del sistema de classificació de les morfoanomalies, sense el qual es fa difícil la comparació dels resultats obtinguts en diferents estudis.

1.3.3 Altres tests per a avaluar la qualitat seminal

En els darrers anys nous mètodes basats en la funció espermàtica (capacitació i reacció acrosòmica, funcionalitat de les mitocondries, integritat de la cromatina, capacitat d'unió dels espermatozous a la zona pel·lúcida, etc.) s'han usat per determinar la capacitat fecundant dels espermatozous. La necessitat d'un nivell tècnic alt i materials que no estan a l'abast de tothom (oòcits, per exemple) fan que es limiti el seu ús a propòsits de recerca. La taula 1.3.2 resumeix la informació que actualment hi ha sobre alguns dels nous indicadors moleculars de la qualitat seminal.

TAULA 1.3.2: RESUM D'ALGUNES MOLÈCULES PROPOSADES COM A MARCADORS DE LA FERTILITAT DELS ESPERMATOZOUS. MOLTES DE LES FUNCIONS LLISTADES SÓN, EN AQUESTS MOMENTS, NOMÉS ESPECULATIVES. BRAUNDMEIER AND MILLER (2001).

Molècula	Localització	Funció proposada	Autors
Osteopontin, prostaglandin D sintasa	Plasma seminal	Desconeguda en fertilitat	Cancel i col. (1997, 1999); Gerena i col. (1998)
Proteïnes d'unió a heparina	Glàndules accessòries i espermatozous	Millora l'afinitat per l'heparina i la capacita-ció	Bellin i col. (1994)
Antigen (FAA) i altres	Glàndules accessòries i espermatozous	Una proteïna d'unió a heparina, incrementa l'afinitat per l'heparina i millora la capacita-ció	McCauley i col. (1999, 2001); Sprott I col. (2000)
Clusterina	Testicles i fluid epididimari	Espermatogènesi i/o maduració epididimal defectuosa	Fouchecourt I col. (2000); Ibrahim i col. (2000)
Proteïnes xoc per calor (Hsp2A)	Membrana de la cua de l'espermatozou	Immaduresa espermàtica	Huszar i col. (1997); Rolf i col. (1997)
Acrosina	Dins l'acrosoma	Acrosomes intactes	Francavilla i col. (1994); Shimizu i col. (1997)
Anticossos espermàtics	Cap de l'espermatozou	El complex antigen-anticos bloqueja la unió espermatozou-oòcit	Naz (1987); Kim i col. (1999)
Espècies reactives d'oxigen	Membrana de l'espermatozou	Danys sobre la membrana de l'espermatozou	Aitken i col. (1991)
ATP	Espermatozou	Millora la motilitat espermàtica	Irvine i Aitken (1985); Tardif i col. (1999)

1.4 Fertilitat i la seva relació amb els caràcters que defineixen la qualitat seminal

1.4.1 Avaluació de la fertilitat

La importància de les variables que defineixen la qualitat seminal s'ha d'establir a partir de les seves relacions amb la fertilitat (Braundmeier i Miller, 2001). El desenvolupament dels diferents tests usats per avaluar la producció i qualitat seminal dels ejaculats ha tingut com a objectiu principal trobar una prova o un conjunt de proves que permetin estimar la seva capacitat fecundant, la qual pot ser avaluada a partir de proves *in vivo* o proves *in vitro*.

1.4.1.1 Proves *in vivo*

La millor forma de conèixer la capacitat fecundant dels ejaculats és mitjançant la realització de proves *in vivo*, les quals mesuren el nombre de parts que han resultat de la inseminació d'un nombre suficient de femelles per ejaculat (Foote, 1988 citat per Gadea, 2001). La variabilitat de la fertilitat deguda a la femella és elevada, això implica l'ús d'una població uniforme i d'un nombre important de femelles, per a poder obtenir estimes més precises, i d'altra banda dóna lloc a que el període d'estudi sigui molt llarg. Ambdues coses unides al baix percentatge de parts que s'obtenen quan s'insemina amb dosis a baixa concentració suposen un elevat cost econòmic. Per confirmar la gestació de les femelles s'usen la palpació, l'estudi ecogràfic o el resultat de la data de part.

1.4.1.2 Proves *in vitro*

1.4.1.2.1 TESTS HETERÒLEGS DE FECUNDACIÓ IN VITRO

Aquests tests valoren la capacitat de penetració que tenen els espermatozous en oòcits lliures de zona pel·lúcida. Normalment s'usen oòcits de hámster daurat (*Mesocricetus auratus*), degut a que la seva membrana plasmàtica no presenta especificitat d'espècie (Yanagimachi, 1972) i, per tant, permet la penetració d'espermatozous de diverses espècies (conill, Hanada i Chang, 1978). El procediment consisteix en un cultiu d'aquests oòcits i d'espermatozous, que han estat prèviament capacitats i als que se'ls ha induït la reacció acrosòmica. Seguidament es fixen els oòcits i es compta el nombre de caps d'espermatozous descondensats que hi ha dins els oòcits.

Aquest test permet estudiar la inducció de la capacitació espermàtica, la reacció acrosòmica, la unió a la membrana plasmàtica de l'oòcit i la descondensació del cap de l'espermatozou dins l'oòcit, però obvia la capacitat dels espermatozous de travessar i sobreviure en el tracte genital femení, de penetrar les cèl·lules del cúmul i de travessar la zona pel·lúcida. Malgrat aquestes limitacions, s'han trobat correlacions positives i altes entre aquest test i la fertilitat del semen *in vivo* en diverses espècies. En porcs, Berger i Parker (1989) mostren una correlació elevada (0.89) entre el nombre d'oòcits penetrats i la fertilitat *in vivo*.

1.4.1.2.2 TESTS HOMÒLEGS DE FECUNDACIÓ IN VITRO

Aquests tests usen oòcits i espermatozous pertanyents a la mateixa espècie, la qual cosa permet analitzar totes les fases del procés de fecundació. La capacitat d'unió dels espermatozous a la zona pel·lúcida depèn en gran mesura de la qualitat i estat de maduració dels oòcits, això pot explicar el gran desacord que s'observa entre diferents autors (en braus, Truelson i col., 1996 i Zhang i col., 1997) respecte la correlació existent entre aquest test i la fertilitat *in vivo*, ja que les característiques dels oòcits utilitzats en cada treball poden ser força diferents (oòcits madurats *in vivo* i obtinguts per laparotomia, oòcits madurats *in vitro*, oòcits immadurs, ...).

1.4.2 Relació de la fertilitat amb les variables de qualitat seminal

Tot i el gran nombre d'estudis fets respecte la importància que tenen les característiques que defineixen la qualitat seminal sobre la fertilitat, aquesta relació encara no és ben coneguda. La informació que es té disponible és poca i normalment prové d'experiments amb un disseny experimental diferent respecte a factors genètics i ambientals, els quals poden afectar la fertilitat i prolificitat i que s'han de tenir presents per poder comparar resultats i treure conclusions reals.

La manca de coneixement de les relacions existents entre les variables que defineixen la qualitat seminal pot també dificultar l'anàlisi de les dades i la interpretació dels resultats, ja que l'estudi de les relacions entre les variables de qualitat seminal i la fertilitat es realitza a partir d'un anàlisi de regressió múltiple on és necessari que les variables incloses en el model no estiguin molt correlacionades per evitar problemes de col·linealitat. Dos aspectes més a tenir presents són la preselecció dels ejaculats, normalment per motilitat, i la concentració de les dosis. En moltes ocasions la concentració d'espermatozous utilitzada per a realitzar aquest tipus d'estudi és troba per sobre de la concentració mínima requerida, per la qual cosa els resultats poden quedar emmascarats en aquells casos on les deficiències en qualitat seminal que presentin els animals siguin compensades per una elevada concentració. Els caràcters que són importants per la fertilitat poden dividir-se en dos grans grups, aquells que són compensables i aquells que són no compensables. Els caràcters compensables són aquells que no afecten la fertilitat si el nombre d'espermatozous utilitzats en la inseminació és alt. Els

caràcters no compensables són aquells que no poden ser corregits amb un increment del nombre d'espermatozous inseminats (Braundmeier i Miller, 2001).

A continuació es resumeix la informació disponible en la literatura sobre la relació d'algunes variables de producció i qualitat seminal i la fertilitat en espècies ramaderes.

1.4.2.1 Concentració

En conills, molts autors han estudiat la relació entre la concentració i la fertilitat amb l'objectiu de determinar el nombre mínim d'espermatozous que han de ser inseminats mantenint una bona fertilitat (Farrell i col., 1993; Alvariño i col., 1996; Pizzi i col., 1996; Viudes-de-Castro i Vicente, 1997; etc.) Alvariño i col. (1996) observaven que amb 20×10^6 espermatozous per dosi el percentatge de fertilitat disminuïa un 12 % respecte a l'obtingut a partir de 60×10^6 espermatozous per dosi quan la inseminació es feia amb semen refrigerat 24 hores després de la recollida; Pizzi i col. (1996), quan inseminaven femelles receptives, consideraven que 7.5×10^6 espermatozous per dosi eren suficients per arribar a un alt nivell de fertilitat; Viudes-de-Castro i Vicente (1997) conclouien que la reducció de 16×10^6 a 4×10^6 espermatozous per dosi no afectava la fertilitat quan la inseminació es feia 2-4 hores després de la recollida del semen en femelles múltiples lactants receptives; Castellini i Lattaioli (1999) quan inseminaven amb semen fresc 4 hores després de la recollida observaven que el nombre d'espermatozous mínim per a obtenir una bona fertilitat diferia entre femelles receptives i no receptives (8×10^6 espermatozous *versus* $11-13 \times 10^6$ espermatozous). Farrell i col. (1993) suggerien que el nombre mínim d'espermatozous necessaris per a una fertilitat normal era de 0.05×10^6 .

La diversitat de resultats observats respecte la concentració mínima necessària per a obtenir una bona fertilitat podria explicar-se per les diferents condicions en què s'han dut a terme els treballs (semen fresc o refrigerat, femelles receptives o no receptives, femelles lactants o no lactants, etc.). Alvariño (2000) també apunta la possibilitat que la concentració mínima necessària per a una bona fertilitat sigui diferent en funció de la línia estudiada, i en aquest sentit seria recomanable un estudi específic per a cadascuna de les línies de conill utilitzades en inseminació artificial.

1.4.2.2 Motilitat

Comunament s'ha considerat la motilitat com una de les característiques més importants per a avaluar la capacitat fecundant dels ejaculats. Tanmateix, per si sola, no sempre és un predictor eficaç de la fertilitat (Braundmeier i Miller, 2001).

En braus Farrell i col. (1998), al realitzar un anàlisi de regressió múltiple per a estudiar la relació entre la fertilitat i els paràmetres de motilitat mesurats a partir de CASA, observaven que els paràmetres de motilitat explicaven una gran part de la variació total de la fertilitat ($R^2 = 0.97-0.98$) quan en l'anàlisi de regressió entraven 5 paràmetres de motilitat. En el mateix sentit, Wood i col. (1986) troben que la combinació motilitat individual (mesurada de forma subjectiva en semen fresc diluït), motilitat massal (mesurada de forma subjectiva en semen congelat-descongelat sense diluir), percentatge de cues enrotllades i presència de gotes proximals proporcionaven la millor predicció de la fertilitat. Christensen i col. (2005), en vaquí de llet, trobaven una correlació moderada i positiva entre la fertilitat i la motilitat individual subjectiva en semen fresc i congelat (0.48 i 0.55, respectivament).

En porcs Gadea i col. (2004) estudiaven la relació entre paràmetres de qualitat seminal i fertilitat en condicions comercials i observaven una correlació entre el percentatge d'espermatozous mòbils, mesurats de forma subjectiva, i la presència de gotes citoplasmàtiques proximals amb la fertilitat. El model, però, explicava una petita part del percentatge de variació total de la fertilitat, degut probablement a la preselecció feta en els ejaculats per motilitat. Tardif i col. (1998) també demostraven que el percentatge d'espermatozous mòbils, mesurats subjectivament, estaven correlacionats amb la fertilitat quan el nombre d'espermatozous usats per a la inseminació era subòptim. Aquesta observació fa veure la importància de l'ús apropiat del nombre d'espermatozous quan es vol correlacionar la fertilitat amb característiques compensables del mascle.

En conills Farrell i col. (1993) obtenien una correlació moderada (0.39) entre el percentatge de espermatozous amb motilitat progressiva i el percentatge d'òocits fertilitzats quan s'inseminaven femelles superovulades, i observaven que la correlació incrementava (0.53) quan s'afegien al model VCL, VAP, VSL, LIN, ALH i BCF; mentre que Hagen i col. (2002) no trobaven relació entre la velocitat ($\mu\text{m/s}$) i la fertilitat. En aquests dos estudis, però, es va treballar amb un nombre molt petit de mascles (4 i 2 respectivament) i de femelles (48 i 80 respectivament). Brun i col. (2002a), en un estudi amb semen de 54 mascles, preseleccionat per motilitat, i 839 inseminacions trobaven que la motilitat massal, avaluada de manera subjectiva, era la variable que major influència tenia sobre el percentatge de fertilitat. Lavara i col. (2005), també amb semen preseleccionat per motilitat, mostraven una correlació moderada entre el percentatge de fertilitat i el percentatge d'espermatozous mòbils (0.31), l'índex de linearitat (-0.32).

Hi ha força treballs on s'estableixen les correlacions existents entre les variables clàssiques de qualitat seminal (volum, concentració, motilitat valorada de forma subjectiva), mentre que les correlacions existents entre els 21 paràmetres de motilitat mesurats amb sistemes CASA han estat poc estudiades (en cavalls i en porcs Quintero i col., 2003 i 2004, respectivament; en conills Lavara i col., 2005). Conèixer les relacions entre les variables de qualitat seminal ha de ser un pas previ als estudis que avaluen la relació d'aquestes variables

amb la fertilitat. Aquest coneixement s'ha de tenir present en els dissenys experimentals on s'hagi de realitzar una preselecció dels ejaculats (normalment sota condicions de granja comercial els ejaculats són preseleccionats per motilitat i concentració) ja que podria donar-se un biaix en les demés característiques del semen. També és necessari a fi d'evitar problemes de col·linealitat en el moment d'establir els models de regressió múltiple que es fan servir per analitzar la relació entre la fertilitat i les característiques seminals. Malgrat això, pocs dels treballs esmentats han tingut en compte les correlacions existents entre les variables de qualitat seminal.

1.4.2.3 Integritat de la membrana plasmàtica

Molts autors han estudiat la relació existent entre la integritat de la membrana i la fertilitat, obtenint resultats contradictoris i/o no comparables degut al diferent tractament de les mostres i avaluació de la fertilitat. Neild i col. (2000), en cavalls, concloïen que mascles amb una baixa resposta al test hipoosmòtic (< 40 %) eren de dubtosa fertilitat. En semen de porc preseleccionat per anomalies (< 20 % d'espermatozous anormals per ejaculat) Perez-Llano i col. (2001) obtenien una correlació positiva i moderada (0.43) entre un test hipoosmòtic lleugerament modificat (temps d'incubació 5 minuts *versus* 120 minuts) i la fertilitat. En semen fresc de braus Brito i col. (2003) identificaven el test hipoosmòtic com a un predictor del potencial de fertilització del semen *in vitro*. En semen congelat de braus Correa i col. (1997) detectava una correlació positiva i moderada (0.57) entre la fertilitat i la resposta al test hipoosmòtic, mentre que Rota i col. (2000) no observaven correlació quan la fertilitat era estimada *in vitro*. Les alteracions en la morfologia espermàtica que indueix el test hipoosmòtic es poden observar de manera particularment important en el flagel mentre que no és comú notar un increment del volum del cap dels espermatozous (Jeyendran i col., 1984). Per tant, tot i les correlacions positives entre el test hipoosmòtic i la fertilitat, podria donar-se el cas que els canvis observats sobre el flagel dels espermatozous no indiquessin una normal funcionalitat de la membrana del cap.

Quant a la relació entre la integritat estructural de la membrana i la fertilitat, Alm i col. (2001) en semen congelat de brau mostraven una correlació molt baixa (0.05) quan la viabilitat era mesurada a partir d'una tinció vital i microscopi de fluorescència. I Christensen i col. (2005) en semen fresc i en semen congelat de vaquí de llet observaven una correlació positiva i moderada (0.32 i .041, respectivament) quan la viabilitat era mesurada mitjançant citometria de flux.

1.4.2.4 Qualitat de l'acrosoma

La fertilització en mamífers requereix de l'entrada de l'espermatozou en l'oòcit, el qual està envoltat d'una estructura complexa anomenada zona pel·lúcida, que l'espermatozou haurà de travessar abans de fusionar-se

amb la membrana plasmàtica de l'oòcit. Aquest procés requereix de la reacció acrosòmica, a partir de la qual es produeixi l'alliberament dels enzims que són necessaris per travessar la zona pel·lúcida.

La importància de la normalitat de l'acrosoma sobre la fertilitat ha estat estudiada per diferents autors. En cavalls, Pesch i col. (2006) van trobar que animals fèrtils presentaven un menor percentatge d'acrosomes danyats, mesurat en semen fresc i a partir de microscòpia electrònica, (6.1 %, 7.6% i 21.4 % d'acrosomes danyats en animals fèrtils, subfèrtils i infèrtils, respectivament). Giritharan i col. (2005), en braus, van detectar que el percentatge d'espermatozous units a zona pel·lúcida presentava una correlació negativa (-0.27) amb percentatge d'acrosomes reaccionats espontàniament i una correlació positiva (0.31) amb el percentatge d'acrosomes reaccionats de manera induïda, quan sotmetien els espermatozous descongelats a 0 i 4 hores d'incubació en un medi de capacitació. En conills, Courtens i col. (1994) observaven una correlació negativa i significativa (-0.55) entre el percentatge d'acrosomes anormals, mesurat en semen fresc i mitjançant microscòpia electrònica, i el percentatge de fertilitat.

1.4.2.5 Anomalies morfològiques

La presència d'un percentatge elevat d'anomalies morfològiques en els ejaculats pot produir una disminució de la fertilitat del mascle. En humans les anomalies morfològiques són un important indicador de la disminució de la fertilitat; segons Keel i Schaule (2000) és el test laboratorial més important en l'avaluació de la fertilitat masculina humana. En el mateix sentit Ombelet i col. (1995) i Kruger i Coetzee (1999) coincideixen en que la morfologia espermàtica és la variable més properament relacionada amb la fertilitat. Thundathil i col. (1999), en braus, observaven que espermatozous amb caps piriformes presentaven problemes d'unió a l'oòcit i que el percentatge d'oòcits fecundats era menor que quan s'utilitzaven ejaculats normals, i Correa i col. (1997) obtenien una correlació positiva (0.59) entre el percentatge d'espermatozous normals mesurat en semen congelat i la fertilitat. Gadea i col. (2004), en porcs, observaven que la presència de gotes citoplasmàtiques proximals estaven significativament correlacionades amb el percentatge de fertilitat. I en conills, Lavara i col. (2005) també detectaren una correlació entre la fertilitat i el percentatge d'espermatozous anormals (-0.32).

1.4.2.6 Característiques relacionades amb la composició bioquímica de l'ejaculat

El plasma seminal és una barreja de secrecions procedents dels testicles, epidídim i glàndules accessòries que serveix com a medi de transport per als espermatozous ejaculats (Assumpção i col., 2005). Malgrat Holtz i Smidt (1976) consideressin aquestes secrecions com accessòries, degut a què els espermatozous de l'epidídim caudal ja tenen capacitat fecundant, experiments recents relacionen diversos factors del plasma seminal amb la qualitat seminal i amb la fertilitat en diferents espècies animals. Hennault i Killian (1996), en

braus, mostraven que els espermatozous incubats en plasma seminal procedent de mascles amb alta fertilitat milloraven el rati de penetració d'òcits homòlegs i lliures de zona pel·lúcida, mentre que si els espermatozous eren incubats amb plasma de braus de baixa fertilitat els resultats del test empitjoraven. Graham i col. (1994), en marrans i braus, també suggereixen que el plasma seminal conté factors importants per al manteniment dels espermatozous i per la motilitat. En conills, Castellini i col. (2002) observaven una reactivació d'espermatozous immòbils en presència de plasma seminal i una baixada de la motilitat en mostres altament diluïdes.

A un nivell més concret Minelli i col. (en conill, 2001) i Eriksson i col. (en porc, 2005) han detectat canvis en la motilitat, viabilitat i integritat acrosòmica dels espermatozous quan eren incubats amb proteïnes purificades del plasma seminal. Quant a la relació entre les proteïnes del plasma seminal i la fertilitat, Killian i col. (1993) van detectar un predomini de dues proteïnes (26 kDa pl 6.2 i 55 kDa pl 4.5) en el plasma seminal de braus caracteritzats per tenir una elevada fertilitat, la prevalença de dues proteïnes (16 kDa pl 6.7 i 16 kDa pl 4.1) en el plasma seminal de braus de baixa fertilitat, i una alta correlació (0.89) entre la presència d'aquestes proteïnes i la fertilitat; mentre que Assumpção i col. (2005) no van trobar una correlació significativa entre el contingut proteic del plasma seminal i la fertilitat. Brandon i col. (1999) observaven que en el plasma seminal de cavalls amb alta fertilitat predominava una proteïna (72 kDa pl 5.6) mentre que el plasma seminal de cavalls amb baixa fertilitat era més ric en tres proteïnes diferents (75 kDa pl 6.0, 18 kDa pl 4.2 i 16 kDa pl 6.5), i Macpherson i col. (2002) observaven que els mascles amb majors nivells de IGF-I en el plasma seminal presentaven un major percentatge de femelles prenyades. Experiments *in vitro* i *in vivo* han demostrat que la incubació d'espermatozous de mamífers amb determinats pèptids sintètics incrementa la fertilitat (Ammann i col., 1999).

1.5 Millora de la fertilitat i l'eficàcia dels mascles d'inseminació artificial

El valor d'un animal de granja està en funció de la seva capacitat reproductiva, ja que la rendibilitat de les granges comercials depèn del seu èxit reproductiu. Una baixa fertilitat suposa una pèrdua econòmica important. Boichard (1988) estimava que una diferència del 20 % en la tasa de concepció induïa a una diferència de renda del 10 % en vaquí de llet; en conills (Ramon, comunicació personal) valorava el benefici industrial per femella i any en 66.21 euros i la pèrdua d'un punt en la fertilitat en 0.89 euros per femella, per tant una diferència del 10% en la tasa de fertilitat suposa una diferència en el benefici industrial per femella i any del 13.5%.

Encara que la major part dels caràcters reproductius són normalment atribuïts a la femella (fertilitat, mida de la llograda), resulten de la combinació de caràcters que s'expressen en la femella, en el mascle i en l'embrió. El mascle juga un paper molt important en l'èxit reproductiu d'una explotació, ja que pot condicionar el rendiment reproductiu de entre 10 a 100 femelles (munta natural o inseminació artificial, respectivament). L'efecte del mascle sobre la fertilitat està molt documentat en bovins (on hi ha un gran nombre de dades); Humblot i col. (1991) observaven diferències importants en la fertilitat entre races i entre mascles dins de raça quan es realitzava IA. En conills, Vicente i col. (2000) i Brun i col. (2002a) trobaven diferències en fertilitat i prolificitat entre línies seleccionades per velocitat de creixement i línies seleccionades per caràcters reproductius, quan s'aplicava inseminació artificial amb o sense restricció de la concentració.

El guany en eficàcia dels mascles d'IA pot plantejar-se a partir de la millora en el maneig dels mascles i/o a través de l'aprofitament de la variabilitat que presenten els caràcters, entre línies i dins de línia, mitjançant l'ús dels creuaments i/o de la selecció.

1.5.1 Maneig

La fertilitat i la producció i qualitat seminal depenen d'un gran ventall de factors ambientals, de maneig i genètics (Alvariño, 2000). L'edat, la preparació sexual, la intensitat del ritme d'extracció i l'alimentació són alguns dels paràmetres a tenir presents en el maneig dels mascles.

Així doncs, Flowers (1997) indica que, en porcs, la sobrenutrició i l'estrès per calor pot inhibir l'espermatozeugònesi i disminuir la libido, i que la interacció social entre mascles durant la pubertat semblava ser un important factor negatiu.

En conill, Rebollar i col. (1998) observaven que l'aplicació en mascles joves de HCG (50 UI) o GnRH (20 mg) durant dos mesos incrementava el volum de l'ejaculat i les dosis útils un 36% i un 76%, respectivament.

L'efecte del ritme d'extracció sobre la producció i qualitat seminal ha estat àmpliament estudiat en conill (López i col., 1996; Arriota i col., 2000; Mocé i col., 2000; Nizza i col., 2002). Tot i les diferents freqüències d'extracció usades els resultats mostren una disminució en el nombre d'ejaculats obtinguts, d'ejaculats útils i de la concentració d'espermatozous a mesura que s'incrementa el ritme d'extracció. En aquest sentit, López i col. (1996) van trobar un millor rendiment en el volum i la concentració de l'ejaculat quan la recollida del semen es fraccionava en dos dies consecutius (2+2) respecte quan es recollien 4 ejaculats per mascle el mateix dia.

El ritme d'extracció més freqüentment usat en conill és el semiintensiu: dues extraccions successives en dos dies de la setmana. En animals joves el període d'entrenament a la vagina artificial s'usa per a adaptar el ritme d'extracció a cada animal, un ritme d'extracció inadequat podria donar lloc a una pitjor qualitat seminal durant les primeres extraccions (Picard-Hagen i col., 2002), les quals són utilitzades moltes vegades per determinar l'estada dels mascles en els centres d'inseminació.

1.5.2 Creuaments

El creuament no és un mètode de selecció, el seu objectiu és aprofitar la variabilitat existent entre races o línies per a augmentar la productivitat dels animals fent ús de la complementarietat i l'heterosi.

L'explotació de la complementarietat té com a objectiu combinar les diferents característiques de les línies per maximitzar el valor de la descendència en relació a la productivitat final.

El terme heterosi va ser encunyat per Shull al 1914 per descriure el increment en vigor dels animals creuats respecte les línies parentals pures. En la pràctica, l'heterosi s'estima com la desviació de la mitjana de la descendència de creuaments recíprocs a la mitjana de les races paternes respecte el caràcter avaluat (Notter, 1987). Normalment s'expressa en percentatge:

$$h_I (\%) = \{[(M_{AB} + M_{BA}) - (M_A + M_B)] / (M_A + M_B)\} * 100$$

Aquest percentatge d'heterosi s'anomena *heterosi individual* i quantifica el vigor híbrid degut a l'augment de la heterocigositat dels individus. Alguns caràcters podran presentar també *heterosi materna i/o paterna*, deguda a la heterocigositat de la mare i/o del pare dels animals que s'avaluen.

Notter (1987) en la seva revisió sobre el mascle creuat detalla el model exposat per Dickerson sobre les causes de que un grup d'animals tingui una mitjana fenotípica concreta en relació a un caràcter. Aquest model assumeix que el fenotip està sotmès a influències directes (I), heterosi (h) i influències maternes (M) i/o paternes (P):

- i) Mitjana dels *efectes directes*, els quals fan referència a la contribució additiva dels gens nuclears procedents de cada pare (g^l).
- ii) *Heterosi individual*, la qual fa referència a la millora en la producció, vigor, qualitat, etc. en un individu (h^l). La magnitud de l'heterosi dependrà fonamentalment de dues condicions: l'existència de desviacions de dominància i/o de les freqüències gèniques dels al·lels dels gens

que determinin el caràcter. En caràcters on existeixi un predomini dels efectes genètics additius i/o les freqüències gèniques dels al·lels no difereixin l'heterosi serà molt baixa o nul·la.

En el model de Dickerson l'heterosi és atribuïda a les interaccions intra-loci (dominància o superdominància) juntament amb les interaccions entre-loci (epístasis). Altres autors, però, han desenvolupat models de creuament alternatius que permeten separar l'estimació de l'heterosi i els efectes d'epístasis (Hill, 1982; William i Pollack, 1985; Wolf i col., 1995, citats per Notter, 1987).

- iii) Mitjana dels *efectes materns* de la línia mare (g^M), tenen en compte l'existència de diferències en l'expressió del caràcter en la progènie degudes a la línia usada com a mare en el creuament. Els efectes materns poden incloure l'existència d'heterosi materna (té en compte el mèrit de l'ús de femelles creuades *versus* femelles pures en la millora de la progènie), d'un efecte dels gens mitocondrials (transmesos per la línia femella a la descendència) o l'existència de gens lligats al sexe entre d'altres.
- iv) Mitjana dels *efectes paterns* de la línia pare (g^P), tenen en compte l'existència de diferències en la millora de la producció en la progènie degudes a la línia usada com a pare en el creuament. Els efectes paterns poden incloure l'existència d'heterosi paterna (fa esment de l'avantatge en l'ús de mascles creuats *versus* mascles purs en la millora de la progènie) o l'existència de gens lligats al sexe entre d'altres.

Basant-nos en el model de Dickerson, la mitjana (M) de la producció esperada per a les línies pures A i B seria:

$$M_{AA} = g^I_A + g^M_A + g^P_A$$

$$M_{BB} = g^I_B + g^M_B + g^P_B$$

I la mitjana dels creuaments recíprocs seria:

$$M_{AB} = \frac{1}{2} g^I_A + \frac{1}{2} g^I_B + g^M_B + g^P_A + h^I_{AB}$$

$$M_{BA} = \frac{1}{2} g^I_A + \frac{1}{2} g^I_B + g^M_A + g^P_B + h^I_{BA}$$

L'increment mig en el vigor de la progènie vindrà donat per: $\frac{1}{2} (h^I_{AB} + h^I_{BA})$. L'heterosi s'ha de calcular a partir dels dos creuaments recíprocs per a evitar tenir en compte l'acció dels efectes genètics materns en l'expressió del caràcter d'interès.

Els creuaments han estat àmpliament usats en producció animal. Així doncs, Shrestha i Heaney (2004) exposaven que el creuament entre dues o més línies és un procediment econòmicament eficient per aprofitar l'heterosi individual o maternal en la producció comercial d'ovelles. En la indústria porquina l'ús de creuaments

En el creuament a tres vies el creuament (AxB) és produït per a aconseguir una F_1 caracteritzada per tenir una alta fertilitat i prolificitat, les quals s'obtenen per l'explotació de l'heterosi. Aquests individus F_1 (AB) seran usats com a mares i creuats amb una tercera línia (C) amb un bon índex de creixement per produir una progènie (AB)xC. En aquest darrer creuament s'explota la complementarietat, l'heterosi materna i l'heterosi individual.

Existeix poca informació en relació al benefici de l'ús de mascles creuats per a la millora de caràcters reproductius. En conills, Brun i col. (2002a) observaven diferències en fertilitat i mida de la llogridada quan comparaven els resultats de l'aparellament de mascles i femelles creuats respecte els resultats de mascles i femelles purs, i obtenint uns resultats favorables per a l'aparellament dels animals creuats. Tanmateix, d'aquesta experiència no es pot saber si les diferències eren degudes al mascle creuat o a la femella creuada. En altres espècies (en porquí, Buchanan, 1987; en vaquí, Thrift i Aaron, 1987) els resultats obtinguts són controvertits respecte la fertilitat. Respecte la prolificitat la majoria dels treballs exposen una lleugera avantatge dels mascles purs respecte els creuats quan la mida de la llogridada es mesurava al deslletament. Quant al paper dels mascles creuats en la millora de la producció i qualitat seminal la informació existent per a la majoria d'aquests caràcters és mínima. Brun i col. (2002a, b), en conill, observaven l'existència d'heterosis per la concentració d'espermatozous, la motilitat massal i el percentatge d'espermatozous mòbils en l'ejaculat. En porcs, Buchanan (1987) evidenciava que el volum i la concentració que mostraven els mascles creuats eren superiors respecte als mascles purs. Més recentment Smital i col. (2004) determinaven l'existència d'heterosis per a alguna característica de qualitat seminal en un tipus de mascles creuats molt utilitzat a la república txeca. En aquest treball l'esquema de creuaments no és complet de manera que en les estimes obtingudes estan presents l'efecte de l'heterosi i els efectes materns sense que es puguin separar. En braus, Thrift i Aaron (1987) trobaven que en general els mascles creuats tendien a expressar una petita a moderada avantatge en diversos caràcters seminals i també una major precocitat.

1.5.3 Selecció

La millora obtinguda en qualsevol caràcter per selecció genètica dependrà de la heretabilitat i variabilitat del mateix, i de la intensitat de selecció aplicada. Tanmateix, a l'hora d'establir el criteri de selecció d'un programa de millora genètica caldrà tenir en compte el pes econòmic del caràcter a seleccionar i l'existència de correlacions genètiques amb altres variables, per a avaluar la eficiència de les possibles estratègies de selecció. El pes econòmic és un indicador de la relativa importància del caràcter en la funció de beneficis d'un sistema productiu donat (Baselga i Blasco, 1989). En conills, Armero i Blasco (1992) destacaven com a principals caràcters productius la mida de la camada, les mortalitats, el interval entre parts, l'índex de conversió i la velocitat de creixement. No obstant aquest treball no inclou caràcters de producció i qualitat de semen, ni tampoc de la fertilitat de la femella.

L'heretabilitat (h^2) i variabilitat de la fertilitat ha estat estudiada en diferents espècies. Boichard i col. (1998) i Varona i col. (2001) en condicions d'inseminació artificial exposaven, en vaquí i en porquí respectivament, que l'heretabilitat de la fertilitat del mascle era molt baixa, però que existia una variabilitat genètica important que podria permetre plantejar la selecció per aquest caràcter. Piles i col. (2005) demostraven, en conills i munta natural, que la variació genètica i ambiental de la fertilitat del mascle, definida com a èxit o fracàs a la cubrició, era pràcticament inexistent. Per tant la selecció genètica per aquest caràcter podria no ser efectiva. Una alternativa podria ser la millora indirecta a través de la selecció pels paràmetres que defineixen la producció i qualitat seminal. Aquesta millora en la producció de semen adquireix una importància decisiva en els sistemes on l'organització reproductiva està basada en la inseminació artificial. Així doncs, la disminució del percentatge de rebuig dels mascles de reposició destinats a la inseminació així com que els mascles siguin capaços de produir un elevat nombre de dosis mantenint una elevada fertilitat són dos objectius claus per als centres d'inseminació i per als productors de carn. Hi ha poca informació publicada relativa a estimes de paràmetres genètics de característiques de producció i qualitat seminal. La taula 1.5.1 ofereix les estimes de la heretabilitat que han estat obtingudes per a alguns d'aquests caràcters, fins al moment totes elles en espècies diferents al conill. La majoria dels caràcters avaluats presenten unes estimes de la h^2 altes. La informació que hi ha en conill és només relativa a estimes de la repetibilitat d'alguns caràcters de producció i qualitat seminal (Batagliani i col., 1992; Bencheick, 1995; Brun i col., 2002b; Castellini i col., 2006), essent aquesta moderada per a la majoria de caràcters estudiats. La repetibilitat, és el sostre de l'heretabilitat, indica el percentatge de variació total associada a un caràcter que és deguda als gens que controlen dit caràcter i a factors permanents no additius deguts al individu. El coneixement de la repetibilitat d'un caràcter permetrà determinar el nombre de mesures a realitzar per a obtenir una estima suficientment precisa del potencial productiu dels animals, necessària per poder prendre decisions relacionades amb l'eliminació d'animals de baixa productivitat.

Actualment els mascles destinats a la inseminació són únicament seleccionats per l'índex de creixement. En porcs es produeix una reposició anual de mascles d'inseminació d'entre un 50% a un 145% de la qual un 10-30% és deguda a una deficient qualitat seminal (Robinson i Buhr, 2005), en conills un 50 % del mascles joves (4-5 mesos) destinats a la reposició dels centres d'inseminació són eliminats per raons sanitàries, manca de libido i/o dolenta producció i qualitat seminal (Ramón, comunicació personal). Robinson i Buhr (2005), en la seva revisió sobre les implicacions de la selecció actual del mascles per caràcters econòmicament importants (velocitat de creixement i índex de conversió), plantejaven si aquesta selecció podria estar malmetent la qualitat seminal.

TAULA 1.5.1: ESTIMES DE L'HERETABILITAT (ERROR ESTÀNDARD) D'ALGUNS CARÀCTERS DE QUALITAT SEMINAL EN DIFERENTS ESPÈCIES

	<i>Smital (2005)</i>	<i>Rege i col. (2000)</i>	<i>Goerke i col. (1970)</i>	<i>Ducrocq i Humblot (1995)</i>	<i>Sarreiro i col. (2002)</i>
Espècie	Porquí	Oví	Oví	Vaquí	Vaquí
Volum	0.58 (0.03)		0.43 (0.23)	0.65 (0.09)	
Concentració	0.49 (0.03)		0.07 (0.18)	0.37 (0.09)	0.00 (0.5)
Motilitat	0.38 (0.04)	0.32 (0.12)	0.16 (0.20)	0.23 (0.08)	0.01 (0.10)
Formes anormals	0.34 (0.03)	0.35 (0.13)	0.42 (0.23)	0.19 (0.07)	0.07 (0.13)

La informació disponible sobre les correlacions dels paràmetres de qualitat seminal amb altres caràcters d'interès productiu és molt limitada. Barbato i col. (1998) i Barbato (1999), en pollastres, observaven que els galls seleccionats per velocitat de creixement tenien una menor qualitat seminal i presentaven una pitjor fertilitat (testada a partir de tests *in vitro* i tests *in vivo*) respecte els mascles pertanyents a un grup control. Oh i col. (2006), en porcs, observaven que els caràcters de qualitat seminal presentaven una correlació genètica negativa amb la musculatura i una correlació genètica positiva amb el greix, i conclouien que l'esquema actual de selecció dels mascles per a inseminació podria estar produint un efecte negatiu sobre la producció de semen. Humblot i col. (1993), en braus, observaven l'existència d'una important correlació entre la producció seminal d'animals joves i la producció d'animals adults i conclouien que l'avaluació de les característiques seminals a edats joves permetria l'eliminació precoç dels mascles millorant la qualitat dels animals adults en els centres d'inseminació. Aquests estudis també indiquen que podria ser necessari afegir algun dels caràcters de qualitat seminal al criteri de selecció que fins al moment s'està aplicant per a garantir una millor qualitat seminal. Rege i col. (2000), en oví, han proposat la inclusió de mesures del mida testicular (volum, circumferència escrotal) en animals joves, doncs han observat una correlació genètica entre moderada i alta i favorable entre aquestes variables i les característiques de qualitat seminal. Cal un coneixement més exhaustiu dels paràmetres genètics de les variables de producció i qualitat seminal i de les variables relacionades amb la mida del testicle, i de les seves correlacions genètiques amb caràcters de creixement per tal de poder incloure noves variables a l'actual índex de selecció.

Capítol 2

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar l'efecte del genotip sobre diferents aspectes relatius a la reproducció del mascle en conill: procés de maduració sexual, característiques de producció i qualitat seminal, fertilitat i prolificitat.

L'estudi sobre el procés de maduració sexual s'ha fet utilitzant dues línies de diferent aptitud reproductiva (una seleccionada per velocitat de creixement i l'altra per mida de la llodrigada al deslletament) esperant que en aquestes línies s'expressessin d'una manera més clara les possibles diferències. S'han analitzat:

1- Els canvis amb l'edat en la conformació del testicle i l'epidídim, mesurats sobre variables de tipus macroscòpic, i els canvis en la composició del testicle, mesurats sobre variables de tipus microscòpic.

2- Els canvis amb l'edat en el contingut de testosterona en plasma sanguini i en els nivells de variables diferents relacionades amb l'estrès oxidatiu en el testicle.

Respecte l'estudi de les característiques de producció i qualitat seminal, la fertilitat i la prolificitat, s'han utilitzat mascles pertanyents a dues línies seleccionades per velocitat de creixement, àmpliament difoses en el sector i utilitzades com a mascles terminals a les granges comercials, i mascles resultants del seu creuament recíproc. S'han estudiat:

1- La variabilitat i repetibilitat de les variables de producció i qualitat seminal i, la relació entre aquestes i amb la fertilitat.

2- El interès del creuament per a la millora de la producció i qualitat seminal i de la fertilitat i la prolificitat.

Capítol 3
EXPERIÈNCIES DESENVOLUPADES

3.1 POST-NATAL SEXUAL DEVELOPMENT IN THE RABBIT: GROWTH AND MATURITY PATTERNS IN TESTIS AND EPIDIDYMIS MACROSCOPIC TRAITS, AND IN TESTIS MICROSCOPIC TRAITS

3.1.1 Abstract

Macroscopical variables related to size of testis and epididymis and microscopical variables related to tissue composition of testis, could be used in the examination of male reproductive function. The knowledge of development pattern of these variables could help to know the degree of male sexual maturation and to establish the best moment to start the reproductive life of males and also to establish the more adequate reproduction rhythm.

The present work was performed in two lines of rabbit of different reproductive aptitude to assess the effect of the line and birth season on age related changes of reproductive parameters. The variables studied were: live weight (LW), testis length (TL), testis width (TWh), testis weight (TW), testis volume (TV), epididymis length (EL), epididymis width (EWh), epididymis weight (EW), epididymis volume (EV), percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL), percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (STES), percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) and diameter of seminiferous tubules (Dr). Measurements began after weaning and continued until males reached 33 weeks of age.

Four principal components explained 79% of the total variation. Most of the macroscopical variables of testis and epididymis were grouped in two non-related sets with variables measuring active spermatogenesis, which are important to know functional maturity of male at a specific age.

Caldes and Prat lines showed similar developmental profiles for most of the variables studied, which showed major changes at young ages and were affected by environmental conditions in the same manner in both lines. The percentages of seminiferous tubules with lumen and with presence of spermatozoa at 20 weeks of age were low in both lines (about 70% and 40%, respectively). Thus, males should be used at a low reproductive rhythm or not used at all, especially in the case of males born during the warm season. Caldes line had higher LW and lower TV than Prat line at any age. No differences between lines were found for microscopical vari-

ables of testes, except for STL. Line Prat showed higher values of this trait at 14 weeks but lower at 33 weeks, suggesting that lines could have a different sexual development pattern.

Significant effect of the birth season was found in LW, TV, EV STES and Dr. The absolute values and the values relatives to its own value at the adult stage of the variables LW, TV, EV and in variables related to the functional maturity were lower in animals born in the warm season. The growth of TV and EV was delayed in animals born in the warm season. Therefore, the effect of birth season should be taken into account in future studies for a more precise analysis and also to establish the age at the beginning of the reproductive life of males as well as the reproductive rhythm used at this time.

3.1.2 Introduction

The study of the animal sexual development involves the knowledge of the growth and maturation patterns of tissues or parts of reproductive system associated with the potential capacity of spermatic production. Macroscopical variables of testes like weight, volume or scrotal circumference have been considered to be markers of male sexual maturation in several mammals (Shinckel *et al.*, 1983; Salhab *et al.*, 2001; Lunstra and Cundiff, 2003; Mandal *et al.*, 2004), since at the onset of spermatogenesis there is an exponential rise of number and size of germ cells that leads to a marked increase in testicular size (Salisbury *et al.*, 1978 cited by Salhab *et al.*, 2001). Microscopical variables like appearance of elongated spermatids and spermatozoa in the seminiferous tubules, seminiferous tubule diameter, number and size of interstitial and germ cells have also been used as indicators of maturation (Shinckel *et al.*, 1983; Tegegne *et al.*, 1991). These parameters moderately correlate with macroscopical variables (Shinckel *et al.*, 1983; Chemes, 2001) giving additional information about functional maturity of testis.

Several authors have found that growth and maturity patterns of testicular and epididymal parameters were affected by genetic factors. In bulls, Lunstra and Cundiff (2003) and Tegegne *et al.* (1991) showed a different developmental pattern of macroscopical and microscopical testicular variables, respectively, among breeds. In the rabbit, different authors have studied the spermatogenesis process and the age at which the different kinds of germ cells appear in the seminiferous tubules (Iczkowski *et al.*, 1991; Berger *et al.*, 1982). They found different results which suggest the possible existence of variation between breeds in the sexual development pattern. Selection on growth rate can also modify the whole pattern of growth (Blasco *et al.*, 2003; Piles *et al.*, 2003) and may delay sexual maturation. Schinkel *et al.*, (1983), when compared testicular growth in two lines of selection of boars that had different ovulation rate and different growth rate, found that the line selected for lean growth showed larger body weights and smaller testes size at any age, fewer seminiferous tubules with active spermatogenesis and smaller seminiferous tubule diameter at 120 days of age. They concluded that the

observed differences between lines suggested that selection for lean growth resulted in an increase of age at puberty and a slower testicular development.

On the other hand, seasonal effects have been observed in some reproductive traits of mature animals of several mammalian species. In rabbits these effects have been studied in: seminal parameters (García-Tomás *et al.*, 2006; Lavara *et al.*, 2000; Theau-Clement *et al.*, 1995), testis size (Carson and Amann, 1972) and serum testosterone (Boiti *et al.*, 1992 and Chiericato *et al.*, 1994). These effects probably also exist on growth pattern of those traits.

The present work was performed to assess the effect of line and environmental factors on age related changes of macroscopical variables of testes and epididymis, and of microscopical variables of testes, in two lines of rabbit of different reproductive aptitude. The relationships among these variables were also examined.

3.1.3 Material and Methods

3.1.3.1 Animals

The study involved two rabbit lines (Caldes and Prat) extensively used in intensive meat rabbit production in Spain and Portugal. Caldes was a sire line selected on the basis of growth rate by individual selection (Gómez *et al.*, 1999); Prat was a dam line selected on the basis of litter size at weaning (Gómez *et al.*, 1996). These lines have a different kindling rate (80.5 % and 86.2 % in lines Caldes and Prat, respectively) and a different litter size (the number of total kits born were 8.16 and 9.68 in lines Caldes and Prat, respectively).

Animal maintenance as well as field measurements were carried out in the facilities of the experimental farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (Caldes de Montbui, Spain). Animals were born in two different periods: December that coincides to the cold season in Spain, with an outdoor medium temperature of 8.5 ° C; and May to July that corresponds to the warm season, with an outdoor medium temperature of 22.7 ° C. After weaning, males were housed 6 per cage and were fed commercial rabbit pellets *ad libitum* (15.5 % crude protein, 2.3 % fat, 17.2 % fibre) until 75 days old; then they were placed in individual cages and were subsequently restricted to 180 g/d of another commercial diet (16 % crude protein, 4.3 % fat, 17 % fibre) until sacrifice. Fresh water was available *ad libitum*. Animals were raised with a photoperiod of 16 hours light/day.

Eight bucks per line (Caldes, Prat) and season were randomly sampled at 4, 8, 10, 14, 16, 20, 25 and 33 weeks of age. These ages take into account changes in prepubertal (4, 8 and 10 weeks), pubertal (14, 16 and 20 weeks) and mature (25 and 33 weeks) rabbits during development.

3.1.3.2 Tissues sampling

Rabbits were weighted (live weight, LW) prior to sacrifice by intravenous administration of potassium pentobarbital 18 % (Sigma-Aldrich). Testis and epididymis were removed and weighted. Testis and epididymis length and width were also obtained with a calliper; width of testes was measured at the point of maximum width. For testis and epididymis the average of left and right measurements weight, length and width was calculated obtaining: averaged testis weight (TW), averaged epididymis weight (EW), averaged testis length (TL), averaged epididymis length (EL), averaged testis width (TWh) and averaged epididymis width (EWh).

Right testis and epididymis were placed in ice-cold isotonic saline until volume measurement, which was performed by using a pycnometer (right testis volume, TV, and right epididymis volume, EV). One portion of the left testes was cut transversally, always from the central area, and fixed by immersion at 4 ° C with paraformaldehyde 2 % plus glutaraldehyde 2.5 % in 0.1 M cacodylate buffer. Then samples were stored at 4 ° C, for at least 24 hours, until starting the microscopic study.

3.1.3.3 Microscopic study

After fixation, testes were embedded in paraffin. Sections of 2 µM thickness at 100 µM intervals were obtained with a microtome (HM 310 Microm) and stained with haematoxylin and eosin. Sections were oriented perpendicular to the long axis of the testes maximizing the number of round tubular profiles.

At least 40-50 seminiferous tubules, that were round or nearly round, were chosen randomly per male by observation under a light microscope (Nikon) at x100. The number of seminiferous tubules with presence of lumen (nSTL) and tubular diameter (Dr) were measured by using the Analysis Package (www.soft-imaging.net). The number of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (nSTES) and the number of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (nSTS) were also determined in the same way at x1000, from thirty seminiferous tubules with presence of lumen randomly chosen per male.

The following ratios were calculated from the previously mentioned variables:

- Percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL) = $nSTL \times 100 / \text{number of seminiferous tubules}$.
- Percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (STES) = $nSTES \times 100 / 30$.
- Percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) = $nSTS \times 100 / 30$.

3.1.3.4 Statistical analysis

Summary statistics and phenotypic correlations among live weight, macroscopical variables of testes and epididymis, and microscopical variables of testes were obtained using Proc Means and Proc Corr from the SAS v.8 package. Phenotypic correlations among variables were estimated as the residual correlation. Residuals were estimated from a model including the fixed factors of line (two levels; C, P), birth-season (two levels; cold, warm), age, and the double interactions line x age and birth-season x age, using GLM procedure of SAS. A principal component analysis was performed using the Princomp procedure from the SAS v.8 package. This technique reduces the whole set of n correlated variables to n uncorrelated linear functions of the original measurements.

According to the estimates of the correlations between all variables, the study of age related changes considered only the set of the following traits: LW, TV, EV, STL, STES, STS and Dr. Data were subjected to analysis of variance by using GLM procedures of SAS v.8. (SAS, 2001). Live weight, STL, STES and STS were analysed according to a model which included the fixed factors of line (two levels; C, P), birth season (two levels; cold, warm), age (8 levels for LW; 4, 8, 10, 14, 16, 20, 25, 33 and 6 levels for variables related to testicular tissue composition; 4, 8, 14, 16, 20, 33) and the double interactions line x age and birth season x age. The analyses of TV, EV and Dr were performed including the same fixed factors as before plus LW as a covariate to take into account the differences in size of the animals belonging to each of the lines. Maturity rate, defined as the ratio of the value of each variable at any age with respect to its own value at the adult stage, was also analyzed for all traits according to the same models. The value at the adult stage of LW, TV, EV and Dr was assumed to be the estimated A parameter of the Von Bertalanfy function (Richars, 1969), since it was the growth function that better fit the data at adult stage between the following parametric functions: Von Bertalanfy, Brody, Gompertz. Figure 3.1.1 shows average values of LW, TV, EV and Dr at any age and the adjusted growth curves according to the line. For STL, STES and STS the value at the adult stage was assumed to be the same as at 33 weeks of age, because it was not found any adequate parametric function for these traits.

When interactions line x age and birth-season x age were significant, the variables were analyzed at any specific age to estimate differences between lines or between seasons.

3.1.4 Results and discussion

3.1.4.1 Relationship between variables

Table 3.1.1 shows summary statistics of the recorded traits. It was noteworthy the high coefficient of variation for TW, TV, EW and EV values at 10 weeks of age, STES values at 14 weeks of age, and STS values at 16 weeks of age. These results could indicate individual differences in the age at the onset of spermatogenesis or at the onset of puberty. Similar values for the overall means were reported for the adult TW (Carson and Amann, 1972), Dr at 4 and 8 weeks of age (Iczkowski *et al.*, 1991) and the age of the animal at the occurrence of STL (Berger *et al.*, 1982). However, the values found in the literature for TW (Ambriz *et al.*, 2003), TV (at 4 and 7 weeks of age, Iczkowski *et al.*, 1991; and at adult age, Theau-Clement *et al.*, 1995) and EW (Carson and Amann, 1972; Ambriz *et al.*, 2003) were higher than those observed here. These differences could be explained by genetic and environmental factors, but for TV it could be also possible an effect of the procedure used to measure this trait. Iczkowski *et al.* (1991) estimated TV indirectly from the testis area, calculated as $\pi((d_1 + d_2)/4)^2$ where d_1 and d_2 were two perpendicular diameters of testis, per the number of testis sections and distance between sections in the slide, and Theau-Clement *et al.* (1995) recorded the amount of isotonic saline displaced when the testis was immersed in a measuring cylinder.

Table 3.1.2 shows the coefficients of correlation among all the variables studied. Figure 3.1.2 shows the results of the principal component analysis for macroscopical variables of testes and epididymis, and microscopical variables of testes. Live weight showed a low correlation with variables related with testis size and it was not correlated with the variables measuring epididymis size except with EL. There are contradictory results in the literature. Thus, Zanella *et al.* (mature boars, 1999) and Franca *et al.* (mature cats, 2003) did not find any significant correlation between LW and TW, while Okwun *et al.* (mature boars, 1996) showed a high and positive correlation between those traits.

With respect to the principal components (PC) analysis, the first four PC explained a 79% of total variation (37.1, 17.5, 13.9 and 10.4, respectively). The predominant variables defining the first PC were TL, TW, and TV: they were far from the origin and close to the axe. Variables related to testis size were positive and moderate to highly correlated among them (specially the correlation between TW and TV), which confirm findings by Shinckel *et al.* (1983) and Okwun *et al.* (1996), in boar, and Salhab *et al.* (2001), in ram. Epididymis weight and EV were also important in the definition of this PC as well as in the third PC, since they were at the same distance to both axes. A moderate correlation (0.21-0.48) was found between variables related to testis size and variables related to epididymis size. Testis width and EL also were important in the definition of the third PC. Variables related to epididymis size were low to moderate correlated, except EW and EV that showed a correlation of 0.85 and lay near each other in the plane defined by this PC.

Epididymis width and STS were far from the origin and close to the second PC. These two variables showed a moderate and positive correlation (0.40), as could be expected because of the transit of the spermatozoa in the epididymis for their final maturation. Percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids was also far from the origin of this PC, but in an almost intermediate position between second and third PC. This variable showed a positive and moderate correlation (0.60) with STS.

It has not found any correlation among traits related to testis and epididymis size and variables related to the functional maturity of testis (both sets of variables formed and angle of 90° in the graphics of PC). Several authors have related testicular cellular dynamics and spermatogenesis process with seminiferous tubular size and growth of testis (in boar, Schinkel *et al.*, 1983; in human, Chemes, 2001; in Aponte *et al.*, 2005). We did not find any correlation between testis size and percentage of seminiferous tubules with active spermatogenesis. Therefore, TW and TV seemed not to be good markers of maturity. A higher testis size at a specific age did not necessarily mean a more developed testis. In mature bulls, Brito *et al.* (2002) and Pant *et al.* (2003) showed that sperm production (volume of ejaculate and total number of sperm) and quality traits were positively associated with testis volume and scrotal circumference. But they did not observe any relationship between sperm concentration and testis size. Therefore the positive regression observed between testicular volume and ejaculate volume could not be direct, the increase in ejaculate volume could be explained by the an-nex gland development.

Tubular diameter was a variable defining the fourth PC. This variable showed low to moderate correlation (about 0.30) with variables related to testis and epididymis size. This result was not in agreement with coefficient of correlation (0.80) found by Schinkel *et al.* (in boars, 1983) between variables defining testis size and tubular diameter. No correlation was found between Dr and TWh and EWh, measurements of these two variables could not be accurate enough. Tubular diameter could be a variable defining cellular hyperplasia and hypertrophy resulting of the spermatogenesis process. Thus, it showed a positive and moderate correlation with STES (0.54). There was not relationship between Dr and STS, this could be explained because spermatozoa formation occurs by a differentiation of elongated spermatids without cellular division when most of the seminiferous tubules show elongated spermatids.

3.1.4.2 Effect of line on developmental profile of macroscopical and microscopical variables related to sexual maturation.

The effect of the line on developmental profile was studied for the set of the following variables: LW, TV, EV, STL, STES, STS and Dr. Testis weight and EW were not considered for the analysis since they were highly correlated with TV and EV, respectively. Figure 3.1.3 shows the age related changes according to the line for the considered variables.

The evolution of LW was similar in both lines studied and followed the characteristic sigmoid curve with a maximum growth rate about 8 weeks of age and after that, a stage of progressive diminution of growth until 33 weeks. In general, Caldes males were about 10% heavier than Prat males at any age from weaning. Blasco *et al.* (1993) also found differences between a sire and a dam rabbit lines in the estimated adult body weight, when the Gompertz function was used; and Ouhayound (1978) in a review showed that there is great variability among breeds and origins in adult weight and other growth parameters.

Testis volume and EV also showed a sigmoid growth curve. When these traits were analysed in relation to the body weight no changes were observed between 4 and 8 weeks of age. After that they showed a fast growth, with a maximum about 14 weeks of age, which indicates that the spermatogenic activity could have started. Iczkowski *et al.* (1991) showed a relevant increment in the percentage of germ cells in mitosis at 7 weeks and an abundant meiotic activity from 9 weeks. The increase of TV is probably related to the mitotic cell proliferation since there was an important increase in plasma testosterone levels between 4 and 8 weeks of age (data not shown). When TV and EV were analysed as absolute values the increase in size was observed since 4 weeks of age, especially for TV. Iczkowski *et al.* (1991) studied testicular development in rabbits at prepuberty stage (from birth to 8 weeks of age) and observed a great increase in the testis volume, in the rate of testis volume occupied by seminiferous tubules and in tubular length from the first postnatal week to the onset of spermatogenesis at the seventh week.

Differences in TV between lines, at constant LW, were found from 10 to 33 weeks of age. Differences in testis size between lines have previously been observed by other authors in other species (in boar, Shinckel *et al.*, 1983; in bull, Tegegne *et al.*, 1991; in bull, Lunstra and Cundiff, 2003). Prat males had larger testis volume (about 10% of the overall mean) than Caldes males indicating a possible higher production of semen, as it has been described in bovine (Brito *et al.*, 2002; Pant *et al.*, 2003). However, we do not have data to confirm this hypothesis. Vicente *et al.* (2000) compared semen production and quality of four selected rabbit lines: three lines selected for prolificacy and a line selected for growth rate during the fattening period. They found that the sire line showed lower number of spermatozoa produced per ejaculate, ejaculate volume, individual motility and number of spermatozoa with acrosomal integrity than the maternal lines, but they did not measure testis size. The differences observed by us in LW and TV could be due to a correlated effect of selection, since Prat line was selected on the basis of litter size at weaning while Caldes line was selected on the basis of rate of growth. Shinckel *et al.* (1983) when comparing two lines of boars that had different ovulation rates and different growth rates also found differences in live weight and testis size and suggested a possible effect of selection. There were no differences for EV at any age suggesting a similar capacity to store fertile sperm in both lines.

Tubules with presence of lumen were observed at 14 weeks old, so formation of lumen was done between 8 and 14 weeks of age. The percentage of seminiferous tubules with presence of lumen showed a different development pattern between lines: in line Caldes the value of this variable increases with age, especially be-

tween 16 and 20 weeks of age, while Prat line showed a high value at 14 weeks old that remains constant until 33 weeks of age. This result could indicate a sexual precocity in the individuals of this line with respect to the others. The occurrence of elongated spermatids took place at 14 weeks old. After that, there was an important increase in STES until 16 weeks. Both lines showed similar values for this variable at any age. Tubules with presence of spermatozoa became visible between 14 to 16 weeks of age. For this variable, both lines also presented a similar growth pattern with the biggest increase between 16 and 20 weeks of age. Results concerning STL, STES and STS were in agreement with Berger *et al.* (1982), who observed tubular lumen formation from 13 to 14 weeks, elongated spermatids between 14 to 17 weeks and spermatozoa from 17 to 21 weeks. With respect to Dr main changes have been observed between 8 and 14 weeks of age, there was a great three-fourfold rise. Several authors showed the development pattern of tubular diameter (Schinckel *et al.*, 1983; Iczkowski *et al.*, 1991; Chemes, 2001). They also observed the main increase in this variable at the onset of spermatogenesis.

At 33 weeks of age, about 70% of seminiferous tubules presented lumen and about 50% of them showed spermatozoa. From our results it is difficult to establish the values at the adult stage for STL and STS, but they seem to be far from 100%. The observed value of STS could be related to the seminal epithelium cycle. In the seminiferous tubules it could be observed until five generations of sperm cells, which are disposed in superposed layers. Each generation performs its spermatogenesis synchronically and the appearing of different cellular stages follows a precise order (Thibault and Levasseur, 2001).

No differences between lines were found for any microscopical variable. However a significant interaction between line and age was obtained for STL and Dr that could be related with a different maturation pattern of the lines. In pigs, Shinckel *et al.* (1983) found that STL and STES were lower in animals selected for lean growth at any age but especially at 120 days of age, and suggested that these animals had a slower testicular development. Tegegne *et al.* (1991) comparing two bull breeds showed that the appearance of elongated spermatids and spermatozoa in the seminiferous tubules and epididymis occurred at different age.

Differences between lines in TV could not be explained by variations in the studied microscopical variables, but they could be due to a different density of seminiferous tubules, Leydig cells or Sertoli cells between lines. In boars, Walker *et al.* (2004) showed differences between two lines from an experiment of divergent selection for testosterone production. The densities of Leydig cells differed, while seminiferous tubule density tended to differ and Sertoli cell densities remained constant.

For a complete comparison between lines in age related changes, variables were analyzed in relation to their adult value to know if there were differences in the maturation pattern for the same variables. Figure 3.1.4 shows the age related changes according to the line for these variables. The line and the interaction between the line and age were found to be non significant effects for TV, EV, STES and STS indicating that both lines

showed similar values of these variables and that those traits evolved in the same manner to maturity. However, the interaction between line and age was significant for STL, LW and Dr STL. In the line Prat was observed higher values for STL in relation to their value at 33 weeks of age, at 14 and 16 weeks of age, this could indicate that Prat line could have a higher maturity degree at pubertal stage. With respect to Dr, line Prat showed at 14 weeks of age higher percentage of the estimated value at the adult stage than Caldes line. However, this fact was not observed for TV suggesting that there could be differences between the two lines in relative growth for this trait. The proportion of the adult body weight that was reached at 16 and 20 weeks of age was higher in Caldes line than in Prat line indicating a bigger maturity degree of those animals at pubertal stage. When time was expressed in the metabolic scale of Taylor those differences disappeared, as expected.

Sexual maturity has been defined as the age when a male is used for first time for reproduction and produces results that are considered satisfactory in the industry (Berger *et al.*, 1982; Brito *et al.*, 2004). In the present work it was not evaluated the fertilizing capacity of bucks to avoid a possible effect of an early semen extraction on testis development and sexual behaviour of males. However, it has been suggested in bulls that the use of semen from early pubertal male might lead to an unacceptable decrease of the non-return rate in the insemination centres. Picard-Hagen *et al.* (2002) showed that bulls collected before 410 days of age had lower sperm quality than bulls collected after 410 days of age when the collection rhythm was intense, but only for the first collections. However, when the collections were adapted to physiological capacity of each animal no differences were found. These results suggested the importance of the adaptation of the collection rhythm to the sexual maturation in young bulls. From our results it could be proposed not to use males for reproduction at an intensive rhythm before 20 weeks of age, since at this time testis size has only reached about 70% of its adult value, and STS was only about 70% of their value at 33 weeks of age. In Caldes line, the information available about the evolution of ejaculated volume and individual motility of the spermatozoa with age shows an important increase between 20 to 33 weeks of age for both variables, indicating that young males could not be ready to an intensive rhythm of collection and that the value at 33 weeks of age for STL, STES and STS is probably underestimating the real adult value. Therefore, the percentages of tubules with presence of spermatozoa at 20 weeks of age are even more unfavourable. Berger *et al.* (1982) give support to this recommendation. They found, in New Zealand rabbits, that first successful and fertile matting occurred about 150 days of age. However, Macedo and Miguel (1986) found that bucks reached sexual maturity on day 129, and Alvaríño (1998) in its review on artificial insemination in the industrial meat production exposed that males can be used from 4 month of age.

3.1.4.3 Effect of birth season on developmental profile of macroscopical and microscopical variables related to sexual maturation.

Figures 3.1.5 and 3.1.6 show the age related changes according to the birth season for the studied variables and for the same variables divided by their own mature values, respectively. Same results were found for both sets of variables, therefore comments will be referred to both sets at the same time.

In general, it has been observed a negative effect of the warm season on the absolute values and on the values relative to the estimated adult value for LW, TV, EV and for variables related to the functional maturity. It has also been found an effect of birth season on the growth pattern of TV and EV. Animals born in the warm season showed a delay in the growth of these variables. Thus, animals born in the warm season could be more immature at peripuberal stages. Tatman *et al.* (2004), in bulls, also concluded that birth season affected sexual development. They showed that fall-born bulls were older than spring-born bulls at sexual maturity.

Animals born in the cold season showed a higher LW and higher maturity degree between 8 to 20 weeks of age. However, at advanced ages they reached similar values than males born during the warm season as expected, since body weight at early ages is more affected by the initial environmental conditions and the correlation between successive weights is high. On the other hand, the environmental conditions are the opposite at birth than at 25 and 33 weeks of age, therefore there is an opposite effect on growth at this time. High temperatures could affect negatively feed intake leading to low values of live and carcass weights and low growth rate (Piles *et al.*, 2004). Testis and epididymis volume of males born in the cold season grew faster at initial ages and started the phase of decreasing growth earlier than the same organs in males born in the warm season. In the case of the last ones, growth of TV and EV was delayed during the warm season while a compensatory growth was produced during the favourable season, which leads to higher adult values. The differences between growth pattern for LW and TV and EV suggest that there could be an effect of season of birth on the relative growth of these organs, possibly not only in the impetus but also in the change point of different phases of relative growth. Carson and Amann (1972), in mature rabbits housed under semi-controlled environment, showed that TW were lower for rabbits killed in July, August and September. They concluded that seasonal variation in testicular mass was not eliminated at constant light and temperature, but also an effect of season of birth could not be excluded on seasonal changes in TW.

The evolution of the occurrence of tubules with lumen did not show a clear pattern, but it seemed that STL was not affected by birth season. This variable is an important morphological variable of the seminiferous tubules and it has been used to indicate the onset of puberty in several mammals, since it is less affected by environmental conditions. The percentage of seminiferous tubules with presence of spermatids was in general higher at any age in males born in the cold season than in the others; only at 20 weeks of age they showed similar values. Concerning STS, bucks born in cold season showed an earlier increment of this trait than males born in

the warm season, which started their growth later but they reached similar values at the 33 weeks of age. Tubular diameter in animals born in cold season was higher (about 6% of the overall mean) than in animals born in warm season, differences were observed in peripubertal stage, while mature values were similar. Spermatogenesis, in several mammals, shows seasonal variations related to photoperiod and temperature (Alvariño, 2000). Concerning the effect of temperature, Flowers (1997) showed that heat stress inhibited spermatogenesis and decreased libido in boars. Differences in STES and Dr could be due to an inhibition of the secretion of gonadal stimulating hormones affecting levels of testosterone produced by high environmental temperatures (Alvariño, 2000).

More research is needed to know the evolution of other histological traits of testis such as the density of seminiferous tubules, which could help in the understanding of testis growth and its relationship with semen production and quality, in order to set the optimal age to start the reproduction life of males.

3.1.5 Conclusion

Four principal components explained 79% of the total variation. Most of the macroscopical variables of testis and epididymis were grouped in two sets which were non-related with variables measuring active spermatogenesis, which are important to know functional maturity of male at a given age.

Caldes and Prat lines showed similar developmental profiles for all variables studied, which showed major changes at young ages and were affected by environmental conditions in the same manner in both lines. Caldes line had higher LW and lower TV than Prat line. No differences were found for microscopical variables of testes between lines, except for STL, which could have different development pattern in the two lines.

Significant effect of the birth season was found for LW, TV, EV STES and Dr. The absolute values and the values relative to its own estimated value at the adult stage for the variables LW, TV, EV and in variables related to the functional maturity were lower in animals born in the warm season. It was also been observed a delay in the growth of TV and EV in animals born in the warm season. Therefore, the effect of birth season should be taken into account in future studies for a more precise analysis and also to establish the age at the beginning of the reproductive life of males, as well as its reproductive rhythm used at this time.

3.1.6 Acknowledgements

This research was supported by UB project 56.5.48.000.00 689.05 (MC 066605) and by INIA project SC 00 - 011. Mónica García received a fellowship from the Generalitat de Catalunya. The authors are grateful to Carme

Requena, Llibertat Tusell, Núria Aloy, and Oscar Perucho for valuable cooperation during experimental phase of this study, comments and suggestions.

3.1.7 References

Ambriz D, Contreras JS, Hernández O, Mercado E, Cervantes FA, Rosado A. 2003. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diaza*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zool. Mex.*; 88: 257-269.

Alvariño JMR. 1998. Inseminación artificial como base de la cunicultura industrial. Publicaciones científicas Ovejero, Leon.

Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbit. Proceedings of the 7th World Rabbit Congress. Valencia (Spain); A: 13- 35.

Alvariño JMR, Lopez FJ, Del Arco JA, Bueno A, Torres R. 1996. Effects of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 hours stored semen. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Toulouse (France); 2: 3-5.

Aponte PM, Rooij DG, Bastidas P. 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*; 64: 1440-1455.

Blasco A, Gómez E. 2003. A note on growth curves of rabbit lines selected on growth rate or litter size. *Amin. Prod.*; 57: 332-334.

Berger M, Jean-Faucher Ch, Turckheim M, Veysièrè G, Blanc MR, Poirier JC, Jean Cl. 1982. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinologica*; 99: 459-465.

Boiti C, Chiericato GM, Filotto U, Canali C. 1992. Effects of high environmental temperature on plasma testosterone, cortisol, T3 and T4 levels in the growing rabbit. *J. Appl. Rabbit Res.*; 15: 447-455.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*; 58 (6): 1175-1186.

Brito LFC, Silva AEDF, Unanian MM, Dobe MAN, Barbosa RT, Kastelic JP. 2004. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*; 62: 1198-1217.

- Carson WS, Amann RP. 1972. The male rabbit VI. Effects of ejaculation and season on testicular size and function. *J. Anim. Sci.*; 34: 302-309.
- Chiericato GM, Boiti C, Canali C, Rizzi C, Rostellato V. 1994. Effets de l'age et de la température ambiante sur les concentrations circulantes hormonales chez le lapin. *VIèmes Journées de la Recherche cunicole, La Rochelle (France)*; 1: 137-144.
- Chemes HE. 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Andrology*; 24: 2-7.
- Flowers WL. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fert.*; 67-78 Suppl. 52.
- Franca LR, Godinho CL. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68 (5): 1554-156.
- García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livest. Sci.*; 100: 111-120.
- Gómez EA, Rabel O, Ramon J, Baselga M. 1996. A genetic study of a line selected on litter size at weaning. *Proceedings of the 6th of the World Rabbit Congress, Toulouse, (France)*; 2: 289-292.
- Gómez EA, Baselga M, Rafel O, Ramon J. 1999. Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Options Méditerranéennes, series cahiers*; 41: 289-292.
- Iczkowski KA, Sun EL, Gondos B. 1991. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *American J. Anatomy*; 190: 266-272.
- Lavara R, Mocé E, Andreu E, Pascual JJ, Cervera C, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. 2000. Effects of environmental temperature and vitamin supplements on seminal parameters from a rabbit line selected by high growth rate. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain*; A: 167-171.
- Lunstra DD, Cundiff LV. 2003. Growth and pubertal development in Brahman-, Boran-, Tuli-, Belgian Blue-, Hereford- and Angus-sired F1 bulls. *J. Anim. Sci.*; 81 (6): 1414-1426.
- Mandal DK, Singh K, Tyagi S. 2004. Age related changes in body size and gonadal development of growing Frieswal bulls. *Indian J. Anim. Sci.*; 74 (1): 31-34.
- Macedo AP, Miguel O. 1986. Puberty in New Zealand White rabbits. *Rev. de Fac. De Medicini Vet. e Zootecnia, Univ. de São Paulo*; 23 (1): 55-67.
- Okwun OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra DD, Johnson L. 1996. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boars. *J. Reprod. Fert.*; 107: 137-149.

- Ouhayoun J. 1978. Etude comparative de races different par le poids adulte. Thèse de 3^o cycle, Montpellier: 104.
- Pant HC, Sharma RK, Patel SH, et al. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *Theriogenology*; 60 (1): 27-34.
- Picard-Hagen N, Sourbe O, Lyazrhi F, Coupet H, Hennequin M, Jacob H, Berthelot X. 2002. Effect of precocious collection on semen output and quality in young Holstein bulls. *Theriogenology*; 57: 1511-1522.
- Piles M, Gianola D, Varona L, Blasco A. 2003. Bayesian inference about parameters of a longitudinal trajectory when selection operates on a correlated trait. *J. Anim. Sci.*; 81: 2714-2724.
- Piles M, Rafel O, Ramon J, Gómez EA. 2004. Crossbreeding parameters of some productive traits in meat rabbits. *World Rabbit Sci.*; 12: 139-148.
- Richards, F.J. 1969. The quantitative analysis of growth. In: *Plant physiology*. Steward, F.C. (Ed.) Academic press, 1-76.
- Salhab SA, Zarkawi M, Wardeh MF, Al-Masri MR, Kassem R. 2001. Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, body weight and parental size in growing ram lambs. *Small Ruminant Res.*; 40: 187-191.
- SAS Institute Inc., 2001. *SAS/STAT User's Guide Statistics, Version 8*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schinckel A, Johnson RK, Pumfrey RA, et al. 1983. Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive-performance. *J. Anim. Sci.*; 56 (5): 1065-1076.
- Schinckel A, Johnson RK, Kittok RJ. 1984. Relationships among measures of testicular development and endocrine function in boars. *J. Anim. Sci.*; 58 (5): 1255-1261.
- Tatman SR, Neuendorff DA, Wilson TW, Randel RD. 2004. Influence of season of birth on growth and reproductive development of Brahman bulls. *Theriogenology*; 62: 93-102.
- Theau-Clement M, Michel N, Esparbié J, Bolet G. 1995. Effects of artificial photoperiods on sexual behaviour and sperm output in the rabbit. *Anim. Sci.*; 60: 143-149.
- Thibault C, Levasseur MC. 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. 2d Ed., INRA, Paris (France).
- Tegegne A, Entwistle KW, Mukasamugerwa E. 1991. A quantitative histological study of testicular and epididymal development in boran and boran-x friesland bulls in Ethiopia. *Theriogenology*; 35 (5): 991-1000.

Walker S, Robison OW, Whisnant CS, Cassady JP. 2004. Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars. *J. Anim. Sci.*; 82 (8): 2259-2263.

Zanella E, Lunstra D, Wise T, Kinder J, Ford J. 1999. Testicular morphology and function in boars differing in concentrations of plasma follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*; 60 (1): 115-118.

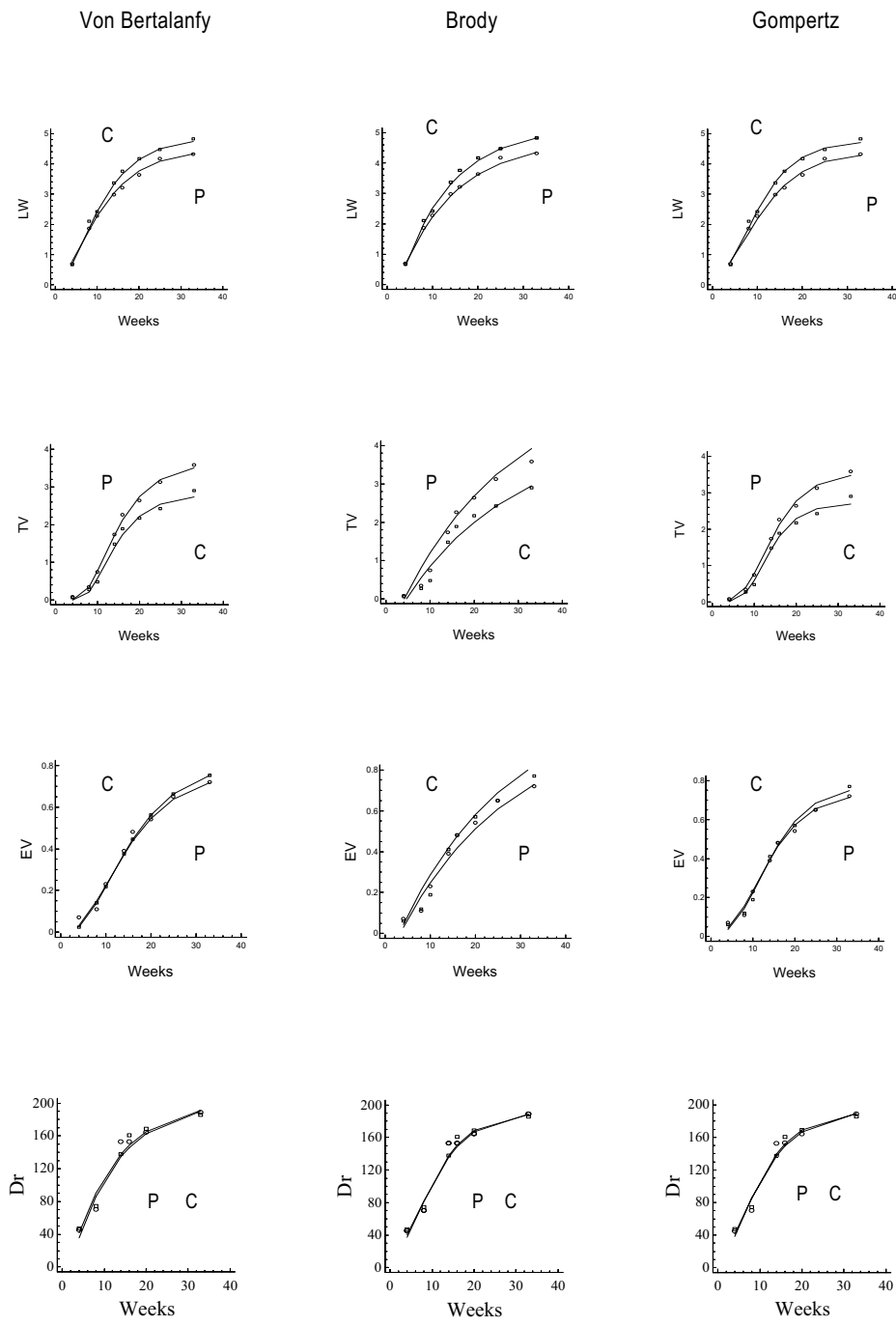


Figure 3.1.1: Adjusted growth curves and average values of LW, TV, EV and Dr according to the line.

TABLE 3.1.1: SUMMARY STATISTICS ACCORDING TO THE AGE OF THE ANIMALS.

Age		LW ¹	TL ¹	TWh ¹	TW ¹	TV ¹	EL ¹	EWh ¹	EW ¹	EV ¹	STL ¹	STES ¹	STS ¹	Dr ¹
4	Mean	0.69	0.79	0.31	0.04	0.07	1.81	0.07	0.02	0.06	-	-	-	46.2
	S.D	0.14	0.08	0.04	0.01	0.02	0.23	0.01	0.005	0.02	-	-	-	6.9
	CV	19.8	10.5	12.8	26.5	26.0	12.7	17.3	22.3	27.1	-	-	-	15.1
8	Mean	1.97	1.57	0.58	0.30	0.31	3.48	0.11	0.11	0.11	-	-	-	72.1
	S.D	0.31	0.21	0.08	0.11	0.13	0.47	0.02	0.01	0.03	-	-	-	10.7
	CV	15.7	13.4	14.0	34.9	41.1	13.5	14.4	41.1	25.3	-	-	-	14.8
10	Mean	2.33	2.0	0.76	0.60	0.59	4.29	0.16	0.18	0.20	-	-	-	-
	S.D	0.38	0.48	0.15	0.36	0.35	0.71	0.03	0.09	0.10	-	-	-	-
	CV	16.1	24.1	19.8	60.7	60.0	16.6	19.6	47.0	50.4	-	-	-	-
14	Mean	3.16	2.82	1.07	1.64	1.60	5.13	0.17	0.38	0.40	48.2	27.4	-	144.6
	S.D	0.38	0.43	0.14	0.42	0.42	0.60	0.02	0.1	0.12	13.9	24.9	-	17.9
	CV	12.2	15.1	12.8	25.3	26.0	11.8	13.6	25.7	30.3	28.8	90.9	-	12.4
16	Mean	3.49	2.92	1.2	2.1	2.1	5.79	0.17	0.47	0.48	47.1	70.6	20.0	154.8
	S.D	0.45	0.39	0.14	0.49	0.46	0.7	0.02	0.13	0.16	15.9	25.7	12.2	13.6
	CV	12.8	13.2	11.4	23.3	22.1	12.1	12.0	26.7	34.2	33.8	36.5	60.7	8.8
20	Mean	3.9	3.07	1.2	2.5	2.4	6.35	0.2	0.59	0.55	62.6	81.7	36.2	166.7
	S.D	0.43	0.24	0.11	0.46	0.51	0.75	0.07	0.09	0.12	8.9	10.6	15.3	9.9
	CV	11.1	7.9	8.9	18.1	21.2	11.8	35.5	15.9	21.5	14.2	12.9	42.3	5.9
25	Mean	4.3	3.1	1.3	2.83	2.76	6.53	0.18	0.64	0.65	-	-	-	-
	S.D	0.33	0.29	0.12	0.66	0.66	0.7	0.04	0.13	0.14	-	-	-	-
	CV	7.7	9.3	9.4	23.3	24.1	10.7	19.7	20.8	22.0	-	-	-	-
33	Mean	4.55	3.27	1.31	3.36	3.24	6.12	0.18	0.77	0.74	64.8	91.3	52.4	187.5
	S.D	0.56	0.33	0.12	0.85	0.86	0.5	0.03	0.13	0.14	13.7	7.2	8.4	6.6
	CV	12.3	10.1	9.3	25.2	26.5	8.1	18.2	17.4	19.2	21.2	7.9	16.0	3.5

¹LW: Live weight, TL: testis length, TWh: testis width, TW: testis weight, TV: testis volume, EL: epididymis length, EWh: epididymis width, EW: epididymis weight, EV: epididymis volume, STL: percentage of seminiferous tubules with presence of lumen, STES: percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids, STS: percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa, Dr: diameter of seminiferous tubules.

TABLE 3.1.2: CORRELATIONS AMONG LIVE WEIGHT, MACROSCOPICAL AND MICROSCOPICAL TRAITS.

	<i>TL</i>	<i>TWh</i>	<i>TW</i>	<i>TV</i>	<i>EL</i>	<i>EWh</i>	<i>EW</i>	<i>EV</i>	<i>STES</i>	<i>STS</i>	<i>Dr</i>
¹ LW	0.20*	0.16*	0.14*	0.16*	0.22*	0.08	0.07	-0.003	-0.07	0.18	-0.01
¹ TL		0.46*	0.71*	0.71*	0.36*	0.04	0.46*	0.33*	0.06	0.02	0.27*
¹ TWh			0.70*	0.68*	0.25*	0.16*	0.31*	0.21*	0.16	-0.04	0.18
¹ TW				0.96*	0.26*	0.06	0.45*	0.29*	0.18	-0.13	0.26*
¹ TV					0.31*	0.03	0.48*	0.33*	0.13	-0.11	0.29*
¹ EL						-0.06	0.32*	0.24*	-0.05	0.22	-0.02
¹ EWh							0.12*	0.07	0.15	0.40*	-0.02
¹ EW								0.85*	0.1	0.02	0.15
¹ EV									0.16	0	0.22*
¹ STES										0.60*	0.54*
¹ STS											0.07

*Significant at the 5% level.

¹LW: Live weight, TL: testis length, TWh: testis width, TW: testis weight, TV: testis volume, EL: epididymis length, EWh: epididymis width, EW: epididymis weight, EV: epididymis volume, STES: percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids, STS: percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa, Dr: diameter of seminiferous tubules.

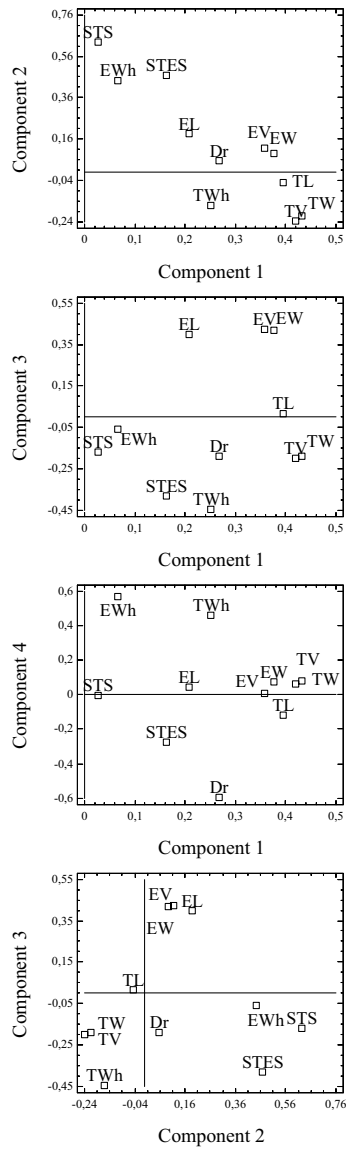


Figure 3.1.2: Projections of the variables in the plane defined by different principal components. TL: testis length, TWh: testis width, TW: testis weight, TV: testis volume, EL: epididymis length, EWh: epididymis width, EW: epididymis weight, EV: epididymis volume, STES: percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatozoa, STS: percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa, Dr: diameter of seminiferous tubules

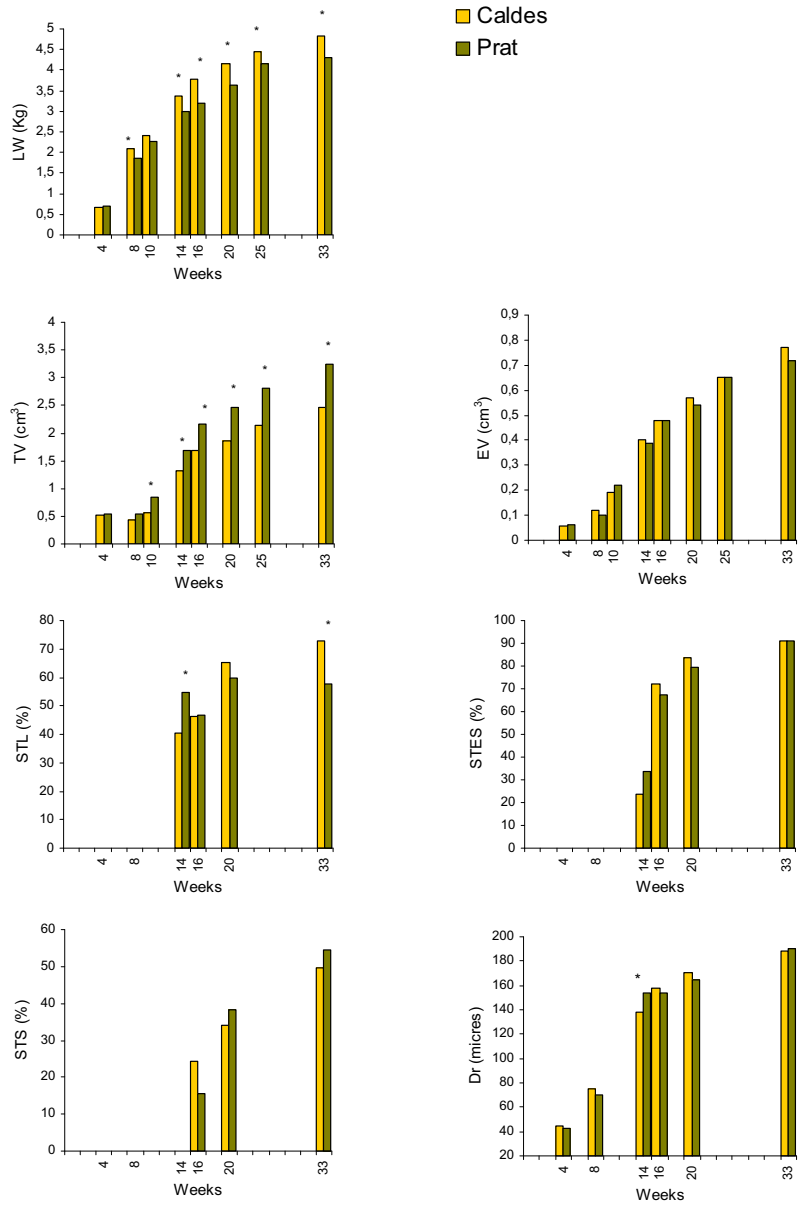


Figure 3.1.3: Age related changes according to the line for the considered variables. Live weight (LW), testis volume (TV), epididymis volume (EV), percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL), percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (STES), percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) and diameter of seminiferous tubules (Dr) in Caldes and Prat bucks. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between lines at the same age: *, $P < 0.05$.

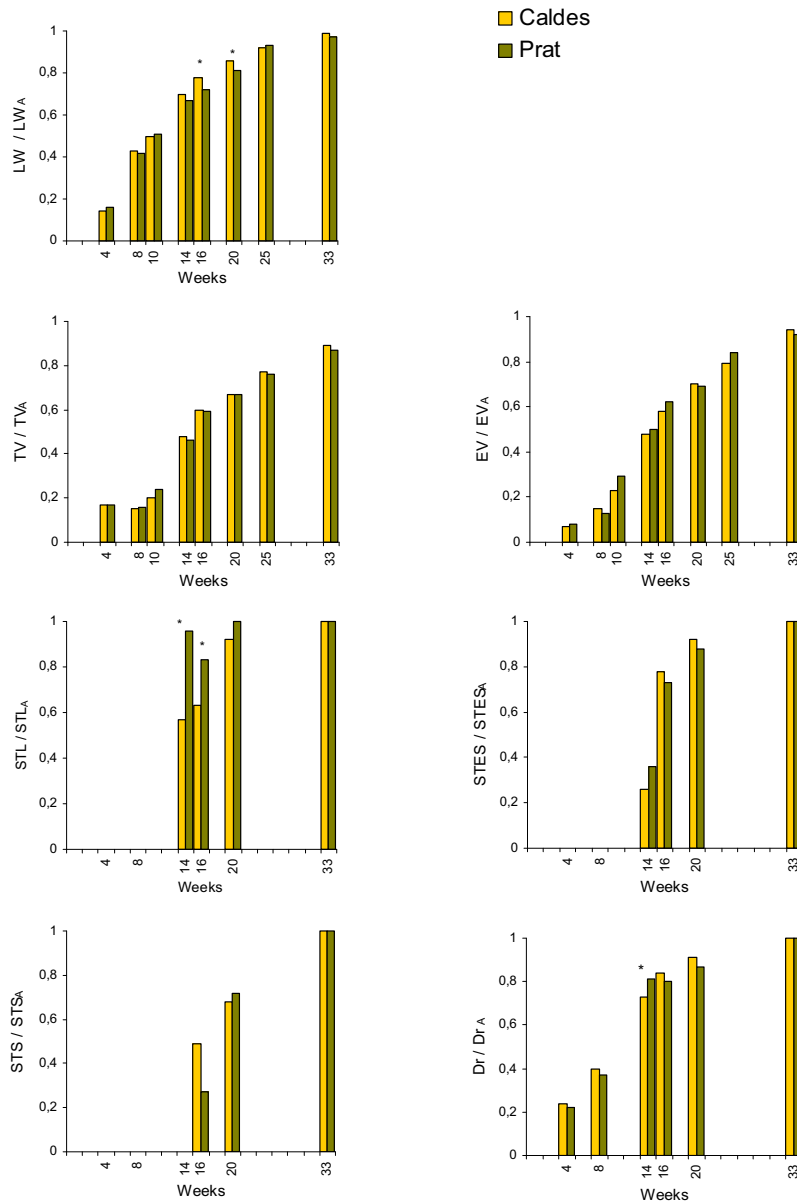


Figure 3.1.4: Age related changes according to the line for the considered variables in relation to their adult value. Live weight (LW), testis volume (TV), epididymis volume (EV), percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL), percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (STES), percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) and diameter of seminiferous tubules (Dr) divided by their own value at adult stage (LW_A, TV_A, EV_A, STL_A, STES_A, STS_A, Dr_A) in Caldes and Prat bucks. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between lines at the same age: *, P < 0.05.

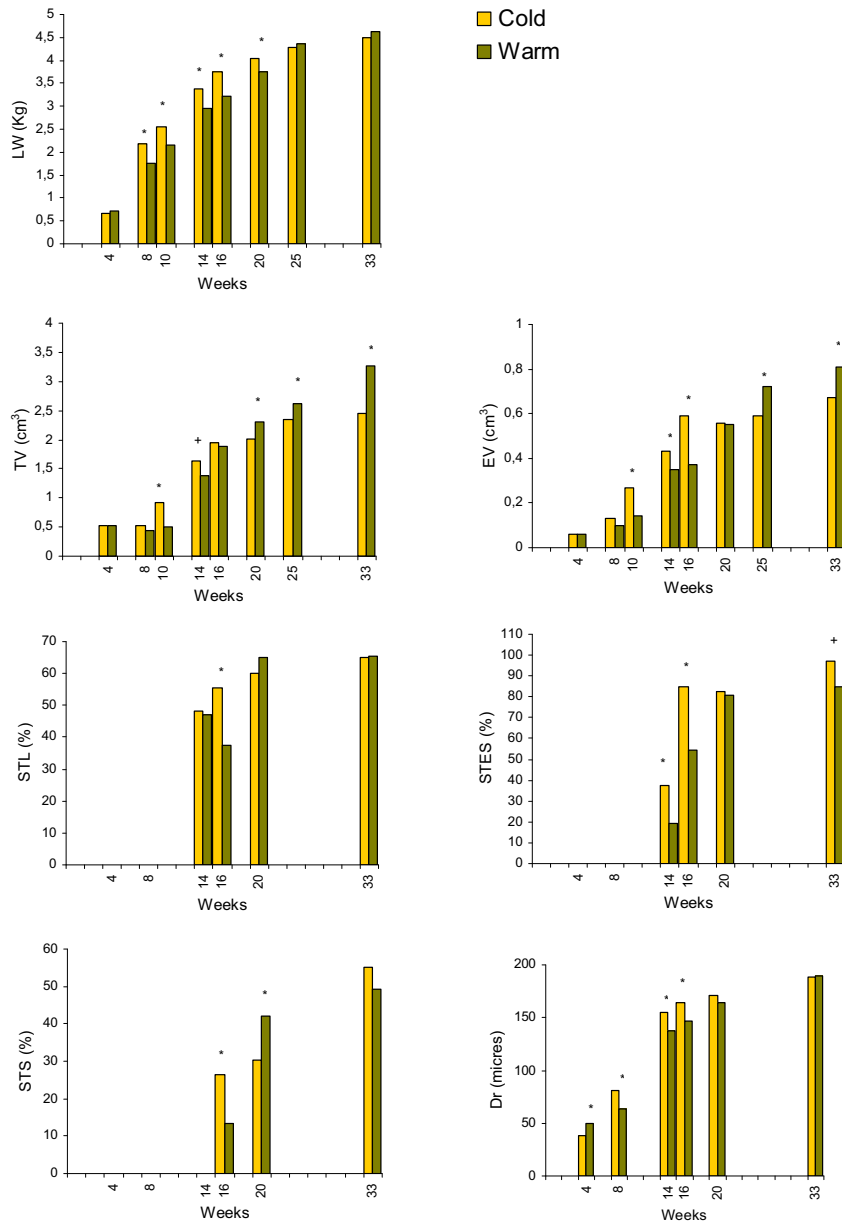


Figure 3.1.5: Age related changes according to the birth season for the considered variables. Live weight (LW), testis volume (TV), epididymis volume (EV), percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL), percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatids (STES), percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) and diameter of seminiferous tubules (Dr) in bucks born in different seasons. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between birth season at the same age: *, $P < 0.05$.

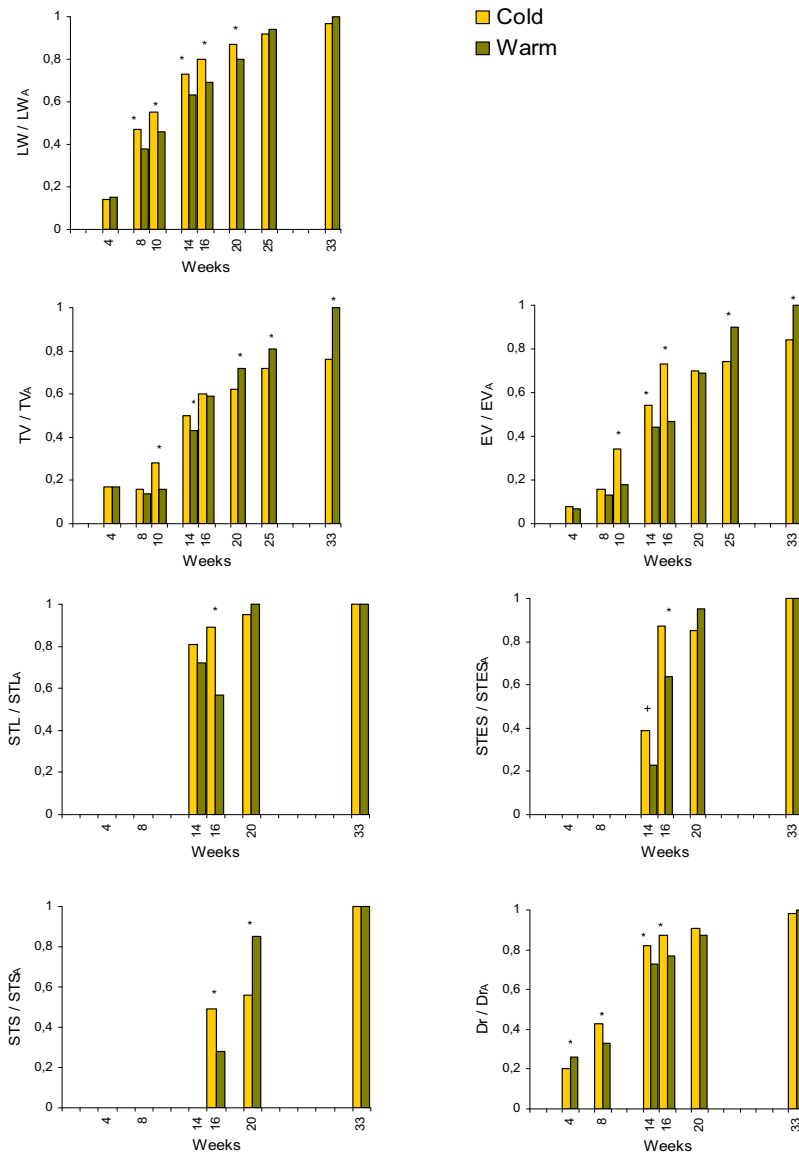


Figure 3.1.6: Age related changes according to the birth season for the considered variables in relation to their adult value. Live weight (LW), testis volume (TV), epididymis volume (EV), percentage of seminiferous tubules with presence of lumen (STL), percentage of seminiferous tubules with presence of elongated spermatozoa ($STES$), percentage of seminiferous tubules with presence of spermatozoa (STS) and diameter of seminiferous tubules (Dr) divided by their own value at adult stage (LW_A , TW_A , TV_A , EW_A , EV_A , STL_A , $STES_A$, STS_A , Dr_A) in bucks born in different seasons. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between birth season at the same age: *, $P < 0.05$

3.2 LINE AND BIRTH-SEASON EFFECTS ON PLASMA TESTOSTERONE AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TESTIS OF MATURING RABBITS¹

3.2.1 Abstract

Oxidative stress is a factor related to the male reproductive function. Differences between breeds have been found for testis size, seminiferous tubule diameter, number and size of interstitial and germ cells, etc. Traits related to the redox system could also be affected by genetic factors. The existence of differences between lines for these traits could lead to differences in reproductive maturation and fertility.

The present paper has investigated the age-related changes of the plasma testosterone concentration (TST), and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) radical formation, superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT) and thiobarbituric acid reacting substances (TBARs) level in testis of rabbits. The existence of differences between lines selected for different aptitudes (Calde for growth rate and Prat for litter size) and the effect of birth season for these traits was assessed.

Major changes in the oxidative metabolism were observed at an early age and could be explained by the concomitant changes in testicular structure and function. Both lines showed similar developmental profiles and levels for all the variables studied. Environmental conditions affected both lines in the same manner. Significant seasonal variations were found in $O_2^{\cdot-}$, SOD and CAT. Future studies should take into account differences between seasons for a more precise analysis.

3.2.2 Introduction

The role of oxidative stress in the male reproductive function has recently gained considerable attention, since standard semen analysis seems not to provide a complete diagnosis of sperm quality and production (Sikka, 2001). The first enzymes involved in the antioxidant mechanisms to suppress oxidative stress are cytosolic Cu-Zn and mitochondrial Mn superoxide dismutases (SODs). Superoxide dismutase scavenges superoxide anion (O_2^-) by converting it to hydrogen peroxide (H_2O_2). Hydrogen peroxide is then metabolized by catalase (CAT) to H_2O plus O_2 . These antioxidant enzymatic mechanisms together with non-enzymatic mechanisms are necessary to avoid the formation of lipid peroxides. Otherwise, H_2O_2 jointly with O_2^- may generate hydroxyl radicals in presence of iron by the Haber-Weiss reaction, which are able to initiate lipid peroxidation leading to deterioration of the cell membrane structure and integrity. Thiobarbituric acid reacting substances (TBARs) can be used to evaluate indirectly the cumulative lipid peroxidation, this variable being mainly a measure of malondialdehyde (MDA), which is a stable end product of lipid peroxidation.

The majority of papers related to oxidative stress and the male reproductive function have studied reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes in ejaculates, seminal plasma and mature spermatozoa. Although a great production of ROS will have negative effects on spermatozoa, several authors have shown that a controlled release of ROS appears to modulate sperm function and that moderate lipid peroxidation is necessary to maximize the fertilizing potential of spermatozoa. Rivlin *et al.* (2004) have found that low concentrations of H_2O_2 are beneficial for bull sperm capacitation, and de Lamirande and Gagnon (1993) have shown that a treatment with O_2^- or H_2O_2 induces capacitation and hyperactivation of human spermatozoa. Also, it has been shown that spermatozoa and seminal plasma of various mammals have significant CAT activity (Jeulin *et al.*, 1989; Foote *et al.*, 2000), therefore oxidative stress in spermatozoa has to be properly controlled since its disruption may otherwise result in sperm damage and infertility.

Testosterone (TST) is a clue for spermatogenesis and affects the production of ROS (Peltola *et al.*, 1996; Chaiy *et al.*, 1997; Aydilek *et al.*, 2004). Testes are very susceptible to peroxidation injury because of their high polyunsaturated fatty acids concentration (Davis *et al.*, 1966). Several authors have found expression and activity of Cu-Zn SOD, Mn SOD, CAT, and Se-Glutathione peroxidase (Gpx) (Gu and Hecht, 1996; Zini and Schlegel, 1996; Samanta *et al.*, 1999) and O_2^- generation (Georgellis *et al.*, 1988) in testes of various mammals. The antioxidant enzyme system of male germ cells shows a different pattern with respect to other organs, with high activity and mRNA levels of SOD and low CAT and Gpx (Gu and Hecht, 1996; Samanta *et al.*, 1999). This pattern has been related to a specific role in spermatogenesis for H_2O_2 .

Environmental, physiological and genetic factors can affect normal spermatogenesis as well as sperm function, thereby altering male fertility. Concerning genetic factors, differences between breeds have been found for some reproductive characteristic such as testis size, seminiferous tubule diameter, number and size of intersti-

tial and germ cells, appearance of elongate spermatids, and spermatozoa in the seminiferous tubules (Berger *et al.*, 1982; Iczkowski *et al.*, 1991; Tegegne *et al.*, 1991). A seasonal depression of fertility has been described in several mammalian species. Seasonal effects on male reproduction have usually been studied through seminal parameters (Theau-Clement *et al.*, 1995; Lavara *et al.*, 2000; García-Tomás *et al.*, 2006), testis size (Carson and Amann, 1972) and serum TST (Boiti *et al.*, 1992; Chiericato *et al.*, 1994). Such studies have normally taken into account the photoperiod with or without regulation of temperature or only the environmental temperature, but not season of birth. The information currently available for the effect of temperature on oxidative stress is very scarce or even non-existent. Bello-Klein *et al.* (2000) have reported seasonal variations for these traits in the heart and liver in rats.

The aim of this study was to investigate the effects of line and birth season on the age-related changes of the plasma TST concentration and oxidative stress (O_2^- generation, SOD and CAT activities, and TBARs level) in maturing rabbit's testis.

3.2.3 Material and Methods

3.2.3.1 Animals

The study involved two rabbit lines (Caldes and Prat) extensively used in intensive meat rabbit production in Spain and Portugal. The Caldes line is a sire line selected on the basis of growth rate by individual selection (Gómez *et al.*, 1999); the Prat line is a maternal line selected on the basis of litter size at weaning (Gómez *et al.*, 1996). These lines show a different kindling rate (80.5 % and 86.2 %, respectively) (Piles *et al.*, 2005) and a different litter size (total number of kits born: 8.16 and 9.68, respectively) when natural matting was used. Animal maintenance as well as field measurements were carried out in the facilities of the experimental farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (Caldes de Montbui, Spain). Animals were born in two different periods: December, which coincides with the cold season in Spain, with an average outdoor temperature of 8.5°C; and May, to July, which corresponds to the warm season, with a medium outdoor temperature of 22.7°C.

After weaning, males were housed 6 per cage and fed commercial rabbit pellets *ad libitum* (15.5% crude protein, 2.3% fat, 17.2% fibre) until 75 days old; then they were placed in individual cages and were subsequently restricted to 180 g/d of another commercial diet (16% crude protein, 4.3% fat, 17% fibre) until sacrifice. Fresh water was available *ad libitum*. The animals were raised with a photoperiod of 16 hours light/day.

Eight bucks per line (Caldes, Prat) and season were sampled at 4, 8, 10, 14, 16, 20 and 33 weeks of age. These ages take into account changes in prepubertal (4, 8 and 10 weeks), pubertal (14, 16 and 20 weeks) and mature (33 weeks) rabbit testis during development.

3.2.3.2 Blood and tissues sampling and preparation

One blood sample of 2.5 ml was obtained from 8 animals per line and birth season by intracardiac puncture at each age. Rabbits were always bled at the same time in the morning (8.00 a.m.). Blood samples were centrifuged at 17310 g for 10 minutes. The plasma samples obtained were stored at -80°C until used for TST measurements.

Rabbits were killed by intravenous administration of potassium pentobarbital 18%. Right testes were removed quickly and placed in ice-cold saline. After removal of the tunica albuginea, the testes were stored at -80°C until the measurement of oxidative stress indicators was carried out.

After thawing, testes were weighed and homogenised with a polytron (PT 3100 Polytron Kinematica AG) at 4°C in 1:10 (w/v) phosphate buffer pH 7.4 (1.59 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 140 mM NaCl). After that, homogenates were sonicated for 3 minutes using an ultrasound-bath.

Protein estimation of samples was made according to the Biuret method with bovine serum albumin as the reference protein.

3.2.3.3 Testosterone concentration

Testosterone, as indicator of sexual maturity, was measured in 0.4 ml of each plasma sample by radioimmunoassay. The samples were previously subjected to ethyl ether extraction to minimize the effect of plasma proteins, to homogenize the conditions of standards and samples, and to improve the sensitivity by concentrating both samples and controls, and then assayed without a preparative chromatography (Chubb *et al.*, 1978). After that, TST was analysed by the DSL-4100 Testosterone RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories). This kit presented a low cross-reactivity (6.6%) with dihydrotestosterone. Results were expressed as ng TST/dl plasma.

3.2.3.4 Oxidative stress parameters

The formation of O_2^- was evaluated by chemiluminescence (Tarpey *et al.*, 1999). Testis aliquots (2.5 mg) were incubated at 37°C for 3 hours in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 μ M EDTA, 100 μ M 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) and 100 μ M N5-(1-iminoethyl)-L-ornithine.dihydrochloride (L-NIO) in either the presence or absence of the SOD mimetic Tiron (10 mM). After incubation, coelenterazine (10 μ M) was added and the light emitted was measured with a luminometer (TD-20/20 Turner Desings DLReadi) for 10 minutes. The O_2^- generation was measured as the difference between samples with Tiron and samples without Tiron and expressed as relative light units (RLU)/mg testis/min.

To assay antioxidant enzymes, homogenates were centrifuged at 416 g for 10 minutes at 4°C. Superoxide dismutase and CAT activities were measured in the supernatant of testis homogenates. Superoxide dismutase activity (cytosolic Cu/Zn) was assayed in 0.8 ml of supernatant spectrophotometrically by monitoring at 414 nm the inhibition of 24 mM pyrogallol autooxidation in the presence of SOD (Marklund, 1985). One unit of SOD is defined as the amount of the enzyme required to inhibit 50% the pyrogallol autooxidation, results were expressed as units of enzyme activity/mg protein. Catalase activity at 25°C was measured spectrophotometrically by using 0.5 ml of the supernatant, following a decrease of H_2O_2 at 240 nm, according to Aebi (1984). The first-order reaction rate (K) of H_2O_2 consumption of catalase was calculated and the results were expressed in K/mg protein.

Lipid peroxidation was estimated in 0.8 ml of crude homogenate as TBARS by the thiobarbituric acid (TBA 1%) method of Yagui (1984). Before reaction with TBA at 90°C for 60 minutes, samples were incubated in trichloroacetic acid (TCA 20%) at 4°C for 90 minutes in order to minimize interaction with proteins. The values of TBARS were expressed as nmol of MDA/mg protein.

3.2.3.5 Statistical analyses

Data from testis and serum were subjected to analysis of variance by using GLM procedures of SAS v.8 (SAS, 2001) according to a model which included the fixed factors of line (two levels: Caldes, Prat), birth-season (two levels: cold, warm), age (6 levels for TST, SOD, CAT and TBARS, and 5 levels for O_2^-) and the double and triple interactions between the fixed factors. When interactions line x age and birth season x age were significant, the variables were analyzed at each age with the same model as before to observe differences between lines or between birth seasons at a specific age.

3.2.4 Results

Table 3.2.1 shows estimated LS means (standard error) of line and birth-season for TST, O_2^- , SOD, CAT and TBARs. No differences were found between lines for any of the studied variables when lines were compared at fixed age. Lines presented similar developmental profiles for TST, SOD and CAT, while there was a significant interaction between line and age for TBARs and O_2^- . There were differences between birth-seasons for O_2^- , SOD and CAT. All the variables showed a significant interaction between birth season and age. No significant interactions between line and season were found for any variable; therefore, differences in environmental conditions affected both genotypes in the same manner.

Figures 3.2.1 and 3.2.2 show the age-related changes of studied variables according to the line and to the birth season, respectively.

3.2.4.1 Testosterone

There were no differences between lines in TST (Fig. 3.2.1). Concentration of TST was very low at 4 weeks (undetected). A notable rise occurred between 4 and 8 weeks, after that TST concentration of Caldes males became constant while Prat males dropped (about 70%) from 8 to 14 weeks and stabilized their concentration at 16 weeks. Bucks born in the warm season had low circulating concentration of TST at pubertal ages (Fig. 3.2.2).

3.2.4.2 Superoxide anion

The Caldes males had steady levels of O_2^- , while Prat males showed a large drop in the O_2^- (about 30%). Moreover, there was only a rise (about 20%) between 14 and 20 weeks (Fig. 3.2.1). Differences between animals born in the cold and in the warm seasons were found (Fig. 3.2.2), being lower the values of animals born in the cold season. Both groups showed different developmental profiles, arriving at a similar value at 33 weeks. The O_2^- production in rabbits born in the cold season dropped progressively. However a O_2^- production rise from 8 weeks to 20 weeks was observed in rabbits born in the warm season; after that, there was an important drop.

3.2.4.3 Superoxide dismutase

With respect to SOD activity, principal changes were also observed between 8 to 16 weeks (Fig. 3.2.1). Mature male rabbits tended to have greater SOD than prepubertal males (about 30%) and pubertal males (about 12%). Animals born in the warm season had more SOD than animals born in the cold season (Fig. 3.2.2), showing different developmental profiles. But both groups had a tendency to increase enzyme activity during maturation of testis, and to reach the similar values at 33 weeks.

3.2.4.4 Catalase

The main changes in CAT activity in both Caldes and Prat bucks occurred between 8-16 weeks (Fig. 3.2.1), after which the developmental profile was steadier. There was a twofold rise from 8 to 10 weeks followed by a large three-fourfold drop from 10 to 16 weeks. Differences between animals born in the cold season and those born in the warm season were found (Fig. 3.2.2). In animals born in the cold season, CAT presented a twofold rise from 8 to 10 weeks and a great eightfold drop from 10 to 20 weeks, after which there were no important changes. On the other hand, the evolution of CAT in animals born in the warm season was stable between 10 and 20 weeks of age.

3.2.4.5 Ratio of Superoxide dismutase activity to Catalase activity

No differences between lines were observed in the ratio SOD/CAT (Fig. 3.2.1). This ratio showed low values from 10 to 14 weeks in the two lines, after that a great increase in this ratio was observed. A different development pattern was obtained between animals born in different season (Fig. 3.2.2). Animals born in the cold season had a low SOD/CAT ratio between 8 and 14 weeks of age, a high ratio at 16 and 20 weeks of age and a moderate ratio at 33 weeks of age. Animals born in the warm season showed a moderate SOD/CAT ratio between 8 and 20 weeks of age, after that an important increment of this ratio was found.

3.2.4.6 Thiobarbituric acid reacting substances

Thiobarbituric acid reacting substances level was very high in the youngest animals (Fig. 3.2.1). The curve dropped about two-fold in Caldes males and about three-fold in Prat males, from 10 weeks to its lowest point at 20 weeks in Caldes males and at 14 weeks in Prat males; after that, the values remained stable. Although only significant differences were found between lines at the prepubertal stage, at 14 weeks Caldes males had a higher TBARs concentration (about 30%). Differences between animals born in a different season were mod-

erate, being higher in animals born in the cold season (Fig. 3.2.2). At 8 weeks, animals born in the warm season had threefold more TBARs than animals born in the cold season; however, from 14 weeks, values of animals born in the cold season were 30% to 60% higher than values of animals born in the warm season. Animals born in the warm season showed a sevenfold drop from 8 to 33 weeks, while the developmental profile of animals born in the cold season was more irregular.

3.2.5 Discussion

Spermatogenesis takes place concomitantly with a great metabolic activity and enormous energy expenditure, resulting in the production of ROS (Maiorino and Ursini, 2002). The antioxidant enzyme pattern in testis is unusual in relation to other organs; high SOD activity/mRNA levels and low CAT activity/mRNA levels are observed (Peltola *et al.*, 1992; Gu and Hecht 1996; Samanta *et al.*, 1999). Hydrogen peroxide has been reported to be beneficial to sperm capacitation (Rivlin *et al.*, 2004) and to induce sperm hyperactivation (de Lamirande and Gagnon, 1993), and it has been hypothesised that it could be involved in the regulation of normal germ cell division and differentiation (Samanta *et al.*, 1999 and Peltola *et al.*, 1992). Thus, oxidative stress in male germ cells is a physiological event when properly controlled and moderate lipid peroxidation is necessary to maximize the fertilizing potential of spermatozoa.

Whether line and season of birth affect testosterone concentration, oxidative stress parameters and their relationship have not yet been studied.

Our general results showed that the two lines studied had similar levels of TST and oxidative stress parameters. However, statistical analyses showed interaction between line and age for TBARs and O_2^- . It is likely that these interactions indicate a different rate of maturation between lines at pubertal stage, although no differences in TST were found. Testicular androgens and specially TST play an important role in the development of accessory reproductive organs and in the differentiation of germ cells (Steinberg, 1974). It has been shown that plasma TST in the New-Zealand strain of rabbit increases from the 40th to the 60th day (consistent with an accelerated testis growth), remained unchanged until the 90th and decreased thereafter (Berger *et al.*, 1982). Similar results were found in the present work.

The main changes in the SOD and CAT activities and lipid peroxidation (TBARs) observed at young ages (8 from 16 weeks), in our study, could be explained by the concomitant changes in testicular structure and function. In rabbit, Iczkowski *et al.* (1991) observed that spermatogonia were visible at 7 to 8 weeks, spermatocytes at 9 weeks and that meiotic activity became abundant by 9 weeks. Berger *et al.* (1982) showed tubular lumen formation from 13 to 14 weeks, elongated spermatids between 14 to 17 weeks and spermatozoa from 17 to 21 weeks. It is likely that these changes depend on the line of rabbits. Ihrig *et al.* (1974) reported the level of CAT

activity in rabbit testis from prepubertal (4 weeks) to mature stages (34 weeks), and described a developmental profile of CAT similar to the profile shown in our work. Superoxide dismutase has been described as essentially localized in pachytene spermatocytes, round spermatids and spermatozoa (38-56% activity) (Bauché *et al.*, 1994) and regulated during mouse spermatogenesis (Gu and Hecht, 1996 and 1997). The developmental profile of SOD in our study can be due to the increase in the meiotic cell population during maturation. Testicular membranes are rich in polyunsaturated fatty acids (Davis *et al.*, 1966) and thus very susceptible to lipid peroxidation injury (Peltola *et al.*, 1992; Chainy *et al.*, 1997; Lucesoli and Fraga, 1999). In the present work, TBARS were high at young age and after that an important decrease was observed as it has also been described in rat testis (Samanta *et al.*, 1999). This may be due to a great production of ROS, as well as to the qualitative and quantitative changes occurring in phospholipids and fatty acid composition in the testis during maturation (Davis *et al.*, 1966; Oshima and Carpenite, 1968). Davis *et al.* (1966) observed in rat testis a decrease in the concentration of stearic acid and oleic acid, both in triglycerides and phospholipids, and an increase in the concentration of the docosapentaenoic acid, in phospholipids, associated with the appearance and maturation of the spermatids. The first fatty acids are related to energy use, while docosapentaenoic acid is related to the adaptative response of membrane.

In the present study we have observed an increase of SOD and a decrease of CAT with the age as showed other authors in rat testis (Peltola *et al.*, 1992; Samanta *et al.*, 1999). Metabolism of O_2^- is presumably controlled to some extent by the induction of antioxidant enzyme activities. Dismutation of O_2^- by SOD generates H_2O_2 , which in turn is converted to water by CAT. Low CAT activity could be related to the need for an increase in H_2O_2 levels during spermatogenesis (Samanta *et al.*, 1999; Peltola *et al.*, 1992). Thus, it has been hypothesised that H_2O_2 may be involved in the regulation of cell division and cell differentiation (Sohal *et al.*, 1986). From our results the rise in the ratio SOD/CAT observed during puberty stage, which was mainly due to a decrease in CAT, could be explained by a requirement of H_2O_2 in the last steps of spermatogenesis.

Both lines showed similar developmental profiles and levels of TST and oxidative stress parameters. It seems that the studied variables, although have a relevant role on sexual maturation, could not affect in an important manner the reproductive aptitude of the two lines.

In our study, O_2^- , SOD and CAT activities showed seasonal differences, but all the variables studied had a significant interaction between season of birth and age. In this sense it has been found a different development pattern between birth-seasons for all the variables.

In rabbits born in the warm season the prepuberty stage (8 weeks of age) was associated to high level of lipid peroxidation and high SOD/CAT ratio that could be related to a negative effect on the spermatogenesis process. At puberty stage rabbits born in the warm season had low concentration of TST, high CAT and low SOD/CAT ratio, which could be related to low percentage of seminiferous tubules with presence of elongate

spermatids and spermatozoa. Boiti *et al.* (1992) and Chiericato *et al.* (1994) also reported that rabbits housed at low temperatures (12°C and 20°C, respectively) had higher plasma TST concentration than rabbits housed at high temperatures (30°C and 27°C, respectively) at 15 weeks old and 10-12 weeks old, respectively. Berger *et al.* (1982) have observed a positive correlation between body weight, testis weight and TST in growing rabbits. Moreover, Piles *et al.* (2004) have reported that summer had negative effects on feed intake because of high temperatures, leading to low values of live and carcass weights and low growth rate. The high levels of plasma TST at puberty stage in animals born in cold season could be related to the stimulating effect of cold environment on the feed intake, since body weight in our animals was higher in males born in the cold season than in males born in the warm season (2.55 ± 0.07 Kg and 2.15 ± 0.07 Kg, respectively at 10 weeks of age and 4.04 ± 0.07 Kg and 3.76 ± 0.07 Kg, respectively at 20 weeks of age). In several mammalian species, a “seasonal sterility” has been described, in which high ambient temperatures could inhibit the secretion of gonadal stimulating hormones, affecting levels of TST and reproductive functionality of males (Alvariño, 2000). Therefore, a direct effect of environmental temperature on TST cannot be ruled out. At mature stage (33 weeks of age) maintenance of TBARs was observed in animals born in the cold and in the warm seasons, although the lipid peroxidation was high in rabbits born in the cold season. In animals born in the cold season the steady O_2^- jointly with the increment in SOD could explain the important rise in CAT and the stable levels of TBARs. Whereas in animals born in the warm season constant SOD together with the drop in O_2^- could mean a less need of CAT to maintain TBARs levels.

The effect of TST on oxidative stress parameters in testis has been studied by several authors, but there is disagreement in their results. Chainy *et al.* (1997) in adult rats and Aydilek *et al.* (2004) in adult rabbits showed decreasing levels of antioxidant enzymes and increasing levels of MDA in response to TST propionate treatment, concluding that the induction of oxidative stress observed in the testis by TST propionate treatment may be due to a decrease in intratesticular TST. However, Peltola *et al.* (1996) have shown that TST propionate treatment reduced the levels of conjugated dienes in adult rat testis and reported that lipid peroxidation occurred in normal steroidogenesis *in vivo*. It has also been reported that aminoglutethimide (Peltola *et al.*, 1996) and hexachlorocyclohexane (Samanta *et al.*, 1999), which are inhibitors of the cytochrome P450 enzymes that are involved in the steroidogenesis, induce lipid peroxidation in the testis, possibly due to a decrease in the intratesticular TST. In the present work, when variables were studied according to the birth season, we observed that animals born in cold season had high concentration of TST, low SOD and CAT and high TBARs at puberty stage, but we did not have experimental evidence that an increment in TST levels leads to higher TBARs levels and fewer antioxidant enzymes activities.

In conclusion, changes in the oxidative metabolism in rabbit testis related to testosterone levels were studied for the first time. Both lines showed similar developmental profiles and levels for all the variables studied, presenting major changes at young ages and being affected by environmental conditions in the same manner.

Significant seasonal variations were found in CAT, SOD and O_2^- . Future studies should take into account differences between seasons for a more precise analysis.

3.2.6 Acknowledgements

This research was supported by UB project 56.5.48.000.00 689.05 (MC 066605) and by INIA project SC 00 - 011. Mónica García received a fellowship from the Generalitat de Catalunya. The authors are grateful to Dra. Martínez de Osaba, Carme Requena, Llibertat Tusell, Núria Aloy, Oscar Perucho and Kelly Casós for valuable cooperation during experimental phase of this study, comments and suggestions.

3.2.7 References

Aebi HE. 1984. Catalase in Vitro. *Method. Enzymol.*; 105: 121-126.

Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbit. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress. Valencia (Spain)*; A: 13- 35.

Aydilek N, Aksakal M, Karakılıç AZ. 2004. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. *Andrologia*; 36: 277-281.

Bauché F, Fouchard MH, Jégou B. 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *Febs Lett.*; 349 (3): 392-396.

Bello-Klein A, Morga-Martins MI, Barp J, Ilesuy S, Bello AA, Singal PK. 2000. Circaannual changes in antioxidants and oxidative stress in the heart and liver in rats. *Comp. Biochem. Phys. C*; 126 (2): 203-208.

Berger M, Jean-Faucher Ch, Turckheim M, Veyssiere G, Blanc MR, Poirier JC, Jean Cl. 1982. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinologica*; 99: 459-465.

Boiti C, Chiericato GM, Filotto U, Canali C. 1992. Effects of high environmental temperature on plasma testosterone, cortisol, T3 and T4 levels in the growing rabbit. *J. Appl. Rabbit Res.*; 15: 447-455.

Carson WS, Amann RP. 1972. The male rabbit VI. Effects of ejaculation and season on testicular size and function. *J Anim Sci.*; 34: 302-309.

Chainy GBN, Samantaray S, Samanta L. 1997. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia*; 29: 343-349.

Chiericato GM, Boiti C, Canali C, Rizzi C, Rostellato V. 1994. Effets de l'age et de la température ambiante sur les concentrations circulantes hormonales chez le lapin. *VIèmes Journées de la Recherche cunicole, La Rochelle (France)*; 1: 137-144.

Chubb C, Ewing L, Irby D, Desjardins C. 1978. Testicular maturation in the rabbit: secretion of testosterone, dihydrotestosterone, 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol and 5 α -androstan-3 β , 17 β -diol by perfused rabbit testes-epididymes and spermatogenesis. *Biol. Reprod.*; 18: 212-218.

de Lamirande E, Gagnon C. 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.*; 16: 21-25.

Davis JT, Bridges RB, Coniglio JG. 1966. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. *Biochem. J.*; 98: 342-346.

Foote RH, Hare E. 2000. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. *J. Andrology*; 21 (5): 664-668.

García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livest. Sci.*; 100: 111-120.

Georgellis A, Tsirigotis M, Rydström J. 1988. Generation of superoxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis. *Toxicol. Appl. Pharm.*; 94: 362-373.

Gomez EA, Rafel O, Ramon J, Baselga M. 1996. A genetic study of a line selected on litter size at weaning. 6th Congress of the World Rabbit Science Association congress, Toulouse (France); 2: 289-292.

Gómez EA, Baselga M, Rabel O, Ramon J. 1999. Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Options Méditerranéennes, series cahiers*; 41: 289-292.

Gu W, Hecht NB. 1996. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J. Andrology*; 17(3): 256-262.

Gu W, Hecht NB. 1997. The enzymatic activity of Cu/Zn superoxide dismutase does not fluctuate in Mouse spermatogenic cells despite mRNA changes. *Exp. Cell. Res.*; 232: 371-375.

Ihrig TJ, Renston RH, Renston JP, Gondos B. 1974. Catalase activity in the developing rabbit testis. *J. Reprod. Fert.*; 39: 105-108.

Iczkowski KA, Sun EL, Gondos B. 1991. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *American J. Anatomy*; 190: 266-272.

Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.*; 24: 185-196.

Lavara R, Mocé E, Andreu E, Pascual JJ, Cervera C, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. 2000. Effects of environmental temperature and vitamin supplements on seminal parameters from a rabbit line selected by high growth rate. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain*; A: 167-171.

Lucesoli F, Fraga CG. 1999. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and α -tocopherol supplementation. *Toxicology*; 132: 179-186.

Maiorino M, Ursini F. 2002. Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol. Chem.*; 383 (3-4): 591-597.

Marklund SL. 1985. Pyrogallol autooxidation. In *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Ratón. FL; 243-247.

Oshima M, Carpenter MP. 1968. The lipid composition of the prepubertal and adult rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 152: 479-497.

Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. Andrology*; 13 (5): 450-455.

Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T, Ahotupa M. 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*; 137: 105-112.

Piles M, Rafel O, Ramon J, Gómez EA. 2004. Crossbreeding parameters of some productive traits in meat rabbits. *World Rabbit Sci.*; 12: 139-148.

Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*; 70 (2): 518-522.

Samanta L, Roy A, Chainy GBN. 1999. Changes in rat testicular antioxidant defence profile as a function of age and its impairment by hexachlorocyclohexane during stages of maturation. *Andrologia*; 31(2): 83-90.

SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide Statistics, Version 8. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2001.

Sohal RS, Allen RG, Nations C. 1986. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *J. Free Radical Biol. Med.*; 2: 175-181.

Steinberg E. 1974. Maturation of male germinal epithelium. In "Control of the onset of puberty (M.M. Grumbach, G.D. Grave and F.E. Mayer, eds). Hohn Wiley & Son, New York; 386-391.

Sikka SC. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.*; 8 (7): 851-62.

Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. 1999. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ. Res.*; 84 (10): 1203-11.

Tegegne A, Entwistle KW, Mukasamugerwa E. 1991. A quantitative histological study of testicular and epididymal development in boran and boran-x friesland bulls in Ethiopia. *Theriogenology.*; 35 (5): 991-1000.

Theau-Clement M, Michel N, Esparbié J, Bolet G. 1995. Effects of artificial photoperiods on sexual behaviour and sperm output in the rabbit. *Anim. Sci.*; 60: 143-149.

Yagi K. Assay for blood plasma and serum. 1984. *Oxygen Radicals in Biological Systems. Method. Enzimol.*; 105: 328-331.

Zini A, Schlegel PN. 1996. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J. Andrology*; 17 (5): 473-480.

TABLE 3.2.1: LS MEANS (STANDARD ERROR) FOR MALE LINE AND SEASON OF BIRTH ON STUDIED VARIABLES.

	¹ TST (ng/dl plasma)	¹ O ₂ ⁻ (RLU/mg tissue/minute)	¹ CAT (K/ mg protein)	¹ SOD (U/ mg protein)	SOD/CAT	¹ TBARs (nmol MDA/ mg protein)
Male line	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
Caldes	169.16 (18.20)	5.37 (0.19)	0.047 (0.002)	6.50 (0.11)	260.4 (32.3)	1.46 (0.07)
Prat	170.43 (18.44)	5.14 (0.19)	0.051 (0.002)	6.72 (0.10)	246.9 (25.5)	1.39 (0.06)
Season of birth	ns	*	*	*	ns	ns
Cold	189.37 (18.54)	4.84 (0.19)	0.058 (0.002)	6.12 (0.11)	239.6 (26.9)	1.45 (0.06)
Warm	150.23 (18.11)	5.67 (0.19)	0.040 (0.002)	7.09 (0.11)	267.7 (31.2)	1.49 (0.06)
Age	*	*	*	*	*	*
Male line x Age	ns	*	ns	ns	ns	*
Season of birth x Age	*	*	*	*	*	*
Male line x Season of birth	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Male line x Season of birth x Age	ns	*	ns	ns	ns	ns

ns (non-significant), * significant at the 5% level.

¹TST: testosterone concentration O₂⁻: superoxide anion radical formation, SOD: superoxide dismutase activity, CAT: catalase activity, TBARs: thiobarbituric acid reacting substances level.

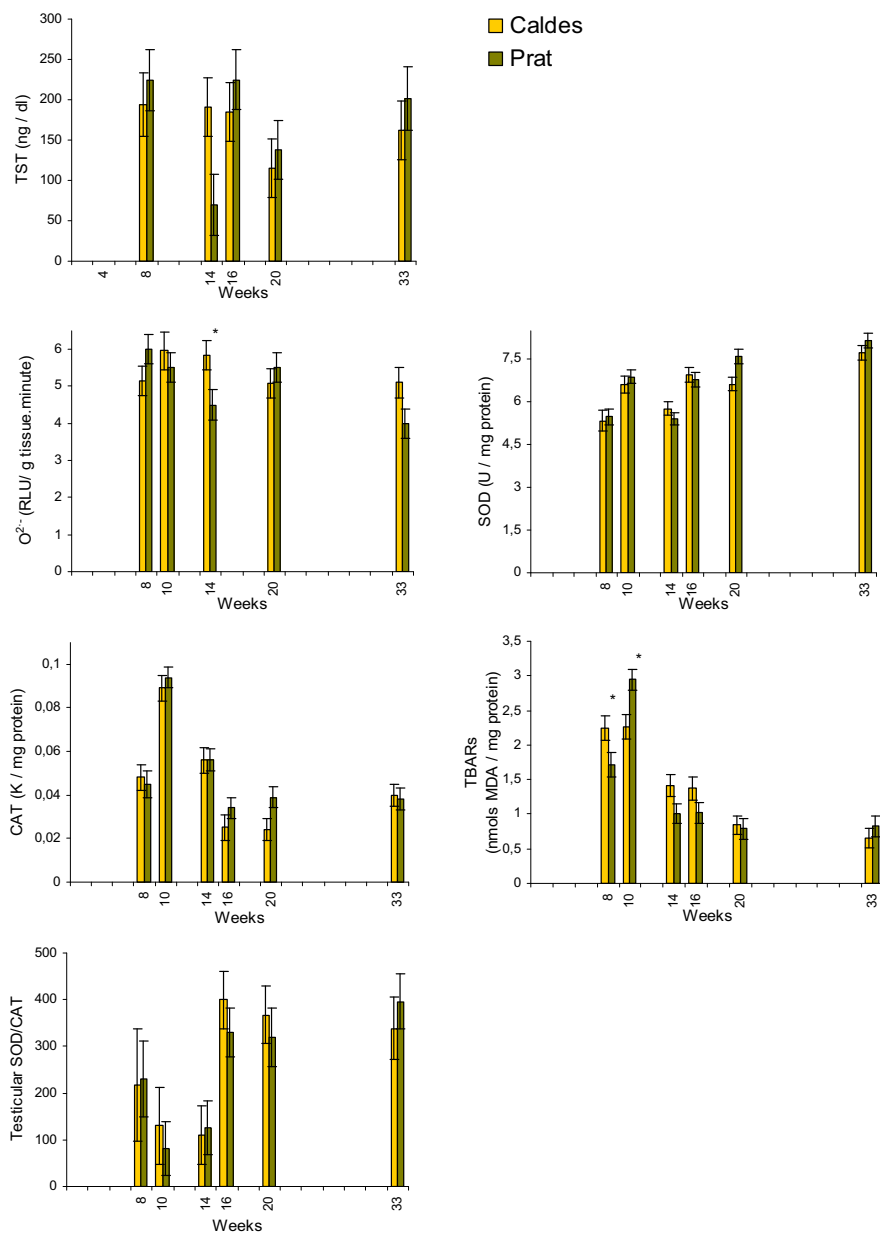


Figure 3.2.1: Age related changes of studied variables according to the line. Testosterone concentration (TST), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) formation, superoxid dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT) and thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) level in Caldes and Prat bucks. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between lines at the same age: *, $P < 0.05$.

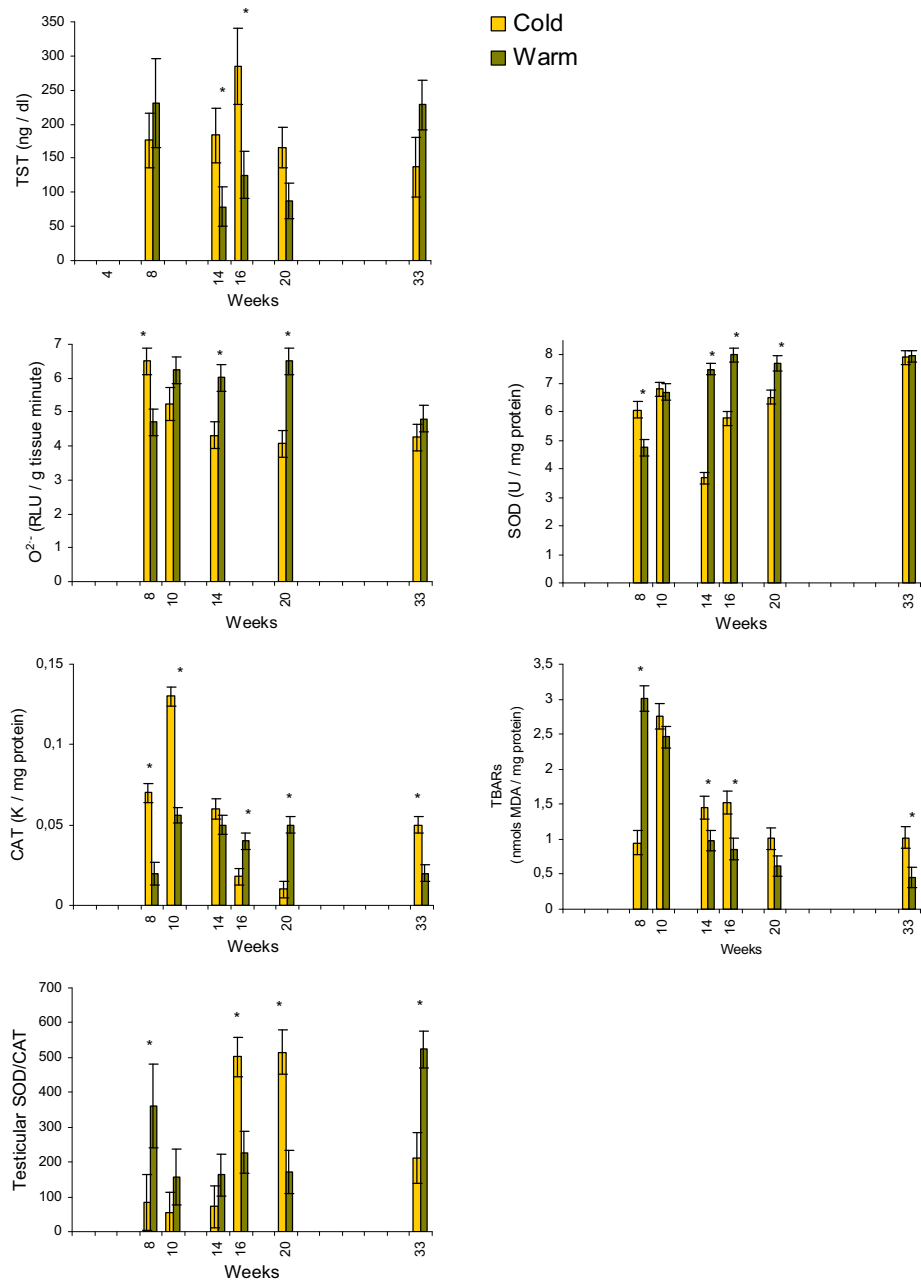


Figure 3.2.2: Age related changes of studied variables according to the birth season. Testosterone concentration (TST), superoxide anion (O_2^-) formation, superoxid dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT) and thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) level in bucks born in different seasons. The age points represent the mean of 10 to 16 animals per rabbit line. The asterisks indicate a significant difference between birth seasons at the same age: *, $P < 0.05$

3.3 VARIABILITY, REPEATABILITY AND PHENOTYPIC RELATIONSHIPS OF SEVERAL CHARACTERISTICS OF PRODUCTION AND SEMEN QUALITY IN RABBIT¹

3.3.1 Abstract

A total of 2041 ejaculates from 153 adult males pertaining to 4 groups of bucks were analysed and the following traits were recorded: pH, ejaculate volume (V), mass motility (Mm), individual motility (Mi), concentration (Cn), total number of spermatozoa per ejaculate (TSE), percentage of sperm viability (Vi), percentage of sperm with acrosome integrity (NAR), percentage of sperm normalcy (Nr), percentage of sperm morphological abnormalities of head (H), neck-midpiece (Nm) and tail (T) and presence of proximal and distal cytoplasmic droplet (Dp, Dd). Principal component (PC) analysis and phenotypic correlations were performed in order to examine the relationships between qualitative and quantitative traits of rabbit semen. The repeatability of the traits measured was also estimated.

Phenotypic correlations between sperm traits were estimated as the residual correlation from an analysis of variance, including the effects of: genetic type of the male, order of the ejaculate, day of collection and the permanent non-additive random effect of the male to which the observation corresponds. The repeatability of these traits was analysed separately, in a set of univariate analyses, using VCE software. The previously defined mixed model was used for this analysis. The principal component analysis was performed using the Princomp procedure of the SAS v.8 package.

The first four PC explained 62 % of total variation: 23 %, 18 %, 12 % and 8 %, respectively. Percentage of sperm viability, NAR, Nr, T and Nm were the predominant variables in the first PC. Mass motility, Mi, pH, V, Cn and TSE were located in the second. Percentage of sperm with the presence of proximal and distal cytoplasmic droplet, NAR, Vi and Nr were the predominant traits in the third and V defined the fourth.

Repeatability of semen quality traits was moderate for most of the traits. The highest values (about 0.45) corresponded to V, Cn, Nr and Dp and the lowest (about 0.10) to H and Nm. Repeatability of the first ejaculate was greater than that of the second for pH, Mm, Mi, H, Dp and Dd.

¹This paper has been published in the journal "Animal Reproduction Science" with the following reference: García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Anim. Reprod. Sci.*; 93: 88-100.

3.3.2 Introduction

Semen quality is usually established through the relationship between its characteristics in the corresponding ejaculate and the result of insemination. However this relationship is still not very well understood, because the evaluation and recording of semen characteristics are not frequently performed and because there are many environmental factors that strongly affect fertility and must be taken into account before drawing reliable conclusions or comparing results from different experiments. Moreover, semen quality is habitually described through indicators corresponding to a wide range of traits: i) qualitative characteristics of the ejaculate (presence or absence of gel, urine or calcium carbonate deposits) ii) characteristics related with the biochemical composition of the ejaculate (enzyme content, fructose content, etc), iii) qualitative characteristics of the spermatozoa (quality of the acrosome, abnormal forms of head, tail or neck-mid piece, different parameters defining their movement, etc) or, iv) characteristics of the insemination dose (volume, concentration). Most of these measurements are correlated, making data analysis more difficult and the interpretation of results in studies concerning their relationship with fertility. It is therefore important to ascertain whether they could be replaced by fewer measurements without a significant loss of information. This would imply obtaining a smaller set of measurements explaining most of the observed variability. This is important when the objective of a research is to assess what are the traits or combinations of traits that better define semen quality. In this case, it is necessary to know relationship between the variables to choose the ones that should included in the multiple regression model to avoid problems due to the co-linearity between them. With this in mind, the first aim of this research was to perform principal component analysis for several semen quality traits using semen from adult males belonging to two selected lines of rabbit and their reciprocal crosses.

As previously mentioned, semen production and quality depends on a great variety of management, environmental and genetic factors (Alvariño 2000): breed, age, sexual preparation, season of collection, number of ejaculates collected and interval between collections. It is important to know the variability of the traits in order to determine the sample size of the experiment, especially in the case of traits that are difficult and expensive to measure, like semen quality traits. It is also essential quantify the relative importance of the different sources of variation associated with a given trait in order to evaluate its possibilities for selection and choose the most efficient method to apply. The second aim of this research was therefore to estimate the variability and repeatability of several semen quality traits, some of which were qualitative characteristics of the spermatozoa. Repeatability indicates the rate of total variation associated with a given trait that is due to the genes controlling that trait and the environmental factors common to all the observations relating to the same individual. This is the upper limit of heritability. Knowledge concerning the repeatability of a given trait is also important for determining the number of measurements that are required for any individual animal in order to guarantee a reliable genetic evaluation and/or to estimate the productive potential of the animal with respect to the trait in question for the purpose of taking decisions relating to culling.

3.3.3 Materials and Methods

The trial was carried out at the experimental farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) in two different periods corresponding to the warm and cold seasons in Spain.

3.3.3.1 Animals

Data related to 153 males from two rabbit sire lines and their reciprocal crosses. After weaning, males were housed in individual cages and subjected to a photoperiod of 16 hours light/day and temperatures ranging from 14 to 24.4 °C. Animals were fed *ad libitum* with commercial rabbit pellets (15.5 % crude protein, 2.3 % fat, 17.2 % fibre) until 60 days of age. They were then restricted to 180 g/d of another commercial diet (16 % crude protein, 4.3 % fat, 17 % fibre). Fresh water was constantly available.

3.3.3.2 Semen collection

At five months of age, bucks started the training period with home made artificial vaginas (containing water at 50 °C) and one ejaculate was collected per male and per week. At six months of age they entered production. For 7 weeks, two ejaculates were collected per male and per week, with an interval of 30 minutes between collections.

3.3.3.3 Semen evaluation and traits

All ejaculates were stored at 37°C in a water bath until their evaluation, performed within 15 minutes after collection. Ejaculates containing urine and calcium carbonate deposits were discarded. The volume (V) and pH of the ejaculate were determined using a graduated tube and a 507 Crison pH-metre, respectively. Gel plugs, when present, were removed before volume evaluation. Mass motility (Mm) was assessed according to a subjective scale ranging from 1 to 5, using aliquots (10µl) of raw semen and a light (Nikon) microscope at x100. Aliquots (10µl) of raw semen were fixed using a vital nigrosin-eosin staining (Bamba, 1988) to allow posterior measurements of sperm quality traits by examining 200 spermatozoa under a light (Olympus CH-3) microscope at x1000 and calculating the following ratios:

- Percentage of sperm viability (Vi)
- Percentage of sperm with acrosome integrity (NAR)

- Percentage of sperm normalcy (spermatozoa without morphological abnormalities) (Nr)
- Percentage of sperm morphological abnormalities of head (H)
- Percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece (Nm)
- Percentage of sperm morphological abnormalities of tail (T)
- Percentage of proximal and distal cytoplasmic droplet (Dp, Dd)

Ejaculates were subsequently diluted (1:5) in a commercial saline extender for rabbit semen (KUBUS m.r.a S.A, Madrid, Spain) and individual motility (Mi) was evaluated under a (Nikon) phase-contrast optic microscope set at x400 using a subjective scale from 0 to 5 (Roca *et al.*, 2000). Finally, the concentration (Cn) was measured using fixed spermatozoa (2% glutaraldehyde) in a Thoma-Zeiss counting cell chamber (final dilution 1:50) and a light (Olympus CH-2) microscope at x400. The synthetic variable total number of spermatozoa per ejaculated (TSE = V * Cn) was also calculated.

3.3.3.4 Statistical analyses

Summary statistics and phenotypic correlations between semen quality traits were obtained using Proc Means and Proc Corr from the SAS v.8 package. Phenotypic correlations between sperm traits were estimated as the residual correlation from an analysis of variance of sperm traits, including the effects of: genetic type of the male (four levels; C, CxR, RxC, R), order of the ejaculate (first and second), day of collection and the permanent non-additive random effect of the male to which the observation corresponds. Repeatability of sperm traits was analysed using VCE software, in a set of univariate analyses and according to a mixed model including same factors as the ones previously defined. Repeatability was estimated for each rank of ejaculates and for the average of the two ejaculates and according to the formula $r = \sigma_S^2 / \sigma_S^2 + \sigma_e^2$; where σ_S^2 is the sire variance and σ_e^2 is the error variance.

A principal component analysis was performed using the Princomp procedure from the SAS v.8 package. This technique reduces the whole set of n correlated variables to n uncorrelated linear functions of the original measurements. The first principal component is the linear combination of all of the variables showing the maximum variation among the samples. The second, third and further components are similarly linear combinations representing the next largest variations, irrespective of those represented by previous components.

3.3.4 Results

Table 3.3.1 shows summary statistics of the recorded traits. The most remarkable was the high level of variability in the percentages of sperm morphological abnormalities, Cn and TSE.

Table 3.3.2 shows repeatability of quantitative semen quality traits calculated for samples from the first ejaculate, from the second ejaculate and from both. Repeatability was moderate for most of the traits. The highest values (about 0.45) corresponded to V, Cn, Nr and Dp. The lowest values (about 0.10) corresponded to H and Nm - two particular classes of abnormal forms of spermatozoa. Repeatability of the first ejaculate was higher than for the second for pH, Mm, Mi, H, Dp and Dd. However, the other traits showed similar values for both ejaculates.

Figures 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 and 3.3.4 show the results of principal component (PC) analysis and table 3.3.3 shows the coefficients of correlation between all the variables considered. The first four PC explained 62 % of total variation (23 %, 18 %, 12 % and 8 %, respectively). Percentage of sperm viability, NAR, Nr, T and Nm were the predominant variables defining first PC since they were distributed far from the origin. However, only Nm and T were close to this axe. Percentage of sperm viability, NAR and Nr were also the predominant variables defining the third PC since they were at the same distance from the planes defined by PC1 and PC2 and PC3 and PC2. Variables related with the presence of cytoplasmic droplets in the spermatozoa were far from the origin and close to the third PC, being the variables that better define this axe. Percentage of sperm viability and NAR showed a high and positive correlation between them (0.98). These two variables and Nr showed a negative correlation with the group of variables defining spermatozoa abnormalities (Nm, T, H, Dp and Dd). This correlation was moderate to high and negative between Vi and Nm (-0.38), NAR and Nm (-0.48), Nr and T (-0.72), Nr and Nm (-0.45). A positive correlation was observed between Dp and Dd (0.28): the two traits laid near each other in the plane defined by the second PC. All the variables used for measuring different kinds of morphological abnormalities showed low correlations between them, especially T with Dp and Dd since they were in different PCs.

Variables measuring spermatozoa motility, pH and the number and concentration of spermatozoa in the ejaculate were located on a second PC. As expected, the correlation between the two measurements of motility was moderately and positively correlated (0.52). The correlation between TSE and Cn was also very high (0.87), the points were almost at the same position on the plane defined by the first two PCs; whereas, the correlation between TSE and V (0.19) was very low. TSE and Cn were also positively correlated with Mm (0.39 and 0.47, respectively) and Mi (0.34 and 0.35, respectively). The correlation between pH and Mm, Mi, Cn and TSE was moderate and negative (-0.41, -0.48, -0.41 and -0.41, respectively). Individual motility was found low but positively correlate with Vi and NAR (0.27 and 0.21, respectively) since they are in different PCs, indicating a little greater progressive movement of sperm corresponding to a higher viability and acrosome integrity of the sper-

matozoa. A small but opposite relationship was observed between Mm and Mi, and Dp (-0.12 and -0.17, respectively). The variable pH showed a low and negative correlation with Vi and NAR (-0.24 and -0.19 respectively).

The V seems important in the definition of the 4th PC. It was not related with most of the traits.

3.3.5 Discussion

Similar values for the overall means were reported elsewhere (Kuzminsky *et al.*, 1996; Alvariño, 2000), with the exception of V and morphological abnormalities. The V parameter exhibited values almost twice as high as those reported by Vicente *et al.* (1996) in line R, and by Castellini *et al.* (1999) in hybrid bucks. On the contrary, Vi and Nr values were smaller than those obtained by Echegaray-Torres *et al.* (2004) or by Nagy *et al.* (2001). The values obtained for H and T were lower than those reported by Radnai *et al.* (1988), Finzi *et al.* (1995) and Kuzminsky *et al.* (1996), while values for Nm were higher than those reported by the same authors. These differences could be explained by genetic and environmental factors but also by the application of different criteria for the evaluation of sperm abnormalities and the use of different semen processing technologies. The high level of variability in the percentages of sperm morphological abnormalities, Cn and TSE has also been previously reported (Finzi *et al.*, 1995; Kuzminsky *et al.*, 1996).

Repeatability of the semen production and quality traits was moderate for most them, indicating that almost half of the observed phenotypic variance was due to male-related sources of variation. As expected, the repeatability of Dp, which is directly related with the maturity of the spermatozoa (Bonet *et al.*, 2000), was high. The repeatability of Nm showed the lowest value; according to our criteria abnormalities of sperm neck-midpiece suppose a separation between the head and the tail of the spermatozoa, a rupture of the middle part of the tail and/or a thickening of the midpiece, someone of these causes could be affected to the management semen samples. The values obtained in this experiment were, generally, in line with those previously reported by Bencheikh (1995), and Brun *et al.* (2002) but were greater than those reported by Battaglini *et al.* (1992). However, there are no previous studies concerning the repeatability of these traits: Vi, NAR, Nr, Dp, Dd, H, T and Nm in rabbits.

Percentage of sperm viability and NAR were located in almost the same position on the plane defined by the first and second PC, this indicated that they are measuring practically the same phenomena. NAR measure the integrity of the acrosome membrane, while Vi makes reference to the integrity of the plasmalemma. Most of the time, the disintegration of the acrosome membrane led to staining of the spermatozoa and to a subsequent loss of viability.

Percentage of sperm viability, NAR and Nr were separated from the group of variables defining spermatozoa abnormalities (Nm, T, H, Dp and Dd) by 180°, which indicated a negative correlation between the two groups of variables. The correlation between Vi and NAR was especially high and negative with Nm. The first two causes of abnormalities of sperm neck-midpiece (previously mentioned) could affect the integrity of the plasmalemma leading to a decrease in Vi and NAR. As expected, the percentage of sperm normalcy was highly and negatively correlated with all types of morphological abnormalities (H, Nm, T, Dp and Dd) corresponding the magnitude of these correlations with the distance between them in figure 1. The correlation was especially high between Nr and T and between Nr and Nm. These types of abnormalities were much more frequent than the others, as it has been also observed by Kuzminsky *et al.* (1996) and Finzi *et al.* (1995). This is interesting from a practical point of view, since T and Nm are easily detected under a light microscope at x400. This equipment is usually available in artificial insemination centres. The relationship between Nm and Nr could also explain the positive correlation between Nr and Vi and NAR.

All the variables used for measuring different kinds of morphological abnormalities were low correlated, suggesting that most of the causes that lead to them could be different, particularly since they have different origins. For example, H and Nm originate in the testicular region (Axner *et al.*, 1999 in cat; Perez-Sanchez *et al.*, 1997 in rabbit; Toyama *et al.*, 1996 in boar) while the morphogenesis of T and the migration of the cytoplasmic droplet occur in the epididymis (Axner *et al.*, 1999; Perez-Sanchez *et al.*, 1997 in rabbit; Calvo *et al.*, 1997 in hamster; Holt, 1982 in boar). However, this relationship was positive indicating that semen with presence of some morphological abnormality tends to exhibit certain other kinds of abnormalities. Panidis *et al.* (1988) and Rousso *et al.* (2002) have also observed, in men, that spermatozoa with abnormal heads presented significantly more neck, tail and cytoplasmic droplet abnormalities. Bonet *et al.* (2000), in pigs, reported that immature spermatozoa, which usually present cytoplasmic droplets, greater development of the acrosome apical protuberance and greater flexibility of the head, are often more fragile than mature spermatozoa.

Variables measuring spermatozoa motility, pH, V and the number and concentration of spermatozoa in the ejaculate were located on a second PC. This indicated a variation that was not related to variables defining morphological abnormalities or to the integrity of spermatozoa membranes, since the entire PC revealed uncorrelated linear trait combinations. Thus, the correlations that we observed between those two groups of variables were always very low: Mi and Vi and NAR; Mm and Mi and Dp; pH and Vi and NAR.

The high and positive correlation between Mm and Mi confirmed findings by Bencheikh (1995). The correlation between TSE and Cn was much higher than that between TSE and V, indicating that differences in this synthetic variable were mainly due to differences in Cn. This result was also reported by Brun *et al.* (2002). TSE and Cn were also positively correlated with Mm and Mi, as previously reported by Battaglini *et al.* (1992), Bencheikh (1995) and Brun *et al.* (2002). The antagonistic relationship between pH and Mm, Mi, Cn and TSE has also been reported by Battaglini *et al.* (1992), Bencheikh (1995) and Brun *et al.* (2002). This could be ex-

plained by the metabolic activity of the spermatozoa, which release lactic acid, causing a reduction in pH (Brun *et al.*, 2002). The negative correlation between pH and Vi and NAR was also reported by Bencheikh (1995).

The positive correlation observed between Dp and Dd was expected, since both abnormalities are signs of immature sperm.

The positive relationship between V and Cn was also found by Bencheikh (1995). Brun *et al.* (2002) did not find significant correlations between V and any other elementary trait.

3.3.6 Conclusion

High variability was found for concentration, percentage of spermatozoa with the presence of proximal and distal cytoplasmic droplet and the presence of some morphological abnormalities. The repeatability of most semen quality traits was moderate, indicating that almost half of the observed phenotypic variance was due to sources of variation related with the male. The most repeatable traits were those defining semen production (volume and concentration), percentage of sperm normalcy and percentage of spermatozoa with the presence of proximal cytoplasmic droplet, with the latter being related to the maturity of the spermatozoa. These traits could be improved by selection, but more research is needed in order to know their genetic parameters. Traits defining certain particular morphological abnormalities of spermatozoa were the least repeatable.

Four principal components (PC) explained 62 % of the total variation. Semen quality traits were grouped in non-related sets: variables related with morphology and the integrity of spermatozoa membrane; variables measuring pH, spermatozoa motility and the concentration; and volume of the ejaculate. Our results showed three groups of variables that correlated highly amongst themselves, which suggests that they could be used to measure the same phenomena: the percentage of sperm viability and percentage of sperm with acrosome integrity; mass and individual motility; and the percentage of sperm normalcy and the percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece and tail. Therefore, the most easily obtained valuable variable could be used in order to improve the efficacy of the evaluation of semen characteristics in laboratories or artificial insemination centres.

3.3.7 Acknowledgment

The research was supported by the INIA project SC 00 - 011 and the UB project 56.5.48.000.00 689.05 (MC 066605). Mónica García received fellowship from Generalitat de Catalunya.

3.3.8 References

Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbit. Proceedings of the 7th World Rabbit Congress. Valencia (Spain); A: 13- 35.

Axner E, Linde-Forsberg C, Einarsson S. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*; 52(5): 767-78.

Bamba K. 1988. Evaluation of acrosome integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*; 29: 1245-1251.

Battaglini M, Castellini C, Lattaioli P. 1992. Variability of the main characteristic of rabbit semen. *J. Appl. Rabbit Res.*; 15: 439-446.

Bencheikh N. 1995. Effect de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoids récoltés chez le lapin. *Ann. Zootech.*; 44: 263-279.

Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. 2000. *Morfología Espermática en Porcí*. Institut d'Estudis Catalans, 1^a edition, Barcelona, Spain.

Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002. Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. *Anim. Res.*; 51: 433-442.

Calvo A, Martinez E, Pastor LM, Vazquez JM, Roca J. 1997. Classification and quantification of abnormal sperm along the epididymal tract. Comparaison between adult and aged hamsters. *Reprod. Nutr. Dev.*; 37(6): 661-673.

Castellini C, Lattaioli P. 1999. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*; 57: 111-120.

Echegaray-Torres JL, Olvera-Carmona JA, Salcedo-Baca R, Mendoza-Alvarez B. 2004. Quality and fertility of preserved rabbit semen at 15 °C, in gelatine supplemented extender. Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico; 258-262.

Finzi A, Morera P, Kuzminsky G. 1995. Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Sci.*; 3(4): 157-161.

- Holt W. 1982. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J. Reprod. Fertil.*; 64(2): 485-489.
- Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.*; 36: 565-575.
- Nagy S, Sinkovics G, Kovacs A. 2001. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in gelatin-supplemented extender. *Anim. Reprod. Sci.*; 70: 283-286.
- Panidis D, Vlassis G, Vayionas M, Matalliotakis I, Kalogeropoulos A. 1988. Coexistence of spermatozoa morphological abnormalities in the semen of potentially fertile men. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.*; 29(4): 281-286.
- Perez-Sanchez F, Tablado L, Soler C. 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*; 47: 893-901.
- Radnai I. 1988. Investigations on semen abnormalities of Angora rabbits. *Proceedings of the 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary*; 465-469.
- Rousso D, Kourtis A, Mavromatidis G, Gkoutzioulis F, Makedos G, Panidis D. 2002. Pyriform head: a frequent but little-studied morphological abnormality of sperm. *Arch. Andrology*; 48(4): 267-272.
- Roca J, Martinez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*; 64: 103-112.
- Toyama Y, Itoh Y. 1996. Ultra structural features and pathogenesis of decapitated spermatozoa in boar. *Andrologia*; 28 (2): 109-115.
- Vicente JS, Viudes de Castro MR, Lavara R, Lavara F. 2000. Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. *7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain)*; A: 1273-277.

TABLE 3.3.1: SUMMARY STATISTICS

	<i>pH</i>	<i>V</i> ¹ (ml)	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn</i> ¹ (x10 ⁶ /ml)	<i>TSE</i> ¹ (x10 ⁶)	<i>Vi</i> ¹ (%)	<i>NAR</i> ¹ (%)	<i>Nr</i> ¹ (%)	<i>H</i> ¹ (%)	<i>Nm</i> ¹ (%)	<i>T</i> ¹ (%)	<i>Dp</i> ¹ (%)	<i>Dd</i> ¹ (%)
N ²	1917	1546	1809	1805	1783	1783	885	885	885	885	885	885	885	885
Mean	7.63	1.19	2.76	2.58	245.35	297.23	81.14	83.01	86.14	0.55	3.51	6.62	1.2	1.97
SD ²	0.59	0.43	0.90	1.64	227.08	280.39	11.56	10.98	8.11	0.73	3.11	5.55	1.59	2.41
CV ²	7.73	36.13	32.61	63.56	92.55	94.33	14.25	13.23	9.41	132.73	88.6	83.83	132.5	122.33

¹V: volume of the ejaculate, Mm: mass motility, Mi: individual motility, Cn: concentration, TSE: total number of spermatozoa per ejaculate, Vi: percentage of sperm viability, NAR: percentage of sperm with acrosomal integrity, Nr: percentage of sperm normalcy, H: percentage of sperm morphological abnormalities of head, Nm: percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece, T: percentage of sperm morphological abnormalities of tail, Dp: percentage of sperm with proximal cytoplasmic droplet, Dd: percentage of sperm with distal cytoplasmic droplet.

²N: Number of observation, SD: standard deviation, CV: coefficient of variation.

TABLE 3.3.2. REPEATABILITY OF QUANTITATIVE SEMEN QUALITY TRAITS (STANDARD ERROR)

	<i>pH</i>	<i>V</i> ¹ (ml)	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn</i> ¹ (x10 ⁶ /ml)	<i>TSE</i> ¹ (x10 ⁶)	<i>Vi</i> ¹ (%)	<i>NAR</i> ¹ (%)	<i>Nr</i> ¹ (%)	<i>H</i> ¹ (%)	<i>Nm</i> ¹ (%)	<i>T</i> ¹ (%)	<i>Dp</i> ¹ (%)	<i>Dd</i> ¹ (%)
Ejaculate														
1	0.45 (0.027)	0.46 (0.03)	0.41 (0.028)	0.43 (0.028)	0.48 (0.028)	0.41 (0.028)	0.20 (0.038)	0.20 (0.037)	0.45 (0.039)	0.085 (0.034)	0.14 (0.041)	0.39 (0.04)	0.47 (0.043)	0.31 (0.04)
2	0.38 (0.028)	0.4 (0.03)	0.36 (0.028)	0.28 (0.026)	0.43 (0.029)	0.43 (0.33)	0.18 (0.037)	0.18 (0.037)	0.38 (0.04)	0.073 (0.032)	0.11 (0.036)	0.39 (0.042)	0.37 (0.042)	0.19 (0.039)
1 and 2	0.38 (0.023)	0.38 (0.025)	0.37 (0.024)	0.35 (0.023)	0.39 (0.024)	0.33 (0.022)	0.18 (0.024)	0.18 (0.024)	0.42 (0.03)	0.085 (0.019)	0.14 (0.024)	0.39 (0.031)	0.44 (0.03)	0.25 (0.028)

¹V: volume of the ejaculate, Mm: mass motility, Mi: individual motility, Cn: concentration, TSE: total number of spermatozoa per ejaculate, Vi: percentage of sperm viability, NAR: percentage of sperm with acrosome integrity, Nr: percentage of sperm normalcy, H: percentage of sperm morphological abnormalities of head, Nm: percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece, T: percentage of sperm morphological abnormalities of tail, Dp: percentage of sperm with proximal cytoplasmic droplet, Dd: percentage of sperm with distal cytoplasmic droplet.

TABLE 3.3.3. COEFFICIENTS OF CORRELATION BETWEEN THE VARIABLES INCLUDED IN THE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

	<i>pH</i>	<i>V</i> ¹	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn</i> ¹	<i>TSE</i> ¹	<i>Vi</i> ¹	<i>NAR</i> ¹	<i>Nr</i> ¹	<i>H</i> ¹	<i>Nm</i> ¹	<i>T</i> ¹	<i>Dp</i> ¹
<i>pH</i>													
<i>V</i>	-0.07*												
<i>Mm</i>	-0.41*	-0.16*											
<i>Mi</i>	-0.48*	-0.02	0.52*										
<i>Cn</i>	-0.41*	-0.1*	0.47*	0.35*									
<i>TSE</i>	-0.41*	0.19*	0.39*	0.34*	0.87*								
<i>Vi</i>	-0.24*	-0.07	0.11	0.27*	-0.01	-0.04							
<i>NAR</i>	-0.19*	-0.04	0.06*	0.21*	-0.05	-0.07*	0.98*						
<i>Nr</i>	-0.02	0.06	-0.02	0.04	-0.14*	-0.13*	0.23*	0.28*					
<i>H</i>	0.03	-0.04	0.03	0.02	-0.01	0.01	0.09	0.04	-0.17*				
<i>Nm</i>	0.02	0.05	-0.02	-0.03	0	0.02	-0.38*	-0.48*	-0.45*	0.07*			
<i>T</i>	0.01	-0.03	0.04	0.04	0.21*	0.21*	-0.15*	-0.16*	-0.72*	0.09*	0.11*		
<i>Dp</i>	0.16*	-0.04*	-0.12*	-0.17*	-0.13*	-0.14*	-0.04	-0.07	-0.38*	0.11*	0.12*	0.04	
<i>Dd</i>	-0.04	-0.09*	0	-0.02	-0.03	-0.08*	0.05	0	-0.32*	0.09*	0.09*	0.01	0.28*

* significant at the 5% level.

V: volume of the ejaculate (ml), *Mm*: mass motility, *Mi*: individual motility, *Cn*: concentration (x10⁶/ml), *TSE*: total number of spermatozoa per ejaculate (x10⁶), *Vi*: percentage of sperm viability, *NAR*: percentage of sperm with acrosome integrity, *Nr*: percentage of sperm normalcy, *H*: percentage of sperm morphological abnormalities of head, *Nm*: percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece, *T*: percentage of sperm morphological abnormalities of tail, *Dp*: percentage of sperm with proximal cytoplasmic droplet, *Dd*: percentage of sperm with distal cytoplasmic droplet.

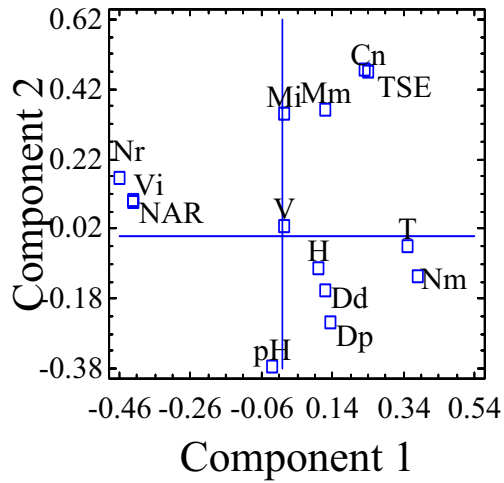


Figure 3.3.1. Projection of the variables in the plane defined by the first and second principal components. Abbreviations: V: volume of the ejaculate, Mm: mass motility, Mi: individual motility, Cn: concentration, TSE: total number of spermatozoa per ejaculate, Vi: percentage of sperm viability, NAR: percentage of sperm with acrosome integrity, Nr: percentage of sperm normalcy, H: percentage of sperm morphological abnormalities of head, Nm: percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece, T: percentage of sperm morphological abnormalities of tail, Dp: percentage of sperm with proximal cytoplasmic droplet, Dd: percentage of sperm with distal cytoplasmic droplet.

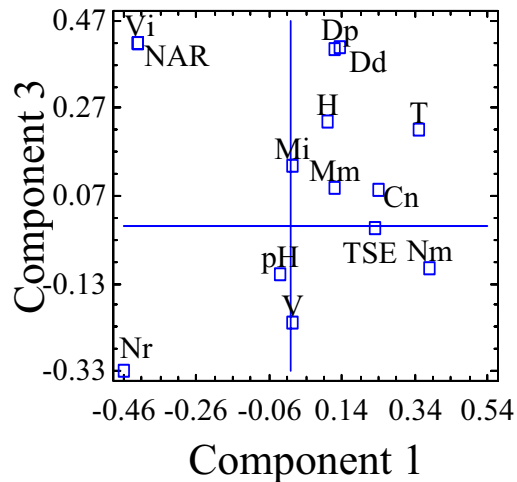


Figure 3.3.2. Projection of the variables in the plane defined by the first and third principal components. The abbreviations are the same as in figure 3.3.1.

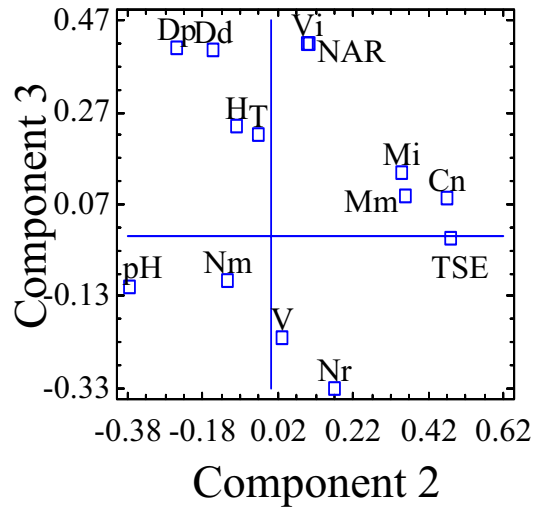


Figure 3.3.3. Projection of the variables in the plane defined by the second and third principal components. The abbreviations are the same as in figure 3.3.1.

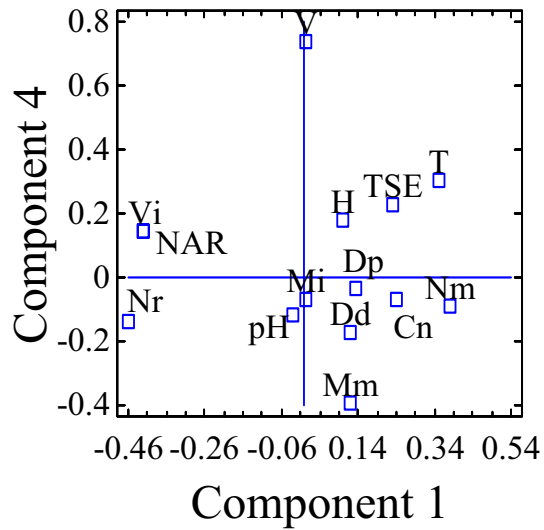


Figure 3.3.4. Projection of the variables in the plane defined by the first and fourth principal components. The abbreviations are the same as in figure 3.3.1.

3.4 HETEROSIS, DIRECT AND MATERNAL GENETIC EFFECTS ON SEMEN QUALITY TRAITS OF RABBITS¹

3.4.1 Abstract

A complete diallel cross involving two rabbit sire lines (C and R) was carried out to estimate the crossbreeding genetic parameters of seminal traits. 2041 solicitations from 153 males were analyzed. The traits studied were: presence of gel plugs (G), urine (U), and calcium carbonate deposits (CC), number of useful ejaculates (UE), pH, volume (V), mass and individual motility (Mm, Mi), useful Mi (UM), concentration (Cn), number of spermatozoa per ejaculate (TSE), percentage of viable spermatozoa (Vi), spermatozoa with normal apical ridge (NAR), normal spermatozoa (Nr), spermatozoa with morphological abnormalities of head (H), neck-midpiece (Nm), and tail (T), presence of proximal and distal cytoplasmic droplet (Dp, Dd).

Estimates of heterosis, direct and maternal genetic effects were obtained from the solutions of the mixed model. There were major differences in direct genetic effects between lines, which were favourable to line C for Cn and TSE, and unfavourable for CC, Nm and Dp. Smaller differences were also observed in Vi and NAR favourable to line R. Differences between lines with respect to the maternal genetic effects were relevant and favourable to line C for V and to line R for U, UM, Cn, TSE, Nm, Mi, and Mm. Individual heterosis was high for Dp and Dd.

¹This paper has been published in the journal "Livestock Science" with the following reference: García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livest. Sci.*; 100: 111-120.

3.4.2 Introduction

Intensive meat production in Europe is based on a three-way cross in which the sire is selected for growth rate. The objective of the artificial insemination centres is to distribute the semen obtained from these sires as widely as possible and at the lowest possible cost. Males should therefore be able to produce a large number of doses while maintaining a high fertility rate.

Semen production and quality depend on male genotype and age, sexual preparation, season of collection, number of ejaculates, and the interval between collections (Alvariño, 2000). With respect to genetic factors, Vicente *et al.* (2000), Theau-Clement *et al.* (2003) and Brun *et al.* (2002a, b and 2004) found differences in seminal characteristics between rabbit lines. Several authors have studied the effect of crossbreeding on seminal characteristics but the information currently available in the literature is very scarce or even non-existent for most semen quality traits. Brun *et al.* (2002a, b) estimating the effect of heterosis in rabbits, reported significant and relevant values for concentration, mass motility and the percentage of motile sperm per ejaculate. In others species, Buchanan (1987) reported that the volume of the ejaculate of crossbred boars was 14% greater than that of purebreds boars, while Thrift and Aaron (1987) found heterosis for sperm concentration in bulls. The aim of this work was to estimate heterosis, and the direct and maternal genetic effects on several characteristics of the ejaculate and the spermatozoa by using two sire lines of rabbits and their reciprocal crosses.

3.4.3 Material and Methods

3.4.3.1 Animals

A complete diallel cross was performed involving two rabbit sire lines (C and R) selected for growth rate by individual selection from 1993 and 1980 respectively (Estany *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1999). The trial was carried out on the experimental farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) in two different periods corresponding to the warm and cold seasons in Spain.

Twenty bucks were used per genetic type (C, CxR, RxC, R) and period. After weaning, males were housed in individual cages with a photoperiod of 16 hours light/day and temperatures ranging from 14.0°C to 24.4 °C. Animals were fed with commercial rabbit pellets *ad libitum* (15.5 % crude protein, 2.3 % fat, 17.2 % fiber) until 60 days old. They were subsequently restricted to 180 g/d of another commercial diet (16 % crude protein, 4.3 % fat, 17 % fiber). Fresh water was always available.

3.4.3.2 Semen collection

At five months of age, bucks started the training period with a homemade PVC artificial vagina (containing water at a temperature of 50 °C) and one ejaculate was collected per male each week. At six months of age, they started the production period. For 7 weeks, two ejaculates were collected per male each week, with an interval of 30 minutes between collections. Total number of solicitations (TNS) and number of collections (NC) were recorded according to the genetic type of the bucks and the collection rate ($CR = NC \times 100 / TNS$) was calculated.

3.4.3.3 Semen evaluation and traits

All ejaculates were stored at 37°C in a water bath for no more than 15 minutes after collection. Visual features of semen quality were recorded as binary traits: 0 - presence, 1 - absence of gel plugs (G), urine (U) and calcium carbonate deposits (CC). The variable number of useful ejaculates (UE) was defined as a binary trait: 0 - rejected, 1 - accepted. An ejaculate was rejected when it presented residuals of urine or calcium carbonate deposits.

The following ratios were calculated by genetic type for the previously mentioned traits:

$$\text{Useful collection rate, UCR} = \Sigma UE \times 100 / NC$$

$$\text{Gel plugs rate, GR} = \Sigma G \times 100 / NC$$

$$\text{Urine rate, UR} = \Sigma U \times 100 / NC$$

$$\text{Calcium carbonate deposits rate, CCR} = \Sigma CC \times 100 / NC$$

Volume (V) and pH of the ejaculate were measured. Gel plugs, when present, were removed before volume evaluation. Mass motility (Mm) was assessed according to a subjective scale ranging from 1 to 5, using aliquots (10µl) of raw semen and a light microscope (Nikon) at x100. Aliquots (10µl) of the raw semen were fixed using vital nigrosin-eosin staining (Bamba, 1988) to allow posterior measurements of sperm quality traits by examining 200 spermatozoa under a light microscope (Olympus CH-3) at x1000 and calculating the following ratios:

$$\text{Percentage of viable spermatozoa, Vi}$$

Percentage of spermatozoa with normal apical ridge, NAR

Percentage of normal spermatozoa (spermatozoa without abnormalities), Nr

Percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of the head, H

Percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of the neck-midpiece, Nm

Percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of the tail, T

Percentage of spermatozoa with presence of proximal and distal cytoplasmic droplet, Dp, Dd

Ejaculates were diluted (1:5) in a commercial saline extender for rabbit semen (KUBUS m.r.a S.A, Madrid, Spain) and individual motility (Mi) was evaluated under a microscope with a phase-contrast optic (Nikon) at x400 according to a subjective scale from 0 to 5 (Roca *et al.*, 2000). Ejaculates with Mi scores of 3 or higher than 3 (UM), defined as binary trait, and the corresponding ratios were calculated by genetic type (high motility rate, UMR = Σ UM / UE). Finally, the concentration (Cn) was measured using fixed spermatozoa (2% glutaraldehyde, in a final dilution of 1:50) in a Thoma-Zeiss counting cell chamber and under a light microscope (Olympus CH-2) at x400 and then the synthetic variable total number of spermatozoa was calculated for each ejaculate (TSE = V x Cn).

3.4.3.4 Statistical analyses

A Chi-square test was used to analyse the frequencies of visual features of semen quality. Binary traits were analysed using the procedure GENMOD of the SAS v.8. package (SAS, 2001) with a mixed model including the fixed effects of male genetic type (at four levels; C, CxR, RxC, R) and the order of the ejaculate (first and second) and the permanent random male effect to which the observation corresponded. Previous analyses showed that the day of collection factor, which takes into account differences in environmental conditions or in the semen collection procedure that could occur from day to day, had no effect on these traits. As a result, this factor was not included in the analyses.

Quantitative traits were analysed with the procedure MIXED of the SAS v.8. package (SAS, 2001) using a mixed model including the same factors as those considered in the analysis of binary traits plus the day of collection factor. Estimates of the effects of season, ejaculate order and genetic type of the bucks and cross-breeding genetic parameters of the lines were obtained from the solutions of the corresponding mixed model

by generalized least squares using GEDMOD and MIXED procedures. Crossbreeding parameters were estimated according to the Dickerson's model, following the procedure described by Baselga *et al.* (2003).

3.4.4 Results

3.4.4.1 Semen collection and qualitative characteristics of the ejaculate

Semen collection and qualitative characteristics of the ejaculate were analysed by two different procedures depending on whether the trait was defined as a percentage or as a binary trait. Table 3.4.1 shows the frequencies of these traits according to the genetic type of the bucks, obtained from the Chi-square analysis. Table 3.4.2 shows the least square means corresponding to the effects of genotype of the bucks and ejaculate order of the logistic regression model for the same traits. Same estimates expressed as percentages of incidence can be obtained directly from these values (Hosmer and Lemeshow, 1989). For all traits, they were close to the values shown in table 3.4.1 since data were equilibrated for all the factors of the model. Male genotype had no effect on CR, which was high (about 93 %) in all cases. The useful collection rate was more variable, ranging from 72 to 89 %. Significant differences were found between genetic types for number of useful ejaculates: R and CxR males performed better than C males, while RxC and CxR males were different at the 10 % level of significance. The most frequent reason for discarding ejaculate was the presence of calcium carbonate sediments, whether associated or not with the presence of urine (Table I). All of the genetic types presented both reasons for refusal. There were significant differences between RxC and CxR males for the trait indicating the presence/absence of urine favourable to CxR males (estimated odds ratio, RxC *versus* CxR = 2.63). Differences between C and R males were also found for the trait indicating the presence/absence of calcium carbonate deposits that were favourable to R males (estimated odds ratio, R *versus* C = 0.22). The rate of ejaculates with gel plugs ranged between 16 and 30 %. C and RxC bucks revealed the lowest incidence of this characteristic. With respect to UM, CxR males performed better than RxC and C males (estimated odds ratio, CxR *versus* RxC = 1.69, CxR *versus* C = 1.96).

Despite the fact that NC was higher for the first ejaculate (odds ratio = 1.23), the second ejaculate presented better characteristics than the first. The odds ratios for the second *versus* the first ejaculate were: 1.89 for UE, 0.14 for G, 0.39 U and 0.58 for CC.

Table 3.4.3 shows the estimates of estimable functions between direct genetic effects, maternal genetic effects and individual heterosis. Differences between lines for direct genetic effects were only observed for CC. This difference was favourable to the line R (estimated odds ratio, C *versus* R = 2.86). Maternal effects were significant and favourable to line R for U (estimated odds ratio, C *versus* R: 2.64) and UM (estimated odds ratio, R

versus C: 1.69) and, favourable to line C for G (estimated odds ratio, C versus R: 0.54). Maternal effects were also significant at the 10% level for UE and favourable to line R (estimated odds ratio, C versus R: 0.51). Individual heterosis was not found to be significant for any of these traits.

3.4.4.2 Quantitative semen quality traits

Summary statistics of the quantitative traits are shown in Table 3.4.4. The most significant point to note is the high variability in the percentages of sperm morphological abnormalities, Cn and TSE. Similar values for overall means were reported in other experiments (Kuzminsky *et al.* 1996, Alvariño, 2000), but in this experiment, the value of V was almost double that reported by Vicente *et al.* (2000) for line R.

Table 3.4.5 shows estimated lmeans (standard error) for the buck genotype and estimated differences between first and second ejaculate and, between cold and warm season on semen characteristics. Differences between purebred males were found for pH, Mm, Mi, Vi, NAR, Nm and Dp. These differences were favourable for males from genetic type R. There were also differences between the two types of crossbred males: males from genetic type CxR showed higher Mm, Mi, Cn, TSE and Nm and lower V than RxC males. In general, males from genetic type C, and – to a slightly lesser degree - males from genetic type RxC, seemed to produce lower quality semen than bucks from the other genetic types. Such differences were especially relevant for Nm and Dp, where the difference between C males and the averages for other groups were about 36% and 85% respectively of the overall means. The differences between C and RxC males with respect to CxR and R males were about 20% for Mi and Cn and about 10% for Mm. The order of the ejaculate had a significant and relevant effect (about 15% of the overall mean) in most of semen quality traits. The second ejaculate showed higher Mm, Cn and Nr, and lower pH, V, H, Dp and Dd values than the first. The factor day of collection had a significant effect in all quantitative traits. There were differences in the seminal characteristic even between days pertaining to the same (cold or warm) season. Differences between semen collected during the warm and cold seasons were significant for all quantitative semen quality traits except V, Mi, H and Dd. These differences were of considerable magnitude (about 30% of the overall mean) and favoured semen collection during the cold period for Cn, TSE and Dp, but were unfavourable for Nm and T. Differences in pH, Mm, Vi, NAR and Nr, were smaller (less than 10%) and favoured cold season collection for pH and Mm but were unfavourable for Vi, NAR and Nr.

Table 3.4.6 shows the estimates of estimable functions of direct genetic effects, maternal genetic effects and individual heterosis. Differences between lines for direct genetic effects were significant for Cn, TSE, Vi, NAR, Nm and Dp. These differences were large (about 50% of the overall mean) and favourable to C line for Cn and TSE, and to line R for Nm and Dp. Differences in Vi and NAR were also favourable to line R, but smaller in size (about 10% of the overall mean). It therefore seems that line C could be superior in traits related with sperm

production but inferior with respect to semen quality traits. Differences between lines for maternal genetic effects were observed for V, Mm, Mi, Cn, TSE and Nm at the 5% level of significance and also for pH, NAR, Nr and Dd at the 10% level of significance. These differences were relevant (14%) and favourable to line C for V and Nm (21%) and relevant and favourable to line R for Cn (40%), TSE (23%), Mi (19%), and Mm (9%). Favourable and significant individual heterosis was observed in Nr, Dp and Dd at the 5% level of significance and for NAR and Nm at the 10% level. The heterosis effect was high for Dp (57%), Dd (30%) and Nm (14%) but almost negligible for NAR and Nr (about 2%).

3.4.5 Discussion

The high values for the collection rate found here and also reported by other authors (Brun *et al.*, 2002a; Theau-Clement *et al.*, 2003) confirm that male rabbits are well adapted to semen collection with artificial vagina and can therefore be used for artificial insemination: they rapidly ejaculate after a simple intromission, there is only a short interval between successive ejaculations, and it is easy to collect their semen with an artificial vagina (Garcia *et al.*, 2002).

The potential advantage of using crossbred instead of purebred sires has not previously received much attention and there is very little information in the literature relating to this topic, especially in the case of rabbits, for which there are only two previous studies (Brun *et al.* 2002a, b). In our experiment, no differences between genetic types were found for CR – neither were any reported by Brun *et al.* (2002a). However, differences were found for semen quality traits, which lead to differences in useful collection rate. R and CxR bucks performed better than C and RxC bucks, showing higher useful collection rates, mainly due to differences in direct genetic effect in the presence of calcium carbonate deposits. RxC bucks showed a higher incidence for the presence of urine in the ejaculate than males from the other genetic groups. In spite of the fact that CxR and R bucks displayed the higher rate of ejaculates with gel plugs, this characteristic was not considered negative with respect to the quality of the ejaculate for AI. Even so, this implies an additional step in the preparation of the doses for insemination and an increase in the time required for this process. Due to differences in maternal genetic effects, RxC bucks showed a lower incidence of ejaculates with gel plugs than CxR bucks. Theau-Clement *et al.* (2003) and Brun *et al.* (2002a) reported differences between lines for useful collection rate, which were mainly explained by differences in volume and mass motility. Brun *et al.* (2004) found differences for the presence of urine. Theau-Clement *et al.* (2003) and Brun *et al.* (2004) reported values of UCR similar to those reported here, but lower than the ones cited in Brun *et al.* (2002a). They did not report the presence of calcium carbonate deposits in their lines, and neither have other authors. Brun *et al.* (2002a) also include in their criteria for semen elimination insufficient volume and an individual motility score of less than 6 on a subjective scale ranging from 0 to 9 leading to a rate of sample acceptance of about 50 %. In our particular case, the rejection of semen was undertaken in two steps. Firstly, semen was rejected if it contained residuals

amounts of urine or deposits of calcium carbonate. Secondly, an evaluation of individual motility was performed on retained samples and semen was eliminated if the scores for this trait were less than 3 on a subjective scale ranging from 0 to 5. The reason for this was that the calcium carbonate deposits present in our lines made it difficult, if not impossible, to evaluate individual motility in most cases. The UCR for the present experiment was about 81%. This value multiplied by the average UMR lead to a rate of sample acceptance about 47 %. However, it is difficult to compare the ease of collecting semen from the two groups of males in the two experiments because it is hard to know whether both elimination criteria are equally restrictive.

With regard to quantitative semen quality traits, there is no clear picture concerning differences between male genetic types. However, it is evident that for most traits C bucks seemed to produce lower quality semen than other genetic types, while CxR and R males had the best semen characteristics. Differences between strains with respect to seminal characteristics were also observed by Vicente *et al.* (2000) and Brun *et al.* (2002a, b and 2004).

Differences in direct genetic effects between lines were important and favourable to line C for Cn and TSE, to line R for CC, Nm and Dp, and also to line R for Vi and NAR but at a lower magnitude in this last case. It therefore seems that the direct genetic effects of line were favourable to line C in traits related with sperm production but unfavourable with respect to semen quality traits. To the best of our knowledge, no one had previously estimated direct genetic effects in rabbit.

Differences between lines with respect to the maternal genetic effects were observed for G, U, UM, V, Mm, Mi, Cn, TSE and Nm. These differences were relevant and favourable to line C for G and V, and relevant and favourable to line R for U, UM, Cn, TSE, Nm, Mi and Mm. The differences between reciprocal crosses for the traits related to energy metabolism (Mm, Mi) were explained by Brun *et al.* (2002a) as sex-linked effects on account of maternal transmission of mitochondria (cell organelles involved in energy metabolism). We cannot offer any hypotheses to explain the biological origin of the observed maternal genetic effects for other traits. Maternal genetic effects were always opposite in sign and lesser in magnitude than direct genetic effects, except in the case of Cn, which displayed similar - but also opposite - values for the two effects.

Favourable and significant individual heterosis was observed in Nr, Dp and Dd at the 5% level of signification and for NAR and Nm at the 10% level. The heterosis effect was high for Dp (57%), Dd (30%) and Nm (14%), but almost negligible for NAR and Nr (about 2%). Brun *et al.* (2002a) also reported great variability in estimates of the effect of heterosis in function of the seminal trait. They observed 6.8% heterosis in Mm, 4.1% in percentage of motile spermatozoa and high values of heterosis in Cn (37.5%), TSE (37.6%) and number of motile spermatozoa per ejaculate (42.3%). In swine, Buchanan (1987) in a review of experiments comparing crossbred and purebred boars showed that crossbreds produced larger ejaculate volumes (14%) and had better semen quality (motility percentage and normal sperm) than purebreds. In cattle, a review by Thrift and Aaron

(1987) showed that crossbred bulls produced fewer abnormal spermatozoa than purebreds. One possible explanation for the considerable negative heterotic effect observed in this experiment in Dp, Dd and Nm and the positive heterotic effect observed in NAR and Nr could be that crossbred males reach sexual maturity faster than purebreds. The results reviewed by Buchanan (1987) and Thrift and Aaron (1987) generally supported this idea but it should be confirmed in rabbit.

The order of the ejaculate had a considerable influence upon most semen quality traits. The second ejaculate showed higher Mm, Cn and Nr, and fewer pH, V, H, Dp and Dd than the first. Differences in mass motility are in agreement with the results reported by Bonanno and Costanzo (1987), Bencheikh (1995), Brun *et al.* (2002a) and Theau-Clement *et al.* (2003); the smaller ejaculate volume and the higher sperm concentration had previously been observed by Battaglini *et al.* (1992). Despite the better characteristics of the second ejaculate for AI, the magnitude of these differences does not seem to justify direct rejection of first ejaculates because this would cause a decrease of about 45% in the total production of useful doses. It would be interesting to know whether the semen production and quality of just one ejaculate with pre-stimulation of the male would be similar to that of the second ejaculate or lie between the values attributable to the first and second ejaculates for these sire lines.

The cold season was, generally, favourable for semen production and quality. In this period bucks seem to produce greater quantities of mature spermatozoa than during, and immediately after, the warm season. Differences in sperm concentration and pH confirmed results reported by Battaglini *et al.* (1992).

There was an opposite effect of all the factors included in the model on pH with respect Mm, Mi, Cn and TSE. This may be due to the antagonistic relationship between these traits, found in this experiment (García-Tomás *et al.*, 2006) and previously reported by Brun *et al.* (2002a), which could be explained by the metabolic activity of the spermatozoa, which releases lactic acid and consequently decreases pH. It was also observed an opposite effect on Mm and Mi with respect to the effect on Dp. In rats, Akbarsha *et al.* (2000) reported an impairment of sperm motility that may be due to an increase in the retention of the cytoplasmatic droplets produced by the administration of different toxics.

The relative importance of semen quality traits must be established through their relationship with fertility after insemination or natural mating. However this relationship is difficult to know mainly because it is not easy to acquire sufficient accurate data from laboratory tests and fertility in vivo of spermatozoa in the same sample (Amann, 1989) and also because the inseminations should be performed with less than optimum sperm number (Tardif *et al.*, 1999). On the other hand, due to differences in measurements procedures and management it is hard to draw any general conclusions from the different studies. In rabbits, several authors have studied the relationship between classical semen traits and fertility. Brun *et al.* (2002b) showed that mass motility and the number of motile sperm per ejaculation influenced the kindling rate, while Alvariño *et al.* (1996), Pizzi *et al.*

(1996) and Castellini *et al.* (1999) reported a relationship between the number of spermatozoa inseminated and the rate of fertility. In swine, Tardif *et al.* (1999) identified sperm motility as a useful indicator of sperm fertilizing capacity *in vivo*. In humans, a large number of works have studied the relationship between several characteristics of sperm morphology and fertility *in vivo* (Ombelet *et al.*, 1995); most of them have concluded that they are important traits.

In rabbits, the relationship between fertility and the traits that have shown in our study a significant heterotic effect remains unknown. Therefore, we cannot establish the superiority of crossed males. More research is needed in order to know more about the fertility of crossbred and purebred males, and also to discover other semen quality traits or molecular markers that could be related with male fertility.

3.4.6 Conclusions

Two sire lines that had been highly selected for growth rate had relevant differences in direct and maternal genetic effects for several semen production and quality traits. However only three of the fourteen variables analysed, which had an unknown relationship with fertility, showed a significant heterosis effect. Therefore, the superiority of crossbred bucks has not been proved for the lines and traits evaluated. Further research is needed in order to know the fertility of crossbred and purebred males and the relationship between qualitative and quantitative seminal characteristics and buck fertility.

3.4.7 Acknowledgment

The research was supported by the INIA project SC 00 - 011 and the UB project 56.5.48.000.00 689.05 (MC 066605). Mónica García received fellowship from Generalitat de Catalunya.

3.4.8 References

Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J. Andrology*; 10 (2): 89-98.

Akbarsha MA, Latha PNL, Murugaian P. 2000. Relation of cytoplasmic droplet by rat epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *J. Reprod. Fertil.*; 120: 385-390.

- Alvariño JMR, Lopez FJ, Del Arco JA, Bueno A, Torres R. 1996. Effects of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 hours stored semen. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Toulouse (France); 2: 3-5.
- Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbit. Proceedings of the 7th World Rabbit Congress. Valencia (Spain); A: 13- 35.
- Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology; 29: 1245-1251.
- Baselga M, García M, Sánchez JP, Vicente JS, Lavara R. 2003. Analysis of reproductive traits in crosses among maternal lines of rabbits. Anim. Res.; 52: 473-479.
- Battaglini M, Castellini C, Lattaioli P. 1992. Variability of the main characteristic of rabbit semen. J. Appl. Rabbit Res.; 15: 439-446.
- Bencheikh N. 1995. Effect de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoids récoltés chez le lapin. Ann. Zootech. ; 44: 263-279.
- Bonano A, Costanzo D. 1987. Influenza di fattori fisiologici e climatici sul determinismo dei principali parametri riproduttivi di coniglie sottoposte ad inseminazione artificiale. Riv. Coniglicoltura ; 3: 33-39.
- Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002a. Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. Anim. Res.; 51: 433-442.
- Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002b. The relationship between semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. Anim. Reprod. Sci.; 70: 139-149.
- Brun JM, Theau-Clement M, Larzul C, Falieres J, Saleil G. 2004. Semen production in two lines divergently selected for 63-D body weight. 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico); 238-244.
- Buchanan DS. 1987. The crossbred sire: experimental results for swine. J. Anim. Sci.; 65: 117-127.
- Castellini C, Lattaioli P. 1999. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. Anim. Reprod. Sci.; 57: 111-120.

- Estany J, Camacho J, Baselga M, Blasco A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Gen. Selec. Evol.*; 24: 527-537.
- García DA, Torres AMR, Mora RS, Popota JAM, García AR. 2002. Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes. *Arch. Andrology*; 48: 1-7.
- García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Anim. Reprod. Sci.*; 93: 88-100.
- Gómez EA, Rafel O, Ramon J, Baselga M. 1999. Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Options Méditerranéennes, Series Cahiers* ; 41: 147-152.
- Hosmer DW, Lemeshow S. 1989. *Applied logistic regression*. Wiley-Interscience publication, USA.
- Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.*; 36: 565-575.
- Ombelet W, Menkveld R, Kruger TFK, Steeno O. 1995. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum. Repr. Update*; 1(6): 543-557.
- Pizzi F, Guaita N, Luzi F, Biffi B, Brivio R, Crimella C. 1996. Effect of the numbers of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility in rabbits. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France)*; 2: 3- 5.
- Roca J, Martinez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*; 64: 103-112.
- SAS Institute Inc., 2001. *SAS/STAT User's Guide Statistics, Version 8*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*; 52: 447-459.
- Theau- Clement M, Brun JM, Sabbioni E, Castellini C, Renieri T, Besenfelder U, Falières J, Esparbie J, Saleil J. 2003. Comparaison de la production spermatique de trois souches de lapins: moyennes et variabilités. 10^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 Nov., Paris.
- Thrift FA, Aaron DK. 1987. The crossbred sire: experimental results for cattle. *J. Anim. Sci.* 65,128-135.

Vicente JS, Viudes de Castro MR, Lavara R, Lavara F. 2000. Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. 7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain); A: 1273-277.

TABLE 3.4.1: FREQUENCIES OF SEMEN COLLECTION AND OCCURRENCE OF QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE ACCORDING TO THE GENOTYPE OF THE BUCKS.

	<i>Genotype</i>	<i>C</i>	<i>CxR</i>	<i>RxC</i>	<i>R</i>	<i>Chi-square prob</i>
TNS	Total number of solicitations	454	514	543	530	
CR	Collection rate (%)	94.49	92.61	95.40	93.21	0.2252
UCR	Useful collection rate (%)	72.26	85.71	75.68	89.27	<0.0001
GR	Gel plugs rate (%)	15.62	29.62	19.50	26.72	<0.0001
UR	Urine rate (%)	6.06	4.83	11.58	5.67	<0.0001
CCR	Calcium carbonate rate (%)	26.34	13.03	19.31	7.29	<0.0001
UMR	Useful individual motility rate (%)	50.97	66.91	54.36	61.05	<0.0001

TABLE 3.4.2: LS-MEANS (STANDARD ERROR) CORRESPONDING TO THE EFFECTS OF GENOTYPE OF BUCKS AND EJACULATE ORDER OF THE LOGISTIC REGRESSION MODELS FOR SEMEN COLLECTION AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE.

	<i>NC</i> ¹	<i>UE</i> ¹	<i>G</i> ¹	<i>U</i> ¹	<i>CC</i> ¹	<i>UM</i> ¹
Genotype						
C	2.85 (0.39)	0.98 ^a (0.23)	-2.00 ^a (0.24)	-2.84 (0.34)	-1.05 ^a (0.23)	0.04 ^a (0.18)
CxR	2.53 (0.42)	1.83 ^{b,c} (0.28)	-1.08 ^c (0.16)	-3.09 (0.39)	-1.93 ^{b,c} (0.29)	0.71 ^b (0.15)
RxC	3.04 (0.38)	1.16 ^{a,b} (0.22)	-1.70 ^{a,b} (0.25)	-2.12 (0.29)	-1.45 ^{a,b} (0.22)	0.18 ^a (0.20)
R	2.62 (0.46)	2.16 ^c (0.28)	-1.24 ^{b,c} (0.18)	-2.91 (0.35)	-2.57 ^c (0.30)	0.45 ^{a,b} (0.16)
Ejaculate						
1	2.86 ^a (0.22)	1.21 ^a (0.14)	-0.53 ^a (0.13)	-2.26 ^a (0.18)	-1.48 ^a (0.14)	0.44 (0.11)
2	2.65 ^b (0.20)	1.85 ^b (0.13)	-2.48 ^b (0.15)	-3.21 ^b (0.22)	-2.02 ^b (0.14)	0.26 (0.09)

Different letters indicate significant different groups at the 5% level.

¹ NC: number of collections, UE: number of useful ejaculates, G: number of ejaculates containing gel plugs, U: number of ejaculates containing urine, CC: number of ejaculates containing calcium carbonate deposits, UM: number of ejaculates with Mi₂≥3.

TABLE 3.4.3: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (D_C , D_R) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (M_C , M_R) OF LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROSIS (h_{CR}) BETWEEN THEM FOR SEMEN COLLECTION AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE.

	NC^1	UE^1	G^1	U^1	CC^1	UM^1
$d_C - d_R$	-0.28 (0.82)	-0.50 (0.51)	-0.15 (0.42)	-0.90 (0.69)	1.05* (0.53)	0.11 (0.35)
$m_C - m_R$	0.50 (0.56)	-0.67 (0.36)	-0.62* (0.3)	0.97* (0.48)	0.48 (0.37)	-0.52* (0.25)
h_{CR}	0.05 (0.41)	-0.07 (0.26)	0.23 (0.21)	0.27 (0.34)	0.12 (0.26)	0.20 (0.17)

* significant at the 5% level.

¹ The abbreviations are the same as in table 3.4.2.

TABLE 3.4.4: SUMMARY STATISTICS.

	<i>pH</i>	<i>V</i> ¹ (<i>ml</i>)	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn</i> ¹ (106/ <i>ml</i>)	<i>TSE</i> ¹ (106)	<i>Vi</i> ¹ (%)	<i>NAR</i> ¹ (%)	<i>Nr</i> ¹ (%)	<i>H</i> ¹ (%)	<i>Nm</i> ¹ (%)	<i>T</i> ¹ (%)	<i>Dp</i> ¹ (%)	<i>Dd</i> ¹ (%)
<i>N</i> ²	1917	1546	1809	1805	1783	1783	885	885	885	885	885	885	885	885
Mean	7.63	1.19	2.76	2.58	245.35	297.23	81.14	83.01	86.14	0.55	3.51	6.62	1.20	1.97
SD ²	0.59	0.43	0.90	1.64	227.08	280.39	11.56	10.98	8.11	0.73	3.11	5.55	1.59	2.41
CV ²	7.73	36.13	32.61	63.56	92.55	94.33	14.25	13.23	9.41	132.73	88.60	83.83	132.50	122.33

¹V: ejaculate volume, Mm: mass motility, Mi: individual motility, Cn: concentration, TSE: total number of spermatozoa per ejaculated, Vi: percentage of sperm viability, NAR: percentage of sperm with acrosomal integrity, Nr: percentage of sperm with normalcy, H: percentage of sperm morphological abnormalities of head, Nm: percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece, T: percentage of sperm morphological abnormalities of tail, Dp: percentage of sperm with proximal cytoplasmic droplet, Dd: percentage of sperm with distal cytoplasmic droplet.

²N: Number of observation, SD: standard deviation, CV: coefficient of variation.

TABLE 3.4.5: LSMEANS (STDERR) FOR THE GENOTYPE OF BUCKS AND ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN FIRST AND SECOND EJACULATES (E_{J1}, E_{J2}) AND BETWEEN COLD AND WARM SEASONS (S_C, S_W) ON SEMEN CHARACTERISTICS.

	<i>pH</i>	<i>V(ml)</i> ¹	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn (106/ml)</i> ¹	<i>TSE (106)</i> ¹	<i>Vi(%)</i> ¹	<i>NAR(%)</i> ¹	<i>Nr(%)</i> ¹	<i>H(%)</i> ¹	<i>Nm (%)</i> ¹	<i>T (%)</i> ¹	<i>Dp(%)</i> ¹	<i>Dd(%)</i> ¹
Genotype														
CC	7.80 ^a	1.21 ^{a,b}	2.56 ^a	2.10 ^a	251.87 ^{a,b}	298.47 ^{a,b}	76.72 ^a	78.84 ^a	85.16 ^a	0.43	4.28 ^a	6.11	1.99 ^a	1.84 ^{a,b}
	(0.06)	(0.05)	(0.1)	(0.18)	(23.18)	(25.55)	(1.19)	(1.13)	(1.06)	(0.06)	(0.3)	(0.68)	(0.22)	(0.27)
CR	7.53 ^b	1.14 ^a	2.94 ^c	2.92 ^c	306.29 ^b	348.24 ^b	80.51 ^b	82.35 ^b	86.20 ^{a,b}	0.41	3.44 ^b	7.29	0.91 ^b	1.80 ^{a,b}
	(0.06)	(0.05)	(0.1)	(0.18)	(23.64)	(26.04)	(1.13)	(1.08)	(1.03)	(0.06)	(2.29)	(0.66)	(0.21)	(0.23)
RC	7.67 ^{a,b}	1.31 ^b	2.69 ^{a,b}	2.44 ^{a,b}	208.27 ^a	278.81 ^a	82.23 ^b	84.54 ^b	88.52 ^b	0.49	2.70 ^c	6.17	0.86 ^b	1.28 ^b
	(0.06)	(0.05)	(0.1)	(0.17)	(22.35)	(24.66)	(1.09)	(1.04)	(0.98)	(0.06)	(0.28)	(0.63)	(0.20)	(0.25)
RR	7.60 ^b	1.09 ^a	2.83 ^{b,c}	2.78 ^{b,c}	249.31 ^{a,b}	269.75 ^a	82.74 ^b	84.51 ^b	85.65 ^a	0.53	2.87 ^{b,c}	7.47	1.13 ^b	2.31 ^a
	(0.06)	(0.04)	(0.09)	(0.16)	(21.23)	(23.40)	(1.06)	(1.01)	(0.95)	(0.06)	(0.27)	(0.61)	(0.20)	(0.24)
E _{J1} – E _{J2}	0.049*	0.16*	-0.38*	-0.055	-27.96*	0.37	0.95	0.95	-1.05*	0.11*	0.13	0.09	0.17*	0.44*
	(0.02)	(0.02)	(0.03)	(0.059)	(7.19)	(9.00)	(0.67)	(0.64)	(0.4)	(0.04)	(0.18)	(0.27)	(0.08)	(0.14)
S _C – S _W	-0.30*	0.008	0.29*	0.32	147.5*	194.79*	-4.21*	-3.41*	-2.43*	-0.032	0.98*	2.36*	-0.58*	-0.25
	(0.07)	(0.05)	(0.11)	(0.19)	(24.6)	(27.16)	(1.23)	(1.72)	(1.1)	(0.07)	(0.31)	(0.71)	(0.23)	(0.28)

Different letters indicate significant different groups at the 5% level. * significant at the 5% level.

¹ The abbreviations are the same as in table 3.4.5.

TABLE 3.4.6: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (D_C , D_R) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (M_C , M_R) OF LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROSIS (h_{CR}) BETWEEN THEM FOR QUANTITATIVE SEMEN QUALITY TRAITS.

	<i>pH</i>	<i>V</i> ¹ (ml)	<i>Mm</i> ¹	<i>Mi</i> ¹	<i>Cn</i> ¹ (10 ⁶ /ml)	<i>TSE</i> ¹ (10 ⁶)	<i>Vi</i> ¹ (%)	<i>NAR</i> ¹ (%)	<i>Nr</i> ¹ (%)	<i>H</i> ¹ (%)	<i>Nm</i> ¹ (%)	<i>T</i> ¹ (%)	<i>Dp</i> ¹ (%)	<i>Dd</i> ¹ (%)
$d_C - d_R$	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	ns
	0.059	-0.046	-0.013	-0.20	100.58	194.79	-7.78	-7.87	-2.81	-0.18	2.15	-0.23	0.91	0.055
	(0.12)	(0.09)	(0.18)	(0.19)	(42.98)	(27.16)	(2.12)	(2.02)	(1.91)	(0.11)	(0.54)	(1.23)	(0.40)	(0.49)
$m_C - m_R$	+	*	*	*	*	*	ns	+	+	ns	*	ns	ns	+
	0.14	0.16	-0.25	-0.48	-98.02	-69.42	1.77	2.19	2.32	0.08	-0.74	-1.13	-0.051	-0.53
	(0.08)	(0.06)	(0.13)	(0.22)	(29.51)	(32.49)	(1.41)	(1.35)	(1.29)	(0.07)	(0.36)	(0.82)	(0.27)	(0.33)
h_{CR}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	*	ns	+	ns	*	*
	-0.099	0.077	0.12	0.24	6.69	29.41	1.66	1.77	1.95	-0.03	-0.50	-0.06	-0.68	-0.53
	(0.06)	(0.05)	(0.1)	(0.17)	(22.89)	(25.24)	(1.12)	(1.07)	(1.01)	(0.06)	(0.29)	(0.65)	(0.21)	(0.26)

+, * significant at the 10% and 5% level respectively.

¹ The abbreviations are the same as in table 3.4.5.

3.5 REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF CROSSBRED AND PUREBRED MALE RABBITS¹

3.5.1 Abstract

The effect of buck genetic type and crossbreeding parameters on fertility and prolificacy were estimated using two rabbit sire lines and their reciprocal crosses. The relationship between the reproductive performance of inseminated multiparous does and several semen quality traits was also investigated. The semen characteristics evaluated were: pH (**pH**), mass and individual motility (MM, IM), percentage of viable spermatozoa (Vi), spermatozoa with normal apical ridge (NAR), normal spermatozoa (NSP), spermatozoa with morphological abnormalities of head (HAP), neck-midpiece (NAP), and tail (TAP), spermatozoa with the presence of proximal (PD) and distal (DD) cytoplasmic droplets.

Fertility was analysed as a continuous trait (kindling rate) or as a binary trait (success or failure of kindling). In the first case, the analysis was performed using GLM procedures of SAS v.8. according to a model that included the fixed factors of buck genetic type, number of ejaculates per pool and week of insemination. In the second case, fertility was analysed using GENMOD procedures of SAS v.8 according to a mixed model including the same fixed factors as before plus the physiological status of the does and the permanent random effect of female. Number of kits born alive and number of stillborn were analysed with MIXED procedures of SAS v.8 with the same model used for the analysis of fertility as a binary trait. Estimates of the estimable functions of crossbreeding genetic parameters of the lines were obtained from the solutions of the corresponding models by generalized least squares using GLM, GENMOD and MIXED procedures. Crossbreeding parameters were estimated according to the model of Dickerson. A linear regression was used to determine the relationship between fertility and litter size and the semen characteristics evaluated.

Significant differences in fertility were observed among buck genetic types, which were favourable to type R. Differences between lines in maternal genetic effects were relevant and favourable to type R for fertility. Individual heterosis was important but unfavourable for fertility.

¹This paper has been published in the journal "Livestock Science" with the following reference: García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006. Reproductive performance of crossbred and purebred male rabbits. *Livest. Sci.*; 104: 233-243.

A slight correlation was obtained between all semen quality traits and fertility and prolificacy. Two multiple models were found for fertility, including NAP, IM, NSP, buck genetic type and Vi in one model or NAR in other model. Individual motility had an important positive effect, while NAP had a small negative effect. When MM, TAP and buck genetic type were included in a multiple model for the number of kits born alive, both MM and TAP had significant small effects. Individual motility and DD appeared to be related to number of kits stillborn, but only DD had a significant although negligible effect.

3.5.2 Introduction

Male fertility and prolificacy are highly influenced by the amount of semen produced as well as by its quality. Semen production and quality is usually described by means of a wide range of traits (Ducrocq and Humblot, 1997): i) qualitative characteristics of the ejaculate (presence or absence of gel, urine or calcium carbonate deposits) ii) characteristics related to the biochemical composition of the ejaculate (enzyme content, fructose content, etc), iii) qualitative characteristics of the spermatozoa (quality of the acrosome, abnormal forms of head, tail or neck-mid piece, different parameters defining their movement, etc) or, iv) characteristics of the insemination dose (volume, concentration). The importance of these traits should be established through their relationship with the result of insemination (Braundmeier and Miller, 2001). However this relationship is still not well established, because the evaluation and recording of semen characteristics are not frequently performed, and also because the information available usually comes from experiments with different designs for environmental or genetic factors which can affect fertility and prolificacy and must be taken into account when drawing up reliable conclusions or comparing results.

Vicente *et al.* (2000) and Brun *et al.* (2002a) found differences between rabbit lines of selection with respect to fertility and prolificacy, when artificial insemination was applied either with or without restrictive dose concentration. Differences may exist between purebred and crossbred males with respect to reproductive traits; however, there is very little information available concerning the use of crossbred male rabbits. Brun *et al.* (2002a) reported that fertility and litter size were higher when mating involved both F1 crossbred males and females compared to mating involving purebred males and females, however this study did not separately distinguish between the effect of the crossbred male and crossbred female on those traits. However, Buchanan (1987), in swine, and Thrift and Aaron (1987), in cattle, reported that there were no convincing results regarding the benefits of using crossbred sires.

The efficiency of artificial insemination in animal breeding implies reducing the number of spermatozoa at insemination. An assessment of semen quality is therefore required. In rabbits, most of the studies concerning the relationship between semen quality and fertility have only considered sperm concentration or sperm motility as the main parameters that indirectly define semen quality (Farrell *et al.*, 1993; Alvariño *et al.*, 1996; Viudes-

de-Castro and Vicente, 1997; Castellini and Lattaioli, 1999; Brun *et al.*, 2002a; Hagen *et al.*, 2002). However, some other traits or combinations of traits could better explain male fertility. Thus, Ombelet *et al.* (1995) concluded that most reports emphasize the importance of sperm morphology as a predictor of men's "in vivo" fertilizing potential; Alm *et al.* (2001), in dairy bulls, found a correlation between sperm viability and fertility; Gadea *et al.* (2004), in swine, reported that sperm motility and the presence of proximal cytoplasmic droplets significantly correlated with farrowing rate; and Lavara *et al.* (2005), in rabbits, observed correlations between kindling rate and percentage of total motile cells, linearity index and the percentage of abnormal sperm.

This study had two aims. The first was to estimate, under commercial conditions, the effect of buck genetic type on male fertility and prolificacy and also the crossbreeding parameters of these traits, by using two sire lines of rabbits and their reciprocal crosses. The second was to estimate the relationship between these traits and several sperm qualitative characteristics.

3.5.3 Material and Methods

3.5.3.1 Animals

Males belonged to 4 groups corresponding to two sire lines of rabbits (C and R) and their reciprocal crossbreds (CxR and RxC). Lines C (Gómez *et al.*, 1999) and R (Estany *et al.*, 1992) were selected for increased post weaning daily gain by individual selection since 1993 and 1980, respectively. Females were obtained from the cross between animals from line Prat (Gómez *et al.*, 1996) and line V (Estany *et al.*, 1989), both being selected on the basis of litter size at weaning. Crossbred females are usually employed in the terminal cross in the current scheme of rabbit production.

Twenty bucks per genetic type were used. After weaning, they were housed in individual cages with a photoperiod of 16 hours light/day and at temperatures ranging from 10 to 14°C. Animals were fed on commercial rabbit pellets *ad libitum* (15.5% crude protein, 2.3% fat, 17.2% fiber) until 60 days old. They were subsequently restricted to 180 g/d of another commercial diet (16% crude protein, 4.3% fat, 17% fiber). Fresh water was always available.

3.5.3.2 Semen collection

Bucks started the training period at five months. One ejaculate was collected per male per week, using an artificial vagina (containing water at 50°C). At six months, two ejaculates per male per week were collected, with

an interval of 30 minutes between collections. The ejaculates used in the study were collected when males were 8-10 months old, and for three months.

3.5.3.3 Semen evaluation

Semen production and quality were evaluated at the experimental farm. All ejaculates were stored in a water bath at 37 °C until evaluation but for no more than 15 minutes after collection. Ejaculates containing urine and calcium carbonate deposits were discarded, and gel plugs were removed. After that, individual motility (IM) of the ejaculate was measured in aliquots under a microscope with a phase-contrast optic (Nikon) at x400 according to a subjective scale from 0 to 5 (Roca *et al.*, 2000) where 0 meant 0-10 % and 5 meant 90-100 % of the motile spermatozoa showing progressive movement. Ejaculates with individual motility lower than 2.5 were discarded.

After this initial evaluation, ejaculates from two to four bucks of each genetic type were pooled to avoid the possible effect associated with using dominant males on the result of the inseminations (Vicente *et al.*, 2004). On average, 5 ejaculates were pooled, with 4 being the minimum and 8 the maximum. The pH (pH) was determined in raw semen by using a 507 Crison pH-metre, mass motility (MM) was assessed according to a subjective scale ranging from 1 to 5, using aliquots (10 µl) of raw semen and a light microscope (Nikon) at x100. Aliquots (10 µl) of raw semen were fixed using vital nigrosin-eosin staining (Bamba, 1988) to allow posterior measurements of sperm quality traits by examining 200 spermatozoa under a light microscope (Olympus CH-3) at x1000: percentage of viable spermatozoa (Vi); percentage of spermatozoa with normal apical ridge (NAR); percentage of normal spermatozoa (spermatozoa without abnormalities) (NSP); percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of head (HAP), neck-midpiece (NAP), and tail (TAP); percentage spermatozoa with the presence of proximal (PD) and distal (DD) cytoplasmic droplet. After that, pools of ejaculates were diluted (1: 5) in a commercial saline extender for rabbit semen (KUBUS m.r.a S.A, Madrid, Spain) and individual motility (IM) was evaluated in the manner explained above. The sperm cell concentration (SCC) was measured in aliquots using fixed spermatozoa (2 % glutaraldehyde) in a Thoma-Zeiss counting cell chamber (final dilution 1: 50) and a light microscope (Olympus CH-2) at x400 and adjusting to 30×10^6 / ml.

3.5.3.4 Fertility after artificial insemination

After semen evaluation, pools were stored at 18°C for a maximum of 24 hours prior to artificial insemination at a commercial farm. A total of 595 inseminations were carried out on multiparous lactating and non-lactating does with semen from 112 pools obtained from 599 ejaculates from 72 bucks. Does were treated with subcutaneous applications of 12-15 IU of eCG (Folligon®, Intervet, Holland) for oestrous induction 48h before A.I. The

does were inseminated with 0.5 ml semen from pools with a concentration of 30×10^6 cells / ml. Ovulation of does was immediately induced after A.I. by an intramuscular injection of 0.8 mg Busereline acetate (Suprefact®, Hoechst-Roussel, Germany). The number of inseminations per group was: 160 C, 159 CxR, 161 RxC and 158 R.

3.5.3.5 Statistical analyses

Semen quality traits were subjected to an analysis of variance by using GLM procedures of SAS v.8. (SAS, 2001) according to a model which included the fixed factors of buck genetic type (four levels; C, CxR, RxC, R), the number of ejaculates per pool (five levels, 4 to 8), and week of insemination (ten levels), taking into account the small differences in environmental conditions and/or in sample preparation procedures that could exist from week to week.

Fertility was analysed as a continuous trait (kindling rate) or as a binary trait (success or failure of kindling). In the first case, the analysis was performed using GLM procedures of SAS v.8. (SAS, 2001) according to the same model assumed for semen quality traits. In the second case, logistic regression, with logit link function, was used to analyse fertility by using GENMOD procedures of SAS v.8. (SAS, 2001) according to a mixed model including the same fixed factors as before plus the physiological status of the multiparous does (two levels; lactating, non lactating) and the permanent random female effect. The random effect associated with the pool was always non significant and was therefore not included in the analyses.

A mixed linear model was used to analyse the number of kits born alive and number of stillborn kits by using the MIXED procedure of SAS v.8 (SAS, 2001) according to the second model used to analyse fertility.

Estimates of the estimable functions of crossbreeding genetic parameters of the lines were obtained from the solutions to the corresponding models by generalized least squares using GLM, GENMOD and MIXED procedures. Crossbreeding parameters were estimated according to the Dickerson model following the procedure described by Baselga *et al.* (2003).

Linear regression analyses were used to study the relationships between semen quality traits and fertility and litter size by using REG procedure of SAS v.8 (SAS, 2001). First, a set of bivariate analyses was performed. Then multivariate analyses (stepwise) were carried out including variables whose bivariate test had a p-value lower than or equal to 0.25 (Hosmer and Lemeshow, 1989) and variables considered of biological importance by other authors (Gadea *et al.*, 2004) which were weakly or non correlated with other variables in the model, in accordance with previous results (García-Tomás *et al.*, 2006a), to avoid problems due to co-linearity. The fac-

tor buck genetic type was included in all regression models for fertility and for number of kits born alive and stillborn.

3.5.4 Results

3.5.4.1 Effect of buck genetic type on semen characteristics, fertility and prolificacy

Table 3.5.1 shows LS means (standard error) for semen characteristics according to buck genetic type. Differences between purebred males were found for pH, NSP, NAP and PD. These differences were always favourable to R males, but were only relevant for NAP and PD (37% and 77% of the mean, respectively). There were also differences between both types of crossbred males: males from the genetic type CxR showed higher NSP (4%) and lower TAP (32%) than RxC males. The C males showed the highest PD and the RxC males showed the highest TAP.

Table 3.5.2 shows LS means (standard error) for fertility, number of kits born alive and number of stillborn kits according to the buck genetic type. When fertility was analysed as a continuous trait, differences between purebred males were important and favourable to R males (about 10% of the mean), and differences between crossbred males were relevant and favourable to CxR males (about 13%). RxC males had the worst fertility ratio; C and CxR males were in an intermediate position, while R males performed the best. When fertility was considered as a binary trait, RxC males also presented the worst percentage for fertility, while there were no significant differences between the other male genetic types. Buck genetic type had no effect on the number of kits born alive or stillborn.

The week of insemination and the physiological status of the female did not have any effect on fertility or on the number of kits born alive or stillborn.

Table 3.5.3 shows estimates of estimable functions between direct genetic effects, maternal genetic effects and individual heterosis for fertility and prolificacy. No differences between lines were observed for direct genetic effects with respect to any trait. The only significant differences between lines for maternal genetic effects were found for fertility, defined as a continuous or discrete variable. These differences were relevant (18% of the mean) and favourable to line R. Individual heterosis was significant for fertility considered as a continuous trait and also significantly different from zero at the 10% level when it was considered to be a binary trait. It was relevant in magnitude (10%) but unfavourable to crossbred males. There was no significant heterosis effect on the number of kits stillborn, and although differences between crossbred and purebred males were im-

portant (about 20%), and favourable to crossbred males, the values were very small and the differences could also be considered irrelevant.

3.5.4.2 Relationship between semen characteristics and fertility and prolificacy traits.

Tables 3.5.4, 3.5.5 and 3.5.6 show the results of bivariate and multivariate linear regression analysis for fertility and the number of kits born alive and stillborn on buck genetic type and semen quality traits. Bivariate and multivariate analyses showed small correlations between all semen quality traits and variables that characterize the reproductive performance of does (fertility and prolificacy): R^2 was always less than 0.15.

When fertility was analysed using bivariate regression model, NSP had a small and positive effect on fertility (0.94 ± 0.29), whereas NAP had a small and negative effect (-2.20 ± 0.69). For traits related to prolificacy, only DD had a significant but negligible effect (0.15 ± 0.07) on number of kits stillborn. In all cases the proportion of the total variance explained by models was less than 0.09.

According to the results of the bivariate analyses and the previous estimates of correlations between semen quality traits, two multivariate regression models for fertility were considered, which included the buck genetic type and seven low or non correlated variables out of the following ones: IM, Vi, NAR, NSP, NAP, TAP, DP and DD. Table 3.5.5 shows the results of the multivariate regression analyses (stepwise) of semen quality traits for fertility. Buck genetic type, IM, NSP, NAP and Vi or NAR appeared to be related to fertility. Individual motility was significant at the 10 % level and it had an important and positive effect (9.71 ± 4.53 in one model and 10.01 ± 4.54 in other model), while NAP appeared as a significant component with a small effect on fertility (-2.01 ± 1.02 in one model and -2.06 ± 1.06 in other model). The percentage of total variance explained by the models was very small ($R^2 = 0.15$).

Also, according to the bivariate analysis, buck genetic type, MM, IM, NSP, NAP and TAP were chosen to construct a multivariate model for number of kits born alive, while buck genetic type, IM, PD and DD were selected for number of kits stillborn. Table 3.5.6 shows the results of the multivariate regression analyses for the number of kits born alive and the number stillborn. Of the selected variables, buck genetic type, MM and TAP were finally included in the multivariate model for the number of kits born alive, but only MM and TAP had significant effects (-0.98 ± 0.39 and 0.17 ± 0.07 , respectively). Of the variables considered to construct the multivariate model for the number of kits stillborn, DD appeared as a significant component but with a negligible effect (0.17 ± 0.07).

3.5.5 Discussion

The values for fertility and prolificacy obtained in this study were similar to those reported in previous studies performed with other rabbit lines (Pizzi *et al.*, 1996; Castellini and Lattaioli, 1999; Vicente *et al.*, 2000; Lavara *et al.*, 2005); only Brun *et al.* (2002a) reported smaller values for fertility.

Relevant differences between buck genetic types have been found for fertility. These differences could be explained by differences in maternal genetic effects and the existence of heterosis for this trait. In the present work, maternal genetic effects were high in magnitude and favourable to line R, whereas the effect of individual heterosis was negative and moderate. Thus, due to unfavourable maternal genetic effects, C and RxC bucks exhibited lower reproductive performance than CxR and R bucks, but only the fertility of RxC males was significantly different from that of CxR and R males due to the addition of the negative heterotic effect for this group. We cannot offer a hypothesis about the origin of the observed maternal genetic effects on fertility. García-Tomás *et al.* (2006b), in individual ejaculates from the same genetic types, and Brun *et al.* (2002b), in other rabbit lines, found maternal genetic effects for IM that could explain the observed maternal genetic effect on fertility since this trait seems to be related to fertility, as will later be discussed. From our results, the use of a crossbred male instead of a purebred male does not seem to be particularly advisable. Brun *et al.* (2002a) reported differences in fertility between mating involved crossbred males and females and purebred males and females from lines selected for litter size. However, it was not possible to know from that study whether those differences were due to the crossbred male or to the crossbred female. There is no information available about individual heterosis and direct and maternal genetic effects for male fertility in rabbits. In other species, such as swine and cattle, controversial results have been published about the effect of purebred *versus* crossbred sires on fertility (see reviews Buchanan, 1987; Thrift and Aaron, 1987). It seems that crossbred males could be more advanced in sexual maturity. However, at the adult stage, differences with respect to purebred males tend to disappear (Wilson *et al.*, 1977; Buchanan and Johnson, 1984). In our experiment, bucks could be considered as adult males and therefore differences in fertility, prolificacy or semen quality were not expected to be due to differences in maturity.

We carried out two different analyses for fertility, considering this variable either as a continuous or a discrete trait. When fertility was defined as a continuous trait, results had a more immediate interpretation but it was not possible to take into account the correlations between data from the same female and/or the effect of other factors related with the female, such as its physiological status, on the frequencies of the different qualitative traits. In the case of experiments which are not completely equilibrated for these factors, certain results could be masked.

Differences in fertility between buck genetic types were in concordance with the observed differences in semen quality traits. In general, fertility and most semen quality traits were better in R males than in C males, and also

were better in CxR males than in RxC males. When ejaculates from the same bucks were evaluated individually (García-Tomás *et al.*, 2006b) similar behaviour of genetic types was obtained for semen quality traits; the use of pools of ejaculates instead of individual ejaculates, the preselection of ejaculates and the environmental factors could explain the differences observed in the results from the two works. Vicente *et al.* (2000), Theau-Clement *et al.* (2003) and Brun *et al.* (2002a, 2004) also observed differences in semen characteristics for males from different lines of selection and from crossbred and purebred males. The relative importance of semen quality traits must be established through their relationship with fertility after insemination or natural mating. It is difficult to draw any general conclusions from the different studies, mainly due to differences in the procedures used to evaluate semen quality and management and preparation conditions associated with the insemination doses.

In rabbits, several authors have studied the relationship between classical semen quality traits (volume, concentration and motility) and fertility (Pizzi *et al.*, 1996; Viudes-de-Castro *et al.*, 1997; Castellini and Lattaioli, 1999; Brun *et al.*, 2002a). Furthermore, variables related with sperm viability and sperm morphological abnormalities have never or hardly ever been considered. In the present study, semen was evaluated for these traits and tested for fertility and prolificacy under commercial conditions at a non-restrictive concentration (15 million spermatozoa per dose) and using ejaculates pre-selected by motility. Motility was not correlated or was only poorly correlated with all the semen quality traits recorded here (García-Tomás *et al.*, 2006a) therefore the preselection of ejaculates was expected to have no effect on the distribution of these variables. The use of an excessive number of sperm for AI could have a compensatory effect and mask the effect of some semen quality traits on fertility (Tardif *et al.*, 1999).

Under our experimental conditions, only NSP and NAP had small and significant effects on fertility in a bivariate linear regression analysis, but only NAP appeared as a significant component in the multivariate linear regression models considered. However, the percentage of total variance explained by the multivariate models was very small ($R\text{-square} \leq 0.15$). The percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of neck-midpiece is negatively and moderately correlated with the percentage of sperm normalcy: this relationship explains the positive effect of NSP on fertility and the negative effect of NAP. The effect of these variables on fertility is interesting from a practical point of view, since morphological abnormalities are easily detected under a light microscope at x400 and this equipment is usually available in artificial insemination centres. Moreover, it is important to bear in mind that NSP is a very repeatable trait (García-Tomás *et al.*, 2006a) and therefore this trait could facilitate selection of sires for rabbit AI. In rabbits, Lavara *et al.* (2005) showed a negative correlation between the variable percentage of abnormal sperm and kindling rate. However, when this variable was included in a multiple regression model, it was found to be non significant. In boars, an inverse relationship has been reported between the number of morphological abnormalities and fertility (Gadea, 2005).

Individual motility is considered a good indicator of the functionality and integrity of the membranes. In rabbits, Brun *et al.* (2002a) showed that mass motility, evaluated according to a subjective scale, had a positive influence on the kindling rate but Hagen *et al.* (2002) found that sperm velocity, measured in $\mu\text{m/s}$ of a linear trajectory, was not significantly correlated with fertility. Farrell *et al.* (1993) and Lavara *et al.* (2005) studied the relationship between fertility and sperm motility parameters assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA). Farrell *et al.* (1993) found that the correlation between fertility and several motility parameters was $r = 0.53$. Lavara *et al.* (2005) concluded that the velocity parameters average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$) and linearity index (LIN, %) had the highest impact in a multiple regression model for fertility, although these variables were statistically non significant. The high correlation obtained between VAP and VCL (0.95) could lead to problems due to co-linearity and mask results. In swine, Tardif *et al.* (1999) identified sperm motility (the percentage of motile spermatozoa visually assessed by microscopy) as a useful indicator of sperm fertilizing capacity in vivo when suboptimal sperm numbers were used for insemination and Gadea *et al.* (2004) found that sperm motility was a major factor in fertility when commercial doses were used for insemination. However, in our experiment there was no clear relationship between individual motility and fertility. In the bivariate analysis, this trait was non-significant, and in the multivariate model it was important but significant only at 10 % level. These results were probably due to the small range of variation for this trait after the pre-selection of the ejaculates.

Viability and NAR were non-significant components in the two multivariate models for fertility. The relationship between fertility and viability has been considered by several authors, although there was disagreement in the results. The acrosome integrity also has been judged to be an important factor in male fertility; in rabbits, Courtens *et al.* (1994) showed a negative and moderate correlation ($r = -0.55$) between fertility and percentage of abnormal acrosomes.

In our experiment, fertility did not vary according to the physiological status of the does at the time of insemination. Castellini and Lattaioli (1999) did not find any significant differences in fertility between receptive multiparous lactating and non-lactating does either, but Piles *et al.*, (2005) reported a negative effect of lactation on fertility in C line and Fortun-Lamotte and Bolet (1995) and Brun *et al.* (2002a) also observed this effect in other populations.

In the present study, no significant differences were observed among buck genetic types in terms of the number of kits born alive and stillborn. These results do not agree with those presented by Vicente *et al.* (2000) and Brun *et al.* (2002a), but the properties of either the genetic lines or of the doses used for AI in our experiment may partly explain this lack of agreement.

Heterosis and differences between lines in direct and maternal genetic effects were found to be non significant for prolificacy traits. Buchanan (1987) reported that experiments concerning the effect of purebred *versus*

crossbred boars on litter size at birth showed contradictory results but for litter size at weaning most research indicated a small advantage for purebred boars.

Although no bivariate model was significant for the number of kits born alive, MM and TAP were significantly correlated with this trait in a multivariate model. Similarly, Gadea *et al.* (2004) found no significant univariate model for piglets born alive but a significant multivariate model was constructed with two variables of motility (percentage of motile spermatozoa and forward progressive motility) and the variable folded tail. For the number of kits stillborn DD appeared as a significant but negligible component, in both the bivariate and multivariate models. Sperm parameters accounted for only a very small part of the percentage of variation in litter size.

Additional methods are needed to better predict the fertilizing capacity of spermatozoa, since the use of a single attribute does not seem to be sufficient (Colenbrander *et al.*, 2003) and because the classical methods of semen evaluation are poor predictors of fertility outcome (Gadea *et al.*, 2004). In field commercial conditions, immediate, simple and non-expensive assays are needed to evaluate the ejaculates and optimise the use of males in AI centres.

3.5.6 Conclusions

Crossbred sires tended to express a moderate advantage for various semen quality traits, but when semen from these bucks was used for AI under commercial conditions, a negative heterotic effect was observed on fertility. The differences in fertility found in the present work were mainly explained by differences in maternal genetic effects. Therefore, the use of crossbred males does not provide a major advantage with respect to the use of purebred males from sire lines.

The qualitative characteristics of the spermatozoa evaluated here were poor predictors of the fertility outcome and prolificacy.

3.5.7 Acknowledgements

This research was supported by INIA project SC 00 - 011 and UB project 56.5.48.000.00 689.05 (MC 066605). Mónica García received a fellowship from the Generalitat de Catalunya. The authors are grateful to Dr. Blasco and Dr. López-Bejar for comments and suggestions.

3.5.8 References

- Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M. 2001. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology*; 56(4): 677-684.
- Alvariño JMR, Lopez FJ, Del Arco JA, Bueno A, Torres R. 1996. Effects of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 hours stored semen. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Toulouse (France)*; 2: 3-5.
- Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*; 29: 1245-1251.
- Baselga M, García M, Sánchez JP, Vicente JS, Lavara R. 2003. Analysis of reproductive traits in crosses among maternal lines of rabbits. *Anim. Res.*; 52: 473-479.
- Braundmeier AG, Miller DJ. 2001. The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility. *J. Dairy Sci.*; 84 (9): 1915-1925.
- Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002a. The relationship between semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*; 70: 139-149.
- Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002b. Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. *Anim. Res.*; 51: 433-442.
- Brun JM, Theau-Clement M, Larzul C, Falières J, Saleil G. 2004. Semen production in two lines divergently selected for 63-D body weight. *8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico)*; 238-244.
- Buchanan DS, Johnson RK. 1984. Reproductive-performance for 4 breeds of swine - crossbred females and purebred and crossbred boars. *J. Anim. Sci.*; 59 (4): 948-956.
- Buchanan DS. 1987. The crossbred sire: experimental results for swine. *J. Anim. Sci.*; 65: 117-127.
- Castellini C, Lattaioli P. 1999. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*; 57: 111-120.
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Repr. Dom. Anim.*; 38: 305-311.

- Courtens JL, Bolet G, Theau-Clement M. 1994. Effect of acrosome defects and sperm chromatin decondensation on fertility and litter size in the rabbit. Preliminary electron-microscopic study. *Reprod. Nutr. Dev.*; 34: 427-437.
- Ducrocq V, Humblot P. 1997. Is selection on semen characteristics needed?. International Workshop on Genetic Improvement of Functional Traits in Cattle: Fertility and Reproduction, Grub, Germany, Nov. 23-25.
- Estany J, Baselga M, Blasco A, Camacho J. 1989. Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livest. Prod. Sci.*; 21: 67-75.
- Estany J, Camacho J, Baselga M, Blasco A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Gen. Selec. Evol.*; 24: 527-537.
- Farrell PB, Foote RH, Simkin ME, Clegg ED, Wall RJ. 1993. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated and fertility in rabbits. *J. Andrology*; 14: 464-471.
- Fortun-Lamothe L, Bolet G. 1995. Les effets de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *INRA Prod. Anim.*; 8: 49-53.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Repr. Dom. Anim.*; 39: 303-308.
- Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*; 63: 431-444.
- García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006a. Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Anim. Repr. Sci.*; 93: 88-100.
- García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. 2006b. Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livest. Sci.*; 100: 111-120.
- Gómez EA, Rafel O, Ramon J, Baselga M. 1996. A genetic study of a line selected on litter size at weaning. 6th congress of the world rabbit science association congress, Toulouse, (France); 2: 289-292.
- Gómez EA, Baselga M, Rafel O, Ramon J. 1999. Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Options Méditerranéennes, series cahiers* ; 41: 289-292.

Hagen DR, Gilkey AL, Foote RH. 2002. Spermatozoal velocity and motility and relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit Sci.*; 10 (4): 135-140.

Hosmer DW, Lemeshow S. 1989. *Applied logistic regression*. Wiley-Interscience publication, USA.

Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Repr. Nutr. Dev.*; 36: 565-575.

Lavara R, Mocé E, Lavara F, Viudes de Castro MP, Vicente JS. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*; 64: 1130-1141.

Ombelet W, Menkveld R, Kruger TFK, Steeno O. 1995. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum. Repr. Update*; 1(6): 543-557.

Piles M, Rafel O, Ramon J, Varona L. 2005. Genetic parameters of fertility in two lines of rabbits with different reproductive potential. *J. Anim. Sci.*; 83: 340-343.

Pizzi F, Guaita N, Luzi F, Biffi B, Brivio R, Crimella C. 1996. Effect of the numbers of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility in rabbits. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France)*; 2: 3- 5.

Roca J, Martinez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Repr. Sci.*; 64: 103-112.

SAS Institute Inc., 2001. *SAS/STAT User's Guide Statistics, Version 8*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*; 52: 447-459.

Theau- Clement M, Brun JM, Sabbioni E, Castellini C, Renieri T, Besenfelder U, Falieres J, Esparbie J, Saleil J. 2003. Comparaison de la production spermatique de trois souches de lapins: moyennes et variabilités. 10^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 Nov., Paris.

Thrift FA, Aaron DK. 1987. The crossbred sire: experimental results for cattle. *J. Anim. Sci.*; 65: 128-135.

Vicente JS, Viudes-de-Castro MR, Lavara R, Lavara F. 2000. Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain)*; A: 1273-277.

Vicente JS, Viudes-de-Castro MR, Lavara R, Mocé E. 2004. Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology*; 61: 1357-1365.

Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. 1997. Effect of sperm count on the fertility and prolificacy of meat rabbits. *Anim. Repr. Sci.*; 46: 313-319.

Wilson ER, Johnson RK, Wettemann RP. 1977. Reproductive and testicular characteristics of purebred and crossbred boars. *J. Anim. Sci.*; 44 (6): 939-947.

TABLE 3.5.1: LS MEANS (SE) ACCORDING TO THE GENETIC TYPE OF BUCKS FOR SEMEN CHARACTERISTICS

	<i>pH</i>	<i>MM</i> ¹	<i>IM</i> ¹	<i>Vi</i> ¹ (%)	<i>NAR</i> ¹ (%)	<i>NSP</i> ¹ (%)	<i>HAP</i> ¹ (%)	<i>NAP</i> ¹ (%)	<i>TAP</i> ¹ (%)	<i>PD</i> ¹ (%)	<i>DD</i> ¹ (%)
Genetic type of bucks											
C	7.8 ^a	3.2	3.2	84.3 ^b	85.8 ^b	85.6 ^b	0.39	4.5 ^a	4.1 ^b	2.3 ^a	2.9 ^a
	(0.06)	(0.1)	(0.07)	(1.3)	(1.2)	(1.22)	(0.1)	(0.5)	(0.6)	(0.2)	(0.3)
CxR	7.8 ^a	3.2	3.2	89.7 ^a	91.1 ^a	89.2 ^a	0.49	2.6 ^b	4.0 ^b	1.05 ^{b,c}	2.2 ^{a,b}
	(0.07)	(0.1)	(0.07)	(1.4)	(1.3)	(1.2)	(0.1)	(0.5)	(0.6)	(0.3)	(0.4)
RxC	7.8 ^a	3.3	3.1	88.4 ^a	89.8 ^a	85.7 ^b	0.39	3.5 ^{a,b}	5.9 ^a	1.4 ^b	1.5 ^b
	(0.07)	(0.1)	(0.07)	(1.4)	(1.3)	(1.2)	(0.1)	(0.5)	(0.6)	(0.3)	(0.4)
R	7.4 ^b	2.9	3.3	86.1 ^{a,b}	87.5 ^{a,b}	91.1 ^a	0.33	2.7 ^b	3.4 ^b	0.53 ^c	2.0 ^{a,b}
	(0.07)	(0.1)	(0.07)	(1.3)	(1.2)	(1.1)	(0.1)	(0.5)	(0.6)	(0.2)	(0.3)
Week of insemination	ns	*	*	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns

ns (non significant), a, b, c, Different letters in the same column indicate significant differences among groups at the 5% level * significant at the 5% level.

¹ MM: mass motility, IM: individual motility, Vi: percentage of viable spermatozoa, NAR: percentage of spermatozoa with normal apical ridge, NSP: percentage of normal spermatozoa, HAP: percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of head, NAP: neck-midpiece, TAP: tail, PD: percentage of spermatozoa with presence of proximal cytoplasmic droplet, DD: distal cytoplasmic droplet.

TABLE 3.5.2: FERTILITY AND PROLIFICACY ACCORDING TO THE BUCK GENETIC TYPES

	¹ Fertility (%)	² Fertility (0, 1)	Kits born alive	Kits stillborn
Buck genetic types				
C	74.8 ^b (3.7)	1.2 ^b (0.27)	9.2 (0.49)	1.06 (0.27)
CxR	78.7 ^{b, c} (4.1)	1.5 ^b (0.31)	9.9 (0.52)	0.78 (0.29)
RxC	65.5 ^a (4.0)	0.65 ^a (0.29)	10.0 (0.53)	0.86 (0.29)
R	85.3 ^c (3.6)	1.93 ^b (0.28)	9.9 (0.46)	1.00 (0.25)
Week insemination	ns	ns	ns	Ns
Physiological status		ns	ns	Ns

ns (non significant), a, b, c, Different letters in the same column indicate significant differences among groups at the 5% level.

¹ Fertility analysed as a continuous trait

² Fertility analysed as a binary trait. Fertility (%) = eLS-means / 1 + eLS-means

TABLE 3.5.3: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (dC, dR) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (mC, mR) OF THE LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROISIS (hCR) BETWEEN THEM FOR FERTILITY AND PROLIFICACY

	¹ Fertility (%)	² Fertility (0, 1)	Kits born alive	Kits stillborn
³ d _C – d _R	2.8 (7.5)	0.16 (0.51)	-0.8 (0.9)	-0.03 (0.50)
³ m _C – m _R	-13.2* (4.3)	-0.89* (0.30)	0.13 (0.52)	0.08 (0.28)
³ h _{CR}	-7.9* (3.9)	-0.46+ (0.27)	0.4 (0.48)	-0.21 (0.26)

* significant at the 5% level, + significant at the 10% level.

¹ Fertility analysed as a continuous trait

² Fertility analysed as a binary trait. Fertility (%) = eLS-means / 1 + eLS-means

³ dC, dR: direct genetic effect of lines C and R, respectively; mC, mR: maternal genetic effect of lines C and R, respectively; hCR: heterotic effect between lines C and R.

TABLE 3.5.4: BIVARIATE LINEAR REGRESSION FOR KINDLING RATE, KITS BORN ALIVE AND KITS STILLBORN ON BUCK GENETIC TYPE AND DIFFERENT SEMEN QUALITY TRAITS

	% Fertility				Kits born alive				Kits stillborn			
	${}^2\beta$	3SE	p-value	R ²	${}^2\beta$	3SE	p-value	R ²	${}^2\beta$	3SE	p-value	R ²
pH	5.16	7.22	0.48	0.006	-0.09	0.87	0.91	0.002	0.28	0.49	0.57	0.004
MM ¹	-1.05	3.35	0.75	0.001	-0.71	0.39	0.08	0.05	0.08	0.23	0.74	0.001
IM ¹	4.22	4.58	0.36	0.008	0.84	0.52	0.11	0.04	-0.50	0.33	0.13	0.02
Vi ¹	0.32	0.28	0.25	0.013	-0.009	0.03	0.79	0.02	-0.008	0.02	0.68	0.002
NAR ¹	0.42	0.29	0.16	0.02	-0.02	0.03	0.62	0.02	-0.009	0.02	0.67	0.002
NSP ¹	0.94	0.29	0.002	0.093	-0.06	0.03	0.07	0.05	-0.015	0.02	0.49	0.005
HAP ¹	0.36	3.77	0.92	0.002	0.37	0.43	0.39	0.03	-0.29	0.27	0.29	0.01
NAP ¹	-2.20	0.69	0.002	0.091	0.13	0.08	0.11	0.05	0.04	0.05	0.43	0.007
TAP ¹	-0.63	0.58	0.28	0.01	0.09	0.06	0.16	0.04	-0.009	0.04	0.84	0.0008
PD ¹	-1.72	1.51	0.26	0.013	-0.0007	0.17	0.99	0.02	0.20	0.11	0.07	0.03
DD ¹	-0.89	1.03	0.39	0.007	-0.11	0.12	0.37	0.03	0.15	0.07	0.04	0.04

¹ MM: mass motility, IM: individual motility, Vi: percentage of viable spermatozoa, NAR: percentage of spermatozoa with normal apical ridge, NSP: percentage of normal spermatozoa, HAP: percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of head, NAP: neck-midpiece, TAP: tail, PD: percentage of spermatozoa with presence of proximal cytoplasmic droplet, DD: distal cytoplasmic droplet.

² β : coefficients of regression.

³ SE: standard error.

TABLE 3.5.5: MULTIVARIATE LINEAR REGRESSION OF KINDLING RATE ON BUCK GENETIC TYPE AND SEMEN QUALITY TRIATS

<i>Multivariate linear models</i>								
	<i>Model 1</i>				<i>Model 2</i>			
	² β	³ SE	Partial R ²	p-value	² β	³ SE	Partial R ²	p-value
Constant	36.48	53.9		0.50	39.39	56.5		0.48
NAP ¹	-2.01	1.02	0.083	0.004	-2.06	1.06	0.083	0.004
IM ¹	9.71	4.53	0.03	0.073	10.01	4.54	0.03	0.073
Vi ¹	-0.41	0.34	0.015	0.20				
NAR ¹					-0.43	0.37	0.15	0.20
NSP ¹	0.65	0.42	0.013	0.23	0.64	0.42	0.012	0.24
Buck genetic type	-1.85	1.47	0.014	0.21	-1.83	1.47	0.014	0.21
p-value	0.006				0.007			
R ²	0.15				0.15			

¹ NAP: percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of neck-midpiece, IM: individual motility, Vi: percentage of viable spermatozoa, NAR: percentage of spermatozoa with normal apical ridge, NSP: percentage of normal spermatozoa.

² β : coefficients of regression.

³ SE: standard error.

TABLE 3.5.6: MULTIVARIATE LINEAR REGRESSION FOR NUMBER OF KITS BORN ALIVE AND KITS STILLBORN ON BUCK GENETIC TYPE AND SEMEN QUALITY TRAITS

	<i>Number of kits born alive</i>			<i>Number of kits stillborn</i>		
	${}^2\beta$	3SE	p-value	${}^2\beta$	3SE	p-value
Constant	11.03	1.35	0.0001	2.53	1.1	0.02
MM ¹	-0.94	0.39	0.05			
IM ¹				-0.62	0.34	0.07
TAP ¹	0.17	0.07	0.03			
DD ¹				0.17	0.07	0.04
Buck genetic type	0.20	0.18	0.26			
p-value		0.03			0.02	
R ²		0.08			0.07	

¹ MM: mass motility, IM: individual motility, TAP: percentage of spermatozoa with morphological abnormalities of tail, DD: percentage of spermatozoa with presence of distal cytoplasmic droplet.

² β : coefficients of regression.

³ SE: standard error.

Capítol 4
RESUM GLOBAL

Els treballs realitzats en aquesta tesi han estudiat l'efecte de factors genètics sobre diversos aspectes relacionats amb l'eficàcia en l'ús dels mascles d'inseminació artificial: la maduració sexual, la qualitat i producció seminal, la fertilitat i la prolificitat dels mascles.

En primer lloc s'ha estudiat l'existència de variació entre línies en alguns marcadors morfològics i moleculars de la maduració sexual: variables macroscòpiques de testicle i epidídim, variables microscòpiques de testicle i diversos paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu del testicle.

La mida del testicle ha estat consirada per alguns autors com un marcador de la maduració sexual i la producció seminal degut a la seva relació amb la activitat mitòtica i meiótica en els túbuls seminífers. A partir de l'estudi de les correlacions entre variables macroscòpiques del testicle i l'epidídim (pes, volum, longitud i amplada) i les variables microscòpiques dels testicles (diàmetre dels túbuls seminífers –indicador de l'increment en mida i en nombre de cèl·lules germinals durant el procés d'espermatogènesi-, percentatge de túbuls amb llum, i els percentatges de túbuls amb presència d'espermàtides elongades i amb presència d'espermatozous) s'ha trobat que les variables relacionades amb la mida del testicle i de l'epidídim no estaven relacionades amb les variables microscòpiques del testicle que sí donen informació respecte a la maduresa funcional d'aquest òrgan. Així, a una edat determinada, una major mida del testicle no implica necessàriament un major grau de desenvolupament sexual, per la qual cosa no es pot considerar un bon indicador de la maduresa sexual d'un individu. D'altra banda s'ha observat que les variables macroscòpiques del testicle presentaven unes correlacions moderades-altes entre elles, de manera que per a futures determinacions del valor de la seva mida es podria utilitzar només una de elles. No passa el mateix per a les variables relacionades amb la mida de l'epidídim que es trobaven poc o moderadament correlacionades, únicament el pes i el volum presentaven un alt valor de correlació. Ambdós conjunts de variables estaven moderadament correlacionats entre ells. Queda per conèixer la relació entre la mida del testicle i la producció de semen per gram de testicle.

Les línies estudiades van presentar uns patrons de desenvolupament similars per a totes les variables durant el període estudiat (entre les 4 i les 33 setmanes de vida), excepte per al percentatge de túbuls seminífers amb llum. El pes viu va seguir una corba sigmoïdal amb el màxim creixement entre les 4 i 8 setmanes de vida, i a partir d'aquest moment s'observava una disminució progressiva del creixement fins a les 33 setmanes. El volum del testicle y del epidídim van presentar el màxim creixement entre les 10 i les 14 setmanes d'edat, la qual cosa indicaria el començament de la activitat espermatogènica, i arribaven al seu pes adult més tard de les 33 setmanes. L'aparició de la llum als túbuls seminífers es produïa entre les 8 i les 14 setmanes d'edat. El percentatge de túbuls seminífers amb llum presentaven un diferent patró de desenvolupament: en la línia Caldes el valor d'aquesta variable augmentava amb l'edat, mentre que en la línia Prat s'observà un valor més elevat a les 14 setmanes de vida, que es mantenia estable fins a les 33 setmanes. Aquest resultat podria indicar una major precocitat sexual d'aquesta última línia. La presència de túbuls amb espermàtides elongades i amb espermatozous, es va observar a partir de les 14 i de les 16 setmanes, respectivament. A les 20 setmanes de

vida (edat a la què normalment es mascles comencen la seva activitat reproductiva en granges comercials i centres d'inseminació) la proporció aconseguida del volum del testicle respecte al seu valor estimat al estat adult era només del 70%; només al voltant d'un 70% dels túbuls seminífers presentaven llum. Això, juntament amb l'evolució amb l'edat dels mascles del volum dels ejaculats i de la motilitat espermàtica, observada en dades històriques de la línia Caldes, permet concloure que a aquesta edat els mascles no semblen ser suficientment madurs per a ser utilitzats a un ritme intensiu de recollida. Caldria doncs adaptar el nombre d'extraccions setmanals a l'estat de desenvolupament de l'animal tant per les possibles repercussions negatives sobre la futura vida reproductiva dels mascles joves com per a optimitzar el rendiment obtingut dels mascles adults.

Respecte als valors de les variables estudiades, es van observar diferències entre línies en el pes viu a partir de les 4 setmanes, en el volum del testicle respecte al pes viu de l'animal a partir de les 10 setmanes i en el percentatge de túbuls seminífers amb llum a les 14 setmanes, com s'ha esmentat abans. La línia Caldes és de major mida però té un volum de testicles proporcionalment menor, la qual cosa podria implicar una menor producció de semen, en el cas de que no hi hagueren diferències en la densitat de túbuls seminífers o aquestes foren favorables a la línia que presenta major volum de testicles. En aquest experiment es va decidir no realitzar extraccions de semen per la possible repercussió que aquestes podrien tenir sobre el procés de maduració sexual; tampoc no es disposa de dades històriques de la línia Prat relatives a la producció de semen perquè sempre ha estat utilitzada en munta natural, per la qual cosa no podem confirmar aquesta hipòtesis de moment. Està previst finalitzar l'experiment mesurant la densitat de túbuls seminífers i la producció d'espermatozous en el testicle.

Quan les variables eren analitzades en relació amb el seu valor adult estimat, les diferències per a la variable volum del testicle desapareixien, indicant un mateix grau de desenvolupament dels testicles en les dues línies. Tanmateix, per al pes corporal la línia Caldes presentava un major percentatge del pes adult a la pubertat (14-20 setmanes) però quan l'edat s'expressava en l'escala metabòlica de Taylor, aquestes diferències desapareixien. El percentatge de túbuls amb llum respecte al seu valor a les 33 setmanes de vida va presentar uns valors similars als d'aquesta variable en termes absoluts, la qual cosa també indica un major grau de maduresa en els mascles de la línia Prat a l'estadi puberal.

Els canvis més importants en el metabolisme oxidatiu van ser observats també a edats primerenques i podrien ser explicats pels canvis en l'estructura i funció testicular ja esmentats. Durant l'estadi puberal es van observar baixos nivells d'activitat de la catalasa, nivells alts d'activitat de la superòxid dismutasa, una alta concentració de testosterona i una moderada lipoperoxidació. Alguns autors en diferents espècies han observat un patró similar dels enzims antioxidants en el testicle i han suggerit que els baixos nivells de l'activitat catalasa podrien estar relacionats amb la necessitat d'un increment en peròxid d'hidrogen durant l'espermatogènesi. La dismutació de l'anió superòxid per la superòxid dismutasa genera peròxid d'hidrogen, el qual és convertit a aigua i oxigen per la catalasa. Nosaltres observarem alts nivells de superoxid dismutasa juntament amb baixos ni-

vells de catalasa al final de l'estadi de pubertat pel què seria possible que aquest requeriment de peròxid d'hidrogen es produís durant espermiogènesis. Està prevista la mesura del peròxid d'hidrogen per confirmar la seva presència durant la pubertat.

Ambdues línies van mostrar uns nivells i un perfil de desenvolupament similars per a la majoria de les variables estudiades. Aquestes variables, doncs, tot i tenir un paper destacat en la maduració sexual sembla que no afecten de manera important a la capacitat reproductiva.

En general es va observar un efecte negatiu de l'estació de naixement càlida sobre els valors absoluts i el patró de desenvolupament de la majoria de les variables estudiades. Els animals nascuts en l'estació càlida van presentar en l'estadi prepúber un retard en el creixement del volum del testicle i l'epidídim i uns alts nivells de lipoperoxidació, i a l'estadi púber un valor menor de volum de testicle i epidídim, un menor percentatge de túbuls seminífers amb espermatides elongades i amb espermatozous, una baixa concentració de testosterona i una alta activitat catalasa. És possible que els animals nascuts en l'estació càlida siguin més immadurs a edats primerenques que els animals nascuts en l'estació freda, tot i que el percentatge de túbuls seminífers amb llum (variable morfològica dels túbuls seminífers utilitzada per determinar l'edat a la pubertat en moltes espècies) no va presentar diferències. L'efecte de l'estació de naixement sobre el desenvolupament sexual s'hauria de tenir present en futurs estudis per a un anàlisi més precís, així com per a establir l'edat d'inici de la vida reproductiva dels mascles i el ritme d'extracció al inici.

Els darrers tres treballs de la tesis han tractat principalment de l'efecte del creuament sobre variables de producció i qualitat del semen, la fertilitat i la prolificitat del mascle, que de ser favorable podria conduir a un canvi en l'esquema de producció de carn de conill. Actualment, la producció intensiva de conill està basada en un creuament a tres vies, en el qual el mascle terminal usat és un mascle procedent d'una línia seleccionada per creixement. Per altra part, s'ha estimat la repetibilitat i s'han descrit les relacions existents entre les variables seminals, i d'aquestes amb les de fertilitat i de prolificitat .

La qualitat seminal ha estat descrita per una gran quantitat de característiques. Conèixer les seves relacions facilitaria tant l'anàlisi de les dades com la interpretació dels resultats en els estudis duts a terme per a conèixer les relacions que existeixen entre la fertilitat i les variables de producció i qualitat seminal. D'altra banda, conèixer aquestes relacions facilita l'avaluació del semen a nivell dels centres d'inseminació, al permetre reduir el nombre de variables utilitzades escollint la que sigui més senzilla i ràpida de valorar. Així doncs, en primer lloc es va realitzar un estudi sobre les correlacions existents entre algunes de les variables que defineixen la qualitat seminal: pH, volum de l'ejaculat, motilitat massal, motilitat individual dels espermatozous, concentració espermàtica, nombre total d'espermatozous per ejaculat, percentatge d'espermatozous viables, percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica, percentatge d'espermatozous normals, percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de cap, coll-part intermèdia i cua i amb presència de gotes

citoplasmàtiques proximals i distals. A partir dels resultats d'aquest estudi es va observar que les variables que defineixen la viabilitat, la normalitat acrosòmica i la normalitat morfològica dels espermatozous estaven poc correlacionades amb les variables normalment utilitzades en la valoració diària dels mascles d'inseminació (volum de l'ejaculat, motilitat massal, motilitat individual dels espermatozous, concentració espermàtica, nombre total d'espermatozous per ejaculat). Sembla doncs, que aquestes variables estan explicant una part distinta de la variació observada, i per tant caldria incloure al menys alguna d'elles a l'avaluació dels ejaculats que normalment es fa en els centres d'inseminació. D'altra banda apareixien tres grups de variables molt correlacionades: 1) percentatge d'espermatozous viables i percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica; 2) motilitat massal i motilitat individual; 3) percentatge d'espermatozous normals, percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de coll-part intermèdia i de cua. Per a optimitzar el temps i els recursos en l'avaluació dels ejaculats en els centres d'inseminació s'hauria d'escollir la variable més ràpida, econòmica i fàcilment mesurable. Quant a la repetibilitat dels caràcters, va resultar moderada per a la majoria de les variables estudiades, indicant que almenys la meitat de la variància fenotípica observada era deguda a fonts de variació relacionades amb el mascle. L'estima del potencial productiu d'un animal és un punt important per tal de poder prendre decisions respecte la seva vida en l'explotació, el coneixement de la repetibilitat dels caràcters permet determinar el nombre de mesures necessàries per a obtenir una estima precisa d'aquest potencial.

En el següent treball es van estimar els paràmetres de creuament i l'efecte del tipus genètic sobre les variables ja esmentades més 5 variables relacionades amb la qualitat de l'ejaculat: presència de gel, presència d'orina, presència de precipitats de carbonat càlcic, utilitat de l'ejaculat i alta motilitat. Per aquesta part es va realitzar un creuament dial·lèlic entre les línies Caldes i R. Es van observar diferències entre tipus genètics en les variables qualitatives de l'ejaculat, en les variables de producció (volum de l'ejaculat, concentració espermàtica i nombre total d'espermatozous de l'ejaculat) i en algunes de les variables de qualitat de l'espermatozou (percentatge d'espermatozous viables, percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica, percentatge d'espermatozous normals, percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques coll-part intermèdia i amb presència de gotes citoplasmàtiques proximals). Tot i que els resultats obtinguts no permeten tenir una visió clara i diferenciada de les característiques de cada tipus genètics sembla que el semen dels mascles Caldes presenta una pitjor qualitat que el procedent dels mascles Caldes x R i dels mascles R.

Quant als paràmetres de creuament que expliquen aquestes diferències, es van observar diferències en els efectes genètics directes, les quals van ser importants i favorables a la línia Caldes per a variables relacionades amb la producció de semen (concentració espermàtica i nombre total d'espermatozous en l'ejaculat), i favorables a la línia R i altes per a variables relacionades amb la qualitat de l'ejaculat (presència de carbonat càlcic en l'ejaculat) i baixes per a variables relacionades amb la qualitat espermàtica (percentatge d'espermatozous viables, percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica, percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de coll-part intermèdia i presència de gotes citoplasmàti-

ques proximals). Sembla que la característica principal de la línia Caldes seria una major producció espermàtica mentre que la línia R es caracteritzaria per una millor qualitat seminal. També es van observar diferències entre els efectes genètics materns per a moltes de les variables estudiades. En general, quan la mare pertanyia a la línia Caldes, els mascles produïen ejaculats de major volum mentre que quan la mare era de la línia R, els mascles presentaven una millor qualitat de l'ejaculat (presència de orina, alta motilitat), qualitat espermàtica (motilitat massal, motilitat individual, percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de coll-part intermèdia) i producció espermàtica (concentració d'espermatozous i nombre total d'espermatozous per ejaculat). Respecte l'efecte d'heterosi, únicament va resultar significatiu, presentant un valor favorable i elevat, per als percentatges d'espermatozous amb presència de gotes citoplasmàtiques proximals i distals, variables que es consideren relacionades amb la maduresa sexual. En conills, Brun i col. (2002b) observaven petits valors d'heterosi positiva per la motilitat massal, el percentatge d'espermatozous mòbils i una heterosi elevada per la concentració, el nombre d'espermatozous per ejaculat i el nombre d'espermatozous mòbils per ejaculat. És possible que en les línies Caldes i R la freqüència dels al·lels dels gens que intervenen en l'expressió d'aquests caràcters siguin similars, la qual cosa podria explicar que nosaltres no haguem observat heterosis en elles. Per tant, l'ús de mascles creuats per a millorar la productivitat dels centres d'inseminació no sembla tenir cap avantatge, sinó que seria més raonable l'ús d'animals de línies especialitzades.

A banda de la productivitat dels mascles als centres d'inseminació, l'interès en l'ús d'un mascle creuat s'ha d'estudiar en relació als seus resultats reproductius en les granges comercials. Així doncs, en un darrer estudi es va estudiar l'efecte del tipus genètic i es van estimar els paràmetres de creuament per a la fertilitat i la prolificitat dels mascles en inseminació artificial practicada en condicions comercials (preselecció dels ejaculats per motilitat i concentració d'espermatozous de 40 milions/ml). Per aquest estudi s'utilitzaren mascles de les mateixes línies del treball anterior i els seus creuaments recíprocs.

Els tipus genètics estudiats van presentar diferències importants en la fertilitat però no en la prolificitat. Aquestes diferències eren explicades per diferències en els efectes genètics materns i l'existència d'heterosis, però no pels efectes genètics directes, que no van resultar significatius. Els efectes genètics materns van ser molt alts i favorables a la línia R, això explicaria la més baixa fertilitat observada en els mascles dels tipus genètics Caldes i R x Caldes respecte la fertilitat obtinguda pels mascles dels tipus genètics R i Caldes x R, encara que només la fertilitat dels mascles R x Caldes va resultar ser significativament diferent degut a la suma de l'efecte d'heterosi (moderada i negativa). Els efectes genètics materns observats en la motilitat individual podrien explicar els efectes genètics materns observats en la fertilitat, ja que la motilitat individual sembla estar relacionada amb la fertilitat. D'aquests resultats, conclouem que l'ús de mascles creuats tampoc suposa cap avantatge respecte a l'ús de mascles purs, quan el maneig reproductiu és en inseminació artificial en les condicions descrites anteriorment i en les línies estudiades.

La importància dels caràcters de qualitat seminal ha de ser en darrer terme establerta a partir de les seves relacions amb la fertilitat i la prolificitat. Amb les dades resultants del experiment anterior es va dur a terme una anàlisi de regressió múltiple per a intentar conèixer aquestes relacions. Es van considerar diferents models per tal d'evitar la inclusió de variables que fossin molt correlacionades. Per a la variable fertilitat el model contenia les següents variables: percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de coll-part intermèdia, percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica, motilitat individual, tipus genètic de mascle i percentatge d'espermatozous viables o percentatge d'espermatozous amb normalitat acrosòmica. Per a la variable nombre de llogrons nascuts vius el model incloïa les variables: motilitat massal i percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de cua. I per a la variable nombre de nascuts morts únicament la variable percentatge d'espermatozous amb presència de gota citoplasmàtica distal va ser significativa. Tots els models explicaven un percentatge molt baix de la variació total observada. Aquest resultat podria estar relacionat amb les condicions en què es va realitzar l'assaig, especialment en relació a la concentració d'espermatozous, que podrien donar lloc a què l'efecte d'algunes característiques de qualitat dels mateixos resultés emmascarat. Així doncs, els assajos en les condicions habituals de camp resulten poc potents per a aquest tipus d'estudi. Per a futurs estudis sobre la relació entre les variables de qualitat seminal i la fertilitat caldria un disseny amb unes condicions més restrictives. Malgrat això, es va observar un efecte desfavorable i petit del percentatge d'espermatozous amb anormalitats morfològiques de coll-part intermèdia. L'efecte d'aquesta variable sobre la fertilitat i la seva estreta relació amb el percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica és interessant des d'un punt de vista pràctic, ja que la normalitat morfològica és fàcilment detectada sota microscòpic de camp clar el qual es pot trobar usualment en els centres d'inseminació. D'altra banda, com ja hem vist, el percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica presentava una repetibilitat moderada, per tant l'ús d'aquest caràcter podria facilitar la selecció de mascles d'inseminació. La motilitat individual presentava un efecte sobre la fertilitat significatiu al 10%, positiu i important. Aquest resultat podria ser degut a la preselecció dels ejaculats, ja que únicament es van inseminar ejaculats amb un percentatge d'espermatozous mòbils major del 50%.

Com a conclusió general d'aquesta part, s'ha vist que el tipus genètic del mascle té una certa importància no només sobre les característiques de producció i qualitat seminal sinó també sobre la fertilitat, quan s'usa inseminació artificial en condicions comercials, caràcter que fins fa poc temps s'havia atribuït principalment a la femella. Possiblement l'efecte sigui encara major i pugui ser observat sobre la prolificitat si la inseminació es practica a concentracions més restrictives, que permetin un major aprofitament dels mascles d'inseminació.

Capítol 5

CONCLUSIONS

1- La majoria de les variables macroscòpiques del testicle i l'epidídim es van agrupar en conjunts no relacionats amb les variables microscòpiques dels testicles, indicadores de la funcionalitat d'aquest òrgan, a una edat donada. Per tant, les variables relacionades amb la mida del testicle i de l'epidídim poden no ser indicadores de la maduresa sexual.

2- Les dues línies estudiades van presentar un perfil de desenvolupament similar per a la majoria de les variables de tipus morfològic i molecular estudiades, les quals van mostrar els canvis més rellevants a edats primerenques i van estar afectades per les condicions ambientals de la mateixa manera.

3- La línia Prat va presentar un menor pes viu i un major volum de testicle, a partir del deslletament, i un major percentatge de túbuls seminífers, a la pubertat, que la línia Caldes. Malgrat que les dues línies van presentar un mateix grau de desenvolupament dels testicles a una mateixa edat, semblen diferir en el percentatge de túbuls amb llum en relació al seu valor a les 33 setmanes de vida, la qual cosa podria indicar una major precocitat sexual en els animals de la línia Prat.

4- És possible que els animals nascuts en l'estació càlida siguin més immadurs a edats primerenques que els animals nascuts en l'estació freda, ja que en general es va observar un efecte negatiu de l'estació de naixement càlida sobre els valors absoluts i el patró de desenvolupament de la majoria de les variables estudiades. L'efecte de l'estació de naixement sobre el desenvolupament sexual s'hauria de tenir present en futurs estudis per a un anàlisi més precís, així com per a establir l'edat d'inici de la vida reproductiva dels mascles i el ritme d'extracció al inici.

5- Les variables que defineixen la viabilitat, la normalitat acrosòmica i la normalitat morfològica dels espermatozous estaven poc correlacionades amb les variables normalment utilitzades en la valoració diària dels mascles d'inseminació (volum de l'ejaculat, motilitat massal, motilitat individual dels espermatozous, concentració espermàtica, nombre total d'espermatozous per ejaculat). Sembla doncs, que aquestes variables estan explicant una part distinta de la variació observada, i per tant caldria incloure al menys alguna d'elles a l'avaluació dels ejaculats que normalment es fa en els centres d'inseminació.

6- La repetibilitat dels caràcters va resultar moderada per a la majoria de les variables estudiades, indicant que almenys la meitat de la variància fenotípica observada era deguda a fonts de variació relacionades amb el mascle.

7- Les diferències observades entre tipus genètics de mascles per a les variables de producció i qualitat seminal podien ser explicades majorment per diferències en els efectes genètics directes i els efectes genètics materns, mentre que no existeix efecte d'heterosi o aquest és poc important per a la majoria de les variables es-

tudiades. L'ús de mascles creuats per a millorar la productivitat dels centres d'inseminació no sembla tenir cap avantatge, sinó que seria més raonable l'ús d'animals de línies especialitzades.

8- Els tipus genètics estudiats van presentar diferències importants en la fertilitat però no en la prolificitat. Aquestes diferències eren explicades per diferències en els efectes genètics materns (en general alts i favorables) i l'existència d'heterosis (moderada i negativa), però no pels efectes genètics directes, que no van resultar significatius. Així doncs, per a aquests caràcters i en les línies estudiades l'ús de mascles creuats tampoc suposa cap avantatge respecte a l'ús de mascles purs, quan el maneig reproductiu és en inseminació artificial en condicions comercials.

9- Els assajos en les condicions habituals de camp (preselecció per motilitat i inseminació a altes concentracions d'espermatozous) resulten poc potents per a l'estudi de la relació entre les variables de qualitat seminal i la fertilitat. Caldria un disseny amb unes condicions més restrictives.

10- L'efecte més clarament observat sobre la fertilitat ha estat el de la variable percentatge d'espermatozous amb anomalies morfològiques de coll-part intermèdia. Això juntament amb la seva estreta relació amb el percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica és interessant des d'un punt de vista pràctic, ja que la normalitat morfològica és fàcilment detectada sota microscòpic de camp clar el qual es pot trobar usualment en els centres d'inseminació. D'altra banda, com ja hem vist, el percentatge d'espermatozous amb normalitat morfològica presentava una repetibilitat moderada, per tant l'ús d'aquest caràcter podria facilitar la selecció de mascles d'inseminació. La motilitat individual també sembla afectar de manera important a la fertilitat tot i que en aquest estudi només ha resultat significativa al 10%, possiblement degut a la preselecció dels ejaculats.

Capítol 6
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Al-Jassim AF, Al-Saigh MNR. 1999. Some aspects of post-natal growth of Arabi sheep: Live weight and body organs INDIAN J. ANIM. SCI.; 69 (8): 604-608 AUG.

Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M. 2001. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. THERIOGENOLOGY; 56(4): 677-684.

Alvariño JMR. 1998. Inseminación artificial como base de la cunicultura industrial. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS OVEJERO, LEON.

Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbit. PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS. VALENCIA (Spain); A: 13- 35.

Alvariño JMR, Lopez FJ, Del Arco JA, Bueno A, Torres R. 1996. Effects of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 hours stored semen. PROCEEDINGS OF THE 6th WORLD RABBIT CONGRESS. TOULOUSE (France); 2: 3-5.

Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. J. ANIM. SCI.; 57: 380-403 Suppl. 2.

Amann RP, Shabanowitz RB, Huszar G, Broder SJ. 1999. Increased in vitro binding of fresh and frozen-thawed human sperm exposed to a synthetic peptide. J. ANDROLOGY; 20 (5): 655-660 SEP-OCT.

Armero Q, Blasco A. 1992. Economic weights for rabbit selection indices. PROCEEDINGS OF THE 5th WORLD RABBIT CONGRESS. OREGON (USA); A: 637-642.

Arriola J, Foote RH. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg-yolk and whole egg extenders. J. DAIRY SCI.; 70 (8): 1664-1670 AUG.

Arriola Z, Falceto MV, Martín Rillo S, De Alba C, Moreno C, Ciudad MJ, Rafel O. 2000. PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS, VALENCIA (Spain); A: 81-87.

Aydilek N, Aksakal M, Karakılıç AZ. 2004. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. ANDROLOGIA; 36: 277-281.

Assumpção TI, Torres Júnior RAA, Sousa MV, Ricart CAO. 2005. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. ARQ. BRAS. MED. VET. ZOOTEC.; 57(1): 55-61 FEB.

- Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosome integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *THERIOGENOLOGY*; 29: 1245-1251.
- Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH. 1998. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *BIOL. REPR.*; 58 (3): 686-699 MAR.
- Barbato GF. 1999. Genetic relationships between selection for growth and reproductive effectiveness. *POULTRY SCI.*; 78 (3): 444-452 MAR.
- Baselga M, Blasco A. 1989. Mejora genética del conejo de producción de carne. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, Spain.
- Battaglini M, Castellini C, Lattaioli P. 1992. Variability of the main characteristic of rabbit semen. *J. APPL. RABBIT RES.*; 15: 439-446.
- Bauché F, Fouchard MH, Jégou B. 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS LETTERS*; 349 (3): 392-396.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. ANDROLOGY*; 21 (6): 895-902 NOV-DEC.
- Blasco A, Gómez E. 2003. A note on growth curves of rabbit lines selected on growth rate or litter size. *ANIM. PROD.*; 57: 332-334.
- Bencheikh N. 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoids récoltés chez le lapin. *ANN. ZOOTECH.*; 44: 263-279.
- Berger M, Jean-Faucher Ch, Turckheim M, Veyssiere G, Blanc MR, Poirier JC, Jean Cl. 1982. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *ACTA ENDOCRINOLOGICA*; 99: 459-465.
- Berger T, Parker K. 1989. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *GAM. RES.*; 22 (4): 385-397 APR.
- Boichard D. 1988. Quel est l'impact économique d'une mauvaise fertilité chez la vache laitière?. *INRA PROD. ANIM.*; 1: 245-252.

Boichard D, Babart A, Briend M. 1998. Evaluation génétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. RENC. RECH. RUMINANTS; 5: 103-106.

Boiti C, Chiericato GM, Filotto U, Canali C. 1992. Effects of high environmental temperature on plasma testosterone, cortisol, T3 and T4 levels in the growing rabbit. J. APPL. RABBIT RES.; 15: 447-455.

Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. 2000. Morfología Espermática en Porcí. 1st Ed., INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS, Barcelona, Spain.

Boussit B. 1989. Reproduction et insemination artificielle en cuniculture. Ed. ASSOSSIATION FRANÇAISE DE CUNICULTURE, Lempdes, France.

Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. THERIOGENOLOGY; 52 (5): 863-873 OCT 1.

Braundmeier AG, Miller DJ. 2001. The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility. J. DAIRY SCI.; 84 (9): 1915-1925 SEP.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. THERIOGENOLOGY; 58 (6): 1175-1186 OCT 1.

Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate THERIOGENOLOGY; 60 (8): 1539-1551 NOV.

Brito LFC, Silva AEDF, Unanian MM, Dobe MAN, Barbosa RT, Kastelic JP. 2004. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. THERIOGENOLOGY; 62: 1198-1217.

Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002a. The relationship between semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. ANIM. REPROD. SCI.; 70: 139-149.

Brun JM, Theau-Clement M, Bolet G. 2002b. Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. ANIM. RES.; 51: 433-442.

Brun JM, Theau-Clement M, Larzul C, Falieres J, Saleil G. 2004. Semen production in two lines divergently selected for 63-D body weight. PROCEEDINGS OF THE 8th WORLD RABBIT CONGRESS, PUEBLA (México); 238-244.

Buchanan DS. 1987. The crossbred sire: experimental results for swine. J. ANIM. SCI.; 65: 117-127.

Carson WS, Amann RP. 1972. The male rabbit VI. Effects of ejaculation and season on testicular size and function. J. ANIM. SCI.; 34: 302-309.

Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IKM, Drobnis EZ. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. J. ANDROLOGY; 14 (4): 289-297 JUL-AUG.

Castellini C, Lattaioli P. 1999. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. ANIM. REPROD. SCI.; 57: 111-120.

Castellini C, Dal Bosco A, Bernardini M. 2000. Effect of dietary alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid: vitamin content and oxidation status of rabbit semen. PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS. VALENCIA (Spain); A: 105-110.

Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Beghelli D. 2002. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. THERIOGENOLOGY; 58 (9): 1723-1732 DEC.

Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Dal Bosco A. 2006. Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. WORLD RABBIT SCI.; 14 101-106.

Chainy GBN, Samantaray S, Samanta L. 1997. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. ANDROLOGIA; 29: 343-349.

Chemes HE. 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. INT. J. ANDROLOGY; 24: 2-7.

Chen Y, Yang X, Foote RH. 1989. Timed breeding of rabbits with fresh and frozen thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. ANIM. REPROD. SCI.; 18 (1-3): 35-41 FEB.

Chiericato GM, Boiti C, Canali C, Rizzi C, Rostellato V. 1994. Effets de l'age et de la température ambiante sur les concentrations circulantes hormonales chez le lapin. VIèmes JOURNÉES DE LA RECHERCHE CUNICOLE, LA ROCHELLE (France); 1: 137-144.

Christensen P, Knudsen DB, Wachmann H, Madsen MT. 2004. Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. THERIOGENOLOGY; 62 (7): 1218-1228 OCT 1.

Christensen P, Rode M, Synnestvedt B, Lehn-Jensen H. 2005. Flow cytometric determination of sperm concentration in raw boar semen results in production of uniform semen doses. THERIOGENOLOGY; 63 (2): 489-490 JAN 15.

Correa JR, Zavos PM. 1994. The hypoosmotic swelling test - its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. THERIOGENOLOGY; 42 (2): 351-360 AUG.

Correa JR, Pace MM, Zavos PM. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. THERIOGENOLOGY; 48 (5): 721-731 OCT 1.

Courtens JL, Bolet G, Theau-Clement M. 1994. Effect of acrosome defects and sperm chromatin decondensation on fertility and litter size in the rabbit. Preliminary electron-microscopic study. REPROD. NUTR. DEV.; 34: 427-437.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1986. 2 Simple methods for detecting acrosome-reacted human-sperm. GAM. RES.; 15 (3): 213-226.

Davis JT, Bridges RB, Coniglio JG. 1966. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. BIOCH. J.; 98: 342-346.

de Lamirande E, Gagnon C. 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. INT. J ANDROLOGY; 16: 21-25.

Drevius LO, Eriksson H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa experimental. CELL RES.; 42 (1): 136-156.

Ducrocq V, Humblot P. 1995. Genetic-characteristics and evolution of semen production of young normande bulls. LIV. PROD. SCI.; 41 (1): 1-10 JAN.

Engelhart K, Jentzsch AM, Furst P, Biesalski HK. 1998. Short-term parenteral application of alpha-tocopherol leads to increased concentration in plasma and tissues of the rat. FREE RADICAL RES.; 29 (5): 421-426.

Eriksson BM, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. 2005. Effect of seminal plasma protein fractions on boar spermatozoa motility and acrosome integrity. *THERIOGENOLOGY*; 63 (2): 491-491 JAN.

Eroschenko VP. 2004. di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 10th Ed. Lippincot Williams & Wilkins.

Eustache F, Jouannet P, Auger J. 2001. Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *J. ANDROLOGY*; 22 (4): 558-567 JUL-AUG.

Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT, Jost LK. 1993. Rapid-determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow-citometry. *J. DAIRY SCI.*; 76 (1): 86-94 JAN.

Farrell PB, Foote RH, Simkin ME, Clegg ED, Wall RJ. 1993. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated and fertility in rabbits. *J. ANDROL.*; 14, 464-471.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *THERIOGENOLOGY*; 49 (4): 871-879 MAR.

Flowers WL. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. REPROD. FERT.*; 67-78 Suppl. 52.

Foote RH. 1996. Dairy cattle reproductive physiology research and management - Past progress and future prospects. *J. DAIRY SCI.*; 79 (6): 980-990 JUN.

Foote RH, Hare E. 2000. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. *J. ANDROL.*; 21 (5): 664-668.

Gacitua H, Arav A. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *THERIOGENOLOGY*; 63 (3): 931-938 FEB.

Gadea, J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. *INVEST. AGR., PROT. SANID. ANIM.*; 16:63-77.

Gadea J, Sellés E, Marco MA. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *REPR. DOM. ANIM.*; 39: 303-308.

Georgellis A, Tsirigotis M, Rydström J. 1988. Generation of superoxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis. *TOXICOL. APPL. PHARM.*; 94: 362-373.

Giritharan G, Ramakrishnappa N, Balendran A, Cheng KM, Rajamahendran R. 2005. Development of in vitro tests to predict fertility of bulls. *CAN. J. ANIM. SCI.*; 85 (1): 47-52 MAR.

Goerke TP, Thrift FA, Dutt RH. 1970. Heritability of semen traits and their relation to fertility in southdown sheep. *J. ANIM. SCI.*; 31 (3): 445-450.

Gondos B, Renston RH, Conner LA. 1973. Ultrastructure of germ-cells and sertoli cells in postnatal rabbit testis. *AMERICAN J. ANATOMY*; 136 (4): 427-439.

Graham JK. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *THERIOGENOLOGY*; 41 (5): 1151-1162 APR.

Gravance CG, Davis RO. 1995. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J. ANDROLOGY*; 16(1): 88-92.

Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ 1995. Computer automated sperm head morphometry analysis (asma) of goat spermatozoa. *THERIOGENOLOGY*; 44 (7): 989-1002 NOV.

Gu W, Hecht NB. 1996. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J. ANDROLOGY*; 17(3): 256-262.

Guraya SS. 1980. Recent progress in the morphology, histochemistry, biochemistry, and physiology of developing and maturing mammalian testis. *INTERNATIONAL REVIEW OF CITOLOGY*; 62: 187-309.

Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animals. 4ª ed., Mcgraw-Hill Interamericana, México.

Hagen DR, Gilkey AL, Foote RH. 2002. Spermatozoal velocity and motility and relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *WORLD RABBIT SCI.*; 10 (4): 135-140.

Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *NUTR. REVIEWS*; 52 (8): 253-269.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, England.

Hanada A, Chang MC. 1978. Penetration of zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and fertilization of deer mouse eggs in vitro. J. EXP. ZOO.; 203 (2): 277-286.

Hanada A, Nagase H. 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. J. REPROD. FERT.; 60 (1): 247-252.

Henault MA, Killian GJ. 1996. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. J. REPR. FERT.; 108 (2): 199-204 NOV.

Hidalgo M, Rodriguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C. 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. VET. MED-CZECH.; 50 (1): 24-32 JAN.

Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. J. ANDROLOGY; 18 (3): 312-323 MAY-JUN.

Holtz W, Smidt D. 1976. Fertilizing-capacity of epididymal spermatozoa in pig. J. REPR. FERT.; 46 (1): 227-229.

Humblot P, Decoux G, Dhome T. 1991. Effects of the sire and district of AI on cow fertility. REPR. DOM. ANIM.; 26 (5): 225-234 OCT.

Humblot P, Ducrocq V, Nemeth C. 1993. Relationship between semen characteristics of young and adult bulls in the normande breed. LIV. PROD. SCI.; 35 (3-4): 265-281 JUN.

Iczkowski KA, Sun EL, Gondos B. 1991. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. AMERICAN J. ANATOMY; 190: 266-272.

Ihrig TJ, Renston RH, Renston JP, Gondos B. 1974. Catalase activity in the developing rabbit testis. J. REPROD. FERT.; 39: 105-108.

Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. GAM. RES.; 24: 185-196.

- Jeyendran RS, Vandervan HH, Perez Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human-sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. REPR. FERT.*; 70 (1): 219-228.
- Keel BA, Schaule TK. 2000. Correlation of the bovine cervical mucus penetration test with human sperm characteristics in 1406 ejaculates. *ARCH. ANDROLOGY*; 109-115 MAR-APR.
- Kelso KA, Redpath A, Noble RC, Speake BK. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. REPR. FERT.*; 109 (1): 1-6 JAN.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. 1993. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. *BIOL. REPR.*; 49 (6): 1202-1207 DEC.
- Kruger TF, Coetzee K. 1999. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *HUM. REPR. UPDATE*; 5 (2): 172-178 MAR-APR.
- Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *REPROD. NUTR. DEV.*; 36: 565-575.
- Lavara R, Moce E, Andreu E, Pascual JJ, Cervera C, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. 2000. Effects of environmental temperature and vitamin supplements on seminal parameters from a rabbit line selected by high growth rate. *PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS, VALENCIA (Spain)*; A: 167-171.
- Lavara R, Mocé E, Lavara F, Viudes de Castro MP, Vicente JS. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits?. *THERIOGENOLOGY*; 64: 1130-1141.
- López FJ, Alvaríño JMR, Del Arco JA, Delgado F, Ramiro JL. 1996. Effect of cooling temperature on 24 hours stored semen for artificial insemination. *PROCEEDINGS OF THE 6th WORLD RABBIT CONGRESS, TOULOUSE (France)*; 2: 79-81.
- López FJ, Alvaríño JMR. 1998. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up 96 hours. *WORLD RABBIT SCI.*; 6: 251-253.
- Lunstra DD, Cundiff LV. 2003. Growth and pubertal development in Brahman-, Boran-, Tuli-, Belgian Blue-, Hereford- and Angus-sired F1 bulls. *J. ANIM. SCI.*; 81 (6): 1414-1426 JUN.

Macedo AP, Miguel O. 1986. Puberty in New Zealand White rabbits. REV. FAC. Medicini Vet. Zootecnia, Univ. de São Paulo; 23 (1): 55-67.

Macpherson ML, Simmen RCM, Simmen FA, Hernandez J, Sheerin BR, Varner DD, Loomis P, Cadario ME, Miller CD, Brinsko SP, Rigby S, Blanchard TL. 2002. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and-5 in equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. BIOL. REPROD.; 67 (2): 648-654 AUG.

Mandal DK, Singh K, Tyagi S. 2004. Age related changes in body size and gonadal development of growing Frieswal bulls. Indian J. ANIM. SCI.; 74 (1): 31-34 Jan.

MAPA. 2003. Encuesta nacional de cunicultura.

MAPA. 2005. Encuesta nacional de cunicultura. Available: www.mapa.es/es/estadistica/pags/cunicultura/cunicultura2003.htm.

Minelli A, Moroni M, Castellini C. 2001. Isolation and purification of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: Effects on sperm motility and viability. J. EXP. ZOOL.; 290 (3): 279-290 AUG.

Miret, S. 2000. Grado de inseturación de los ácidos grasos de la dieta y su suplementación con vitamina E. Efecto sobre la absorción de hierro y el estrés oxidativo. TESIS DOCTORAL. Barcelona.

Mocé E, Lavara R, Lavara F, Vicente JS. 2000. Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS, VALENCIA (Spain); A: 197-201.

Mocé E, Vicente JS. 2002. Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. REPROD. NUTR. DEV.; 42 (3): 189-196 MAY-JUN.

Moce E, Vicente JS, Lavara R. 2003. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. THERIOGENOLOGY; 60 (1): 115-123 JUN.

Morrell JM. 1995. Artificial-insemination in rabbits British. VETERINARY J.; 151 (5): 477-488 SEP-OCT.

Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. J. REPR. FERT.; 81 (1): 127-135 SEP.

Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *CONTRACEPTION*; 65 (4): 305-311 APR.

Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Aguero A. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *ANDROLOGIA*; 32 (6): 351-355 NOV.

Nizza A, Di Meo C, Taranto S, Stango G. 2002. Effect of collection frequency on rabbit semen production. *WORLD RABBIT SCI.*; 10 (2): 49-52.

Notter DR. 1987. The crossbred sire – theory. *J. ANIM. SCI.*; 65 (1): 99-109 JUL.

Oh SH, See MT, Long TE, Galvin JM. 2006. Estimates of genetic correlations between production and semen traits in boar. *ASIAN-AUSTRALASIAN J. ANIM. SCI.*; 19 (2): 160-164 FEB.

Okwun OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra DD, Johnson L. 1996. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boars. *J. REPROD. FERT*; 107: 137-149.

Ombelet W, Menkveld R, Kruger TFK, Steeno O. 1995. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *HUM. REPROD. UPDATE*; 1(6): 543-557.

Pant HC, Sharma RK, Patel SH, Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, Misra AK, Prabhakar JH. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *THERIOGENOLOGY*; 60 (1): 27-34 JUN.

Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. ANDROLOGY*; 13 (5): 450-455.

Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T, Ahotupa M. 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *ENDOCRINOL.*; 137: 105-112.

Perez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *THERIOGENOLOGY*; 56 (3): 387-398 AUG.

Perez-Sanchez F, Tablado L, Soler C. 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *THERIOGENOLOGY*; 47 (4): 893-901 MAR.

- Pesch S, Bostedt H, Failing K, Bergmann M. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. ANIM. REPROD. SCI.; 91 (3-4): 285-298 FEB.
- Picard-Hagen N, Sourbe O, Lyazrhi F, Coupet H, Hennequin M, Jacob H, Berthelot X. 2002. Effect of precocious collection on semen output and quality in young Holstein bulls. THERIOGENOLOGY; 1511-1522.
- Piles M, Gianola D, Varona L, Blasco A. 2003. Bayesian inference about parameters of a longitudinal trajectory when selection operates on a correlated trait. J. ANIM. SCI.; 81: 2714-2724.
- Piles M, Rafel O, Ramon J, Varona L. 2005. Genetic parameters of fertility in two lines of rabbits with different reproductive potential. J. ANIM. SCI.; 83: 340-343.
- Pizzi F, Guaita N, Luzi F, Biffi B, Brivio R, Crimella C. 1996. Effect of the numbers of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility in rabbits. PROCEEDINGS OF THE 6th WORLD RABBIT CONGRESS, TOLOUSE (France); 2: 3- 5.
- Puig-Perellada P. 2002. Radicales libres en biología y medicina: bases fisiológicas y modelos experimentales. Radicales libres- generalidades. CURSO DE POSTGRADO DE LA UB. Barcelona, Spain.
- Quintero-Moreno A, Miro J, Rigau AT, Rodriguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. THERIOGENOLOGY; 59 (9): 1973-1990 MAY.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodriguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. THERIOGENOLOGY; 61 (4): 673-690 FEB.
- Radnai I. 1988. Investigations on semen abnormalities of Angora rabbits. PROCEEDINGS OF THE 4th WORLD RABBIT CONGRESS, BUDAPEST (Hungary); 465-469.
- Rebollar PG, Ubilla E, Alvarino JMR, Lorenzo PL, Silvan G, Illera JC. 1998. Effects of HCG or gonadoreline on seminal parameters and plasma testosterone levels in young male rabbits. J. PHYS. BIOCH.; 54 (3): 161-166 SEP.
- Rege JEO, Toe F, Mukasa-Mugerwa E, Tembely S, Anindo D, Baker RL, Lahlou-Kassi. 2000. A Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs SMALL RUM. RES.; 37 (3): 173-187 AUG.

- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *BIOL. REPROD.*; 70 (2): 518-522.
- Robinson JAB, Buhr MM. 2005. Impact of genetic selection on management of boar replacement. *THERIOGENOLOGY*; 63 (2): 668-678 JAN.
- Roca J, Martinez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *ANIM. REPROD. SCI.*; 64: 103-112.
- Rosato MP, Rebollar PG, Iaffaldano N. 2006. Comparación de diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. *XXXI SYMPOSIUM DE CUNICULTURA, LORCA (España)*; 9-13.
- Rossell JM. 2000. Enfermedades del conejo. Tomo I Generalidades. 1ª Ed., Mundi-Prensa, Espanya.
- Rota A, Penzo N, Vincenti L, Mantovani R. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *THERIOGENOLOGY*; 53 (7): 1415-1420 APR.
- Salhab SA, Zarkawi M, Wardeh MF, Al-Masri MR, Kassem R. 2001. Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, body weight and parental size in growing ram lambs. *SMALL RUMINANT RES.*; 40:187-191.
- Salomon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of semen. *ANIM. REPROD. SCI.*; 62: 77-111.
- Samanta L, Roy A, Chainy GBN. 1999. Changes in rat testicular antioxidant defence profile as a function of age and its impairment by hexachlorocyclohexane during stages of maturation. *ANDROLOGIA*; 31(2): 83-90 MAR.
- Sánchez J. 1997. Fisiología animal aplicada. 1ª Ed., Universitat de Barcelona, Espanya.
- Sarreiro LC, Bergmann JAG, Quirino CR, Pineda NR, Ferreira VCP, Silva MA. 2002. Heritability and genetic correlation between scrotal circumference, libido and seminal traits in Nellore bulls. *ARQ. BRAS. MED. VET. ZOOTEC.*; 54 (6): 602-608 DEC.
- Schinckel A, Johnson RK, Pumfrey RA, Zimmermas DR. 1983. Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive performance. *J. ANIM. SCI.*; 56 (5): 1065-1076.

- Shrestha JNB, Heaney DP. 2004. Review of Canadian, Outaouais and Rideau Arcott breeds of sheep - 2. Crossbreeding, registration and subsequent release to the Canadian sheep industry *SMALL RUM. RES.*; 55 (1-3): 1-13 OCT.
- Si W, Hildebrandt TB, Reid C, Krieg R, Ji WZ, Fassbender M, Hermes R. 2006. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *THERIOGENOLOGY*; 65 (4): 788-798 MAR.
- Siemieniuch M, Bielas W, Dubiel A, Zbyryt I, Chorbinski P. 2005. Evaluation of viability and integrity of cell membranes in fresh and frozen boar semen. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA*; 61 (2): 184-187 FEB.
- Singleton WL. 2001. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. *THERIOGENOLOGY*; 56 (8): 1305-1310 Sp. Iss. NOV.
- Smital J, De Sousa LL, Mohsen. 2004. A Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *ANIM. REPROD. SCI.*; 80 (1-2): 121-130 JAN.
- Smital J, Wolf J, De Sousa LL. 2005. Estimation of genetic parameters of semen characteristics and reproductive traits in AI boars. *ANIM. REPROD. SCI.*; 86 (1-2): 119-130 MAR.
- Styne DM. 1994. Physiology of puberty. *HORM. RES.*; 41 (suppl. 2): 3-6.
- Tardif S, Laforest J P, Cormier N, Bailey J L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *THERIOGENOLOGY*; 52:447-459.
- Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. 1998. Use of Hoechst 33342 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer-assisted analysis. *J. ANDROLOGY*; 19 (2): 201-206 MAR-APR.
- Tegegne A, Entwistle KW, Mukasamugerwa E. 1991. A quantitative histological study of testicular and epididymal development in boran and boran-x friesland bulls in Ethiopia. *THERIOGENOLOGY*; 35 (5): 991-1000.
- Theau-Clement M, Michel N, Esparbié J, Bolet G. 1995. Effects of artificial photoperiods on sexual behaviour and sperm output in the rabbit. *ANIM. SCI.*; 60: 143-149.
- Theau- Clement M, Brun JM, Sabbioni E, Castellini C, Renieri T, Besenfelder U, Falières J, Esparbie J, Saleil J. 2003. Comparaison de la production spermatique de trois souches de lapins: moyennes et variabilités. 10èmes JOURNÉES DE LA RECHERCHE CUNICOLE, PARIS (France); 81-88.

Theau- Clement M, Falieres J. 2005. Evaluation de la concentration de semence de lapins selon 2 méthodes: Hématimètre et NucleoCounter SP100. 11èmes JOURNÉES DE LA RECHERCHE CUNICOLE, PARIS (France); 95-98.

Thrift FA, Aaron DK. 1987. The crossbred sire: experimental results for cattle. J. ANIM. SCI.; 65: 128-135.

Thundathil J, Palasz AT, Mapletoft RJ, Barth AD. 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. ANIM. REPROD. SCI.; 57 (1-2): 35-50 OCT.

Truelson SL, Grahan JK, Mortimer RG, Field TG. 1996. In vitro penetration into bovine oocytes and zona-free hamster oocytes by bull spermatozoa treated with liposomes. J. DAYRI SCI.; 79: 991-999.

Tuli RK, Holtz W. 1994. The effect of zwitterion buffers on the freezability of boer goat semen. THERIOGENOLOGY; 37 (4): 947-951 APR.

Urry RL. 1984. An overview of male reproductive physiology. Reproduction: The new frontier in occupational and environmental health research, 261-274. Alan R. Liss, New York.

Varona L, Noguera JL. 2001. Variance components of fertility in Spanish Landrace pigs. LIV. PROD. SCI.; 67 (3): 217-221 JAN.

Vazquez-Levin M. 2006. Estudios sobre la proteína de adhesión caderina epitelial: desde su participación en la fecundación hasta su rol en el cáncer. SEMINARIO. Available: [www. ir. vhebron. net/ imatges](http://www.ir.vhebron.net/imatges).

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. THERIOGENOLOGY; 57 (1): 149-179 JAN.

Vianna WL, Bruno DG, Namindome A, Rosseto AC, Rodrigues PHM, Pinese ME, Moretti ADS. 2004. Efficiency of different measurement techniques of sperm concentration in swine. REV. BRAS. ZOOTEC.; 33 (6): 2054-2059 Suppl. 2, NOV-DEC.

Vicente JS. 2001. Aplicación práctica de la inseminación artificial: organización y manejo de reproductores. JORNADAS PROFESIONALES DE CUNICULTURA, CALELLA (Spain); 10.1-10.12.

Vicente JS, Viudes de Castro MR, Lavara R, Lavara F. 2000. Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. PROCEEDINGS OF THE 7th WORLD RABBIT CONGRESS, VALENCIA (Spain); A: 1273-277.

- Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *THERIOGENOLOGY*; 59 (2): 571-584 JAN.
- Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. 1996. A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *ANIM. REPROD. SCI.*; 44 (3): 195-201 OCT.
- Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, 1997. Effect of sperm count on the fertility and prolificacy of meat rabbits. *ANIM. REPR. SCI.*; 46: 313-319.
- Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Lavara R, Lavara F. 1998. Efficacité de l'insémination artificielle avec un faible nombre de spermatozoïdes dans systems des élevages commerciaux. 7èmes JOURNÉES DE LA RECHERCHE CUNICOLE, LYON (France); 241-244.
- Viudes-De-Castro MP, Moce E, Vicente JS, Marco-Jimenez F, Lavara R. 2005. In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit semen *REPROD. DOMEST. ANIM.*; 40 (2): 136-140 APR.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *ANIM. REPROD. SCI.*; 60-61: 481-492.
- Willems CM. 1978. Development of artificial insemination in pigs in E.A.A.P. countries. *LIV. PROD. SCI.*; (3): 285-291.
- Wood PDP, Foulkes JA, Shaw RC, Melrose DR. 1986. Semen assessment, fertility and the selection of hereford bulls for use in AI. *J. REPROD. FERT.*; 76 (2): 783-795 MAR.
- Yanagimachi R. 1972. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in-vitro *J. REPROD. FERT.*; 28 (3): 477-480.
- Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. 2003. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *ANIM. REPROD. SCI.*; 76 (1-2): 99-111 MAR.
- Zaini A, Jennings MG, Baker HWG. 1985. Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men. *International J. ANDROLOGY*; 8 (6): 427-435 DEC.
- Zeginiadou T, Papadimas J, Mantalenakis S. 2000. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *ANDROLOGIA*; 32 (6): 335-343 NOV.

Zhang BR, Larson B, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H. 1997. Relationships between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. THERIOGENOLOGY; 48: 221-231.

Zini A, Schlegel PN. 1996. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. J. ANDROL.; 17 (5): 473-480.

ÍNDEX

CAPÍTOL 1	INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1	FISIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ DEL MASCLE	4
1.1.1	<i>Breu descripció de l'aparell reproductor del mascle, i dels processos d'espermatogènesi i fertilització</i>	<i>4</i>
1.1.2	<i>Desenvolupament sexual</i>	<i>11</i>
1.2	INSEMINACIÓ ARTIFICIAL.....	18
1.2.1	<i>Ús de la inseminació artificial en el sector cunícola</i>	<i>18</i>
1.2.2	<i>Maneig del semen.....</i>	<i>26</i>
1.3	CARACTERÍSTIQUES QUE DEFINEIXEN LA PRODUCCIÓ I QUALITAT DEL SEMEN I LA SEVA AVALUACIÓ	29
1.3.1	<i>Característiques de l'ejaculat</i>	<i>29</i>
1.3.2	<i>Característiques qualitatives dels espermatozous.....</i>	<i>32</i>
1.3.3	<i>Altres tests per a avaluar la qualitat seminal</i>	<i>39</i>
1.4	FERTILITAT I LA SEVA RELACIÓ AMB ELS CARÀCTERS QUE DEFINEIXEN LA QUALITAT SEMINAL.....	41
1.4.1	<i>Avaluació de la fertilitat.....</i>	<i>41</i>
1.4.2	<i>Relació de la fertilitat amb les variables de qualitat seminal</i>	<i>42</i>
1.5	MILLORA DE LA FERTILITAT I L'EFICÀCIA DELS MASCLES D'INSEMINACIÓ ARTIFICIAL	47
1.5.1	<i>Maneig.....</i>	<i>48</i>
1.5.2	<i>Creuaments</i>	<i>49</i>
1.5.3	<i>Selecció.....</i>	<i>52</i>
CAPÍTOL 2	OBJECTIUS	55
CAPÍTOL 3	EXPERIÈNCIES DESENVOLUPADES	59
3.1	POST-NATAL SEXUAL DEVELOPMENT IN THE RABBIT: GROWTH AND MATURITY PATTERNS IN TESTIS AND EPIDIDYMISS MACROSCOPIC TRAITS, AND IN TESTIS MICROSCOPIC TRAITS.....	61
3.1.1	<i>Abstract.....</i>	<i>61</i>
3.1.2	<i>Introduction</i>	<i>62</i>

3.1.3	<i>Material and Methods</i>	63
3.1.4	<i>Results and discussion</i>	66
3.1.5	<i>Conclusion</i>	72
3.1.6	<i>Acknowledgements</i>	72
3.1.7	<i>References</i>	73
3.2	LINE AND BIRTH-SEASON EFFECTS ON PLASMA TESTOSTERONE AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TESTIS OF MATURING RABBITS	85
3.2.1	<i>Abstract</i>	85
3.2.2	<i>Introduction</i>	86
3.2.3	<i>Material and Methods</i>	87
3.2.4	<i>Results</i>	90
3.2.5	<i>Discussion</i>	92
3.2.6	<i>Acknowledgements</i>	95
3.2.7	<i>References</i>	95
3.3	VARIABILITY, REPEATABILITY AND PHENOTYPIC RELATIONSHIPS OF SEVERAL CHARACTERISTICS OF PRODUCTION AND SEMEN QUALITY IN RABBIT ...	103
3.3.1	<i>Abstract</i>	103
3.3.2	<i>Introduction</i>	104
3.3.3	<i>Materials and Methods</i>	105
3.3.4	<i>Results</i>	107
3.3.5	<i>Discussion</i>	108
3.3.6	<i>Conclusion</i>	110
3.3.7	<i>Acknowledgment</i>	110
3.3.8	<i>References</i>	111
3.4	HETEROSIS, DIRECT AND MATERNAL GENETIC EFFECTS ON SEMEN QUALITY TRAITS OF RABBITS	119
3.4.1	<i>Abstract</i>	119
3.4.2	<i>Introduction</i>	120
3.4.3	<i>Material and Methods</i>	120
3.4.4	<i>Results</i>	123
3.4.5	<i>Discussion</i>	125
3.4.6	<i>Conclusions</i>	128
3.4.7	<i>Acknowledgment</i>	128
3.4.8	<i>References</i>	128
3.5	REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF CROSSBRED AND PUREBRED MALE RABBITS	139
3.5.1	<i>Abstract</i>	139

3.5.2	<i>Introduction</i>	140
3.5.3	<i>Material and Methods</i>	141
3.5.4	<i>Results</i>	144
3.5.5	<i>Discussion</i>	146
3.5.6	<i>Conclusions</i>	149
3.5.7	<i>Acknowledgements</i>	149
3.5.8	<i>References</i>	150
CAPÍTOL 4	RESUM GLOBAL	161
CAPÍTOL 5	CONCLUSIONS	169
CAPÍTOL 6	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	173

ÍNDIX DE TAULES

TAULA 1.1.1: ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN.	14
TAULA 1.2.1: ESTRUCTURA PRODUCTIVA DE LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 1999.....	20
TAULA 1.2.2: ESTRUCTURA PRODUCTIVA DE LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003.....	21
TAULA 1.2.3: TIPUS DE REPRODUCCIÓ I MANEIG DE GRANGES CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003.....	22
TAULA 1.2.4: DESPESES (MILERS DE PESETES) EN LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 1999.....	23
TAULA 1.2.5: DESPESES (MILERS D'EUROS) EN LES EXPLOTACIONS CUNÍCOLES INDUSTRIALS, ANY 2003	24
TAULA 1.2.6: INFLUÈNCIA DE L'ORGANITZACIÓ EN BANDES SOBRE EL TREBALL PER FEMELLA I LA PRODUCCIÓ PER HORA TREBALLADA.....	25
TAULA 1.3.1: DESCRIPCIÓ DE LA MORFOLOGIA ESPERMÀTICA PER ELIASSON (1971), L'ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (OMS, 1980-1987), CRITERI ESTRICTE DE TIGERBERG (KRUGER, 1986; MENKVELD, 1990) I OMS (1992) .	37
TAULA 1.3.2: RESUM D'ALGUNES MOLÈCULES PROPOSADES COM A MARCADORS DE LA FERTILITAT DELS ESPERMATOZOUS. MOLTES DE LES FUNCIONS LLISTADES SÓN, EN AQUESTS NOMÉS ESPECULATIVES	40
TAULA 1.5.1: ESTIMES DE L'HERETABILITAT (ERROR ESTÀNDARD) D'ALGUNS CARÀCTERS DE QUALITAT SEMINAL EN DIFERENTS ESPÈCIES	54
TABLE 3.1.1: SUMMARY STATISTICS ACCORDING TO THE AGE OF THE AMINALS.....	78
TABLE 3.1.2: CORRELATIONS AMONG LIVE WEIGHT, ANATOMICAL AND HISTOLOGICAL TRAITS.....	79
TABLE 3.2.1: LS MEANS (STANDARD ERROR) FOR MALE LINE AND SEASON OF BIRTH ON STUDIED VARIABLES.	99
TABLE 3.3.1: SUMMARY STATISTICS.....	113
TABLE 3.3.2. REPEATABILITY OF QUANTITATIVE SEMEN QUALITY TRAITS (STANDARD ERROR).....	114
TABLE 3.3.3. COEFFICIENTS OF CORRELATION BETWEEN THE VARIABLES INCLUDED IN THE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS	115
TABLE 3.4.1: FREQUENCIES OF SEMEN COLLECTION AND OCCURRENCE OF QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE ACCORDING TO THE GENETIC TYPE OF THE BUCKS.	132
TABLE 3.4.2: LS-MEANS (STANDARD ERROR) CORRESPONDING TO THE EFFECTS OF GENOTYPE OF BUCKS AND EJACULATE ORDER OF THE LOGISTIC REGRESSION MODELS FOR SEMEN COLLECTION AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE.	133
TABLE 3.4.3: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (D_C , D_R) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (M_C , M_R) OF LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROISIS (H_{CR}) BETWEEN THEM FOR SEMEN COLLECTION AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE	134
TABLE 3.4.4: SUMMARY STATISTICS.....	135

TABLE 3.4.5: LSMEANS (STDERR) FOR THE GENOTYPE OF BUCKS AND ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN FIRST AND SECOND EJACULATES (E_{J1} , E_{J2}) AND BETWEEN COLD AND WARM SEASONS (S_C , S_W) ON SEMEN CHARACTERISTICS.	136
TABLE 3.4.6: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (D_C , D_R) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (M_C , M_R) OF LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROSIS (H_{CR}) BETWEEN THEM FOR QUANTITATIVE SEMEN QUALITY TRAITS.	137
TABLE 3.5.1: LS MEANS (SE) ACCORDING TO THE GENETIC TYPE OF BUCKS FOR SEMEN CHARACTERISTICS	154
TABLE 3.5.2: FERTILITY AND PROLIFICACY ACCORDING TO THE BUCK GENETIC TYPES	155
TABLE 3.5.3: ESTIMATES OF THE DIFFERENCES BETWEEN DIRECT GENETIC EFFECTS (D_C , D_R) AND MATERNAL GENETIC EFFECTS (M_C , M_R) OF THE LINES C AND R, AND INDIVIDUAL HETEROSIS (H_{CR}) BETWEEN THEM FOR FERTILITY AND PROLIFICACY	156
TABLE 3.5.4: BIVARIATE LINEAR REGRESSION FOR KINDLING RATE, KITS BORN ALIVE AND KITS STILLBORN ON BUCK GENETIC TYPE AND DIFFERENT SEMEN QUALITY TRAITS	157
TABLE 3.5.5: MULTIVARIATE LINEAR REGRESSION OF KINDLING RATE ON BUCK GENETIC TYPE AND SEMEN QUALITY TRIATS	158
TABLE 3.5.6: MULTIVARIATE LINEAR REGRESSION FOR NUMBER OF KITS BORN ALIVE AND KITS STILLBORN ON BUCK GENETIC TYPE AND SEMEN QUALITY TRAITS	159

ÍNDIX DE FIGURES

<i>Figura 1.1.1: Dibuix d'una part d'un túbul seminífer i de teixit intersticial (Amann i Schanbacher, 1983).....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 1.1.2: Dibuix d'un espermatozou (Bonet i col., 2000).....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 1.1.3: Esquema de l'estructura general del testicle i de l'epidídim</i>	<i>7</i>
<i>Figura 1.1.4: Esquema de l'aparell genital del mascle</i>	<i>8</i>
<i>Figura 1.1.5: Esquema del procés de fecundació en mamífers</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1.1.6: Reacció de l'acrosoma.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 1.1.7: Esquema d'un oòcit (Eroschenko, 2004).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 1.1.8: Regulació endocrina de l'activitat testicular</i>	<i>11</i>
<i>Figura 1.1.9: Representació idealitzada de les reaccions d'iniciació i propagació de la lipoperoxidació d'un àcid gras insaturat amb tres dobles enllaços</i>	<i>15</i>
<i>Figura 1.2.1: Vagina artificial</i>	<i>26</i>
<i>Figura 1.3.1: Integritat de la membrana plasmàtica</i>	<i>33</i>
<i>Figura 1.3.2: Integritat de l'acrosoma (font pròpia).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 1.3.3: Morfoanomalies dels espermatozous (font pròpia).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 1.5.1: Esquema de creuament a dues vies</i>	<i>51</i>
<i>Figura 1.5.2: Esquema de creuament a tres vies</i>	<i>51</i>
<i>Figure 3.1.1: Adjusted growth curves and average values of LW, TV, EV and Dr according to the line.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 3.1.2: Projections of the variables in the plane defined by different principal components.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 3.1.3: Age related changes according to the line for the considered variables</i>	<i>81</i>
<i>Figure 3.1.4: Age related changes according to the line for the considered variables in relation to their adult value</i>	<i>82</i>
<i>Figure 3.1.5: Age related changes according to the birth season for the considered variables.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 3.1.6: Age related changes according to the birth season for the considered variables in relation to their adult value.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 3.2.1: Age-related changes of studied variables according to the line</i>	<i>100</i>
<i>Figure 3.2.2: Age-related changes of studied variables according to the birth-season.</i>	<i>101</i>
<i>Figure 3.3.1. Projection of the variables in the plane defined by the first and second principal components ..</i>	<i>116</i>
<i>Figure 3.3.2. Projection of the variables in the plane defined by the first and third principal components.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 3.3.3. Projection of the variables in the plane defined by the second and third principal components .</i>	<i>117</i>
<i>Figure 3.3.4. Projection of the variables in the plane defined by the first and fourth principal components.....</i>	<i>117</i>

