

BOT-128 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 283-284, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc127>

Semen quality and fertility effectiveness of cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls

Manoj Kumar Singh*, Smiriti Gupta, Kanika Gandhi,
S.S. Lathwal, Naresh L. Selokar

Embryo Biotechnology Lab, Animal Biotechnology Division
ICAR- National Dairy Research Institute, Karnal-132001
(Haryana) India

*Corresponding author: manoj.singh@icar.res.in

ABSTRACT

In India, due to a severe shortage of elite bulls, semen available from progeny-tested bulls covers a limited breedable population of buffalo. Animal cloning has proved beneficial in making identical genetic copies in the shortest possible time to meet the target of providing elite breeding bulls. ICAR-National Dairy Research Institute, Karnal, has produced several cloned breeding bulls, of which two breeding bulls (named Swarn and Rajat) were used to demonstrate the fertility of cloned bulls. The semen parameters such as volume (2.83 ± 0.33 vs. 2.44 ± 0.23 ml), sperm concentration (1607.56 ± 161.90 vs. 1589.44 ± 211.76 million/ml), mass motility (3.17 ± 0.08 vs. 3.11 ± 0.20), progressive motility ($87.78 \pm 0.88\%$ vs $85.00 \pm 1.44\%$) and acrosome integrity ($85.39 \pm 1.66\%$ vs $87.61 \pm 1.80\%$), respectively in cloned and non-cloned bull's semen and had no significant ($p < 0.05$) difference. Post-thaw motility was also similar to non-cloned

Calidad del semen y efectividad en la fertilidad de toros clonados de búfalo (*Bubalus bubalis*)

Manoj Kumar Singh*, Smiriti Gupta, Kanika Gandhi,
S.S. Lathwal, Naresh L. Selokar

Laboratorio de Biotecnología de Embriones, División de
Biotecnología Animal
ICAR- Instituto Nacional de Investigación Láctea,
Karnal-132001 (Haryana) India

*Autor de correspondencia: manoj.singh@icar.res.in

RESUMEN

En la India, debido a una grave escasez de toros élite, el semen disponible de toros probados en la progenie cubre una población reproducible limitada de búfalos. La clonación de animales ha demostrado ser beneficiosa al hacer copias genéticas idénticas en el menor tiempo posible para cumplir el objetivo de proporcionar toros reproductores élite. ICAR-Instituto Nacional de Investigación Láctea, Karnal, ha producido varios toros reproductores clonados, de los cuales dos toros reproductores (llamados Swarn y Rajat) se utilizaron para demostrar la fertilidad de los toros clonados. Los parámetros del semen como volumen ($2,83 \pm 0,33$ vs. $2,44 \pm 0,23$ ml), concentración de espermatozoides ($1607,56 \pm 161,90$ vs. $1589,44 \pm 211,76$ millones/ml), motilidad de masa ($3,17 \pm 0,08$ vs. $3,11 \pm 0,20$), motilidad progresiva ($87,78 \pm 0,88\%$ vs $85,00 \pm 1,44\%$) y la integridad acrosómica

bulls or their parents. When these spermatozoa were subjected to a transcriptomics study, 27,481 transcripts were identified, out of which 18,703 transcripts were expressed commonly in both cloned and somatic cell donor bull's spermatozoa. Only 566 transcripts were up-regulated, and 410 transcripts were down-regulated significantly ($FC \geq 2$; $P < 0.05$) in clone bulls spermatozoa relative to somatic cell donor bulls spermatozoa. KEGG analysis revealed that the Up- and down-regulated transcripts affect excision repair, autophagy, lipolysis, AMPK, and insulin signaling pathways. A total of 278 miRNAs were found in both cloned and parent bull spermatozoa, of which 239 were common and 28 were unique to cloned bulls spermatozoa. Out of 62 miRNAs (at $FC \geq 2$; $p < 0.05$) found by differential expression analysis, 31 were up-regulated, and 31 were down-regulated in cloned bull spermatozoa compared to donor bulls. The expression pattern of some necessary transcripts and miRNAs associated with spermatogenesis, sperm motility, sperm capacitation, bull fertility, and early embryonic development was almost similar in cloned bulls spermatozoa and parent bulls spermatozoa. To determine the fertility of cloned bulls, 20 female buffaloes were inseminated with the semen of two above-mentioned cloned bulls. A 65% conception rate was achieved following insemination, which is typical in buffaloes. Thirteen healthy calves (seven males and six females) have been produced, and further attempts are ongoing to produce more calves. These calves are physiologically normal, growing well and healthy. In conclusion, with this limited study, we can say that the semen produced by cloned bulls is similar to that of non-cloned bulls and parent bulls, which can be further used in various assisted reproductive technologies and sustainable milk production.

Keywords: cloned buffalo, semen, transcriptome, miRNA, fertility.

Acknowledgement. This work was financially supported by Buffalo Cloning Project (NASF/GTR-7004/2018-19) ICAR-NASF, New Delhi.

($85,39 \pm 1,66\%$ vs $87,61 \pm 1,80\%$), respectivamente en semen de toro clonado y no clonado y no tuvieron diferencia significativa ($p < 0,05$). La motilidad post-descongelación también fue similar a la de los toros no clonados o a sus padres. Cuando estos espermatozoides se sometieron a un estudio transcriptómico, se identificaron 27.481 transcripciones, de las cuales 18.703 se expresaron comúnmente en espermatozoides de toro de donantes de células somáticas y clonados. Solo 566 transcripciones estaban reguladas positivamente y 410 transcripciones estaban reguladas negativamente significativamente ($FC \geq 2$; $p < 0,05$) en espermatozoides de toros clonados en relación con los espermatozoides de toros donantes de células somáticas. El análisis de KEGG reveló que las transcripciones reguladas hacia arriba y hacia abajo afectan las vías de reparación por escisión, autofagia, lipólisis, AMPK y señalización de insulina. Se encontró un total de 278 miARN en espermatozoides de toro clonados y parentales, de los cuales 239 eran comunes y 28 exclusivos de los espermatozoides de toro clonados. De 62 miARN (en $FC \geq 2$; $p < 0,05$) encontrados mediante análisis de expresión diferencial, 31 estaban regulados positivamente y 31 estaban regulados negativamente en espermatozoides de toro clonados en comparación con toros donantes. El patrón de expresión de algunos transcritos y miARN necesarios asociados con la espermatogénesis, la motilidad de los espermatozoides, la capacitación de los espermatozoides, la fertilidad del toro y el desarrollo embrionario temprano fue casi similar en los espermatozoides de toros clonados y en los espermatozoides de toros parentales. Para determinar la fertilidad de los toros clonados, se inseminaron 20 búfalas con el semen de dos toros clonados antes mencionados. Después de la inseminación se logró una tasa de concepción del 65%, lo cual es típico en las búfalas. Se han producido trece terneros sanos (siete machos y seis hembras) y se están realizando nuevos intentos para producir más terneros. Estos terneros son fisiológicamente normales, crecen bien y están sanos. En conclusión, con este estudio podemos decir que el semen producido por toros clonados es similar al de toros no clonados y al de toros parentales, el cual puede usarse aún más en diversas tecnologías de reproducción asistida y producción sostenible de leche.

Palabras clave: búfalo clonado, semen, transcriptoma, miARN, Fertilidad.

Agradecimientos. Este trabajo fue apoyado financieramente por Buffalo Cloning Project (NASF/GTR-7004/2018-19) ICAR-NASF, Nueva Delhi.