

Caracterización de parámetros de calidad seminal en variedades amenazadas de la raza porcina Ibérico

Díaz-Ruiz, E.¹; González-Ariza, A.¹; León, J.M.²; Peláez-Caro, M.¹@; Venegas, M.³; Forero, F.J.³; Salgado, J.¹; Pérez-Marín, C.C.⁴; Navas-González F.J.⁵; Delgado, J.V.¹; Galán-Luque, I.¹ y Arando, A.^{1,6}

¹ Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

² Centro Agropecuario Provincial. Diputación de Córdoba. Córdoba. España.

³ Diputación Provincial de Huelva. Huelva. España.

⁴ Departamento de Medicina y Cirugía animal. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

⁵ Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Alameda del Obispo. Córdoba. España.

⁶ Animal Breeding Consulting S.L. Córdoba. España.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Raza autóctona.
Semen.
Calidad seminal.
Conservación.

El cerdo Ibérico es una raza autóctona española que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas de dehesas del suroeste peninsular donde juega un papel fundamental en la conservación de dicho ecosistema. El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo una caracterización de distintos parámetros indicativos de la calidad seminal en tres variedades de cerdo Ibérico. Para ello, se utilizaron sementales de las variedades Retinto del Andévalo, Torbiscal y Negro de los Pedroches, analizándose 16 muestras por animal, y valorándose en cada eyaculado las variables volumen, concentración, morfología, motilidad y parámetros cinemáticos. Según los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas para todas las variables estudiadas excepto para la velocidad curvilínea (VCL) e índice de rectitud (STR). En relación al volumen espermático, se observaron diferencias significativas entre sementales, siendo el verraco n° 2 de la variedad Retinto del Andévalo quien presentó el valor más alto (89.4 ± 15.39 mL). En cuanto a la concentración espermática, el ejemplar de la variedad Negro de los Pedroches fue quien reportó mayor concentración media ($467.6 \pm 71.84 \times 10^6$ spz/mL), siendo así mismo el que presentó un mayor porcentaje de morfoanomalías. Finalmente, los valores de motilidad total y progresiva fueron más elevados en el verraco n° 1 de la variedad Retinto del Andévalo ($91.98 \pm 2.86\%$ y $61.67 \pm 5.92\%$, respectivamente). En conclusión, la calidad seminal observada en los verracos de la raza porcina Ibérico en el presente estudio, es apta según los valores de referencia para la especie para su uso en programas de reproducción asistida, a excepción del ejemplar de la variedad Negro de los Pedroches el cual posee un alto número de morfoanomalías.

Characterization of seminal quality parameters in endangered varieties of the Iberian pig breed

SUMMARY

The Iberian pig is a native Spanish breed that is widely distributed in the dehesa areas of the south-western peninsula, where it plays a fundamental role in the conservation of the ecosystem. The objective of the present study was to characterize different parameters indicative of seminal quality in three varieties of Iberian pigs. For this purpose, boars of the Retinto del Andévalo, Torbiscal and Negro de los Pedroches varieties were used, analyzing 16 samples per animal, and evaluating the variables volume, concentration, morphology, motility and kinematic parameters in each ejaculate. According to the results obtained, significant differences were observed for all the variables studied except for curvilinear velocity (VCL) and straightness index (STR). In relation to sperm volume, significant differences were observed between boars, being the boar n° 2 of the Retinto del Andévalo variety who presented the highest value (89.4 ± 15.39 mL). Regarding sperm concentration, the specimen of the Negro de los Pedroches variety reports the highest mean concentration ($467.6 \pm 71.84 \times 10^6$ spz/mL), being also the one with the highest percentage of morphoanomalies. Finally, total and progressive motility values were higher in the boar n° 1 of the Retinto del Andévalo variety ($91.98 \pm 2.86\%$ and $61.67 \pm 5.92\%$, respectively). In conclusion, the seminal quality observed in the boars of the Iberian pig breed in the present study is suitable according to the reference values for the species for its use in assisted reproduction programs, with the exception of the specimen of the Negro de Pedroches variety, which has a high number of morphoanomalies.

ADDITIONAL KEYWORDS

Native breed.
Semen.
Sperm quality.
Conservation.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 28.10.2021
Aceptado/Accepted: 10.04.2023
On-line: 15.04.2023
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
magecon@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El cerdo Ibérico es una raza autóctona española que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas de dehesa del suroeste peninsular. Su sistema de producción es mayoritariamente de tipo extensivo jugando un papel fundamental en la conservación de dicho ecosistema (MAPA 2021). A pesar de que en los años 60 dicha raza estuvo en peligro de extinción, a partir de los años 80 se produjo un aumento del censo de la misma gracias a la revalorización de sus productos y a la concienciación por parte de la sociedad de la importancia de conservar los recursos genéticos (Nieto *et al.* 2019), sin embargo hoy en día alguna de sus variedades siguen estando amenazadas. En 1985 se creó la Asociación Española de Criadores de Cerdo Ibérico, la cual es la encargada de gestionar el libro genealógico de la raza y el programa de cría de la misma, aprobado a través de la Resolución de 10 de agosto de 2011, de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos.

El cerdo Ibérico cuenta con cinco variedades reconocidas oficialmente por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, estando por un lado las variedades Entrepelado y Retinto, consideradas como variedades de fomento y por otro, las variedades Lampiño, Manchado de Jabugo y Torbiscal, que se encuentran amenazadas (MAPA 2021). Así mismo, existen otras variedades no reconocidas oficialmente como son Retinto del Andévalo y Negro de los Pedroches.

Dado que el efecto del macho es un factor importante en la reproducción, es necesario llevar a cabo una evaluación de la calidad seminal que permita aplicar técnicas de inseminación artificial, las cuales disminuyen el riesgo de transmisión de enfermedades, permitiendo a su vez la selección de individuos de alto valor genético (Rodríguez *et al.* 2017). En los centros de reproducción asistida, las pruebas rutinarias más extendidas incluyen el estudio del volumen, de la concentración, de la morfología y de la motilidad espermática (Didion 2008).

La concentración espermática está relacionada con la capacidad de fertilización, y su medición debe ser precisa, ya que junto al volumen obtenido van a determinar el número de dosis que pueden prepararse a partir de un eyaculado (Vianna *et al.* 2004). Ambas variables se ven altamente influenciadas por la frecuencia de recolección de semen, presentando unos valores más bajos cuando la extracción seminal se realiza cada 24 horas en lugar de cada 72 horas (Swierstra & Dyck 1976). En todo caso, tanto la cantidad como la calidad seminal están relacionadas con otros factores como la edad, la estación, la nutrición, el estado de salud, la función del sistema endocrino, el alojamiento, el estímulo sexual, el estrés y el tamaño testicular, entre otros (Ciereszko, Ottobre & Glogowski 2000; Kondracki *et al.* 2012; Smital 2009; Žaja *et al.* 2016).

La morfología espermática influye en la fertilidad, ya que la forma y el tamaño del espermatozoide están relacionados con su habilidad para penetrar el óvulo (Kondracki *et al.* 2017). No obstante, sobre este parámetro influyen distintos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos al animal. Dentro de los factores in-

trínsecos son destacables la especie, la raza, la edad, la madurez sexual, la genética, etc., siendo por otro lado importantes los factores extrínsecos relacionados con el ambiente en el que se halla el animal, al igual que el procesado del semen (Yániz, J, Soler & Santolaria 2015).

Por otro lado, la motilidad espermática se relaciona con el estado energético del espermatozoide que a su vez influye en su capacidad de fertilización (Yaniz, Lopez-Gatius & Hunter 2006; Yaniz, JL *et al.* 2000). Para su evaluación, la introducción del sistema CASA supuso un gran avance ya que los resultados obtenidos presentan una mayor objetividad (Palacín *et al.* 2013). No obstante, existen ciertos factores que pueden influir en dichos resultados como son el técnico, la óptica, la configuración del software, el número de campos analizados, la concentración y la dilución de la muestra, entre otros (Contri *et al.* 2010; Holt *et al.* 1994; Rijsse-laere *et al.* 2003).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo una caracterización de distintos parámetros indicativos de la calidad seminal en tres variedades amenazadas de cerdo Ibérico con el fin de determinar su aptitud reproductiva para su inclusión en programas de inseminación artificial que garanticen su conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRA ANIMAL

Para el presente estudio se utilizaron cuatro sementales, dos de ellos de la variedad Retinto del Andévalo (2 años), uno de la variedad Torbiscal (1,5 años) y otro de la variedad Negro de los Pedroches (7 años). Los animales se alojaron en las instalaciones del Centro Agropecuario Provincial de la Diputación de Córdoba (España) bajo un fotoperiodo natural donde se alimentaron con un pienso comercial, estando provistos de agua *ad libitum*.

Los animales fueron tratados de acuerdo a la Legislación Europea (Directiva 2010/63/UE "sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos"), la cual ha sido traspuesta al derecho español a través del Real Decreto 53/2013.

RECOGIDA Y PROCESADO DEL SEMEN

Tras un período de entrenamiento de los verracos de seis meses, el estudio de calidad seminal se llevó a cabo durante un período de siete meses (desde noviembre de 2020 hasta junio de 2021), recogiendo un total de 16 muestras por animal. La extracción seminal se efectuó por parte de personal técnico de forma manual mediante el empleo de colectores atemperados a 37°C, recogiéndose únicamente la fracción rica del eyaculado. Seguidamente, se redujo la temperatura hasta alcanzar los 25°C, momento en el que se realizó una dilución 1:2 con el diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS, Minitube Ibérica, Tarragona, España), el cual estaba atemperado a la misma temperatura. Finalmente, se produjo una bajada progresiva de la temperatura hasta alcanzar los 15°C en 2 horas, con la ayuda de una nevera programada, momento en el que se efectuó la evaluación seminal.

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN

Para la evaluación del volumen, éste se midió mediante tubos Falcon de 50 mL graduados. La concentración espermática se midió mediante el fotómetro Spermacue 12300/0500 (Minitube Ibérica, Tarragona, España).

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN

Para la evaluación de la morfología, se depositaron 10 µL de cada muestra seminal en un portaobjetos, se extendió y se dejó que se secase para poder realizar una tinción Diff-Quick (Kubus, Madrid, España) que consiste en sumergir la muestra en primer lugar en una solución fijadora durante un minuto, seguidamente en una tinción eosinófila durante otro minuto y finalmente en una tinción basófila otro minuto más. Posteriormente se llevó a cabo un conteo de 200 espermatozoides al microscopio (Olympus CX21FS2) a 40x, distinguiendo aquellos espermatozoides morfológicamente normales de aquellos que presentaban alguna anomalía ya fuera de cabeza, de parte intermedia o de cola.

Para el análisis de la motilidad y de los parámetros cinemáticos las muestras se diluyeron a una concentración de 25×10^6 spz/mL con BTS y se colocó una gota de 10 µL en un portaobjetos. Se utilizó el software ISAS v.1.2 (Proiser, Valencia, España). Los parámetros estudiados fueron: motilidad total (MT) (%), motilidad progresiva (MP) (%), velocidad curvilínea (VCL) (µm/s), velocidad rectilínea (VSL) (µm/s), velocidad lineal (VAP) (µm/s), índice de linealidad (LIN) (%), índice de rectitud (STR) (%), índice de oscilación (WOB) (%), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) (µm) y frecuencia de batida (BCF) (Hz).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un test de Shapiro-Wilks para determinar si los datos obtenidos presentaban una distribución normal. Los datos que no seguían una distribución

normal, como el % de MT, el % de WOB y el % de morfoanomalías fueron transformados a arcoseno. Posteriormente, se realizó un One-way ANOVA seguido por un test de Tukey para detectar diferencias entre los diferentes sementales respecto a los distintos parámetros estudiados. Se consideró que existían diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Según los resultados obtenidos en la **tabla I**, todas las variables estudiadas excepto VCL y SRT mostraron diferencias significativas entre los diferentes verracos. El verraco nº 2 de la variedad Retinto del Andévalo presentó un volumen superior en comparación con los verracos nº 1 y 3 (89.4 ± 15.39 mL, 67.13 ± 8.65 mL y 70.13 ± 12.64 mL, respectivamente).

En cuanto a la concentración espermática, todos los ejemplares presentan un valor cercano a los 400×10^6 spz/mL, siendo el ejemplar de la variedad Negro de los Pedroches el que reporta una mayor concentración media, y siendo por el contrario el ejemplar de la variedad Torbiscal el que presenta un valor inferior. Por otra parte, se puede apreciar como en la mayoría de los casos el porcentaje de espermatozoides normales es superior al 90%, alejándose bastante de esta cifra el verraco nº 4, con un total de 45% de morfoanomalías. Finalmente, el verraco nº 1 mostró los mejores resultados de motilidad total y progresiva, al igual que para los parámetros cinemáticos.

DISCUSIÓN

La técnica de inseminación artificial constituye actualmente una herramienta fundamental en el ámbito de la reproducción asistida, la cual ha dado lugar a la diseminación de la mejora genética y a un mayor estatus sanitario en las distintas explotaciones (Waberski *et al.* 2019). No obstante, se trata de una técnica

Tabla I. Resultados correspondientes a los parámetros de calidad seminal en verracos de la raza porcina Ibérico (MEDIA \pm DE) (Results corresponding to the parameters of seminal quality in boars of the Iberian pig breed (AVERAGE \pm SD)).

| | Verraco 1 | Verraco 2 | Verraco 3 | Verraco 4 |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Variedad | Retinto del Andévalo | Retinto del Andévalo | Torbiscal | Negro de los Pedroches |
| Volumen (mL) | 67,13 \pm 8,65c | 89,4 \pm 15,39a | 70,13 \pm 12,64bc | 80,75 \pm 7,21ab |
| Concentración ($\times 10^6$ spz/mL) | 412,83 \pm 55,32ab | 404,3 \pm 62,14ab | 387,83 \pm 63,01b | 467,6 \pm 71,84a |
| Spz normales (%) | 91,88 \pm 1,91a | 90 \pm 3,69a | 91,7 \pm 2,29a | 54,81 \pm 12,12b |
| MT (%) | 91,98 \pm 2,86a | 79,96 \pm 7,5bc | 85,23 \pm 5,97b | 76,07 \pm 8,18c |
| MP (%) | 61,67 \pm 5,92a | 45,29 \pm 7,21b | 46,34 \pm 9,48b | 37,57 \pm 9,75b |
| VCL (µm/s) | 66,78 \pm 8,94 | 63,48 \pm 10,63 | 58,15 \pm 10,06 | 56,92 \pm 8,34 |
| VSL (µm/s) | 29,16 \pm 1,3a | 23,67 \pm 1,51b | 20,32 \pm 2,43c | 15,73 \pm 1,68 |
| VAP (µm/s) | 51,62 \pm 5,9a | 46,56 \pm 7,62ab | 40,1 \pm 5,86b | 30,13 \pm 3,78c |
| LIN (%) | 44,59 \pm 7,79a | 38,19 \pm 6,54ab | 35,67 \pm 6,02b | 28,05 \pm 4,17c |
| STR (%) | 57,35 \pm 8,56 | 52,09 \pm 9,22 | 51,35 \pm 7,46 | 52,4 \pm 3,86 |
| WOB (%) | 77,6 \pm 4,47a | 73,43 \pm 4,04ab | 69,3 \pm 4,32b | 53,77 \pm 8,69c |
| ALH (µm) | 2,45 \pm 0,31b | 2,47 \pm 0,29b | 2,38 \pm 0,31b | 2,82 \pm 0,27a |
| BFC (Hz) | 7,28 \pm 0,46a | 6,26 \pm 0,42b | 7,08 \pm 0,63a | 6,21 \pm 0,38b |

ampliamente extendida en los sistemas de producción intensivos, y no tanto, en los sistemas de producción extensivos como son los mayormente presentes en el cerdo Ibérico. En todo caso, previamente a su aplicación es necesario llevar a cabo una evaluación seminal que determine la calidad de la muestra, siendo los principales parámetros estudiados de forma rutinaria en los centros de reproducción asistida el volumen, la concentración, la morfología y la motilidad espermática.

Por lo general, para considerar un eyaculado apto en relación a la concentración espermática, este parámetro debe ser superior a 200×10^6 spz/mL (De Mercado *et al.* 2010; Gómez-Fernández *et al.* 2012), por lo que todos los ejemplares estudiados presentarían unos valores aceptables ya que el porcentaje más bajo se corresponde con una concentración de $387.83 \pm 63.01 \times 10^6$ spz/mL, valor perteneciente al verraco de la variedad Torbiscal. Como puede observarse, los valores obtenidos no difieren con los resultantes en otras razas puras como Duroc, Petrain y Large White, donde la concentración espermática fue de 491 ± 170.8 , 453 ± 154.3 y $401 \pm 165.4 \times 10^6$ spz/mL, respectivamente. En cambio, en relación al volumen espermático, la cantidad obtenida es baja en todos los ejemplares estudiados en comparación con estas razas puras ya que el valor más alto obtenido en nuestro estudio corresponde al verraco n° 2, perteneciente a la variedad Retinto del Andévalo con un 89.4 ± 15.39 mL, siendo en contraposición el valor más bajo el perteneciente a la raza Duroc con 200 ± 70.5 mL (Wolf 2009). Estas diferencias pueden ser debidas a diversos factores como pueden ser la raza, la edad y la estación, entre otros. En el presente trabajo se observa como aquellos verracos con mayor edad tienden a ofrecer una mayor concentración espermática como consecuencia de un mayor desarrollo testicular. Por otra parte, el volumen obtenido por los verracos es similar a los descritos por Sereno (2002) donde observó en el cerdo Ibérico un volumen medio de 74 mL, siendo de 70.5 mL en la variedad Torbiscal, similar a los del presente trabajo.

En todo caso, todas estas diferencias pueden tener un componente humano, ya que cada operario encargado de llevar a cabo la extracción seminal tiene un criterio diferente a la hora de discernir que fracción del eyaculado se considera rica y cual no.

Así mismo, se considera que un eyaculado con menos de un 60% de MT y con más de un 20% de morfoanomalías podría comprometer la fertilidad (Didion 2008). Como podemos observar, la MT media de los distintos verracos evaluados es superior al 76%, lo que implicaría una calidad aceptable de los mismos habiéndose observado diferencias significativas entre los mismos. Se trata de un valor similar al observado por Sancho *et al.* (2007) donde la MT para la variedad Lampiño y Entrepelado fue de $73.3 \pm 39.6\%$ y de $79.9 \pm 11.7\%$, respectivamente. No obstante, la MP resultante en los verracos objeto de estudio fue bastante inferior a la reportada por Rooke, Shao and Speake (2001) en la raza Large White ($45.29 \pm 7.21\%$, $46.34 \pm 9.48\%$ y $37.57 \pm 9.75\%$ vs 62.9%), a excepción del valor obtenido por el verraco n° 1 el cual es equiparable a dicha raza ($61.67 \pm 5.92\%$). Dichas diferencias en la motilidad progresiva

pueden estar ligadas al set up empleado en el software de análisis de motilidad.

En relación a las morfoanomalías, podemos observar que los dos ejemplares de la variedad Retinto del Andévalo y el ejemplar de la variedad Torbiscal presentan valores inferiores al 10%, siendo por el contrario en el ejemplar de la variedad Negro de los Pedroches superior al 20%, en concreto de aproximadamente un 45%, lo que deriva en posibles problemas reproductivos que desaconsejarían su uso dentro de un programa de inseminación. El alto porcentaje de morfoanomalías observado podría ser debido a la edad del verraco, ya que a partir de los dos años de vida la calidad seminal disminuye (Flowers 2002). Así mismo, la anatomía testicular se va alterando con el paso de los años dando lugar a unos testículos con poca firmeza que van a interferir de forma negativa en la liberación de espermatozoides (Quiles & Hevia 2003). Por otro lado, a excepción del verraco de la variedad Negro de los Pedroches, el resto de ejemplares presenta unos valores similares a la raza Large White, en la cual se observó un 12.8% de morfoanomalías (Rooke, Shao & Speake 2001). Así mismo, Sereno (2002) observó un valor 6.96% en el cerdo Ibérico. En todo caso, afecciones de tipo microbiano localizadas en el aparato reproductor, también influyen negativamente en la calidad seminal, siendo este el caso por ejemplo, de *Brucella suis* que provoca degeneración testicular y del virus de Aujeszky que origina degeneración en los túbulos seminíferos y necrosis focal en la túnica albugínea del testículo (García 2004).

CONCLUSIÓN

A excepción del verraco de la variedad Negro de los Pedroches, la calidad seminal de los verracos estudiados de la raza porcina Ibérico en relación a las variables volumen, concentración, morfología, motilidad y parámetros cinemáticos, es apta según los valores de referencia de la especie para poder utilizarlos dentro de los programas de reproducción asistida de la raza que supongan una mejora en los parámetros reproductivos de las distintas explotaciones y que contribuyan a la conservación de las distintas variedades amenazadas.

AGRADECIMIENTOS

Queríamos agradecer su colaboración a la Diputación de Córdoba por alojar a los verracos objeto de estudio en sus instalaciones y a la Diputación de Huelva por proveerlos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ciereszko, A, Ottobre, J & Glogowski, J 2000, 'Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars', *Animal reproduction science*, vol. 64, no. 1-2, pp. 89-96.
- Contri, A, Valorz, C, Faustini, M, Wegher, I & Carluccio, A 2010, 'Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa', *Theriogenology*, vol. 74, no. 3, pp. 424-35.
- De Mercado, E, Rodríguez, A, Gómez, E & Sanz, E 2010, 'Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality', *Animal reproduction science*, vol. 118, no. 1, pp. 54-61.

- Didion, B 2008, 'Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples', *Theriogenology*, vol. 70, no. 8, pp. 1374-6.
- Flowers, W 2002, 'Using reproductive biology to improve suboptimal reproductive performance', in *Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA, sep*, pp. 43-8.
- García, EdCVB 'Evaluaciones de los factores medioambientales que influyen sobre la calidad seminal en sementales porcinos', Tesis Licenciatura (MVZ). Cd Obregon, 2004. ITSON.
- Gómez-Fernández, J, Gómez-Izquierdo, E, Tomás, C, González-Bulnes, A, Sánchez-Sánchez, R & de Mercado, E 2012, 'Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig', *Animal reproduction science*, vol. 130, no. 1-2, pp. 82-90.
- Holt, W, Watson, P, Curry, M & Holt, C 1994, 'Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop', *Fertility and sterility*, vol. 62, no. 6, pp. 1277-82.
- Kondracki, S, Iwanina, M, Wysokińska, A & Huszno, M 2012, 'Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology', *Acta Veterinaria Brno*, vol. 81, no. 2, pp. 195-9.
- Kondracki, S, Wysokińska, A, Kania, M & Górski, K 2017, 'Application of two staining methods for sperm morphometric evaluation in domestic pigs', *Journal of veterinary research*, vol. 61, no. 3, p. 345.
- MAPA 2021. Visto: 20/10/2021, Catálogo oficial de razas (mapa.gob.es).
- Nieto, R, García-Casco, J, Lara, L, Palma-Granados, P, Izquierdo, M, Hernandez, F, Dieguez, E, Duarte, JL & Batorek-Lukač, N 2019, 'Ibérico (Iberian) Pig', *European local pig breeds diversity and performance a study of project TREASURE*, pp. 1-25.
- Palacín, I, Vicente-Fiel, S, Santolaria, P & Yániz, J 2013, 'Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram', *Small ruminant research*, vol. 112, no. 1-3, pp. 128-35.
- Quiles, A, & Hevia, M 2003, 'Factores que afectan la fertilidad del verraco', *Porcicultura*.
- Rijsselaere, T, Van Soom, A, Maes, D & de Kruif, A 2003, 'Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer', *Theriogenology*, vol. 60, no. 8, pp. 1553-68.
- Rodriguez, AL, Van Soom, A, Arsenakis, I & Maes, D 2017, 'Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen', *Porcine health management*, vol. 3, no. 1, pp. 1-12.
- Rooke, J, Shao, C & Speake, B 2001, 'Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen', *REPRODUCTION-CAMBRIDGE*, vol. 121, no. 2, pp. 315-22.
- Sancho, S, Casas, I, Ekwall, H, Saravia, F, Rodriguez-Martinez, H, Rodriguez-Gil, J, Flores, E, Pinart, E, Briz, M & Garcia-Gil, N 2007, 'Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs', *Reproduction*, vol. 134, no. 1, pp. 111-21.
- Sereno, JRB 2002, 'Caracterización del cerdo ibérico por la aptitud sexual del macho', Universidad de Córdoba.
- Smital, J 2009, 'Effects influencing boar semen', *Animal reproduction science*, vol. 110, no. 3-4, pp. 335-46.
- Swierstra, E & Dyck, G 1976, 'Influence of the boar and ejaculation frequency on pregnancy rate and embryonic survival in swine', *Journal of animal science*, vol. 42, no. 2, pp. 455-60.
- Vianna, WL, Bruno, DG, Namindome, A, Rosseto, AC, Rodrigues, PHM, Pinese, ME & Moretti, AdSA 2004, 'Efficiency of different measurement techniques of sperm concentration in swine', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 33, no. 6, pp. 2054-9.
- Waberski, D, Riesenbeck, A, Schulze, M, Weitze, KF & Johnson, L 2019, 'Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges', *Theriogenology*, vol. 137, pp. 2-7.
- Wolf, J 2009, 'Genetic correlations between production and semen traits in pig', *animal*, vol. 3, no. 8, pp. 1094-9.
- Yániz, J, Lopez-Gatius, F & Hunter, R 2006, 'Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa', *Anatomia, histologia, embryologia*, vol. 35, no. 1, pp. 28-34.
- Yániz, J, Soler, C & Santolaria, P 2015, 'Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review', *Animal reproduction science*, vol. 156, pp. 1-12.
- Yániz, JL, Lopez-Gatius, F, Santolaria, P & Mullins, KJ 2000, 'Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa', *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, vol. 260, no. 3, pp. 268-78.
- Žaja, IŽ, Samardžija, M, Vince, S, Majić-Balić, I, Vilić, M, Đuričić, D & Milinković-Tur, S 2016, 'Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables', *Animal reproduction science*, vol. 164, pp. 169-76.