

R-130 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 253-254, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc103>**Cloned buffalo bulls and their somatic cell donor bulls exhibit similar *in-vitro* embryo production efficiency****Tanya Gupta, Gaurav Tripathi, Sonal Gupta,
Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh***Embryo Biotechnology Lab, Animal Biotechnology Division
ICAR- National Dairy Research Institute, Karnal-132001,
India*Corresponding author: Manoj Kumar Singh (manoj.singh@icar.res.in)**ABSTRACT**

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has emerged as a valuable assisted reproductive technology for faster multiplication of animals. This helps to preserve the valuable superior germplasm. The cloning of superior sires and their use in breeding programs helps rapidly disseminate superior genetics in animal populations. However, questions remain regarding cloned bulls' fertility status compared to their somatic cell donor bulls, especially in buffaloes. We studied the semen kinetic parameters and *in vitro* fertilization (IVF) rate of frozen-thawed cloned bulls' semen (n=2) compared to those of somatic cell donor bulls' semen (n=2). The kinematics were studied using a Computer Assisted Semen Analyzer (CASA; IVOS II, IMV, France). Semen from cloned bulls vs. donor bulls showed progressive motility with distance average path (17.70 ± 0.835 vs. $18.72 \pm 0.53 \mu\text{m}$), distance curvilinear (28.30 ± 2.85 vs. $31.61 \pm 1.71 \mu\text{m}$), distance straight line (15.89 ± 0.56 vs. $16.36 \pm 0.20 \mu\text{m}$), velocity average path (74.84 ± 7.23 vs. $69.59 \pm 9.96 \mu\text{m/s}$), velocity curvilinear (113.77 ± 15.28 vs. $113.49 \pm 16.94 \mu\text{m/s}$), and velocity straight line (66.71 ± 6.01 vs. $61.94 \pm 9.13 \mu\text{m/s}$). This suggested that the kinematic parameters of cloned bull semen were not significantly different ($p < 0.05$) from those of the somatic cell donor bull semen. Furthermore, cloned and donor bull semen was used for IVF to assess the blastocyst production rate. Immature oocytes were matured *in vitro* for 24 h in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂ in air; RH>95%) at 38.5°C. After 24 h, mature oocytes were co-incubated with processed semen in the fertilization Bracket and Oliphant (BO) medium for 18 h. The presumptive zygotes were cultured in Research Vitro Cleavage medium (RVCL; Cook, Australia) for up to 8 days. The cleavage and blastocyst rates for cloned bulls, $68.72 \pm 0.72\%$ and $14.11 \pm 1.89\%$, respectively, did not differ significantly ($p < 0.05$) from those of the donor bulls, i.e., $67.44 \pm 0.16\%$ and $13.96 \pm 1.24\%$, respectively. Furthermore,

Los toros bufalinos clonados y sus donantes de células somáticas exhiben una eficiencia de producción de embriones *in vitro* similar

**Tanya Gupta, Gaurav Tripathi, Sonal Gupta,
Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh***Laboratorio de Biotecnología de Embriones, División de
Biotecnología AnimalICAR- Instituto Nacional de Investigación Láctea,
Karnal-132001, India*Autor de correspondencia: Manoj Kumar Singh (manoj.singh@icar.res.in)**RESUMEN**

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) se ha convertido en una valiosa tecnología de reproducción asistida para una multiplicación más rápida de los animales. Esto ayuda a preservar el valioso germoplasma superior. La clonación de toros superiores y su uso en programas de reproducción ayuda a difundir rápidamente una genética superior en las poblaciones animales. Sin embargo, quedan dudas sobre el estado de fertilidad de los toros clonados en comparación con sus toros donantes de células somáticas, especialmente en los búfalos. Estudiamos los parámetros cinéticos del semen y la tasa de fertilización *in vitro* (FIV) del semen de búfalos reproductores clonados congelados-descongelados (n=2) en comparación con los del semen de búfalos donantes de células somáticas (n=2). La cinemática espermática se estudió utilizando un analizador de semen asistido por computadora (CASA; IVOS II, IMV, Francia). El semen de toros clonados vs. toros donantes mostró motilidad progresiva con distancia trayectoria promedio (17.70 ± 0.835 vs. $18.72 \pm 0.53 \mu\text{m}$), distancia curvilínea (28.30 ± 2.85 vs. $31.61 \pm 1.71 \mu\text{m}$), distancia línea recta (15.89 ± 0.56 vs. $16.36 \pm 0.20 \mu\text{m}$), velocidad de trayectoria promedio (74.84 ± 7.23 frente a $69.59 \pm 9.96 \mu\text{m/s}$), velocidad curvilínea (113.77 ± 15.28 frente a $113.49 \pm 16.94 \mu\text{m/s}$) y velocidad en línea recta (66.71 ± 6.01 frente a $61.94 \pm 9.13 \mu\text{m/s}$). Esto sugirió que los parámetros cinemáticos del semen de toro clonado no eran significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los del semen de toro donado de células somáticas. Además, se utilizó semen de toro clonado y donado para la FIV para evaluar la tasa de producción de blastocistos. Los ovocitos inmaduros se maduraron *in vitro* durante 24 h en una incubadora de CO₂ humidificada (5% de CO₂ en aire; RH>95%) a 38,5°C. Después de 24 h, los ovocitos maduros se incubaron conjuntamente con el semen procesado en el

the expression of pluripotency-related genes (*OCT4*, *SOX2*, and *NANOG*) was similar in blastocysts produced in both experimental groups. Thus, the semen characteristics and *in vitro* embryo production rate of cloned bulls are like those of their somatic cell donor bulls. This preliminary study suggests that farmers can use semen from cloned bulls for Artificial Insemination programs and other ART procedures.

Keywords: buffalo, semen, IVF, blastocyst.

Acknowledgement: This work was financially supported by Buffalo Cloning Project (NASF/BGAM(SM)-9001/2022-23) ICAR-NASF, New Delhi.

medio de fertilización Bracket y Oliphant (BO) durante 18 h. Los presuntos cigotos se cultivaron en medio Research Vitro Cleavage (RVCL; Cook, Australia) durante 8 días. Las tasas de escisión (clivaje) y blastocisto de los toros clonados, $68,72 \pm 0,72\%$ y $14,11 \pm 1,89\%$, respectivamente, no difirieron significativamente ($p < 0,05$) de las de los toros donantes, es decir, $67,44 \pm 0,16\%$ y $13,96 \pm 1,24\%$, respectivamente. Además, la expresión de genes relacionados con la pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) fue similar en los blastocistos producidos en ambos grupos experimentales. Por lo tanto, las características del semen y la tasa de producción de embriones *in vitro* de los toros bufalinos clonados son similares a las de sus toros donantes de células somáticas. Este estudio preliminar sugiere que los ganaderos pueden utilizar semen de toros clonados para programas de inseminación artificial y otros procedimientos de reproducción asistida.

Palabras clave: búfalo, Semen, FIV, blastocisto.

Reconocimiento: Este trabajo fue apoyado financieramente por Buffalo Cloning Project (NASF/BGAM(SM)-9001/2022-23) ICAR-NASF, Nueva Delhi.