

مقایسه رقیق کننده‌های مختلف اسپرم خروس بومی در رقت‌های مختلف اسپرم طی دو زمان تلقیح

مهرداد مدرس^{۱*}، شهرام جعفری^۲، عبدالحسین سمیع^۳ و سعید انصاری^۴

۱- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان

۲- کارشناس ارشد علوم دامی

۳- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

۴- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۱

چکیده

به منظور تعیین مناسب‌ترین رقیق کننده‌های منی از بین رقیق کننده‌های بلتسویل، رینگر و شیر و مقایسه نسبت‌های مختلف رقیق کننده‌های جهت رقیق‌سازی (نسبت یک به یک، یک به دو منی به رقیق کننده‌های)، بر باروری و نیز بررسی تاثیر زمان نگهداری منی (بدون نگهداری و یا ۲۴ ساعت نگهداری) بر درصد باروری، در مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی واقع در استان اصفهان، این مطالعه انجام شد. این تحقیق شامل ۱۱ تیمار و در هر تیمار ۳ قطعه خروس به عنوان تکرار و ۲۴ قطعه مرغ و جمعاً ۲۶۴ قطعه مرغ بود. پس از جمع آوری منی، مایع بدست آمده به نسبت‌های یک به یک و یا یک به دو با رقیق کننده‌های مختلف رقیق شده و تلقیح بلافاصله یا پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نگهداری منی بعد از ۲۴ ساعت باعث کاهش باروری شد. اثر رقیق کننده‌های مختلف و همچنین زمان‌های تلقیح بر صفت باروری معنی‌دار بود ($P < 0/01$). بین نسبت‌های یک به یک و یک به دو رقیق کننده‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در بین رقیق کننده‌ها زمانی که از منی تازه بهره گرفته شد، استفاده از رینگر یک به یک بالاترین درصد باروری را موجب گردید ($P < 0/01$) و بین بلتسویل با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی استفاده از شیر به عنوان رقیق کننده‌ها باعث کاهش باروری گردید ($P < 0/01$). به نظر می‌رسد که برای نگهداری منی هیچ کدام از رقیق کننده‌های ذکر شده مناسب نبوده و استفاده از رینگر به عنوان رقیق کننده باعث بالاترین درصد باروری می‌شود.

کلمات کلیدی: رقیق کننده، باروری، اسپرم، تلقیح مصنوعی

مقدمه

امروزه از تلقیح مصنوعی به عنوان روش متداول در صنعت پرورش طیور استفاده می‌شود که با کمک آن علاوه بر شجره دار نمودن گله می‌توان عملکرد تولید مثل را در مرغ‌های گوشتی به حد مطلوب رساند و از نژادهای برتر از نظر ژنتیکی، در تلقیح استفاده نمود (۹). تلقیح مصنوعی اجازه می‌دهد که پرند در گروه‌های کوچکی نگهداری شوند (۱۴). علاوه بر آن استفاده از رقیق کننده‌های مناسب و میزان رقیق کردن منی می‌تواند اصلاح گران طیور را در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی یاری نماید. این امر به ویژه در کشور ما می‌تواند مورد توجه واقع شود. استفاده از رقیق کننده‌ها مناسب باعث کاهش هزینه تلقیح مصنوعی شده (۲)، علاوه بر آن در یک رقیق کننده مناسب از موادی استفاده می‌شود که هم انرژی مورد نیاز اسپرم را تأمین کرده و هم باعث محافظت از آن شوند (۴). در ترکیب رقیق کننده‌ها، معمولاً از موادی استفاده می‌شود که در نتیجه تجزیه منی خروس و بوقلمون بدست آمده‌اند. با استفاده از رقیق کننده‌ها مناسب می‌توان بدون افزایش تعداد اسپرم، از دزهای بیشتری در تلقیح استفاده نموده و ضمن افزایش تعداد نتاج شجره دار روند برنامه‌های ژنتیکی را تسریع بخشید (۹).

تاکنون یک رقیق کننده مناسب که برای اسپرم همه گونه‌های پرندگان مناسب باشد، معرفی نشده است (۷). ترکیباتی که به عنوان رقیق کننده معرفی شده‌اند، متعدد می‌باشند. از جمله این رقیق کننده‌ها می‌توان به بلتسویل، رینگر و شیر اشاره کرد. اثر این رقیق کننده‌ها بر باروری و میزان مناسب رقیق سازی منی مورد بحث محققین می‌باشد (۲).

بنابراین اهداف این تحقیق عبارتند از:

تعیین مناسب‌ترین رقیق کننده‌ها از بین رینگر، بلتسویل و شیر برای ابقاء توان باروری تخم مرغ‌های بومی، تشخیص مناسبترین غلظت رقیق کننده منی با استفاده از رقیق کننده

مربوطه و بررسی تأثیر زمان نگهداری منی بر باروری مرغان مادر بومی.

مواد و روش‌ها

در انجام این تحقیق از ۳۳ قطعه خروس و ۲۶۴ قطعه مرغ بالغ نژاد بومی اصفهان، در سنین بین ۳۰ تا ۴۰ هفتگی، در مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی وابسته به امور دام جهاد کشاورزی اصفهان استفاده شد. طول مدت روشنایی سالن نگهداری خروس‌ها ۱۶ ساعت در روز بود.

رقیق کننده‌های مورد استفاده شامل بلتسویل با $pH=7/51$ ، رینگر با $pH=7$ ، شیر هموزنیزه و کم چرب و آب مقطر با $pH=7$ بودند. تخم مرغ‌ها با استفاده از گاز فرمالدئید به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند. در این طرح از ۱۱ تیمار و برای هر تیمار ۳ قطعه خروس به عنوان تکرار و برای هر خروس ۸ قطعه مرغ در نظر گرفته شد. در کل برای هر تیمار از ۲۴ مرغ استفاده شد. مرغ‌هایی برای خروسها در نظر گرفته شدند که والدین آنها و یا یکی از والدین آنها مشترک نباشند، تا از همخونی که باعث کاهش باروری می‌شود، جلوگیری شود. اسپرم‌گیری از خروس‌ها به مدت ۳ هفته و هر هفته دو بار انجام گرفت. شیوه اسپرم‌گیری به این نحو بود که پره‌های ناحیه مقعد چیده شده و پشت خروس، زیر رانها و زیر بالهای آنها ماساژ داده می‌شد و در مرحله آخر بعد از فشاردادن به اطراف کلواک انزال صورت می‌گرفت (۲). ساعت ۱۵/۰۰ هر روز برای جمع آوری منی در نظر گرفته شد. به جهت اطمینان از باروری طبیعی خروسها اسپرم‌های جمع آوری شده مورد ارزیابی (مورفولوژی و motility) قرار گرفتند. به منظور رقیق کردن منی، از رقیق کننده‌های مختلف رینگر، بلتسویل و شیر به نسبت ۱ به ۱ و ۱ به ۲ برای گروه شاهد از منی رقیق نشده استفاده شد. منی در دو زمان تلقیح شد، برای شرایط زمانی صفر منی را فوری بعد از رقیق کردن استفاده کرده و برای شرایط زمانی ۲۴ ساعت، منی در درجه حرارت ۵ درجه در یخچال نگهداری می‌شد و پس از گذشت این

جدول‌های گرافیکی از نرم افزار کوآتروپرو استفاده گردید. جهت انجام محاسبات آماری پژوهش از نرم افزار کامپیوتری SAS استفاده شد.

$$Yijkl = M + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$$

Yijkl: مقدار هر مشاهده - M: میانگین کل - A_i : اثر

مربوط به دو سطح نگهدارنده (غلظت) - B_j : اثر مربوط به ۲ زمان تلقیح - C_k : اثر مربوط به ۳ محلول رقیق کننده - AB_{ij} : اثر متقابل عامل A و عامل B - AC_{ik} : اثر متقابل عامل A و عامل C - BC_{jk} : اثر متقابل عامل B و عامل C - ABC_{ijk} : اثر متقابل عامل A و عامل B و عامل C - E_{ijkl} : خطای آزمایش.

نتایج

۱- اثر نوع رقیق کننده

استفاده از رقیق کننده های مختلف شامل شیر، بلتسویل و رینگر نسبت به شاهد کاهش معنی داری ($P < 0.01$) در باروری به وجود آورد، در صورتی که تفاوتی در انواع رقیق کننده‌ها وجود نداشت (جدول ۱). اگر علاوه بر نوع رقیق کننده، زمان ذخیره سازی منی نیز در نظر گرفته شود (جدول ۱)، مشخص می‌شود که استفاده از رقیق کننده رینگر باعث بالاترین درصد باروری پس از گروه شاهد شده و بین درصد باروری ایجاد شده در نتیجه استفاده از رینگر با شاهد اختلاف معنی داری وجود ندارد. بین انواع رقیق کننده‌ها و نسبت های مختلف رقیق کنندگی بر روی درصد باروری اختلاف معنی داری وجود ندارد و بیشترین درصد باروری با استفاده از منی رقیق نشده و بدون ذخیره سازی بدست آمد (جدول ۱). بیشترین درصد باروری با استفاده از محلول رینگر به نسبت یک به یک و بدون ذخیره سازی حاصل شد که حتی از گروه شاهد نیز بیشتر بود. با استفاده از رینگر به نسبت یک به دو، بدون ذخیره سازی، نیز باروری بالایی بدست آمد (جدول ۱).

زمان تلقیح انجام می‌گردد. به منظور تلقیح، مقدار ۰/۰۵ میلی لیتر مایع منی با استفاده از سرنگ انسولین به عمق ۲ تا ۳ سانتی متری کلواک داخل واژن تخلیه می‌گردد.

به مدت ۱۴ روز در دو نوبت ساعت ۱۱/۰۰ و ساعت ۱۸/۰۰ مجموعاً ۱۸۲۳ عدد تخم مرغ جمع آوری و در سردخانه در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۷۵ تا ۸۰ درصد ذخیره شد. بعد از ذخیره سازی، تخم مرغ‌ها ۱۸ روز داخل ستر با رطوبت ۵۲ در صد و حرارت ۳۷/۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و بعد از ۱۹ روز تخم مرغ‌ها به هچر انتقال داده شده و به مدت سه روز در این دستگاه قرار گرفتند. دمای هچر در ۲۴ ساعت اول ۳۱/۵ درجه و رطوبت ۶۴ درصد و در روزهای دوم و سوم در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد و در رطوبت ۷۲ درصد تنظیم گردید (۳). بعد از پایان ۲۱ روز با توجه به معیارهای زیر درصد باروری تعیین گردید:

- ۱) نبود حلقه خونی که نشان دهنده ناباروری تخم مرغ یا مردن جنین در روز اول انکوباسیون است.
- ۲) وجود حلقه خونی یا مشاهده یک جنین کوچک نشاندهنده مرگ جنین در سه روز اول انکوباسیون و وجود جنین‌های مرده‌ای که پر و پنجه‌های پا تشکیل نشده، اما ران تشکیل شده است نشان دهنده مرگ بین ۲-۷ روزگی است.
- ۳) وجود جنین‌های مرده‌ای که دارای پر بوده و پنجه‌های پا تشکیل شده، اما کیسه زرده جذب حفره شکمی نشده‌اند که نشان دهنده مرگ بین ۸-۱۸ روزگی است.
- ۴) وجود جنین‌های مرده‌ای که در آن کیسه زرده به طور کامل یا مقداری از آن جذب حفره شکمی شده باشد، که نشان دهنده مرگ بین ۱۹-۲۱ روزگی است (۱۳).

روش تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل با آرایش ۳×۲×۲ انجام گردید، میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند و برای ترسیم

۲- اثر زمان ذخیره سازی

مختلف آن جهت رقیق سازی، باروری بعد از ۲۴ ساعت ذخیره سازی کاهش می‌یابد.

ذخیره سازی منی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، باروری را بطور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/01$) (جدول ۱). با مراجعه به جدول ۱، تأثیر متقابل طول مدت ذخیره سازی و نسبت استفاده از رقیق کننده، تأثیر متقابل طول مدت ذخیره سازی و نوع رقیق کننده، تأثیر متقابل مدت زمان، نوع و نسبت استفاده از رقیق کننده، نشان داده می‌شود که با وجود استفاده از رقیق کننده نسبت‌های

جدول ۱- مقایسه میانگین صفت باروری بر اساس مقدار، زمان و رقیق کننده

درصد باروری	مقدار × زمان × رقیق کننده
۹۸/۵۸ ^a	یک به یک × صفر × رینگر
۹۴/۰۸ ^{ab}	یک × صفر × شاهد
۸۳/۳۵ ^{abc}	یک به دو × صفر × رینگر
۶۶/۰۰ ^{bdc}	یک به دو × صفر × بلتسویل
۶۲/۴۱ ^{bdc}	یک به یک × صفر × بلتسویل
۵۶/۵۴ ^{dc}	یک به یک × صفر × شیر
۴۹/۹۱ ^d	یک به دو × صفر × شیر
۱۰/۶۶ ^e	یک به دو × بیست و چهار × رینگر
۶/۲۴ ^e	یک به دو × بیست و چهار × بلتسویل
۲/۷۵ ^e	یک به یک × بیست و چهار × بلتسویل
۱/۵۶ ^e	یک به یک × بیست و چهار × رینگر

۱- میانگین‌ها در هر ستون که دارای حروف غیر یکسان هستند تفاوت معنی‌دار با هم دارند ($P < 0/05$).

۲- مقدار یک در این مقدار مربوط به شاهد (منی خالص) است و بدین معنی است که هیچ نوع غلظتی از رقیق کننده با منی مخلوط نشده است.

مقدار یک به یک: یک حجم رقیق کننده + یک حجم منی مقدار

یک به دو: دو حجم رقیق کننده + یک حجم منی

۳-نسبت استفاده از رقیق کننده

استفاده از رقیق کننده بلتسویل (به نسبت‌های یک به یک و یک به دو) نشان دهنده آن است که بین نسبت‌های مختلف این رقیق کننده بر باروری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و زمانی استفاده از رقیق کننده بلتسویل باروری مطلوبی به دنبال خواهد داشت که از منی بدون ذخیره سازی استفاده گردید، به طوری که باروری در این حالت با شاهد، اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتایج بدست آمده از تحقیقات مختلف در مورد این رقیق کننده با یکدیگر مطابقت ندارد. در برخی تحقیقات با استفاده از رقیق کننده بلتسویل، کاهش باروری مشاهده گردیده است (۱۴). در تحقیق دیگر بعد از ۴۸ ساعت نگهداری با استفاده از رقیق کننده بلتسویل، مشاهده شد که باروری به میزان ۶۴ درصد کاهش یافته است (۱۵) و برخی دیگر استفاده از این رقیق کننده را برای ذخیره سازی منی مناسب تشخیص داده‌اند (۱۲)، که احتمالاً دلایل اختلاف نتایج گزارش شده با این تحقیق، مربوط به مدت زمان کمتر ذخیره سازی منی و نگهداری منی در دمای بالاتر (۱۵) درجه سانتی‌گراد) می‌باشد که این امر شوک سرمایی اسپرم را برطرف می‌کند. در این تحقیق با توجه به pH منی، که از کمی اسیدی تا کمی قلیایی بود (۴)، برای نگهدارنده بلتسویل با استفاده از این pH، باروری بالایی (۹۲ درصد) گزارش شده است (۱۶).

در این تحقیق استفاده از شیر باعث کاهش باروری گردید ($P < 0/05$) و بین استفاده از نسبت‌های مختلف آن (یک به یک و یک به دو) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. گزارشات دیگر حاکی از آن است که زمانی که از شیر پاستوریزه به منظور رقیق کردن استفاده می‌شود، باروری حاصل شده تقریباً معادل با زمانی است که اسپرم خالص و تازه مورد استفاده قرار گرفته بود (۱) احتمالاً دلایل این اختلاف نتیجه را می‌توان به اختلاف گروه‌های نژادی (خارجی و بومی) نسبت داد.

بنابراین استفاده از شیر اغلب زمانی توصیه می‌شود که رقیق کننده مناسب دیگری در دسترس نباشد.

نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهند که درصد باروری در نتیجه رقیق کردن منی نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشته ($P < 0/01$)، در حالی که بین باروری ایجاد شده در نتیجه استفاده از نسبت‌های یک به یک و یا یک به دو از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. جدول ۱ نشان می‌دهد که بین انواع رقیق کننده‌ها و نسبت‌های مختلف استفاده از آنها اختلافی مشاهده نمی‌گردد. اگر علاوه بر نسبت استفاده از رقیق کننده‌ها و نوع آن، زمان ذخیره سازی منی رقیق شده در نظر گرفته شود (جدول ۱)، مشاهده می‌شود که در هر کدام از رقیق کننده‌ها بین نسبت‌های یک به یک و یک به دو اختلاف معنی‌داری وجود ندارد

بحث و نتیجه گیری

۱- نوع رقیق کننده

استفاده از رقیق کننده‌های مختلف شامل شیر، بلتسویل و رینگر نسبت به شاهد باعث کاهش قابل توجهی در باروری شد ($P < 0/01$). در بین رقیق کننده‌ها، استفاده از رینگر باعث بالاترین درصد باروری شد. با توجه به اینکه استفاده از این رقیق کننده به نسبت یک به یک و حتی یک به دو باعث باروری بالایی شد، هنگامی که حجم منی گرفته شده از خروس در حد کمی بوده (کمتر از ۰/۱CC)، استفاده از این نسبت‌های رقیق کننده رینگر، به نظر مناسب می‌رسد لذا نتیجه‌گیری شد که این محلول از لحاظ فیزیولوژیک، باعث حفظ ساختار و توان باروری اسپرم شده است. در تحقیقی که در همین زمینه در ایستگاه تحقیقاتی مرغ بومی فارس به عمل آمده است (۳)، نتیجه گیری شده است که استفاده از محلول رینگر توان باروری اسپرم را کاهش داده که این نتیجه با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد و احتمالاً این اختلاف به علت تفاوت در محیط آزمایش بوده است.

۲- اثر زمان ذخیره سازی منی

بعد از ۲۴ ساعت ذخیره سازی منی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد باروری بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافته که با نتایج سایر تحقیقات مطابقت دارد (۱۸،۱۷،۱۵،۱۱،۱۰،۸،۵).

در مجموع نتیجه گیری می‌شود که اسپرم خروس نژاد بومی اصفهان، مناسب جهت ذخیره سازی با استفاده از رقیق کننده‌هایی نظیر شیر، بلتسویل و رینگر نبوده و شوک سرمایی (نگهداری در دمای پایین) به شدت بر خصوصیات باروری اسپرم موثر است. بعد از ۲۴ ساعت اسپرم مانند سایر سلول‌های سوماتیک از شوک سرمایی دچار آسیب‌هایی از جمله تخریب اسپرم، کاهش تعداد کل اسپرم (به دلیل کم شدن اکسیژن) و افزایش نفوذ پذیری غشا می‌شود که منجر به تخریب اسپرم می‌گردند.

۳- نسبت استفاده از رقیق کننده

به دلیل بالا بودن تعداد اسپرم از رقیق کردن منی برای کاهش غلظت اسپرم استفاده می‌شود. در این تحقیق مشاهده

گردید که در نتیجه رقیق کردن منی، باروری کاهش قابل توجهی یافت ($P < 0.01$)، در حالی که بین باروری ایجاد شده در نتیجه استفاده از نسبت‌های یک به یک یا یک به دو اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در یک تحقیق، تا نسبت یک به چهار، منی به رقیق کننده، در باروری تغییری دیده شد و بیش از آن باعث کاهش باروری بود (۸) در تحقیقی دیگر رقیق سازی به نسبت یک به پنج (منی به نگهدارنده بلتسویل) باعث کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های مرده در مقایسه با نمونه‌های رقیق نشده گردید (۶).

در مجموع چون بین نسبت‌های یک به یک و یک به دو بر درصد باروری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، مشخص شد که حجم اسپرم برای باروری مطلوب حتی با دو برابر رقیق کردن منی برای باروری کافی بوده و در شرایطی که حجم منی کم است آنها را می‌توان تا دو برابر رقیق کرده و علاوه بر اینکه تلقیح به راحتی انجام می‌پذیرد، می‌توان منی رقیق شده را به مرغ‌های بیشتری تلقیح نمود بدون اینکه درصد باروری تغییر یابد.

منابع

۱. رشیدی ه. ۱۳۷۱. کالبد شناسی پرندگان اهلی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه چمران، صفحه ۲۶۲.
۲. میر عبدالباقی ژ. ۱۳۷۷. جزوه آموزشی تلقیح مصنوعی طیور. صفحه ۳۱.
۳. نحوی م.ع. ۱۳۷۹. گزارش اجمالی از تلقیح مصنوعی در مرکز مطالعات مرغ بومی فارس. معاونت امور دام جهاد فارس، صفحه ۱۲.
۴. هاشمی م. ۱۳۷۰. فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی. چاپ اول. انتشارات فرهنگ جامع، صفحه ۳۰۲.
5. Blesbois E., Grasseau L. and Seigneurin F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129: 371-378.
6. Clarke R.N., M.R. Bakst and M.A. Ottinger. 1984. Morphological change in chicken and turkey spermatozoa incubated under various condition. *Poultry Science*, 63:801-805.
7. Crawford R.D. 1990. *Poultry Breeding and Genetics*. Elsevier Press. ISBN 0-444-88557-9.
8. De Reviere M. and J.B. William. 1984. Testis development and production of spermatozoa in the cockerel. In: Cunningham F.J. Alake, P.E. Hewitt D. (Eds.). *Reproduction Biology of Poultry*. British Poultry Science, Harlow, UK. pp:183- 202.
9. Etches R.J. 1996. *Reproduction in Poultry*. CAB International. pp:234- 262.

10. Gill S.P.S., R.P. Amann. 2002. Does evaluation of one or two ejaculates of rooster semen provide a valid basis for culling inferior males. *Journal of Applied Poultry Research*, 11(3): 275-281.
11. Howarth B. J. 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis, and vas deferens following intramaginal insemination. *Biology of Reproduction*, 28: 256.
12. Johnson P.A., S. Stoklosowa and J.M. Bahr. 1987. Interaction of granulosa and theca layers in the control of progesterone secretion in domestic hen. *Biology of Reproduction*, 37:1149.
13. Lyones J.J. 1998. Small flock series incubation of poultry. Agri. Pub.
14. Pelaez S. and Julie A. 2007. Characterizing the Glycocalyx of Poultry Spermatozoa: I. Identification and distribution of carbohydrate residues using flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Journal of Andrology*, 28(2): 134.
15. Rabbani A., Sasanami T. and Yoshizaki N. 2005. Sperm-egg interaction is mediated by a sperm-associated body in quail. *Development, Growth & Differentiation*, 48: 33 – 40.
16. Sexton T.J. 1988. Comparison of commercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5°C. *Poultry Science*, 67: 131-134.
17. Shimada K., M.B. Valdez Jr., M. Mizutani, T. Namikawa. 2007. Potential application of sperm bearing female-specific chromosome in chickens. *Cytogenet Genome Research*, 117: 240-247.
18. Siudzinska A. and E. Ukaszewicz. 2008 . Effect of Semen extenders and storage time on Sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, 17:101-108.