

ผลของอายุและสายพันธุ์ต่ออัตราการเคลื่อนที่, อัตราการรอดชีวิต และความสามารถพันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง

Effect of age and line on the motility viability and fertility rate of cryopreserved Thai native cock semen.

พรจิต สอนสีดา¹, เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1*}, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์¹ และ พิษณุรัตน์ แสนไชยสุริยา¹
Pornjit Sonseeda¹, Thevin Vongpralub^{1*}, Bunyat Loaphaibool¹ and Pitcharat Sanchaisuriya¹

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์ของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง 3 สายพันธุ์ (เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ และซี) ใน 2 ระดับอายุ (8 เดือนและ 20 เดือน) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ใช้แผนการทดลองแบบ 2X3 factorial in CRD ใช้พ่อพันธุ์ไก่กลุ่มละ 6 ตัว ดำเนินการรีดน้ำเชื้อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright microscope โดยรวมน้ำเชื้อในแต่ละกลุ่มเจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm ลดอุณหภูมิไปที่ 5 °ซ เติมน้ำยาที่มี DMF (DMF 6% น้ำเชื้อเจือจางมีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 1,200 x 10⁶/มล.) ในหลอดขนาด 0.5 มล. ดำเนินการบรรจุแช่แข็งด้วยวิธีการอ้งไอไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -35 °ซ นาน 10 นาที และอุณหภูมิ -135 °ซ นาน 5 นาทีเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 °ซ ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °ซ จากการศึกษาคุณลักษณะของการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง Computer-assited semen analysis (CASA) และอัตราการรอดชีวิตด้วย Flow cytometer ดำเนินการทดสอบความการสมบรูณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการผสมเทียมกับแม่ไก่ไข่ทางการค้า จากการศึกษาพบว่าอายุและสายพันธุ์ของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง ให้คุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งภายหลังการละลายและอัตราไข่มีเชื้อหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแช่แข็ง, สายพันธุ์, อายุ, ไก่พื้นเมืองไทย

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of 3 lines (Lueng hang khaw, Pradoo hang dum and Chee) at 2 different ages (8 and 20 months) of Thai native cock on cryopreserved semen quality and fertility. The experiment of 2X3 factorial in CRD (6 males for each groups) were conducted. Semen was collected from each cock, evaluated under bright microscope. Semen sample were pooled for each group and diluted with schramm diluent. Semen sample were cool down to 5°C and diluents plus DMF was added (6% DMF of total volume when the sperm concentration was 1,200 x 10⁶/ml) semen was loaded into 0.5 ml straws and freez by locating at -35°C for 10 min and located at -135°C for 5 min then plunged into liquid nitrogen. Straw were thawed in cold water (5°C). The motility characteristics were examined by computer-assisted semen analyser (CASA) and viability was assessed by flow cytometer. Fertility test of frozen semen was carried on by inseminated to layer hens. The results of the present study showed that there were no effect of Thai native cock line and age on posthaw semen quality and fertility.

Keywords: frozen semen, line, age, Thai native chicken

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

* Corresponding author. vthevi@kku.ac.th

บทนำ

พันธุ์ไก่พื้นเมืองในท้องถิ่นต่างๆของโลกมีแนวโน้มลดจำนวนลงเป็นลำดับ (Tadano et al., 2008) สำหรับประเทศไทยไก่พื้นเมืองซึ่งนับว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของชาวชนบทและมีความหลากหลายทางชีวภาพก็กำลังถูกคุกคามเช่นเดียวกัน ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุ์กรรมจึงมีความสำคัญต่อความหลากหลายทางชีวภาพ การผสมเทียมนับเป็นเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการอนุรักษ์ในสัตว์ปีก ซึ่งการทำน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ปีกนั้นมีความสำคัญในแง่ของการอนุรักษ์พันธุ์กรรมอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถเก็บรักษาพันธุ์กรรมได้ยาวนานและสะดวกในการนำไปใช้สำหรับการผสมเทียม Hammerstedt, (1995) รายงานว่ามีความแตกต่างระหว่างตัวสัตว์พันธุ์ และสายพันธุ์มีผลต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ให้ผลต่างจากรายงานของ Makhafola et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าการผสมของสายพันธุ์ไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ส่วน Long et al. (2010) รายงานว่าคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอายุพ่อพันธุ์โดยที่อายุมากคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์จะลดน้อยลง แต่การศึกษาข้อมูลดังกล่าวเป็นการศึกษาข้อมูลในต่างประเทศ สำหรับการศึกษานในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาข้อมูลดังกล่าว ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอายุ และสายพันธุ์ไก่พื้นเมือง (เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ และซี) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองไทย ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมและการปรับปรุงพันธุ์

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลองใช้พ่อพันธุ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ และไก่พื้นเมืองซีแต่ละสายพันธุ์มีอายุแตกต่างกัน

2 กลุ่มคือ 8 เดือนและ 20 เดือน กลุ่มละ 6 ตัว จำนวนรวม 36 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และในการทดลองทดสอบอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า รวมทั้งสิ้นจำนวน 100 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 3 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ น้ำยาเจือจางที่ใช้คือสูตร Schramm โดยมีองค์ประกอบทางเคมี(ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Sigma) ในน้ำ 1 ลิตรดังนี้ Magnesium acetate 0.70 กรัม, Sodium glutamate 28.50 กรัม, Glucose 5.00 กรัม, Inositol 2.50 กรัม, และ Potassium acetate 5.00 กรัม (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง พ่อพันธุ์จะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง จากนั้นบีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาดขนาด 1.5 ml. โดยในหลอด 1.5 ml จะมีน้ำยาเจือจางอยู่ 200 μ l แช่น้ำเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20°ซ ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ bright microscope ตามที่อ้างโดย (เทวินทร์ และยุพิน, 2551) น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนและเคลื่อนที่ต่ำกว่าร้อยละ 80 จะไม่นำมาศึกษา สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง รวบรวมน้ำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เติมน้ำยาเจือจางอีกให้ได้สัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ : น้ำยา) การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า ด้วยเครื่อง CASA ส่วนการประเมินการรอดชีวิตของอสุจิด้วยการใช้สีฟลูออเรสเซนต์ SYBR-14 ด้วยเครื่อง Flow cytometer สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อนั้นลดอุณหภูมิเหลือ 5°ซ โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงเตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสม dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบเป็นร้อยละ 6 ในน้ำเชื้อเจือจางสุดท้าย 4 ส่วน (ส่วนเดิม 3 ส่วน ส่วนที่มี DMF

1 ส่วน) บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปมหลอดน้ำเชื้อเจือจางที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที จากนั้นเข็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลา นำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่อง โฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดวางบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว เป็นการสิ้นสุดขบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่อหลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยจุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที เข็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่จุ่มในน้ำเย็น นำไปผสมเทียมแม่ไก่โดยทันที การผสมเทียมนั้นดำเนินการตามวิธีการผสมเทียมโดยการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดไก่อตามวิธีการของ Quinn และ Burrows (1936) อ้างโดย (Lake and Stewart, 1998) ทำการผสมเทียมในช่วงเวลา 15.00 – 17.00 น. โดยใช้ไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ถอดปลายเข็มฉีดยาออกแล้ว ดูดบรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร ผสมเทียมโดยการสอดไซริงค์ความลึกประมาณ 4 ซม. ค่อยๆ ปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดของไก่ โดยใช้เวลาปล่อยน้ำเชื้อประมาณ 5 วินาที ประเมินอัตราการผสมติดที่โดยการส่องไข่มีเชื้อที่ 7 วันหลังนำไข่เข้าฟัก การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ 2x3 factorial in CRD การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS สำเร็จรูป (SAS, 1985) วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลอง ด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของสายพันธุ์และอายุต่อคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นไก่อพื้นที่เมือง

จากข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการวัดพบว่า สายพันธุ์มีผลต่อค่าคะแนนความแข็งแรงของการเคลื่อนที่แบบหมู่ (mass movement) โดยสายพันธุ์

เหลืองหางขาวให้ค่าคะแนนสูงกว่าประดู่หางดำแต่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น พบว่าสายพันธุ์และอายุไม่มีผลต่อค่าศึกษาอื่น ๆ ดังแสดงใน Table 1 Kelso et al. (1996) ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะน้ำเชื้อของไก่อายุ 25 และ 60 สัปดาห์ และรายงานว่าคุณภาพน้ำเชื้อได้แก่ ความเข้มข้นของอสุจิ อสุจิมีชีวิตตลอดจนกิจกรรมด้านการเมตาบอลิซึม และระดับ enzyme glutathione peroxidase ในน้ำเชื้อไก่อายุมากต่ำกว่าพวกอายุน้อย สอดคล้องกับการศึกษาของ Tabatabaei et al. (2010) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อไก่อพื้นที่เมืองของอิหร่านที่อายุ 26, 34 และ 45 สัปดาห์ พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อในด้านต่างๆ ลดน้อยถอยลงตามอายุที่เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Cerolini (1997) ซึ่งรายงานว่าคุณภาพน้ำเชื้ออายุ 24-39 สัปดาห์ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด และจะลดเหลือเพียงครึ่งหนึ่งในสัปดาห์ที่ 54 แสดงให้เห็นถึงความเสื่อมสภาพทางการสืบพันธุ์เป็นไปตามอายุขัย ในการศึกษานี้พบว่าไก่อพื้นที่เมืองอายุ 8 เดือน และ 20 เดือน ให้คุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานของ Peters et al. (2008) เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อไก่อ 7 สายพันธุ์พบว่าไม่แตกต่างกัน

ผลของสายพันธุ์และอายุต่อคุณภาพและคุณสมบัติของน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

จากการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์และอายุของพ่อพันธุ์ไก่อพื้นที่เมืองไม่มีผลต่อความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งภายหลังการละลาย และอัตราของไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังแสดงใน Table 2

คุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งขึ้นกับคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น (Blesbois, 2007; Wishart, 2009) มีความแตกต่างระหว่างตัวสัตว์ พันธุ์ และสายพันธุ์ (Hammerstedt, 1995) การศึกษานี้ให้ผลต่างจากรายงานของ Makhafola et al. (2009) ซึ่งรายงานถึงผลของสายพันธุ์ไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ส่วน Long et al. (2010) รายงานว่าคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและอัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอายุพ่อพันธุ์โดยไก่อายุมาก คุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำลง Kelso et al. (1999) ได้รายงานถึงองค์ประกอบของ lipid ของอสุจิที่เปลี่ยนแปลงไปตามอายุของไก่ ซึ่งมีผลต่อตัวอสุจิ ภายหลังจากแช่แข็งและละลาย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อรวมของพ่อพันธุ์สายพันธุ์ประดู่หางดำมีความแข็งแรงของการเคลื่อนที่ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่นและมีแนวโน้มที่จะให้อัตรากการผสมติดต่ำกว่าอีก 2 สายพันธุ์ ($P < 0.06$) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษา

เปรียบเทียบคุณลักษณะอื่นๆ ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองในสายพันธุ์และอายุต่างๆ

ในการศึกษานี้ทำการศึกษาในไก่เมื่อเริ่มต้นการทดลองอายุ 8 เดือนเปรียบเทียบกับ 20 เดือน ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในขณะที่การศึกษานี้ของนักวิจัยต่างประเทศส่วนใหญ่ศึกษาในไก่อายุ 6-12 เดือน จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าไก่พื้นเมืองไก่พื้นเมืองมีอายุทางการสืบพันธุ์ที่ยาวนานกว่า ซึ่งควรต้องทำการศึกษาต่อไป

Table 1 Fresh semen characteristics of 8 and 20 months old of Thai native cocks.

Treatments	% mass	motility	Concentration ($\times 10^7$)	live	volume	Total sperm/ ejaculates($\times 10^7$)
Breed						
Lueng	4.33 ^a	90.0	472.9	92.9	0.35	162.2
Pradoo	4.10 ^b	88.6	423.6	90.1	0.31	136.6
Chee	4.29 ^{ab}	88.6	508.3	91.5	0.28	143.8
Age						
8 month	4.27	89.7	477.6	91.8	0.34	160.9
20 month	4.21	88.6	458.9	91.2	0.29	134.2
Breed x age	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SEM	0.04	0.57	18.12	0.58	0.02	9.31

Different superscripts within column indicate significant differences: ^{a-b} $P < 0.05$ (N=18)

Table 2 Motility, plasma membrane integrity and fertility of frozen thawed Thai native-chicken sperm.

Treatments	motility		Plasma membrane integrity (%)	Fertility (%)
	Total motile (%)	Progressive motile (%)		
Line				
Lueng hang khao	53.00	22.05	52.46	63.19 ^{ab}
Pradoo	50.16	22.22	52.47	57.71 ^b
Chee	51.13	21.30	50.56	67.57 ^a
Age				
8 month	51.29	21.05	54.80	65.19
20 month	51.57	22.66	48.86	60.45
breeds x %age	ns	ns	ns	ns
SEM	1.99	1.45	1.73	1.64

Different superscripts within column indicate significant differences: ^{a-b} $P < 0.05$ (N=18)

สรุป

จากการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์และอายุไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแบบแช่แข็งภายหลังการละลาย ส่วนอัตราการผสมติดในน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง พบว่าสายพันธุ์ซีให้อัตราการผสมติดสูงต่างจากพันธุ์ประดู่หางดำแต่ไม่มีความแตกต่างจากพันธุ์เหลืองหางขาว และไม่พบความแตกต่างในเรื่องผลของอายุต่ออัตราการผสมติด

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณโครงการพัฒนาศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ที่อนุเคราะห์เงินสนับสนุนและพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง และภาควิทยาศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และแม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้าเพื่อใช้ในการทดสอบอัตราการผสมติด

เอกสารอ้างอิง

เทรินทร์วงศ์พระลับ และ ยุพิน ผาสุข. 2550. การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมไก่พื้นเมือง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ชุดโครงการการพัฒนาไก่พื้นเมือง สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Bleabois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult. Sci.* 63; 213-222

- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. Pages 229-250 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL
- Kelso, K. A., S. Cerolini, R. C. Noble, N. H. Sparks, and B. K. Speake. 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 106:201-206.
- Long, J. A., D.C. Bongalhands, J. Pelaez, S. Saxena, P. Settar, N. P. O' Sullivan and J. E. Fulton. 2010. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poult. Sci.* 89: 966-973.
- Makhafola, M. B., K. C. Lehloenya, M.L. Mphaphathi, A. Dinnyes and T. L. Nedambale. 2009. The effect of beed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *Southern African J. Anim. Sci.* 39: 242-245 (supplement I)
- Perters, S. O., O. D. Shoyebo, B. M. Ilori, M. O. Ozoje, C. O. N. Ikeobe and Adebambo. 2008. Semen quality traits of seven strain of chickens raised in the humid tropics. *Int. J. poult. Sci.* 7: 949-953.
- Tabatabaei S., R. A. Batavani and A. R. Talebi. 2010. Comparison of semen quality in indigenous and Ross broiler breeder Roosters. *J. Anim. Vet. Advances.* 8(1): 90-93.
- Tadano, R., M. Sekino, M. Nishibori, and M. Tsudzuki. 2008. Microsatellite marker analysis for the Genetic relationships among japanese long-tailed chicken breeds. *Poultry Sci.* 86:460-469
- Wishart, G. J. 2009. Semen quality and semen storage. pp. 151-178, in P. M. Hocking (ed). *Biology of Breeding Poultry*. CAB international.