



PENGARUH JENIS PENGECER DAN KONSENTRASI SPERMATOZOA AYAM PELUNG TERHADAP PERIODE FERTIL TELUR AYAM ARAB

¹⁾YUNI MARIANI, ²⁾ NI MADE ANDRI KARTIKA

Fakultas Peternakan, Universitas Nahdlatul Wathan Mataram,
Jl. Kaktus No. 1-3 (0370) 641275 Mataram

e-mail: mariani.yuni25@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh interaksi jenis pengencer dan konsentrasi spermatozoa terhadap periode fertil. Penelitian dilaksanakan dengan metode eksperimental laboratorium dengan rancangan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3 dan 9 kali ulangan. Faktor pertama adalah jenis pengencer (J) yaitu $J_1 = \text{NaCl Fisiologis}$ dan $J_2 = \text{Ringer Laktat}$, sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi spermatozoa (K) yaitu $K_1 = 50$ juta, $K_2 = 100$ juta, $K_3 = 150$ juta. Dengan demikian terdapat 6 unit percobaan. Peubah yang diamati meliputi periode fertil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara jenis pengencer dan konsentrasi spermatozoa terhadap periode fertil. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis pengencer tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap periode fertil, begitu juga peningkatan konsentrasi spermatozoa tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap periode fertil. IB dengan konsentrasi 100 juta sel spermatozoa pada koleksi telur selama 21 hari menunjukkan hasil yang terbaik.

Kata kunci : Pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, periode fertile.

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to determine the interaction effects between diluent type and numbers of spermatozoa of Pelung Roosters on the fertile period in Arab hens' eggs. The experiment was conducted using experimental laboratory method and Complete Randomized Design (CRD) in a 2x3 factorial design. Diluent type ($J_1 = \text{Physiological Saline}$ and $J_2 = \text{Ringer lactate solution}$) was considered as first factor and numbers of spermatozoa ($K_1 = 50$ million, $K_2 = 100$ million and $K_3 = 150$ million) as the second factor. Each of the treatment was repeated nine times. Variables measured were is fertile period. The results showed that diluent type and numbers of spermatozoa had no significant interaction on fertile period and egg fertility. Results of Anova showed that the type of diluent had no significant effect ($P > 0.05$) on fertile period. The numbers of spermatozoa had no significant effect ($P > 0.05$) on fertile period.. It can be concluded that Insemination with a 100 million of sperm cell for 21 day- egg collection gave the best egg fertility.

Keywords : semen diluter, numbers of spermatozoa, fertile period

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ayam Pelung adalah ayam lokal Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan melalui persilangan dengan ayam Arab untuk menjadi penghasil daging dan telur. Ayam Pelung selain sebagai ayam penyanyi karena suaranya bervolume besar, panjang, dan berirama juga memiliki keunggulan berupa ukuran tubuh yang lebih besar dan pertumbuhannya lebih cepat dibandingkan dengan ayam lokal lain. Ayam Arab merupakan ayam tipe petelur dengan produksi telur yang tinggi yakni mencapai 190 – 250 butir/tahun (Sulandari *et al.*, 2007)

Teknik Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi yang diharapkan dapat memperbaiki produktivitas ayam dengan melakukan persilangan (Ridwan dan Rusdin, 2008; Sutiyono *et al.*, 2006). Teknik IB memungkinkan untuk melakukan persilangan antar jenis ayam bahkan antar jenis unggas seperti ayam Bekisar (ayam Hutan dengan ayam Buras) dan Tiktok (itik dengan entok) (Sutiyono *et al.*, 2006). Rendahnya keberhasilan IB dipengaruhi oleh strain ayam, umur, pengencer semen, derajat pengenceran atau dosis inseminasi, kualitas semen, deposisi semen, frekuensi, dan waktu inseminasi buatan (Saleh dan Sugiyatno, 2006).

Penanganan semen ayam di luar tubuh telah banyak dilakukan dan cukup berhasil diantaranya dengan mengencerkan menggunakan NaCl, Ringer laktat dan sebagainya. NaCl fisiologis telah digunakan untuk pengencer semen unggas sejak tahun 1959 oleh Lorent. Spermatozoa ayam toleran terhadap konsentrasi NaCl dari 0,5 sampai 1,5% pada umumnya yang digunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% (Sutiyono, 2001). Larutan ringer, merupakan larutan yang telah terbukti dapat diterima oleh tubuh terutama tubuh manusia sebab larutan tersebut sebagai larutan *infuse*. Kemampuan spermatozoa yang terkandung dalam semen yang diencerkan dengan bahan-bahan tersebut, belum cukup bukti dalam membuahi sel telur di dalam alat reproduksi ayam betina.

Jumlah spermatozoa motil progresif yang dideposisikan akan memengaruhi lama tidaknya periode fertil. Semakin banyak spermatozoa motil progresif yang mencapai *chalaziferous region* pada saluran reproduksi betina akan semakin lama periode fertil spermatozoa, karena *sperm nest* pada saluran reproduksi ayam betina memiliki sistem pelepasan spermatozoa untuk proses fertilisasi secara bertahap (Ridwan, 2002). Dosis IB yang baik pada ayam yaitu 100 juta spermatozoa (Tabatabaei, 2010; Mauldin, 2009).

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lamanya periode fertil telur ayam Arab yang diinseminasi dengan spermatozoa ayam Pelung pada jenis pengencer dan konsentrasi spermatozoa yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Materi

Hewan percobaan yang digunakan terdiri atas 7 ekor ayam jantan Pelung berumur rata-rata 48 minggu dan 54 ekor ayam Arab betina dewasa produktif berumur 32 - 35 minggu. Ayam jantan dipelihara dalam kandang individu berukuran 70 x 70 x 70 cm. Ayam betina dipelihara pada kandang battere dengan ukuran kandang 40 x 30 x 30 cm. Ayam jantan dan betina diberikan pakan yang sama, berupa campuran jagung, dedak halus dan konsentrat dengan perbandingan 50 : 20 : 30 yang mengandung protein 21 persen dan 2900 kcal ME/kg. Pakan diberikan dua kali sehari yaitu pada pagi hari pukul 08.00 dan sore hari pada pukul 15.00 WIB, sebanyak 120 gram/ekor/hari dan minum diberikan secara *ad libitum*.

Bahan-bahan yang digunakan yang digunakan terdiri atas semen, NaCl fisiologis, Ringer laktat, eosin, dan alkohol. Peralatan yang digunakan, meliputi tabung *ependorf*, tissue, termos es, timbangan elektrik, tabung reaksi, *object glass*, *Cover glass*, bilik hitung *Neubaur*, pipet eritrosit, haemocytometer, spuit, pipet, pH meter, mikroskop monitor, spuit volume 1ml, mesin tetas dan alat *candling*).

Metode

Metode koleksi semen. Koleksi semen ayam dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Burrows dan Quinn pada tahun 1937 dengan teknik pengurutan (*massage*) (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Pengurutan dilakukan secara halus pada bagian punggung sampai ekor berulang kali sampai kloaka ayam jantan tersebut memerah, setelah itu diurut kloakanya untuk pengeluaran semennya. Semen yang tertampung dikumpulkan dalam satu tabung dan dimasukkan ke dalam termos es, kemudian segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume, pH, warna dan konsistensi. Evaluasi mikroskopis meliputi gerak massa, motilitas, konsentrasi dan mortalitas. Evaluasi semen dilakukan untuk mengetahui kualitas semen yang akan digunakan untuk IB. Evaluasi ini dilakukan pada semen segar sebelum dilakukan pengenceran. Motilitas spermatozoa diatas 50 persen yang digunakan untuk IB.

Pengenceran semen. Semen diencerkan sesuai perlakuan dengan pengencer NaCl fisiologis dan Ringer laktat. Perbandingan semen dengan pengencer adalah 1 : 3.

Pelaksanaan IB. Ayam betina sebagai hewan percobaan diinseminasi menggunakan semen yang telah diencerkan sesuai perlakuan. Ayam betina dipegang dengan posisi bagian posterior ayam betina sedikit diangkat dari sumbu badannya sehingga bagian posterior lebih tinggi dari bagian anteriornya. Ayam betina dirangsang dengan pengurutan dan menekan bagian atas dan bawah abdomen supaya ayam betina tersebut mengeluarkan vaginanya dari rongga kloaka. Inseminasi dilakukan pada sore hari pukul 16.00 WIB dengan tujuan untuk menghindari adanya telur dalam uterus yang dapat menghambat pergerakan progresif spermatozoa.

Koleksi dan inkubasi telur hasil inseminasi. Telur dikoleksi mulai hari kedua setelah IB, kemudian dibersihkan dari kotoran menggunakan spons, lalu telur ditandai sesuai dengan tanggal bertelur, nomor ayam dan kelompok perlakuan. Koleksi telur dilakukan pada sore hari yakni pada pukul 16:00 WIB sampai pukul 17:00 WIB. Setiap 7 hari koleksi, telur diinkubasikan ke dalam mesin tetas pada temperatur 38-39°C.

Pengukuran periode fertile. Data periode fertil diperoleh dengan mengkoleksi telur mulai hari ke 2 hingga hari ke 22 (21 hari) setelah IB dan selanjutnya dieramkan. Data periode fertil dan fertilitas didapatkan dengan cara melakukan *candling* pada telur hasil IB yang telah dieramkan. Telur yang dikoleksi setiap 7 hari dimasukkan ke dalam mesin tetas. Setelah hari ke 7 pengeraman maka dilakukan *candling* dengan tujuan untuk mengetahui telur yang fertil dengan melihat adanya perkembangan embrio dini menggunakan teropong telur. Telur fertil akan memperlihatkan adanya gumpalan merah atau penyebaran pembuluh darah, sedang yang tidak fertil tidak menunjukkan tanda-tanda tersebut. Telur yang tidak terlihat fertil pada saat *candling*, dipecah untuk memastikan apakah telur tersebut terbuahi atau tidak. Dengan cara tersebut, maka akan diperoleh data periode spermatozoa sebagai hasil kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur.

Periode fertil diperoleh dengan mengamati telur yang telah diinkubasi hingga telur tidak bertunas selama 21 hari koleksi telur, dihitung dalam satuan hari. Periode fertil dihitung untuk mengetahui kemampuan spermatozoa membuahi sel telur di dalam saluran reproduksi betina.

Rancangan percobaan. Penelitian menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 2 x 3 dan diulang sebanyak 9 kali. Faktor J (jenis pengencer) terdiri atas : J1 = NaCl Fisiologis, J2 = Ringer Laktat; Faktor K (konsentrasi spermatozoa) terdiri atas : K1 = 50 juta sel spermatozoa dengan volume 0,08 ml, K2 = 100 juta sel spermatozoa dengan volume 0,16 ml, dan K3 = 150 juta sel spermatozoa dengan volume 0,24 ml. Terdapat 6 kombinasi perlakuan yaitu : J1K1, J1K2, J1K3, J2K1, J2K2, J2K3.

Analisis Data. Data yang diperoleh dievaluasi menggunakan analisis variansi untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diuji dan dilanjutkan dengan uji BNJ (Steel and Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan kedua bahan pengencer masih diperoleh telur fertil pada hari ke 19 setelah IB walaupun persentasenya sangat rendah yaitu diperoleh pada kelompok perlakuan yang diinseminasi menggunakan 100 dan 150 juta sel spermatozoa. Hal ini disebabkan, pada perlakuan 100 dan 150 juta sel spermatozoa menyebabkan spermatozoa yang mencapai *sperm nest* lebih banyak sehingga hasil fertilisasi lebih lama daripada inseminasi menggunakan 50 juta sel spermatozoa.

Rataan periode fertil spermatozoa ayam Pelung yang diinseminasikan pada ayam Arab dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi ($P > 0,05$) antara jenis pengencer dan konsentrasi spermatozoa terhadap periode fertil. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer yang digunakan dan konsentrasi spermatozoa tidak saling memengaruhi periode fertil.

Tabel 1. Rataan \pm std dan Hasil Analisis Periode Fertil pada Jenis Pengencer dan Konsentrasi Spermatozoa per Inseminasi

Pengencer Jenis	Konsentrasi Spermatozoa (Juta/inseminasi)			Rataan
	50	100	150	
	Periode Fertil (Hari)			
NaCl Fisiologis	14,67 ^a \pm 2,65	15,44 ^a \pm 2,07	16,11 ^a \pm 2,20	15,4 ^a \pm 0,72
Ringer Laktat	14,78 ^a \pm 2,57	15,78 ^a \pm 2,33	16,56 ^a \pm 2,24	15,7 ^a \pm 0,83
Rataan	14,78 ^a \pm 0,16	15,61 ^a \pm 0,24	16,33 ^a \pm 0,31	

Keterangan: Superskrip yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Rataan periode fertil pada kelompok pengencer NaCl relatif lebih rendah daripada periode fertil yang menggunakan larutan Ringer laktat (15,4 dan 15,7 hari). Namun perhitungan secara statistik rata-rata periode fertil dari kedua pengencer tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Lake dan Stewart (1978), bahwa lama periode fertil pada ayam didapatkan rata-rata 12 hari.

Peranan pengencer untuk mempertahankan spermatozoa setelah dideposisikan memang kurang diperlukan jika dilihat dari hasil penelitian yang diperoleh, karena dalam saluran reproduksi betina memang memiliki kondisi pH yang sesuai dan adanya pasokan nutrisi dari lingkungan *sperm nest* yaitu di daerah *uterovaginal junction* (UVJ), sehingga spermatozoa dapat bertahan lebih lama. Berbeda dengan spermatozoa yang tidak segera dideposisikan atau disimpan secara *in vitro*, sangat membutuhkan pasokan zat nutrisi dari pengencer dan memerlukan buffer atau penyangga karena aktivitas spermatozoa di luar tubuh akan lebih tinggi jika dibandingkan di dalam organ reproduksi betina. Bearden dan Fuquay (1997) menyatakan bahwa metabolisme secara aerob, menghasilkan asam laktat yang kian tertimbun dan akan menurunkan nilai pH semen yang akhirnya menurunkan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa.

King *et al.*, (2002) melaporkan bahwa selama di *sperm storage tubulus* (SST), spermatozoa berada di lipatan atau *crypta* mukosa uterus yang memberikan keuntungan ganda. Selain mendapatkan asupan nutrisi, juga kondisi *crypta* yang sangat mendukung untuk menekan proses metabolisme spermatozoa, ikut menstabilkan *plasmalema* dan sel membran lainnya, sehingga spermatozoa dapat hidup lebih lama. Ditambahkan oleh Etches (1996) bahwa sel sekretoris dari SST memproduksi lemak, glikogen, dan asam *phospat* yang akan digunakan sebagai kebutuhan nutrisi spermatozoa selama berada di SST.

Semakin tinggi jumlah spermatozoa yang diinseminasikan, semakin lama periode fertil. Seperti tertera pada Tabel 1, IB dengan 150 juta sel spermatozoa menunjukkan angka periode fertil yang lebih tinggi ($16,33,2 \pm 0,31$ hari) dibandingkan dengan IB menggunakan 50 dan 100 juta sel spermatozoa yaitu masing-masing $14,78 \pm 0,16$ hari dan $15,61 \pm 0,24$ hari. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi spermatozoa tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap periode fertil ($P > 0,05$).

Lamanya periode fertil ditentukan oleh jumlah spermatozoa yang masuk ke dalam SST (Wishart, 1987; Brillard dan Antoni, 1990). Semakin banyak spermatozoa motil progresif yang mencapai *chalmaziferous region* pada saluran reproduksi betina akan semakin lama periode fertil spermatozoa, karena *sperm nest* pada saluran reproduksi ayam betina memiliki sistem pelepasan spermatozoa untuk proses fertilisasi secara bertahap (Ridwan, 2002). Selanjutnya Tartaglione dan Ritta, (2004), Sutkeviciene *et al.*, (2009), King *et al.*, (2002), menyatakan bahwa spermatozoa yang bergerak progresif yang mampu membuahi sel telur karena mampu mencapai saluran reproduksi yang lebih dalam.

Periode fertil diukur mulai dari hari kedua setelah inseminasi sampai pada hari terakhir telur fertil, periode fertil merupakan hasil dari proses fertilisasi. Menurut Ridwan (2002), lama periode fertil spermatozoa ayam dipengaruhi oleh ketersediaan spermatozoa yang dapat membuahi sel telur di dalam *sperm nest*. Lamanya kemampuan hidup spermatozoa ayam dalam saluran reproduksi betina mencapai 32 hari, akan tetapi daya fertilitasnya hanya mencapai 21 hari setelah inseminasi (Kismiati, 1999).

Faktor yang membatasi periode fertil spermatozoa setelah berada dalam saluran reproduksi betina, selain masa hidup spermatozoa itu sendiri, adalah jumlah spermatozoa saat berada di *uterovaginal junction* (UVJ). Spermatozoa secara bertahap dilepaskan sedikit demi sedikit dalam lumen uterus. Pelepasan spermatozoa ini terjadi sekitar waktu ovulasi dan oviposisi. Segera setelah spermatozoa dilepas, aktivitas metabolisme dan motilitas spermatozoa meningkat, dan diduga setelah proses penurunan stabilitas *plasmalema* sehingga daya hidup spermatozoa semakin menurun. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan yang dilaporkan oleh Fuji dan Tamura (1963) yang dikutip Gilbert (1980), bahwa spermatozoa dijumpai dalam jumlah besar pada kelenjar UVJ setelah inseminasi, dan dalam jumlah yang semakin berkurang sampai telur fertil yang terakhir dikeluarkan. Spermatozoa dapat kehilangan fertilitasnya sekalipun secara visual masih hidup.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara jenis pengencer dan konsentrasi spermatozoa terhadap periode fertil. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis pengencer tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap periode fertil, begitu juga peningkatan konsentrasi spermatozoa tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap periode fertil. IB dengan konsentrasi 100 juta sel spermatozoa pada koleksi telur selama 21 hari menunjukkan hasil yang terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden, J.H. and Fuquay. 1997. *Applied Animal Reproduction*. Second edition. Reston Publishing Company, Inc. Prentice Hail Company Reston. Virginia.
- Brillard J.P. 2003. *Practical aspects of fertility in poultry*. World's Poult. Sci. J. 59:441-446.
- Brillard J.P, and GR McDaniel, 1986. *Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens*. *J. Poult. Sci.* 65 : 2330 - 2334.
- Eslick, M.L., and G.R. McDaniel. 1992. *Interrelationships between fertility and hatchability of eggs from broiler breeder hens*. *J. Appl. Poult. Res.* 1:156 – 159.
- Etches, R.J. 1996. *Reproduction in Poultry*. Departement of Animal and Poultry Science Publishers, B.V. Amsterdam, London, New York, Tokyo.88
- Froman, D.P, J.D. Kirby, and J.A. Proudman. 2008. *Reproduction in Poultry : Male and Female*. In Hafez, B., and E.S.E. Hafez. 2008. *Reproduction in Farm Animals*. Blackwell Publisher. 7th ed.
- Fuji, S., dan T. Tamura. 1963. *Location of Sperms in the Oviduct of Domestic Fowl with Special Reference to Storage of Spermns in the Vaginal Gland*. *J. Fac. Fish. Husb.* 5 : 143 – 163
- Gilbert., A. B., 1980. *Poultry*. In E. S. E. Hafez (ed) *Reproduction in farm animals*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- King, C.J. 1993. *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, London, New York, Tokyo.
- Kismiati, S. 1999. *Fertilitas telur dan mortalitas embrio ayam kedu hitam pada interval inseminasi yang berbeda*. *J. Pengemb. Peternakan Trop*. Universitas Diponegoro. Semarang. 53 –59.
- Lake P. E. and J.M. Steward. 1978. *Artificial Insemination in Poultry*. The 1st Ed. Her Majesty's Stationary Office. London. Pp 1-35.
- Mauldin J.M. 2009. *Poultry Breeding : Natural Mating and Fertilization*. College of Agricultural and Environmental Sciences, The University of Georgia Cooperative Extension Service.
- Obidi J.A, B.I Onyeanus, JO Ayo, PI Rekwot and SJ Abdullahi. 2008. *Effect of timing of artificial insemination on fertility and hatchability of Shikabrown breeder hens*. *J. Poult. Sci.* 7(12): 1224-1226.
- Ridwan, 2002. *Fertil life dan periode fertil spermatozoa ayam buras pasca inseminasi buatan*. Tesis. Pascasarjana Universitas Pandjadjaran, Bandung.
- Ridwan dan Rusdin. 2008. *Konservasi Semen Ayam Buras Menggunakan berbagai Pengencer terhadap Fertilitas dan Periode Fertil Spermatozoa Pasca Inseminasi Buatan*. *J. Agroland.* 15 (1) : 63 – 67.
- Saleh, D.M. dan Sugiyanto. 2006. *Pengaruh Waktu Inseminasi Buatan terhadap Fertilitas Ayam Petelur*. *J. Anim. Prod.* 8 (2) : 83-87.
- Siudzinska A. and F. Lukaszewicz. 2008. *Effect of Semen Extenders and Storage Time on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds*. *J. Appl. Poul. Res.* 17:101-108.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik Suatu Pendekatan Biometrik*. Edisi ke-2. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Sulandari, S., M.S.A Zien, Paryanti, S., Sartika, F. Astuti, M. Widjastuti, T. Sujana, E. Darana, S. Setiawan, dan D. Garnida. 2007. *Sumber Genetik Ayam Lokal Indonesia*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Press. Jakarta. pp : 45 -104.
- Sutiyono, S. Riyadi, dan S. Kismiati. 2006. *Fertilitas dan daya tetas telur dari ayam petelur Hasil inseminasi buatan menggunakan semen ayam kampung Yang Diencerkan Dengan Bahan Berbeda*. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 31 (1).
- Sutkeviciene N, V. Riskeviciene, A. Januskauskas, H. Zilinskas and M. Andersson. 2009. *Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar*. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 51 : 53
- Tabatabaei, S., 2010. *The effect of Spermatozoa Number on Fertility Rate of Chicken in Artificial Insemination Programs*. *J. of Anim. and Vet. Advances.* 9 (12) : 1717 - 1719.
- Tartaglione C.M. and M.N. Ritta. 2004. *Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozenthawed bull semen*. *Theriogenology.* 62:1245-1252.
- Wishart G.J. 1987. *Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl numbers of oviducal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs*. *J. Reprod. and Fertil.* 80 : 49