
FACTORS EFFECTING SPERMATOZOA MOTILITY IN TURKEY – TEMPERATURE AND DILUENT

Slanina T., Petrovičová L., Massányi P.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovak Republic

E-mail: slaninatomas@atlas.sk

ABSTRACT

Target of our study was to analyze the turkey spermatozoa motility parameters cultured *in vitro* at laboratory temperature (22 °C) and cool milieu – cooling (4 °C) and to analyze the spermatozoa motility in turkey semen diluted with physiological solution as well as commercial diluent and subsequently cultured *in vitro* in cool milieu (4 °C) in time periods 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes, whereby a motility of samples diluted with commercial diluent and physiological solution was analyzed after 24 hours. The motility was determined using the SpermVision CASA system. After the semen dilution with physiological solution and subsequent culture at laboratory temperature and at cool condition a significant decrease of spermatozoa motility at laboratory temperature was detected from Time 0 (94.15%) till the 180 minutes of culture (53.91%). At the cool milieu this difference was lower (95.41 and 78.86%, respectively) and the differences were significant from the 30 minutes of culture till 180 minutes. Similar tendency were found for progressive spermatozoa motility, velocity curved line, amplitude of lateral head displacement, beat cross frequency, where significantly higher rates were measured after 30 minutes of culture at lower temperature. The spermatozoa motility between samples cultured in physiological solution and commercial diluent was in both groups very balanced for 90 minutes of culture. Subsequently, significantly higher spermatozoa motility was detected at time periods 120, 150 and 180 minutes of culture in commercial diluent. Also after 24 hours the motility was higher in this group. Progressive spermatozoa motility replicates the tendency of total spermatozoa motility. Significant decrease in the parameters – velocity curved line and amplitude of lateral head displacement; were detected between samples after 90 minutes of cultivation in physiological solution. Any significantly differences were detected – in beat cross frequency, after 24 hours this parameter was significant higher in sample with commercial diluent.

Key words: turkey, spermatozoa, motility, CASA, temperature, diluents

Acknowledgement: This study was supported by VEGA project 1//0532/11

ÚVOD

Domáce morky sú intenzívne šľachtené a chované predovšetkým na váhu a telovú kompozíciu. Zlepšenie týchto vlastností je badateľné, ale zlepšiť reprodukčné charakteristiky je veľmi ťažké. Z tohto dôvodu je dôležité vykonávanie efektívneho výberu ejakulátov na základe kvality, pretože umelá inseminácia (AI) vyžaduje vysoko kvalitné spermie získané od individuálnych samcov. Ako uvádza Hocking (2009) uskladnenie ejakulátu moriakov je využívané v komerčných chovných prevádzkach, ale účinnosť týchto systémov v udržiavaní schopnosti fertilizácie spermií *in vitro* počas 24 hodín uskladnenia je mizivá, v porovnaní s vajcovodom živého organizmu, ktorý môže udržať schopnosť fertilizácie spermií počas mnohých týždňov. Aby hydinársky priemysel ťažil z moderných techník umelej inseminácie, je nutné správne uskladňovanie ejakulátu hydiny (Dumpala et al., 2006).

Viacero faktorov zohráva dôležitú úlohu v udržiavaní kvality ejakulátu počas uskladnenia. Hlavnú úlohu majú riedidlá používané pre využitie ejakulátu a podmienky uskladnenia ako napríklad čas, prevzdušňovanie a udržiavacia teplota. Je známe, že pohyblivosť spermií a fertilizačná schopnosť nezriedeného čistého vtáčieho ejakulátu uskladneného *in vitro* sa obvyčajne znižuje v rámci 1 hodiny po odbere. Z toho dôvodu, pre uskladnenie ejakulátu vtákov, je veľmi dôležitý typ riedidla a teplota uskladnenia pre zabránenie znižovania kvality spermií (Dumpala et al., 2006).

Uskladnenie spermií v chladnejších podmienkach znižuje metabolizmus a udržiava ich životaschopnosť po dlhší čas. Metabolizmus spermií nie je úplne zastavený počas tekutého uskladnenia pri zníženej teplote. Hlavné zmeny, ktoré nastanú zahŕňujú ireverzibilné zníženie pohyblivosti, morfologickej celistvosti a fertility spermií (Maxwell a Stojanov, 1996). V skutočnosti je uskladnenie ejakulátu vždy sprevádzané zhoršením kvality spermií a fertility. Negatívny účinok na kvalitu spermií u tekutého *in vitro* uskladnenia ejakulátu moriakov, ktorý súvisí so zlým vplyvom na fertilitu, potvrdili vo svojej štúdii i Donoghue a Wishart (2000).

Pre dlhšie uchovanie ejakulátov vtákov boli vyvinuté mnohé riedidlá (Akçay et al., 2006). Väčšina z nich sú soľné roztoky vhodné pre priame prežitie spermie, pretože poskytujú osmotický tlak (330 – 400 mOsm) a pH (7,0 – 7,4) identické so semennou plazmou (Thurston, 1995). Riedidlá by mali taktiež obsahovať rôzne energetické substráty. Z toho dôvodu sú riedidlá používané pre ejakulát hydiny obohatené o uhľohydráty (glukóza alebo fruktóza) a v iných komponentoch pravdepodobne poskytujú energiu (citrát, glutamát, octan) (Thurston, 1995). Väčšina riedidiel poskytuje energiu pre metabolizmus a tlmivú kapacitu. Bunky spermií majú tendenciu formovať sa do zhlukov zamotaných más v hustom, čistom semene. Semenné riedidlá zabraňujú tomuto zhlukovaniu riedením vonkajšej koncentrácie, ako aj zväčšujú metabolickú aktivitu spermií a zlepšujú ich

pohyblivosť. Z praktického hľadiska znižujú počet požadovaných samcov a celkové náklady (Semen Quality, 2007).

Dlhodobé uskladňovanie morčacieho ejakulátu má významný ekonomický dopad na reprodukčné a manažérske programy chovu moriek. Cieľom našej práce bolo určiť vplyv teploty kultivácie ako aj riedidla na pohyblivosť spermíi moriakov v rôznych časových obdobiach.

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál

V práci sme hodnotili ejakuláty získané masírovaním od moriakov línie Big 6 (BUT – British United Turkeys Ltd., Chester, UK). Vzorky ejakulátu sa ihneď po odbere riedili riedidlami – jedna vzorka fyziologickým roztokom (Sodium Chloride 0,9% w/v intravenous Infusion Bieffe, Birffe Midetal S.p.A., Grosotto, Taliansko) a druhá vzorka náhodne vybraným komerčným riedidlom, v pomere jedna ku dvom (1 diel ejakulátu a 2 diely riedidla).

Príprava vzoriek

Ejakuláty sa po prenose do laboratória pred analýzou museli opätovne riediť, pretože ejakulát moriakov obsahuje vysoké koncentrácie spermíi. Ejakulát sa preto opätovne riedil fyziologickým roztokom a komerčným riedidlom, v pomere 50 μ m ejakulátu a 1000 μ m riedidla, takže finálne riedenie pri analýze bolo 1:40. Z každého zriedeného ejakulátu sme pripravili dve vzorky, ktoré boli označené ako c/c – riedené fyziologickým roztokom a c/z – riedené komerčným riedidlom, a boli umiestnené do chladničky s teplotou 4°C. Pohyblivosť sa hodnotila a porovnávala pri teplote 4°C v časových intervaloch 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minút a 24 hodín.

Z ejakulátu zriedeného pri odbere fyziologickým roztokom sme si pripravili ďalšie dve vzorky, z ktorých jedna bola kultivovaná pri laboratórnej teplote (22°C) a druhá vzorka bola vložená do chladničky, kde sa udržiavala teplota 4 °C. Pohyblivosť sa hodnotila a porovnávala pri laboratórnej a pri zníženej teplote v siedmych časových obdobiach a to: 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minút. V experimente sme vykonali 6 opakovaní.

Analytická metóda

Na hodnotenie pohyblivosti spermíi sme použili CASA (Computer – Assisted Sperm Analysis – analýza pohyblivosti spermíi počítačovou technikou) systém SpermVision (Minitüb, Tiefenbach, SRN) s mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japonsko). Každú vzorku sme umiestnili do počítacej komôrky Makler Counting Chamber s hĺbkou 10 μ m (Sefi–Medical Instruments, SRN) a následne umiestnili do zorného poľa. V každej vzorke sme sledovali nasledovné parametre – percento pohyblivých spermíi (%), percento progresívne pohyblivých spermíi (%); VCL (velocity curved line) – krivočiara rýchlosť (μ m.s⁻¹) [časovo–závislá pohyblivosť hlavičky spermie pozdĺž aktuálnej krivočiarej dráhy ako vnímané dva rozmery pod mikroskopom]; ALH (amplitude of lateral head displacement) – amplitúda laterálneho (bočného) premiestnenie hlavičky (μ m.s⁻¹)

[Stupeň laterálneho premiestnenia hlavičky spermie okolo priemernej dráhy. ALH môže byť vyjadrená ako maximálna alebo priemerná hodnota] a BCF (beat cross frequency) – frekvencia krížových úderov (Hz) [frekvencia pri ktorej VCL križuje VAP (velocity average path) priemerná dráhová rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)]. V rámci každého merania systém CASA vyhodnotil parametre pohyblivosti z minimálne 8 polí komôrky Makler Counting Chamber.

Na porovnanie výsledkov CASA analýzy v jednotlivých časových obdobiach pri sledovaní vplyvu teploty sme použili štatistický Scheffeho test. Pri porovnávaní výsledkov vplyvu veku na motilitu sme použili štandardný štatistický Studentov t -test. Preukaznosť rozdielov sme hodnotili na hladine preukaznosti $p < 0,05$; 0,01 a 0,001. Pri jednotlivých meraniach sme zaznamenávali priemernú hodnotu (\bar{x}), minimálnu (min) a maximálnu (max) hodnotu, smerodajnú odchýlku (SD) a variačný koeficient (cv).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Súčasným metódam uskladňovania spermií sú účinné len pre krátke periódy a je nutné ich vylepšovať. Jednou z podmienok nutných pre uskladnenie ejakulátu *in vitro* je nízka teplota, obyčajne 2 – 5°C. Použitie nízkej teploty v kombinácii s ochranným médiom, obsahujúcim glykolytické substráty a sprostredkujúcim cyklus kyseliny citrónovej, je nedostatočné na zaručenie dlhodobého *in vitro* prežitia morčacích spermií (Douard et al., 2000).

Vplyv rozdielnych teplôt na motilitu spermií

Giesen a Sexton (1983) sledovali účinok teploty skladovania na morčacie spermie po 18 hodinách kultivácie. Ejakulát bol uchovávaný pri teplotách 5, 15, 25 a 35°C. Pohyblivosť spermií medzi neskladovanou kontrolou a vzorkami držanými pri 5°C nebola odlišná (62 vs. 64%). Vzorky skladované pri 15 a 25°C mali pohyblivosť 40 – 8%. Vzorky držané pri 35°C po 18 hodinách boli nepohyblivé.

Z našich dosiahnutých výsledkov vyplýva, že spermie po riedení (fyziologickým roztokom) a kultivované v chlade pri teplote 4°C vykazujú lepšie hodnoty oproti hodnotám spermií kultivovaných pri laboratórnej teplote. Počiatočná pohyblivosť v čase 0 nebola preukazne rozdielna u vzorky kultivovanej v laboratórnej teplote (94,15%) a chladenej vzorky – 95,42% (Tabuľka 1). Preukazný rozdiel ($p < 0,001$) je však už badateľný po 30 minútach kultivácie, kde spermie kultivované pri nízkej teplote mali pohyblivosť 90,25% a spermie kultivované pri teplote 22°C mali pohyblivosť 82,35%. Tento rozdiel sa neustále zvyšuje postupujúcim časom kultivácie. U vzorky uskladnenej v chlade bol pozorovaný len mierny pokles počas celej doby kultivácie. Značný pokles (12%) bol zistený u vzorky uchovávanej pri laboratórnej teplote už po 30 minútach.

Kotłowska et al. (2006) vo svojej práci uvádzajú, že percentuálny podiel pohyblivosti spermií počas 2,5 a 24 hodinového uskladnenia ejakulátu moriakov v chlade (4 – 7°C) je podobný (okolo 70%) a významný pokles nastáva po 48 hodinách. Doba uskladnenia spôsobuje stály pokles charakteristík pohyblivosti spermií spojený s oboma rýchlosťami pohybu (VCL a VAP) a trajektórie pohybu (VSL, LIN). V rovnakom čase neboli nájdené žiadne zmeny v BCF.

V našej práci bola pohyblivosť spermíí po 2,5 hodine 54,61% u spermíí kultivovaných pri teplote 22°C a 84,08% pri teplote 4°C. Rozdiel medzi našimi výsledkami po 2,5 hodinovej kultivácii spermíí mohol byť spôsobený tým, že Kotłowska et al. používali pri riedení ejakulátu pred analýzou riedidlo Ovodyl (IMV, I'Aigle, France) a my sme ejakulát riedili fyziologickým roztokom (Sodium Chloride 0,9% w/v intravenous Infusion Bieffe, Grosotto, Taliansko).

Tabuľka 1: **MOT** [%] – pohyblivosť spermíí pri odlišných teplotách v jednotlivých časoch

Čas [min.]	min	max	x	sd	cv
Fyziologický roztok; laboratórna teplota					
0	83,72	99,28	94,15	3,81	4,04
30	57,97	97,44	82,35	10,46	12,70
60	25,52	96,36	72,50	16,28	22,46
90	47,55	83,96	68,85	9,50	13,80
120	35,56	90,59	66,08	15,37	23,25
150	18,68	86,57	54,61	16,42	30,07
180	29,79	80,61	53,91	12,49	23,17
Fyziologický roztok; chladnička					
0	85,20	99,72	95,42-	3,28	3,44
30	76,57	98,41	90,25***	5,51	6,11
60	78,63	98,57	90,86***	5,95	6,55
90	66,48	97,57	86,33***	8,37	9,70
120	63,82	93,00	80,70***	7,74	9,59
150	67,76	95,03	84,08***	6,39	7,60
180	66,66	88,51	78,86***	5,90	7,48

min – minimum; *max* – maximum; *x* – priemer; *sd* – smerodajná odchyľka; *cv* – variačný koeficient (%); *preukazné rozdiely* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *neupreukazný rozdiel* – $p > 0,05$ (platné pre všetky tabuľky).

Analýzou percenta progresívne pohyblivých spermíí (PRO) sme zistili identický pokles pohyblivosti od času 30 minút až po 180 minút s preukazným rozdielom ($p < 0,001$) v prospech chladenej vzorky. V čase 0 nebola progresívna pohyblivosť vo vzorkách preukazne rozdielna (81,20 ku 82,22%), avšak po 30 minútach bol zaznamenaný vysoký pokles u nechladenej vzorky až 25,9% oproti chladenej vzorke, kde pokles predstavoval len 8,65% (Tabuľka 2).

Pri sledovaní krivočiarej rýchlosti (VCL) a taktiež amplitúde laterálneho posunu hlavičky (ALH), sme v čase 0 nezistili preukazné rozdiely. S postupným časom kultivácie od 30 až po 180 minút bolo postupné znižovanie týchto parametrov preukazne rozdielne ($p < 0,001$), s vyššími hodnotami pre vzorku udržiavanú v chlade. Frekvencia úderov (BCF) bola preukazne vyššia ($p < 0,01$) po 30 minútach kultivácie v nižšej teplote a v časových obdobiach 90 až 180 minút sme taktiež zaznamenali vyššie preukázané rozdiely ($p < 0,001$) v hodnotách vzorky uchováanej pri nižšej teplote.

Tabuľka 2: **PRO** [%] – progresívna pohyblivosť spermíí pri odlišných teplotách v jednotlivých časoch.

Čas [min.]	min	max	x	sd	cv
	Fyziologický roztok; laboratórna teplota				
0	67,32	92,12	81,20	6,34	7,81
30	22,75	81,78	55,33	16,63	30,05
60	15,48	82,88	47,14	17,84	37,85
90	7,44	56,45	37,24	12,69	34,09
120	8,33	72,38	37,58	19,46	51,77
150	3,84	52,77	23,56	10,91	46,32
180	7,44	45,41	24,71	8,69	35,19
	Fyziologický roztok; chladnička				
0	66,27	93,17	82,22-	7,85	9,55
30	49,54	88,95	73,57***	10,15	13,80
60	52,06	91,03	73,97***	10,21	13,80
90	28,06	85,32	65,19***	13,71	21,03
120	43,20	75,99	58,68***	8,95	15,26
150	42,61	80,25	62,40***	9,00	14,42
180	35,73	72,24	54,50***	9,81	18,00

Vplyv rozdielnych riedidiel na motilitu spermíí

Vplyvom troch rôznych riedidiel na fertilitu spermíí moriakov sa zaoberali Akçay et al. (2006), pričom spermie boli uchovávané pri 4°C počas 24 až 48 hodín. Používané riedidlá obsahovali sacharidy: 0,3 M glukózu, 0,6 M sacharózu a Ringerov roztok. Ejakulát uskladnený v 0,6 M sacharózovom roztoku nebol použitý pre insemináciu kvôli nízkej pohyblivosti (10% pohyblivosť po 24 hodinách uskladnenia, a 0% pohyblivosť po 48 hodinách uskladnenia). Pohyblivosť spermíí v riedidle obsahujúceho 0,3 M glukózu a Ringerov roztok pri 4°C bola: 90,9% (24 h, 0,3 M glukóza); 79,1% (48 h, 0,3 M glukóza); 69,8% (24 h, Ringerov roztok); 30,9% (48 h, Ringerov roztok); 93,8% (kontrola, čerstvé spermie). Podľa Akçaya et al. (2006) neboli pozorované žiadne významné rozdiely medzi fertilizáciou spermíí uložených v glukózových roztokoch počas 24 hod. a kontrolou spermíí, ktoré boli čerstvé. Ale rozdiely medzi riedidlami boli významné ($p < 0,05$). Tieto výsledky ukázali, že ejakulát moriakov môže byť uskladnený v glukózových roztokoch počas 24 alebo 48 h s minimálnou stratou fertility.

V našich experimentoch sme analýzou percenta pohyblivých spermíí v čase 0 zistili preukazný rozdiel medzi účinkom fyziologického roztoku a komerčného riedidla ($p < 0,01$), kde fyziologický roztok vykazoval vyššiu účinnosť v porovnaní s komerčným riedidlom (Tabuľka 3). Následne v časových intervaloch 30 – 90 minút sme nezaznamenali žiadne rozdiely medzi týmito riedidlami. Ale po 120 minútach až 24 hodinách kultivácie sme zistili preukazne vyššiu pohyblivosť ($p < 0,05$ – $p < 0,001$) spermíí s komerčným riedidlom.

V našej práci pohyblivosť spermíí zriedených vo fyziologickom roztoku počas 120 minút kultivácie dosahovala 80,70%. Pohyblivosť spermíí zriedených v komerčnom riedidle, taktiež po 120 minútach kultivácie, dosahovala 90,04%, čo je takmer o 10% viac ako vo fyziologickom

roztoku. V porovnaní so štúdiou Morella et al. (2005), kde sa pohyblivosť spermíí počas 2 hodín kultivácie pri laboratórnej teplote pohybovala na úrovni 72,5% v riedidle „Turkey Semen Extend“ a 62,5% pohyblivosťou v riedidlách Ovodyl a BPSE. Z týchto výsledkov vyplýva, že po 2 hodinách kultivácie lepšie výsledky dosiahli riedidlá, ktoré sme používali v našej práci. Dôvodov, prečo majú tieto riedidlá lepšie výsledky môže byť viacero: jedným z nich je, že v našej práci sme ejakulát uchovávali pri teplote 4°C.

Tabuľka 3: MOT [%] – pohyblivosť spermíí v jednotlivých riedidlách a časových obdobiach

Čas [min./h]	min	max	x	sd	cv
Fyziologický roztok					
0	85,20	99,72	95,42	3,28	3,44
30	76,57	98,41	90,25	5,51	6,11
60	78,63	98,57	90,86	5,95	6,55
90	66,48	97,57	86,33	8,37	9,70
120	63,82	93,00	80,70	7,74	9,59
150	67,76	95,03	84,08	6,39	7,60
180	66,66	88,51	78,86	5,90	7,48
24H	29,46	78,85	52,86	12,37	23,39
Komerčné riedidlo					
0	72,68	99,02	92,26**	5,74	6,23
30	79,20	96,56	89,85-	4,43	4,93
60	74,44	96,01	88,94-	5,59	6,29
90	72,14	97,88	87,47-	6,76	7,73
120	71,21	98,14	90,04***	7,49	8,32
150	80,09	99,38	89,55*	4,71	5,26
180	68,11	98,80	87,53***	8,28	9,46
24H	41,03	87,37	60,82**	14,76	24,27

Pri hodnotení percenta progresívne pohyblivých spermíí sme zistili rozdiely medzi hodnotenými riedidlami len po 120 minútach kultivácie (Tabuľka 4), kde bola zistená štatisticky vyššia preukaznosť u komerčného riedidla ($p < 0,001$), ktorá sa udržiavala do konca kultivácie. Z týchto výsledkov môžeme konštatovať, že komerčné riedidlo udržiava progresívnu pohyblivosť spermíí moriakov po dlhšiu dobu.

Krivočiara rýchlosť (VCL) vykazovala výrazné rozdiely po 90 minútach kultivácie. V čase 90 a 150 minút boli preukazné rozdiely ($p < 0,05$). Avšak v časoch 120, 180 minút a 24 hodín bola dokázaná preukaznosť ($p < 0,001$). Amplitúda laterálneho posunu hlavičky (ALH) klesla pri riedení s fyziologickým roztokom z 5,39 μm (0 minút) na 4,22 μm (180 minút), zatiaľ čo riedených s komerčným riedidlom z 5,22 μm (0 minút) len na 4,84 μm (180 minút). Po 90 minútach kultivácie boli zistené preukazné rozdiely ($p < 0,001$). Nepreukazné rozdiely sme zistili pri hodnotení frekvencie úderov (BCF), avšak po 24 hodinách sme zaznamenali vyššie preukazné hodnoty ($p < 0,001$) u komerčného riedidla.

Tabuľka 4: **PRO** [%] – Progresívna pohyblivosť spermií v jednotlivých riedidlách a časových obdobiach

Čas [min./h.]	min	max	x	sd	cv
	Fyziologický roztok				
0	66,27	93,17	82,22	7,85	9,55
30	49,54	88,95	73,57	10,15	13,80
60	52,06	91,03	73,97	10,21	13,80
90	28,06	85,32	65,19	13,71	21,03
120	43,20	75,99	58,68	8,95	15,26
150	42,61	80,25	62,40	9,00	14,42
180	35,73	72,24	54,50	9,81	18,00
24H	6,35	40,17	21,80	8,82	40,45
Komerčné riedidlo					
0	46,69	89,96	78,04-	9,98	12,79
30	56,19	86,25	73,61-	7,25	9,84
60	50,60	84,57	70,62-	8,76	12,41
90	48,96	88,67	69,31-	11,99	17,30
120	47,47	88,27	73,81***	10,58	14,34
150	49,46	91,40	70,19***	9,01	12,84
180	49,35	89,49	70,99***	11,10	15,64
24H	13,18	72,54	36,32***	17,25	47,51

ZÁVER

Pre dlhodobjšiu kultiváciu (skladovanie) spermií moriakov je potrebné spermie udržiavať pri nízkych teplotách (4 – 8 °C) čo potvrdili aj naše výsledky. Pohyblivosť a progresívna pohyblivosť vykazovala výrazné rozdiely už po 30 minútach kultivácie a s predlžovaním času kultivácie sa tieto rozdiely ešte zväčšovali. Podobné tendencie sme zistili aj pri ďalších parametroch pohyblivosti spermií, ktoré dosiahli preukazne lepšie výsledky pri kultivácii v chlade.

Zároveň z údajov vplyvu fyziologického roztoku a komerčného riedidla možno konštatovať, že pohyblivosť spermií bola v oboch sledovaných skupinách veľmi vyrovnaná po dobu 90 minút kultivácie. Avšak pri dlhodobjšej kultivácii preukazne vyššiu pohyblivosť spermií vykazovali spermie kultivované v komerčnom riedidle. Z týchto údajov možno skonštatovať, že na dlhodobjšie uskladňovanie ejakulátu je vhodné používať komerčne dostupné riedidlá.

LITERATÚRA

Akçay E., Varisli Ö., Tekin N. (2006): Fertilizing ability of turkey semen diluted with simple sugar-based extenders after cooled storage. EPC 2006 - XII European Poultry Conference. Verona : World Poultry Science Association.

Donoghue A. M., Wishart G. J. (2000): Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62(4): 213-232.

Douard V., Hermier D., Blesbois E. (2000): Changes in turkey semen lipids during liquid *in vitro* storage. *Biology of Reproduction*, 63(5): 1450-1456.

Dumpala P. R., Parker H. M., McDaniel C. D. (2006): The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *International Journal of Poultry Science*, 5(9): 838-845.

Giesen A. F., Sexton T. J. (1983): Beltsville poultry semen extender. 9. Effect of storage temperature on turkey semen held eighteen hours. *Poultry Science*, 62(7): 1305-1311.

Hocking, P. M. 2009. *Biology of Breeding Poultry*. Edinburgh : CABI, 2009. 464 s. ISBN 978-1-84593-375-3.

Hybrid Turkeys: Semen Quality. www.hybridturkeys.com

Kotłowska M., Dietrich G., Wojtczak M., Karol H., Ciereszko A. (2006): Effect of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology* 67(2): 276-286.

Maxwell W. M., Stojanov T. (1996): Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(6): 1013–1020.

Morrell J. M., Persson B., Tjellström H., Laessker A., Nilsson H., Danilova M., Holmes P. V. (2005): Effect of semen extender and density gradient centrifugation on the motility and fertility of turkey spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(9): 522-525.

Thurston R. J. (1995): Storage of poultry semen above freezing for twenty-four to forty-eight hours. In Bakst, M.R. and Wishart, G.J. (eds) *Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. The Poultry Science Association, Savoy, Illinois, s. 107–122.