

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Faktory ovlivňující přežitelnost spermií po
rozmrazení inseminační dávky býků**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Miriam Lachmanová

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Faktory ovlivňující přežitelnost spermií po rozmrazení inseminační dávky býků" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Luděkovi Stádníkovi, Ph.D. za možnost zpracování velmi zajímavého tématu v oblasti reprodukce skotu. Také bych chtěla poděkovat Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za laskavou pomoc s vedením práce, analýzou laboratorních vzorků a statistickým zpracováním získaných dat. Děkuji také své rodině za pomoc a morální podporu v průběhu mého studia.

Faktory ovlivňující přežitelnost spermií po rozmrazení inseminační dávky býků

Souhrn

Cílem práce bylo určit vliv a vzájemný vztah mezi vnějšími faktory (klimatické podmínky, technologie ustájení, výživa zvířat, frekvence odběru, manipulace s ejakulátem) a vnitřními podmínkami (plemeno, genotyp, individualita zvířete, věk zvířete).

Hypotézou byl předpoklad, že nepříznivé klimatické podmínky negativně ovlivňují aktuální, respektive budoucí kvalitu čerstvého ejakulátu. Součástí vyhodnocení byl vliv tlaku vzduchu, relativní vlhkosti vzduchu a termínová teplota v 7:00 h.

Našeho experimentu se zúčastnili 4 býci různých plemen i věku, z jedné inseminační stanice. K výrobě inseminačních dávek bylo použito pouze sperma splňující daná kritéria. Celkem bylo pro pokus použito 20 vzorků ejakulátů od každého býka. K ředění byla použita 4 komerčně vyráběná ředidla, AndroMed®, Bioxcell®, Optidyl® a Triladyl®. Vyrobené inseminační dávky byly uchovávány v kontejnerech s tekutým dusíkem a rozmrazovány standardním způsobem ($38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sec). Všechny vzorky byly hodnoceny termodynamickým testem přežitelnosti spermií v čase 0 – 120 min ($t_0 - t_{120}$). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu SAS 9.3.

Výsledky prokázaly vliv individuality býka, ředidla, pořadí skoku a vliv vybraných klimatických podmínek jako důležitý faktor. Nejlepších výsledků dosáhli Optidyl (51,68 % aktivních spermií v čase t_0 , 46,91 % aktivních spermií v čase t_{30}) a AndroMed (49,23 % aktivních spermií v čase t_0 , 46,41 % aktivních spermií v čase t_{30}). Jako nejméně vhodné ředidlo byl vyhodnocen Bioxcell (44,00 % aktivních spermií v čase t_0 , 39,92 % aktivních spermií v čase t_{30}). Na konci termodynamického testu (t_{120}) nejlepších výsledků dosáhl AndroMed (25,29 % aktivních spermií). S rostoucím časem hodnoty klesaly, nezávisle na skocích, ředidlech a býcích.

Nejpozitivnější vliv na množství ejakulátu (5,99 g) byl prokázán u relativní vlhkosti vzduchu v rozmezí (76,05 – 84,72 %). Vliv tlaku vzduchu ($<972,49\text{ hPa}$) na aktivitu spermií (80,84 %) byl také průkazný. Rozdíl oproti ostatním skupinám byl průkazný ($P < 0,01$).

Klíčová slova: Býk, reprodukce, ejakulát, inseminační dávka, ředidlo, konzervace, mrazení, přežitelnost spermií, hodnocení ejakulátu, kvalita ejakulátu

Factors affecting sperm survival after thawing of bulls' AI doses

Summary

The aim of my work was determine the influence and relationship between the external factors (like climatic conditions, housing technology, frequency of collection or handling with ejaculate) and the intrinsic factors (e.g. breed, genotype or age and individuality of the animal).

The main hypothesis of my work analyzes the climatic condition and their effects on the quality of the ejaculate. Especially the high temperature has negative effects on the recent ejaculate. This hypothesis can't be demonstrated because of unfavourable climatic conditions – samples were collected in the colder periods of the year. Important parts of experiment were pressure, relative humidity and term temperature at 7:00 AM.

We worked with four bulls (different ages and different breeds) from one semen collection centre. For the production of semen doses (or insemination doses) we used only semen meeting the conditions. The experiment used twenty samples from each bull. To the dilution were used four commercially produced diluents - AndroMed®, Bioxcell®, Optidyl® and Triladyl®. Insemination doses were storage in the containers with the liquid nitrogen and after that they were de-frosted by the standard way ($38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sec). All of these samples were evaluated by the thermodynamic sperm survival test in time from 0 – 120 minutes. Results were statistically evaluated in program SAS 9.3.

Results demonstrated that the individuality of bull, diluents, order of jump and climatic conditions are important factors. The best results were achieved by Optidyl (there were 51, 68 % active sperm in time t0 and 46, 91% active sperm in time t30) and AndroMed (49, 23 % active sperm in time t0 and 46, 41% active sperm in time t 30). Bioxcell (44, 00% active sperm in time t0 and 39, 92 % active sperm in time t30) was evaluated as the least acceptable diluent. In end of the thermodynamic test was AndroMed the best one (25, 29 % active sperm in time t120). With increasing time values decreased – independently on diluents, bulls or jumps.

Relative humidity between 76, 05 and 84, 72 % has the most positive effect on the amount of the ejaculate. Influence of the air pressure (<972, 49 hPa) on the activity of sperm was conclusive too. The difference compared to the other groups was significant ($P < 0.01$).

Keywords: bull, reproduction, ejaculate, insemination dose, diluents, conservation, refrigeration, survivability of sperm, evaluation of the ejaculate, quality of the ejaculate

OBSAH

1. ÚVOD	12
2. CÍL PRÁCE	13
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	14
3.1. Faktory ovlivňující plodnost býků	14
3.1.1. Činitelé vnitřního prostředí	14
3.1.1.1. Plemeno.....	14
3.1.1.2. Genotyp.....	15
3.1.1.3. Individualita	16
3.1.1.4. Věk zvířat.....	17
3.1.2. Činitelé vnějšího prostředí	18
3.1.2.4. Klimatické podmínky	18
3.1.2.5. Technologie ustájení.....	20
3.1.2.6. Výživa zvířat	21
3.1.2.7. Frekvence odběru, manipulace.....	22
3.2. Odběr ejakulátu	22
3.3. Hodnocení ejakulátu	24
3.4. Ředění ejakulátu	25
3.4.1. Složení ředidla.....	26
3.5. Konzervace býčího ejakulátu	29
3.5.1. Krátkodobá konzervace	29
3.5.2. Dlouhodobá konzervace - kryokonzervace	30
3.6. Uchovávání a manipulace s inseminačními dávkami	31
3.6.1. Porušení oplozovací schopnosti inseminační dávky	32
4. METODIKA A POUŽITÝ MATERIÁL	34
4.1. Odebírání býci	34

4.2. Použitá ředidla	34
4.3. Meteorologická data	35
4.4. Odběr a zpracování ejakulátu.....	35
4.5. Termodynamický test	36
4.6. Statistické zpracování výsledků	37
4.6.1. Modelová rovnice pro hodnocení základních parametrů nativního ejakulátu.....	37
4.6.2. Modelová rovnice pro hodnocení inseminačních dávek při termodynamickém testu.....	38
4.7. Statistická průkaznost	39
5. VÝSLEDKY.....	40
5.1. Základní statistické charakteristiky	40
5.2. Korelační analýza	42
5.3. Výsledky procedury MIXED pro vyhodnocení nativního ejakulátu	46
5.4. Výsledky vlivu býka, pořadí skoku, relativní vlhkosti vzduchu a tlaku vzduchu na množství ejakulátu, koncentraci spermií v ejakulátu a aktivitu spermií..	47
5.4.1. Vliv býka	47
5.4.2. Vliv pořadí skoku.....	48
5.4.3. Vliv relativní vlhkosti vzduchu.....	48
5.4.4. Vliv tlaku vzduchu	49
5.5. Výsledky procedury MIXED pro hodnocení zmrazeného/rozmrazeného ejakulátu.....	51
5.6. Vliv proměnných hodnot – býka, skoku a ředidla na aktivitu spermií v průběhu termodynamického testu přežitelnosti spermií	52
5.6.1. Vliv býka	52
5.6.2. Vliv skoku.....	52
5.6.3. Vliv ředidla	53

6. DISKUZE	54
6.1. Základní statistické charakteristiky hodnocených ukazatelů	54
6.2. Korelační analýza	55
6.3. Kvalitativní a kvantitativní vlivy působící na nativní ejakulát býků	56
6.4. Vliv býka, skoku a ředidla na aktivitu spermií v čase 0 - 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií	57
7. ZÁVĚR	60
8. SEZNAM LITERATURY	63

1. ÚVOD

Genetický pokrok v oblasti chovu skotu, zejména v odvětví produkce mléka, je založen na dvou procesech, a sice využití býků s vysokou genetickou hodnotou a selektivním odchovu telat s vysokou chovatelskou hodnotou. Umělá inseminace je výkonným nástrojem moderních biotechnologií 21. století, hlavním prostředkem pro rychlé šíření cenného genetického materiálu a způsob volby pro chovatele skotu na celém světě ke zlepšení genetické kvality a zisku v jejich chovu.

Jedním z nejdůležitějších faktorů ekonomiky chovu hospodářských zvířat je nerušený průběh pohlavních funkcí a periodická a pravidelná plodnost samců a samic. Snahou chovatele je dosáhnout v podmínkách chovu efektivní reprodukce hospodářských zvířat umělým zasahováním do rytmu jejich pohlavního života, nejvíce umělou inseminací.

Správně zrealizovaná inseminace hraje velice důležitou roli v zabřezávání, neméně důležitá je správná a precizní příprava inseminační dávky. Výsledek oplození a počet živých a oplození schopných spermií určuje vhodná technika rozmrazení inseminační dávky.

I za nejlepších podmínek je inseminace ovlivněna velmi krátkou životností spermií. Bez použití vhodných technologií ke zpracování je životaschopnost a oplození schopnost nativního ejakulátu skotu omezena na několik hodin. I když můžeme prodloužit životaschopnost spermií na dobu neurčitou prostřednictvím kryokonzervace, zmrazení a následné rozmrazení spermií zvyšuje riziko poškození a snížení fertility spermií, oproti hodnotám nativního ejakulátu.

Faktory, které ovlivňují plodnost hospodářských zvířat, tvoří složitý komplex vzájemně na sebe působících činitelů. Lze sem zahrnout klimatické podmínky stáje, roční období, technologie a management chovu, sociální hierarchii ve stádě, plemeno, věk, výživu a mnoho dalších.

Většina inseminačních dávek pochází ze zahraničních chovů. V českých chovech je snaha o rozvoj biotechnologických metod, což znamená příležitosti pro podstatné zvýšení výroby a použití zmrazeného spermatu. Pro splnění tohoto požadavku musí průmysl umělé inseminace znát veškeré faktory, které ovlivňují produkci spermií a kvalitu semene.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je detekovat významnost vztahu mezi vlivem vnějších podmínek (klimatické podmínky, technologie ustájení, výživa zvířat, frekvence odběru, manipulace s ejakulátem) a vnitřních faktorů (plemeno, genotyp, individualita zvířete, věk zvířete).

Hlavním tématem práce je zhodnotit vliv klimatických podmínek a kvalitou nativního ejakulátu, respektive inseminačních dávek plemenných býků. Tento vliv byl vyjádřený přežitelností spermií v průběhu tepelného termodynamického testu.

Hypotézou je předpoklad, že nepříznivé klimatické podmínky, především vysoká teplota vzduchu, negativně ovlivňuje aktuální, respektive budoucí kvalitu čerstvého ejakulátu býků a tím i přežitelnost spermií po rozmrazení inseminační dávky.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

Býci jsou používáni buď k přirozené plemenitbě, nebo jako dárci spermatu pro použití v umělé inseminaci. V případě přirozeného páření může jeden býk obstarávat stádo 60 a více krav. Na druhé straně, při využití býka pro umělou inseminaci je z každého ejakulátu vyroben velký počet inseminačních dávek (BRONSON, 1989).

Proto plodnost a reprodukční schopnost individuálního býka je rozhodujícím faktorem pro stanovení reprodukční výkonnosti krav. Vysoká zásoba kvalitních a zdravých spermií, stejně jako sexuální touha - libido, jsou nezbytné pro ejakulaci spermií do skutečné nebo umělé vagíny (HAFEZ a HAFEZ, 2006).

Bohužel plodnost býků používaných pro přirozenou plemenitbu není zdaleka tak vyšetřována, jako plodnost samic určených k umělé inseminaci, a to může vést k vážnému a nákladnému zpoždění při objevení problémů s plodností (BALL a PETERS, 2004).

Literární rešerše pojednává o normální býčí reprodukční funkci, zejména o vnitřních a vnějších vlivech působících na ejakulát. Dále pojednává o manipulaci a zpracování spermatu (poněvadž všechny tyto postupy mohou zásadně ovlivnit kvalitu a oplození schopnost spermií) od sběru až po oplodnění, včetně možných úskalí, které mohou snížit výslednou plodnost ejakulátu.

3.1. Faktory ovlivňující plodnost býků

Faktory, které mají vliv na reprodukci u zvířat, jsou klasifikovány jako vnitřní a vnější. Následující činitele jsou řazeny mezi faktory vnitřní – plemeno, genotyp, individualita a věk zvířete. Klimatické podmínky, technologie ustájení, výživa zvířat, frekvence odběru spermatu a manipulace s ním, jsou faktory vnější (BRONSON, 1989).

3.1.1. Činitelé vnitřního prostředí

3.1.1.1. Plemeno

Plemeno je populace hospodářských zvířat stejného druhu a fylogenetického původu s charakteristickými znaky a vlastnostmi, které se za nezměněných podmínek přenášejí na potomstvo. V současné době je u skotu několik set plemen, která se od sebe více, či méně

odlišují. Stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat, nová plemena stále vznikají i zanikají (KLIMENT, 1983).

S domestikací, umělým výběrem a se změnou podmínek chovu však dochází postupně i ke změně tvarových a užitkových vlastností plemene. Snahou je posílení jednotlivých žádoucích vlastností zvířat. Činitelé, kteří mají podstatný vliv na vznik a utváření plemene, jsou například výživa, fylogenetický původ a přírodní výběr. Dále také podmínky spojené s rozvojem nových technologií, technikou chovu, plemenářskou prací a ekonomikou chovu (KLIMENT, 1983).

Stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat, lze plemena skotu dělit dle mnoha hledisek. Zejména podle fylogenetického původu, podle země původu a geografického rozšíření, užitkovosti a stupně prošlechtění (SAMBRAUS, 2006).

Často jsou pozorovány rozdíly v sexuální výkonnosti u jednotlivých plemen a linií skotu. Samci mléčných plemen skotu jsou obecně aktivnější než samci masných plemen (HAFEZ a HAFEZ, 2006).

Průměrné rozdíly mezi plemeny jsou způsobeny účinkem různých genů přítomných v různé frekvenci u jednotlivých plemen. Plemena, která byla izolována od sebe navzájem, a to buď rodokmenovou překážkou, vlivem lidské šlechtitelské práce nebo geografickou bariérou, se rozcházejí ve frekvenci genů, které ovlivňují expresi mnoha vlastností (NEELY et al., 1982).

3.1.1.2. Genotyp

Genotypem označujeme soubor všech genetických informací organismu. Genotyp velmi závisí na interakcích prostředí. Projevuje se, když genotypy (jednotlivci, odrůdy, plemena, atd.) ukazují rozdílné fenotypové odpovědi na jedno nebo více prostředí. Vliv prostředí na genotyp v interakci s velmi odlišnými genotypy a prostředími je dobře známý a zdokumentovaný v oboru jak rostlin, tak živočichů. Studie genotypu a environmentálních interakcí jsou stále více důležité, protože genotypy hospodářských zvířat jsou nyní ovlivňovány nejrůznějšími prostředími (BRYANT et al., 2004).

Kromě toho, DOMINIK et al. (2001) předpokládají, že existují různé genetické vztahy mezi různými vlastnostmi v celém prostředí.

CASTILLO - JUAREZ et al. (2002) uvádí, že rozdíly v řízení mezi dvěma prostředími způsobují úpravu genetických expresí sledovaných vlastností. Problémem zůstává, jak

porozumět a předvídat, do jaké míry zdánlivě malé genetické změny životního prostředí můžou vyvolat interakci biologického a ekonomického významu.

Vnitřní studium interakcí je předmětem výzkumu, které genotypy se vyrovnají s problémy životního prostředí a změnou. FRISCH (1981) naznačuje, že výběr reakce na růst v náročném prostředí není v důsledku zlepšení vlastního genetického potenciálu, ale vzhledem ke zvýšené odolnosti jen vůči environmentálnímu stresu. Zatímco ORDONEZ (1990) uvádí, že šlechtění pro zvýšení výroby (například v tropických podmínkách) bude jen nepřímý výběr pro přizpůsobivost.

3.1.1.3. Individualita

Neméně důležitým faktorem je také individualita, se kterou úzce souvisí temperament. Temperament je charakterizován jako stupeň dráždivosti a reaktivnosti nervové soustavy na základě vzruchu a útlumu. Zakládá schopnost zvířete vnímat rozdílné podněty vnějšího prostředí a adaptovat se bez neúměrných reakcí. Z definice temperamentu, společně s vlivem endokrinního systému vyplývá také poměrně úzký vztah ke komplexi (MAJZLÍK, 2000).

Rozlišujeme čtyři základní typy temperamentu. Živý temperament, jinak také nazývaný sangvinik je klidné zvíře, které přiměřeně reaguje na podněty. Podráždění a útlum je v rovnováze, reflexy se utvářejí rychle a přetrvávají, zvíře se snadno učí a přizpůsobí. Zvíře s živým temperamentem je optimální typ pro využití v umělé inseminaci (MAJZLÍK, 2000).

U cholerika se pak jedná o temperament ohnivý, který je protipólem temperamentu živého. Reakce na podnět bývá prudší, zvíře je poměrně lekávé, často i agresivní, hůře ovladatelné. U těchto zvířat je nízký práh dráždivosti, která převládá. Zvíře je prudké, nervózní, rychle reaguje, je dráždivé a citlivé na všechny podněty. Jsou hůře ovladatelná až umíněná. Při větší zátěži podléhají neurózám. Tato zvířata jsou pro využití v reprodukčních biotechnologiích nevhodná (MAJZLÍK, 2000).

Zvíře s klidným flegmatickým temperamentem má procesy podráždění a útlumu silné a v rovnováze, ale s pomalým průběhem. Reflexy a reakce jsou pozvolné, tvoří se pomalu, ale na druhou stranu dlouho přetrvávají. Tento typ je častý u mohutných a silných zvířat, například u masných plemen skotu (MAJZLÍK, 2000).

Temperament apatický, častěji nazývaný melancholický je extrémem klidného temperamentu, procesy podráždění a útlumu jsou slabé, s převládající pasivitou a pomalou reakcí. Reflexy se tvoří pomalu, zvíře je celkově zpomalené, málo učenlivé, hůře ovladatelné a přizpůsobivé. S melancholickým temperamentem se lze nejčastěji setkat u kastrátů – vůl, valach (MAJZLÍK, 2000).

Temperament je velmi důležitý pro využívání zvířete, spolurozhoduje o charakteru zvířete, schopnosti k učení a výcviku a má jak přímý vztah k využití zvířete (odběr ejakulátu u býka), tak nepřímý (libido sexualis, chování býka v odběrové místnosti, ochota k páření). Individualita a temperament jsou jednak výsledkem dědičného založení (vazbou na druh, plemeno a pohlaví zvířete), ale jsou též ovlivněny podmínkami prostředí odchovu a zacházením ze strany zootechnika či ošetřovatele (MAJZLÍK, 2000).

3.1.1.4. Věk zvířat

Pohlavní funkce můžou probíhat až po dostavení se pohlavní dospělosti zvířat, když dojde k synchronizaci citlivosti gonád a regulačních mechanismů a trvají jen určité období života zvířat (ŠMERHA et al., 1980).

Většina světových studií uvádí, že věk chovných býků je velmi důležitý pro vlastnosti ejakulátu. Obecně platí, že produkce a kvalita spermatu se zvyšuje s věkem býka (STALHAMMAR et al., 1989; MATHEVON et al., 1998; BRITO et al., 2002).

Zvýšení objemu ejakulátu s věkem býka je v souladu s předchozími studiemi (EVERETT a BEAN, 1982; TAYLOR et al., 1985; MATHEVON et al., 1998; BRITO et al., 2002). TAYLOR et al. (1985) pozorovali nárůst objemu ejakulátu až do 7 let věku chovných samců. Poté objem ejakulátu zůstal konstantní až do 10 let věku býků. To je v souladu se zjištěními BRITO et al. (2002). Nejvyšší objemy ejakulátů byly zjištěny u býků starších 9 let, ale tyto se nijak výrazně nelišily od ejakulátu býků ve věku 5 - 9 let. Jiní autoři (EVERETT a BEAN, 1982; MATHEVON et al., 1998) pozorovali nárůst až od věku 4 - 5 let.

Výsledky celkového počtu spermií v ejakulátu se řídily objemem ejakulátu, což je v souladu se studiemi dříve publikovanými (EVERETT a BEAN, 1982; TAYLOR et al., 1985; MATHEVON et al., 1998; BRITO et al., 2002).

TAYLOR et al. (1985), MATHEVON et al. (1998) pozorovali zvýšení koncentrace spermií až do 22 měsíce věku. V jiné studii (BRITO et al., 2002) stáří býka nevykazovalo

žádný účinek na koncentraci spermií. Výsledky pro pohyblivost spermií, na rozdíl od zjištění jiných studií (STALHAMMAR et al., 1989; MAKULSKA et al., 1993), vykazovaly větší pohyblivost s věkem býka.

Mnoho autorů uvádí, že se stoupajícím věkem a fyziologickým stárnutím organismu nastává útlum pohlavních činností. Dalo by se předpokládat, že věk zvířat může být zodpovědný za drobné defekty spermií v inseminační dávce. Avšak očekávaná snížená pohyblivost spermií se s věkem nemění (EVERETT a BEAN, 1982; DIARRA et al., 1997; MATHEVON et al., 1998), spermie jsou bez závažnějších vad (CHANDLER et al., 1985), nebo se vady naopak výrazně snižují s věkem (SODERQUIST et al., 1996).

Období senility z hlediska hospodářského využití zvířat neovlivňuje efektivnost reprodukce, protože zvířata se z chovu vyřazují dřív, než dosáhnou zmíněného věku (ŠMERHA et al., 1980).

3.1.2. Činitelé vnějšího prostředí

Do podmínek vnějšího prostředí lze zařadit klimatické podmínky, roční období, technologie ustájení, ošetřování, způsob odchovu, sociální hierarchii ve stádě, odběr ejakulátu a manipulaci s ním (BRITO et al., 2002).

Jednotlivé faktory vnějšího prostředí působí na organismus zvířete jako celek a vyvolávají určitou reakci. Reakce zvířete je odvozena od tělesné konstituce, dědičného založení, zdravotního stavu, užitkovosti a stupni fyzické kondice. Účinky vlivů vnějšího prostředí se projevují prostřednictvím exteroceptorů smyslových orgánů, kterými dochází k dráždění kůry velkého mozku a hypotalamo - hypofyzárního systému, který řídí průběh a zajišťuje správný chod pohlavních funkcí (LOUDA et al., 2007).

3.1.2.4. Klimatické podmínky

Významným faktorem v souboru činitelů, které působí na reprodukci a plodnost, jsou klimatické vlivy. Vyplývá tak z různorodosti činitelů, kterými jsou světlo, teplota, tlak vzduchu a roční období (KLIMENT et al., 1983).

Světová populace skotu se nachází v různých klimatických pásmech. Vliv životního prostředí je vázáný na určité klimatické podmínky, které byly intenzivně zkoumány jak u

různých plemen, tak v různých zemích. V mnoha studiích roční období významně ovlivnilo produkci spermatu (MATHEVON et al., 1998), zatímco další studie a vyšetření neodhalily prokazatelný efekt ročního období (BRITO et al., 2002).

Sezónní vlivy jsou nejen výsledkem různých faktorů, jako je teplota, vlhkost, délka dne, složení krmiva, ale i řízení chovu. V důsledku toho, byly významné sezónní vlivy na produkci spermatu částečně rozporuplné. Zatímco, například STALHAMMAR et al. (1989) pozorovali nejvyšší koncentrace spermií a celkový počet spermií v letním období, MATHEVON et al. (1998) zjistili vyšší hodnoty v zimě a na jaře.

Optimální okolní teplota pro produkci spermatu, byla stanovena přibližně v rozmezí 15 až 20 °C (TAYLOR et al., 1985).

Nejen teplota v den odběru, ale také v průběhu zrání spermií v nadvarletí nebo v průběhu spermatogeneze (do asi 70 dní před odběrem) má vliv na produkci spermatu (STEPHAN et al., 1971; MEYERHOEFFER et al., 1985; DORST, 1991). Nicméně, byly zjištěny odchylky u jednotlivých plemen býků, což naznačuje rozdíly v jednotlivých tepelných tolerancích.

Reprodukce skotu může být ovlivněna tepelným stresem. Při vysoké teplotě nebo vlhkosti, může dojít k nefunkčnosti termoregulačních mechanismů a následkem toho ke zvýšení vnitřní teploty nad fyziologické meze (CHEMINEAU, 1994).

Tepelný stres může snížit počet úspěšných zabřeznutí a zvýšení embryonální mortality u krav (WOLFENSON et al, 2000), a snížit kvalitu semene býků (JOHNSTON et al., 1963; SKINNER a LOUW, 1966).

Během období horka v tropických oblastech dochází ke snížené produkci spermií a pokles kvality semene, nicméně, sezónní změny nelze přičítat pouze vyšší okolní teplotě (IGBOELI a RAKHA, 1971; FIELDS et al., 1979; KUMI - DIAKA et al., 1981; REKWOT et al., 1987).

Z hlediska vlivu klimatických podmínek na hospodářská zvířata je známo, že vysoké a nízké okolní teploty mohou být zodpovědné za snížení plodnosti. Teplota šourku je regulována nezávisle na tělesné teplotě těla pomocí termoreceptorů v šourku a efektorů ve formě aktivity svalů *tunica dartos*. Nicméně tyto efektorové mechanismy jsou nedostatečné k udržení teploty šourku při extrémních teplotách, nebo extrémních mrazech. Rychle tak může dojít k znehodnocení spermatu a tím i ke snížení plodnosti teplem nebo chladem (GORDON, 2004).

Vlivem extrémně vysokých anebo nízkých teplot se mohou narušit fyziologické funkce, protože termoregulační mechanismy nejsou už schopné přizpůsobit organismus takovým změnám (KLIMENT et al., 1983). Těmto tvrzením však odporuje jiná studie, ve které bylo prokázáno, že extrémní teploty (až - 24 °C) měly pouze malý vliv na produkci spermií. Došlo pouze k nepatrnému snížení objemu spermatu a malému úbytku celkového počtu spermií, ve srovnání s optimální teplotou 16 - 21 °C (TAYLOR et al., 1985).

EVERETT a BEAN (1982) uvádějí, že nebyly zjištěny žádné významné účinky okolní teploty nebo vlhkosti na produkci spermií a kvalitu semene býků plemene Holštýn v mírném pásmu. Nicméně, MATHEVON et al. (1998) uvádí, že Holštýnští býci produkují více spermií (vyšší koncentrace spermií a celkový počet spermií) s větší pohyblivostí v zimě a na jaře.

Výkyvy plodnosti lze pozorovat i v souvislosti s ročním obdobím (roční fotoperiodismus charakterizovaný kvalitativními změnami v složení světelného spektra). Prodlužování či zkracování doby slunečního svitu indikuje kvalitativní rozdíly v reprodukční sféře, což se projevuje rozdílnou intenzitou pohlavní aktivity v průběhu roku. Období změn spektra v prospěch UV záření (jaro a začátek léta) a období jeho ubývání (konec léta, podzim) stimuluje aktivitu štítné žlázy, která vyprodukuje optimální množství tyroxinu pro aktivaci gonadotropních funkcí adenohipofýzy. Naopak, nedostatek tyroxinu zpomaluje metabolické děje a inhibuje gonadotropní funkce hypofýzy s následnou sexuální hypofunkcí (KLIMENT et al., 1983).

3.1.2.5. Technologie ustájení

Lze rozlišit několik typů ustájení: volné či vazné, popř. vazné ustájení s pastvou. Záleží také na konstrukci vrchní stavby a střechy, tzn. množství světla v ustajovacím zařízení. Z hlediska reprodukce dosahuje lepší úrovně volné, popřípadě pastevní ustájení. Lze pozorovat intenzivnější příznaky říje, samci mají mnohdy kvalitnější ejakulát s vysokým podílem oplození schopných spermií, avšak identifikace zvířat může být ztížena (ŘÍHA, 1996).

Nepříznivé mikroklimatické podmínky ustajovacích prostor, především relativní vlhkost a teplota prostorů, ale také výskyt vysokého obsahu čpavku a silné proudění vzduchu, mohou též negativně ovlivňovat reprodukční funkce (GAMČÍK et al., 1980).

3.1.2.6. Výživa zvířat

Účinky nutričního omezení na plodnost jsou pozoruhodné a markantní, více však u samic, než u samců. Obecně platí, že nejdůležitějším konečným faktorem je dostupnost potravin a jeho vliv na energetickou bilanci, neboť reprodukce je energeticky vysoce náročná (BRONSON, 1989).

Za jedny z nejdůležitějších složek výživy s vlivem na reprodukci jsou označovány bílkoviny a aminokyseliny (KLIMENT et al., 1983).

Výživové nedostatky mohou oddálit nástup puberty a negativně ovlivnit tvorbu a vlastnosti samčího spermatu. Mladé a rostoucí zvíře je mnohem náchylnější na nutriční stres než starší zvíře. Kromě toho, nevyhovující nutriční podmínky ovlivňují více endokrinní funkci varlete, než samotnou spermatogenezi. Mezi běžné výživové faktory patří počet přijatých kalorií v krmivu, množství bílkovin a živin. Velkou roli hraje nedostatek vitamínů, minerálních látek, nebo zvýšený příjem toxických látek (HAFEZ a HAFEZ, 2006).

Poruchy reprodukce mají obvykle blízký vztah k pochybení ve výživě, chovatelsky nejvýznamnějším syndromem je stájová sterilita s vážnými ekonomickými dopady pro chovatele. Jako kontrola výživného stavu slouží metabolická vyšetření (ŘÍHA, 1996).

Doba potřebná k průběhu spermatogeneze u býka je 54 dnů (SAUNDERS, 2003), a proto je doporučení dodávat býkům přiměřenou výživu, bez jakýchkoliv deficitů v dodávkách určitých živin během 2 měsíců před plánovaným zařazením do chovu.

KENDALL et al. (2000) se zabývali účinky minerálů (zinek, kobalt, selen) na motilitu spermií, procento živých spermií a membránovou integritu. Tyto účinky, které se projevovaly také zvýšenou koncentrací glutathionu peroxidázy v semenné plazmě, byly přičítány selenu na základě toho, že doposud nebyl prokázán vliv zinku na semennou plasmu, stejně jako vliv kobaltu na samčí plodnost (ANDERSON et al., 1996).

Stejně tak může různá kvalita krmiva ovlivnit kvalitu semene až po několik týdnů (PETER, 1991).

Zajímavé je, že společně s věkem dochází u býků k významnému snížení koncentrací polynenasycených mastných kyselin (kyselina arachnidová, kyselina dekosahexanová), společně s úbytkem antioxidantních enzymů v semenné plasmě (KELSO et al., 1997), což podnítilo obchodní zájem v používání potravinových doplňků na bázi rybího tuku a větší procento začleňování antioxidantů a vitamínu E ke zvýšení plodnosti. Tyto mastné kyseliny

jsou důležité pro integritu membrány spermií, pohyblivosti a životnosti spermií (ROOKE et al., 2001).

3.1.2.7. Frekvence odběru, manipulace

Bylo zjištěno, že doba sexuální přípravy býka může mít významný vliv na objem ejakulátu, počet vyrobených dávek z odebraného ejakulátu a motility spermií po rozmrazení (KOMISURD a ANDERSEN, 1996). To může vysvětlit proč vodící technik býka a technik odebírající semeno mají zásadní vliv na jeho kvalitu a množství, protože jsou zodpovědní za sexuální stimulaci a přípravu (MATHEVON et al., 1998).

Zvýšení objemu ejakulátu s rostoucím intervalem odběru je v souladu s několika studii (EVERETT et al., 1978; EVERETT a BEAN, 1982; MATHEVON et al., 1998). Autoři také pozorovali vyšší koncentrace spermií a výrazný nárůst celkového počtu spermií v ejakulátu s delšími intervaly mezi jednotlivými odběry.

EVERETT et al. (1978) a MATHEVON et al. (1998) uvádějí, že optimální intervaly odběru jsou 3 - 5 dnů pro maximální dosažitelné procento pohyblivých spermií.

Intenzita využívání býka, jinak také nazývaná exploatace, se liší nejenom věkem a kondicí zvířete, ale i zdravotním stavem. Nadměrným využíváním býka se sníží libido, objem i koncentrace ejakulátu, zhorší se přežitelnost a rezistence spermií. Oproti tomu nedostatečným využíváním býka, spermie setrvávají příliš dlouhou dobu v nadvarleti a tím dochází k jejich degradaci a snižování rezistence (HOFÍREK et al., 2009).

3.2. Odběr ejakulátu

Rutiní inseminační odběr semene býka začíná poté, co se osvědčil a splnil veškeré výběrové postupy a testy. U masných plemen se obvykle začíná s produkcí spermatu pro komerční využití kolem dvou let věku (LOUDA et al., 2001).

Při odběru je nutné získat celý objem ejakulátu s co nejmenším biologickým znečištěním, neporušit životnost, morfologii a oplození schopnost spermií, zabezpečit zdravotní stav a plodnost plemeníka před vlivem nepříznivých faktorů. Přerušením přirozené plemenitby, snížit možnost šíření pohlavních chorob. V průběhu let byly vyvinuty nejlepší postupy a technologie, které se přizpůsobují individualitě každého plemeníka, s cílem

maximalizovat objem odebraného ejakulátu nejvyšší kvality a s minimální kontaminací. Tyto metody odběru fungují po desetiletí a nevyžadují již zásadní změny (VĚŽNÍK et al., 2004).

Klíčem k maximalizaci produkce spermií je přiměřená sexuální stimulace, které je dosaženo optimální teplotou a tlakem v umělé vagíně, společně s vhodnou frekvencí odběru na základě rychlosti produkce spermií ve varlatech (PETELÍKOVÁ et al., 1998).

V historii se sperma odebíralo ručně z pochvy samice, později se k zachycení používala suchá mořská houba, avšak při všech těchto postupech, nebylo možné zajistit kvalitativní a hygienické podmínky (KLIMENT et al., 1983).

Většina odběrů ejakulátů se provádí tím, že se býk přiměje ejakulovat do umělé vagíny. Ta je konstruována tak, aby simulovala fyziologické podmínky pochvy samice (tlak, teplotu, kluzkost). Konstrukce umělé pochvy se mírně změnila, v průběhu let došlo ke snížení ztráty spermií a eliminace nebezpečí poškození penisu. To pomáhá správné erotizaci každého pleménika, z nichž někteří mají v tomto ohledu velmi přesné preference. V době odběru by měla mít umělá vagina vnitřní teplotu 38 – 40 °C a tlak cca 530 kPa (LOUDA et al., 2001). HOFÍREK et al. (2009) uvádí teplotu 39 – 42 °C. Před samotným odběrem je nutné vymazat umělou vagínu sterilní nespermicidní vazelinou.

Umělá vagina obsahuje syntetický gumový kužel s kanálkem, který odvádí sperma do nádoby na sběr. Izolace kolem zkumavky udržuje správnou teplotu (35 – 38 °C), dokud se semeno nedostane do laboratoře k dalšímu zpracování. Umělá vagina musí být vždy sterilní (LOUDA et al., 2001).

Pokud je býčí sperma odebíráno příliš často, může docházet ke snížení kvality a počtu spermií v ejakulátu. V praxi musí být kompromis mezi maximálním rozsahem výroby a optimálním výnosem při každém odběru. To znamená, že většina býků je odebírána dvakrát týdně po celou dobu jejich produktivního života, který obvykle trvá 5 - 6 let (KLIMENT et al., 1983).

Jedním z nejdůležitějších faktorů úspěšnosti je hygiena prostředí, ve kterém se odběr provádí, samozřejmě i sterilita pomůcek používaných pro odběr, jelikož ovlivňují kvalitu odebraného ejakulátu (HOFÍREK et al., 2009).

Pro vlastní odběr se využívá fantom, či atrapa - klidní býci střídající se po 4 odběrech, což vynahrazuje říjící se pleménici (KLIMENT et al., 1983; LOUDA et al., 2007). Před každým odběrem i po něm se provádí desinfekce a důkladné osušení zádě atrapy. Předkožka odebíraného pleménika musí být také pečlivě omyta vlažnou vodou a osušena buničinou. Při

dostatečném vydráždění se nechá býk skočit a dorazit. Doraz trvá zhruba vteřinu, ale je silný a odběrový technik si musí dát pozor, aby mu býk umělou pochvu nevyrazil z ruky (HOFÍREK et al., 2009).

Kromě odběru do umělé vagíny se zřídka využívá odběr elektroejakulací a odběr pomocí masáže ampulí chámovodu (LOUDA et al., 2001).

Po samotném odběru dochází v laboratoři k posouzení kvality, ve sběrači se ejakulát nařadí a pozvolna se ochlazuje metodou ekvibrace (BOUŠKA et al., 2006).

3.3. Hodnocení ejakulátu

Jakmile je sperma odebráno, začíná nevratný proces stárnutí spermií. Existuje velký počet parametrů používaných k posouzení kvality ejakulátu. Biochemickým měřením a funkčními testy lze hodnotit objem, koncentraci spermií, pohyblivost spermií, podíl živých spermií, podíl abnormálních spermií. Velké rozdíly jsou nejen mezi jednotlivými vzorky odebraného spermatu, ale i mezi býky ve všech těchto parametrech (MOCÉ a GRAHAM, 2008).

Jakmile bylo sperma odebráno, je nutné ho udržovat při teplotě 30 až 35 °C, dokud není vyhodnoceno a připraveno k dalšímu zpracování. První hodnocení kvality spermatu je nutné provést okamžitě po odběru. Hodnotí se koncentrace spermií, konzistence, přítomnost hnisu, či indikace infekce. V této fázi by sperma také mělo být vizuálně kontrolováno na přítomnost kontaminujících látek, jako jsou vlasy, stolice nebo krev. V této fázi může být zjištěna přítomnost moči (LOUDA et al., 2001).

Objem spermatu v ejakulátu je možné měřit pomocí stupnice na zkumavkách ihned po odběru. Nízký objem nemusí hned být důvod k obavám, neboť existují značné rozdíly mezi jednotlivci a mezi plemeny. Objem ejakulátu může být také snížen důsledkem častého odběru (BALL a PETERS, 2004).

Malý vzorek spermatu je umístěn na vyhřáté sklíčko a pozoruje se pod mikroskopem s cílem odhadnout podíl živých spermií, který by neměl klesnout pod 60 %. Jestliže spermie plavou dozadu nebo v kruzích, mohly být poškozeny chladem, vysokou teplotou nebo se může jednat o osmotický šok. Po posouzení čerstvého spermatu se vzorek ředí na sklíčko a

odhaduje se podíl morfologicky abnormálních spermií, který by neměl překročit 20 % (VĚŽNÍK et al., 2004).

Objem spermatu může být důležitý ve vztahu k počtu dávek semene, které mohou být připraveny z jednoho ejakulátu. Hustota spermií má také zřejmý význam pro stanovení počtu inseminačních dávek a fertilizační kapacity spermatu. Posouzení progresivní motility je důležité, protože je možné přibližné vyhodnocení životaschopnosti spermatu. Nicméně, přesné určení poměru živých a mrtvých spermií provádí laboratorní technik pomocí diferenciálního barvení (BALL a PETERS, 2004).

Na jedno z předních míst ve výčtu spermato - analytických metod patří posuzování a kvalitativní hodnocení motility spermií. Současně s motilitou je zkoumána i rychlost pohybu spermií, která je velmi citlivým ukazatelem možné nastupující degenerace ejakulátu. Kolektiv autorů považuje progresivní pohyb spermií za jeden z nejvýznamnějších ukazatelů pro odhad fertilizační schopnosti spermatu. Z funkčního hlediska, je pohyb spermií nutnou podmínkou pro transport a průnik do samičího oocyty (VĚŽNÍK et al., 2004).

Motilita spermií je pravděpodobně jedním z nejvíce využívaných kritérií pro hodnocení nativního i konzervovaného ejakulátu. Ve snaze snížit subjektivní hodnocení pohyblivosti, které do značné míry záleželo na schopnostech pracovníka, a získat co nejobektivnější výsledky, byly vyvinuty CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), přesné automatické systémy analýzy spermií (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997).

3.4. Ředění ejakulátu

Veškeré testy a hodnocení kvality mají za úkol posoudit a vyhodnotit pouze kvalitní sperma, od prvotřídních plemenů. Ejakulát se dále ředí různými ředidly, aby se navodilo vhodné prostředí k uchování a adekvátní přežitelnosti (BOUŠKA a kol., 2006) a také pro získání více inseminačních dávek. Ředěním se vytváří vhodné podmínky pro přežití spermií mimo organismus. Ředidla musí splňovat vhodné fyziologické podmínky prostředí pro spermie, aby se po dlouhou dobu nesnížila jejich oplozovací schopnost a mohla být použita pro větší množství plemenic (KLIMENT et al., 1983).

Ředidlo musí být zdrojem energie pro spermie, splňovat kvalitní puřovací schopnost, obsahovat určité množství elektrolytu. Neméně důležité je zajištění požadovaného

osmotického tlaku a stálého pH (6,4 – 6,8), které bude odpovídat požadavkům býčího spermatu. Je nezbytné, aby ředidlo bylo sterilní, netoxické, jinak nezávadné, a musí být ekonomicky dostupné (LOUDA et al., 2001).

Obecné požadavky na komponenty jednotlivých ředidel jsou iontové nebo neiontové látky pro udržení osmolarity, zdroje lipoproteinů s vysokou molekulovou hmotností materiálu, například žloutek či mléko. Dále glycerol, propan – di – ol, glukóza nebo fruktóza jako zdroj energie a další přísady jako jsou enzymy a antibiotika (VISHWANATH et al., 1996).

Složení ředidel významně ovlivňuje životaschopnost a oplozovací schopnost spermií v inseminační dávce (SIDDIQUE et al., 2006). Většina společností, zabývajících se umělou inseminací na profesionální úrovni, investuje do vývoje a přípravy vlastních ředidel s drobnými úpravami, které vyhovují jejich požadavkům (VISHWANATH et al., 1996).

Jako jedny z prvních typů ředidel byly běžně využívány tělní tekutiny, a to krevní sérum, lymfa, sekret ze sklivce, sekrety semenných váčků, vaječný žloutek a bílek a kravské mléko (LOUDA et al., 2001).

MILOVANOV (1962) uvádí, že dle určitých vlastností se složky ředidla dají rozdělit na tři základní skupiny: Extendor pro navýšení objemu, protektor pro zvětšení objemu společně se zajištěním ochrany a výživy, implementor, který má shodné vlastnosti jako protektor a navíc pozitivně působí na fyziologii samičích pohlavních orgánů a oplození jako takové.

3.4.1. Složení ředidla

Před samotným zmrazením se ejakulát naředí příslušným ředidlem. Mezi základní funkce ředidla lze zařadit zvýšení počtu inseminačních dávek, konzervace spermií v anabióze, ochrana proti chladovému šoku, zvýšení délky oplozovací schopnosti, inhibice a eliminace toxických látek, mikrobů a bakterií, ochrana před zničením nízkými teplotami - kryoprotekce, zvýšení doby uchovatelnosti (BALL a PETERS, 2004).

Základními složkami ředidla jsou **kryoprotektiva**, která chrání spermatické buňky před jejich prasknutím a následným zničením ledovými krystaly, vznikajícími během procesu zmrazování. Kryoprotektiva zvyšují odolnost spermií a jsou obranou proti možnému chladovému šoku. Jedním z nejpoužívanějších kryoprotektiv je vaječný žloutek, kravské mléko, glycerol, či přídavek Tris - hydroxymethyl - aminomethan (BALL a PETERS, 2004).

Pro preciznější a méně složité mikroskopické pozorování, byl ze žloutku vyextrahován cholesterol LDL (lipoprotein s nízkou hustotou), protože má jednodušší chemické složení než žloutek a také je samostatně používán na ředění a zvýšení přežitelnosti spermií (AMIRAT et al., 2004).

Před několika lety došlo k postupnému odstranění celého žloutku, jako jedné složky ředidla, protože zde bylo poměrně velké zdravotní riziko v souvislosti s kontaminací biologickým materiálem (VISHWANATH et al., 1996). Hledají se proto nové vhodné látky, které by ho mohli nahradit, například sojový extrakt lecitin (BOUSSEAU et al., 1998).

Nicméně se opět ukazuje, že některé používané alternativy nejsou tak úspěšné jako původní žloutková, či mléčná ředidla (VAN WAGTENDONK DE LEEUW et al., 2000). TAKAHASHI et al. (2012) považuje za ideální ředidlo standardní kombinaci vaječného žloutku či kravského mléka s glycerolem.

Vhodnost použití kravského mléka jako kryoprotektiva pro ochranu spermií bylo prokázáno už v roce 1951 (THACKER a ALMQUIST, 1951). Kasein obsažený v mléce má ochranný účinek proti ztrátě lipidové membrány (BERGERON et al., 2007).

Kryokonzervace se neobejde bez glycerolu (HOFÍREK et al., 2009), poněvadž glycerol chrání spermie před poškozením (GARNER et al., 1999). RODRIGUEZ et al. (1975) uvádí koncentraci glycerolu 7 – 9% jako ideální pro dlouhodobé zmrazování ejakulátu.

AWAD (2011) testoval záměnu kryoprotektantů s nízkou molekulovou hmotností (etylenglykol, metanol) za glycerol. Pomocí analýzy CASA nezjistil prokazatelný rozdíl v použití metanolu nebo etylenglykolu ke kryokonzervaci.

MOCÉ a GRAHAM (2006) se zabývali studiem a testováním účinku CLC (směs cholesterolu a cyklodextrinů), které přidali do nezředěného nativního ejakulátu. Výsledky prokázaly její kladný vztah ke zvýšení přežitelnosti spermií.

Neméně důležitou a ochrannou složkou jsou **antibiotika**, u kterých bylo zjištěno, že mohou zvyšovat fertilitu ejakulátu při využití pro umělou inseminaci (DE JARNETTE et al., 2004).

Přidávání antibiotik do ředidel má za cíl chránit ejakulát před virovou či bakteriální kontaminací a následným šířením pohlavních chorob. Například bovinní virová diarhoe (BVD-MD, virové onemocnění skotu) může být přenášena během inseminace (BALL a PETERS, 2004).

BOUSSEAU et al. (1998) uvádí, že každé ředidlo má rozdílný obsah antibiotik ve specifickém poměru. Například AndroMed® a Triladyl® obsahují Tylosin, Gentamycin, Spektinomycin a Lincomycin.

AKHTER et al. (2007) se zabývali testováním vlivu antibiotik GTLS (Gentamycin, Tylosin, Linco-spectin) na plodnost býka. Výsledky svého výzkumu porovnali s výsledky tradičně používaných antibiotik SP (streptomycin, penicilin), které dříve zkoumala řada vědců (HUSSAIN et al., 1990; ALI et al., 1994; SANSONE et al., 2000; ANDRABI et al., 2001). V závěru nebyla zjištěna vyšší plodnost při použití GTLS (Gentamycin, Tylosin, Linco-spectin) oproti SP (streptomycin, penicilin).

Konečným produktem metabolismu spermií je kyselina mléčná, která může způsobit snížení hladiny pH. **Pufry** (fosfát, citrát sodný, TRIS), přidávané do ředidla mají za cíl udržovat hladinu pH v rozmezí 6,4-6,8 a zabránit tak aglutinaci spermií (BALL a PETERS, 2004). GLEN et al. (1956) zveřejňuje další organický pufr a to citrát sodný.

SIDDIQUE et al. (2006) ve své studii o vlivu pufru na mrazitelnost ejakulátu uvádějí, že použili ředidla o různé koncentraci TRIS, kyseliny citrónové citrátu sodného, glukosy, fruktosy, laktosy, vaječného žloutku, antibiotik (Penicilinu a Dihydroxystreptomycinu) a glycerolu. Došli k závěru, že nejadekvátnějším ředidlem ke kryokonzervaci je takové, které obsahuje TRIS a citrát sodný v poměru 1 : 1.

Soli vyrovnávají osmotický tlak před mrazením a ochraňují spermatické buňky před poškozením (AMIRAT et al., 2005).

Pro přežití samčích pohlavních buněk mimo prostředí organismu potřebují spermie dostatek **energie**. Do ředidel se za tímto účelem přidávají jednoduché cukry, jako například fruktosa, laktosa nebo kyselina citrónová (BALL a PETERS, 2004; AMIRAT et al., 2005). KLIMENT et al. (1983) popisují jako základní složku ředidel glukózu.

Bi-destilovaná voda má v ředidle funkci nosiče ostatních látek v něm obsažených (SIDDIQUE et al., 2006).

Správně vyrobené ředidlo se otestuje s kapkou spermatu. Sleduje se, zda nedojde ke snížení motility a fertility spermií. Když toto základní vyšetření dopadne dobře, postupným přimícháváním ředícího roztoku se naředí celý ejakulát a opět zkontroluje motilita. Je-li vše v normě, dávka se pomocí automatického stroje naplní do pejet (HOFÍREK a kol., 2009).

3.5. Konzervace býčího ejakulátu

Uchování a zvýšení životaschopnosti a oplozovací schopnosti ejakulátu je primárním cílem konzervace ejakulátu. Dalším cílem je také zvětšením objemu ejakulátu – naředěním, získat co nejvíce inseminačních dávek s minimálním počtem deseti miliónů oplození schopných a aktivních spermií při aktivitě nejméně 30 % (LOUDA et al., 2001).

VISHWANATH et al. (1996) uvádí, že téměř veškeré sperma používané v umělé inseminaci v rozvinutých zemích je zmrazeno, kvůli zachování motility v průběhu skladování a distribuce. Kombinace teploty při manipulaci a při následném mrazení, chemického složení ředidla a hygienické kontroly jsou klíčové faktory, které ovlivňují životnost spermií.

Toho je velmi úspěšně dosaženo, pokud se sperma uskládá v kapalném dusíku při teplotě -196 °C.

3.5.1. Krátkodobá konzervace

V dnešní době se lze setkat s touto metodou velice zřídka. Naředěný ejakulát se uchovává při teplotě 2 °C až 4 °C, nejčastěji v chladničce. Využití a oplození schopnost takto konzervovaného ejakulátu je maximálně dva dny. Doba použitelnosti ejakulátu se dá prodloužit, pokud se při konzervování použije citrát sodný s upraveným pH 6,15 a to až na 3 až 4 dny (LOUDA et al., 2001).

Nejčastěji využívaná ředidla pro krátkodobou konzervaci jsou ředidla ze sušeného mléka: žloutko – mléčné ředidlo a žloutko – citrátové ředidlo. Ředidla se musí připravovat denně čerstvá a jednotlivé komponenty musí odpovídat přísným veterinárním požadavkům a musí být uchovávány ve sterilním prostředí, kvůli možné bakteriální kontaminaci (JANUSKAUSKAS, 1999).

3.5.2. Dlouhodobá konzervace - kryokonzervace

Kryokonzervace býčího ejakulátu zahrnuje několik po sobě následujících kroků: ředění spermatu, chlazení, následné zmrazení, uchování a rozmrazení spermií. Všechny tyto kroky mohou způsobit poškození spermií. Primární metodou vedoucí k prodloužení přežívání spermií je snížení teploty ejakulátu, které vede ke snížení metabolické aktivity spermií (HOLT et al., 2005).

K dalšímu prodloužení doby uchování spermií bez objektivně prokázané ztráty životaschopnosti je nutné spermie zmrazit. Proces kryokonzervace spermií však zahrnuje sérii fyzikálních a chemických změn, které v konečném důsledku mohou poškodit buňku (THURSTON et al., 2002).

V roce 1949 bylo zjištěno, že glycerol má kryoprotektivní vlastnosti, které představovaly obrovský pokrok v oblasti uskladňovacích technologiích, stejně jako přeorientování na plastové pejety (BALL a PETERS, 2004). Od té doby, při významném a denním používání zmrazeného spermatu v chovu skotu, bylo dosaženo relativně velkého pokroku v oblasti ředidel ejakulátu. I nadále však zůstává prostor pro zlepšení, protože kryokonzervací určitá část spermií ztrácí integritu a funkčnost. Zlepšení lze dosáhnout pomocí různých druhů ředidel, které jsou v interakci se spermatem a poskytují ochranu různých buněčných komponentů během chladičích, zmrazovacích a rozmrazovacích procesů (HOLT, 2000).

Principem dlouhodobé konzervace je uchovávání spermií – inseminačních dávek ve speciálních chladičích kontejnerech naplněných tekutým dusíkem při teplotě - 196 °C. Kryokonzervace má řadu výhod. Ejakulát může být uchováván neomezenou dobu, manipulace a zacházení s ním sice vyžaduje určitá technická a bezpečnostní opatření, avšak není nijak obtížné. Další výhodou je snadné překonání časových limitů, geografických hranic a samozřejmě s tímto spojená ekonomická stránka (JANUSKAUSKAS, 1999).

Nevýhodou je, že v průběhu hlubokého mrazení a následného rozmrazování dochází k funkčním odlišnostem ejakulátu od nativního spermatu a často také k poškození určitého množství spermií. Poškození se projevuje nejčastěji morfologickými změnami na hlavičkách spermií. Dále je po rozmrazení semene pohyblivost spermií značně snížena, dochází k poklesu glykolýzy a tvorbě kyseliny mléčné. Kyselina mléčná postupně okyseluje prostředí, snižuje aktivitu spermií, způsobuje anabiózu a následné odumření samčích pohlavních buněk (BALL a PETERS, 2004).

Jsou značné rozdíly ve způsobilosti spermií ke konzervaci hlubokým mrazením jak mezi ejakuláty téhož býka, tak mezi ejakuláty různých býků (WATSON, 1990).

Oplozovací schopnost čerstvého semene je mnohonásobně vyšší, než schopnost zmrazeného a poté rozmrazeného semene (JANUSKAUSKAS, 1999).

Základním předpokladem úspěšné fertilizace oocytů *in vivo* i *in vitro* je výborný funkční stav spermií po kryokonzervaci. Pouze kvalitní a nepoškozené spermie s intaktním akrozomem a s nenarušeným průběhem akrozomální reakce mohou úspěšně penetrovat *zonu pellucidu* a fertilizovat oocyt (YANAGIMACHI, 1988).

3.6. Uchovávání a manipulace s inseminačními dávkami

Zmrazené sperma je nezbytné přepravovat a skladovat v nádržích s kapalným dusíkem speciálně určených pro tento účel. Kontejnery jsou dvouplášťové, mohou být z nejrůznějších materiálů, nejčastěji olověné, či hliníkové. Tak dlouho, jak zůstává sperma ponořeno v kapalném dusíku, stav spermií a jejich plodnost zůstávají beze změny. Kontrola hladiny dusíku v kontejneru se provádí sterilní plastovou tyčí ponořenou do kontejneru. Po několika sekundách se tyč vyjme a zkontroluje hladina (BALL a PETERS, 2004)

LOUDA et al. (2007) uvádí, že komplikace mohou nastat, když jsou pejety vystaveny zvýšené teplotě před tím, než jsou ve skutečnosti zapotřebí pro umělou inseminaci, či jiné účely. K poškození může dojít například únikem kapalného dusíku z nádrže, v případě že pejety jsou uskladněny příliš dlouhou dobu, při manipulaci a doplňování mrazicího média, nebo když se protahuje nezbytně nutná doba ke kontrole či výběrem pejet v hrdle nádrže. Oplozovací schopnost inseminačních dávek při expedici z inseminační stanice obchodní firmou inseminačnímu technikovi nebo přímo chovateli závisí na řadě různých činitelů. Při nedodržení přesně stanovených metod může dojít k poškození či zničení životnosti spermií (LOUDA et al., 2007).

Změny fyziologických vlastností spermií při vystavení pejety zvýšené teplotě jsou kumulativní a je třeba dbát, aby se zabránilo jakémukoliv zbytečnému vyjmutí pejety z kapalného dusíku. Každou manipulaci (počítání, přesun dávek mezi kontejnery, atd.) s inseminačními dávkami je třeba pečlivě uvážit, zda zamýšlený úkon je nezbytně nutný a zahrnuje metodický postup obsluhy (BALL a PETERS, 2004).

Dalším důležitým faktorem při manipulaci a uchovávání dávek je dodržení bezpečné teplotní zóny, při jejímž narušení může být nastartován proces rozmrazování dávky. I krátkodobé přechodné vyjmutí inseminační dávky z chladové zóny bezpečné teploty znatelně naruší její oplozovací schopnost (NEBEL et al., 1993).

Při vkládání nakoupených inseminačních dávek do kontejneru je nutné označit místo uložení jednotlivých goblet - pouzder s inseminačními dávkami na držácích kanystru v kontejneru i v plánku plnění a odběru dávek, který slouží k průběžné orientaci. Plánek musí obsahovat přesné informace o registrech inseminačních dávek, včetně datum vložení, odběru, podpis inseminačního technika (NEBEL et al., 1993).

3.6.1. Porušení oplozovací schopnosti inseminační dávky

Při zamýšlené manipulaci s inseminačními dávkami či gobletami je nutné nejdříve zkontrolovat hladinu dusíku v kontejneru. Při nízké hladině dusíku dochází při manipulaci s inseminačními dávkami a jejich zpětném ponoření do par dusíku, jen k částečnému ochlazení, cca o -30 až -40 °C (BERNDSTON, 1977).

Ten také uvádí efekt zpětného ponoření pejety nebo goblety po dobu jedné minuty, za účelem zabránění porušení bezpečné teploty. BERNDSTON (1977) také zjistil, že zpětné ochlazení inseminační dávky je závislé na hladině dusíku v kontejneru. Čím relativně déle technik manipuluje s gobletou, či inseminační dávkou nad zónou bezpečné teploty, tím déle musí zpětně nechat gobletu chladit ponořenou v parách nad hladinou, nebo ponořenou do tekutého dusíku. Doba manipulace v hrdle kontejneru má být však vždy co nejkratší, maximálně do 1 minuty. Po 1 minutě v hrdle se musí gobleta okamžitě ponořit alespoň na 10 sec. zpět do dusíku.

Znaky porušenosti rozmražené a opětovně zmražené inseminační dávky jsou patrné na první pohled nejen na povrchu pejety, která je obalená jinovatkou či ledem. Pejety mohou být i vzájemně spojené v důsledku přimrznutí a je velice obtížné je jednotlivě vyjmout z goblety. Jedním z mnoha dalších znaků mohou být nesymetrické kruhové a podélné praskliny, výduť uprostřed pejety, nebo sedimentace spermií v dolní polovině pejety (LOUDA et al., 2007).

Inseminační dávka vyjmutá z kontejneru a ponechaná při venkovní teplotě může ztratit svoji oplozovací schopnost již po 10 sec, nejdéle však do 30 sec., dochází k nastartování procesu rozmrazení. Spolu s opětovným ponořením do dusíku dochází k jeho

neodbornému zmrazení a částečnému poškození oplozovací schopnosti. S každým dalším opakováním tohoto procesu ztrácí sperma svoji oplozovací schopnost (LOUDA et al., 2007).

4. METODIKA A POUŽITÝ MATERIÁL

4.1. Odebírání býci

K pokusům byli vybráni 4 fertilní býci různých plemen, chovaní na ISB Natural, s. r. o. v Hradištku pod Medníkem, s možností napájení *ad libitum*, denní krmná dávka byla: 10 kg sena, 5 kg slámy, 0,5 kg sojového šrotu, 3 kg směsi šrotů (1/3 oves, 1/3 pšenice, 1/3 ječmen) a 0,1 kg minerální krmné směsi (Premin 22 Natural, VVS Verměřovice, Česká republika). Odběr ejakulátu a výroba dávek probíhala v období od 1. 12. 2008 do 6. 4. 2009. Býci byli jedenkrát týdně odebírání standardní metodou do umělé vagíny. Celkem bylo pro pokus použito 20 vzorků ejakulátů od každého býka.

1. **KANTOR**, NEA 665, narozen 20. 6. 2007, Holštýnské plemeno – použito 160 inseminačních dávek.
2. **KARTAGO**, ZBA 341, narozen 21. 4. 2002, plemeno Blonde d'Aquitaine – použito 160 inseminačních dávek.
3. **LUM**, HRF 316, narozen 26. 3. 2003, plemeno Hereford – použito 160 inseminačních dávek.
4. **PORTHOS**, ZAA 678, narozen 8. 4. 2007, plemeno Aberdeen Angus – použito 160 inseminačních dávek.

4.2. Použitá ředidla

V tomto projektu byla použita čtyři komerčně vyráběná ředidla: AndroMed®, Bioxcell®, Triladyl®, Optidyl®, od různých zahraničních firem – Minitübe z Německa, IMV Technologies z Francie a BIO – VET z Francie.

AndroMed® je bezžloutkové ředidlo obsahující rostlinné fosfolipidy, TRIS, kyselinu citrónovou, cukry, antioxidanty, puify, glycerol a redestilovanou vodu. Standardní verze obsahuje antibiotika podle Směrnice ES 88/407 (Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin, Linkomycin). Firma Minitübe Germany je výrobcem tohoto ředidla. Ředidlem Andromed® bylo naředěno 160 inseminačních dávek z 640.

Bioxcell® je ředidlo neobsahující živočišné bílkoviny (vaječný žloutek, kravské mléko). Obsahuje antibiotika Linkomycin, Spektinomycin, Gentamicin a Tylosin. Výrobcem je firma IMV Technologies z Francie. Tímto ředidlem bylo naředěno 160 dávek z 640.

Triladyl® je ředidlo na bázi vaječného žloutku, obsahuje TRIS, kyselinu citrónovou, cukr, pufr, glycerol, redestilovanou vodu a antibiotika podle směrnice EU 88/407 (Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin, Linkomycin). Toto ředidlo vyrábí firma Minitübe z Německa. Triladylem® bylo naředěno 160 inseminačních dávek z 640 použitých.

Optidyl® obsahuje ionizovaný vaječný žloutek, glycerol, TRIS a antibiotika dle Směrnice EU No 88/407 Streptomycin, Penicilin, Linkomycin, Spektinomycin. Toto ředidlo vyrábí firma BIO – VET z Francie. Ředidlo Optidyl® bylo použito k naředění 160 inseminačních dávek z celkových 640.

4.3. Meteorologická data

Data použitá pro výzkum byla dodána z Českého hydrometeorologického ústavu sídlícího v Komořanech. Výsledná měření byla z období 1. 12. 2008 do 6. 4. 2009 a byla získána ze záznamů meteorologických stanic Praha - Libuš (P1PLIB01) a Netvořice (P3NETV01), které se nacházejí nejbližší k sídlu společnosti Natural, s. r. o. v Hradištku pod Medníkem. Sledované faktory byly následující – termínová teplota vzduchu, průměrná rychlost větru, rychlost, směr, a čas maximálního nárazu větru, relativní vlhkost vzduchu, tlak vodní páry, počet hodin slunečního svitu, tlak vzduchu a denní úhrn srážek.

4.4. Odběr a zpracování ejakulátu

V období od 20.11.2008 do 6.4.2009 byl každý z býků odebírán standardním způsobem – ejakulací do umělé vagíny. Od každého z odebíraných býků bylo získáno 20 vzorků ejakulátů, které splňovaly základní vstupní kritéria a požadavky nutné pro následnou kryokonzervaci.

Základní vstupní hodnocení dle standardní metodiky inseminační stanice bylo provedeno řádně proškoleným personálem v laboratořích firmy Natural, s.r.o. Nativní ejakuláty byly vizuálně zkontrolovány a zhodnoceny na přítomnost nežádoucích příměsí, či

kontaminujících látek, kterými mohou být vlasy, stolice nebo krev. Byl také sensoricky zhodnocen zápach ejakulátu. Hustota odebraného ejakulátu byla změřena na fotometru (SPEKOL II, Česká republika). Na automatické digitální váze značky Scout Pro (firma OHAUS®, USA) bylo stanoveno množství ejakulátu. Subjektivní metodou pomocí mikroskopu (MEOPTA, Česká republika) s fázovým kontrastem byla stanovena aktivita spermií. Pro další zpracování byl využit pouze ejakulát o minimální hustotě $0,7 \times 10^6$ v mm^3 s aktivitou (přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou) nejméně 70 %.

Vzorky spermatu, které byly hodnoceny pozitivně, byly rovnoměrně rozděleny pomocí sterilní pipety na čtyři díly do sterilních zkumavek předem předehřátých na $38\text{ }^\circ\text{C}$. Do těchto zkumavek s jednotlivými vzorky ejakulátů bylo sterilní injekční stříkačkou přeneseno předem určené množství ředidla, aby výsledná koncentrace byla 10 000 aktivních spermií v inseminační dávce. Zkumavky byly následně uzavřeny vysterilizovaným víčkem. Poté následoval standardní postup výroby inseminační dávky. Po cca 10 minutovém promísání byl zředěný ejakulát naplněn do 0,25 ml pejet, tyto poté zchlazovány na teplotu $4\text{ }^\circ\text{C}$ a ekvilibrovány po dobu 90 minut před samotným mrazením. Následovala standardní metoda pozvolného zmrazování v automatickém mrazicím boxu (Digitcool od firmy IMV Technologies, Francie) na teplotu $-105\text{ }^\circ\text{C}$. Dávky byly uloženy v kontejnerech s tekutým dusíkem při teplotě $-196\text{ }^\circ\text{C}$.

4.5. Termodynamický test

Termodynamický test je hojně využívaná metoda, kterou se hodnotí pokles aktivity spermií v čase. Inseminační dávky vyrobené z posuzovaného spermatu byly rozmrazeny ve vodní lázni při teplotě $39\text{ }^\circ\text{C}$ ($38\text{ }^\circ\text{C}$ - $40\text{ }^\circ\text{C}$) po dobu 30 vteřin.

Poté byly pejety osušeny sterilní buničinou, byl odstříhnut zatavený horní konec a byly vloženy do sterilních zkumavek s 1,5 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl, pH 6,8).

Inkubace probíhala v suchém termostatu (Thermo – block, FALC®, Itálie) při teplotě $38\text{ }^\circ\text{C}$. Aktivita byla hodnocena subjektivně pomocí mikroskopu (Nikon® Eclipse E200, Japonsko) s fázovým kontrastem, opatřeným výhřevnou destičkou (teplota $38\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$), při zvětšení 200x v 30 minutových intervalech.

Motilita byla hodnocena vždy ze 3 zorných polí a odhadem se stanovilo procentické zastoupení spermií, které vykazovaly rychlý přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou. Aktivita byla hodnocena v pěti časech, aby bylo zjištěno, jak dlouho po rozmrazení bude zachována aktivita spermií. První hodnocení proběhlo ihned po rozmrazení inseminační dávky a vložení do zkumavky ve vodní lázni (čas t0). Druhé hodnocení proběhlo po 30 minutách (čas t30). Třetí hodnocení proběhlo v čase 60 min. od rozmrazení (čas t60), čtvrté hodnocení v čase 90 min. od rozmrazení (čas t90) a poslední hodnocení ejakulátu proběhlo po 120 min. od rozmrazení (čas t120).

4.6. Statistické zpracování výsledků

Veškeré údaje byly postupně zaznamenávány do počítače, do programu Microsoft Office Excel 2007. Takto byly připraveny pro statistické hodnocení, společně s meteorologickými daty.

Pro statistické vyhodnocení byl použit program SAS 9.3 (SAS/STAT[®] 9.3, 2011). Pro stanovení základních parametrů souborů byly využity procedury MEANS a UNIVARIATE. Vztahy mezi vybranými indikátory byly posuzovány pomocí korelačních koeficientů, které byly vypočteny pomocí procedury CORR. Při výběru vhodného modelu hodnocení daných ukazatelů byla využita procedura REG, metoda STEPWISE. Pro hodnocení rozdílu mezi jednotlivými sledovanými proměnnými byla použita procedura MIXED, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey – Kramerova testu.

4.6.1. Modelová rovnice pro hodnocení základních parametrů nativního ejakulátu (model 1)

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + b^*(\text{teplota}) + e_{ijklm}$$

kde:

y_{ijklm} - hodnoty závisle proměnné (množství ejakulátu v g, koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$, aktivita spermií po odběru v %),

μ - obecná hodnota závisle proměnné,

- a_i – fixní efekt býka ($i = 1, n = 20; i = 2, n = 20; i = 3, n = 20; i = 4, n = 20$),
- b_j – fixní efekt pořadí skoku ($j = 1$ - první, $n = 35; j = 2$ - druhý, $n = 30; j = 3$ – dvojskok, $n = 15$),
- c_k – fixní efekt skupiny relativní vlhkosti ($k = 1$ ($<76,05\%$), $n = 27; k = 2$ ($76,05 - 84,72\%$), $n = 22; k = 3$ ($>84,72\%$), $n = 31$),
- d_l – fixní efekt skupiny tlaku vzduchu ($k = 1$ ($<972,49$ kPa), $n = 26; k = 2$ ($972,49 - 982,84$ kPa), $n = 29; k = 3$ ($>982,84$ kPa), $n = 25$),
- b (teplota)** – regrese na teplotu v čase 7:00,
- e_{ijklm} – náhodná reziduální chyba.

4.6.2. Modelová rovnice pro hodnocení kvality inseminačních dávek při termodynamickém testu (model 2)

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + b(M * K * A) + e_{ijkl}$$

kde:

y_{ijkl} - hodnoty závislé proměnné (aktivita spermií po rozmrazení inseminační dávky v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v %),

μ – obecná hodnota závislé proměnné,

a_i – fixní efekt býka ($i = 1, n = 160; i = 2, n = 160; i = 3, n = 160; i = 4, n = 160$),

b_j – fixní efekt skoku ($j = 1$ - první, $n = 283; j = 2$ - druhý, $n = 237; j = 3$ – dvojskok, $n = 120$),

c_k – fixní efekt ředidla ($k = 1, n = 160; k = 2, n = 160; k = 3, n = 160; k = 4, n = 160$),

b(M*K*A) – regrese na interakci množství, hustoty a aktivity čerstvého ejakulátu,

e_{ijkl} – náhodná reziduální chyba.

4.7. Statistická průkaznost

Vlivy jednotlivých sledovaných faktorů byly hodnoceny dle příslušných lineárních modelů. V závislosti na vybraných faktorech byly hodnoceny rozdíly ve zkoumaných ukazatelích na hladině statistické průkaznosti:

P < 0,05 statisticky významný rozdíl – **95 %**

P < 0,01 statisticky vysoce významný rozdíl – **99 %**

P < 0,001 statisticky velmi vysoce významný rozdíl – **99,9 %**

5. VÝSLEDKY

5.1. Základní statistické charakteristiky

V Tabulce 1 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky hodnocených ukazatelů. Průměrné pořadí skoku bylo 1,75. Býci byli odebíráni jednou, maximálně dvakrát za den, anebo byly oba skoky smíchány dohromady. Průměrné množství odebraných ejakulátů bylo 4,83 g v rozpětí od 1,30 do 10,60 g. Průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla $1,21 \times 10^6/\text{mm}^3$, nejnižší naměřená koncentrace byla $0,60 \times 10^6/\text{mm}^3$ a nejvyšší $2,10 \times 10^6/\text{mm}^3$. Aktivita spermií po odběru byla v průměru 79,70 % v rozpětí 70 – 90 %. Průměrná aktivita spermií v čase 0 dosáhla 47,38 %. Aktivita spermií v čase 30 byla průměrně 43,43 %. Průměrná aktivita spermií v čase 60 byla 36,75 %. Průměrná aktivita spermií v čase 90 byla 29,34 % a v čase 120 byla 22,90 %.

Průměrná rychlost větru byla 2,57 m/s v rozmezí 0 m/s – 9,70 m/s. Průměrná rychlost maximálního nárazu větru dosáhla 9,32 m/s v rozmezí 3,70 m/s až 21,90 m/s. Průměrná hodnota směru maximálního nárazu větru byla 206,70 m/s v rozpětí 75,00 m/s až 337,00 m/s. Relativní vlhkost vzduchu byla průměrně 80,38 %, minimální vlhkost vzduchu 62 % a maximální 97 %. Průměrné hodnoty pro tlak vodní páry byly 5,43 hPa v rozmezí 2,10 hPa až 11,10 hPa.

Průměrný počet hodin slunečního svitu byl 1,17 h. Průměrný tlak vzduchu byl 977, 66 hPa. Průměrný denní úhrn srážek byl 1,57 mm, minimální 0 mm a maximální denní úhrn srážek 10,50 mm. Pro detailní vyhodnocení byly použity následující ukazatele: tlak vzduchu, relativní vlhkost vzduchu a termínová teplota v 7:00, protože se domníváme, že ze všech meteorologických ukazatelů jsou tyto zásadní pro průběh reprodukce.

Tab. 1. Základní statistiky hodnoceného souboru dat

Proměnná	N	\bar{x}	S	min.	max.	s.e.
S	20	1,75	0,75	1,00	3,00	0,03
M	20	4,83	2,15	1,30	10,60	0,08
K	20	1,21	0,39	0,60	2,10	0,02
A	20	79,70	8,59	70,00	95,00	0,34
t0	640	47,38	18,68	0	90,00	0,74
t30	640	43,43	18,55	0	85,00	0,73
t60	640	36,75	18,13	0	80,00	0,72
t90	640	29,34	17,54	0	70,00	0,69
t120	640	22,90	18,06	0	70,00	0,71
T07	20	-1,95	6,93	-19,00	8,00	0,27
T14	20	2,49	5,00	-7,60	19,20	0,20
T21	20	-0,23	5,05	-14,80	12,00	0,20
Vprum	20	2,57	2,03	0	9,70	0,08
Vmax	20	9,32	4,11	3,70	21,90	0,16
VSmax	20	206,70	67,66	75,00	337,00	2,67
Vlhkost	20	80,38	8,67	62,00	97,00	0,34
Tlak VP	20	5,43	1,89	2,10	11,10	0,07
SSV	20	1,17	2,24	0	7,70	0,09
Tlak	20	977,66	10,36	950,00	994,00	0,41
SRA	20	1,57	2,79	0	10,50	0,11

Vysvětlivky: S – pořadí skoku plemenného býka v den odběru; M – množství odebraného ejakulátu v g; K - koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$; A – aktivita spermií po odběru v %; t 0 – 120 - aktivita spermií v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií v %; T07 – T21 – termínová teplota vzduchu v den odběru v °C; Vprum – průměrná rychlost větru v m/s; Vmax – rychlost maximálního nárazu větru v m/s; VSmax – směr maximálního nárazu větru v m/s; Vlhkost – relativní vlhkost vzduchu v %; Tlak VP – tlak vodní páry v hPa; SSV – počet hodin slunečního svitu v h; Tlak – tlak vzduchu v hPa; SRA – denní úhrn srážek v mm.

5.2. Korelační analýza

V tabulce 2 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty a související statistické významnosti mezi hodnocenými proměnnými.

Mezi býkem versus pořadí skoku plemenného býka v den odběru, množstvím odebraného ejakulátu, termínovou teplotou vzduchu (T07, T14, T21), tlakem vodní páry a počtem hodin slunečního svitu byly zjištěny kladné korelační koeficienty na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi býkem a koncentrací spermií v ejakulátu, aktivitou spermií po odběru, aktivitou spermií v čase 120 min, časem maximálního nárazu větru a tlakem vzduchu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$.

Mezi býkem a aktivitou spermií v čase t0, t30 a t60 byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Mezi býkem a aktivitou spermií v čase t90 byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi býkem a ředidlem, průměrnou rychlostí větru, rychlostí a směrem maximálního nárazu větru, relativní vlhkostí vzduchu a denním úhrnem srážek nebyla zjištěna průkazná závislost.

Mezi pořadím skoku a množstvím odebraného ejakulátu, aktivitou spermií v čase t30, t60, termínovou teplotou vzduchu T07, T14, T21, směrem maximálního nárazu větru a tlakem vodní páry byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi pořadím skoku a koncentrací spermií v ejakulátu, aktivitou spermií po odběru a relativní vlhkostí vzduchu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi pořadím skoku a aktivitou spermií v čase t0, rychlostí maximálního nárazu větru byly zjištěny kladné korelace a mezi pořadím skoku a tlakem vzduchu, denním úhrnem srážek záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Mezi pořadím skoku a aktivitou spermií v čase t90 byla zjištěna kladná korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi množstvím odebraného ejakulátu a koncentrací spermií v ejakulátu, tlakem vzduchu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi množstvím odebraného ejakulátu a termínovou teplotou vzduchu T07, T14, T21 byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$.

Mezi koncentrací spermií v ejakulátu a aktivitou spermií v čase t60, t90 a t120 byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi koncentrací spermií

v ejakulátu a průměrnou rychlostí větru, rychlostí maximálního nárazu větru a denním úhrnem srážek byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi koncentrací spermií v ejakulátu a aktivitou spermií po odběru, aktivitou spermií v čase t_0 byly zjištěny záporné korelace a mezi koncentrací spermií v ejakulátu a termínovou teplotou vzduchu T21 kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Mezi koncentrací spermií v ejakulátu a aktivitou spermií v čase t_{30} , počtem hodin slunečního svitu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi aktivitou spermií po odběru a aktivitou spermií v čase t_{60} , t_{90} a t_{120} a relativní vlhkostí větru byly zjištěny korelace kladné na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií po odběru a termínovou teplotou vzduchu T14, T21, rychlostí a směrem maximálního nárazu větru a počtem hodin slunečního svitu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií po odběru a aktivitou spermií v čase t_0 , t_{30} a časem maximálního nárazu větru byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,01$. Mezi aktivitou spermií po odběru a termínovou teplotou vzduchu T07, průměrnou rychlostí větru, tlakem vodní páry, denním úhrnem srážek byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi ředidlem a pořadím skoku plemenného býka v den odběru, množstvím odebraného ejakulátu, termínovou teplotou vzduchu (T07, T14, T21), tlakem vodní páry a počtem hodin slunečního svitu nebyla zjištěna žádné korelační koeficienty.

Mezi aktivitou spermií v čase t_0 a t_{30} , t_{60} , t_{90} a t_{120} byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t_0 a termínovou teplotou vzduchu T07 byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t_0 a termínovou teplotou vzduchu T21, tlakem vodní páry byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a t_{60} , t_{90} , t_{120} byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a termínovou teplotou vzduchu T07, T21 byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a termínovou teplotou T14, relativní vlhkostí vzduchu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a tlakem vzduchu byla kladná korelace na hladině významnosti $P < 0,05$. Mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a tlakem vodní páry byla korelace záporná, mezi aktivitou spermií v čase t_{30} a počtem hodin slunečního svitu kladná korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi aktivitou spermií v čase t60 a t90, t120 byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t60 a termínovou teplotou T07, T21 a tlakem vodní páry byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t60 a termínovou teplotou vzduchu T14 byla zjištěna záporná korelace a mezi aktivitou spermií v čase t60 a počtem hodin slunečního svitu, tlakem vzduchu byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,01$.

Mezi aktivitou spermií v čase t90 a t120, počtem hodin slunečního svitu a tlakem vzduchu byly zjištěny kladné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t90 a termínovou teplotou vzduchu T07, T21, tlakem vodní páry byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t90 a termínovou teplotou vzduchu T14, rychlostí maximálního nárazu větru byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,01$. Mezi aktivitou spermií v čase t90 a průměrnou rychlostí větru byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti $P < 0,05$.

Mezi aktivitou spermií v čase t120 a termínovou teplotou vzduchu T07, T21, průměrnou rychlostí větru, rychlostí maximálního nárazu větru a tlakem vodní páry byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t120 a počtem hodin slunečního svitu byla zjištěna kladná korelace na hladině významnosti $P < 0,001$. Mezi aktivitou spermií v čase t120 a termínovou teplotou vzduchu T14 byla zjištěna záporná korelace a mezi aktivitou spermií v čase t120 a tlakem vzduchu kladná korelace na hladině významnosti $P < 0,01$. Mezi aktivitou spermií v čase t120 a denním úhrnem srážek byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti $P < 0,05$.

Tab. 2 Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi hodnocenými proměnnými

		S	M	K	A	řed	t0	t30	t60	t90	t120	T07	T14	T21	Fprum	Fmax	Dmax	Casmax	H	E	SSV	P	SRA
býk	r	0,564	0,255	-0,147	-0,510	0	-0,092	-0,083	-0,101	-0,136	-0,160	0,277	0,327	0,250	-0,017	0,072	0,016	-0,156	0,014	0,350	0,100	-0,208	-0,049
	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,021	0,035	0,011	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,672	0,070	0,682	<0,001	0,731	<0,001	0,011	<0,001	0,218
S	r		0,464	-0,409	-0,193	0,007	0,097	0,132	0,149	0,112	0,071	0,204	0,269	0,167	0,062	0,090	0,168	0,010	-0,151	0,243	0,034	-0,084	-0,095
	P		<0,001	<0,001	<0,001	0,870	0,014	0,001	<0,001	0,005	0,072	<0,001	<0,001	<0,001	0,115	0,023	<0,001	0,792	<0,001	<0,001	0,396	0,034	0,016
M	r			-0,275	-0,035	<0,001	-0,053	-0,032	0,000	0,001	0,011	0,308	0,296	0,276	0,051	0,038	0,161	-0,055	-0,023	0,319	0,049	-0,148	-0,057
	P			<0,001	0,376	0,999	0,178	0,420	0,992	0,985	0,780	<0,001	<0,001	<0,001	0,195	0,332	<0,001	0,167	0,558	<0,001	0,216	<0,001	0,153
K	r				-0,100	-0,016	-0,095	-0,128	-0,160	-0,213	-0,258	0,055	0,046	0,096	0,273	0,326	-0,019	-0,032	-0,054	0,057	-0,105	-0,064	0,201
	P				0,012	0,693	0,016	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,166	0,244	0,015	<0,001	<0,001	0,624	0,426	0,172	0,151	0,008	0,108	<0,001
A	r					0,002	0,113	0,124	0,143	0,188	0,226	-0,121	-0,203	-0,157	-0,123	-0,196	-0,211	0,103	0,218	-0,120	-0,145	0,050	-0,123
	P					0,967	0,004	0,002	0,000	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,009	<0,001	0,003	<0,001	0,208	0,002
řed	r						0,070	0,036	0,006	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	0	0,003	0	-0,002	0,016	-0,004	0	-0,012	0,008	-0,004
	P						0,076	0,368	0,876	0,916	0,926	0,933	0,931	0,991	0,934	0,996	0,967	0,686	0,914	0,992	0,770	0,837	0,924
t0	r							0,925	0,834	0,749	0,648	-0,148	-0,063	-0,107	0,015	0,052	0,064	-0,033	-0,089	-0,113	0,075	0,044	0,032
	P							<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,113	0,007	0,704	0,192	0,104	0,400	0,024	0,004	0,058	0,272	0,425
t30	r								0,924	0,830	0,727	-0,171	-0,088	-0,141	-0,018	-0,001	0,055	-0,051	-0,081	-0,134	0,104	0,087	0,013
	P								<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,027	<0,001	0,652	0,975	0,164	0,195	0,042	0,001	0,008	0,027	0,751
t60	r									0,923	0,819	-0,173	-0,105	-0,174	-0,025	-0,058	0,046	-0,059	-0,067	-0,145	0,129	0,126	0,004
	P									<0,001	<0,001	<0,001	0,008	<0,001	0,534	0,142	0,241	0,138	0,090	<0,001	0,001	0,001	0,929
t90	r										0,924	-0,191	-0,113	-0,199	-0,083	-0,112	0,029	-0,057	-0,035	-0,156	0,169	0,151	-0,025
	P										<0,001	<0,001	0,004	<0,001	0,037	0,005	0,460	0,149	0,380	<0,001	<0,001	<0,001	0,527
t120	r											-0,184	-0,123	-0,216	-0,145	-0,181	0,017	-0,062	0,013	-0,163	0,203	0,125	-0,082
	P											<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	0,665	0,119	0,746	<0,001	<0,001	0,002	0,037

Vysvětlivky: S – pořadí skoku plemenného býka v den odběru; M – množství odebraného ejakulátu v g; K - koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$; A – aktivita spermií po odběru v %; řed – vliv použitého ředidla; t 0 – 120 - aktivita spermií v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií v %; T07 – T21 – termínová teplota vzduchu v den odběru v °C; Vprum – průměrná rychlost větru m/s; Vmax – rychlost maximálního nárazu větru v m/s; VSmax – směr maximálního nárazu větru v m/s; Vlhkost – relativní vlhkost vzduchu v %; Tlak VP – tlak vodní páry v hPa; SSV – počet hodin slunečního svitu v h; Tlak – tlak vzduchu v hPa; SRA – denní úhrn srážek v mm.

Zelené – korelace na hladině významnosti $P < 0,001$

Modré – korelace na hladině významnosti $P < 0,01$

Červené – korelace na hladině významnosti $P < 0,05$

Prázdné – korelace není, bez závislosti

5.3. Výsledky procedury MIXED pro vyhodnocení ukazatelů nativního ejakulátu

Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů modelu 1 jsou uvedeny v tabulce 3. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí 0,40 – 0,69. To znamená, že modelová rovnice vysvětlovala 40 – 69 % proměnlivosti. Všechny efekty v modelové rovnici byly pro množství ejakulátu, koncentraci spermií v ejakulátu a aktivitu spermií v ejakulátu statisticky průkazné ($P < 0,05$ – $0,001$). Vztahy mezi sledovanými faktory (býk, skok, vlhkost vzduchu, tlak vzduchu, termínová teplota v 7:00) a jednotlivými ukazateli (množství, koncentrace, aktivita), byly determinovány, dle výše uvedené modelové rovnice (viz. 4.6.1 modelová rovnice pro hodnocení základních parametrů nativního ejakulátu).

Vliv býka, pořadí skoku a relativní vlhkosti vzduchu na sledované ukazatele (množství, koncentrace, aktivita) byl statisticky velmi vysoce významný ($P < 0,001$). Vliv tlaku vzduchu na množství ejakulátu a aktivitu spermií byl statisticky vysoce významný ($P < 0,001$), na koncentraci spermií v ejakulátu byl vliv tlaku vzduchu významný ($P < 0,05$). Vliv termínové teploty vzduchu v 7:00 na množství a koncentraci spermií v ejakulátu byl velmi vysoce statisticky významný ($P < 0,001$). U vlivu termínové teploty v 7:00 na aktivitu spermií byla prokázána statistická významnost ($P < 0,05$).

Tab. 3. Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu 1

UKAZAT EL	MODEL		Býk		S		Vlhkost		Tlak		T07	
	r2	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
M	0,69	<0,001	65,20	<0,001	190,37	<0,001	28,89	<0,001	13,66	<0,001	47,74	<0,001
K	0,40	<0,001	48,88	<0,001	28,28	<0,001	10,05	<0,001	4,07	0,018	27,49	<0,001
A	0,51	<0,001	168,93	<0,001	29,35	<0,001	15,61	<0,001	7,35	<0,001	4,28	0,039

Vysvětlivky: M – množství ejakulátu v g; K - koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$; A – aktivita spermií po odběru v %; Býk – vliv býka; S – vliv pořadí skoku plemenného býka; Vlhkost – vliv relativní vlhkosti vzduchu v den odběru v %; Tlak – vliv tlak vzduchu v den odběru v hPa; T07 – vliv termínové teploty vzduchu v den odběru v 7:00 hod. v °C.

5.4. Výsledky vlivu býka, pořadí skoku, relativní vlhkosti vzduchu a tlaku vzduchu na množství ejakulátu, koncentraci spermií v ejakulátu a aktivitu spermií

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky vlivu býka, pořadí skoku, relativní vlhkosti vzduchu a tlaku vzduchu na množství ejakulátu, koncentraci spermií v ejakulátu a aktivitu spermií.

5.4.1. Vliv býka

Nejvyšší hodnoty množství ejakulátu (6,59 g) byly naměřeny u býka č. 1, který vykazoval statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) oproti býkovi č. 2 (5,69 g), býkovi č. 3 (4,67 g) a býkovi č. 4 (4,89 g). Mezi množstvím ejakulátu u býka č. 2 a býka č. 3 byl zjištěn taktéž statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$). Pro hodnoty naměřené mezi býkem č. 2 a č. 4 byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$).

Při měření koncentrace spermií v ejakulátu vykazoval nejvyšší hodnoty ($1,46 \times 10^6/\text{mm}^3$) býk č. 3. Oproti hodnotám ($1,11 \times 10^6/\text{mm}^3$) naměřených u býka č. 1, vykazovali býci č. 2, č. 3 a č. 4 statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$). V koncentraci ejakulátu mezi býky č. 2 ($1,28 \times 10^6/\text{mm}^3$) a býkem č. 3 ($1,46 \times 10^6/\text{mm}^3$) byl zjištěn statisticky středně

významný rozdíl ($P < 0,01$). Stejně tak i mezi býkem č. 2 ($1,28 \times 10^6/\text{mm}^3$) a býkem č. 4 ($0,90 \times 10^6/\text{mm}^3$). V koncentraci ejakulátu mezi býkem č. 3 ($1,46 \times 10^6/\text{mm}^3$) a býkem č. 4 ($0,90 \times 10^6/\text{mm}^3$) byl také zaznamenán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Pokud se týká aktivity spermií, nejvyšší hodnoty (89,1 %) vykazoval býk č. 1, nejnižší pak (74,78 %) býk č. 2. Statisticky vysoce významné rozdíly ($P < 0,001$) byly naměřeny u aktivity spermií mezi býkem č. 1 (89,1 %), býkem č. 2 (74,78 %), býkem č. 3 (77,09 %) a býkem č. 4 (76,75 %). Statisticky vysoce významné rozdíly ($P < 0,001$) byly také naměřeny mezi býkem č. 2 (74,78 %) a býkem č. 3 (77,09 %).

5.4.2. Vliv pořadí skoku

Největší množství ejakulátu (8,37 g) v závislosti na pořadí skoku bylo naměřeno u dvojskoku (č. 3), nejnižší množství ejakulátu (3,64 g) pak při druhém skoku (č. 2). Všechny skoky mezi sebou vykazovaly statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Pro koncentraci spermií byl naměřen nejvyšší výsledek ($1,33 \times 10^6/\text{mm}^3$) při skoku č. 1, ten taky vykazoval statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) oproti skoku č. 2 ($1,12 \times 10^6/\text{mm}^3$) a dvojskoku (č. 3; $1,12 \times 10^6/\text{mm}^3$).

Nejvyšší aktivita spermií (82,23 %) byla naměřena při skoku č. 2, který vykazoval statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,001$) oproti skoku č. 1 (78,24 %) a dvojskoku (č. 3; 77,82 %).

5.4.3. Vliv relativní vlhkosti vzduchu

Nejpozitivnější vliv na množství ejakulátu (5,99 g) měla vlhkost vzduchu č. 2 (76,05 – 84,72 %), nejhorších výsledků (4,97 g) dosáhla vlhkost č. 1 (<76,05 %). Byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi všemi naměřenými hodnotami množství ejakulátu.

Pokud se týká hustoty ejakulátu, nejvyšších hodnot dosáhla při relativní vlhkosti vzduchu č. 1 ($1,26 \times 10^6/\text{mm}^3$), nejhorší pak při relativní vlhkosti vzduchu č. 3 ($1,12 \times 10^6/\text{mm}^3$). Mezi hustotou ejakulátu s hodnotou ($1,26 \times 10^6/\text{mm}^3$) a hustotou ejakulátu ($1,12 \times 10^6/\text{mm}^3$) byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Naproti tomu nejvyšší aktivita spermií (81,31 %) byla naměřena u relativní vlhkosti vzduchu č. 3 (>84,72 %). Byl naměřen statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi

aktivitou spermií (78,07 %) a druhou aktivitou spermií (78,91 %). Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi aktivitou spermií č. 2 (78,91 %) a aktivitou č. 3 (81,31 %).

5.4.4. Vliv tlaku vzduchu

Nejvyšší hodnoty pro množství ejakulátu (5,75 g) byly naměřeny u tlaku vzduchu č. 2 (972,49 - 982,84 hPa). Statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) byl naměřen mezi množstvím ejakulátu u skupiny tlaku vzduchu č. 1 (5,59 g) a skupiny č. 3 (5,04 g) resp. mezi skupinou tlaku vzduchu č. 2 (5,75 g) a č. 3 (5,04 g).

Pro hustotu byly nejvyšší hodnoty ($1,24 \times 10^6/\text{mm}^3$) naměřeny u skupiny podle tlaku vzduchu č. 3 ($>982,84$ hPa). Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) naměřen pouze mezi hustotou ejakulátu u skupiny podle tlaku vzduchu č. 2 ($1,14 \times 10^6/\text{mm}^3$) a ejakulátem u skupiny č. 3 ($1,24 \times 10^6/\text{mm}^3$).

Pro aktivitu spermií byly nejvyšší hodnoty (80,84 %) naměřeny u skupiny podle tlaku vzduchu č. 1. ($<972,49$ hPa). Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi aktivitou spermií u skupiny č. 1 (80,84 %) a č. 3 (78,29 %), resp. statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi aktivitou spermií u skupiny č. 1 (80,84%) a skupiny č. 2 (79,17%).

Tab. 4. Vliv býka, pořadí skoku, relativní vlhkosti vzduchu a tlaku vzduchu na množství ejakulátu, koncentraci spermií v ejakulátu a aktivitu spermií.

proměnná	úrovně	M	K	A
		LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
Býk	1	6,59 ± 0,125 ^A	1,11 ± 0,031 ^A	89,10 ± 0,625 ^A
	2	5,69 ± 0,123 ^{B,C,a}	1,28 ± 0,031 ^{B,C}	74,78 ± 0,615 ^{B,C}
	3	4,67 ± 0,129 ^{B,D}	1,46 ± 0,033 ^{B,D,E}	77,09 ± 0,646 ^{B,D}
	4	4,89 ± 0,139 ^{B,b}	0,90 ± 0,035 ^{B,D,F}	76,75 ± 0,693 ^B
Skok	1	4,37 ± 0,088 ^A	1,33 ± 0,022 ^A	78,24 ± 0,442 ^A
	2	3,64 ± 0,088 ^{B,C}	1,12 ± 0,022 ^B	82,23 ± 0,438 ^{B,C}
	3	8,37 ± 0,202 ^{B,D}	1,12 ± 0,051 ^B	77,82 ± 1,010 ^D
Vlhkost	1 (<76,05)	4,97 ± 0,088 ^A	1,26 ± 0,022 ^A	78,07 ± 0,441 ^A
	2 (76,05 - 84,72)	5,99 ± 0,098 ^{B,C}	1,19 ± 0,025	78,91 ± 0,491 ^{B,C}
	3 (>84,72)	5,42 ± 0,099 ^{B,D}	1,12 ± 0,025 ^B	81,31 ± 0,497 ^D
Tlak	1 (<972,49)	5,59 ± 0,095 ^A	1,19 ± 0,024	80,84 ± 0,473 ^{A,a}
	2 (972,49 - 982,84)	5,75 ± 0,100 ^C	1,14 ± 0,025 ^a	79,17 ± 0,501 ^b
	3 (>982,84)	5,04 ± 0,097 ^{B,D}	1,24 ± 0,025 ^b	78,29 ± 0,487 ^B

Vysvětlivky: Býk 1 - KANTOR, NEA 665; Býk 2 - LUM, HRF 316; Býk 3 - KARTAGO, ZBA 341; Býk 4 - PORTHOS, ZAA 678; Skok 1 – první skok v den odběru; Skok 2 – druhý skok v den odběru; Skok 3 – dvojskok (první a druhý skok v den odběru smíchaný dohromady); Vlhkost – relativní vlhkost vzduchu v den odběru v %; Tlak – tlak vzduchu v den odběru v hPa; M – množství ejakulátu v g; K - koncentrace spermií v ejakulátu v 10⁶/mm³; A – aktivita spermií po odběru v %; A-B; C-D; E-F = průkaznost na hladině významnosti P<0,01; a-b;c-d = <0,05

5.5. Výsledky procedury MIXED pro hodnocení zmrazeného/rozmrazeného ejakulátu

Vztahy mezi sledovanými faktory (býk, skok, ředidlo, objem, hustota, aktivita) a jednotlivými ukazateli (výsledky termodynamického testu přežitelnosti t0 – t120), byly determinovány dle výše uvedené modelové rovnice (viz 4.6.2. Modelová rovnice pro hodnocení inseminačních dávek při termodynamickém testu). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí 0,09 – 0,14. To znamená, že modelová rovnice vysvětlovala 9 – 14 % proměnlivosti. Všechny efekty v modelové rovnici byly statisticky průkazné (P<0,05–0,001) pro výsledky termodynamického testu přežitelnosti spermií.

Vliv býka na sledované ukazatele (t0 – t120) byl statisticky velmi vysoce významný (P<0,001). Vliv pořadí skoku na t0 – t90 byl taktéž statisticky velmi vysoce významný (P<0,001). Vliv ředidla nebyl zjištěn na ukazatele t90 a t120 (P>0,05), na ukazatele t0 byl jeho vliv statisticky vysoce významný (P<0,01), na ukazatele t30 byl statisticky velmi vysoce významný (P<0,001) a na ukazatele t60 byl vliv statisticky významný (P<0,05). Vliv regrese na interakci množství odebraného ejakulátu, koncentrace spermií v ejakulátu a aktivity spermií po odběru byl statisticky velmi vysoce významný (P<0,001) na ukazatele t0, t60, t90 a t120, na ukazatele t30 statisticky vysoce významný (P<0,01).

Tab. 5. Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu 2

UKAZATEL	MODEL		Býk		S		Ředidlo		M*K*A	
	r2	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
t0	0,09	<0,001	6,76	<0,001	10,94	<0,001	5,14	0,002	9,19	<0,001
t30	0,10	<0,001	8,56	<0,001	14,92	<0,001	5,26	0,001	8,36	0,004
t60	0,11	<0,001	14,33	<0,001	14,76	<0,001	2,79	0,040	10,60	0,001
t90	0,13	<0,001	22,03	<0,001	9,51	<0,001	1,27	0,285	17,34	<0,001
t120	0,14	<0,001	24,84	<0,001	5,48	0,004	1,15	0,329	18,60	<0,001

Vysvětlivky: Býk – vliv býka; S – vliv pořadí skoku plemenného býka v den odběru; Ředidlo – vliv použitého ředidla; M*K*A – regrese na interakci množství, koncentrace a aktivity čerstvého ejakulátu; t0 – 120 - aktivita spermií v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií v %.

5.6. Vliv proměnných hodnot – býka, skoku a ředidla na aktivitu spermií v průběhu termodynamického testu přežitelnosti spermií

Byl sledován vliv jednotlivých proměnných (býk, skok, ředidlo) na aktivitu spermií po rozmrazení v určitém čase, výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

5.6.1. Vliv býka

Býk č. 1 měl ve všech časech (t_0 – 54,45 %, t_{30} – 50,83 %, t_{60} – 46,44%, t_{90} – 39,94%, t_{120} – 34,44%) nejlepší přežitelnost spermií oproti býkům č. 2, č. 3 a č. 4. S rostoucím časem (t_0 – t_{120}) klesaly pro jednotlivé býky hodnoty přežitelnosti. Mezi býkem č. 1 a býky č. 2 a č. 3 byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) ve všech časech (t_0 – t_{120}). V čase t_0 a t_{30} byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi býky č. 1 (t_0 – 54,45 %, t_{30} – 50,83 %) a č. 4 (t_0 – 45,22 %, t_{30} – 42,29 %), pro které byl také zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) v časech t_{60} , t_{90} a t_{120} . Průkazně nejhorší hodnoty přežitelnosti spermií přitom vykazoval býk č. 3 a to ve všech časech (t_{30} – 41,11 %, t_{60} – 34,15 %, t_{90} – 25,29 %, t_{120} – 18,65 %), kromě t_0 , kdy nejnižší hodnoty byly naměřeny u býka č. 4. a to 45,22 % přeživších spermií.

5.6.2. Vliv skoku

Nejvyšší hodnoty (50,66 %) byly naměřeny v čase t_0 u skoku č. 3, nejnižší pak (19,92 %) v čase t_{120} u skoku č. 1. Statisticky vysoce významné rozdíly ($P < 0,01$) byly naměřeny mezi skoky č. 1 a č. 2 v časech (t_0 , t_{30} , t_{60} a t_{90}) a mezi skoky č. 1 a č. 3 v čase t_{60} . Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) pak byly prokázány mezi skoky č. 1 a č. 3 v čase t_{90} a mezi skoky č. 1 a č. 2 v čase t_{120} .

5.6.3. Vliv ředidla

Nejlepší hodnoty přežitelnosti (51,68 %) byly naměřeny v čase t0 pro ředidlo Optidyl®, nejhorší pak (21,92 %) v čase t120 pro ředidlo Bioxcell®. Byly zjištěny statisticky vysoce významné rozdíly ($P < 0,01$) mezi ředidlem Bioxcell® a Optidyl® v časech t0 a t30. Byly zjištěny statisticky vysoce významné rozdíly ($P < 0,01$) mezi ředidlem Andromed® a Bioxcell® v čase t30. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) byly naměřeny mezi ředidlem Andromed® a Bioxcell® v čase t0 a t60.

Tab. 6. Vliv býka, skoku a ředidla na aktivitu spermií v průběhu termodynamického testu přežitelnosti spermií

proměnná	úrovně	t0	t30	t60	t90	t120
		LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
Býk	1	54,45 ± 1,913 ^{A,a}	50,83 ± 1,883 ^{A,a}	46,44 ± 1,834 ^A	39,94 ± 1,761 ^A	34,44 ± 1,814 ^A
	2	47,09 ± 1,794 ^B	42,77 ± 1,765 ^B	36,69 ± 1,719 ^B	27,82 ± 1,651 ^B	20,76 ± 1,701 ^B
	3	45,99 ± 1,797 ^B	41,11 ± 1,769 ^B	34,15 ± 1,722 ^B	25,29 ± 1,654 ^B	18,65 ± 1,704 ^B
	4	45,22 ± 1,998 ^b	42,29 ± 1,967 ^b	34,86 ± 1,915 ^B	28,14 ± 1,839 ^B	21,27 ± 1,895 ^B
S	1	43,26 ± 1,196 ^A	38,79 ± 1,178 ^A	31,89 ± 1,147 ^A	25,61 ± 1,101 ^{A,a}	19,92 ± 1,134 ^a
	2	50,64 ± 1,342 ^B	47,38 ± 1,321 ^B	39,56 ± 1,286 ^B	31,57 ± 1,235 ^B	24,34 ± 1,272 ^b
	3	50,66 ± 2,879	46,59 ± 2,834	42,65 ± 2,759 ^B	33,72 ± 2,650 ^b	27,08 ± 2,730
Řed	1	49,23 ± 1,504 ^a	46,41 ± 1,480 ^A	40,12 ± 1,441 ^a	31,85 ± 1,384	25,29 ± 1,426
	2	44,00 ± 1,504 ^{A,b}	39,92 ± 1,480 ^{B,C}	35,14 ± 1,441 ^b	28,41 ± 1,384	21,92 ± 1,426
	3	47,84 ± 1,502	43,76 ± 1,479	37,35 ± 1,440	30,00 ± 1,383	23,48 ± 1,425
	4	51,68 ± 1,502 ^B	46,91 ± 1,479 ^D	39,54 ± 1,440	30,94 ± 1,383	24,42 ± 1,425

Vysvětlivky: Býk 1 - KANTOR, NEA 665; Býk 2 - LUM, HRF 316; Býk 3 - KARTAGO, ZBA 341; Býk 4 - PORTHOS, ZAA 678; Skok 1 – první skok v den odběru; Skok 2 – druhý skok v den odběru; Skok 3 – dvojskok (první a druhý skok v den odběru smíchaný dohromady); Ředidlo 1 – Andromed®; Ředidlo 2 – Bioxcell®; Ředidlo 3 – Triladyl®; Ředidlo 4 – Optidyl®; t 0 – 120 - aktivita spermií v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií v %; A-B; C-D = průkaznost na hranici významnosti $P < 0,01$; a-b;c-d = průkaznost na hranici významnosti $P < 0,05$.

6. DISKUZE

6.1. Základní statistické charakteristiky hodnocených ukazatelů

V předložené práci byl studován vliv vnějších a vnitřních faktorů na kvalitu býčího ejakulátu, a to nejen na nativní semeno, ale i na inseminační dávky, jelikož dostatečně fertillní spermie, je předpokladem pro úspěšnou reprodukci hospodářských zvířat. Šlechtění a reprodukce chovných býků je o to sledovanější, o co má větší vliv na kvalitu budoucích plemenných zvířat. Mnoho autorů se právě kvůli těmto (a mnoha dalším důvodům) zabývá v souvislosti s různými vlivy vnějšího prostředí pozorováním, odběry a vyhodnocováním kvantity a kvality ejakulátu býků.

Pro průměrný objem ejakulátu jsou stanovené hodnoty 4 ml (MARVAN et al. 1992), na proti tomu GAMČÍK et al. (1992) uvádějí průměrný objem ejakulátu 6 cm³, a SOVA et al. (1981) udává 6 ml v rozmezí od (2 – 12 ml) jako průměrný objem ejakulátu u býka. Průměrné množství námi odebraných ejakulátů býků bylo 4,83 g, kde se hodnoty pohybovaly od 1,30 g do 10,60 g, což je ve shodě s literaturou. LOUDA et al. (2007) uvádí množství vyprodukovaného ejakulátu v rozmezí 3 – 12 cm³ u býků na inseminační stanici.

MÁCHAL et al. (1997) uvádí jako průměrnou koncentraci spermií v ejakulátu býka 1,22 mil / mm³. Jiní autoři stanovují průměrnou koncentraci spermií u býka na 1,2 mil / mm³, v rozmezí 0,5 – 2,2 mil / mm³ (KLIMENT et al. 1989). SOVA et al. (1981) se také zabývali průměrnou koncentrací spermií v ejakulátu, jež může dosahovat 1 – 2 mil / mm³. Podle GAMČÍK et al. (1992) společně s MARVANEM et al. (1992) je průměrná koncentrace spermií v ejakulátu 2 x10³ – 2 x10⁶ /mm³. Nejnižší námi naměřená koncentrace byla 0,60 x10⁶ /mm³, nejvyšší koncentrace 2,10 x10⁶ /mm³ a průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla 1,21 x10⁶ /mm³.

Průměrná aktivita spermií po odběru by neměla být nižší než 68,7 %. (MÁCHAL et al., 1997). Oproti tomu KLIMENT et al. (1989) stanovuje průměrnou aktivitu spermií v ejakulátu býka 80%, s hodnotami 40 – 90 %. Aktivita spermií po odběru v ejakulátech

sledovaných býků byla v průměru 79,70 %, kdy maximální aktivita dosáhla 90 % a minimální 70 %.

Další hodnocení bylo zaměřeno na vyhodnocení přežitelnosti spermií. Výrazně rozdílných výsledků dosáhl MUIÑO et al. (2009), kdy ve svém pokusu použil ejakulát rozdílného plemene býků (Asturiana de los Valles). Inseminační dávky byly rozmrazeny při teplotě 37 °C a následně vyhodnoceny pomocí systému CASA v čase 0h a dále po dvou hodinách. U rozmrazených dávek dosáhla motilita 78,8 % v čase 0h, po 2 hod inkubace se hodnota motility snížila v průměru na 76,9 %.

BALLASTER et al. (2007) ve své práci hodnotil ejakuláty býků plemene Swedish Red. Inseminační dávky byly po dobu 12 s rozmrazeny ve vodní lázni, která dosahovala teploty 35 °C, a následně analyzovány a dále hodnoceny po 30 minutových intervalech, s výsledkem $49,5 \pm 13,9$ % motilních spermií v čase t0 a $60,2 \pm 14,9$ % v čase t30.

Také CONTRI et al. (2010) hodnotil přežitelnost spermií býků plemene Swiss Brown při různých metodách rozmrazení inseminační dávky. Výsledky ukázaly, že při rozmrazení standartní metodou (ve 37 °C vodní lázni po dobu 1 min) přímočarého pohybu dosahovalo $48,1 \pm 7,6$ % spermií. Při metodě rozmrazení při teplotě 70 °C po dobu 5 sec spermie vykazovaly $45,0 \pm 5,0$ % aktivitu.

Námi naměřené hodnoty motility dosáhla rozdílných výsledků a to 47,38% po rozmrazení (v čase 0h), v čase t30 průměrně 43,43 %, 36,75 % v čase t60, v čase t90 29,34 % a po dvou hodinách 22, 90 %. Jiné výsledky mohou být zapříčiněny rozdílným typem použitého ředidla, věkem zvířat, rozdílným plemenem a kondicí zvířat, či jinou technikou zpracování a rozmrazení inseminační dávky. Oproti tomu výsledky jiných autorů (CONTRI et al. 2010) se dost shodují, s našimi výsledky.

6.2. Korelační analýza

Byly zjištěny statisticky významné ($P < 0,001$) kladné korelační koeficienty mezi býkem a pořadím skoku plemenného býka v den odběru, množstvím odebraného ejakulátu, termínovou teplotou vzduchu (T07, T14, T21), tlakem vodní páry a počtem hodin slunečního svitu.

Záporné hodnoty korelačních koeficientů mezi býkem a koncentrací spermií v ejakulátu, aktivitou spermií po odběru, aktivitou spermií v čase 120 min, časem maximálního nárazu větru a tlakem vzduchu byly zjištěny na hladině významnosti ($P < 0,001$).

6.3. Kvalitativní a kvantitativní vlivy působící na nativní ejakulát býků

Individualita a plemenná příslušnost býka je rozhodujícím faktorem ovlivňujícím přežitelnost spermií, což je podloženo testem průkaznosti, který byl statisticky vysoce významný ($P < 0,01$) na veškeré sledované ukazatele. Ačkoliv se býci liší v plemenné příslušnosti, podobné výsledky mohou být z důvodu stejného způsobu odchovu. HOFÍREK et al. (2009) ve svých studiích uvádí, že vliv způsobu odchovu a prostředí na plodnost býků je velice významný a v celkové reprodukci nezanedbatelný.

Býk Kantor vykazoval nejvyšší množství ejakulátu (6,59 g) a aktivity spermií (89,10 %). Tyto výsledky dokazují, že u mléčných plemen je aktivita a přežitelnost spermií vyšší, než u plemen masných. (ZAHRÁDKOVÁ et al., 2009). Toto zjištění vysvětluje faktem, že u plemen masných se všeobecně více využívá přirozená plemenitba, která zajišťuje lepší zabřezávání plemenic ve stádě, oproti tomu při využití umělé inseminace se může zvýšit genetický pokrok ve stádě. Během sledovaného období se objem odebraného ejakulátu pohyboval od 4,67 g u býka Kartaga do 6,59 g u býka Kantora, což je v souladu s literaturou, LOUDA et al. (2007) uvádí 3 – 12 cm³ jako množství odebraného ejakulátu u býků na inseminační stanici.

Není překvapením, že největší množství ejakulátu (8,37 g) v závislosti na pořadí skoku bylo naměřeno u dvojskoku (první a druhý skok v den odběru smíchaný dohromady), nicméně zde byla prokázána nejnižší koncentrace ($1,12 \times 10^6/\text{mm}^3$) a aktivita spermií (77,82 %). Nejméně ejakulátu (3,64 g) bylo odebráno při druhém skoku, avšak spermie z tohoto skoku získané vykazovaly nejvyšší aktivitu (82,23 %).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo při posouzení vlivu vlhkosti vzduchu. Byl prokázán staticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,001$) mezi všemi naměřenými hodnotami množství ejakulátu. Nejpozitivnějšího vliv na množství ejakulátu (5,75 g) bylo dosaženo při 76,05 – 84,72 % vlhkosti vzduchu. Nejméně významných výsledků na množství ejakulátu,

tak i na koncentraci spermií bylo dosaženo při vlhkosti, která se pohybovala >84,72 %. Naproti tomu nejvyšší aktivita spermií (81,31 %) byla naměřena právě při >84,72 % relativní vlhkosti vzduchu, což je v souladu s autory. PETERS & BALL (1986) a LOUDA et al. (2001) uvádějí, že jako minimální hodnota aktivity ejakulátu pro další zpracování se požaduje 70 %.

Vliv tlaku vzduchu byl také velice zajímavý. Z našich pokusů vyplývá, že ideálním tlakem pro správnou funkci pohlavních žláz a následnou bezproblémovou reprodukci, je tlak vzduchu v rozmezí 972,49 - 982,84 hPa pro velmi dobrý objem ejakulátu (5,75 g), pro koncentraci ($1,24 \times 10^6/\text{mm}^3$) u tlaku vzduchu vyššího než 982,84 hPa. LOUDA et al. (2007) uvádí jako průměrné aktivity odebíraných ejakulátu v rozmezí mezi 45 – 75. Nadprůměrná aktivita spermií (80,84 %) byla změřena při tlaku vzduchu menším než 972,49 hPa.

6.4. Vliv býka, skoku a ředidla na aktivitu spermií v čase 0 - 120 min. termodynamického testu přežitelnosti spermií

HOLT (2000) uvádí, že plodnost býka je jedním z mnoha dílčích faktorů, které se významně podílejí na celkové plodnosti dojníc. Technika zpracování a následná metoda výroby inseminační dávky významně ovlivňuje genetický potenciál plodnosti býka.

Důležitým faktorem přežitelnosti spermií je vliv individuality býka, typu užitkovosti i doba trvání termodynamického testu. Všechny ukazatele jsou statisticky významné a byla zjištěna jejich vzájemná korelace. Naopak vazba mezi býkem a ředidlem a ředidlem a extenderem nebyla statisticky významná, jak ve svých studiích uvádí MUIŇO et al. (2007).

Cílem práce nebylo vyhodnotit, který z býků byl v experimentu nejlepší, pro úplnost a objektivitu se však vliv býka v čase vyhodnocoval. Býk Kantor měl ve všech časech (t_0 – 54,45 %, t_{30} – 50,83 %, t_{60} – 46,44%, t_{90} – 39,94%, t_{120} – 34,44%) nejlepší přežitelnost oproti býkům Lumovi, Kartagovi a Porthosovi. Pro jednotlivé býky hodnoty přežitelnosti spermií s rostoucím časem (t_0 – t_{120}) klesaly. Z pokusu přežitelnosti spermií vyšel nejhůře býk Kartago (t_{30} – 41,11 %, t_{60} – 34,15 %, t_{90} – 25,29 %, t_{120} – 18,65 %), a to ve všech časech, kromě t_0 , kdy nejnižší hodnoty byly naměřeny u býka Porthose, a to 45,22 % přeživších spermií. Jeho oplozovací schopnost je tedy nejnižší ze všech sledovaných býků.

V minimální aktivitě spermií po rozmrazení inseminační dávky a následném zařazení býků do plemenitby se autoři rozcházejí. KLIMENT et al. (1983) uvádí, že minimální aktivita

spermií po rozmrazení nesmí klesnout pod 60 % a koncentrace pod $10 - 12 \times 10^6$, podle těchto měřítek, by ani jeden z býků v našem experimentu by nemohl být zařazen do procesu umělé inseminace. LOUDA et al. (2001) jako minimální požadovanou hodnotu aktivity spermií po rozmrazení uvádí 20 %. Této hranice nedosahuje pouze býk Kartago po dvou hodinách testu prežitelnosti.

Aktuální norma v ČR popisuje jako minimální koncentraci v době inseminace 10 miliónů spermií, jinými slovy v době mrazení musí nejméně 40 % spermií vykazovat přímočarý pohyb (HOFÍREK et al. 2009). FILIPČÍK et HANULÁKOVÁ (2011) k tomu dodávají, že aktivita spermií v rozmražené inseminační dávce musí být minimálně 30% a více progresivních spermií, což je v souladu s našimi výsledky.

Pro termodynamický test prežitelnosti spermií byly vybrány vzorky od mléčných i masných plemen. Experiment potvrdil vyšší prežitelnost spermií u mléčných plemen, což se shoduje s výsledky jiných autorů (ZAHRÁDKOVÁ et al. 2009).

Zajímavých výsledků bylo zjištěno u dvojskoku (první a druhý skok v den odběru smíchaný dohromady), byly u něj naměřeny nejvyšší hodnoty (50,66 %) v čase t0 u skoku, nejnižší aktivita spermií (19,92 %) pak byla v čase t120 u ejakulátu získaného z prvního skoku. S rostoucím časem hodnoty klesaly, nezávisle na skocích, ředidlech a býcích.

Ředidla a jejich aditiva byla v posledních letech průběžně zkoumána, stejně tak různé délky a způsoby chlazení, mrazení a rozmrazování býčího ejakulátu (HOLT 2000). Druh ředidla a způsob ředění ejakulátu je nezbytnou a velmi důležitou součástí přípravy inseminační dávky, protože kvalitní ředidla předcházejí destrukci spermií v procesu mrazení. Důležitou součástí experimentu tak byl také vliv určitého ředidla na reprodukční ukazatele spermií. TATHAM (2000), uvádí, že současné typy ředidel obsahují specifické biochemické látky ovlivňující a zvyšující oplození schopnost spermií po rozmrazení.

Existuje mnoho typů ředidel, a nejen komerčně vyráběná. GACITUA et al. (2005) uvádí jako nejznámější komerčně vyráběné ředidlo Andromed®, které neobsahuje žloutek. Bioxcell je dalším typem komerčně vyráběného a běžně v praxi využívaného ředidla na bázi sojového lecitinu (STRADIOLI et al. 2007). Biladyl® a Triladyl® jsou typem ředidla na bázi vaječného žloutku (MUIÑO et al. 2007), dalšími zástupci mohou být ředidla na bázi Tris (hydroxymethyl) aminomethan, mléčná ředidla v kombinaci s citrátem nebo fruktózou, ředidla na bázi sacharózy, laktózy a mnoho dalších (SALOMON a MAXWELL, 1995).

Dalo by se říci, že Triladyl® bude vyhodnocen jako nejlepší ředidlo, protože jednou z jeho složek je vaječný žloutek a LDL. JANETT et al. (2005) se shodují, že Triladyl® sice dosahuje nejlepší životaschopnosti spermií avšak nejhorší motility v porovnání s AndroMedem® a Bioxcellem®. HEROLD et al. (2003) uvádí, že na rozdíl od AndroMedu®, pokud se při dlouhodobé konzervaci přidala homogenní semenná plazma k Triladylu®, byla potvrzena výrazně vyšší přežitelnost spermií po 2 hodinách po rozmrazení.

Nejlepších výsledků na začátku (v čase 0 a 30) dosáhli Optidyl® (51,68 %, 46,91 %) a AndroMed® (49,23 %, 46,41 %). Jako nejhorší ředidlo byl vyhodnocen Bioxcell® (44,00 %, 39,92 %). Na konci termodynamického testu (t120) nejlepších výsledků dosáhl AndroMed® (25,29 %). S rostoucím časem hodnoty klesaly, nezávisle na skocích, ředidlech a býcích.

Celkově tedy výsledky termodynamického testu přežitelnosti spermií udávají jako nejvhodnější ředidlo Optidyl®, které je na bázi žloutku. Tento výsledek se shoduje s ostatními autory (POLGE & ROWSON, 1952; MUIÑO et al., 2007), kteří uvádí, že ředidla na bázi vaječného žloutku jsou lepší než ředidla bezžloutková, chrání spermatické buňky a mají velice příznivé kryoprotektivní účinky.

Společně s Optidylem® bylo vyhodnoceno jako nejlepší ředidlo AndroMed®, je zajímavé, že se jedná o ředidlo bezžloutkové. Ve všech časech u nich bylo zjištěno nejvyšší procento progresivních spermií.

7. ZÁVĚR

Cílem předkládané práce bylo detekovat významnost vztahu mezi vlivem vnějších faktorů (klimatické podmínky, technologie ustájení, výživa zvířat, frekvence odběru, manipulace s ejakulátem) a vnitřních podmínek (plemeno, genotyp, individualita zvířete, věk zvířete).

Hlavním tématem práce bylo zhodnotit vliv klimatických podmínek a kvalitou nativního ejakulátu, respektive inseminačních dávek plemenných býků. Tento vliv byl vyjádřený přežitelností spermií v průběhu tepelného termodynamického testu.

Hypotézou je předpoklad, že nepříznivé klimatické podmínky, především vysoká teplota vzduchu, negativně ovlivňuje aktuální, respektive budoucí kvalitu čerstvého ejakulátu býků a tím i přežitelnost spermií po rozmrazení inseminační dávky.

Základní statistické ukazatele sledovaných býků se shodovaly s fyziologickým rozpětím hodnot. Kvalitativní a kvantitativní parametry odebraných ejakulátů jednotlivých býků vyhovovaly požadavkům na kvalitu ejakulátu býků chovaných na inseminační stanici a používaných v plemenitbě.

Během sledovaného období se objem odebraného ejakulátu pohyboval od 4,67 g u býka Kartaga do 6,59 g u býka Kantora, což je v souladu s literaturou. Průměrné množství odebraného ejakulátu bylo 4,83 g, s koncentrací $1,21 \times 10^6/\text{mm}^3$. V nativním ejakulátu aktivita spermií po odběru dosáhla 79,70 %. Motilita spermií měla v průběhu celého testu přežitelnosti spermií klesající charakter (ze 47,38 na 22,90 %). Námi získané výsledky dokumentují uvedené tvrzení dle významného poklesu motility spermií po rozmrazení inseminačních dávek.

Kladné korelační koeficienty byly detekovány mezi býkem a pořadí skoku plemenného býka v den odběru, množstvím odebraného ejakulátu, termínovou teplotou vzduchu (T07, T14, T21), tlakem vodní páry a počtem hodin slunečního svitu na hladině významnosti ($P < 0,001$). Bohužel se nepodařilo prokázat, zda vysoká teplota negativně ovlivňuje kvalitu ejakulátu, protože průměrné teploty dosahovaly pouze nízkých hodnot, které ejakulát ovlivňovaly spíše kladně.

Naopak mezi býkem a koncentrací spermií v ejakulátu, aktivitou spermií po odběru, aktivitou spermií v čase 120 min, časem maximálního nárazu větru a tlakem vzduchu byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti ($P < 0,001$).

Mezi býkem a aktivitou spermií v čase t_0 , t_{30} a t_{60} byly zjištěny záporné korelace na hladině významnosti ($P < 0,05$). Mezi býkem a aktivitou spermií v čase t_{90} byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti ($P < 0,01$).

Z experimentu vyplývá, že nebyla zjištěna průkazná závislost mezi býkem a ředidlem, průměrnou rychlostí větru, rychlostí a směrem maximálního nárazu větru, relativní vlhkostí vzduchu a denním úhrnem srážek.

Bylo také hodnoceno pořadí skoku na kvalitu ejakulátu. Nejlepších výsledků u objemu ejakulátu bylo dosaženo u prvního a druhého skoku v den odběru smíchané dohromady (8,37 g). Z námi dosažených výsledků vyplývá, že nejvyšší aktivity (82,23 %) dosahovaly spermie při druhém skoku. Pořadí skoku je tudíž velmi důležitým faktorem a významně ovlivňuje kvalitu ejakulátu, resp. kvalitu inseminační dávky.

Staticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,001$) byl prokázán mezi všemi naměřenými hodnotami množství ejakulátu a vlhkostí vzduchu. Při vysoké vlhkosti vzduchu ($> 84,72$ %) byla zjištěna nejvyšší progresivita spermií (81,31 %). Vliv tlaku vzduchu byl také zajímavý.

Průkaznost vlivu tlaku na kvalitativní a kvantitativní vlastnosti ejakulátu byla prokázána. Z našich pokusů vyplývá, že ideálním tlakem pro správnou funkci pohlavních žláz a následnou bezproblémovou reprodukci, je tlak vzduchu v rozmezí 972,49 - 982,84 hPa pro velmi dobrý objem ejakulátu (5,75 g). Nadprůměrná aktivita spermií (80,84 %) byla změřena při tlaku vzduchu menším než 972,49 hPa.

Důležitým faktorem přežitelnosti spermií je vliv individuality býka, typu užitkovosti i doba trvání termodynamického testu. Všechny ukazatele jsou statisticky významné a jejich vzájemný vliv byl průkazný. Nejlepších výsledků v termodynamickém testu přežitelnosti spermií dosáhl býk Kantor, nejhorší byl býk Kartago, jehož aktivita po 2 h termodynamického testu nedosahovala ani 20 %.

Vzorky ejakulátu pro termodynamický test přežitelnosti spermií byly vybrány od mléčných i masných plemen. Experiment potvrdil vyšší přežitelnost spermií u mléčných plemen.

Druh ředidla a způsob ředění ejakulátu je nezbytnou a velmi důležitou součástí přípravy inseminační dávky, protože kvalitní ředidla předcházejí destrukci spermií v procesu mražení. Důležitou součástí experimentu tak byl také vliv určitého ředidla na reprodukční ukazatele spermií.

Výsledky námi prováděného termodynamického testu přežitelnosti spermií vyhodnocují žloutkové ředidlo Optidyl® jako nejvhodnější ředidlo, společně s ředidlem AndroMed®, které funguje na bezžloutkové bázi. Ve všech časech u nich bylo zjištěno nejvyšší procento progresivních spermií. Výsledky pokusu jsou zajímavé, protože většina autorů uvádí nejlepší výsledky právě u ředidel na bázi žloutku, které mají velice pozitivní kryoprotektivní účinky.

Z námi dosažených výsledků jsou patrné individuální rozdíly v objemu ejakulátu, koncentraci a motilitě spermií nejenom ihned po odběru a po naředění, ale i po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek. Tyto výsledky naznačují možné odlišné požadavky na řízení a způsob chovu plemeníků a dostupné metody výroby inseminačních dávek v závislosti na plemeni, resp. produkčním typu plemeníků, individualitě, věku a klimatických podmínkách.

8. SEZNAM LITERATURY

AKHTER, S., SAJJAD, M., ANDRABI, S. M. H., ULLAH, N., QAYYUM, M., (2007): Effect of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 27 (1), s. 13-16.

ALI, H., ALA – UD - DIN, H. A. SAMAD, S., (1994): Comparative effects of combiotic, ampicillin and gentamycin sulphate on motility percentage liveability and absolute index of liveability in the buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 14: 223-227

ANDERSON, J. M. L., AP DEWI, I., AXFORD, R. F. E., (1996): The effect of selenium supplementation on fresh and frozen ram semen. *Anim. Sci.* 62, 672.

ANDRABI, S. M. H., N. AHMAD, A. ABBAS, M., (2001): Effect of two different antibiotik combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 21: 166-169.

AMIRAT, L, TAINTURIER, D., JEANNEAU, L., THORIN, C., GERARD, O., et al., (2004): Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, s. 895-907.

AMIRAT, L., ANTON, M., TAINTURIER, D., CHATAGNON, G., BATTUT I., COURTENS, J. L., (2005): Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing, *Reproduction*, 129, 535 – 543.

AWAD, M. M., (2011): Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123, s. 157-162.

BALL, P. J. H., PETERS, A. R., (2004): *Reproduction in Cattle*, 3rd edition, Blackwell Publishing, UK, ISBN: 1-4051-1545-9.

BALLASTER, J., JOHANNISSON, A., SARAVIA, F., HAARD, M., GUSTAFSSON, H., BAJRAMOVIC, D., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., (2007): Post-thaw viability of bull AI - doses with low-sperm numbers. *Theriogenology* 68, 934 – 943.

BERGERON, A., BRINDLEY, Y., BLODNIN, P., MANJUNATH, P., (2007): Milk ca-seins decrease the binding of the major, bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, 77, s. 120-126.

BERNDSTON, W. E., (1977): Methods of quantifying mammalian spermatogenesis: A Review. *J. Anim. Sci.* 44:818.

BOUSSEAU, S., BRILLARD, J. P., MARQUANT-LE GUIENNE, B., GUÉRIN, B., CAMUS, A., LECHAT, M., (1998): Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk source and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50, s. 699-706.

BOUŠKA, J., DOLEŽAL, O., JÍLEK, F., KUDRNA, V., KVAPILÍK, J., PŘIBYL, J., RAJMON, R., SEDMÍKOVÁ, M., SKŘIVANOVÁ, V., ŠLOSÁRKOVÁ, S., TYROLOVÁ, Y., VACEK, M., ŽIŽLAVSKÝ, J., (2006): Chov dojeného skotu, Profi Press, s.r.o., Praha, s. 186. ISBN 80-86726-16-9.

BRITO, L. F. C., SILVA, A. E. D. F., RODRIGUES, L. H., VIEIRA, F. V., DERAGON, L. A. G., KASTELIC, J. P., (2002): Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58 (6), 1175–1186.

BRONSON, F. H., (1989): Mammalian reproductive biology. University of Chicago Press, New York.

- BRYANT, J., LOPEZ-VILLALOBOS, N., HOLMES, C., PRYCE, J., (2005): Simulation modelling of dairy cattle performance based on knowledge of genotype, environment and genotype by environment interactions: current status. *Agric. Syst.*, 86(2), 121-143.
- CASTILLO - JUAREZ, H., OLTENACU, P. A., CIENFUEGOS - RIVAS E. G., (2002): Genetic and phenotypic relationships among milk production and composition traits in primiparous Holstein cows in two different herd environments. *Livest. Prod. Sci.* 78, 223-231.
- CONTRI, A., VALORZ, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L., CARLUCCIO, A., (2010): Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424 – 435.
- DE JARNETTE, J. M., MARSHALL, C. E., LENZ, R. W., MONKE, D. R., AYARS, W. H., SATTLER, C.G., (2004): Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: The role of the artificial insemination industry. *J. Dairy Sci.*, 87 (E suppl.), s. E93-E104.
- DIARRA, M. S., PARE, J. P., ROY, G., (1997): Genetic and environmental factors affecting semen quality of young Holstein bulls. *Can. J. Anim. Sci.* 77, 77–85.
- DOMINIK, S., CROOK, B. J., KINGHORN, B. P., (2001): The effect of genotype x environment interaction on different traits in different environments. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Gen.* 14: 385-388.
- DORST, J., (1991): Morphologie des Geschlechtssystems. In: Busch, W., Löhle, K., Peter, W. (Eds.), *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. Gustav Fischer Jena, Stuttgart, pp. 169–208.
- EVERETT, R. W., BEAN, B., FOOTE, R. H., (1978): Sources of variation of semen output. *J. Dairy Sci.* 61 (1), 90–95.
- EVERETT, R. W., BEAN, B., (1982): Environmental influences on sperm output. *J. Dairy Sci.* 65, 1303–1310.

FIELDS, M. J., BURNS, W. C., WARNICK, A. C., (1979): Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *J. Anim. Sci.* 48, 1299–1304.

FILIPČÍK, R., HANULÁKOVÁ, Š., (2011): Vliv způsobu rozmrazení inseminační dávky skotu na aktivitu spermií. *Výzkum v chovu skotu*, 53 (3), s. 12 – 16.

FRISCH, J. E., (1981): Changes occurring in cattle as consequence of selection for growth in a stressful environment. *J. Agric. Sci., Camb.* 96, 23-28.

GACITUA, H., ARAV, A., (2005): Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63, 931 – 938 s.

GAMČÍK, P., SKALA, J., LOJDA, L. (1980): Plodnosť hovädzieho dobytku a jej poruchy, *Príroda*, 3. přepracované a doplněné vydání, Bratislava, 407 s.

GAMČÍK, P., KOZUMPLÍK, J., (1992): *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava, *Príroda*, 299 s. ISBN 80-07-00540-4.

GARNER, D. L., THOMAS, C. A., GRAVANCE, C. G., (1999): The Effect of Glycerol on the Viability, Mitochondrial Function and Acrosomal Integrity of Bovine Sperma-tozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, 34, s. 399-404.

GLEN, D., O'DELL, HURST, V., (1956): The effect on glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk, podium citrate and skim milk semen extenders. *J. Dairy Sci.*, 39, s. 1156-1160.

GORDON, I., (2004): *Reproduction technologies in farm animals*, CABI Publishing, 7th Floor, UK, ISBN 0-85199-862-3.

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E., (2006): *Reproduction in farm animals*, 7th edition, Blackwell Publishing, USA, ISBN: 978-0-6833-0577-7.

HEROLD, F. C., GERBER, D., AURICH, J. E., (2003): Influence of homologous semi-nal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl or AndroMed. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 90 (3), s. 58-61.

HOFÍREK, B., DVOŘÁK, R., NĚMEČEK, L., POSPÍŠIL, Z. a kol., (2009): *Nemoci skotu*. Česká buiatrická společnost, Brno, s. 1149. ISBN 978-80-86542-19-5.

HOLT, W. V., (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 3-22.

HOLT, W. V., MEDRANO, A., THURSTON, L. M., WATSON, P. F. (2005): The significance of cooling and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63, 370-382.

HUSSAIN, S. S., AHMAD, N., ALA-UD-DIN, CHAUDHRY, N. A., (1990): Effect of different antibiotics on motility and liveability of spermatozoa and viable bacterial count in buffalo semen. *Pakistan Vet. J.*, 10, s. 171-174.

CHANDLER, J. E., ADKINSON, R. W., HAY, G. M., CRAIN, R. L., (1985): Environmental and genetic sources of variation for seminal quality in mature Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 68, 1270–1279.

CHEMINEAU, P., (1994): Medio ambiente y reproduction animal. *Rev. Mund. Zootech.* 77, 2–14.

IGBOELI, G., RAKHA, A. M., (1971): Seasonal changes in the ejaculate characteristics of Angoni (short horn zebu) bulls. *J. Anim. Sci.* 33, 651–654.

JANETT, F., KEO, S., BOLLWENIN, H., HÄSSIG, M., THUN, R., (2005): Comparison of AndroMed, Bioxcell and Triladyl extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch Tierheilk*, 147, s. 62.

JANUSKAUSKAS, A., (1999): Assessment of viability and function of post-thaw spermatozoa from Swedish dairy AI bulls. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, ISSN 1401-6257. ISBN 91-576-5435-2.

JOHNSTON, J. E., NAELAPAA, H., FRYE, J. B., (1963): Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbreed bulls exposed to high temperatures and humidity. *J. Anim. Sci.* 22, 432–436.

KELSO, K. A., REDPATH, A., NOBLE, R. C., SPEAKE, B. K., (1997): Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. Reprod. Fert.* 109, 1–6.

KENDALL, N. R., MCMULLEN, S., GREEN, A., RODWAY, R. G., (2000): The effect of zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 277–283.

KLIMENT, J., KLIMENT, M. et al., (1983): *Reprodukcia hospodárskych zvierat, Príroda, vydavateľstvo kníh a časopisov, n.p., Bratislava, 378 s. ISBN: 301-04-46.*

KOMISURD, E., ANDERSEN BERG, K., (1996): The influence of duration of sexual preparation on bovine semen characteristics and fertility rates. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 369–371.

KUMI - DIAKA, J., NAGARATNAM, V., RWUAAN, J. S., (1981): Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. *Vet. Rec.* 108, 13–15.

LOUDA, F., ČEŘOVSKÝ, J., JEŽKOVÁ, A., STÁDNÍK, L., (2001): Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod, ČZU v Praze, s. 225, ISBN: 80-213-0702-1.

LOUDA, F., BJELKA, M., JEŽKOVÁ, A., POZDÍŠEK, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., (2007): Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby, Výzkumný ústav pro chov skotu, s. r. o. Rapotín, s. 43, ISBN: 978-80-87144-01-5.

MÁCHAL, L., KŘIVÁNEK, I., CHLÁDEK, G., DOLEŽAL, P., (1997): Correlation between the relative permittivity, conductivity, and qualitative indicators of bull and boar ejaculates. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 6, 13 – 22.

MAJZLÍK, I., (2000): Chov zvířat I. Česká zemědělská univerzita, 220 s, ISBN: 8021306416

MAKULSKA, J., HAGGER, C., KUNZI, N., KUPFERSCHMIED, H. U., (1993): Genetic and environmental influences on semen traits in A.I. bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 279 - 284.

MARVAN, F., HAMPL, A., HLOŽÁNKOVÁ, E., KRESAN, J., MASSANYI, L., VERNEROVÁ, E., (1992): Morfologie hospodářských zvířat. VŠZ Praha a VŠZ Brno, 303 s, ISBN 8020902732.

MATHEVON, M., BUHR, M. M., DEKKERS, J. C. M., (1998): Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 81, 3321–3330.

MEYERHOEFFER, D. C., WETTEMANN, R. P., COLEMAN, S. W., WELLS, M. E., (1985): Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *J. Anim Sci.* 60 (2), 352–357.

MILOVANOV, V. K., (1962): Biology of reproduction and artificial insemination of animals. Selhozizdat, Moscow, 696 pp.

MOCÉ, E., GRAHAM, J. K., (2006): Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84, s. 826-833.

MOCÉ, E., GRAHAM, J. K., (2008): In vitro evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 105 (1-2), s. 104-118.

MUIÑO, R., FERNÁNDEZ, M., PENA, A. I., (2007): Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h. *Reprod. Dom. Anim.*, 42 (3), 305 – 311.

MUIÑO, R., PEÑA, A., RODRÍGEUZ, A., TAMARGO, C., HIDALGO, C., (2009): Effect of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Austrian de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860 – 868.

NEBEL, R. L., VISHWANT, R., MCMILLAN, W. H., SAACKE, R. G., (1993): Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: A review. *Reprod. Fert. Dev.* 5(6), 701-712.

NEELY, J. D., JOHNSON, B. H., DILLARD, E. U., ROBISON, O. W., (1982): Genetic parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. *J. Anim. Sci.* 55 (5), s. 1033-1040.

ORDONEZ, J., (1990): Breeding beef cattle in Latin American tropics. *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.* 15, 254-260.

PETELÍKOVÁ, J., (1998): Historický vývoj, současný stav a výsledky inseminace skotu v České republice, s. 12-18. In: 50 let inseminace v ČR, Českomoravská společnost chovatelů s.r.o, 94 s.

PETER, W., (1991): Künstliche Besamung beim Rind. In: Busch, W., Löhle, K., Peter, W. (Eds.), *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. Gustav Fischer Jena, Stuttgart, pp. 311–316.

POLGE, C., ROWSON, L. E. A., (1952): Results with bull semen stored at -79°C. Veterinary Record, 64, 851 – 854. In: AMIRAT et al., (2005): Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. Reproduction, 129, 535 – 543.

REKWOT, P. I., VOH Jr., A. A., OYEDIPE, E. O., OPALUWA, G. I., SEKONI, V. O., DAWUDA, P. M., (1987): Influence of season on characteristics of the ejaculate from bulls in an artificial insemination center in Nigeria. Anim. Reprod. Sci. 14, 187–194.

RODRIGUEZ, O. L., BERNDTSON, W. E., ENNEN, B. D., PICKETT, B. W., (1975): Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. J. Anim. Sci., 41, s. 129-136.

RODRIGUEZ - MARTÍNEZ, H., LARSSON, B., PERTOFT, H., (1997): Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod. Fertil. Dev. 9, 297–308.

ROOKE, J. A., SHAO, C. C., SPEAKE, B. K., (2001): Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. Reproduction 121, 315–322.

ŘÍHA, J., (1996): Reprodukce ve stádě skotu, Výzkumný ústav pro chov skotu, s. r. o. Rapotín.

SALAMON, S., MAXVELL, W. M. C., (1995): Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci., 37, 185 – 249.

SAMBRAUS, H. H., (2006): Atlas plemen hospodářských zvířat. Praha: Nakladatelství Brázda. 295 s. ISBN 80-209-0344-5.

SANSONE, G., NASTRI, M. J. F., FABBROCINI, A., (2000): Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod. Sci., 62: 55-76.

SAS Institute Inc. (2011): SAS/STAT[®] 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SAUNDERS, P. T. K., (2003): Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. Reprod. Suppl. 61, 91–101.

SIDDIQUE, M., ALI, R., RAZA, A., (2006): Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. Journal of agriculture & social sciences, 2, 2, 117 – 119.

SKINNER, J. D., LOUW, G. N., (1966): Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. J. Appl. Phys. 21, 1784–1790.

SODERQUIST, L., JANSON, L., HAARD, M., EINARSSON, S., (1996): Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. Anim. Reprod. Sci. 44, 91–98.

SOVA, Z., BUKVAJ, J., KOUDELA, K., KROUPOVÁ, V., PJESČAK, M., PODANÝ, J., (1981): Fyziologie hospodářských zvířat. Praha, SZN, 511 s. ISBN neuvedeno.

STALHAMMAR, E. M., JANSON, L., PHILLIPSON, J., (1989): Genetic studies on fertility in A.I. bulls. I. Age, season and genetic effects on semen characteristics in young bulls. Anim. Reprod. Sci. 19 (1–2), 1–17.

STEPHAN, E., LORRMANN, W., DYCKA, J., (1971): Zur Problematik der Klimaempfindlichkeit bei Haustieren (III). Auswirkungen experimenteller Wärmebelastungen auf Bullen – 1. Mitteilung: Einige meßbare Eigenschaften des Ejakulates. Zuchthygiene 1, 19–38.

STRADIOLI, G., NORO, T., SYLLA, L., MONACI, M., (2007): Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67, 1249 – 1255.

ŠMERHA, J., LOUDA, F., (1980): Reprodukce hospodářských zvířat, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 270 s, ISBN neuvedeno.

TAKAHASHI, T., ITOH, R., NISHINOMIYA, H., KATOH, M., MANABE, N., (2012): Effect of Linoleic Acid Albumin in Dilution Solution and Long-term Equilibration for Freezing of Bovine Spermatozoa with Poor Freezability. *Reprod. Dom. Anim.*, 47, s. 92-97.

TATHAM, B., (2000): Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. Report Rur. Indust. Res Corp. Dev., Kingston, ACT, Australia.

TAYLOR, J. F., BEAN, B., MARSHALL, C. E., SULLIVAN, J. J., (1985): Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 68, 2703–2722.

THACKER, D. L., ALMQUIST, J. O., (1951): Milk and milk-products as diluters for bovine semen. *J. Anim. Sci.*, 10, s. 1082 (abstr).

THURSTON, L. M., WATSON, P. F., HOLT, W. V. (2002): Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation, *Cryo Letters*, 23, 255-262.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M., HARING, R. M., KAALLANSBERGEN, L. M. T. E., DEN DAAS, J. H. G., (2000): Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, 54, 57 – 67.

VEŽNÍK, Z., ŠVECOVÁ, D., ZAJÍCOVÁ, A., PŘINOSILOVÁ, P., (2004): Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVeL, Brno, 197 s.

VISHWANATH, R., PITT, C. P., SHANNON, P., (1996): Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 56, 31–34.

WATSON, P. F., (1990): Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G. E. Ed., *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 747–869.

WOLFENSON, D., ROTH, Z., MEIDAN, R., (2000): Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61, 535–547.

YANAGIMACHI, R., (1988): Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, 1, 135- 185.

ZAHRÁDKOVÁ, R., BUREŠ, D., BARTOŇ, L., (2009): *Masný skot od A do Z*. Praha: Český svaz chovatelů masného skotu, s. 397. ISBN 978-80-254-4229-6.