

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

Bc. KAROLÍNA WERNEROVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chovu a šlechtění zvířat



Hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Martin Hošek, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Karolína Wernerová

Brno 2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Karolína Wernerová**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Zootechnika
Název tématu: **Hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen**
Rozsah práce: 50-60 stran textu a přílohy

Zásady pro vypracování:


1. Studentka se zaměří na problematiku hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen na ŠZP Žabčice a u soukromých chovatelů.
2. Posoudí kvalitu získaných ejakulátů běžnými makroskopickými metodami – vyhodnotí objem, barvu, konzistenci, pach ejakulátu a obsah cizích přímísenin.
3. Dále stanoví aktivitu spermií, jejich koncentraci v ejakulátu a zastoupení morfologických defektů.
4. Získané výsledky vyhodnotí vhodnými matematicko-statistickými metodami a vhodnou formou je předá chovatelům, resp. chovatelské veřejnosti.

Seznam odborné literatury:

1. LOUDA, F. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU Praha, 2001. 225 s. ISBN 80-213-0702-1.
2. LOUDA, F. *Reprodukce hospodářských zvířat I. Návody ..*
3. GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. 3. vyd. Bratislava: Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
4. ŘÍHA, J. *Plemenitba hospodářských zvířat*. Výzkumný ústav chovu skotu Rapotín, 2003. 151 s.
5. ŘÍHA, J. *Reprodukce o proces šlechtění skotu*. Výzkumný ústav chovu skotu Rapotín, 2000. 144 s.


Datum zadání diplomové práce: říjen 2013

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2015


Bc. Karolína Wemerová
Autorka práce




Ing. Martin Hošek, Ph.D.
Vedoucí práce


prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Vedoucí ústavu


prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen* vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Martinu Hoškovi, Ph.D., za odborné připomínky, konzultace a odborné vedení při vypracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Michaele Paldusové za pomoc při zpracování preparátů a výsledků a také své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Cílem diplomové práce je prozkoumat problematiku hodnocení ejakulátů beranů a vyhodnotit kvalitu ejakulátů pomocí makroskopických i mikroskopických metod. V období od 1. ledna do 31. března roku 2015 bylo provedeno celkem 69 odběrů ejakulátů od 7 beranů kombinovaného plemene Zwartbles v majetku Ing. Martina Hoška, Ph.D., 4 beranů plemene Suffolk a 1 berana plemene Charollais chovaných na Školním zemědělském podniku Žabčice Mendelovy univerzity v Brně. Ihned po odběru bylo u všech vzorků provedeno makroskopické a mikroskopické vyšetření, které zahrnovalo zjištění objemu ejakulátu, aktivity a koncentrace spermií. Pro zhodnocení morfologických parametrů beraních ejakulátů byly zhotoveny morfologické nátěry, které byly převezeny do laboratoře oddělení reprodukce hospodářských zvířat Ústavu a šlechtění zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Sledovány byly především změny na hlavičce, akrozomu, spojovací části a bičíku (torze, DAG efekt). Dále pak byla sledována přítomnost spermií nezralých a degenerovaných. Z výsledků vyplývá, že na kvalitu ejakulátu má vliv jak věk beranů, tak především frekvence odběrů a velikost varlat, ale rozdíly mezi plemeny s různou užitkovostí nebyly výrazné.

Klíčová slova: beraní ejakulát, objem, aktivita, koncentrace, morfologie spermií

Abstract

The aim of this thesis was to investigate the issues of ejaculate evaluation and analyse the quality of ejaculates via macroscopic and microscopic methods. From 1st January to 31st March 2015, 69 ejaculates were collected from 7 rams of the dual-purpose Zwartbles breed owned by Ing. Martin Hoška, PhD, 4 rams of the Suffolk breed and 1 ram of the Charollais breed from the School Agricultural Facility Žabčice of Mendel University in Brno. Macroscopic and microscopic analyses were performed immediately after sample collection, including the detection of the ejaculate volume as well as the sperm activity and concentration. For the evaluation of morphological parameters of the ram ejaculates, morphological smears were performed, which were transported to a laboratory of the Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno. Mainly changes in the sperm head, acrosome, midpiece and tail (torsion, DAG effect) were monitored. Further, the presence of immature and degenerated sperm was also monitored. The results show that the quality of ejaculate is influenced by the age of the rams and particularly by the frequency of the sampling and the size of the testicles whereas the difference between the breeds of distinct purpose was not significant.

Key words: ram ejaculate, volume, activity, concentration, sperm morphology

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce	8
3	Literární přehled.....	9
3.1	Anatomie pohlavních orgánů berana	9
3.1.1	Varlata	9
3.1.2	Nadvarlata.....	10
3.1.3	Chámovod.....	10
3.1.4	Přidatné pohlavní žlázy	11
3.1.4.1	Měchýřkovité žlázy	11
3.1.4.2	Předstojná žláza	12
3.1.4.3	Bulbouretrální žláza.....	12
3.1.5	Pyj.....	12
3.2	Ejakulát	13
3.2.1	Vývoj spermií	14
3.2.1.1	Spermatocytogeneze.....	14
3.2.1.2	Spermiogeneze.....	15
3.2.2	Semenná plazma	15
3.2.3	Spermie.....	16
3.3	Neurohormonální řízení reprodukce beranů	16
3.3.1	Gonadotropin releasing hormon (GnRH)	17
3.3.2	Folikuly stimulující hormon (FSH, folitropin).....	18
3.3.3	Luteinizační hormon (LH, lutropin)	18
3.3.4	Testosteron	18
3.3.5	Inhibin.....	18
3.4	Pohlavní chování a pohlavní reflexy	19

3.5	Příprava beranů na připouštěcí období	19
3.5.1	Pohlavní aktivita ovcí	20
3.5.2	Ustájení beranů	20
3.5.3	Výživa a krmení	21
3.5.4	Klimatické faktory	21
3.5.5	Návyk na odběr semene	22
3.5.6	Stříž vlny a ošetření paznehtů	23
3.5.7	Kontrola pohlavních orgánů	23
3.5.8	Připouštěcí plán	23
3.5.9	Péče o berany prubíře	24
3.6	Získávání ejakulátu od beranů	24
3.6.1	Odběr semene do umělé vagíny	25
3.6.1.1	Příprava umělé vagíny na odběr semene	25
3.6.1.2	Postup při odběru	26
3.6.2	Odběr semene elektroejakulací	27
3.6.2.1	Postup při odběru	27
3.7	Vlastnosti ejakulátu berana	28
3.7.1	Laboratorní vyšetření	29
3.7.2	Makroskopické vyšetření	29
3.7.2.1	Objem ejakulátu	29
3.7.2.2	Hustota ejakulátu	30
3.7.2.3	Barva ejakulátu	30
3.7.2.4	Cizí přímíseniny	30
3.7.3	Mikroskopické vyšetření	30
3.7.3.1	Koncentrace spermíí	31
3.7.3.2	Aktivita spermíí	32
3.7.4	Stanovení rezistence	33

3.7.5	Dehydrogenační zkouška.....	33
3.7.6	pH ejakulátu.....	34
3.7.7	Tepelný test přežitelnosti.....	34
3.7.8	Stanovení patologických spermií	34
3.7.8.1	Vývojové tvarové anomálie degenerativního charakteru	35
3.7.8.2	Patologické formy ve tvaru hlaviček.....	36
3.7.8.3	Změny na akrozomu	36
3.7.8.4	Změny v zadní části hlavičky	36
3.7.8.5	Změny na spojovací části	37
3.7.8.6	Patologické změny na bičících	37
3.7.8.7	Nezralé spermie	37
3.7.8.8	Změny v nukleoplasmě.....	38
3.8	Požadavky na čerstvý beraní ejakulát.....	38
3.9	Konzervace beraního spermatu.....	39
3.9.1	Krátkodobá	39
3.9.2	Dlouhodobá	39
4	Materiál a metodika.....	41
4.1	Použitá plemena.....	42
4.1.1	Masná	42
4.1.1.1	Suffolk	42
4.1.1.2	Charollais (CH)	44
4.1.2	Kombinovaná	45
4.1.2.1	Zwartbles (ZW)	45
5	Výsledky a diskuze	47
5.1	Vyhodnocení výsledků ejakulátu.....	47
5.1.1	Makroskopické vyšetření.....	47
5.1.1.1	Objem ejakulátu (ml).....	47

5.1.2	Mikroskopické vyšetření	49
5.1.2.1	Vířivý pohyb spermií.....	49
5.1.2.2	Aktivita spermií (%).....	50
5.1.2.3	Koncentrace ejakulátu (x 10 ⁶ ml)	51
5.1.2.4	Celkový počet spermií v ejakulátu (x 10 ⁶ ml).....	53
5.1.3	Morfologické vyšetření	55
5.1.3.1	Morfologicky normální spermie v ejakulátu (%)	55
5.1.3.2	Nezralé spermie v ejakulátu (%)	56
5.1.3.3	Degenerované spermie v ejakulátu (%).....	57
5.1.3.4	Morfologicky změněný bičík (%).....	58
5.1.3.5	Morfologické změny krčku spermií	59
5.1.3.6	Morfologické změny akrozomu spermií (%).....	60
5.1.3.7	Morfologické změny hlavičky spermií (%).....	61
5.1.3.8	DAG efekt spermie (%).....	62
6	Závěr	63
7	Seznam použité literatury.....	65
7.1	Seznam tabulek.....	67
7.2	Seznam grafů	68

1 ÚVOD

Ovce obecná (*Ovis ammon*) se v mnoha poddruzích vyskytuje od východního Turecka a Zakavkazska přes střední a severní Írán a celou střední Asii až do jižní Sibíře a Mongolska na severovýchodě a do severní Indie a Nepálu na jihovýchodě. Ovce domácí (*O. ammon f. aries*) byla domestikována v oblasti středního a západního Íránu z rasy původně popsané jako *Ovis orientalis*. (Laštůvka a kol., 2004) Na základě archeologických nálezů se předpokládá, že první domestikované formy ovčí byly známy v období 11 až 10 tis. let př.n.l. Zápisy z období 7. tis. let př.n.l. svědčí o již vyspělém chovu v oblasti Íránu. (Šubrt a Hrouz, 2008)

Ovce patří mezi nejstarší a nejvýznamnější druhy hospodářských zvířat. Má pro člověka široké uplatnění od produkce vlny, masa a mléka až po zachovávání přirozeného rázu krajiny díky jejich pastvě. V roce 2009 bylo v ČR chováno 36 plemen ovčí. Z pohledu užitkovosti 52% populace tvoří plemena s kombinovanou užitkovostí, 38% masná plemena a 10% plemena plodná a dojná. (Máchal a kol., 2011)

V dnešní době existuje po celé planetě velké množství plemen ovčí s různou užitkovostí. Vzhledem k rychlosti genetického pokroku se, stejně jako u ostatních hospodářských zvířat, u ovčí uplatňují i umělé reprodukční postupy jako je např. inseminace, při které je možné jedním samcem oplodnit výrazně větší množství samic než v přirozené plemenitbě. Proto je důležité zaměřit se na kvalitu samců nejen z hlediska jejich užitkovosti, ale i z hlediska kvality ejakulátů, která je nutná pro pokrytí poptávky chovatelů. Proto se ve své práci zaměřuji na konkrétní parametry ovlivňující kvalitu ejakulátů a hodnotím jejich vliv.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- prozkoumat problematiku hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen u různých chovatelů
- posoudit kvalitu získaných ejakulátů běžnými makroskopickými metodami - vyhodnocením objemu, barvy, konzistence, pachu ejakulátu a obsahu cizích přímísenin
- stanovit aktivitu spermií, jejich koncentraci v ejakulátu a zastoupení morfologických defektů

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Anatomie pohlavních orgánů berana

Samčí pohlavní orgány jsou tvořeny pohlavními žlázami (varlata), vývodnými cestami (nadvarlata, chámovody), přídatnými pohlavními žlázami (měchýřkovité žlázy, bulbouretrální – Cowperovy žlázy a prostata) a kopulačním orgánem (pyj). (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.1 Varlata

Varle (*testis*) je párová samčí pohlavní žláza, tvoří se v ní samčí pohlavní buňky – spermie a samčí pohlavní hormon – testosteron. Má vejčitý, ze stran mírně zploštělý tvar. U berana dosahuje délka varlat 10 cm a hmotnost 400 – 600g. (Marvan a kol., 2007)

Varlata se vyvíjejí na stropě dutiny břišní a u beranů se před narozením přesouvají do šourku, který zajišťuje příznivé teplotní prostředí pro vývoj spermií, tj. o 3-5°C nižší, než je teplota tělesná. Tato nižší teplota je u savců nutnou podmínkou pro správný rozvoj procesu spermatogeneze a pro životnost spermií ve varleti a nadvarletí. (Jelínek, Koudela a kol., 2003) U přežvýkavců jsou varlata v šourku svou dlouhou osou postavena svisle, s nadvarletním okrajem obráceným kaudomediálně, hlavovým koncem dorzálně a ocasním ventrálně. (Marvan a kol., 2007)

Vazivový obal varlete tvoří přepážky, které oddělují lalůčky varlete, ve kterých se nachází stočené semenotvorné kanálky, v nichž probíhají jednotlivé fáze spermatogeneze. Ve stěně kanálků se nacházejí podpůrné (Sertoliho) buňky, ve kterých probíhá poslední fáze spermatogeneze tj. metamorfóza spermatid ve spermie. Ve vymezeném vazivu mezi semenotvornými kanálky jsou velké intersticiální (Leydigovy) buňky, které jsou bohaté na agranulární endoplazmatické retikulum, ve

kterém je produkován samčí pohlavní hormon testosteron. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.2 Nadvarlata

Nadvarle (*epididymis*) je úsek vývodných cest kyjovitého tvaru, ve kterém rozlišujeme tři části – hlavu, tělo a ocas. Spermie se zde shromažďují a funkčně dozrávají.

Hlava nadvarlete je rozšířená a pevně připojená k hlavovému konci varlete. Skládá se z kliček odvodných kanálků varlete. Na přechodu hlavy a těla nadvarlete se všechny odvodné kanálky spojují v jednotný vývod. Tělo navazuje na hlavu a má tvar úzkého protáhlého oblouku, volně připojeného k varleti. Ocas nadvarlete má tupě zaoblený kuželovitý tvar a přesahuje ocasní konec varlete. Podstatou těla a ocasu je vývod nadvarlete, který směrem k chámovodu pozvolna zesiluje. Slouží jako dočasný rezervoár, v němž se spermie shromažďují až do ejakulace.

Stěna vývodu nadvarlete je složena z epitelu a z vrstvy řídkého vaziva s hladkosvalovými buňkami. Apikální pól většiny buněk je opatřen dlouhými a rozvětvenými mikrokly, pomocí nichž jsou resorbovány látky vzniklé hlavně rozpadem neejakulovaných spermií. Také vylučují do lumenu sekret mírně kyselého povahy, který blokuje motilitu spermií a brání tak vyčerpání jejich malé energetické zásoby. Ke snížení metabolismu spermií přispívá i nižší teplota a nižší hladina kyslíku a vyšší hladina oxidu uhličitého. Díky tomu jsou spermie schopné zachovat si oplozovací schopnost a životnost 2 až 3 týdny. (Marvan a kol., 2007)

3.1.3 Chámovod

Chámovod (*ductus deferens*) je párová silnostěnná trubička spojující vývod nadvarlete s močovou trubicí. V úrovni hlavy nadvarlete se chámovod stává součástí semenného provazce a doprovázen cévami a nervy prochází poševním kanálem do

dutiny břišní. Těsně před svým vyústěním do močové trubice se spojuje s vývodem měchýřkovité žlázy v krátký ejakulační kanálek. Ten se otevírá na semenném hrbolku, což je zaoblená vyvýšenina na dorzální stěně močové trubice, bezprostředně po jejím výstupu z močového měchýře.

Stěna chámovodu je relativně velmi silná a skládá se ze sliznice, svaloviny a serózy. Viskózní hlenovitý sekret tubulózních žláz je vylučován do lumenu chámovodu a stává se součástí ejakulátu. (Marvan a kol., 2007)

3.1.4 Přídavné pohlavní žlázy

Nacházejí se na pánevní části močové trubice. Vyměšují sekret, který se při ejakulaci mísí se spermiemi a vytváří podstatnou část ejakulátu (semennou plazmu). Funguje jako přirozené ředidlo spermií a upravuje pro ně vhodně prostředí při jejich průchodu močovou trubicí a pochvou. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.4.1 Měchýřkovité žlázy

Měchýřkovitá žláza (*glandula vesicularis*) je párový orgán protáhlého tvaru. (Marvan a kol., 2007) Leží na dorzální ploše močového měchýře, laterálně od ampul chámovodu, s nimiž společně vyúsťují ejakulačním kanálkem na semenném hrbolku do močové trubice. U přežvýkavců mají lalůčkovitou strukturu a nepravidelný tvar. Jejich sekret je vylučován ke konci ejakulace. Tvoří 10-14% objemu ejakulátu, je mírně kyselý (pH 6,08), obsahuje fruktózu, kyselinu askorbovou, citronovou, flaviny a jiné látky. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.4.2 Předstojná žláza

Předstojná žláza (*prostata*) je nepárová a leží začátku močové trubice, kaudálně od vyústění chámovodů a měchýřkovitých žláz. Skládá se z těla a roztroušené části. Řídký mlékovitý sekret charakteristického pachu je odváděn do močové trubice četnými drobnými vývody. (Marvan a kol., 2007) Sekret je vylučován při ejakulaci těsně před spermii a současně s nimi. Obsahuje volné aminokyseliny a relativně vysoký obsah anorganických solí, které udržují stálý osmotický tlak v ejakulátu. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.4.3 Bulbouretrální žláza

Bulbouretrální žláza (*glandula bulbourethralis*) je párová a leží na dorzální ploše rozšířeného bulbu močové trubice, tj. v místě jejího přechodu přes sedací oblouk. (Marvan a kol., 2007) U malých přežvýkavců má velikost jako lískový ořech. Sekret je vylučován převážně na konci ejakulace.

Nepatrný podíl na celkovém objemu ejakulátu tvoří i sekret uretrálních žlázek (Litterovy žlázy), které se nacházejí ve stěně močové trubice. Je alkalický (pH 7,2 – 8,5) a obsahuje anorganické soli. Upravuje pH uretry a je vylučován jako předpermiová frakce ejakulátu. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.1.5 Pyj

Pyj (*penis*) je kopulačním orgánem, který umožňuje deponovat semeno do pohlavního ústrojí samice při kopulaci a je současně i odvodnou cestou moči mimo tělo. (Jelínek, Koudela a kol., 2003) Vzhledem k této funkci má stavbu, která mu umožňuje, že se při pohlavním vzrušení napřimuje a zpevňuje, aby mohl být zasunut do genitálu samice.

Pyj má válcovitý tvar a skládá se z fixované části – kořene pyje a volné části – těla pyje. Kořen pyje je pomocí dvou ramen pevně připojen na kaudální zaoblenou plochu obou sedací kostí a přechází v tělo. To je ve své kaudální části uloženo v řídkém podkožním vazivu krajiny hráze a v mezinoží. Kraniální konec pyje je volný, zakončuje se žaludem a je v ochablém stavu ukryt ve zvláštním kožním vaku v předkožce.

U přežvýkavců je pyj poměrně tenký a dlouhý a v klidovém stavu vytváří přibližně uprostřed své délky esovité ohbí, to se nachází těsně kaudálně od báze šourku a při ztopoření pyje se vyrovná. Délka celého pyje je u berana 30 – 50 cm. Kraniální konec pyje se u přežvýkavců rozšiřuje v polštářkovitý žalud, oddělený od těla pyje zúženým krčkem. U berana přesahuje zevní ústí močové trubice vrchol žaludu 3 – 4 cm dlouhým, esovitě prohnutým výběžkem. (Marvan a kol., 2007)

Objemově největší část pyje tvoří topořivé těleso, které je obklopeno fibrózním obalem, od něhož pronikají do topořivého tělesa vazivové trámce, mezi kterými jsou štěrbinové prostory vystlané endotelem, do nichž vyúsťují větve tepen. Snížením polštářkovitých návalků ve stěně tepen, které omezovaly tok krve, se při pohlavním vzrušení zvýší přítok krve a dochází ke ztopoření pyje – erekci. Močová trubice, která se nachází ve ventrálním žlábků pyje, je obklopena houbovitým tělesem, které na konci penisu přechází v houbovitě těleso žaludu. Houbovitá tělesa jsou plněna žilnou krví. U přežvýkavců je žalud pyje málo výrazný a označuje se jako přilba (*galea glandis*). Konečná část pyje je silně inervována a v jeho sliznici jsou početná senzitivní tělíska. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.2 Ejakulát

Ejakulát (sperma, semeno, chám) je tekutina, která se skládá z buněčné části - spermií a z tekuté části - semenné plazmy. Základní hodnoty ejakulátu mají velkou individuální variabilitu a kolísají i u jednoho jedince. Je to podmíněno řadou vnitřních i vnějších faktorů, jako je roční období, světlo, teplo, věk, úroveň výživy a ustájení, zdravotní stav a pohlavní využívání samce. Tyto faktory ovlivňují nejen spermatogenní funkci varlat, ale i sekreční aktivitu přídatných pohlavních žláz. (Marvan a kol., 2007)

Ejakulát berana má nažloutlou barvu a smetanovitou konzistenci. Průměrný objem ejakulátu je 1 ml, pH 6,4 – 7,0 a průměrná koncentrace spermií je 3 000 000 v mm³. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.2.1 Vývoj spermií

Spermie se vytváří po dosažení pohlavní dospělosti v semenotvorných kanálcích varlete a tento proces je označován jako spermatogeneze. Proces se uskutečňuje v pravidelných cyklech a probíhá kontinuálně v průběhu celého reprodukčního období života. V počáteční etapě nemá spermatogeneze ještě pravidelný cyklický charakter a z toho důvodu je vyšší obsah nezralých forem spermií v ejakulátu. S dosažením plné pohlavní dospělosti a stabilizací neuroendokrinní regulace pohlavních funkcí probíhá spermatogeneze u většiny hospodářských zvířat v pravidelných cyklech v průběhu celého roku a nedá se ani urychlit ani zpomalit. Cykly následují v pravidelných intervalech a každý začíná asi o ¼ délky cyklu později než předcházející. Délka jednoho cyklu je u berana 50 dní.

Proces spermatogeneze se dělí na spermatocytogenezi a spermiogenezi. (Marvan a kol., 2007)

3.2.1.1 Spermatocytogeneze

Probíhá ve třech fázích. První fáze – množení – je charakterizována několikanásobným dělením spermatogonií při bazální membráně semenotvorného kanálku. Z mateřské (kmenové) A-spermatogonie vznikne dceřiná A-spermatogonie a druhá diferencovaná spermatogonie intermediárního typu, ze které po několikanásobném dělení vzniknou B-spermatogonie.

Druhá fáze – růstu – je charakterizována růstem B-spermatogonií a změnami na jejich jádře. Výsledkem jsou primární spermatocyty, v jejichž jádře jsou chromozomy schopné uspořádání do dvojic a dva pohlavní chromozomy X a Y.

Třetí fáze – zrání – je charakterizována meiózou, která zahrnuje dvě po sobě jdoucí dělení. Při prvním dělení z primárních spermatocytů vzniknou sekundární spermatocyty a z nich při druhém zracím dělení spermatidy s haploidním počtem chromozomů.

Vznikem spermatid končí zrací dělení a dochází k přeměně spermatid na spermie. (Marvan a kol., 2007)

3.2.1.2 Spermiogeneze

Spermiogeneze (spermiohistogeneze) je proces přeměny okrouhlé nepohyblivé spermatidy ve štíhlou, kopinatou a pohyblivou spermii. Probíhá ve výběžcích podpůrných (Sertoliho) buněk. Jádro spermatidy se prodlouží, oploští a posune k apikálnímu pólu buňky – formuje se hlavička spermie. Na předním pólu jádra se složitým procesem vytvoří z Golgiho aparátu akrozom, který obsahuje specifické enzymy (hyaluronidázu, akrozin, proakrozin, kyselou fosfatázu, proteinázu aj.), rozpouštějící zona pelucida a cytoplazmatický obal vajíčka a tak umožňují penetraci spermie do vajíčka a oplození. Oba buněčné centrioly se posouvají k zadnímu pólu hlavičky a vzniká z nich krček a osová vlákna bičíku spermie. Přeměněné spermie se uvolňují z výběžků podpůrných buněk a dostávají se do lumen semenotvorných kanálků a do vývodných cest. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.2.2 Semenná plazma

Semenná plazma tvoří svým objemem hlavní podíl ejakulátu - u berana 70 – 75%. Skládá se především ze sekretů přídatných pohlavních žláz a v malém množství se na jejím složení podílí i tekutina, která se tvoří ve varleti, nadvarleti, chámovodu a močové trubici. Má pestré chemické složení (anorganické látky, lipidy, sacharidy) a vytváří tak pro spermie přirozené prostředí, které je chrání před nepříznivými vlivy, umožňuje jejich pohyb a je zdrojem jejich výživy.

U přežvýkavců je sperma vypuzeno jednorázovou ejakulací, kterou předchází vyloučení sekretu bulbouretrálních žláz, který upravuje pH močové trubice. Větší část semenné plazmy tvoří sekret měchýřkovité žlázy, žláz močové trubice a poměrně malý je podíl sekretu prostaty. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.2.3 Spermie

Spermie tvoří nejdůležitější složku ejakulátu. Jsou 50 – 80 μm dlouhé a hmotnost je odlišná podle sexchromozomu který obsahují. Spermie s malým heterochromozomem Y (androspermie) jsou lehčí než spermie s větším heterochromozomem X (gynospermie).

Hlavička spermie měří 5 – 10 μm , je oválného tvaru, ze stran oploštělá a tvoří ji především jádro. Přední část hlavičky je kryta akrozomem, který je složen z mukopolysacharidů a obsahuje enzymy, které se uplatňují při pronikání spermie do vajíčka a jeho oplození.

Bičík je 50 – 70 μm dlouhý a představuje pohybové ústrojí spermie, obsahuje dva centrioly a s hlavičkou je spojen krčkem. Bičík je tvořen třemi oddíly. První – spojovací oddíl obsahuje velké množství mitochondrií. Druhý – hlavní oddíl je nejdelší (40- 50 μm), jeho podkladem je osová vlákna obklopená nesegmentovanými chordami a obalená fibrózní pochvou z homogenní a silně kontrastní hmoty. Třetí – koncový oddíl je tvořen pouze osovým vláknem a měří asi 4 μm .

Celá spermie je kryta nepřerušovanou dvouvrstvou cytoplazmatickou membránou, která je acidorezistentní, vysoce permeabilní a citlivá na změny osmotického tlaku. Při dlouhodobé konzervaci (zamrazování) spermií může dojít k poškození permeability membrány a tím ke snížení jejich oplozovací schopnosti. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.3 Neurohormonální řízení reprodukce beranů

Pohlavní funkce samců všech druhů savců jsou řízené nervovou a endokrinní složkou podobně jako u samic. Neuroendokrinní regulace se uskutečňuje v rámci geneticky fixovaného řídicího systému, který je zpravidla pod vlivem vnějších faktorů. Tyto faktory zodpovídají za průběh reprodukčních procesů se zřetelem na druh a individualitu. Nervové a hormonální složky na sebe velmi těsně navazují a vzájemně se ovlivňují a kontrolují, takže představují neoddělitelnou funkční jednotku a tvoří uzavřený funkční okruh, který slouží k zabezpečení jejich vzájemné rovnováhy. Rozvoj reprodukčních orgánů samců a jejich funkcí je zaměřený zejména na zachování pokračování rodu, protože úplný rozvoj těchto funkcí není potřebný pro život individua (např. kastrovaní plemeni). (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Řídicím orgánem pravidelného průběhu pohlavních funkcí je centrální nervový systém, konkrétně hypotalamus a adenohipofýza (hypotalamo-hipofyzární systém). Dalšími složkami reprodukčního funkčního okruhu jsou gonády a vývodné pohlavní cesty. Koordinace mezi jednotlivými složkami řízení pohlavní aktivity se uskutečňuje neurohumorálně v obou směrech, tj. odshora dolů a naopak zespod nahoru.

Kůra koncového mozku pomocí smyslových orgánů přijímá a zaznamenává podněty z vnějšího i vnitřního prostředí, zpracovává je a dále předává do hypotalamu. Hypotalamus s četnými nervovými buňkami nakupenými do skupin, tzv. jader (nuclei), představuje vlastní centrum pro řízení pohlavní činnosti. V hypotalamu jsou dvě místa, která mají klíčový význam pro řízení pohlavní činnosti a jsou označována jako přední a zadní sexuální centra. Zadní obsahuje velké množství jader, ve kterých se na základě impulzů přicházejících z předního sexuálního centra vytvářejí neurosekrety neboli hypotalamické uvolňovací faktory, zvané též liberiny – gonadotropin releasing hormon (GnRH). (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.3.1 Gonadotropin releasing hormon (GnRH)

Chemicky se jedná o dekaeptid mající dvě složky – dva účinky, tj. FSH-RH a LH-RH, které se krevní cestou dostávají do adenohipofýzy a zde iniciují tvorbu gonadotropních hormonů. Pro tvorbu gonadoliberinů je typická pulzativní sekrece, která však u samců není pravidelná.

Pod vlivem hypotalamických GnHR se ve specializovaných buňkách adenohypofýzy vytvářejí dva gonadotropní hormony – FSH a LH (ICSH). Chemicky se jedná o vysokomolekulární glykoproteiny s poměrně vysokou molekulovou hmotností a jsou pohlavně nespecifické. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.3.2 Folikuly stimulující hormon (FSH, folitropin)

U samců stimuluje růst semenotvorných kanálků a tvorbu spermií, činnost Sertoliho buněk a produkci hormonu inhibinu. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.3.3 Luteinizační hormon (LH, lutropin)

U samců také označován jako intersticiální buňky stimulující hormon (ICSH) působí na intersticiální buňky (Leydigovy) a stimuluje tvorbu specifického pohlavního hormonu testosteronu. (Jelínek, Koudela a kol., 2003)

3.3.4 Testosteron

Jedná se o steroid produkovaný, spolu s dalšími androgeny, ve varlatech. Řídí vznik pohlaví a sexuální diferenciaci, stimuluje tvorbu sekundárních pohlavních znaků, růst pohlavního údu, růst a sekreční funkci přídatných pohlavních žláz, formování pohlavního pudu a samčího pohlavního chování. (Jelínek, Koudela a kol., 2003) Asi ze 40% jsou androgeny produkovány také v kůře nadledvin. Biologicky nejaktivnější je dihydrotestosteron, který vzniká redukcí z testosteronu, který je poměrně málo androgenně účinný. (Máchal a kol., 2011)

3.3.5 Inhibin

Glykoprotein vytvářený v podpůrných buňkách semenotvorných kanálků varlete. Působí zpětně na hypofýzu a brzdí tak tvorbu FSH. (Koudela, Jelínek a kol., 2003)

3.4 Pohlavní chování a pohlavní reflexy

Sexuální chování samců u savců, včetně beranů, je ovlivněno přítomností samic v říji, tj. interakcí hladin LH a testosteronu. Studie naznačují, že berani reagují na stadium reprodukčního cyklu samice bez ohledu na vlastní zkušenosti změnou hormonální hladiny. Ovšem zkušený beran výrazně přesněji pozná říjící se samici od samice bez říje, z čehož vyplývá, že se samec díky zkušenostem naučil lépe poznat změny v chování říjících se ovcí.

Sexuální chování berana v přítomnosti ovce v říji je charakterizováno:

- Následování a přibližování
- Očichávání
- Flémování
- Chození do kruhu
- Pokládání hlavy na záď ovce
- Vzeskot – páření

(Louda a Hegedušová, 2009)

3.5 Příprava beranů na připouštěcí období

S přípravou beranů na připouštěcí období se započne 1 měsíc před sezónou. Provádí se stříž vlny, kontrola tělesné kondice a zdravotního stavu, se zvláštním zřetelem na pohlavní orgány a pohlavní aktivitu beranů. Provádí se nácvik odběru spermatu a posouzení jeho kvality. Důležité je i ošetření paznehtů.

Z plemenitby se vyřazují berani s dýchacími poruchami, konstitučně a tělesně slabí a berani s poruchami spermiogeneze. (Louda a Hegedušová, 2009)

Pro umělou inseminaci se můžou používat pouze zdraví a plemenářsky hodnotní berani, při čemž jejich plemenářské vlastnosti mají být podstatně lepší než stádo ovcí, do kterého byli přiděleni. Mladí berani se zařazují do plného provozu v umělé inseminaci až tehdy, když jsou známé vlastnosti jejich potomstva a výsledky plodnosti.

Pohlavní aktivitu a vlastnosti ejakulátu může do značné míry ovlivňovat venkovní prostředí, hlavně soubor výživových a meteorologických faktorů. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Pokud se u berana v posledních osmi týdnech před připouštěním vyskytla porucha zdravotního stavu spojená se zvýšením tělesné teploty, berana v plemenitbě nevyužíváme, protože schopnost jeho spermatu oplodnit vajíčko je snížena nebo úplně porušena. Tento stav bývá ve většině případů pouze přechodný. (Horák a kol., 2012)

3.5.1 Pohlavní aktivita ovcí

Nástup přirozeného plodného období u ovcí následuje po změně délky světelného dne, která nastává po letní rovnodennosti. V závislosti na různých zeměpisných šířkách se u ovcí na severní polokouli začíná objevovat estrus po 21. červnu za 60 – 120 dnů. V našich podmínkách se dostavuje plodné období nejvýrazněji od srpna do listopadu a trvá až do předjaří. V oblasti rovníku vzhledem k celoroční stálosti rytmu dne a noci v podstatě anestrální období u ovcí vůbec neexistuje. (Louda, 1980)

3.5.2 Ustájení beranů

Mělo by být vzdušné s výběhem, avšak je nutné berany chránit před přímým slunečním svitem. Doporučuje se skupinové ustájení o 10 – 15 kusech zvířat s plochou

2 m² pro každé. Teplota by se měla pohybovat od 8 do 18 °C při vzdušné vlhkosti 60 – 80%. (Louda, 2009)

3.5.3 Výživa a krmení

V přípravném období, 6 – 8 týdnů před začátkem umělé inseminace, se zvyšují denní krmné dávky koncentrovaného krmiva a krmiva živočišného původu. V tomto období se kromě pastvy zkrmují šroty, otruby a výlisky a to v množství od 1,5 kg denně, dále zelená krmiva (kukuřice, luštěniny) a okopaniny (krmná mrkev, řepa). Berani musí pravidelně dostávat potřebné minerální látky (sůl, vápník). Kvalitu semene velmi dobře ovlivňuje pasení (především ráno, odpoledne a případně v podvečer).

30 – 40 dní před začátkem připouštění se krmná dávka beranů doplní krmivy živočišného původu (rybí moučka, vejce a odstředěné mléko). Při intenzivním připouštění plemenných beranů se do krmné dávky přidávají 3 – 4 syrové slepičí vejce a 2 – 3 l odstředěného mléka, hlavně při nižším množství koncentrátů.

Po dobu připouštění mají plemenní berani dostávat vyšší krmnou dávku, aby se větším množstvím živin mohla krýt zvýšená potřeba semene. Když se dodržují všechny zásady správné výživy a berani jsou před připouštěním v dobrém výživném stavu, příprava může trvat i kratší dobu (1 měsíc). Jadrná krmiva se podávají beranům 3x denně, šťavnatá krmiva 2 x denně a seno neomezeně, voda na napájení 3 x denně, v létě vícekrát. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Pro zlepšení kvality semene (kvalita a pohyblivost spermií) je vhodné beranům aplikovat 6 – 8 týdnů před začátkem připouštění preparáty s obsahem vitamínu E a selenu. V tomto přípravném období se také musí beran odčervit. Ideální skóre kondice by mělo být 4. (Horák a kol., 2012)

3.5.4 Klimatické faktory

Z meteorologických faktorů můžou na kvalitu ejakulátu nepříznivě působit vlhkost vzduchu, atmosférický tlak a intenzita ultrafialových paprsků. V podmínkách s vyšší teplotou má nepříznivý vliv i vlněná pokrývka. Po ostříhání beranů se zlepšuje termoregulace a kvalita ejakulátu se postupně upraví.

Na pohlavní aktivitu a kvalitu semene do určité míry působí pravidelný pohyb, proto se doporučuje beranům pobyt na pastvě 4 – 6 hodin denně. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.5.5 Návyk na odběr semene

Spočívá v odběru semene postupně od 25. dne až po 5. den před začátkem umělé inseminace. Postupným zvyšováním frekvence odběru semene se připravují pohlavní orgány na intenzivnější odběr. Na začátku přípravného období je kvalita semene obvykle horší až špatná, pravidelnými odběry se postupně zlepšuje.

V přípravném období (např. 25 dní před začátkem připouštěcí sezóny) se doporučuje postupný odběr semene takto: 25., 20. a 18. den 1 skok, 15. a 13. den 2 skoky, 11., 9. a 7. den 3 skoky. Od 5. dne se může semeno odebírat až 4 x denně.

Po dobu přípravy se má od berana získat nejméně 30 – 35 ejakulátů na odčerpání starých spermií a stimulaci neurohormonálního systému na zvýšení tvorby semene.

Pohlavní režim se určuje podle individuálních vlastností berana. Berani, kterým se lehko odebírá semeno do umělé vaginy, přičemž produkují plnohodnotné semeno, se nemají přetěžovat velkým počtem skoků. Na posílení podmíněných pohlavních reflexů se od energických beranů odebírá semeno každý druhý den (1 skok) a posledních 5 dní 1 – 2 x denně.

Berani, kteří mají neplnohodnotné semeno i po zlepšení krmné dávky a úpravě připouštěcího plánu, se nedoporučují na umělou inseminaci. Velmi opatrně je třeba vyřazovat importované berany, kteří vyrostli v jiných klimatických podmínkách. Takováto zvířata první rok na novém místě často produkují neplnohodnotné semeno, jehož kvalita se zlepšuje až v dalším období. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.5.6 Stříž vlny a ošetření paznehtů

Stříhání vlny je důležité z hlediska spermiogenní činnosti a pohlavní aktivity berana v době připouštění. Během přípravného období se ostříhaný beran přivykne a vytvoří si nový tepelný režim a vlna doroste alespoň délky 1 cm. Zdravotní stav berana je důležitý z hlediska žádoucí pohlavní aktivity a fyzické zdatnosti uplatnit pohlavní schopnosti. (Louda a Hegedušová, 2009)

V tomto přípravném období je také potřeba vždy ošetřit paznehty a ve stádech s výskytem nakažlivého kulhání provést revakcinaci (ideálně tři měsíce před připouštěním). (Horák a kol., 2012)

3.5.7 Kontrola pohlavních orgánů

Při kontrole pohlavních orgánů se kontroluje velikost a konzistence varlat, nadvarlat, schopnost vysunování pyje a čistota předkožky. (Louda a Hegedušová, 2009)

3.5.8 Připouštěcí plán

Dospělým beranům je možné dělat denně 3 – 4 odběry semene, v jednotlivých dnech 5 – 6 odběrů. První 2 – 3 odběry se dělají ráno, asi 2 hodiny po krmení a přestávkami mezi odběry 30 minut až hodinu. Čtvrtý, případně pátý odběr se dělá až po delší přestávce (asi 3 hodiny). Nejvhodnější je odběr semene ráno po nakrmení, případně po 1 – 2 hodinovém pobytu ve výběhu a odpoledne okolo 15 – 17 hodiny. Osvědčil se opakovaný odběr, tj. 2 ejakuláty za sebou odebrané v průběhu 5 -10 minut s přestávkou jeden nebo dva dny v týdnu.

Na uchování dobré pohlavní aktivity je důležitý denní režim, který se musí v průběhu celé připouštěcí sezóny přísně dodržovat. Beranům se vytvářejí trvalé podmíněné reflexy na čas a postupnost různých provozních postupů, což způsobuje intenzivnější realizaci nepodmíněných pohlavních reflexů. Stupeň sexuálního využití se určuje se zřetelem na věk, neurokonstituční typ, případně plemeno a celkový kondiční stav berana. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.5.9 Péče o berany prubíře

Měla by být stejná jako o plemenné berany. Na 40 – 50 ovcí by měl být 1 prubíř. Jako prubíři se používají berani čekatelé plodných plemen s žádoucí pohlavní aktivitou. Prubíře musíme pravidelně střídat a odebírat od nich semeno, aby nedošlo k porušení pohlavní aktivity. Také se u nich provádí tzv. kondiční skok. (Louda a Hegedüšová, 2009)

3.6 Získávání ejakulátu od beranů

Nejčastěji se odebírá semeno beranů do umělé vagíny, ojediněle se používá i elektroejakulace. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984) Při porovnání obou metod bylo zjištěno, že při odběru pomocí elektroejakulace je objem ejakulátu vyšší (1,12 cm³) než u odběru do umělé vagíny (0,71 cm³) ovšem koncentrace a aktivita spermií je při elektroejakulaci výrazně nižší (koncentrace 973 mil. v 1 cm³, aktivita 76%) než při odběru do umělé vagíny (koncentrace 3 586 mil. v 1 cm³, aktivita 84%). (Terrill, 1940)

U dospělých beranů lze získávat denně 2 – 5 ejakulátů. Množství a jakost ejakulátu je možné pozitivně ovlivnit dobrou psychosexuální stimulací beranů. Je třeba respektovat individuální chování berana při odběru, aby nedošlo k vytvoření brzdících reflexů, které mohou nepříznivě ovlivnit odběr semene. (Louda, 1980)

3.6.1 Odběr semene do umělé vagíny

Původní model umělé vagíny, který navrhl Milovanov v roce 1931 se po různých modifikacích používá dodnes ve všech státech, ve kterých je zavedena umělá inseminace hospodářských zvířat.

Umělá vagína se skládá z vnějšího válce (délka 200 – 210 mm, průměr 50 – 55 mm), vnitřní vložky (délka 320 – 360 mm, průměr 30 – 35 mm) a skleněného dvoustěnného sběrače semene. Uprostřed válce je otvor, do kterého se nasazuje ventil. Hygieničtější odběr semene je možné zabezpečit pomocí zkrácené umělé vagíny (gumový válec dlouhý 190 mm) a jednorázového trychtýřového sběrače z plastu. (Gamčík, Kozumplík a kol, 1984)

3.6.1.1 Příprava umělé vagíny na odběr semene

Příprava umělé vagíny spočívá v tom, že se do venkovního gumového válce natáhne vnitřní vložka a její delší konec se zahne přes okraj vnějšího válce a důkladně se zafixuje gumovým poutkem.

Vnitřní vložka správně připravené umělé vagíny má mít po celé délce válce stejný vnitřní průměr, nesmí se na ní vytvářet záhyby nebo vydutiny. Nové vložky, jako i vložky před každým odběrem, se musí překontrolovat, jestli nepropouštějí vodu a vzduch, propláchnou se 20% roztokem sody a vyvaří.

Prostor mezi vnějším obalem a vnitřní vložkou se musí ventilem naplnit vodou, která má takovou teplotu, aby při odběru bylo uvnitř vagíny 38 – 40 °C.

Do připravené umělé vagíny se zasune předehřátý sběrač semene, jehož vnější část je naplněna vodou o teplotě 35 – 37 °C. Sběrač semene se gumovým poutkem důkladně fixuje na vnější válec. Na ústí umělé vagíny se v současnosti připevňuje plastový sběrač semene. Mezi sběrač semene a vnitřní vložku se vloží savý sterilní papír. Aby se zachovala tepelná izolace spermatu, může se na jednorázový sběrač semene navléct obal

z molitanu, který se před odběrem zahřívá na teplotu 35 °C. Připravená umělá vagina se může také předeheat v termostatu na 50 °C. Potom se ústí a první třetina vaginy důkladně potřou sterilní vazelinou, druhá třetina se potře jen mírně (mapovitě) a poslední se vůbec nepotírá. Vrstva vazelíny nesmí být silná, protože škodlivě působí na spermie a snižuje životnost vložky.

Umělou vaginu je potřeba natírat v šikmé poloze (úhel 30 – 40°), každou jinou sterilní tyčinkou. Po naplnění vodou a upevnění sběrače semene se dle individuality plemenika načerpá vzduch do meziprostoru tak, aby vznikl tlak asi 5332 Pa. Při správném tlaku k sobě stěny vložky přiléhají tak, že ústí umělé vaginy vytváří tvar podobný písmenu Y. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.6.1.2 Postup při odběru

Jako atrapa se používá ovce v říji, ovce s uměle vyvolanou říjí, beran, skopec nebo vhodně přizpůsobený fantom. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984) Přítomnost říjné ovce zvyšuje objem ejakulátu a urychluje vlastní odběr. Říji u ovce lze vyvolat progesteronovým tamponem napuštěným 25 – 50 µg estradiol-benzoátem, který se zavede do pochvy. Po 12 – 14 dnech se z pochvy vyjme a za 2 až 6 dnů po vyjmutí se u ovce dostaví říje. Ke zvýraznění říje u ovcí je vhodné použít injekci zeronalu. (Louda a Hegedušová, 2009)

Beran musí mít čisté břicho, pánevní končetiny a šourek. Předkožka se může vypláchnout fyziologickým roztokem NaCl, případně roztokem Furalicinu (1:500) a po něm se otvor důkladně osuší buničitou vatou nebo sterilní osuškou.

Semeno se odebírá volně nebo v individuální fixační kličce. Nejvhodnější poloha pracovníka, který semeno odebírá bez použití fixační kličky, je dřep nebo pokleknutí. Po skoku berana ve stádiu vyhledávacího reflexu usměrní pracovník ztopořený úd v úhlu 35 – 40° k ústí umělé vagíny. Po dotyku pohlavního údu s hladkou, teplou a kluzkou stěnou ústí umělé vagíny beran reflexně zasune pohlavní úd dále a po několika pohybech dochází k prudkému dorazu a ejakulaci.

Po ejakulaci se umělá vagina opatrně drží kolmo dolů, aby se ejakulát dostal co nejdřív do sběrače semene, který se odevzdá do laboratoře. Jednorázový sáček z PVC se po odběru zataví a zvaží. Po skončení odběru semene je třeba umělou vaginu dokonale vyčistit a uložit do autoklávu. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Odběr spermatu se provádí 1 – 2x za den, 5x za týden. U mladých beranů je frekvence odběrů nižší. V průměru lze od jednoho berana v připouštěcím období získat za týden 50 – 200 inseminačních dávek obsahujících 100 – 360 x 10⁶ aktivních spermií. V mimosezónním období se získá méně, průměrně asi 50 inseminačních dávek. (Louda a Hegedúšová, 2009)

3.6.2 Odběr semene elektroejakulací

První přístroj pro odběr semene pomocí elektroejakulace byl sestaven Gunnem (1936). Od té doby byl přístroj značně zdokonalen. (Louda, 1980) Při odběru se nejčastěji používá bipolární elektroda, která má tvar duté paličky, dlouhé asi 320 – 400 mm s průměrem 10 – 15 mm. Na jejím konci jsou dvě elektrody dlouhé 100 mm. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.6.2.1 Postup při odběru

Před elektroejakulací se rektum vypláchne 1- 2% vlažným roztokem NaCl, aby se ulehčil přechod elektrického proudu. Potom se sterilní gázou očistí předkožkový otvor, a pokud je znečištěný, vypláchne se ještě fyziologickým roztokem NaCl. Bipolární elektroda se zavede 150 – 200 mm do rekta, kde se fixuje na úrovni měchýřkovitých žláz. Jako zdroj elektrického proudu se používá elektrická síť nebo baterie se střídavým proudem transformovaným na 10 – 30 V. Impulzy následují v intervalu 2 – 5 sekund, při prvních impulzech se zpravidla vyvolá erekční reflex, který ovšem není vždy úplný. Celková délka stimulace s přestávkami až po vyvolání ejakulace trvá 2 – 4 minuty. Po dobu elektroejakulace je nejvhodnější berana fixovat na stole v ležící poloze. Při odběru pomáhají většinou tři pracovníci, přičemž operátor řídí celý proces a vykonává stimulaci

elektrickým proudem, druhý pomocník fixuje elektrodu v rektu a třetí zachytává semeno do zkumavky s nálevkou. Úlohu při odběru mohou lehce zvládnout i dva pracovníci tak, že operatér při stimulaci fixuje elektrodu v rektu a pomocník zachytává ejakulát. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Po dobu odběru spermatu elektroejakulací jsou berani klidní. Někdy je možné pozorovat kopulační pohyby. Při poruše ejakulačního reflexu se přestane asi na 10 minut s drážděním, nebo se ejakulace urychluje masáží pyje. Při elektroejakulaci může při neodborném zacházení dojít i k ochrnutí zadních končetin apod. Elektroejakulaci je možné provádět 1x za 24 až 48 hodin. (Louda, 1980)

Elektroejakulací se semeno může odebrat bez poškození kvality spermatu a škodlivého vlivu na zdravotní stav berana. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7 Vlastnosti ejakulátu berana

Kvalitu semene beranů ovlivňuje sezónnost v připouštění. První ejakuláty beranů, kteří delší čas nepřipouštěli, nepodávají skutečný obraz o funkčním stavu semenotvorného epitelu. Takovéto sperma obsahuje spermie nahromaděné v ocase nadvarlete, které podle délky sexuální abstinence můžou podléhat procesu rozpadu. Objektivní obraz o kvalitě semene je možné získat až po vyprázdnění starých spermií z nadvarlat (asi po 30 - 35 odběrech). Při hodnocení semene berana se používají stejné metody jako při posuzování semene býka. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Ejakulát berana má podobnou charakteristiku jako ejakulát býka, má však menší objem (1 – 1,5 cm³), vyšší hustotu (2 – 5 milionů spermií v 1 mm³) a pach je slabý a připomíná vůni vlny.

Dále je kvalita spermatu výrazně závislá na ročním období. Na podzim tj. v připouštěcím období je kvalita ejakulátu ve všech ukazatelích nejlepší a proto je i nejvhodnější pro dlouhodobou konzervaci. Na jaře lze sledovat mírné zlepšení a to především aktivity spermií a v ostatních ročních obdobích je sperma méně kvalitní. Kvalita ejakulátu beranů, kteří jsou celoročně pravidelně odebíráni na inseminačních

stanicích, je lepší než u beranů používaných v přirozené plemenitbě. (Louda a Hegedušová, 2009)

3.7.1 Laboratorní vyšetření

Odebrané sperma se ve sběrači označí a okamžitě laboratorně posoudí makroskopicky i mikroskopicky. (Louda, 1980)

Vyšetření se pravidelně provádí u ejakulátu beranů chovaných v inseminačních stanicích pro výrobu mražených inseminačních dávek a jejich odběr se provádí pravidelně. V polních podmínkách pro sezónní inseminaci čerstvým semenem je vhodné 4-6 týdnů před zahájením připouštěcí sezóny berany několikrát odebrat a provést všechny zkoušky kvality ejakulátu. V samotném připouštěcím období už pak stačí pouze makroskopické a mikroskopické posouzení aktivity, odhad koncentrace popř. přežitelnost spermatu. (Louda a Hegedušová, 2009)

3.7.2 Makroskopické vyšetření

U ejakulátu se makroskopicky posuzuje barva, zrnitost, pach, obsah přímísenin a objem pomocí pipety s přesností na 0,1 cm³. (Louda, 1980)

3.7.2.1 Objem ejakulátu

Zdravý a pohlavně dospělý beran by měl mít objem ejakulátu v průměru 1 – 1,5 mm³. Menší objem semene bývá na jaře, v létě se mírně zvyšuje a nejvyšších hodnot nabývá na podzim. Pokud se berani odebírají v průběhu celého roku, objem kolísá v závislosti na ročním období jen minimálně. Při odběru elektroejakulací se může dosáhnout vyšších objemů a to 2 – 3 mm³. Minimální objem ejakulátu pro umělou inseminaci je 0,7 cm³.

Vliv na objem ejakulátu může mít věk, plemeno, živá hmotnost samce, výživa, roční období, metoda a frekvence odběru semene. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.2.2 *Hustota ejakulátu*

Sperma beranů dobré kvality je neprůhledná, hustá tekutina smetanové konzistence, která má vysokou viskozitu a dobrou zrnitost. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984) Dobrý, mírně zrnitý vzhled vytvářejí shluky spermatu, které se mírně pohybují. Řídké sperma špatné kvality je vodnaté, průsvitné a bez zrnitosti. (Louda, 1980)

3.7.2.3 *Barva ejakulátu*

Barva ejakulátu je dána hustotou a konzistencí semene. Semeno dobré kvality je špinavo-šedé, krémovo-šedé až mléčné. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.2.4 *Cizí přimíseniny*

K inseminaci se používá pouze čisté semeno. Ejakulát může být znečištěn chlupy, předkožkovými nečistotami, vazelínou/lubrikantem, kožními parazity, prachem, pískem, krví, močí, případně hnísem. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.3 Mikroskopické vyšetření

Mikroskopicky se posuzuje hustota, koncentrace spermií v 1 mm³ a v celém ejakulátu, aktivita spermií, endogenní reductázy, výskyt morfologických vad a pH. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.3.1 *Koncentrace spermií*

Koncentraci spermií můžeme určit odhadem, kdy se na sklíčko dá kapka spermatu a následně podle prostorového uspořádání spermií a jejich vzájemné vzdálenosti provedeme subjektivní hodnocení. (Louda 1980)

Semeno berana můžeme odhadem rozdělit podle hustoty na 6 stupňů:

- Velmi husté sperma – VH (denissimum – DD) obsahuje $4 - 5 \times 10^6$ spermií v mm^3
- Husté sperma – H (densum – D) obsahuje $3 - 4 \times 10^6$ spermií v mm^3
- Středně husté sperma – SH (semidensum – SD) obsahuje $2 - 3 \times 10^6$ spermií v mm^3
- Řídké sperma – R (rarum – R) obsahuje $1 - 2 \times 10^6$ spermií v mm^3
- Velmi řídké sperma – O (oligosperma – O) obsahuje 1×10^6 spermií v mm^3
- Ejakulát bez spermií – A (aspermie – A) bez obsahu spermií

Přesněji můžeme koncentraci určit pomocí počítačích komůrek nebo fotokolorimetricky. V použitelném semeně nesmí koncentrace klesnout pod 2×10^6 v mm^3 . (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Při fotokolorimetrickém stanovení se na základě změření zakalení standardního roztoku, ve kterém je rozptýleno určité množství spermatu, stanoví jeho hustota. Výhodou tohoto měření je jeho rychlost, objektivní přesnost a spotřeba malého množství ejakulátu. Jednou za měsíc je ovšem nutné kontrolovat přesnost tohoto měření pomocí počtů zjištěných v Bürkerově komůrce. Rozdíl těchto měření nesmí být větší než 15%.

Stanovení hustoty hemocytometricky se provádí pomocí Bürkerovy komůrky, tj. spočítáním spermií v několika čtverečích sklíčka a následným dosazením této hodnoty do vzorce. (Louda a Hegedúšová, 1984)

Dále se dá ke stanovení koncentrace spermií využít tzv. Karrasova klínu, do kterého nalijeme ejakulát a zředíme jej NaCl. Následně odečteme na stupnici spermiodensimetru hodnotu, která je ještě dobře viditelná. Chyba této metody se pohybuje kolem 5% od skutečného počtu spermií a po zacvičení lze touto metodou dosáhnout stejných výsledků jako při počítání spermií v Bürkerově komůrce. (Louda, 1980)

3.7.3.2 Aktivita spermií

Hodnotí se po zředění citrátem sodným nebo fyziologickým roztokem pod mikroskopem při zvětšení 250 – 350x. Zjišťuje se přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou, který se vyjádří v %, zároveň se také zjišťuje pohyb na místě, zpětný, spermie bez pohybu a případná aglutinace spermií. (Louda, 1980) Pro umělou inseminaci nesmí počet progresivně se pohybujících spermií klesnout pod 70%.

Za normální fyziologický pohyb se považuje postupný pohyb spermií směrem dopředu za hlavičkou (P). Mezi nefyziologické druhy pohybu se řadí:

- Nepohyblivost (N – nekrospermie)
- Pohyb okolo hlavičky (H)
- Pohyb do kruhu (K)
- Opačný, zpáteční (retrográdní) pohyb (Z)
- Trhavý pohyb (pohyb přerušovaný občasným zastavením) (T)
- Kolísavý, oscilační pohyb (kmitání bičíku na místě, občasně kolísání celé spermie) (O)

Dále se také hodnotí vířivost pohybu. Na sklíčku při menším zvětšení můžeme v dobrých ejakulátech pozorovat hromadný vířivý pohyb, který probíhá ve vlnách a připomíná tahy ryb. Vyjadřuje společné hodnoty hustoty a pohybu a hodnotíme jej

bodovou stupnicí. Hodnocení aktivity touto metodou je ale pouze orientační. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1980)

3.7.4 Stanovení rezistence

Jedná se ukazatel odolnosti spermatu vůči 1% roztoku NaCl. Vyjadřuje se jako poměr vzorku spermatu zředěného tímto roztokem, který se postupně přidává do spermatu až do okamžiku, kdy ustane přímočarý pohyb spermií vpřed za hlavičkou. (Louda, 1980) Minimální hodnota u ejakulátu beranů je 20 000, dobré ejakuláty však dosahují hodnot 30 – 60 000. (Louda a Hegedušová, 2009)

3.7.5 Dehydrogenační zkouška

Semeno se smíchá s roztokem metylénové modři o koncentraci jednoho promile, tato směs se nasaje do kapiláry, která se uzavře a ponoří do vodní lázně o teplotě 45°C. Podle doby, která uplyne od odbarvení nasátého sloupce, se určí počet živých spermií v 1 cm³.

Tabulka 1 Hodnocení dehydrogenační zkoušky

Doba odbarvení v minutách	Počet živých spermií v 1 cm ³ v mil. (dle Sakaly 1956)	Stupeň klasifikace
Do 2	2 950 – 3 500	Výborné (H=1,5 mil. A více)
Do 3	2 250 – 3 200	
Do 4	2 100 – 2 700	
Do 5	1 650 – 2 300	Velmi dobré (H = 0,7 – 1 mil.)
Do 8	950 – 1 700	
Do 10	750 – 1 100	Průměrné (H=0,5 – 0,7 mil.)
Do 12	400 – 800	
Nad 12	400 – 800	Podprůměrné (H=0,4 mil.)

(Louda a Hegedušová, 2009)

3.7.6 pH ejakulátu

pH ejakulátu berana se pohybuje v rozpětí 6,4 – 7,2 a přímo závisí na hustotě semene. Kvalitní ejakuláty mají pH 6,4 – 6,6, horší 6,9 – 7,2. Zvýšené pH nad 7,0 bývá zároveň znakem snížené koncentrace spermií. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.7 Tepelný test přežitelnosti

Semeno se zředí s fyziologickým roztokem o teplotě 39°C, napipetuje se do zkumavky a zahřívá ve vodní lázni o teplotě 45°C po dobu 60 minut. Poté se posuzuje aktivita v intervalech 30 min do úplného zastavení pohybu spermií. (Louda a Hegedušová, 2009)

3.7.8 Stanovení patologických spermií

Hodnocení se provádí stejně jako u býčího spermatu. Můžou se použít metody barvení dle Farellyho, nebo Wels X. (Louda a Hegedušová, 2009)

Bylo zjištěno, že frekvence morfologických změn je podstatně vyšší na hlavičce (průměrně 14,06%) než na bičíku spermie (průměrně 3,3%). Největší procento změn připadá na akrozom (13,05%), což dokládá, že akrozom spermií beranů je velmi labilní systém. Při vyšším výskytu jak 18% vadných spermií (včetně retence protoplazmatických kapek) se semeno nemůže používat. Ejakulát nesmí obsahovat více než 2% spermií s protoplazmatickými kapkami. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

Při hodnocení patologických spermií nelze vyvozovat výsledky z jednorázového vyšetření, ale je nutné vyšetření opakovat po 3 – 5 denních intervalech. Při jednom vyšetření by se mělo posuzovat 300 – 500 spermií, při zvětšení 1 000 – 1 500 x. (Louda a kol., 2001)

Na vznik defektních spermií má vliv mnoho činitelů toxicko-infekčního, fyzikálně-chemického, alimentárního a genetického původu. V závislosti od intenzity mechanismu a místa jeho účinku může nastat úplná porucha v produkci spermií s následnou aspermií nebo oligospermií, příp. zvýšené tvoření defektních spermií. Podle místa tvoření, případně pasáže spermií, na kterých byly spermie postižené škodlivými činiteli, je možné rozdělit změny v morfologii spermií na primární a sekundární.

Primární změny vznikají v době spermiogenetického cyklu až po příchod spermií do ocasu nadvarlete. Patří sem degenerativní formy spermií, změny tvaru hlavičky, změny v nukleoplazmě spermií, změny v akrozomu, trvalé změny na mitochondriálním oddílu bičíku spermie, vývojové anomálie spermie apod.

Sekundární změny vznikají při delším pobytu spermií v ocase nadvarlete. Zařazujeme sem změny, které vznikají od ejakulačního reflexu až po posouzení semene a artefakty způsobené nesprávným zhotovením preparátu. Sekundární změny jsou tedy projevem kvalitativních změn v semenné plazmě. Jejich množství závisí na správnosti dodržování techniky přípravy preparátu, teploty prostředí, i na technologickém postupu při ředění a chlazení semene. Mezi sekundární změny patří nabobtnání, uvolnění, roztrhnutí akrozomu a hlavičky, roztrhaný bičík a torze bičíku různého stupně. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.8.1 Vývojové tvarové anomálie degenerativního charakteru

Patří sem všechny formy spermií, které se vyvinuly atypicky, tzn., že nemají normální diferenciaci, hlavičku s akrozomem, spojovací část bičíku a bičík samotný. Často se v této skupině vyskytují spermie s malou hlavičkou, bičíkem vakovitého nebo kyjovitého tvaru či se zdvojeným bičíkem nebo hlavičkou. V normálním ejakulátu by se nemělo vyskytovat více jak 5 % těchto změn, důvodem vyššího výskytu bývá porucha spermiogeneze. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.2 Patologické formy ve tvaru hlaviček

Nejčastěji bývají hlavičky zúžené, hruškovité, abnormálně veliké, abnormálně malé, asymetrické ovoidní, oválné, citronovité nebo můžou mít narušenou strukturu, tj. proláklou, plošnou, příliš širokou nebo s úzkým klenutím. Celkově by výskyt těchto abnormalit neměl přesáhnout 5%, vyšší výskyt bývá při poruše spermiogeneze doprovázené degenerativními nebo zánětlivými procesy varlat. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.3 Změny na akrozomu

Vnější cytoplazmatická membrána a akrozomální systém jsou velmi citlivé na osmotické změny vnějšího prostředí. (Gamčík, Kozumplík a kol, 1984)

Nejčastěji bývá akrozom zbobtnalý, to může být způsobeno manipulací se spermatem a přítomností vody ve sběrači. Dalšími změnami může být kondenzace akrozomové hmoty k přednímu okraji hlavičky, zřasení předních okrajů hlaviček, různé granulace v akrozomové substanci. U samců s poruchou plodnosti se často vyskytuje svlečený akrozom, které na roztěrech nacházíme nedaleko hlavičky. V takovýchto případech k uvolnění došlo pravděpodobně až po styku se semennou plazmou, protože jinak dochází k jeho absorpci v nadvarleti. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.4 Změny v zadní části hlavičky

Většinou se jedná o změny v nerovné tinktorické schopnosti kalíšku nebo o výskyt granulárních tělísek. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.5 Změny na spojovací části

Jedná se o drobné, málo patrné změny jako zkrácení spojovací části, její prodloužení, ztlustění, zúžení, přerušení spojovací části v některém úseku, ve kterém probíhá pouze holé osově vlákno, nebo rozvázání mitochondriální spirály, která se jeví jako vinoucí se nitkovitý závit. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.6 Patologické změny na bičících

Většinou se jedná o změny způsobené stočením bičíku kolem protoplazmatické kapky, obvykle na konci spojovací části bičíku, do tvaru houslového klíče nebo klubka. Dále abaxiální upevnění bičíku, kdy bičík nevychází ze středu hlavičky, ale z jejího okraje a dekapitace, tj. oddělení bičíků od hlaviček. Často může jít také o změny způsobené špatným roztěrem vzorku.

Řadí se sem i tzv. DAG efekt, při kterém dochází k abnormálnímu vyvinutí bičíku v důsledku chybějících bičíkových fibril ve vnějším kruhu a tím se nevyvine jejich uspořádání 2 + 9 + 9. Tato změna má dědičnou predispozici. (Louda a kol., 2001)

3.7.8.7 Nezralé spermie

Tyto spermie mají zadrženu protoplazmatickou kapku na krčku – proximální nebo v průběhu spojovací části – distální. V normálním ejakulátu nesmí být výskyt vyšší než 2%, jinak se musí sledovat výskyt dalších vývojových vad. (Louda a kol., 2001)

Množství proximálních kapek v proximální části může ovlivnit plodnost plemeníka. Dalším projevem nezralých spermií je zvýšený výskyt vývojových spermiogenetických forem – spermiogonie, spermioocyty I. a II. řádu a spermatidy. Větší množství nezralých

spermií a vývojových forem spermií poukazuje na poškození semenotvorného epitelu, nedostatky v exploataci a v transformaci spermií. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984)

3.7.8.8 Změny v nukleoplasmě

Nejčastěji se jedná o miliární vakuoly při předním okraji hlavičky, makrovakuoly, nepravidelné uspořádání DNA v jádře nebo slabé barevné reakce nukleoplazmy. Tyto změny se posuzují při použití speciálního barvení a nesmí jich být v ejakulátu více jak 15%. (Louda a kol., 2001)

3.8 Požadavky na čerstvý beraní ejakulát

- Ejakulát berana nesmí obsahovat žádné cizí přímíseniny, shluky spermií ani patogenní mikroorganismy a plísň.
- Barva má být slonové kosti, bělavá, šedá
- Pach nevýrazný
- Zrnitá konzistence
- Objem minimálně 0,5 cm³
- Koncentrace minimálně 2 x 10⁶ v 1 mm³ pro krátkodobé uchování
- 2,8 x 10⁶ v 1 mm³ pro zmrazení
- Aktivita minimálně 70% (výjimečně 60%)
- Patologických spermií maximálně 15%
- Nezralé spermie do 2% (protoplazmatická kapénka)
- Rezistence minimálně 20 000

- Přežitelnost tepelným testem minimálně 30% spermií
- pH 6,2 – 6,9

(Louda a Hegedúšová, 2009)

3.9 Konzervace beraního spermatu

3.9.1 Krátkodobá

Pro krátkodobou konzervaci beraního spermatu se využívá stejných ředidel jako při konzervaci býčího spermatu např. citrát sodný, vaječný žloutek, mléko plnotučné, odstředěné, Tris a další. (Louda, 2009) Ředidla umožní konzervaci po dobu 8 – 12 h od odběru ejakulátu.

Poměr ředění ejakulátu se stanoví na základě objemu, koncentrace a aktivity spermií. Stupeň ředění se obvykle pohybuje v poměru 1:3 – 5. Minimální počet spermií v inseminační dávce by měl být 100 – 360 x 10⁶ aktivních spermií obsažených v inseminační dávce o objemu 0,1 – 0,3 cm³.

Naředěné sperma se může buďto ihned použít k inseminaci, uchovávat při teplotě 15°C po dobu 5- 6 h, nebo lze pomalu schladit na 15°C dále v ledničce po dobu 30 minut na 3 - 5°C (v nádobě zabalené do buničité vaty) a uchovávat 12 až maximálně 24 hodin. (Louda, 2001)

3.9.2 Dlouhodobá

Aktivita rozmraženého beraního spermatu bývá velmi dobrá, ale jeho oplozovací schopnost může být velmi špatná až žádná a z tohoto důvodu bývá vyřazováno až 50% mražených ejakulátů. Dále ejakuláty odebrané na podzim vykazují nejlepší výsledky v mrazitelnosti i oplozovací schopnosti.

K mražení beraních ejakulátů se častěji využívá japonské metody, z důvodu její jednoduchosti a nenáročnosti přístrojového vybavení, avšak hrozí zde nebezpečí kontaminace inseminačních dávek.

K inseminaci se používají pouze dávky, u kterých aktivita po rozmrazení dosahuje alespoň 40%. Použitím antimrazového proteinu přidaného do ředidla v množství 10 μg v 1 cm^3 se zvýší procento pohyblivých spermií po rozmražení. Také použití roztoků obsahující oboustranně působící (obojetné) pufrы TES, HEPES, PIPES, upravené NaOH na pH 7, dále tris rozředěný citrátem sodným, zahrnující 13,5% žloutku zvyšuje procento neporušených akrozomů spermií po rozmražení. (Louda, 2001)

4 MATERIÁL A METODIKA

V období od 1. ledna do 31. března roku 2015 bylo provedeno celkem 69 odběrů ejakulátu od 7 beranů kombinovaného plemene Zwartbles v majetku Ing. Martina Hoška, Ph.D., 4 beranů plemene Suffolk a 1 berana plemene Charollais chovaných na Školním zemědělském podniku Žabčice Mendelovy univerzity v Brně.

Všechny odběry ejakulátu byly provedeny Ing. Martinem Hoškem metodou odběru do umělé vagíny, zakončené skleněným sběračem, na ovci fixovanou v „připouštědle“ k tomuto úkonu uzpůsobeném.

Ihned po odběru bylo u všech vzorků provedeno makroskopické a mikroskopické vyšetření, které zahrnovalo zjištění objemu ejakulátu, aktivity a koncentrace spermií. Objem ejakulátu byl zjištěn přímo, odečtem ze stupnice kalibrované odběrové nádoby. Aktivita spermií byla hodnocena subjektivní metodou, dle procentuálního zastoupení spermií v nativním ejakulátu vykazujících progresivní přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou (Louda, 2001). Koncentrace spermií byla stanovena hemocytometrickou metodou pomocí Bürkerovy komůrky (Věžník et al., 2004). Celkový počet spermií byl stanoven prostřednictvím výpočtu z koncentrace spermií v 1 mm³ a objemu ejakulátu (Fuerst-Waltl et al., 2006).

Pro zhodnocení morfologických parametrů beraních ejakulátů byly zhotoveny morfologické nátěry, které byly převezeny do laboratoře oddělení reprodukce hospodářských zvířat Ústavu a šlechtění zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Zde byly obarveny metodou dle Farrelého a mikroskopicky posouzeny při 1000 násobném zvětšení za použití olejové imerze. Při tomto vyšetření bylo vyhodnoceno procento morfologicky normálních a patomorfologicky poškozených spermií. Sledovány byly především změny na hlavičce, akrozomu, spojovací části a bičíku (torze, DAG efekt). Dále pak byla sledována přítomnost spermií nezralých a degenerovaných. Na každém morfologickém preparátu bylo hodnoceno 200 spermií.

Vliv jednotlivých efektů (užitkový typ, interval odběru, věk a obvod šourku) na hodnocené vlastnosti ejakulátu byl testován metodou GLM pomocí statistického programu Statistical Analysis System 9.4. (SAS, 2005). Modelová rovnice byla pro všechny závislé proměnné stejná a má následující tvar:

$$y = ut + i + o + v + e,$$

kde y je závisle proměnná (objem ejakulátu, aktivita, koncentrace a celkový počet spermií, a sledované patomorfologické parametry), ut je pevný efekt užitkového typu (kombinovaná, masná), i je pevný efekt intervalu od předchozího odběru ve dnech (interval 1 = 0 dní, interval 2 = do 7 dní, interval 3 = od 7 do 14 dní a interval 4 = nad 14 dní), o je pevný efekt obvodu varlat, v je věk při odběru a e je residuální chyba.

Testovacím kritériem pro význam jednotlivých efektů byl F-test (TYP III součet čtverců). K analýze rozdílů mezi úrovněmi uvnitř jednotlivých efektů byl následně použit Tukey-Kramerův test.

4.1 Použitá plemena

4.1.1 Masná

4.1.1.1 Suffolk

Plemeno vzniklo v Anglii na začátku 19. století křížením Southdown (beran) a Norfolkská rohatá (bahnice). Uznáno bylo v roce 1810 a plemenná kniha byla založena r. 1887. Podílelo se na vzniku dalších plemen – Suffolk bílý, Francouzská černohlavá, Suffolk jižní, Katahdin, Morlam, Mult nipple, Německá černohlavá masná, Novofundlandská, Olibs, Rideau, Roussin de la Hague a syntetická populace Suffin. Plemeno se mimo Anglii chová v USA, Austrálii, na Novém Zélandě, v jižní Africe,

Kanadě a v řadě evropských zemí za účelem užitkového křížení, pro které je vhodné především rás Americký suffolk (v otcovské pozici), který je většího tělesného rámce. V ČR se plemeno používá od 80. let 20 stol. v hybridizačním programu a později jako hlavní masné plemeno. Klub chovatelů tohoto plemene byl založen 15. 11. 1997 ve Vysokém Mýtě. (Horák a Treznerová, 2010)

Plemeno je polojemnovlnné černošedé bezrohé masné s krátkou vlnou. Tělesný rámec je větší s hlubokým hrudníkem na středně dlouhých, dobře osvalených končetinách. Kromě hlavy jsou černé i nohy včetně paznehtů. Hlava je, hlavně u beranů, klabonosá. Živá hmotnost bahnic je 75 – 85 kg, beranů 100 – 130 kg. Výška v kohoutku 70 cm, v kříži 68 cm, délka těla 100 cm, obvod hrudníku 130 cm. Mateřské vlastnosti a mléčnost bahnic jsou dobré. Plemeno se vyznačuje dobrým zdravým, pevnou konstitucí a dlouhověkostí a je vhodné i do drsnějších klimatických podmínek podhorských oblastí. Je vhodné k užitkovému křížení téměř se všemi plemeny. Řadí se mezi poloraná plemena, tzn., že jehnice lze zapouštět v 10 – 12 měsících věku a hmotnosti 50 – 55 kg.

Vlna je bílá nebo jemně nažloutlá, rouno polouzavřené s ojedinělým výskytem černých vlnovlasů, sortiment B – C (tj. 25 – 33 μm).

Užitkovost plemene:

- Plodnost na obahněnou ovci 170 – 180%
- Živá hmotnost jehňat ve 100 dnech věku 35 -38 kg
- Denní přírůstek v odchovu a výkrmu 330 – 380 g
- Roční stříž bahnic 3,5 – 4,5 kg, beranů 4,5 – 5,5 kg
- Délka vlny 7 – 9 cm
- Výtěžnost vlny 50 – 55%

(Horák, Pindřák a Mareš, 2004)

4.1.1.2 *Charollais (CH)*

Plemeno vzniklo v 19. století ve Francii, v regionu Charollais a vzniklo křížením místních ovcí s plemenem Leicester a v roce 1825 s plemenem Dishley. Plemenná kniha byla založena v roce 1963 a plemeno bylo uznáno v roce 1974. Od roku 1977 se chová ve Velké Británii, Holandsku, Německu, Portugalsku, Rakousku, Slovensku, Španělsku, Ukrajině i v Číně. Ve Švýcarsku se chová těžší typ, tzv. Charollais Suisse. V ČR se chová od roku 1990 a 31. 1. 1992 byl v Nečtinech založen chovatelský klub. (Horák a Treznerová, 2010)

Jedná se o bílé, bezrohé, krátkovlnné plemeno s velmi dobrou masnou užitkovostí a plodností. Jeho předností je skvělé osvalení všech tělesných partií s minimálním podílem tuku. Je středního až většího tělesného rámce s živým temperamentem. Hlava i končetiny jsou bezvlnné, kůže je narůžovělá. Hřbet má široký, rovný, záď mírně sraženou, končetiny silné s pevnými spěnkami. Plemeno je přizpůsobené společné pastvě se skotem. Živá hmotnost bahnic je 70 – 90 kg, beranů 100 – 130 kg. Mléčnost bahnic je dobrá. Je to plemeno rané, tj. jehnice se mohou zapouštět již v 7 – 8 měsících a hmotnosti 45 kg. Jehňata jsou po narození hůře obrostlá vlnou, především v oblasti břicha, a tudíž je nutné provádět bahnění v zateplené stáji při teplotě minimálně 10°C. Plemeno je také náročné na pastvu a zimní výživu a je vhodné spíše do teplejších a sušších klimatických podmínek.

Vlna je bílá sortimentu A až B (tj. 22 – 27 μm). Vzhledem k výborné masné užitkovosti je možné provádět výkrm jehňat do 40 i více kg a je vhodné pro užitkové křížení téměř se všemi u nás chovanými plemeny.

Užitkovost plemene:

- plodnost na obahněnou ovci 150 – 170%
- živá hmotnost jehňat ve 100 dnech věku 35 – 40 kg
- přírůstek jehňat v odchovu a výkrmu 300 – 350 g

- roční stříž potní vlny bahnice 3,0 – 3,5 kg, beranů 3,5 – 4,5 kg
- délka vlny 4 – 6 cm
- výtěžnost vlny 50 – 55 %

(Horák, Pindřák a Mareš, 2004)

4.1.2 Kombinovaná

4.1.2.1 Zwartbles (ZW)

Plemeno vzniklo v Holandsku, ve Fríském regionu v roce 1970 křížením plemen Texel, Fríská a Drenthe. V roce 1995 byl založen chovatelský klub v Anglii a v ČR byl založen 3. 11. 2000 v Seči u Chrudimi. (Horák a Treznerová, 2010)

Je to bezrohé polojemnovlnné, polorané plemeno s kombinovanou užitkovostí (masnou a mléčnou) a klidného temperamentu. Základní zbarvení je tmavě hnědé s černou hlavou a nohy bez vlny a s bílými odznaky - širokou lysinkou na hlavě, spěnky zadních končetin a špička ocasu. Hřbet je rovný, široký, hrud' dlouhá a hluboká. Končetiny jsou delší s pravidelným postojem a pevnými spěnkovými klouby. Živá hmotnost bahnic je 60 – 70 kg, beranů 90 – 110 kg. Bahnice mají dobré mateřské vlastnosti a snadné porody. Jehnice lze zapouštět v 9 – 10 měsících a hmotnosti 45 kg. Díky nízkému obsahu tuku lze jehňata vykrmovat až do hmotnosti 40 kg a jejich masnou užitkovost lze zlepšit užitkovým křížením s masnými plemeny.

Základní zbarvení polouzavřeného rouna je tmavě hnědé, vlna smíšená, sortiment B/C – C/D (tj. 27 – 35 μ m).

Užitkovost plemene:

- Plodnost na obahněnou ovci 160 – 180%
- Živá hmotnost jehňat ve 100 dnech věku 30 – 35 kg
- Denní přírůstek v odchovu a výkrmu 270 – 300 kg
- Roční stříž potní vlny bahnic 3,0 – 3,5 kg, beranů 3,5 – 5,0 kg
- Roční délka vlny 12 – 15 cm
- Výtěžnost vlny 55 – 60 %

(Horák, Pindřák a Mareš, 2004)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení výsledků ejakulátu

5.1.1 Makroskopické vyšetření

5.1.1.1 Objem ejakulátu (ml)

Tabulka 2 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na objem ejakulátu

Objem					
		Počet vzorků	Průměrný objem	Standardní chyba	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	0,98	0,13	n.s.
	Masný	34	1,03	0,14	n.s.
Interval (týdny)	1	12	1,06	0,10	n.s.
	2	16	0,97	0,09	n.s.
	3	27	0,95	0,07	n.s.
	4	14	1,02	0,11	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Tabulka 3 Vliv věku a rozměrů varlat na objem ejakulátu

Objem					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní chyba	p
Věk při odběru*	1	69	0,0006	0,0001	a
Obvod varlat	1	69	-0,0407	0,0327	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,0144	0,0542	n.s.

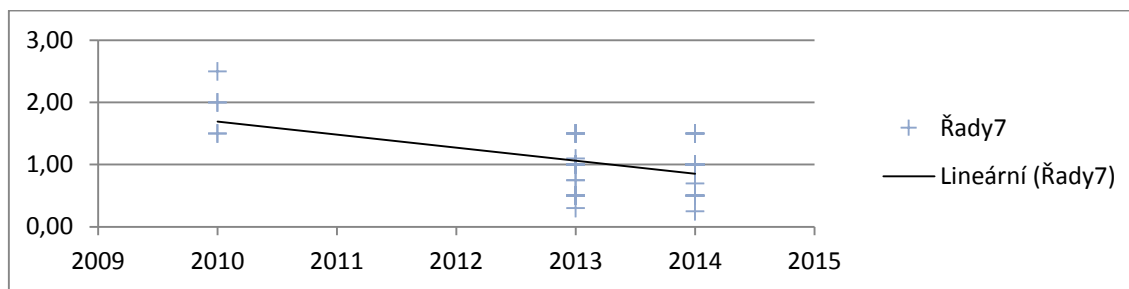
P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Z tabulek č. 2 a č. 3 je patrné, že na objem ejakulátu beranů má vliv pouze věk samců. Užitkový typ, frekvence odběru ani velikost varlat jej neovlivnily. Čím je beran

starší, tím se objem jeho ejakulátu zvyšuje a naopak, čím je mladší, tím je objem ejakulátu nižší.

Průměrný objem ejakulátů v našem pokusu je kolem 1 ml, což je u dalších autorů zcela normální hodnota. Podle Loudy (2009) by měl být minimálně $0,5 \text{ cm}^3$ a podle Gamčíka, Kozumplíka a kol., (1984) by měl být objem ejakulátu beranů $1 - 1,5 \text{ cm}^3$ s tím, že nejmenší objem semene bývá na jaře ($0,8 \text{ cm}^3$), v létě se postupně zvyšuje ($0,9 \text{ cm}^3$) a na podzim je největší ($1 - 1,5 \text{ cm}^3$), dále na objem může mít vliv plemeno a frekvence odběru semene, což se v našem pokusu neprokázalo, a věk.

Graf 1 Závislost objemu ejakulátu na věku beranů (lineární regrese)



Z grafu č. 1 je patrné, že se zvyšujícím se věkem se zvyšuje i objem ejakulátu beranů. Hasan a kol. (2009) ve své studii uvádí, že objem ejakulátu se s věkem zvyšuje, ale největší objem mají berani ve věku 2 let. Jeho průměrné naměřené hodnoty jsou u ročních beranů 0,60 ml, dvouletých 0,91 ml, tříletých 0,85 ml a čtyřletých 0,87 ml.

5.1.2 Mikroskopické vyšetření

5.1.2.1 Vířivý pohyb spermíí

Tabulka 4 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na vířivost ejakulátu

Pohyb					
		Počet vzorků	Průměrný vířivý pohyb	Standardní chyba	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	3,55	0,45	n.s.
	Masný	34	3,91	0,48	n.s.
Interval*	1	12	2,64	0,35	a
	2	16	4,04	0,30	b
	3	27	3,65	0,24	a,b
	4	14	4,59	0,36	b

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Tabulka 5 Vliv věku a rozměrů varlat na vířivost ejakulátu

Pohyb					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní chyba	p
Věk při odběru	1	69	0,0000	0,0004	n.s.
Obvod varlat	1	69	-0,1138	0,1090	n.s.
Délka varlat	1	69	0,0364	0,1805	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Z tabulek č. 4 a č. 5 je vidět, že věk, užitkový typ ani velikost varlat nemá na vířivost spermíí vliv, ovšem byla zjištěna souvislost s frekvencí odběrů beranů. Ejakuláty odebírané každý den měly průkazně horší vířivý pohyb spermíí, než ejakuláty odebírané 1x za týden a po více jak čtrnácti dnech.

Podle Gamčíka a kol. (1984) masivní vířivý pohyb vyjadřuje společné hodnoty koncentrace a aktivity spermíí, čím je pohyb lepší a výraznější, tím je koncentrace a hustota spermatu lepší a naopak.

5.1.2.2 Aktivita spermií (%)

Tabulka 6 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na aktivitu spermií

Aktivita					
		Počet vzorků	Průměrná aktivita	Standardní chyba	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	66,05	8,36	n.s.
	masný	34	61,73	8,94	n.s.
Interval	1	12	58,73	6,50	n.s.
	2	16	69,43	5,64	n.s.
	3	27	57,96	4,59	n.s.
	4	14	69,44	6,81	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 7 Vliv věku a rozměrů varlat na aktivitu spermií

Aktivita					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní chyba	p
Věk při odběru	1	69	-0,0021	0,0076	n.s.
Obvod varlat	1	69	-1,2938	2,0460	n.s.
Délka varlat	1	69	1,9711	3,3878	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z parametrů v tabulkách č. 6 a č. 7 nebyla prokázána žádná souvislost mezi aktivitou spermií a frekvencí odběrů, užitkovým typem, věkem a velikostí varlat odebíraných beranů. Z výsledků je patrná mírně vyšší aktivita spermií kombinovaných plemen beranů než plemen masných.

Podle Loudy (2009) by měla být minimální aktivita spermií beranů 70 % (výjimečně 60%). V našem pokusu měli tedy berani podprůměrné hodnoty, které mohly být způsobeny zimním obdobím odběrů. Louda (2001) uvádí, že nejlepší hodnoty aktivity spermatu beranů se dosahuje v jarním období a v ostatních období bývá kvalita spermatu nižší. Dále Martí a kol. (2012) uvádí nižší hodnoty aktivity spermií

v přípouštěcím období (69%) a vyšší hodnoty v brzkém (74%) a pozdním (72%) nepřípouštěcím období.

V práci Hassana a kol. (2009) byla zjištěna vyšší aktivita spermií u dvouletých a starších beranů (tj. 75 – 76%) než u beranů ročních (68%). V naší práci ale vliv věku na aktivitu spermií potvrzen nebyl.

5.1.2.3 Koncentrace ejakulátu ($\times 10^6$ ml)

Tabulka 8 Vliv užitkového typu a frekvence odběrů na koncentraci spermií v ejakulátu

Koncentrace					
		Počet vzorků	Průměrná koncentrace	Standardní chyba	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	3800285,70	256864,86	n.s.
	Masný	34	3347903,28	274599,76	n.s.
Interval*	1	12	3256956,43	199739,50	a
	2	16	3669428,59	173099,65	a,b
	3	27	4050697,92	140938,81	b
	4	14	3319295,02	209184,63	a

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Tabulka 9 Vliv věku a rozměrů varlat na koncentraci spermií v ejakulátu

Koncentrace					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní chyba	p
Věk při odběru	1	69	112,8580	233,8230	n.s.
Obvod varlat*	1	69	-199629,2540	62830,7260	a
Délka varlat*	1	69	393591,5990	104036,0610	a

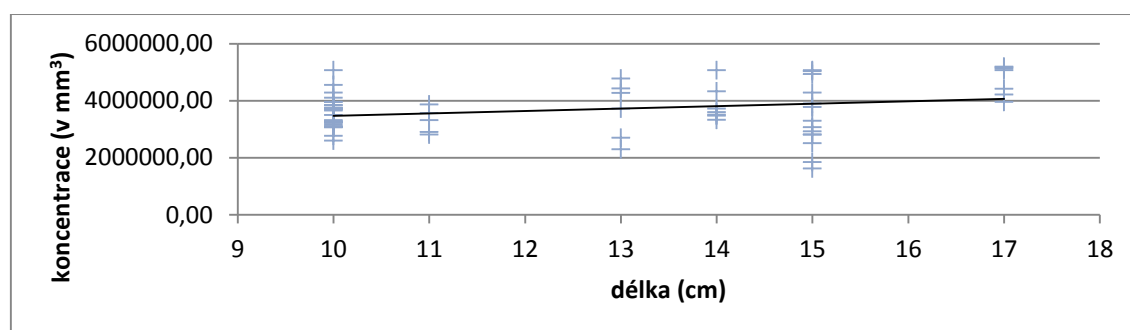
P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Z tabulek č. 8 a č. 9 není prokázáno, že by věk nebo užitkový typ měl vliv na koncentraci spermií v ejakulátu. Z výsledků Hassan (2009) ovšem vyplývá, že mladí (roční) berani mají výrazně nižší koncentraci spermií ($1,03 \times 10^9$ ml), než tělesně dospělí (tříletí) samci ($4,45 \times 10^9$ ml).

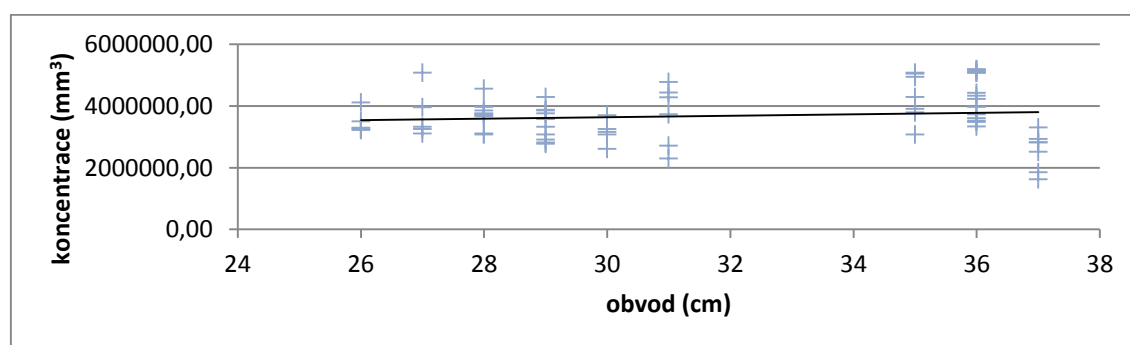
Koncentraci spermií ovlivňuje frekvence odběru, kdy častá (1 x týdně) ani nízká (1 x za 4 týdny) frekvence odběru není pro koncentraci spermií v ejakulátu vhodná. Jako nejvhodnější se jeví odběr 1 x za 3 týdny popř. 1 x za 2 týdny.

Podle Loudy (2009) by koncentrace spermií v ejakulátu berana měla být minimálně 2×10^6 v 1 mm^3 a pro krátkodobé uschování $2,8 \times 10^6$ v 1 mm^3 , což námi odebíraní berani s průměrnými hodnotami $3,3 - 3,8 \times 10^6$ ml splňovali.

Graf 2 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na délce varlat (lineární regrese)

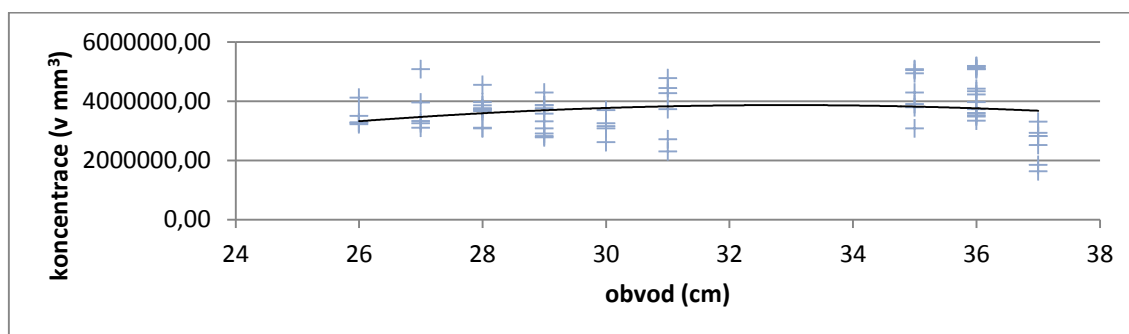


Graf 3 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na obvodu varlat (lineární regrese)



Prokázali jsme také, že koncentraci spermií v ejakulátu ovlivňuje velikost varlat, kdy při jejich větší délce i obvodu nacházíme vyšší koncentraci spermií, jak znázorňují grafy č. 2 a č. 3. Tudíž má význam měření obvodu šourku při bonitaci beranů, který má být podle standardu plemene např. u ročních beranů Suffolk minimálně 35 cm. (Ekofarma Kosařův mlýn, 2015)

Graf 4 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na obvodu varlat (regrese 2. st.)



Dále je z grafu č. 4 patrné, že po dosažení určité maximální hodnoty obvodu varlat (cca 33 cm) se začne koncentrace spermií v ejakulátu snižovat. Vzhledem k menšímu množství vzorků by ale bylo vhodné tento výsledek v další práci prověřit.

5.1.2.4 Celkový počet spermií v ejakulátu ($\times 10^6$ ml)

Tabulka 10 Vliv užtkového typu a frekvence odběru a celkový počet spermií v ejakulátu

CPS					
		Počet vzorků	Průměrný CPS	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	3698431,51	575998,81	n.s.
	Masný	34	3445886,66	615767,91	n.s.
Interval	1	12	3483234,15	447899,79	n.s.
	2	16	3642329,33	388162,07	n.s.
	3	27	3889509,87	316043,95	n.s.
	4	14	3273563,00	469079,75	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 11 Vliv věku a rozměru varlat na celkový počet spermií v ejakulátu

CPS					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru*	1	69	2367,0760	524,3290	a
Obvod varlat*	1	69	-325394,1140	140892,8590	a
Délka varlat	1	69	314745,9760	233292,5140	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$;

Z tabulky č. 10 vyplývá, že užitek typ ani interval odběru nemá vliv na celkový počet spermií v ejakulátu. Z tabulky č. 11 vyplývá, že při vyšším věku a větším obvodu varlat se CPS zvyšuje, přitom ale na to délka varlat vliv nemá.

Průměrný celkový počet spermií v ejakulátu byl v našem pokusu kolem 3,5 miliard, což je mírně více než uvádí Jelínek, Koudela a kol. (2003), podle kterých by měl být 3 miliardy.

5.1.3 Morfologické vyšetření

5.1.3.1 Morfologicky normální spermie v ejakulátu (%)

Tabulka 12 Vliv užítkového typu a frekvence odběru na množství normálních spermií v ejakulátu

Normální					
		Počet vzorků	% normálních spermií	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	86,30	1,89	n.s.
	Masný	34	82,97	2,02	n.s.
Interval	1	12	82,65	1,47	n.s.
	2	16	86,10	1,27	n.s.
	3	27	83,75	1,04	n.s.
	4	14	86,05	1,54	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 13 Vliv věku a velikosti varlat na množství normálních spermií v ejakulátu

Normální					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	-0,0003	0,0017	n.s.
Obvod varlat	1	69	-0,7711	0,4621	n.s.
Délka varlat	1	69	1,2309	0,7651	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 12 a č. 13 vyplívá, že žádný z námi zjišťovaných parametrů nemá prokazatelný vliv na procento morfologicky normálních spermií v ejakulátu. Plemena kombinovaného typu mají v průměru o necelá 4% více morfologicky normálních spermií a také při častém (každodenním) odběru jich bylo o 4% méně než při odběru v intervalech více než 14 dní. Louda (2009) uvádí, že by maximální množství patologických spermií mělo být 15%, což námi zkoumané vzorky v průměru splňují.

Výsledky pokusu Akpa a kol. (2012) ukazují, že vliv na množství morfologických změn spermií má věk berana a to tak, že mladší berani mají vyšší procento vadných spermií než berani starší. To ale v našem pokusu prokázáno nebylo.

5.1.3.2 Nezralé spermie v ejakulátu (%)

Tabulka 14 Vliv užitečného typu a frekvence odběru na množství nezralých spermií v ejakulátu

Nezralé					
		Počet vzorků	% nezralých spermií	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	1,79	0,55	n.s.
	Masný	34	3,20	0,59	n.s.
Interval	1	12	2,51	0,43	n.s.
	2	16	1,88	0,37	n.s.
	3	27	2,40	0,30	n.s.
	4	14	3,19	0,45	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 15 Vliv věku a rozměrů varlat na množství nezralých spermií v ejakulátu

Nezralé					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	0,0007	0,0005	n.s.
Obvod varlat	1	69	0,1424	0,1351	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,3351	0,2237	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Podle tabulek č. 14 a č. 15 námi měřené parametry nemají průkazný vliv na množství nezralých spermií v ejakulátu a průměrná hodnota do 3% je dle Gamčíka a kol. (1984) v normě. Nejnížší procento nezralých spermií bylo zjištěno u frekvence odběru 1x za týden, naopak nejvyšší při frekvenci odběru nad 14 dní.

5.1.3.3 Degenerované spermie v ejakulátu (%)

Tabulka 16 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na množství degenerovaných spermií v ejakulátu

Degenerované					
		Počet vzorků	% degenerovaných spermií	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	1,07	0,33	n.s.
	Masný	34	0,70	0,35	n.s.
Interval	1	12	0,57	0,25	n.s.
	2	16	1,00	0,22	n.s.
	3	27	1,05	0,18	n.s.
	4	14	0,90	0,26	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 17 Vliv věku a rozměrů varlat na množství degenerovaných spermií v ejakulátu

Degenerované					
		Počet pokusů	Regresní koeficient	Standardní odchylka	P
Věk při odběru	1	69	-0,0001	0,0003	n.s.
Obvod varlat	1	69	-0,0105	0,0796	n.s.
Délka varlat	1	69	0,0815	0,1317	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 16 a č. 17 je patrné, že užitkový typ, věk, obvod ani délka varlat nemají vliv na procento degenerovaných spermií v ejakulátu. Berani masného užitkového typu mají v průměru o 0,30% méně degenerovaných spermií než berani kombinovaného typu a berani odebíraní denně mají v průměru až o 0,40% méně degenerovaných spermií, než berani odebíraní častěji, tyto výsledky ale nejsou statisticky průkazné. Podle Loudy (2011) by v ejakulátu nemělo být více jak 5% spermií degenerativního charakteru, což námi odebíraní berani bez problémů splňují.

5.1.3.4 Morfologicky změněný bičík (%)

Tabulka 18 Vliv užitečného typu a frekvence odběru na morfologické změny bičíku

Bičík					
		Počet vzorků	% změn bičíku	Standardní odchylka	P
Užitkový typ	Kombinovaný	35	5,14	1,23	n.s.
	Masný	34	7,91	1,32	n.s.
Interval*	1	12	8,66	0,96	a,c
	2	16	5,81	0,83	c
	3	27	6,91	0,68	c
	4	14	4,71	1,00	b

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 19 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny bičíku

bičík					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	-0,0010	0,0011	n.s.
Obvod varlat	1	69	0,3754	0,3009	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,6730	0,4983	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 18 a č. 19 je patrné, že věk, užitečný typ ani velikost varlat nemá vliv na morfologické změny na bičících spermii. Ovšem je průkazné, že při příliš častém odběru, je množství morfologických změn na bičících výrazně vyšší a u odběrů s frekvencí nad čtrnáct dní je množství výrazně nejnižší.

5.1.3.5 Morfologické změny krčku spermíí

Tabulka 20 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na morfologické změny na krčku spermíí

krček					
		Počet vzorků	% změn krčku	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	1,96	0,72	n.s.
	Masný	34	4,71	0,77	n.s.
Interval	1	12	3,11	0,56	n.s.
	2	16	2,72	0,49	n.s.
	3	27	3,95	0,40	n.s.
	4	14	3,56	0,59	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 21 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny krčku spermíí

krček					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	0,0006	0,0007	n.s.
Obvod varlat	1	69	0,0167	0,1772	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,3994	0,2934	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 20 a č. 21 vyplývá, že věk, velikost varlat ani interval odběrů nemá vliv na procento morfologických změn na krčku spermíí. U masného užitkového typu je o více jak 2% morfologických změn na krčku než u kombinovaného užitkového typu.

5.1.3.6 Morfologické změny akrozomu spermií (%)

Tabulka 22 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na morfologické změny na akrozomu spermií

Akrozom					
		Počet vzorků	% změn akrozomu	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	0,40	0,15	n.s.
	Masný	34	0,08	0,16	n.s.
Interval	1	12	0,02	0,12	n.s.
	2	16	0,07	0,10	n.s.
	3	27	0,28	0,08	n.s.
	4	14	0,30	0,12	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 23 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny na akrozomu spermií

Akrozom					
		Počet vzorků	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	0,0001	0,0001	n.s.
Obvod varlat	1	69	-0,0100	0,0368	n.s.
Délka varlat	1	69	0,0642	0,0610	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 22 a č. 23 je zřejmé, že jsme nenalezli žádný průkazný vliv věku, velikosti varlat, frekvence odběrů ani užitkového typu na morfologické změny akrozomu spermií. U frekvence odběrů je patrné, že čím častěji se sperma odebírá, tím mírně stoupá procento změn na akrozomu spermií.

5.1.3.7 Morfologické změny hlavičky spermii (%)

Tabulka 24 Vliv užitkového typu a frekvence odběrů na morfologické změny hlaviček spermii

Hlavička					
		Počet vzorků	% změn hlavičky	Standardní odchylka	P
Užitkový typ	Kombinovaný	35	1,36	0,30	n.s.
	Masný	34	0,32	0,32	n.s.
Interval	1	12	0,54	0,23	n.s.
	2	16	0,94	0,20	n.s.
	3	27	0,82	0,17	n.s.
	4	14	1,05	0,25	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 25 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny hlaviček spermii

Hlavička					
		N	Regresní koeficient	Standardní odchylka	P
Věk při odběru	1	69	0,0000	0,0003	n.s.
Obvod varlat	1	69	0,1104	0,0739	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,0380	0,1224	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 24 je patrné, že věk ani velikost varlat nemá vliv na procento morfologických změn hlavičky. Z tabulky č. 25 je zřejmé, že o cca 0,5% procenta se sníží procento změn hlavičky při odběrech ejakulátu každý den a také, že o 1% více změn hlavičky je v ejakulátu beranů kombinovaného užitkového typu oproti ejakulátu beranů masného typu. Podle Loudy (2001) by se morfologické změny hlaviček spermii měly v ejakulátu vyskytovat do 5%, což naše vzorky splňují.

5.1.3.8 DAG efekt spermií (%)

Tabulka 26 Vliv užítkového typu a frekvence odběru na DAG efekt spermií

dag-efekt					
		Počet vzorků	% DAG efektu	Standardní odchylka	p
Užitkový typ	Kombinovaný	35	1,20	0,37	n.s.
	Masný	34	1,57	0,39	n.s.
Interval	1	12	1,85	0,29	n.s.
	2	16	1,55	0,25	n.s.
	3	27	1,41	0,20	n.s.
	4	14	0,72	0,30	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Tabulka 27 Vliv věku a rozměru varlat na DAG efekt spermií

dag-efekt					
		N	Regresní koeficient	Standardní odchylka	p
Věk při odběru	1	69	0,0000	0,0003	n.s.
Obvod varlat	1	69	0,0991	0,0899	n.s.
Délka varlat	1	69	-0,1908	0,1489	n.s.

P – průkaznost; a, b, c – statisticky průkazný rozdíl; n.s. – není statisticky průkazné; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,001;

Z tabulek č. 26 a č. 27 je zřejmé, že námi měřené parametry nemají vliv na DAG efekt spermií.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjistit vliv frekvence odběrů, věku, užitkového typu a rozměrů varlat beranů na kvalitu jejich ejakulátu.

V období od 1. ledna do 31. března roku 2015 bylo provedeno celkem 69 odběrů ejakulátu od 7 beranů kombinovaného plemene Zwartbles v majetku Ing. Martina Hoška, Ph.D., 4 beranů plemene Suffolk a 1 berana plemene Charollais chovaných na Školním zemědělském podniku Žabčice Mendelovy univerzity v Brně.

V rámci makroskopického hodnocení jsme hodnotili objem ejakulátu, pomocí mikroskopického hodnocení jsme posuzovali vířivý pohyb, aktivitu, koncentraci, celkový počet spermií a následně provedli jejich morfologické vyšetření.

Z našich pokusů vyplývá, že na objem ejakulátu beranů má vliv pouze věk samců. Čím je beran starší, tím se objem jeho ejakulátu zvyšuje a naopak, čím je mladší, tím je objem ejakulátu nižší. U vířivého pohybu byla zjištěna souvislost s frekvencí odběrů beranů. Ejakuláty odebírané každý den měly průkazně horší vířivý pohyb spermií, než ejakuláty odebírané 1x za týden a po více jak čtrnácti dnech. Na aktivitu spermií námi měřené parametry vliv neměly.

Koncentraci spermií ovlivňuje frekvence odběru, kdy častá (1 x týdně) ani nízká (1 x za 4 týdny) frekvence odběru není pro koncentraci spermií v ejakulátu vhodná. Jako nejvhodnější se jeví odběr 1 x za 3 týdny popř. 1 x za 2 týdny. Prokázali jsme také, že koncentraci spermií v ejakulátu ovlivňuje velikost varlat, kdy při jejich větší délce i obvodu nacházíme vyšší koncentraci spermií. Také je možné, že po dosažení určité maximální hodnoty obvodu varlat (cca 33 cm) se začne koncentrace spermií v ejakulátu snižovat. Vzhledem k menšímu množství vzorků by ale bylo vhodné tento výsledek v další práci prověřit. Také bylo prokázáno, že při vyšším věku jedince a větším obvodu varlat se zvyšuje celkový počet spermií.

Žádný z námi zjišťovaných parametrů nemá prokazatelný vliv na procento morfologicky normálních spermií v ejakulátu a hodnoty našich vzorků se vešly do

optima maximálně 15% patologických spermií. Námi měřené parametry také neměly vliv na obsah nezralých a degenerovaných spermií, množství změn na krčku, hlavičce a akrozomu, ani na DAG efekt u spermií. Ovšem je průkazné, že při příliš častém odběru, je množství morfologických změn na bičících výrazně vyšší než u odběrů s frekvencí nad čtrnáct dní, kdy je množství morfologických změn výrazně nejnižší.

Z výsledků tedy vyplývá, že na kvalitu ejakulátu má vliv jak věk beranů, tak především frekvence odběrů a velikost varlat, ale rozdíly mezi plemeny s různou užitkovostí nebyly výrazné. Proto je důležité, aby chovatelé při výběru beranů do chovu zohledňovali nejen jejich plemennou hodnotu, ale i věk a rozměry varlat a také, aby při přirozeném připouštění či odběru ejakulátu dbali na přípravu plemeníků před připouštěcím obdobím postupným zvyšováním frekvencí odběrů a i v době připouštění/odběrů nepřekračovali frekvenční optimum.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akpa G.N. , Suleiman I.O., Alphonsus C and Adu O.A., 2012: *The variation of age, hair type and body condition score with sperm morphology and cation concentration in yankasa ram*. Elixir Appl. Biology 47, 8629-8632.

Ekofarma Kosařův mlýn, 2015: *Standard Suffolk* [cit. 2015-04-29]. Dostupné na: <http://www.ekofarmasuffolk.cz/standard-suffolk/>

Fuerst-Waltl B., Schwarzenbacher H., Perner CH., Sölkner J., 2006: *Effect of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls*. Anim. Rep. Sci., vol. 95, pp. 27–37.

Gamčík P., Kozumplík J. a kolektiv, 1984: *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava, 344 s.

Hassan M. R., Pervage S., Ershaduzzaman M. and Talukder M. A. I., 2009: *Influence of age on the spermogramic parameters of native sheep*. J. Bangladesh Agril. Univ. 7(2): 301–304.

Horák F., Pindřák A. a Mareš V., 2004: *Atlas plemen ovcí a koz chovaných v České republice*. SCHOK, Brno, 96s. ISBN 80-239-1932-6

Horák F. a Treznerová K., 2010: *Světový genofond ovcí a koz*. SCHOK, Brno, 229s. ISBN 978-80-904140-6-8

Horák F. a kolektiv, 2012: *Chováme ovce*. Brázda, Praha, 383 s., ISBN 978-80-209-0390-7

Jelínek P., Koudela K. a kolektiv, 2003: *Fyziologie hospodářských zvířat*. MENDELU, Brno, 409 s. ISBN 80-7157-644-1

Laštůvka Z. a kolektiv, 2004: *Zoologie pro zemědělce a lesníky*. Konvoj, Brno, 264 s. ISBN 80-7302-008-4

Louda F., 1980: *Reprodukce hospodářských zvířat – I. Návody k praktickému cvičení*. MENDELU, Brno, 270 s.

Louda F., 2001: *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU, Praha, 225 s. ISBN 80-213-0702-1

Louda F., Hegedušová Z., 2009: *Inseminace ovcí – intenzifikační faktor šlechtitelské práce*. Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín, 37s. ISBN 978-80-87144-12-1

Máchal L. a kolektiv, 2011: *Chov zvířat I – chov hospodářských zvířat*. MENDELU, Brno, 237 s. ISBN 978-80-7375-553-9

Martí J. I., Aparicio I.M., Leal C.L.V., Harcía-Herreos M., 2012: *Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates*. *Theriogenology* 78, 528 – 54.

Marvan F. a kolektiv, 2007: *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, Praha, 303 s. ISBN 978-80-213-1658-4

SAS. The GLM Procedure, Procedure Corr., SAS/STAT Software. SAS Institute Inc., 2005.

Šubrt J. a Hrouz J., 2008: *Obecná zootechnika*. MENDELU, Brno, 205 s. ISBN 978-80-7375-115-9

Terrill C. E., 1940: *Comparison of Ram Semen Collection Obtained by Three Different Methods for Artificial Insemination*. *J ANIM SCI* 1940, 1940:201-207.

Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová, P. REPETITORIUM, 2004: *Spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. 1. vyd. VÚVeL, Brno, 197 s. ISBN 80-86895-01-7.

7.1 Seznam tabulek

Tabulka 1 Hodnocení dehydrogenační zkoušky	33
Tabulka 2 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na objem ejakulátu.....	47
Tabulka 3 Vliv věku a rozměrů varlat na objem ejakulátu	47
Tabulka 4 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na vířivost ejakulátu	49
Tabulka 5 Vliv věku a rozměrů varlat na vířivost ejakulátu	49
Tabulka 6 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na aktivitu spermií	50
Tabulka 7 Vliv věku a rozměrů varlat na aktivitu spermií.....	50
Tabulka 8 Vliv užitkového typu a frekvence odběrů na koncentraci spermií v ejakulátu.....	51
Tabulka 9 Vliv věku a rozměrů varlat na koncentraci spermií v ejakulátu.....	51
Tabulka 10 Vliv užitkového typu a frekvence odběru a celkový počet spermií v ejakulátu.....	53
Tabulka 11 Vliv věku a rozměru varlat na celkový počet spermií v ejakulátu.....	54
Tabulka 12 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na množství normálních spermií v ejakulátu.....	55
Tabulka 13 Vliv věku a velikosti varlat na množství normálních spermií v ejakulátu	55
Tabulka 14 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na množství nezralých spermií v ejakulátu.....	56
Tabulka 15 Vliv věku a rozměrů varlat na množství nezralých spermií v ejakulátu.....	56
Tabulka 16 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na množství degenerovaných spermií v ejakulátu.....	57

Tabulka 17 Vliv věku a rozměrů varlat na množství degenerovaných spermií v ejakulátu.....	57
Tabulka 18 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na morfologické změny bičíku	58
Tabulka 19 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny bičíku.....	58
Tabulka 20 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na morfologické změny na krčku spermií	59
Tabulka 21 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny krčku spermií.....	59
Tabulka 22 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na morfologické změny na akrozomu spermií	60
Tabulka 23 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny na akrozomu spermií	60
Tabulka 24 Vliv užitkového typu a frekvence odběrů na morfologické změny hlaviček spermií.....	61
Tabulka 25 Vliv věku a rozměrů varlat na morfologické změny hlaviček spermií .	61
Tabulka 26 Vliv užitkového typu a frekvence odběru na DAG efekt spermií.....	62
Tabulka 27 Vliv věku a rozměru varlat na DAG efekt spermií	62

7.2 Seznam grafů

Graf 1 Závislost objemu ejakulátu na věku beranů (lineární regrese)	48
Graf 2 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na délce varlat (lineární regrese)	52
Graf 3 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na obvodu varlat (lineární regrese)	52
Graf 4 Závislost koncentrace spermií v ejakulátu na obvodu varlat (regrese 2. st.)	53

PŘÍLOHY

Obrázek 1 Umělá vagina, vnitřní vložky, skleněné sběrače, lubrikant a kryt na umělou vaginu

Obrázek 2 Umístění do ochranného obalu

Obrázek 3 Umělá vagina nachystaná na odběr

Obrázek 4 Pracoviště pro hodnocení ejakulátu v polních podmínkách

Obrázek 1 Umělá vagina, vnitřní vložky, skleněné sběrače, lubrikant a kryt na umělou vaginu



Obrázek 2 Umístění do ochranného obalu



Obrázek 3 Uměla vagina nachystaná na odběr



Obrázek 4 Pracoviště pro hodnocení ejakulátu v polních podmínkách

