

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Charakteristika kvalitativních a kvantitativních
ukazatelů ejakulátu beranů a kozlů**

Bakalářská práce

Autor práce: Zdeněk Balšánek

Obor studia: Živočišná produkce

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Hodnocení kvalitativních a kvantitativních znaků ejakulátu beranů a kozlů " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2017

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Martinu Ptáčkovi Ph.D. za cenné rady a odborné vedení při zpracování této práce. Děkuji také své rodině za podporu v průběhu mého studia.

Souhrn

Práce je zpracována jako literární rešerše a zabývá se souhrnem poznatků o hodnocení ejakulátu beranů a kozlů a jeho kvalitativních a kvantitativních vlastnostech. Ejakulát se skládá ze spermií a semenné plasmy, získáváme jej při ejakulaci různými metodami odběru. Může to být buď návykem na odběr do umělé pochvy nebo elektroejakulací. Předtím než se ejakulát použije pro výrobu inseminačních dávek, je důležité odebraný ejakulát vyšetřit.

K tomu slouží hodnocení makroskopické, mikroskopické, biologické, biochemické a speciální. Z makroskopických znaků se stanovuje objem, hustota, barva, pach a obsah cizích přímísenin. Mikroskopické parametry hodnotí hustotu, koncentraci spermií v ejakulátu, aktivitu spermií, výskyt morfologických vad spermií a pH. Do biologických a biochemických se řadí tepelné testy přežitelnosti, zkoušku rezistence, odolnost vůči chladovému šoku, procento živých a mrtvých spermií a dehydrogenační zkouška. Specializované metody hodnocení zahrnují počítačovou metodu CASA a hypoosmotický test. U všech metod je popsán postup, jak se provádějí a průměrné hodnoty.

Po vyšetření se ejakulát ředí různými ředidly. K tomuto účelu se používají různé složky: citrát, fruktóza, glukóza, sacharóza, arabinóza, laktóza, mléko, vaječný žloutek, rafinóza nebo tris. Většinou se složky s různými podíly míchají. Zředěný ejakulát se uchovává buď v tekutém stavu, nebo se mrazí. Mrazení se provádí do ampulí, pejet nebo pelet. Neméně důležité je správné rozmrazení, aby si spermie uchovaly oplodňovací schopnost. Inseminace je důležitá součást šlechtitelských plánů. Rozlišují se tři metody: intravaginální, intracervikální a intrauterinní. Práce popisuje všechny metody a udává zjištěná procenta plodnosti.

Součástí práce je soupis vnitřních a vnějších faktorů ovlivňující parametry ejakulátu. Do vnitřních faktorů zahrnujeme dědičný vliv, věk a zdravotní stav, do vnějších faktorů roční období, frekvence odběrů, teplota a výživa.

Klíčová slova: beran, kozel, objem, aktivita, koncentrace, přežitelnost

Summary

The bachelor thesis is processed as a literature review and summary of findings deals with the evaluation of semen rams and bucks and their qualitative and quantitative characteristics. Ejaculate consists of sperm and seminal plasma, we collect it during ejaculation by different methods of collection. This can be either a habit of taking in an artificial vagina or electroejaculation. Before ejaculate is used for production of doses of semen, it is important to examine the taken ejaculate.

For this purpose it is using the evaluation of macroscopic, microscopic, biological, biochemical and special. From the macroscopic character is determined by volume, density, color, smell and content of foreign impurities. The microscopic characteristics evaluate the density, sperm concentration, sperm activity, the occurrence of defects in sperm morphology and pH. In the biological and biochemical evaluations there are thermal survival test, test resistance, resistance to cold shock, the percentage of live and dead sperm and dehydrogenation test. Specialized methods of evaluation include computerized method of CASA and hypo-osmotic test. For all methods is described the procedure, how to perform and the average values.

After examination is ejaculate diluted with various diluents, for example: citrate, fructose, glucose, sucrose, arabinose, lactose, milk, egg yolk, raffinose or tris. Usually the ingredients are mixed with different shares. Diluted semen is kept either in liquid state, or freezes. Freezing is carried out into the ampoules, straws or pellets. Equally important is the proper thawing to get preserve the fertilizing ability of sperm. Insemination is an important part of the breeding plans. There are three methods: intravaginal, intracervical and intrauterine. The bachelor thesis describes all the methods and shows the detected percentages of fertility.

The bachelor thesis includes a list of internal and external factors affecting parameters of semen. The internal factors include hereditary influence, age and health status, to external factors seasons, frequency of collection, temperature and nutrition.

Keywords: ram, buck, volume, activity, concentration, survivability

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce	2
3. Literární rešerše.....	3
3.1 Chov ovcí v ČR.....	3
3.2 Chov koz v ČR.....	4
3.3 Význam inseminace	5
3.4 Vlastnosti ejakulátu.....	5
3.5 Odběr ejakulátu	6
3.6 Hodnocení ejakulátu.....	7
3.6.1 Hodnocení makroskopických znaků	7
3.6.2 Hodnocení mikroskopických znaků.....	8
3.6.3 Biologické zkoušky.....	10
3.6.4 Biochemické zkoušky	12
3.6.5 Specializované metody hodnocení.....	12
3.7 Ředidla	13
3.8 Uchovávání spermatu v tekutém stavu	15
3.9 Mrazení	15
3.10 Rozmrazování	17
3.11 Inseminace.....	17
3.12 Vlivy působící na kvalitu ejakulátu.....	19
3.12.1 Dědičný vliv.....	19
3.12.2 Roční období.....	19
3.12.3 Věk.....	21
3.12.4 Frekvence odběrů.....	21

3.12.5	Teplota	22
3.12.6	Zdravotní stav	22
3.12.7	Výživa	23
3.12.8	Velikost šourku a rohů	24
4.	Závěr	25
5.	Seznam použité literatury	26
6.	Seznam grafů	34
7.	Seznam příloh	35
8.	Přílohy	36

1. Úvod

Reprodukce je v chovu ovcí a koz jeden z nejdůležitějších faktorů. Závisí na ní nastávající produkce. Ve velkochovech hospodářských zvířat se pro reprodukci upřednostňuje převážně umělá inseminace, jež se u malých přežvýkavců nevyužívá tolik jako např. u skotu, což je škoda, protože má mnoho výhod. Důležité je získat kvalitní inseminační dávky, respektive kvalitní ejakulát. Na ejakulát působí mnoho vnitřních a vnějších faktorů, které určují jeho kvalitu. Pro výrobu inseminačních dávek je ejakulát nutné objektivně vyšetřit. Na to se vyvíjí nové způsoby. Ejakulát se vyšetřuje nejen pro účely inseminace, ale i pro odhalování poruch plodnosti samců, a tím přispívá k lepší rentabilitě chovu.

2. Cíl práce

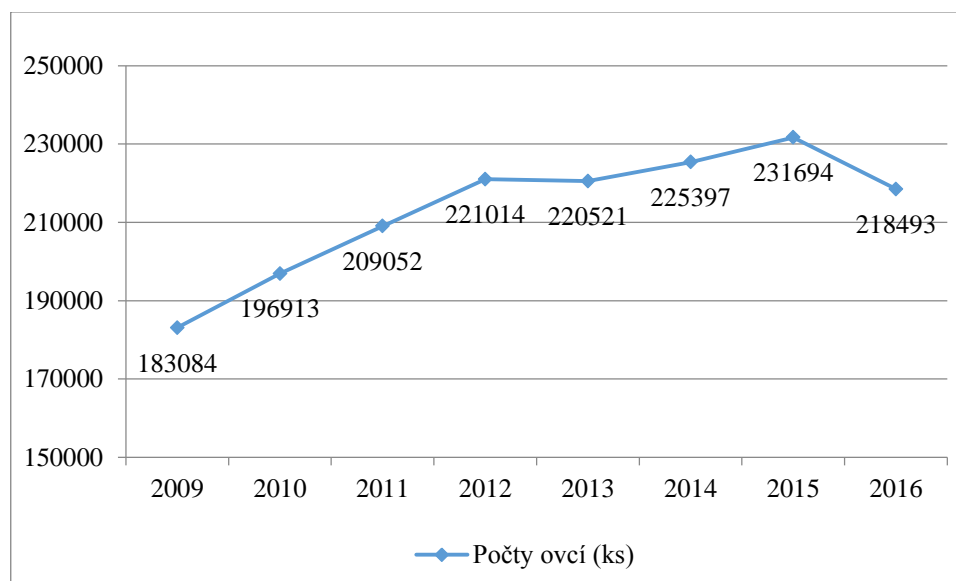
Hodnocení kvality ejakulátu slouží pro uspokojivé reprodukční ukazatele ve stádě, stejně jako následně pro produkci inseminačních dávek. Cílem studie je soupis aktuálních poznatků kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu beranů a kozlů. Literární přehled bude zaměřen na popis metod analýz pro jednotlivé ukazatele. Součástí bakalářské práce bude také soupis vnitřních a vnějších faktorů ovlivňujících kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu. Na základě bakalářské práce budou stanoveny metody pro konzervaci a uchování ejakulátu kozlů a beranů.

3. Literární rešerše

3.1 Chov ovcí v ČR

Od roku 2000, kdy byly nejnižší stavy ovcí od druhé světové války, tyto stavy pomalu narůstají. V roce 2000 klesly počty ovcí na 84 tisíc. Pindřák a kol. (2003) uvádějí, že důvody byly především ekonomické, kdy klesla cena z 210 Kč na 20 – 30 Kč za kilogram potní vlny. V té době probíhala změna užitkového zaměření a původní vlnářská plemena s jednostrannou užitkovostí byla nahrazována kombinovanými, masnými a mléčnými plemeny. Dodnes převažují masná plemena. Poté se stavy začaly pomalu zvyšovat, jak je vidět v grafu 1. Počty ovcí za rok 2016 převyšují 218 tisíc kusů. V roce 2015 bylo 24 118 bahnic zapojeno v kontrole užitkovosti. (Bucek a kol., 2016).

Graf 1: Stavy ovcí v letech 2009 – 2016, k 1. dubnu daného roku



Zdroj: ČSÚ

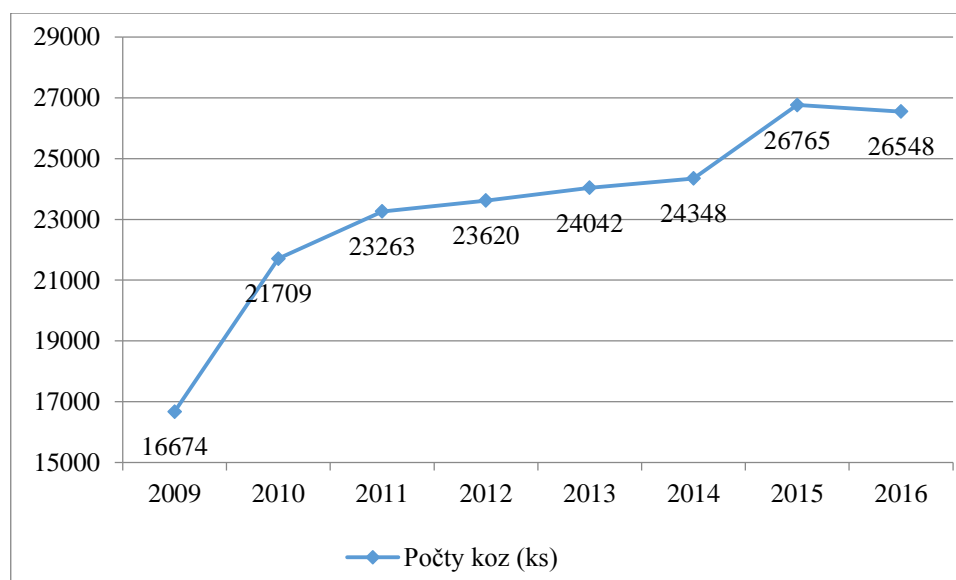
V roce 2015 byly v kontrole užitkovosti průměrné přírůstky jehňat 244 g ve 100 dnech věku, při průměrné hmotnosti při narození 3,5 kg a hmotnosti ve 100 dnech věku 27,9 kg. V kontrole mléčné užitkovosti ovcí bylo uzavřeno 1 570 laktací a dojivost za 150 dnů byla 277 kg mléka. Do kontroly mléčné užitkovosti ovcí byla zapojena plemena cigája, lacaune, východofříská ovce a kříženci. Nejrozšířenější plemena převyšující počty 1000 kusů v kontrole užitkovosti jsou romney, suffolk, šumavská ovce,

merinolandschaf, lacaune a romanovská ovce. V ČR je celkově chováno 34 plemen (Bucek a kol., 2016).

3.2 Chov koz v ČR

Chov koz má na území naší republiky bohatou tradici a historii. Většina koz se chovala v malovýrobě, v domácnostech. Velikost stád je dnes však velmi variabilní, jde o chovy s několika jedinci až po stovky kusů. Stavy koz pomalu narůstají, což je patrné z grafu 2. Od roku 2015 převyšují počty 26 tisíc kusů, které jsou zapsané v ústřední evidenci (Fantová, 2010).

Graf 2: Stavy koz v letech 2009 – 2016, k 1. dubnu daného roku



Zdroj: ČSÚ

V roce 2015 dosahovaly průměrné přírůstky 177 g, kdy u mléčných plemen se sleduje přírůstek do odstavu a u burské kozy do 100 dní věku. V kontrole mléčné užitkovosti bylo pouze 5 144 kusů koz. Průměrná dojivost činí 844 kg za normovanou laktaci, což je 280 dní. Nejrozšířenějšími plemeny byly koza bílá krátkosrstá, která měla dojivost 784 kg, a hnědá krátkosrstá, která měla 764 kg. V České republice je chováno ještě dalších 7 plemen (Bucek a kol., 2016).

3.3 Význam inseminace

Inseminace má řadu pozitiv. Je možné snížit počet chovaných plemeníků a využít jen špičkové jedince, kombinovat inseminaci se synchronizací říje plemenic a plánování porodů podle požadavků trhu a chovatele (Fantová, 2012).

Horák a kol. (2012) uvádějí, že při přirozené plemenitbě může vynikající beran připustit 50 – 80 plemenic ročně, při inseminaci je možné inseminovat až 500 – 600 ovcí.

Využívá se sperma importované od špičkových plemeníků, protože se tak rychleji zvyšuje užitkovost, snižuje se riziko zavlečení nákaz, jsou nižší náklady na dovoz, nemusí být provedena karanténa dovezených zvířat a odpadá riziko, že se dovezený plemeník nepřízpůsobí novým klimatickým podmínkám (Fantová, 2012).

3.4 Vlastnosti ejakulátu

Ejakulát je tekutina, která se dělí na buněčnou část - spermie a na tekutou část - semennou plasmu. Základní hodnoty ejakulátu jsou velice variabilní a kolísají i u jednoho jedince. Je to dáno řadou vnitřních a 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).

Semenná plasma má svým objemem hlavní podíl na množství ejakulátu - u berana 70 – 75%. Skládá se především ze sekretů přídatných pohlavních žláz a v malém množství se na složení podílí i tekutina, která se tvoří ve varleti, nadvarleti, chámovodu a močové trubici. Její chemické složení (anorganické látky, lipidy, sacharidy) vytváří 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 (Jelínek a Koudela, 2003).

Spermie jsou nejdůležitější složkou ejakulátu. Jsou 50 – 80 μm dlouhé. Hlavička spermie měří 5 – 10 μm , je oválného tvaru, ze stran zploštělá a tvoří ji především jádro. Bičík je 50 – 70 μm dlouhý a slouží pro pohyb spermie, obsahuje dva centrioly a s hlavičkou je spojen krčkem (Jelínek a Koudela, 2003).

3.5 Odběr ejakulátu

Nejdůležitější je výběr plemeníků. Leboeuf et al. (2000) si určili za selekční hranici 80 % úspěšných pokusů odběru do umělé pochvy, uspokojivý ejakulát s objemem větším než 0,2 ml, koncentrace vyšší než 1 miliardu a s více než 30 % živých buněk 5 minut po rozmrazení. Ze 107 samců prošlo výběrem 63 %, což je 67 plemeníků.

Metody běžně používané pro odběr beraního a kozlího spermatu jsou buď do umělé pochvy (AV), nebo elektroejakulací (EE). Nejjednodušší a nejvíce využívanou metodou je použití umělé pochvy. Metoda odběru do umělé pochvy je bezbolestný a rychlejší způsob, ale plemeníci musí být na odběr naučeni. Jako umělá pochva se používá umělohmotná trubka, která má vnitřní vložku z pryže, tím vzniká komora, do které se napouští voda o teplotě 39 – 41 °C. Na jeden konec se nasazuje skleněná zkumavka nebo PVC pytlík (nesmí mít spermicidní účinky). Do druhého konce se při skoku samce navede penis. Odběr se provádí na ovci v říji, ovci s uměle vyvolanou říjí, beranu nebo vhodně přizpůsobeném fantomu (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Elektroejakulátory se vyrábí v různých tvarech a velikostech. Jsou používány, když zvířata nejsou naučena k odběru do umělé pochvy. Většinou se získá větší objem spermatu, ale nižší koncentrace spermií. Některá zvířata nereagují dobře na elektrické stimuly. Dále existuje určité nebezpečí kontaminace vzorku spermatu močí (Nutí, n.d.).

Před odběrem se rektum vypláchne 1 – 2 % vlažným roztokem NaCl, pro lepší vedení impulzů. Potom se sterilní gázou očistí předkožkový otvor. Elektroejakulátor se zavede 150 – 200 mm do rekta, kde se fixuje na úrovni měchýřkovitých žláz. Jako zdroj elektrického proudu se využívá elektrická síť nebo baterie se střídavým proudem transformovaným na 10 – 30 V. Impulzy následují v intervalu 2 – 5 sekund. Na začátku 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, kdy operatér řídí celý proces a vykonává stimulaci elektrickým proudem, druhý pomocník fixuje elektrodu v rektu a třetí zachytává semeno do zkumavky s nálevkou (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Menon et al. (1986) porovnávali charakteristiky kozlího spermatu odebraného do umělé pochvy a pomocí elektroejakulátoru. Objem při odběru AV byl 0,4 ml, při EE 0,7 ml; koncentrace 4,6 (AV) vs. 2,1 (EE) x 10⁹ / ml; motilita 81 % (AV) vs. 78 % (EE);

pH 6,2 (AV) vs. 7,0 (EE); a procento normálních akrozomů u metody AV 96 % a u EE 92 %. Sperma odebrané metodou AV mělo nižší objem. Koncentrace spermií byla nižší u EE. Nebyl zjištěn velký rozdíl v pohyblivosti. Použití EE mělo za následek zvýšení vokalizace kozlů a nadměrné svalové kontrakce zadních končetin. Z výše uvedených poznatků vyplynuly závěry, že lepší metoda je způsob odběru do umělé pochvy. V pokusu Malejane et al. (2014) byli plemenci odebíráni pravidelně jednou za týden a autoři uvádějí, že po pátém měsíci odběrů EE už berani nevokalizovali. Přičítali to tomu, že si již berani přivykli na druh tohoto stresu.

3.6 Hodnocení ejakulátu

Hodnocení ejakulátu zahrnuje makroskopické hodnocení, mikroskopické hodnocení, biologické zkoušky, biochemické zkoušky a speciální vyšetření.

3.6.1 Hodnocení makroskopických znaků

Makroskopické hodnocení ejakulátu se provádí ihned po odběru. Hodnotí se hmotnost nebo objem, hustota, barva, pach a obsah cizích přímísenin, které nesmí obsahovat (Louda a kol., 2001).

Objem

Objem se zjišťuje měřením v kalibrovaném válci, nebo vážením na laboratorní automatické váze (v gramech). Bucak et al. (2007) používal při svém pokusu kónickou zkumavku kalibrovanou po 0,1 ml.

Zdravý a pohlavně dospělý beran by měl mít objem ejakulátu v průměru 1 – 1,5 cm³. Ejakulát kozla kolísá od 0,4 – 3 cm³ (Louda a kol., 2001). Menší objem ejakulátu bývá na jaře 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 až 2 – 3 cm³, ejakulát je pak méně kvalitní. Vliv na objem semene může mít plemenná příslušnost, věk, živá hmotnost samce, výživa, roční období, metoda a frekvence odběru semene (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Hustota

Hustota se posuzuje u každého ejakulátu ve sběrači v dopadajícím nebo procházejícím světle. Sperma beranů dobré kvality je hustá, neprůhledná tekutina

smetanové konzistence, která má vysokou viskozitu a dobrou zrnitost (Gamčík a Kozumplík, 1992). Dobrý, mírně zrnitý vzhled vytvářejí shluky spermatu, které se mírně pohybují. Řídké sperma je průsvitné, vodnaté a bez zrnitosti, což je špatně (Louda a kol., 2001).

Barva

Barva ejakulátu je dána hustotou a konzistencí semene. Je hodnocena vizuálně zejména ve vztahu k přítomnosti, nebo nepřítomnosti žlutého zabarvení. Většinou si autoři určují stupnici, podle které barvu hodnotí (Ahmad and Noakes, 1996). Semeno může být jasně žluté, světle žluté, nebo bílé (Ritar et al., 1992).

3.6.2 Hodnocení mikroskopických znaků

Mikroskopicky se posuzuje hustota, koncentrace spermií v 1 mm^3 a v celém ejakulátu, aktivita spermií, výskyt morfologických vad a pH (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Koncentrace

Koncentrace spermií se může určit odhadem, kdy se na sklíčko dá kapka spermatu a následně podle prostorového uspořádání spermií a jejich vzájemné vzdálenosti se provede subjektivní hodnocení. (Louda a kol., 2001). Semeno berana se může odhadem rozdělit podle hustoty na 6 stupňů: od velmi hustého spermatu, které obsahuje $4 - 5 \times 10^6$ spermií v mm^3 , až po velmi řídké s 1×10^6 spermií v mm^3 (Gamčík a Kozumplík, 1992). Průměrná koncentrace spermií berana je 3 000 000 v mm^3 (Jelínek a Koudela., 2003). Koncentrace spermií kozlů je $0,7 - 5 \times 10^6$ spermií v mm^3 , průměrně také 3×10^6 v mm^3 .

Přesně se může koncentrace určit pomocí počítačích komůrek nebo fotokolorimetricky. V použitelném semeně nesmí koncentrace klesnout pod 2×10^6 v mm^3 (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Při fotokolorimetrickém stanovení se na základě změření zakalení standardního roztoku, ve kterém je rozptýleno určité množství spermatu, stanoví jeho hustota. Výhodou tohoto způsobu 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 čtverečcích podložního sklíčka a následným dosazením této hodnoty do vzorce (Louda a Hegedušová, 2009).

Také se dá ke stanovení koncentrace spermií využít tzv. Karrasova klínu, do kterého se nalije ejakulát a zředí se roztokem NaCl. Následně se odečte na stupnici spermiodensimetru hodnota, 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 a kol., 2001).

Aktivita

Aktivita se hodnotí po zředění citrátem sodným nebo fyziologickým roztokem pod mikroskopem při zvětšení 250 – 350×. Sleduje se fyziologický přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou, který se vyjádří v %. Pro umělou inseminaci nesmí počet progresivně se pohybujících spermií klesnout pod 70 % (Louda a kol., 2001). V pokusu Kaya et al. (2002) byla aktivita hodnocena subjektivně pod fázovým kontrastním mikroskopem při 400× zvětšení, vybavené s vyhřívanou podložkou na 37 °C.

Mezi nefyziologické druhy pohybu se řadí: nepohyblivost, pohyb okolo hlavičky, do kruhu, opačný, zpáteční, trhavý, kolísavý, oscilační pohyb (kmitání bičíku na místě, občasný pohyb spermie) (Louda a kol., 2001).

Vířivost

Další se také hodnotí vířivost pohybu. Na sklíčku při menším zvětšení se může v dobrých ejakulátech pozorovat hromadný vířivý pohyb, který probíhá ve vlnách. Vyjadřuje společné hodnoty hustoty a pohybu a hodnotí se bodovou stupnicí. Hodnocení aktivity touto metodou je ale pouze orientační (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Morfologické změny spermií

Primární změny spermií vznikají při spermiogenezi, jsou také označovány jako změny vývojové. Tyto změny průměrně převažují. Jedná se především o změny tvaru hlavičky, změny ve vývoji akrozómu, změny v nukleoplasmě, patologické utváření spojení krčku, abnormality bičíku atd. Například narušením meiotické fáze spermiogeneze vznikají mnohjaderné spermatidy, dvojčata spermií, makrospermie a mikrospermie atd.

Při zánětlivých procesech ve varlatech vznikají atypické tvary hlaviček. Nejčastěji se vyskytují hlavičky zúžené, hruškovité, abnormálně velké, malé, asymetrické ovoidní, oválné, dále spermie s abnormální strukturou hlavičky. Mezi anomálie bičíku se řadí bičík vakovitý, kyjovitý, abnormální jsou i spermie s dvěma bičíky, či hlavičkami. Když převyšuje počet spermií více než 5 % s těmito morfologickými změnami, důsledkem je pravděpodobně porucha spermiogeneze (Louda a kol., 2001).

Sekundární morfologické změny spermií nastávají po delší době v ocasu nadvarlete, při ejakulaci, nesprávnou manipulací ejakulátu. Vliv na tyto změny má kvalita semenné plasmy, nesprávná manipulace a technologický postup při práci s ejakulátem. K sekundárním patologickým změnám patří poruchy funkčnosti membrán, poruchy permeability, poruchy spojené s nesprávnou činností mitochondrií, ztráty enzymatické činnosti, změny na spojovací části, stáčení bičíku a poruchy pohyblivosti spermií. Nejčastější sekundární morfologickou anomálií bývá svlečený akrozóm. Akrozóm bývá často zbobtnalý, důsledkem je prasklý akrozóm, který nasaje vodu. K abnormalitám u bičíku patří také zkrácení či prodloužení spojovací části, zúžení nebo ztlustění a přerušování spojovací části, dále neobvyklé zakroucení bičíku, nesprávné upevnění bičíku s hlavičkou a dekapitace. Do morfologických změn patří i nezralé spermie, které by neměly přesáhnout 2 % (Louda a kol., 2001).

pH ejakulátu

pH ejakulátu berana se pohybuje v rozpětí 6,4 – 7,2, u kozla 6,2 – 7,5 (Louda a kol., 2001) 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 a Kozumplík, 1992). Malejane et al. (2014) ve svém pokusu měřili pH pomocí pH metru a zkoumali, jaké je pH v průběhu roku a rozdíl v odběru do umělé pochvy a elektroejakulací. Vyšly jim tyto hodnoty: jaro 6,7, léto 6,8, podzim 6,8 a v zimě 6,8. A nevýznamné rozdíly v porovnání techniky odběrů.

3.6.3 Biologické zkoušky

Biologické testy zahrnují tepelné testy přežitelnosti, zkoušku rezistence, odolnost vůči chladovému šoku a procento živých a mrtvých spermií.

Tepelné testy přežitelnosti

Krátkodobý tepelný test přežitelnosti - zkumavky s 0,5 – 1 ml naředěného spermatu se vloží do vodní lázně a postupně zahřejí na teplotu 38 ± 1 °C. Po dosažení této teploty se zaznamenává začátek testu. Poté se v hodinových intervalech odebírají vzorky a provádí se posouzení aktivity spermií. Trvání nebývá delší než 6 hodin (Louda a Hegedüšová, 2009).

Dlouhodobý chladový test přežitelnosti - zkumavky se 3 ml naředěného spermatu se vloží do chladničky (teplota 1 – 3 °C). Každý den se poté ve stejnou dobu sleduje aktivita spermií pod mikroskopem s vyhřívanou destičkou. Dobré ejakuláty udrží 96 hodin od odběru aktivitu alespoň 50 % (Louda a Hegedüšová, 2009).

Zkouška rezistence

Jedná se o ukazatel odolnosti spermií vůči 1 % roztoku NaCl. Vyjadřuje se jako poměr vzorku spermatu zředěného tímto roztokem, který se postupně přilévá do spermatu až do okamžiku, kdy ustane přímočarý pohyb spermií (Louda a kol., 2001). Minimální hodnota u ejakulátu beranů je 20 000, dobré ejakuláty ale dosahují hodnot 30 000 – 60 000 (Louda a Hegedüšová, 2009).

Odolnost vůči chladovému šoku

Kapiláry se uloží při teplotě 0 °C, do chlazené lázně po dobu deseti minut. Poté jsou vzorky ohřáty na 37 °C a smíchají se s eosinem, dále jsou promíchávány kruhovým pohybem po dobu 30 sekund. Pak se přidá nigrosin. Roztěry jsou zkoumány pod mikroskopem s 1 000× zvětšením a s olejovou imerzí (Beran et al., 2013).

Procento živých a mrtvých spermií pomocí barvení

Při počítání živých a mrtvých spermií se používá kontrast při barvení různými barvivy, například methylenová modř, eozín, violet. Pracuje se s tím, že mrtvé spermie mají vyšší propustnost svých membrán. U eozíno - nigrozínového barvení se barvivo eozín dostane skrz membránu a zbarví tím mrtvé spermie načerveno, zatímco živé spermie zůstanou neobarveny. Černé pozadí tvořené nigrozínem umožňuje, aby byl rozdíl v zbarvení mrtvých a živých spermií mnohem lépe viditelný. Pozoruje se pod mikroskopem

se zvětšením 1000×, každá laboratoř si stanovuje minimální počet spočítaných spermií, z nichž se vypočítá procento mrtvých a živých (Kaya et al., 2002).

3.6.4 Biochemické zkoušky

Dehydrogenační zkouška

Semeno se smíchá s roztokem methylenové 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 (Louda a Hegedušová, 2009).

3.6.5 Specializované metody hodnocení

Počítačová analýza spermatu CASA (Computer Aided Sperma Analysis)

CASA umožňuje přesnou a objektivní analýzu široké škály spermií. Výrazně zlepšuje schopnost laboratoře přesně analyzovat motilitu. Analýza spermií pomocí fotografie určuje morfologii, fragmentaci DNA, vitalitu a akrozomální reakci. Chyby způsobené lidským faktorem jsou minimalizovány. Tato metoda udává spolehlivé údaje pro vědecké práce, a nejen pro ně. Je složena z počítače a mikroskopu, kteří spolu komunikují (Tarrandellas, n. d.).

CASA určuje parametry: křivočará (kontinuální) rychlost (VCL) (měřeno v $\mu\text{m/s}$), je definována jako průměrná rychlost pohybu spermií za uraženou vzdálenost, včetně všech odchylek pohybu spermií. Amplituda posunu hlavičky na strany (ALH) (měřeno v μm), jsou to průměrné hodnoty pohybu hlavičky spermií do boku. Průměrná rychlost dráhy (VAP) (měřeno v $\mu\text{m/s}$), je definována jako rychlost spermií přes vypočtenou přímočarou dráhu, lineární rychlost (VSL) (měřeno v $\mu\text{m/s}$), které jsou definovány jako průměrná rychlost vypočtená s použitím lineární vzdálenosti mezi začátkem a koncem dráhy spermií. Linearita (LIN) je definovaná jako podíl lineární a kontinuální rychlosti $VSL / VCL \times 100$, a další (Tsakmakidis, 2010).

Robayo et al. (2008) se pokoušeli zjistit provázanost mezi hodnotami CASA a pohybem spermií v děložním hlenu. Kontinuální rychlost (VCL) a rychlost průměrné dráhy (VAP) jsou jediné kinematické parametry, které mají významnou pozitivní korelaci se schopností migrovat v děložním hlenu ovcí. Kontinuální rychlost (VCL), rychlost průměrné dráhy (VAP), lineární rychlost (VSL) a linearita (LIN) velmi významně souvisí

s migrací v kožím děložním hlenu. Tyto výsledky naznačují, že specifické kinematické parametry zjištěné CASA určují schopnost spermií kolonizovat a migrovat skrze děložní hlen s různými mechanickými vlastnostmi.

Hypoosmotický tlak (Hoos test)

Funkční membrána je předpokladem pro fertilizační schopnost spermií, neboť hraje zásadní roli při kapacitaci, akrozomální reakci a vazby spermie na vajíčko. Hypoosmotický test vyhodnocuje funkční integritu plasmatické membrány spermie a také slouží jako užitečný ukazatel plodnosti spermií. Tento test předpovídá membránovou integritu stanovením schopnosti membrány spermie udržet rovnováhu mezi spermií a jejím okolím. Příliv tekutiny v důsledku hypoosmotického stresu způsobuje, že ocas spermie se začne svíjet, nebo bobtnat. Vyšší procento takto deformovaných spermií indikuje, že spermie mají funkční a neporušené plasmatické membrány (Ramu and Jeyedran, 2012). Fonseca et al., (2005) popsali postup při svém pokusu takto: objem ejakulátu 10 μ l se jemně míchá do 2 ml hypoosmotického roztoku, a následně je inkubován po dobu jedné hodiny ve vodní lázni při 37 °C. Po inkubaci se 20 μ l roztoku obsahující semeno umístí na mikroskopické sklíčko. Vzorek přikrytý krycím sklíčkem se vyhodnotí za použití mikroskopu při 1000 \times zvětšení. Celkem se počítalo 200 spermií alespoň v pěti různých oblastech.

3.7 Ředidla

Po zhodnocení se ejakulát ředí. Semenná plasma sama poskytuje pouze omezenou ochranu spermií proti změnám teploty. Pro skladování při snížené teplotě je nutné prodloužit životnost spermií pomocí ředidel (Salamon and Maxwell, 1995a). Ředidlo musí mít dostatečné pH a pufrací kapacitu, vhodný osmotický tlak, a mělo by chránit spermie před mrazem (Salamon and Maxwell, 2000).

Kozdrowski et al. (2007) při pokusu zjistili, že separace semenné plasmy odstředěním a její náhrada ředidlem zvýšila motilitu spermií i po zmražení a rozmražení. Pro nahrazení semenné plasmy použili tris pufr obsahující glukózu, kyselinu citrónovou a glycerol s přísadkou vaječného žloutku. Z čehož vychází, že semenná plasma není potřebná k mražení spermatu, není k tomuto účelu produkována. Důležité je správně namíchané ředidlo.

Gil et al. (2011) zkoumali přídavek žloutku do UHT mléka a komerčního ředidla INRA96[®], což je ředidlo na bázi mléka. Sperma bylo uchovááno při 5 °C. Přídavek 5 % vaječného žloutku a 2 % glycerolu, nebo jen 5 % vaječného žloutku zlepšil kvalitu spermatu. Prodloužila se životaschopnost spermií nejméně o 48 hodin. Vaječný žloutek je výhodnější, když pochází od těžkých plemen kura než od lehkých (Leboeuf et al., 2000).

Ředidlo na bázi citrátu a cukru se využívalo jako jedno z prvních u ředění dávek býků. Názory se liší v typu použitého cukru. Využívá se arabinóza, fruktóza a glukóza.

Další ředidlo je mléko. Je to izotonické médium obsahující mnoho komponent příznivých k udržení životaschopnosti spermií. Používá se sušené, odstředěné mléko a mléko UHT v kombinaci s arabinózou, fruktózou nebo vaječným žloutkem.

Ředidlo na bázi laktózy použité samotné, nebo s vaječným žloutkem nemělo přesvědčivé hodnoty březosti 12 % - 46 %. Nakonec vyšlo nejlepší ředit laktózu s arabskou gumou, citrátem, žloutkem a glycerolem, kdy vycházela březost ovcí od 26 % do 65 % (Salamon and Maxwell, 1995a).

Ředidlo na bázi sacharózy, které obsahuje antioxidanty sacharózy je používáno jako hlavní složka syntetických ředidel, protože bylo zjištěno, že ochrana akrozomové integrity spermií je vyšší, než u glukózy, fruktózy nebo laktózy. Beraní sperma neobsahuje žádné antioxidanty, proto je potřebné je doplňovat v syntetické formě např. vitamín E. Jinou formou ochrany proti peroxidaci lipidů je příprava dávek v anaerobním prostředí při použití buď vodíku, nebo dusíku (Salamon and Maxwell, 1995a).

Bylo zjištěno, že cukry s vysokou molekulovou hmotností, jako je rafinóza, poskytují lepší ochranu spermií během rychlého zmrazení, než ty, které mají nízkou molekulovou hmotnost. Účinek trisacharidů ve srovnání s mono- a disacharidy byl hodnocen jako lepší pro kryokonzervaci (Salamon, 1968).

Systematické zkoumání tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) jako základní prvek pro ředidlo podniknul Salamon and Visser (1972). Ve svých studiích zjistili, že glukóza byla vhodnější cukerná složka v kombinaci s tris než fruktóza, laktóza nebo rafinóza. V testech spermatu použili pelety zmrazené na suchém ledu. Závěr byl, že procento zabřeznutí bahnic se pohybovalo od 30 % do 57 % (Salamon and

Maxwell, 1995a). K ukončení množení mikroorganismů se používají antibiotika např. penicilin a streptomycin (Salamon and Maxwell, 2000).

3.8 Uchovávání spermatu v tekutém stavu

Hlavní metody skladování spermatu v tekutém stavu jsou skladování při 0 – 5 °C nebo 10 – 15 °C a při okolní teplotě podle reverzibilní inaktivace spermií (Maxwell and Salamon, 1993).

V studii Salamon and Maxwell (1995a) zkoumali plodnost ovcí inseminovaných semenem, uloženém na dobu delší než 24 hodin. Pokles procenta zabřeznutí byl 10 – 35 % za každý den skladování. Zatímco procento zabřezlých bahnic inseminovaných čerstvým spermatem bylo 68 % až 75 %. Pro sperma skladované 24, 48 a 72 hodin bylo 45 až 50 %, 25 – 30 % a 15 – 20 %, v uvedeném pořadí. Leboeuf et al. (2000) zjistili, že v 8 dnech skladování při teplotě 5 °C laparoskopickou metodou sperma ještě mělo oplozovací schopnosti. Bez ohledu na ředidlo, zředovací rychlost, teplotu nebo skladovací podmínky.

Oplozovací schopnost kapalného spermatu může být zlepšena pečlivě načasovanou laparoskopickou intrauterinní inseminací. Chirurgická inseminace umožnila přijatelnou plodnost s použitím chlazeného spermatu skladovaného až 8 dní, a některé spermie si zachovaly svou fertilizační schopnost až 10 dní (Salamon et al., 1979).

3.9 Mrazení

Mrazení dávek je pro spermie velmi namáhavé, a relativně vysoký podíl (40 – 60 %) spermií si zachovává pohyblivost po mrazení a rozmrazování, ale pouze asi 20 až 30 % zůstává biologicky aktivních. Spermie můžou být pohyblivé, ale poškození už nedovolí, aby taková buňka vstoupila do vajíčka a oplodnila ho. Pohyblivost a struktura spermií se může narušit různým způsobem, ale není známo, kdy dochází ke změnám. Základní kryogenní poškození spermií může být strukturální (fyzické), biochemické nebo funkční (Salamon and Maxwell, 1995b).

Častější metodou než uchovávání v tekutém stavu je mrazení a uchovávání v tekutém dusíku. Berání sperma se zmrazovalo v ampulích. Tato metoda se dnes zřídka používá, a zmrazování se provádí v PVC pejetách nebo ve formě pelet (kuliček). Zmrazení spermatu

v pejetách se provádí pomocí kapalného dusíku, oproti tomu pelety se mrazí na suchém ledu (Salamon and Maxwell, 2000).

Začíná se chlazením zředěného spermatu až na teplotu blízkou 0 °C, je to období adaptace spermií na snížený metabolismus. Je to čas, kdy dochází k ekvilibraci, který potřebují spermie pro to, aby mohly dosáhnout vyrovnané intracelulární a extracelulární koncentrace.

Ritar et al. (1990b) uvádějí, že optimálním zmrazovacím režimem je to, že inseminační dávky drží 4 – 5 cm nad kapalným dusíkem po dobu 30 s nebo déle, a následně se ponoří do tekutého dusíku. Pejety vystavené páře pouze 10 s, měly životaschopnost buněk vážně narušenou. Doba chlazení a mrazení spermatu závisí na velikosti stébla a typu stojanu sloužícího k držení pejet v páře v průběhu zmrazování. Semeno se plní do pejet po 0,25 ml nebo 0,50 ml. Pejety se plní při 30 °C.

Rychlost chlazení je regulována vzdáleností inseminačních dávek od úrovně chladiwa. Pejety v parách kapalného dusíku o teplotě mezi -75 °C a -125 °C, neměly negativní účinek na kvalitu spermií, ale teplota par -55 °C snižuje přežívání spermií. Nakonec se jako nejlepší mrazení ukázalo při poklesu 16 až 35 °C za minutu.

Zmrazování pelet se obvykle provádí umístěním kapky semene do prohlubni na suchém ledu, na polymerovou desku ochlazenou na -80 až -95 °C, hliníkovou desku nebo nerezovou desku. Rychlost chlazení může být regulována objemem spermatu pelety a teplotou prostředí, na kterém mrazení probíhá. Objem pelety je od 0,03 do 0,86 ml, mrazení probíhá poklesem teplot o 30 °C až 95 °C za minutu. Beraní spermie mohou tolerovat širokou škálu tuhnutí od -79 °C až -160 °C. Pelety obsahují 0,1 - 0,3 cm³ (Salamon and Maxwell, 1995a).

Nakonec všech metod se ampule, pejety i pelety uloží přímo do tekutého dusíku. Při teplotě skladování -196 °C není ovlivněna plodnost několik let. V testu plodnosti spermatu uloženém v bance za 3, 5, 7 a 11 let, bylo procento březosti stanoveno po oplodnění do děložního krčku 53 %, 53 %, 52 % a 55 % v tomto pořadí. V dalším testu se použilo sperma uložené po dobu 16 let, ve stejné bance, a po laparoskopické inseminaci byl výsledek 59 % březost (Salamon and Maxwell, 1995b).

3.10 Rozmrazování

Postup zmrazování a rozmrazování je pro přežití spermií stejně důležitý. Spermie, které přežily ochlazení na teplotu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, musí dvakrát projít kritickou teplotou a to od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ampule se obecně rozehrívají při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lepší výsledky však jsou při rozehrívání při $2 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozehrívání pejet se provádí při teplotě $38 - 42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety se rozehrívají buď v roztoku (mokrý cesta) nebo ve zkumavce (suchá cesta). Teploty se pohybují od 37 do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do zkumavky je dobré dát více než dvě pelety (Salamon and Maxwell, 1995a).

3.11 Inseminace

Rozlišujeme tři klasické inseminační techniky: intravaginální, intracervikální a intrauterinní, ta se dělí na transcervikální a laparoskopickou. Tyto techniky jsou obecně používány při inseminaci čerstvým, nebo chlazeným spermatem. Používá-li se zmrazené sperma je potřeba brát v úvahu, že nejvhodnější a nejčastější postup je laparoskopická intrauterinní inseminace. Cervikální bariéra kozího děložního krčku je relativně snadněji překonatelná než u ovce (Daskin et al., 2016). Děložní krček je v důsledku hlavní překážkou pro průchod nástrojů, jelikož je obtížně rozšířitelný, má pevnou strukturu a je velmi dlouhý (Oliveira, 2009).

Intravaginální – je to nejjednodušší metoda, v jiných zemích, například v Norsku, Austrálii, ji používají sami farmáři. Provádí se za použití inseminační pipety s průměrem 5 mm a zaoblenou špičkou. Bez použití zrcátka, sperma se umístí tak hluboko do pochvy, jak je to jen možné (Nordsoga et al., 2010). Oliveira (2009) uvádí hloubku 13 cm a uspokojivé výsledky za použití čerstvého semene.

Intracervikální – sperma se deponuje asi $5 - 15\text{ mm}$ do kanálu děložního krčku inseminační pipetou. Kdy se děložní krček lokalizuje pomocí poševního zrcátka a světelného zdroje (Andersen et al., 1973).

Intrauterinní transcervikální – plemenice je fixována ve hřbetní poloze, kdy má pánevní končetiny vyvýšené. Pochva se rozšíří použitím poševního zrcátka. Děložní hrdlo se uchopí a přitáhne za použití kleští a inseminační nástroj se zavede do krčku. Semeno se

deponuje za krček do dělohy (Halbert et al., 1990). Kozí děložní krček není tak složitý a podobá se více děložnímu krčku skotu. Pro kozy představuje transcervikální intrauterinní inseminace efektivní a snadno implementovanou metodu (Oliveira, 2009).

Intrauterinní laparoskopická – k provedení této techniky je samice udržována ve hřbetní poloze na podložce s 45° sklonem, aby měla hlavu směrem dolů. Po anestézii a antiseptice kůže před mléčnou žlázou je zaveden první trokar s kanylou, následně je zaveden druhý trokar a kanyla. Endoskop je vložen přes trokar a inseminační pipeta je vložena přes kanylu. Ukládání semene se provádí do každého rohu dělohy. Tato technika vyžaduje použití zvláštního vybavení a provedena specializovaným profesionálem. Proto je to nejdražší metoda ze všech (Oliveira, 2009).

Ritar et al. (1990a) provedli experiment za použití celkem 1833 kašmírských koz, kdy zkoumali rozdíly plodnosti při cervikální a laparoskopické inseminaci. Dospělé kozy (starší 2,5 let), které předtím měly kůzlata, byly inseminovány do děložního krčku, nebo laparoskopicky do děložních rohů. Hodnoty březosti stanovené ultrazvukem (75 – 80 dnů po oplodnění) byly po cervikální inseminaci 39,1 % a laparoskopické inseminaci 52,1 % až 63,6 %. Anakkul et al. (2014) uvádějí, že při laparoskopické inseminaci zmrazeným semenem vyšlo procento březosti 56,67 %, Martinez-Rojero et al. (2006) u chlazeného spermatu procento zabřeznutí 67,5 % a plodnost 118 %. Andersen et al. (1973) vyšlo procento zabřeznutí ovcí u intrauterinní inseminace 54 % a intracervikální pouze 29 %. Tímto se potvrzuje pravidlo, že čím hlouběji se semeno deponuje, tím se zvyšuje procento zabřeznutí.

Salamon and Maxwell (1995b) uvádějí tyto metody na zlepšení plodnosti ovcí: zvýšení koncentrace spermií centrifugací a menším ředěním, tím se dostane do pohlavního traktu větší počet spermií. Jinou metodou je použití relaxinu, oxytocinu, prostaglandinu a dalších látek. Tyto hormony působí na uvolnění děložního krčku a usnadňují tak cervikální a transcervikální inseminaci. Jako další uvedli reinseminování, kdy se první inseminace provede do 12 hodin od začátku říje a druhá do 8 – 13 hodin od první. Další je synchronizace říje pomocí vaginálních tamponů, anebo inseminace v průběhu přirozené říje. Výhodu reinseminování uvádí Karatzas et al. (1997), kdy vyšly hodnoty březosti při jedné inseminaci 48,9 % a při opakované inseminaci 70,4 %.

3.12 Vlivy působící na kvalitu ejakulátu

3.12.1 Dědičný vliv

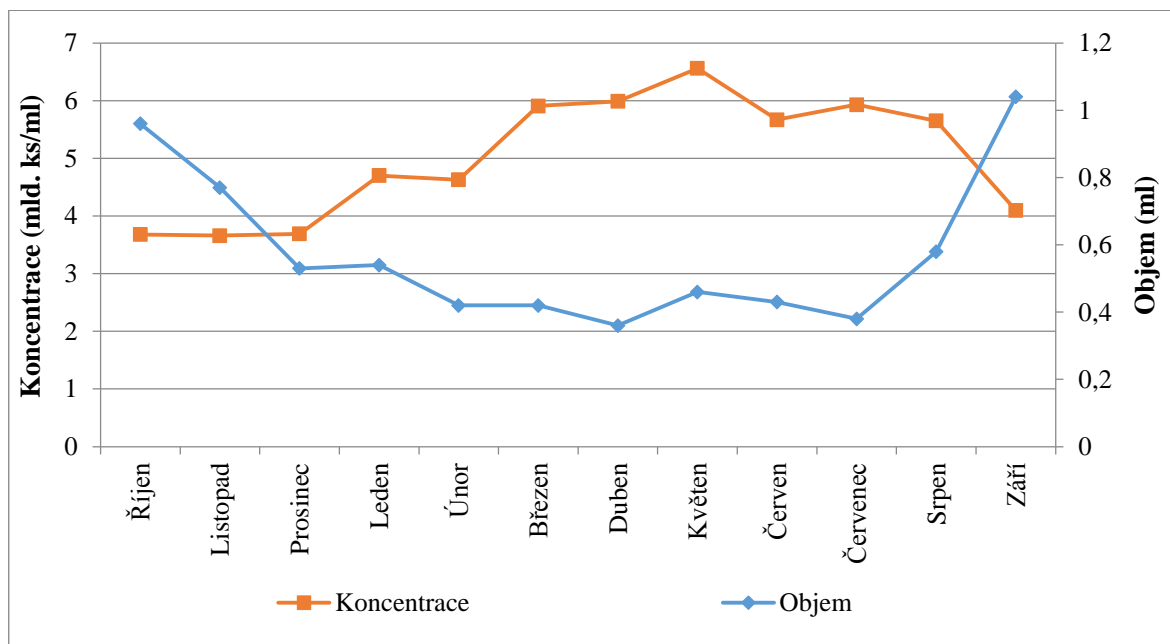
Odhadem koeficientů dědivosti na objem, koncentraci, pohyblivost a počet spermií se zabývali David et al. (2007) na ejakulátech shromážděných od beranů plemen lacaune a manech tête rousse. U ukazatelů objemu, koncentrace a počtu spermií se koeficienty dědivosti pohybovaly od 0,12 do 0,33. Velmi nízká byla odhadnuta dědivost pro motilitu ($h^2 = 0,02 - 0,14$). Mandiki et al. (1998) poukázali na rozdíly v koncentraci spermií a objemu, který se v průběhu roku měnil u plemen texel a suffolk, ale ne u beranů ile-de-France. Z toho se dá usuzovat, že na úrovni plemen, ale i jednotlivců, jsou rozdílné vlastnosti nejen v exteriéru a užitkovosti, ale i v reprodukčních ukazatelích.

3.12.2 Roční období

Hlavně kozli vykazují silnou sezónnost v kvalitě a kvantitě produkce spermií. Proto je omezená doba, po kterou může být sperma odebráno pro skladování, ale ta může být rozšířena pomocí optimalizace výživy a řízení světelného režimu (Ritar, 1993). Na podzim tj. v připouštěcím období je kvalita ejakulátu ve všech ukazatelích nejlepší, a proto je i nejvhodnější pro dlouhodobou konzervaci. Ahmad and Noakes (1996) uvádějí, že v září dosahuje obsah ejakulátu nejvyšších hodnot. Avšak nejlepší koncentraci zjistili v květnu, viz graf 3. Kvalita ejakulátu beranů, kteří jsou celoročně pravidelně odebíráni na inseminačních stanicích, je lepší než u beranů používaných v přirozené plemenitbě (Louda a Hegedúšová, 2009).

Malejane et al. (2014) prováděli studii na pravidelně odebíraných beranech plemene dorper a zkoumali, jaká je kvalita spermatu v průběhu roku a zároveň jaká je kvalita spermatu při odběru do umělé pochvy a při elektroejakulaci. Obecně platí, že sperma s výrazně vyšší kvalitou bylo zaznamenáno v létě, na podzim a na jaře. Dále vyšlo, že elektroejakulace byla méně spolehlivá metoda, a proto doporučili odběr do umělé pochvy jako více přijatelný způsob odběru spermatu. V průběhu zimního období se nedoporučuje odebírat semeno, a to zejména při použití elektroejakulace.

Graf 3: Vliv ročního období na objem spermatu a koncentraci spermií u kozlů



Zdroj: Ahmad and Noakes, 1996

Benmoula et al. (2017) provedli studii provedenou s cílem posoudit účinek ročních období se závislostí na kvalitu spermatu, složení semenné plasmy a pohyblivosti spermií během skladování ejakulátu beranů. Sperma bylo odebráno od pěti dvou až tříletých beranů v průběhu jednoho roku. Ihned po odběru a vyhodnocení se semeno ředilo. Poté byly vzorky hodnoceny v různých časech skladování (0, 8, a 24 hod). Výsledky ukázaly, že kvalita spermatu a koncentrace celkového proteinu v semenné plasmě byly v průběhu roku v podstatě konstantní. Nicméně celková koncentrace lipidů a cholesterolu se výrazně zvýšila v zimě a v létě. Žádný rozdíl nebyl zaznamenán u celkové motility. Došlo se tedy k závěru, že berani mají schopnost produkovat sperma s vysokou kvalitou po celý rok. Karagiannidis et al. (2000) toto potvrzuje tvrzením, že nejlepší sperma bylo sice produkováno v období rozmnožování (pozdním létě a na podzim), ale účinky sezónních vlivů nebyly dostatečné, aby zabránily produkci spermatu použitelného k inseminaci po celý rok.

3.12.3 Věk

Salhab et al. (2003) zjistili, že od věku 11 měsíců již můžou berani produkovat velmi kvalitní ejakulát. Průměrná hodnota pro objem ejakulátu byla 1,2 ml, progresivní motilita činila 75 % a koncentrace spermií $4,0 \times 10^9$ spermií / ml. Důležité bylo, aby se mladí berani přizpůsobili odběru semene do umělé pochvy.

Lymberopoulos et al. (2010) na téma věku také prováděli pokus. Berani byli rozděleni do dvou skupin. Každá skupina se skládala z pěti beranů věku buď 1 – 2 roky (mladí) nebo 4 – 5 let (staří). Ejakuláty byly zředěny a zmrazeny v 0,25 ml dávky. Výsledky ukázaly, že staří berani měli významně nižší hodnoty hyperaktivních spermií, vyšší procento živých spermií a spermie dostatečně dimenzované s neporušenou plasmatickou membránou a funkčními mitochondriemi, bahnice vykazovaly vyšší procento zabřeznutí. Mandiki et al. (1998) potvrzují, že procento mrtvých a abnormálních spermií se snížilo s rostoucím věkem beranů.

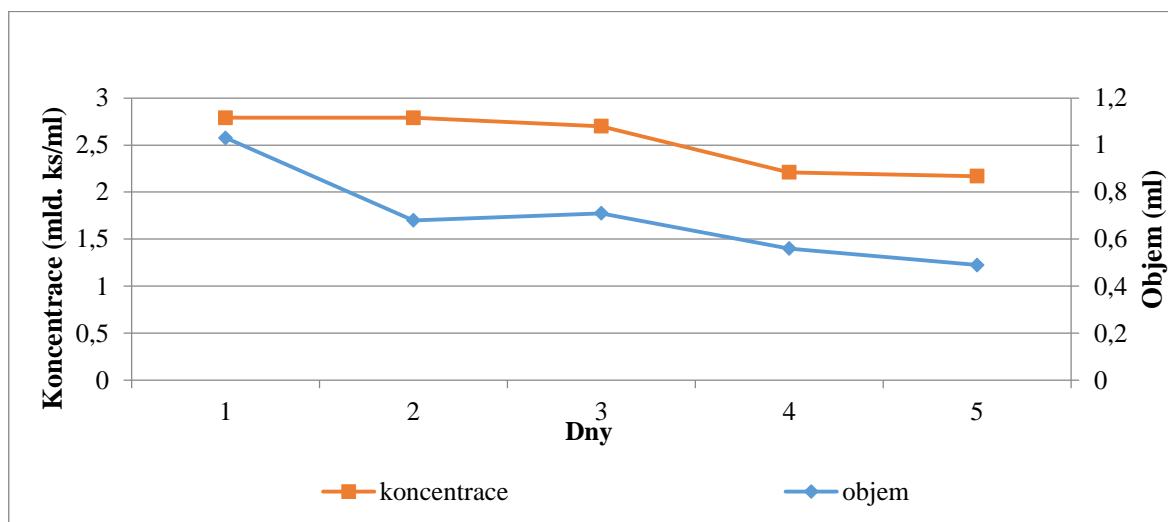
Spermie mladých beranů měly vyšší schopnost vázat se na vajíčko než spermie starších beranů. Závěrem lze říci, že starší berani mají lepší kvalitu spermatu a vyšší plodnost než mladí berani. Což se projevilo při následné laparoskopické inseminaci bahnic v synchronizované říji (Lymberopoulos et al., 2010).

3.12.4 Frekvence odběrů

Sperma se odebírá 1 – 2× za den, 5× za týden. U mladých plemeníků je frekvence odběrů nižší. V průměru lze od jednoho berana v připouštěcím období získat za týden 50 – 200 inseminačních dávek obsahujících $100 – 360 \times 10^6$ spermií. V mimosezónním období se získá méně, průměrně asi 50 inseminačních dávek (Louda a Hegedušová, 2009).

Yotov et al. (2009) provedli studii na účinek frekvence odběrů na přežití spermií ve zředěném spermatu. Bylo vyšetřeno třicet dva ejakulátů. Od každého berana byly odebrány 4 ejakuláty v 10 minutových intervalech ráno a odpoledne. Objem spermatu, koncentrace a progresivní pohyb spermií ve vzorcích se postupně s každým odběrem snižoval (Kaya et al., 2002; Mandiki et al., 1998; Ritar et al., 1992). V grafu 4 je uveden pokles objemu a koncentrace v pěti po sobě jdoucích dnech. Nejvyšší míra živých spermií byla zjištěna ve 2. ejakulátu. Frekvence ejakulace a doba odběru spermatu měla vliv na pohyblivost spermií.

Graf 4: Vliv frekvence odběrů na objem spermatu a koncentraci spermií u kozlů



Zdroj: Ritar et al., 1992

3.12.5 Teplota

V podmínkách s vyšší teplotou má nepříznivý vliv i vlněná pokrývka. Po ostříhání beranů se zlepšuje termoregulace a kvalita ejakulátu se postupně upraví (Gamčík a Kozumplík, 1992). Brooks and Ross (1962) zkoumali vliv okolní teploty na kvalitu ejakulátu. A zjistili, že teplota 27 °C zřejmě představuje kritický bod, nad který se kvalita spermatu začíná zhoršovat. Trvalá teplota nad 30 °C snižuje procento zabřeznutí ovcí na 50 %, při teplotě 38 °C po dobu tří měsíců trvání je reprodukce zcela vyloučená. Vliv na reprodukci má i chladový stres, i když největší vliv má na novorozená mláďata. Chladový stres ovlivňují především srážky, vítr a výška rouna (Mátlová a Loučka, 2002).

3.12.6 Zdravotní stav

Správná péče o kozla a berana může podpořit dosažení jeho genetického potenciálu. Jakákoli nemoc sníží reprodukční výkon a zhorší charakteristiky ejakulátu. Pravidelná kontrola plemeníků může pomoci zabránit neočekávaným poruchám v šlechtitelských programech (Rowe, 2010).

Neplodnost nebo narušení plodnosti má mnoho příčin zahrnující celou řadu specifických poruch. Poškození spermatogeneze, chromozomální abnormality, vrozená onemocnění, bakteriální nebo virové infekce, infekce přídatných pohlavních žláz, dysfunkce endokrinního nebo imunitního systému, neoplasie, vystavení chemickým látkám

nebo ozáření, nutriční a environmentální vlivy, jsou faktory, které mohou působit na fertilizační schopnost samců (Tsakmakidis, 2010). Při zánětech ve varlatech vznikají atypické tvary hlaviček (Louda a kol., 2001).

Ahmad et al. (2009) prováděli studii vlivu pesticidů na parametry ejakulátu. Kdy po použití postřiku pesticidu měli kozli snížený objem ejakulátu, motilitu spermií a koncentraci spermií. Procento spermií abnormálních (bez ocasu, ohnuté, se svinutým ocasem) bylo mnohem vyšší než u kontrolních kozlů. Nejhorší výsledky byly od 30. do 75. dne po potřísnění, po 75. dni se výsledky začaly zlepšovat.

3.12.7 Výživa

Zvířatům by se měla krmit jen krmiva hygienicky nezávadná, jen taková krmiva mohou mít i dieteticky příznivé účinky (Mátlová a Loučka, 2002).

Výživa kozlů a beranů je důležitým faktorem ovlivňujícím jak kvalitu ejakulátu, tak i sexuální libido. Cílem správné výživy je zajistit plemennou kondici v průběhu celého roku. Celý rok se podává vysoce kvalitní seno, v létě 0,8 – 1,5 kg, v zimě 1,0 – 2,0 kg. Siláž podáváme jen v malém množství. Pastva, případně zelená píce (3 – 4 kg), je jen jako doplněk krmné dávky. V zimě se podává řepa nebo krmná mrkev v množství 1,0 – 1,5 kg. Berani musí mít přístup k dostatku pitné vody a minerálnímu lizu (Mg, Se a vitamin E) (Suchý a kol., 2011).

Valdová (2002) uvádí, že před začátkem připouštěcí sezóny by berani měli mít BCS 3,5 až 4,0. Na zlepšení kondice plemenných beranů je čas nejpozději 6 až 8 týdnů před začátkem připouštěcí sezóny. Jako přírůstek na zlepšení kondice je možno počítat 1 až 1,5 kg kukuřice nebo ječmene na den. Suchý a kol. (2011) doporučují z jadrných krmiv: oves, dále luštěniny, hrách, bob, luskovinoobilní směsky, naklíčenou pšenici, pšeničné otruby a kvalitní pokrutiny, minerální látky a vitaminy (A, D, E). Uvádí také, že dieteticky nevhodné jsou lněné pokrutiny, které působí negativně na kvalitu semene, stejně nepříznivě působí krmení závadným krmivem. Mellado et al. (2006) uvádějí, že některé rostliny v dietě kozlů mohou výrazně ovlivnit parametry ejakulátu.

3.12.8 Velikost šourku a rohů

Belibasaki and Kouimtzis (2000) uvádějí, že na pohlavní aktivitu má vliv hmotnost těla. Ukázalo se, že mladší berani vážící více přichází do puberty dříve, než starší, ale hůře krmení, a tím pádem lehčí berani.

Mukasa-Mugerwa and Ezaz (1992) zkoumali vztah mezi přírůstkem po odstavu a obvodu šourku. Denní přírůstek vyšel 48,5 gramů a zvětšení obvodu šourku o 0,07 cm denně. Autor uvádí vysokou korelaci mezi těmito parametry. Test se ukončoval u těch jedinců, kteří měli při odběru více než 50×10^6 spermií a 10 % motilitu. Průměrný věk vyřazení byl 288 dní a průměrný obvod šourku v tomto věku byl 21,5 cm. Dospělo se k závěru, že měření šourku může být použito jako kritérium včasného výběru do plemenitby.

Na vztahy se zaměřili také Rege et al. (2000), zjistili korelaci mezi obvodem šourku a objemem semene a motilitou, kdy se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,55 – 0,62. Vyšší byla korelace mezi objemem šourku, váhou varlat a počtem spermií ve varlatech. U dvou plemen romney a merino vyšly stejné hodnoty, a to 0,75 (Knight, 1977).

Turri et al., (2015) při pokusu zjistili, že obvod šourku a velikost rohů (u rohatých plemen) souvisí s kvalitou spermatu, pokud jde o produkci spermií (koncentrace, celkový počet spermií) a přítomnosti normálních spermií, proto by mohly být použity tyto parametry také pro výběr zvířat do plemenitby.

4. Závěr

Hodnocení kvality ejakulátu je důležité pro určení hodnot reprodukčních ukazatelů plemeníků, stejně tak i pro produkci inseminačních dávek. V práci je uveden soupis metod hodnocení. Počínaje makroskopickým, kdy se hodnotí objem, hustota, barva, pach a přímíseniny. Další jsou metody mikroskopické, které mají přímý vliv na zjištění plodnosti. Jsou sem řazeny hustota, koncentrace, aktivita spermií, výskyt morfologických vad a pH ejakulátu. Významné pro zjišťování plodnosti jsou i biologické a biochemické testy, které zahrnují tepelné testy přežitelnosti, zkoušku rezistence, odolnost vůči chladovému šoku, procento živých a mrtvých spermií a dehydrogenační zkoušku. Uvedeny jsou i nové specializované metody, pomocí nichž se určují další parametry spermatu. Těmito jsou počítačový systém CASA a hypoosmotický test.

Významná část je i příprava inseminačních dávek, jejich ředění, ekvilibrace, mrazení, uchovávání a rozmrazování, následovaná vlastní inseminací. Studie se také zabývá vlivy, které mohou působit na kvalitativní a kvantitativní znaky ejakulátu. Mohou se dělit na faktory vnitřní a vnější. Z vnitřních to jsou: dědičný vliv, věk, zdravotní stav a velikost, z vnějších faktorů: roční období, frekvence odběrů, teplota a výživa. V bakalářské práci je uveden soupis všech dostupných poznatků o kvalitativních a kvantitativních parametrech ejakulátu beranů a kozlů.

5. Seznam použité literatury

Ahmad, N., Noakes, D. E. 1996. Seasonal variations in the Semen quality of young British goats. *British Veterinary Journal*, 152 (2), 225-236.

Ahmad, M., Hussain, I., Khan, A., Najib-ur-Rehman. 2009. Deleterious effects of cypermethrin on semen characteristics and testes of dwarf goats (*Capra hircus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*. 61 (4), 339-346

Andersen, v. K., Aamdal, J., Fougner, J. A. 1973. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*. 8 (3), 113-118.

Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Khunmanee, S., Diloksumpan, P., Berg, D. K., Techakumphu, M. 2014. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. *Theriogenology*. 82 (8), 1137-1144.

Belibasaki, S., Kouimtzis, S. 2000. Sexual activity and body and testis growth in prepubertal ram lambs of Friesland, Chios, Karagouniki and Serres dairy sheep in Greece. *Small ruminant research*, 37 (1), 109-113.

Benmoula, A., Badi, A., El Fadili, M., EL Khalil, K., Allai, L., El Hilali, A., El Amiri, B. 2017. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Animal Reproduction Science*. („in press“)

Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčárková, A., Doležalová, M., Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun*, 61, 1575-1581.

Brooks, J. R., Ross, C. V. 1962. Effect of ambient temperature and thyroxine therapy on quality of rams. *Journal of Animal Science*. 21 (4), 700-705.

Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67 (5), 1060-1067.

Bucek, P., Kölbl, M., Milerski, M., Pind'ák, A., Mareš, V., Konrád, R., Roubalová, M., Škaryd, V., Hošek, M., Rucki, J. 2016. Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2015. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. a Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR. 198 s.

ČSÚ. 2016. Soupis hospodářských zvířat - k 1. 4. 2016 [cit. 2017-04-08]. Dostupné z <<https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-hospodarskych-zvirat-k-1-4-2016>>

Daskin, A., Tekin, K., Tirpan, M. B., Inanc, M. E., Cil, B., Alemdar, H. 2016. The effect of different insemination techniques and cervical conformation index on fertility rates in Angora goat. *Animal Reproduction Science*. 169, 116.

David, I., Druart, X., Lagriffoul, G., Manfredi, E., Robert-Granié, C., Bodin, L. 2007. Genetic and environmental effects on semen traits in Lacaune and Manech tête rousse AI rams." *Genetics Selection Evolution*. 39 (4), 405-419.

Fantová, M. Chov koz. 2012. Vyd. 3., Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda. 232 s. ISBN 978-80-209-0393-8.

Fantová, M. Chov koz. 2010. Vyd. 2., Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda. 216 s. ISBN 978-80-209-0377-8.

Fonseca, J. F., Torres, C. A. A., Maffili, V. V., Borges, A. M., Santos, A. D. F., Rodrigues, M. T., Oliveira, R. F. M. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*, 2 (2), 139-144.

Gamčík, P., Kozumplík, J. 1992. Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat, *Príroda*. Bratislava, 298 s. ISBN 80 – 07 – 00540 – 4.

Gil, J., Fierro, S., Bentancur, O., Olivera-Muzante, J. 2011. Chilled Storage of Ram Semen Improves with the Addition of Egg Yolk and Glycerol to Milk-Based Extenders. *Reproduction in domestic animals*, 46 (3), 503-507.

Halbert, G. W., Dobson, H. J. S. W., Walton, J. S., Buckrell, B. C. 1990. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33 (5), 993-1010.

Horák, F., Axmann, R., Červený, Č., Doležal, P., Doskočil, J., Hošek, M., Hrbek, I., Humpál, J., Jůzl, M., Klimeš, J., Kuchtík, J., Literák, I., Mareš, V., Milerski, M., Novák, J., Pindák, A., Šlosárková, S., Šustová, K., Švéda, J., Tuza, J., Vagenknechtová, M., Veselý, P., Zeman, L. 2012. *Chováme ovce*. Brázda. 384 s. ISBN 978-80-209-0390-7.

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

Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*. 53 (6), 1285-1293.

Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Brikas, P. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*. 48 (6), 1049-1059.

Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*. 44 (2), 153-158.

Knight, T. W. 1977. Methods for the indirect estimation of testes weight and sperm numbers in Merino and Romney rams. *New Zealand journal of agricultural research*, 20 (3), 291-296.

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., Dzieciol, M. 2007. Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted semen analysis system. *Acta Veterinaria Brno*. 76 (4), 601-604.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62 (1), 113 – 141

Lymberopoulos, A. G., Tsakmakidis, I. A., Khalifa, T. A. A. 2010. Effect of Ram Age on Structural and Functional Competence of Frozen–Thawed Spermatozoa in Dairy Sheep. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (4), 572-578.

Louda, F., Čerovský, J., Ježková, A., Stádník, L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat: se základy biotechnických metod. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita. 225 s. ISBN 80 – 213 – 0702 – 1.

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

Mandiki, S., Derycke, G., Bister, J., Paquay, R. 1998. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Ruminant Research*. 28 (1), 67-79.

Maxwell, W. M. C., Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility and Development*. 5 (6), 613–638.

Malejane, C. M., Greyling, J. P. C., Raito, M. B. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *Agriculture, Dairy & Animal Science*. 44 (1), 26-32.

Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2007 *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, Praha. 304 s. ISBN 978-80-213-1658-4.

Martinez-Rojero, R. D., Hernandez-Ignacio, J., Hernandez-Hernandez, H., Michel-Aceves, A. C., Valencia-Mendez, J. 2006. Intrauterine artificial insemination in Creole goats with cooled semen. *Agrociencia*. ISSN 1405-3195

Mátlová, V., Loučka, R. 2002. *Pastevní chov ovcí a koz*. Agrospoj. Praha. Semafor. 151 s. ISBN 8023942174.

Mellado, M., Pastor, F., Lopez, R., Rios, F. 2006. Relation between semen quality and rangeland diets of mixed-breed male goats. *Journal of arid environments*. 66 (4), 727-737.

Memon, M. A., Bretzlaff, K. N., Ott, R. S. 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*. 26 (6), 823-827.

Mukasa-Mugerwa, E., Ezaz, Z. 1992. Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenology*, 38 (5), 979-988.

Nordstoga, A. B., Söderquist, L., Ådnøy, T., Farstad, W., Paulenz, H. 2010. Vaginal deposition of frozen-thawed semen in Norwegian dairy goats: comparison of single and double insemination with equal total number of spermatozoa. *Theriogenology*, 74 (5), 895-900.

Nuti, L. C., n. d. Goat semen collection and processing. [online]. [cit. 2017-03-19]. Dostupné z <http://goatdocs.ansci.cornell.edu/Resources/GoatArticles/GoatGeneticsRepro/GoatSemenNuti.pdf>

Oliveira, R. F. M. 2009. Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos [online] Milkpoint. [cit. 2017-04-08]. Dostupné z <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos-52391n.aspx>

Pind'ák, A., Horák, F., Mareš, V., 2003. Atlas plemen ovcí a koz chovaných v ČR. Brno. Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR. 73 s. ISBN 80-239-1932-6.

Ramu, S., Jeyendran, R. S. 2012. The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. *Humana Press*. 21-25.

Rege, J. E. O., Toe, F., Mukasa-Mugerwa, E., Tembely, S., Anindo, D., Baker, R. L., Lahlou-Kassi, A. 2000. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep: II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. *Small Ruminant Research*, 37 (3), 173-187.

- Ritar, A. J., Ball, P. D., O'May, P. J. 1990a. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reproduction, Fertility and Development*. 2 (4), 377-384.
- Ritar, A. J., Ball, P. D., O'May, P. J. 1990b. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*. 2 (1), 27-34.
- Ritar, A. J. 1993. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia - a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. ISSN 0816-1089.
- Ritar, A. J., Mendoza, G., Salamon, S., White, I. G. 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *Journal of reproduction and fertility*. 95 (1), 97-102.
- Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., Cox J. F. 2008. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (4), 393-399.
- Rowe, J. D. 2010. Buck Health Management. *Proceedings of the Forty-Third Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners*
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1), 77-111.
- Salamon, S., Maxwell W. M. C., 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37 (3-4), 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995b. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 38 (1-2), 1-36.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C., Firth, J. H. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science*. 2 (4), 373–385.

Salamon, S., Visser, D. 1972. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal of Biological Sciences*., 25 (3), 605-618.

Salamon, S. 1968. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Australian Journal of Biological Sciences*., 21 (2), 351-360.

Salhab, S. A., Zarkawi, M., Wardeh, M. F., Al-Masri, M. R., Kassem, R. 2003. Characterization and Evaluation of Semen in Growing Awassi Ram Lambs. *Tropical Animal Health and Production*. 35 (5), 455-463.

Suchý, P., Straková, E., Herzig, I., Skřivanová, E., Zapletal, D., 2011. Výživa a dietetika II. díl – Výživa přežvýkavců. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 127 s. ISBN 978-80-7305-599-8.

Tarrandellas, J. n. d. More than just basic semen analysis [online]. Microptic- automatic diagnostic systém. [cit. 2017-03-17]. Dostupné z <http://www.micropticsl.com/wp-content/uploads/2014/03/sca_evolution_veterinary.pdf>

Tsakmakidis, I. A. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*. 92 (1), 126-130.

Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T. M., Gandini, G., Pizzi, F. 2015. Relationship between body weight, sexual secondary traits and epididymal semen quality in the Alpine goat. *Small Ruminant Research*. 135, 81-84.

Valdová, V., 2002. Výživa ovcí [online] *Náš chov*. [cit. 2017-03-19]. Dostupné z <<http://naschov.cz/vyziva-ovci/>>

Yotov, S., Fasulkov, I., Vassilev, N. 2009. Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science. 35 (2), 117-122.

6. Seznam grafů

Graf 1: Stavy ovcí v letech 2009 – 2016, k 1. dubnu daného roku	3
Graf 2: Stavy koz v letech 2009 – 2016, k 1. dubnu daného roku	4
Graf 3: Vliv ročního období na objem spermatu a koncentraci spermií u kozlů	20
Graf 4: Vliv frekvence odběrů na objem spermatu a koncentraci spermií u kozlů	22

7. Seznam příloh

Obrázek 1: umělá pochva, vnitřní vložky, skleněný sběrač.....	36
Obrázek 2: hodnocení pohybu spermií pomocí CASA.....	36
Obrázek 3: umístění spermií v pohlavním traktu: a)intravaginální	
b,c)intracervikální d)intrauterinní transcervikální e)intrauterinní laparoskopická ..	37

8. Přílohy

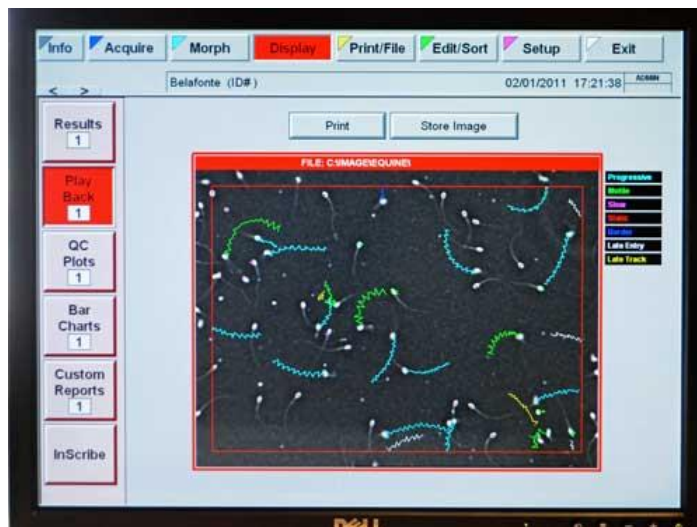
Obrázek 1: umělá pochva, vnitřní vložky, skleněný sběrač



Zdroj:

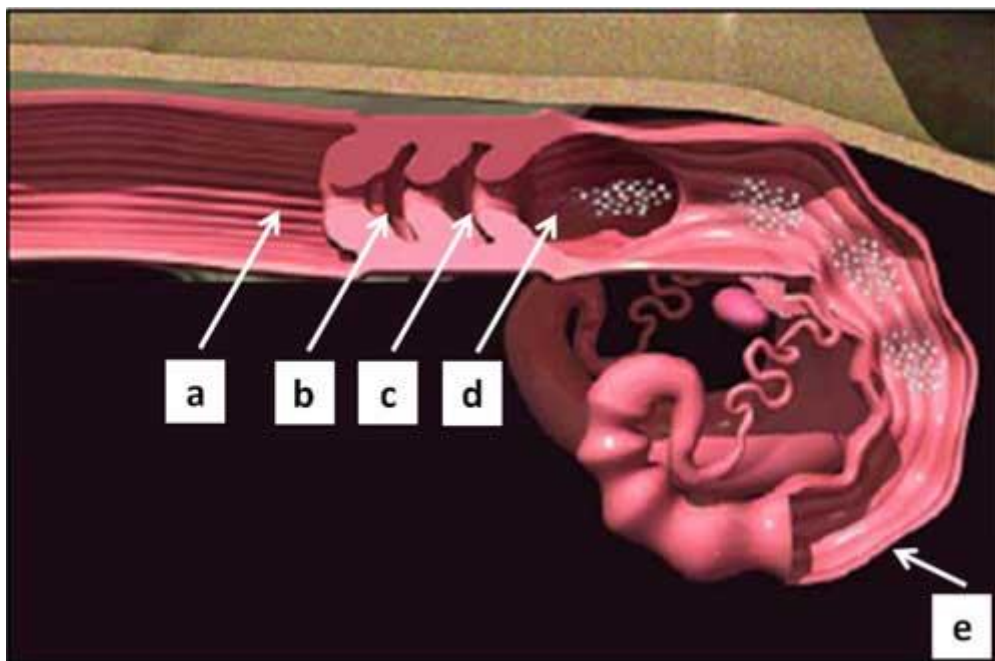
[http://www.kruuse.com/en/ecom/Konsult Diagnostik/Reproduktion/Inseminering/prod_340650.aspx](http://www.kruuse.com/en/ecom/Konsult_Diagnostik/Reproduktion/Inseminering/prod_340650.aspx)

Obrázek 2: hodnocení pohybu spermií pomocí CASA



Zdroj: <http://www.indoreinfertilityclinic.com/wp-content/uploads/2013/07/09-03SwineConf3.jpg?x44519>

Obrázek 3: umístění spermii v pohlavním traktu: a)intravaginální b,c)intracervikální d)intrauterinní transcervikální e)intrauterinní laparoskopická



Zdroj: <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos-52391n.aspx>