

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz**

**Bakalářská práce**

**Kristýna Machová**

**Živočišná produkce**

**Ing. Martin Ptáček, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz" jsem vypracovala 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 autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.4.2018

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martinovi Ptáčkovi, Ph.D. za trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce a dále pak mé rodině a přátelům za podporu během studia.

# Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz

## Souhrn

Cílem bakalářské práce je poskytnout soupis aktuálních poznatků zaměřených na problematiku umělé inseminace v chovech ovcí a koz. Umělá inseminace je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších biotechnologických metod řízené reprodukce s celou řadou výhod. Metodu inseminace a následnou míru zabřeznutí však ovlivňuje mnoho faktorů. Řadí se mezi ně plemeno, pohlavní sezónost, kondice, lidský faktor, způsob vyvolání a synchronizace říje a doba inseminace. Hlavními limitujícími faktory jsou ale především oplozovací schopnost spermií beranů a kozlů v závislosti na způsobu jeho uchovávání a anatomie děložního krčku ovcí a koz. Beraní a především kozlí semeno vykazuje nižší oplozovací schopnost v závislosti na prodlužujícím se čase skladování a zejména po kryokonzervaci. Stavba děložního krčku ovcí a koz zároveň způsobuje složitou překážku k překonání pro rozmražené spermie i inseminační pipetu. Proto se metoda samotné inseminace odvíjí od způsobu a doby skladování inseminační dávky. Pro dosažení přijatelných výsledků zabřezávání při vaginální inseminaci je potřeba inseminovat čerstvým semenem. Inseminace mraženým spermatem se naopak v naprosté většině případů provádí laparoskopicky do děložních rohů. Lze tak dosáhnout 40 – 80 % zabřeznutí. Jako příklad dobré praxe však mohou posloužit chovatelé v Norsku, kde se inseminace provádí vaginálně mraženým spermatem a míra zabřeznutí je obdobná jako u laparoskopie.

Pro své přínosy je umělá inseminace žádoucí. Přesto je ale její použití v praxi, a to i v chovatelsky vyspělejších zemích s vyššími počty zvířat relativně omezena a zaměřena na šlechtitelské programy. Snahy nalézt řešení, jež by vedla ke zjednodušení a tak i rozšíření umělé inseminace za organizačně i ekonomicky výhodných podmínek, jsou předmětem výzkumů. Ty se soustředí zejména na způsoby jak poskytnout vyšší ochranu spermiím během kryokonzervace, optimalizaci synchronizace říje hormonálními i nehormonálními metodami, i metod inseminace samotné.

**Klíčová slova:** ovce, kozy, metody umělé inseminace, ejakulát, synchronizace říje

# Current knowledge about sheep and goat artificial insemination

## Summary

The aim of this thesis is a review of present knowledge related to artificial insemination in sheep and goats. Artificial insemination is one of the oldest and most used biotechnological methods of assisted reproduction and has many advantages. However, the insemination method and subsequent fertility rates are affected by many factors. Among them are breed, seasonal fertility, body condition, human factor, way of inducing and synchronizing estrus and time of insemination. The main limiting factors though are the fertilizing ability of ram and buck semen in correlation with the method of its preservation, and the anatomy of the cervix of the ewe and doe. Ram and primarily buck semen demonstrate lower fertilizing ability with the prolongation of time of its preservation and mainly after cryopreservation. At the same time, the anatomy of the ewe and doe cervix presents a serious barrier for passing of the frozen – thawed sperm as well as the insemination pipette. The method of insemination thus depends on the way and time the insemination dose has been preserved. If acceptable fertility rates are to be reached when using vaginal insemination, it should be performed with fresh semen. Insemination with frozen – thawed semen is in majority of cases performed through laparoscopic deposition of semen into uterine horns. Fertility results can reach 40 – 80 %. An example of good practice can be breeders in Norway though, where insemination is done vaginally with frozen – thawed semen and fertility results are similar as with laparoscopy.

Artificial insemination is for its many advantages desirable. Despite that, its use in farm practice is relatively limited. This can be said even of countries that have high sheep and goat populations and have developed breeding programs. Efforts to find solutions, which would lead to simplifying and expanding artificial insemination under management and economically efficient conditions are the subject of extensive research. Research efforts are primarily focused on being able to provide higher cryopreservation for sperm during freezing, optimizing estrus synchronization through hormonal and non-hormonal means, as well as improving methods of insemination itself.

**Keywords:** sheep, goat, artificial insemination methods, ejaculate, estrus synchronization

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Historie a význam umělé inseminace v chovu ovcí a koz .....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Historie umělé inseminace.....	3
3.1.2 Význam umělé inseminace .....	4
3.1.3 Umělá inseminace v praxi.....	5
<b>3.2 Biologické základy reprodukce.....</b>	<b>6</b>
3.2.1 Berani a kozlí .....	6
3.2.2 Ovce a kozy .....	7
<b>3.3 Faktory ovlivňující umělou inseminaci .....</b>	<b>9</b>
3.3.1 Anatomie děložního krčku.....	9
3.3.2 Plemeno .....	9
3.3.3 Kondice.....	10
3.3.4 Lidský faktor.....	10
<b>3.4 Samčí ejakulát, jeho odběr, kvalita a konzervace.....</b>	<b>10</b>
3.4.1 Metoda odběru semene .....	10
3.4.2 Vlastnosti a hodnocení semene.....	11
3.4.3 Konzervace a ředění semene.....	12
3.4.3.1 Čerstvé semeno.....	13
3.4.3.2 Krátkodobá konzervace v tekutém stavu.....	13
3.4.3.3 Chlazení.....	14
3.4.3.4 Dlouhodobá konzervace semene .....	15
3.4.3.5 Rozmrazování.....	18
<b>3.5 Kontrola reprodukčního cyklu a synchronizace říje .....</b>	<b>18</b>

3.5.1	Beraní efekt a melatonin .....	19
3.5.2	Hormonální synchronizace říje .....	21
3.5.2.1	Progesteron a syntetické gestageny .....	21
3.5.2.2	Prostaglandiny .....	22
<b>3.6</b>	<b>Metody inseminace .....</b>	<b>23</b>
3.6.1	Intravaginální .....	23
3.6.2	Intracervikální .....	25
3.6.3	Intrauterinní .....	26
3.6.3.1	Laparoskopická .....	26
3.6.3.2	Transcervikální .....	28
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>31</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>32</b>

# 1 Úvod

Umělá inseminace je mocným nástrojem při chovu hospodářských zvířat. Jako standartně používaná biotechnologická metoda se běžně uplatňuje v chovatelské praxi u všech druhů a slouží nejen k zefektivnění produkce, ale i pro zachování genových rezerv.

I přes své nesporné výhody, a to zejména plemenářsko – šlechtitelské, ekonomické a veterinárně – hygienické, je umělá inseminace v chovech ovcí a koz v porovnání s chovy skotu a prasat využívána poměrně málo. Mezi důvody proč tomu tak je, se řadí zejména nízká úspěšnost zabřeznutí způsobená několika zvláštnostmi pojícími se k reprodukci ovcí a koz.

Jedná se především o sníženou úspěšnost kryokonzervace beraního a kozlího semene a morfologii reprodukčního traktu samic. Další specifické zvláštnosti zahrnují výrazné meziplenné rozdíly v plodnosti, sezónní pohlavní aktivita, nevýrazné projevy říje a s tím související její synchronizace jak během plodného, tak i neplodného období.

Výše uvedené dohromady tvoří komplex faktorů, který negativně ovlivňuje praktické využití umělé inseminace ve větším měřítku v chovech, a to i v zemích s vysokými početními stavy ovcí a koz a s dlouhou chovatelskou a šlechtitelskou tradicí.

Právě pro své výhody a přínosy je však použití umělé inseminace žádoucí. Zefektivnění a optimalizace nejen metod kryokonzervace semene, synchronizace říje, inseminace samotné, ale i zootechnických opatření a organizace, které by vedly k přijatelným výsledkům v míře zabřeznutí, jsou předmětem výzkumů a snah nalézt taková řešení, jež by vedla k rozšíření využití umělé inseminace v praxi za organizačně i ekonomicky výhodných podmínek pro chovatele.



## **2 Cíl práce**

Inseminace u malých přežvýkavců se využívá jen velmi omezeně. Proto všechny informace, které povedou k charakteristice současného stavu a aktuálním trendům, mohou přispět k potenciálnímu rozvoji tohoto odvětví. Cílem bakalářské práce je tedy soupis aktuálních poznatků tématicky zaměřených na současný stav inseminace v chovu malých přežvýkavců.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Historie a význam umělé inseminace v chovu ovcí a koz

#### 3.1.1 Historie umělé inseminace

Umělá inseminace hraje důležitou roli v chovech hospodářských zvířat po celém světě. Jedná se o nejstarší biotechnologickou metodu, jejíž počátky sahají až do středověku, kdy, jak uvádí Gordon (2004), se v arabských spisech ze 13. století objevuje první zmínka o umělé inseminaci v souvislosti s koněm.

Odborná znalost vázaná k umělé inseminaci začíná u nizozemského vědce van Leeuwenheuka a jeho asistenta Hamma, kteří jako první lidé v roce 1678 viděli jednotlivé živé spermie, které nazvali „zvířátky“ (Foote, 2002).

Jednu z prvních dokumentovaných a především úspěšných umělých inseminací dokládá bezmála o sto let později italský mnich Lazzaro Spallanzani, když v roce 1784 uměle osemenil fenu, která po 62 dnech porodila tři štěňata (Foote, 2002). Spallanzaniho práce se psím a především žabím semenem vedla k prohloubení poznatků o umělém osemeňování, včetně poznatků o mražení spermatu, když se mu v roce 1803 povedlo ve sněhu zmrazit hřebčí sperma, které po následném rozmrazení obsahovalo pohyblivé spermie (Gordon, 2004).

Další pokrok přišel na samém konci 19. století, kdy Heape a další vědci dokládali jednotlivé pokusy umělé inseminace různých druhů zvířat, včetně králíků, psů a koní. Avšak zásadní posun přišel až s prací ruského vědce Ilji Ivanoviče Ivanova, který se zasadil o praktické využití umělé inseminace u hospodářských zvířat. V prvních dvou dekádách 20. století studoval umělou inseminaci nejen hospodářských zvířat, ale i psů, lišek, králíků a drůbeže. Kromě řezení ejakulátu se Ivanov věnoval zaškolování techniků nejen k provádění inseminace, ale také k výběru excelentních samců za účelem násobení jejich potomků skrze umělou inseminaci. Své poznatky publikoval v monografii „Umělé oplodňování hospodářských zvířat“ v roce 1912. Podle Šmerhy a kol. (1987) bylo v období mezi 1907 – 1912 uměle inseminováno 7000 klisen a v rámci pokusů 10 krav a 35 ovcí.

Ivanovovým následníkem se později stal V. K. Milovanov, který po vzoru Itala Amantey, jenž v roce 1914 poprvé použil umělou vagínu pro odběr psího semene, ve 20. a 30. letech minulého století vyrobil a začal používat stejnou, přiměřeně upravenou pomůcku pro odběr semene býků, hřebců a beranů (Foote, 2002).

Rusko se tak stalo první zemí, kde se umělá inseminace ovcí prováděla ve velkém. Jak uvádí Gordon (2004), počet uměle inseminovaných ovcí po roce 1920 v Sovětském svazu postupně narůstal až ke 42 – 44 miliónům ročně, tj. 72 – 76 % všech zvířat. Metoda inseminace byla jednoduchá – inseminovalo se čerstvým, občasně mírně zředěným spermatem – a v praxi se neměnila. Přestože praktické rozšíření ve faremních podmínkách je právem přisuzováno Sovětskému svazu, nové poznatky, zejména pak metody zpracování a uchování spermatu, probíhaly jinde ve světě a týkaly se především umělé inseminace skotu a prasat.

Kromě Salisburyho použití žloutko-citrátového ředidla v roce 1941 učinil zásadní objev v roce 1949 Polge, kdy se mu povedlo zmrazit sperma za pomoci glycerolu (Gordon, 2004; Foote, 2002). Po 2. světové válce tak dochází k masovému rozšíření umělé inseminace a následně i dalších reprodukčních biotechnologií, opět především v chovech skotu a prasat. Současně s rozšířením použití zároveň probíhá intenzivní výzkum nejen konzervace spermíí, ale i činnosti vaječnicků, vyvolání říje a její synchronizace a později ovlivňování ovulační aktivity.

Poznatky v problematice umělé inseminace v rámci chovů ovcí a koz komplexně shrnují Evans a Maxwell (1987). Následně vydávají Chemineau a kol. (1991) manuál k inseminaci ovcí a koz (Faigl et al., 2012).

V České republice shrnují poznatky z posledních let o umělé inseminaci ovcí a koz František Louda a František Bezdíček (Louda a kol., 2001; Louda a Bezdíček, 2017) a v roce 2013 vychází metodika Využití inseminace ovcí v chovatelské praxi (Čunát, 2013).

### **3.1.2 Význam umělé inseminace**

Umělá inseminace je nejstarší a zároveň nejrozšířenější biotechnologickou metodou v rozmnožování zvířat (FAO Assesments, 2015).

Její význam lze nahlížet z pohledu plemenářsko-šlechtitelského, ekonomicko-výrobního a veterinárně-hygienického (Šmerha a kol., 1980).

Z pohledu plemenářsko-šlechtitelského se jedná především o možnost rychlého využití geneticky cenných samců (tj. s potenciálem přenosu vynikajících užitkových vlastností na potomstvo) a tím ke zlepšení celých populací s nízkou užitkovostí. Díky umělé inseminaci je tato možnost k dispozici i v menších stádech. Zároveň umožňuje ostřejší selekci na užitkové vlastnosti samců a tím zrychlení genetického pokroku v populaci. Dále je možné hodnotit samce v různých prostředích a následně tak určit jeho užitkovost v odlišných typech produkce. V neposlední řadě je možné použít umělou inseminaci při křížení příslušníků

stejného druhu, ale odlišného plemene, kteří se výrazně liší živou hmotností, např. malé plemenice primitivních plemen ovcí s mohutnějšími berany s masnou užitkovostí. (Shipley et al., 2007; Šmerda a kol., 1980)

Z pohledu ekonomicko-výrobního se jedná zejména o možnost získat mnohonásobně větší počet potomků od kvalitního plemeníka než za použití přirozené plemenitby s předpokladem genetického zisku u potomstva. Louda (2001) poukazuje na rozdíl mezi 22 jehňaty skrze přirozenou plemenitbu při zařazení berana do stáda a 500 jehňaty při použití umělé inseminace čerstvým semenem. Stupka a kol. (2013) uvádí, že semenem jednoho berana lze inseminovat 16 až 18 tisíc kusů ovcí.

Při použití umělé inseminace se snižují přímé náklady spojené s chovem plemeníka, jenž je v případě malých přežvýkavců využit pouze sezónně. V menších chovech se pak jedná o snížení přímých nákladů na transport zvířat k páření. V případě zmrazování semene se dále snižují přímé náklady na chov pouze prověřených plemeníků, čímž se snižuje celkový počet chovaných plemeníků (Gordon, 2004).

Dále je významným aspektem veterinárně-hygienický přínos, kdy lze uplatňovat uzavřený oběh stáda a minimalizovat tak přenos nejen nemocí ale i stres z transportu a přesunu do nového prostředí. Zároveň umožňuje používání semene plemeníků prověřených v kontrole dědičnosti zdraví a plodnosti, jež musí být součástí komplexního hodnocení. Umožňuje také kontrolu semene, které v případě kontaminace lze ošetřit antibiotiky (Shipley, et al., 2007).

V neposlední řadě však nelze opomenout vědecký přínos umělé inseminace, jak zmiňují Louda a kol. (2001), kdy inseminace přispěla k rozvoji dalších biotechnologických metod reprodukce, především pak superovulace a embryotransferu (ET).

### **3.1.3 Umělá inseminace v praxi**

Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je světová populace ovcí zhruba 1,17 miliard a koz 1 miliarda. Z toho většina populace zvířat žije v rozvojových zemích (FAOSTAT Live, 2016).

I přes to, že je umělá inseminace nejrozšířenější biotechnologickou metodou, její použití je soustředěno do vyspělejších zemí. Navíc v porovnání s chovy skotu s tržní produkcí mléka nebo prasat je umělá inseminace v chovech malých přežvýkavců poměrně omezená (FAO Assesments, 2015).

Početní stav ovcí a koz v Evropské Unii činil v roce 2016 zhruba 111 milionů kusů, z čehož zhruba 88 % byly ovce. Stavby ovcí mezi lety 2000 – 2016 se snížily o 16 %; v poslední době jsou však stabilnější s mírným nárůstem (Anonym 1, 2016).

I přes dostupnost umělé inseminace jak z pohledu infrastruktury, tak ekonomických možností je však umělá inseminace ovcí a koz poměrně málo využívána. V Norsku a Švédsku je použití laparoskopické inseminace legislativně zakázáno (Faigl et al., 2012). V souvislosti s umělou inseminací, resp. synchronizací říje je i fakt, že Evropská unie legislativně (zejména směrnicemi 96/22/EC, 2003/74/EC a 2008/97/EC) omezuje použití množství hormonálních látek v chovech zvířat určených pro produkty pro lidskou spotřebu (Simões, 2015).

Ve Francii byla v roce 2017 z celkového počtu 1,5 milionů bahnic uměle inseminována 1/3; u koz z celkového počtu 839 tisíc bylo inseminováno 73,5 tisíc (Anonym 2, 2018).

Ve Španělsku je umělá inseminace spojována s šlechtitelským programem ovcí, a ani tam není metoda rozšířena v chovech tak jako např. u skotu a prasat. Například v chovech koz s mléčnou produkcí je inseminováno méně než 1 % koz (Lopez-Sebastian et al., 2014).

V Norsku, kde počet chovaných bahnic dosahuje zhruba 700,000 je do šlechtitelského programu zařazeno 90000 bahnic. Z nich je ročně vaginálně inseminováno mraženým spermatem 15 % bahnic s procentem nepřeběhlých (non return rate NRR) 70 % (Blichfeldt et Lewis, 2015).

V České republice činí počet ovcí v roce 2017 celkem 217 tisíc kusů a počet koz 47 tisíc (Bucek a kol., 2017). Biotechnologie jsou v chovech v současnosti využívány málo a to z důvodu nízkých početních stavů (Kulovaná, 2002). Čunát a kol. (2013) uvádějí, že zde chybí realizační tým, který by mohl případné požadavky chovatelů v provozních podmínkách uspokojivě zvládnout. Ojedinele se však najdou chovatelé, kteří umělou inseminaci využívají (Fantová a Nohejlová, 2015; Anonym 3, 2017).

## **3.2 Biologické základy reprodukce**

### **3.2.1 Beraní a kozlí**

Pohlavní zralost u beránků nastupuje ve věku 3 – 6 měsíců a je definována projevením dostatečného zájmu o sexuální aktivitu zároveň s tvorbou dostatečného množství semene k oplodnění (Edmondson et al., 2012). Pohlavní dospělost pak nastupuje při dosažení 40 – 60 % z konečné živé hmotnosti zvířete. Chovné dospělosti dosahuje beran při dosažení 70 % z konečné živé hmotnosti (Horák a kol., 2012).

Jak uvádějí Edmondson et al. (2012), přesný věk dosažení puberty se u beranů odvíjí jednak od plemenné příslušnosti, ale také od doby narození, kdy beránci narozeni dříve na jaře dosahují puberty v pozdějším věku než beránci narozeni o pár měsíců později.

Do plemenitby by se měl beran zařazovat po dosažení tělesné zralosti, tj. u raných plemen ve věku 10 až 12 měsíců, u ostatních v 16 až 18 měsících (Horák a kol., 2012).

Pohlavní zralost kozlů se liší dle plemene – zakrslá plemena jí dosahují ve věku 2 – 3 měsíců, větší ve věku 4 – 5 měsíců. Spermie jsou v ejakulátu obsaženy většinou od věku 4 – 5 měsíců, ovšem kvalita spermií je nízká. Do plemenitby se kozel zařazuje v věku 1 roku, lépe však od 1,5 roku (Fantová a kol., 2015).

Ovce i kozy řadíme mezi zvířata s různě výraznou pohlavní sezónností.

Přestože jsou berani plodní po celý rok, kvalita spermií, jejich denní produkce a sexuální aktivita jsou v našich zeměpisných šířkách ovlivněny zkracujícími se dny, resp. zvýšenou produkcí hormonu melatoninu během krátkých dnů, projevující se nárůstem velikosti varlat o přibližně 1 – 2 cm (Edmondson et al., 2012). V praxi lze sníženou reprodukční schopnost beranů mimo sezónu řešit různými úpravami světelného režimu a následným podáváním exogenního melatoninu (Arranz et al., 1995; Chemineau et al., 1996). Chesnau et al. (2017) předkládají nehormonální variantu, kdy při úpravě světelného režimu na dlouhé dny během zimy a následného období kontinuálního svícení dokazují berani plemene Ille-de-France stejný nárůst velikosti varlat jako během standardní říjové sezóny.

Kozlové mimo říjovou sezónu často vykazují snížené *libido sexualis*, sníženou produkci feromonů, zmenšený objem varlat, nižší životaschopnost spermií po zmrazení a vyšší poměr abnormálních spermií, způsobené nižší hladinou luteinizačního hormonu a testosteronu (Edmondson et al., 2012).

### 3.2.2 Ovce a kozy

Pohlavní zralost u jehnic nastupuje později než u beránků, většinou ve 4 až 7 měsících a pohlavní dospělosti pak při dosažení 40 – 60 % živé hmotnosti dospělých ovcí (Bařina, 2002). Za chovnou dospělost se považuje dosažení 70 % z jejich konečné živé hmotnosti. Ovce dosahuje tělesné dospělosti ve věku dvou až tří let (Horák a kol., 2012).

Kozičky pohlavně dospívají mírně později – ve věku 6 až 8 měsíců; zakrslá plemena dříve - již třeba ve 3 měsících. Kozičky dosahují chovné dospělosti a zařazují se do plemenitby, když dosáhnou 70 % konečné živé hmotnosti (Edmondson et al., 2012). Fantová a kol. (2015) uvádějí jako kritérium pro zařazení do chovu dosažení alespoň 75% hmotnosti dospělého zvířete, tj. asi 35 kg.

Reprodukční proces ovcí i koz je řízen neurohumorálně dle fotoperiody. Během zkracování světelného dne dochází v šišince ke zvýšené produkci melatoninu. Melatonin obecně tlumí produkci hypofýzárních gonadotropinů, nicméně u ovcí a koz působí obráceně a pod jeho vlivem dochází ke stimulaci sekrece gonadotropin releasing hormonu (GnRH) a následně tedy i folikulostimulačního hormon (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Pod vlivem FSH se zvyšuje hladina estrogenů – jejich zvyšující se koncentrace navozuje říjové chování, ale také další procesy v organizmu nezbytné pro ovulaci a následné případné zabřeznutí. K ovulaci vajíček z folikulů pak dochází pod vlivem LH (Reece, 2011; Dardente et al., 2016).

Plodné období se tak v našich klimatických podmínkách projevuje vzhledem k délce dnu, výživovému stavu a plemenné příslušnosti od konce léta do konce roku, následované obdobím anestru. Intenzivní říje se tak dostavují 60 – 120 dnů po nejdelším dnu v roce, tj. 21. červnu. U některých plemen jako jsou ovce východofříská, romanovská nebo finská však probíhá pohlavní aktivita po celý rok (Stupka a kol., 2013).

Období pohlavního klidu, kdy samice nevykazují ochotu k páření, nazýváme anestrus. Kromě anestru sezónního, jenž nastupuje v období s prodlužující se délkou dne, rozlišujeme ještě anestrus laktační a poporodní, který se často projevuje tzv. tichou říjí bez ovulace a souvisí s involucí dělohy, která trvá asi 17 – 21 dnů (Fantová a kol., 2015; Horák a kol., 2012).

Pohlavní cyklus ovce i kozy je polyestrální. Říje trvá zhruba 15 až 45 hodin (průměr 30 hodin) a délka celého pohlavního cyklu se pohybuje mezi 14 a 19 dny (17 průměr) v závislosti na plemenu. 3 až 5 dnů trvá metestrus, 7 až 10 dnů diestrus a 2 dny proestrus. Folikulární fáze (proestrus a estrus) je charakterizována dominancí estrogenu. Během této fáze dochází k růstu folikulů, nástupu říje, sexuálního chování a prudkému zvýšení hladiny LH. K ovulaci dochází 14 až 26 hodin po LH vlně, což je zhruba 21 až 45 hodin po začátku estru. Během ovulace se mohou uvolnit 1 – 4 vajíčka. Luteální fáze (metestrus a diestrus) je charakterizována uvolňováním progesteronu ze žlutého tělíska (*corpus luteum*), jeho růstem a následnou regresí. Z pohledu chování se jedná o období sexuální neochoty (Louda a kol., 2001; Reece, 2011; Edmondson et al., 2012).

U ovcí probíhá tichá říje a příznaky jsou málo zřetelné. Dochází k mírnému zduření a zčervenání vulvy, nechutenství, postávání a vyhledávání berana. Občas lze sledovat mírné vytékání hlenu (Stupka a kol., 2013).

Stejně jako ovce je pohlavní cyklus kozy sezónně polyestrální s plodným obdobím od konce léta od srpna do prosince. U většiny populace následuje anestrus; u části se dostaví říje

i v jarním období. Říjový cyklus je 21 dní (s rozmezím 18 až 24 dní). Na začátku a ke konci plodného období se délka pohlavního cyklu může zkrátit na 5 – 7 dní. Délka říje se pohybuje v rozmezí 24 až 72 hodin; u většiny koz dochází k projevům říje 36 hodin před ovulací. Koza vykazuje nápadnější projevy říje než ovce; během této doby je neklidná, častěji a hlasitě mečí, přijímá menší množství potravy a více pije. Ze zarudlé pochvy vytéká hlen (Fantová a kol., 2015).

### **3.3 Faktory ovlivňující umělou inseminaci**

Efektivitu umělé inseminace u ovcí a koz ovlivňuje komplex faktorů, které působí navzájem a v konečném důsledku určují míru použití této biotechnologické metody.

#### **3.3.1 Anatomie děložního krčku**

Děložní krček ovce uzavírá dutinu děložní a do dutiny pochvy vyčnívá jako nevýrazný čípek. Uvnitř krčku tvoří sliznice podélné a příčné, kaudálně směřující řasy/prstence. Průměr každého ostia jednotlivých kruhových řas je zhruba 2,7 mm. Prstence nejsou seřazeny za sebou a průchod inseminační pipety je výrazně omezen.

Stavba krčku děložního se liší nejen v rámci jednotlivců, ale také v závislosti na plemeni. Délka cervixu se tak může pohybovat od 5 do 10 cm, počet kruhových řas od 3 do 7, průměr ostia od 1 do 3 mm a vzdálenost mezi řasami od 3 do 5 cm (Candappa et al., 2011; Horák a kol., 2012).

Děložní krček kozy je 5 – 6 cm dlouhý (v závislosti na plemeni). Příčně podélné řasy nejsou tak výrazné jako u ovce, ale i u kozy negativně ovlivňují průchod inseminační pipety (Edmondson et al., 2012).

Stavba děložního krčku ovce, resp. vysoká obtížnost jej překonat inseminační pipetou, zásadním způsobem ovlivňuje metodu deponace inseminační dávky a je tedy považována za hlavní limitující faktor umělé inseminace ovcí (Casali et al., 2017).

#### **3.3.2 Plemeno**

Plemeno hraje výraznou roli v plodnosti, tedy i v úspěšnosti umělé inseminace (Anel et al., 2005; Fair et al., 2005; David et al., 2015). Kromě plodnosti ovlivňuje plemeno mimo jiné i stanovení optimální doby inseminace po ukončení hormonální synchronizace říje, což se následně projevuje v celkové míře zabřezávání (Čunát a kol., 2013).



### **3.3.3 Kondice**

Výživový stav zvířete ovlivňuje plodnost – lepších fertilizačních výsledků je možné dosáhnout u zvířat v dobré kondici (Fukui et al., 2010; Slavova et al., 2015). Toho lze docílit krmným šokem, flushingem, tj. zvýšenou dávkou energetických krmiv. Krmná dávka by ve stejné době měla být obohacena o minerály (Horák a kol., 2012).

### **3.3.4 Lidský faktor**

Nešetrné zacházení se zvířaty během odběru semene, synchronizace říje i samotné inseminace způsobuje stres, který v důsledku negativně ovlivňuje plodnost. McCappin et Murray (2011) uvádějí, že míra zabřeznutí po manipulaci s bahnicemi během čtyř až šesti týdnů před inseminací byla 54 % oproti skupině, ve které manipulace neprobíhala a která vykazovala míru zabřeznutí 74 %. Navíc bylo prokázáno, že průchodnost spermií děložním krčkem se může u stresovaných ovcí zpomalit nebo zcela zastavit (Robinson, 1973).

Úspěšnost umělé inseminace je dále ovlivněno zkušeností a odborností inseminačního technika. Anel et al. (2005) uvádějí, že výsledky jak laparoskopické tak vaginální inseminace jsou ovlivněny inseminačním technikem (51,4 % a 43,16 % resp.).

## **3.4 Samčí ejakulát, jeho odběr, kvalita a konzervace**

### **3.4.1 Metoda odběru semene**

Semeno beranů a kozlů se odebírá dvěmi základními postupy – umělou vagínou nebo elektroejakulací.

Pro odběr spermatu lze použít standartní umělou vagínu, případně o 20 cm zkrácenou verzi umělé vagíny pro odběr semene býka. Teplota uvnitř vagíny by se v momentě odběru měla pohybovat v rozmezí 40 – 45 °C. Odběr se provádí v připouštědle za pomoci atrapy. Pokud je atrapou říjná samice, množství a kvalita ejakulátu jsou vyšší (Louda a kol., 2001; Edmondson et al., 2012).

Elektroejakulace se provádí zavedením bipolární elektrody do rekta a následným dodáním elektrických impulzů 10 – 15 voltů po dobu 3 – 5 sekund v 5 – 15 sekundových intervalech. Celková délka stimulace trvá 2 – 4 minuty (Shiple et al., 2007).

Přestože je elektroejakulace poměrně jednoduchá a rychlá procedura, její časté a plošné použití se nedoporučuje s ohledem na wellfare zvířat. V případech kdy je odběr samce umělou vagínou nemožný, např. pokud odmítá atrapu nebo má vady dolních končetin, je elektroejakulace přijatelnou alternativou (Jiménez-Rabadán et al., 2012).

Kromě vlivu metody odběru na samce jako takového však zůstává otázkou, jak vliv má použitá metoda na vlastnosti odebraného ejakulátu. Zároveň se jeví, že zde existují mezidruhové rozdíly.

Nuti (2007) upozorňuje, že elektroejakulace negativně ovlivňuje složení semenné plazmy kozla a snižuje životaschopnost spermií při jeho následném uchovávání.

Jiménez-Rabadán et al. (2012) uvádějí lepší kvalitu spermatu kozlů plemene Blanca-Celtibérica po kryokonzervaci ve prospěch odběru umělou vagínou.

V dalším výzkumu pak Jiménez-Rabadán et al. (2015) porovnávali vliv metody odběru na kryorezistenci u kozlů a beranů. Výsledky studie dokládají negativní vliv elektroejakulace na kvalitu spermatu kozlů po kryokonzervaci, zatímco beraní sperma nevykazovalo změny v souvislosti s metodou odběru. Autoři předkládají hypotézu, že elektroejakulace může vést ke změnám v kozlím ejakulátu, které činí sperma více náchylné ke změnám během kryokonzervace.

Tuto hypotézu nepřímo potvrzují Tapaloaga et Tapaloaga (2016), kteří poměřovali morfometrické vlastnosti beraních spermií v závislosti na metodě odběru. Výsledky jejich výzkumu dokládají, že metoda odběru neovlivňuje morfometrické vlastnosti beraních spermií.

### **3.4.2 Vlastnosti a hodnocení semene**

Objem beraního ejakulátu se pohybuje od 0,5 – 1,5 ml a jeho hustota se pohybuje od 3,5 – 6,5 miliard spermií v 1 ml. Barva je mléčně bílá; pach ejakulátu je nevýrazný a připomíná pach vlny (Shipley et al., 2007).

Objem kozlího ejakulátu se pohybuje od 0,4 – 3 ml, v průměru činí 1 ml. Hustota je značně variabilní a může se pohybovat v rozmezí 2 – 5 miliard spermií 1 ml. Průměr se pohybuje kolem 4 miliard v 1 ml. Barva je bílá nebo šedobílá. Konzistence je závislá na hustotě spermií a může být smetanová u hustých vzorků, případně vodnatá u řídkých (Louda a kol., 2001; Edmondson et al., 2012).

Odebraný ejakulát se podrobuje kvalitativnímu i kvantitativnímu hodnocení. Manipulace během něj by měla probíhat tak, aby se předešlo teplotním výkyvům, kontaktu s vodou, dezinfekčními prostředky, světlem a vzduchem.

Tradiční hodnocení zahrnuje makroskopické posouzení, během kterého se posuzuje barva, zrnitost, pach, obsah přímíšenin a objem pomocí pipety. Základní mikroskopická analýza zahrnuje určení koncentrace spermií, jejich motilitu a morfologické vlastnosti, včetně počtu patologických nebo nezralých spermatických buněk (Louda a kol., 2001).

Vzhledem k mnoha faktorům ovlivňujících úspěšnost inseminace u ovcí a koz, mezi něž se řadí i to jakým způsobem se semeno ředí a uchovává, existuje také maximální snaha stanovit kritéria, která by jasně určila fertilizační schopnosti spermií, jež by se daly použít v následném zhodnocení a použití při výběru semene do inseminační dávky.

Z těchto důvodů se provádí i další, složitější testy a vyhodnocení ejakulátu. Řadí se mezi ně například dehydrogenační zkouška, tepelný test přežitelnosti, akrozomální integrita, schopnost spermie pohybovat se v různém médiu (např. ve vaginálním hlenu), schopnosti fertilizace *in vitro*, počítačově-asistované zhodnocení motility spermií (CASA) (David et al., 2015).

Přestože tyto testy vykazují úspěšnost ve výsledcích *in vitro*, jejich úspěšnost *in vivo*, jak se domnívá David et al. (2015), není velká. To potvrzují i O'Meara et al. (2008), kteří hodnotili několik funkčních testů rozmraženého spermatu jakožto možných indikátorů *in vivo* fertility beranů, a jejich výsledky neprokázaly vztah mezi *in vitro* fertilitou beranů s fertilitou získanou *in vivo*. Nicméně, Vicente-Fiel et al. (2014) ve své studii potvrdili, že v praxi ověření plodní beraní vykazují jasné rozdíly v několika parametrech spermatu, včetně pohyblivosti a životaschopnosti od beranů neplodných.

Nordstoga et al. (2013) se ve svém výzkumu zaměřili na sledování poruch integrity chromatinu DNA spermií za použití metody Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) beranů. Výzkum prokázal negativní vztah mezi DFI (DNA Fragmentation Index) a NRR (non return rate) jakožto jedním z ukazatelů plodnosti.

Tyto testy jsou však většinou předmětem výzkumných studií a pro využití v praxi jsou nepraktické. Musí se navíc většinou kombinovat, což je náročné a drahé, čímž se zhoršuje ekonomika využití inseminace.

V tomto kontextu dokládají David et al. (2015) pozitivní vztah mezi vlnovým pohybem neředěného ejakulátu (mass sperm motility) beranů a jejich fertilitou, resp. oplozovací schopností. Nabízí tak přesvědčivý a jednoduchý indikátor plodnosti, který je zároveň levný a využitelný v praxi.

### **3.4.3 Konzervace a ředění semene**

Ředění semene jednak usnadňuje rozdělení ejakulátu do dávek, zároveň poskytuje vhodné prostředí pro spermie během manipulace a skladování. Semeno se ředí podle způsobu následného použití, resp. uchovávání, metody inseminace, doby inseminace během roku, resp. způsobu vyvolání říje. Semeno se k inseminaci používá čerstvé, chlazené nebo mražené (Shiple et al., 2007).

#### 3.4.3.1 Čerstvé semeno

Samice může být inseminována čerstvým neředěným semenem v dávce přibližně 0,1 ml normálního semene dobré kvality ihned po odběru a hodnocení kvality ejakulátu (Edmondson et al., 2012).

#### 3.4.3.2 Krátkodobá konzervace v tekutém stavu

Pro ředění beraního spermatu ke krátkodobé konzervaci je k dispozici velké množství ředidel. V minulosti se používalo nejvíce žloutko-citrátové ředidlo s přidavkem glukózy. (Salamon et Maxwell, 2000; Louda a kol., 2001). V dnešní době se ke krátkodobé konzervaci používají ředidla na bázi Tris – glukóza – žloutek nebo Tris – citrát – fruktóza – žloutek (Salamon et Maxwell, 2000; Shipley et al., 2007).

Jako komponentu ředidla lze použít mléko - to však musí být tepelně ošetřeno z důvodu odstranění lakteninu, který působí spermicidně. Mléko během tepelného ošetření nesmí vařit a nesmí přijít do kontaktu s vodou. Obecně se dává přednost použití odučněného nebo UHT mléka (Shipley et al., 2007).

Quan et al. (2016) zjistili lepší výsledky měření pohyblivosti, membránové integrity a akrozomálního statusu beraních spermií u ředidel na bázi Tris než u mléka při skladování semene ve 4 °C po dobu 7 dní.

Ředidla mohou být připravována přímo v laboratoři. Jejich příprava je ale náročnější a může se v ní uplatnit faktor lidské chyby, což může kompromitovat jejich kvalitu. Z toho důvodu jsou k dispozici předmíchaná komerční ředidla (Gordon, 2004). Ta jsou buď s komponenty živočišného původu (v ČR k dispozici Triladyl, Ovipro) nebo bez komponentů živočišného původu, jako např. Andromed, Biocipos, Biladyl nebo Optidyl (Čunát, 2013).

Čunát (2013) uvádí, že za použití výše uvedených ředidel lze připravit inseminační dávky na relativně dobré úrovni se zachováním 30 – 70 % progresivní aktivity spermatu. Zároveň podotýká, že ředidla Triladyl a Andromed vykazují dlouhodobě ustálené stabilizační výsledky.

Ředění se provádí okamžitě po odběru přímo ve sběrači. Teplota ředidla i semene musí být stejná. Stupeň ředění beraního spermatu pro krátkodobou konzervaci se stanovuje na základě objemu ejakulátu a koncentrace a aktivity spermií (Louda a kol., 2001). Nejčastěji se beraní sperma ke krátkodobé konzervaci ředí v poměru 1 : 3 až 4. Mohou se však použít i poměry nižší a to 1 : 1 až 2 (Kukovics et al., 2011). Poměr ředění je většinou relativně malý z důvodu minimalizace nadměrného zředění semenné plazmy, která obsahuje prospěšné

antioxidanty a proteiny. Tzv. „ředící efekt“ je totiž často označován jako důvod pro sníženou motilitu a fertilizační schopnost beraního spermatu (Mata-Campuzano et al., 2015).

Stejní autoři však v nedávném výzkumu zjistili, že beraní sperma je lépe konzervováno ve vyšším poměru ředění, než se doposud uvádělo. Ve srovnávacím experimentu sledovali progresivní pohyb spermií v různém stupni ředění a čase. Výzkum prokázal, že po 24 hodinách skladování v 15 °C byl progresivní pohyb spermií v koncentraci  $1,2$  a  $1,4 \times 10^9$  nižší než při koncentraci  $0,2 - 1,0 \times 10^9$  spermií/ml.

Kozlí semeno lze ředit obdobně jako beraní, ovšem s výjimkou použití žloutku a mléka. Je to z toho důvodu, že enzym produkovaný bulbouretrálními žlázami (Cowperovy), které v součinnosti s ampulemi chámovodu, měchýřkovitými žlázami a prostatou produkují semennou plazmu (Reece, 2011), katalyzuje hydrolýzu trioleinu a triglyceridů obsažených v mléčných a žloutkových ředidlech na volné mastné kyseliny, které zpomalují pohyb spermií a poškozují jejich membrány (Salmon et al., 2017). Z toho důvodu se doporučuje buď omezit použití žloutku v ředidle na 2 % (Edmondson et al., 2012) nebo promývání kozlího spermatu a separaci semenné plazmy ihned po odebrání (Salmon et al., 2017). Louda a kol. (2001) uvádějí, že při krátkodobém nebo okamžitým použití naředěného spermatu lze použít k ředění 3,5 % fyziologického roztoku NaCl a vyšším množstvím, tj. 3 – 5 %, žloutku.

Jak dokládají nedávné studie, dobrých výsledků lze dosáhnout u ředidel na bázi sojového lecitinu (Forouzanfar et al., 2010; Rehman et al., 2013; Salmani et al., 2014). Vhodnost tohoto ředidla se projevuje zejména u dlouhodobé konzervace (Masoudi et al., 2017). V rámci své studie však Masoudi et al. (2017) srovnávali i účinnost žloutkového a sojového ředidla při inseminaci čerstvým spermatem – výsledky však nepotvrdily výrazné rozdíly v zabřezávání bahnic mezi jednotlivými metodami inseminace a v závislosti na použitém typu ředidla.

Stupeň ředění se stejně jako u beraního spermatu odvíjí od koncentrace spermií s maximálním poměrem 1 : 15 (Louda a kol., 2001).

#### 3.4.3.3 Chlazení

Naředěné semeno lze okamžitě použít k inseminaci k čerstvé inseminaci viz. výše. Častěji však dochází ke krátkodobému uchování z důvodu transportu na farmu, případně do laboratoře ke zmrazení. Beraní i kozlí sperma je podstatně citlivější na chladový šok než například sperma býčí, obzvlášť při teplotě kolem 18 °C. Je tedy nutné při chlazení postupovat opatrně. Vlastnosti spermií a tedy i oplozovací schopnost se s prodlužujícím

časem konzervace zhoršují a to zhruba o 10 – 35 % na každý den konzervace v tekutém stavu (Maxwell et Watson, 1996; Salamon et Maxwell, 2000).

Na oplozovací schopnost působí, kromě použitého ředidla, i teplota. O'Hara et al. (2010) uvádí vyšší motilitu spermií v ředěném spermatu uchovávaném při teplotě 5 °C po dobu 72 hodin než při skladovací teplotě 15 °C. Wusiman et al. (2012) uvádějí horší oplozovací schopnost beraního spermatu uchovávaném při teplotě 4 °C po dobu 72 hodin při cervikální inseminaci bahnic oproti spermatu skladovaném po dobu 24 hodin při teplotě 23 °C v poměru 69.6 % vs. 76 %. K odlišným výsledkům dospěli Mata-Campuzano et al. (2014), kteří uvádějí lepší motilitu spermií po skladování semene v 15 °C po dobu 2 dnů. Výsledky nabízejí otázku, zda jsou způsobeny rozdílným složením použitého ředidla, případně zda je na kratší skladovací dobu lepší vyšší teplota.

#### 3.4.3.4 Dlouhodobá konzervace semene

Skladování semene v mraženém stavu skýtá výhodu nejen v uchování cenných genů pro budoucí použití, ale také transport semene na delší vzdálenosti než umožňuje krátká doba použití semene v tekutém stavu. V neposlední řadě umožňuje flexibilitu v načasování inseminace a to i mimo standartní říjovou sezónu. Její nevýhodou však u malých přežvýkavců zůstává potřeba vyššího celkového počtu spermií a ekonomická náročnost (Gordon, 2004).

Kryokonzervace semene zastavuje metabolickou aktivitu spermií, která po rozmražení může být obnovena. Nicméně, mrazící proces má na beraní a kozlí sperma negativní vliv, který se, i přestože kvalita rozmrazeného spermatu může být velmi dobrá, projevuje nízkou oplozovací schopností (Louda a kol., 2001). Navíc i přes celou řadu technik mrazení a ředidel, jež jsou k dispozici, semeno zhruba 5 – 10 % beranů nelze úspěšně zmrazit (Shipley et al., 2007).

Výzkumy dokládají, že během kryokonzervace jsou spermiové membrány vystaveny mechanickým, teplotním a chemickým stresům (Salmon et al., 2017). Během rozmrazování také dochází k předčasné kapacitaci spermií a zkracování životnosti buňky (Gillan et Maxwell, 1998; Salamon et Maxwell, 2000). Mražení a následné rozmražení ovlivňuje pohyblivost spermií – Moses et al. (1995) uvádějí, že veškeré kinetické parametry beraního spermatu jsou procesem kryoprezervace pozměněny. Tuncer et al. (2010) uvádějí zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) během mražení a rozmrazování kozlího spermatu. Nežádoucí tvorba ROS vede ke snižování životaschopnosti spermií, jejich pohyblivosti, oplozovací schopnosti (Bucak et al., 2010). Gillan et al. (2004) tvrdí, že proces kryokonzervace narušuje mitochondriální respiraci, která je jedním z procesů přispívajících

k úspěšnému proniknutí spermií děložním krčkem. Autoři tak naznačují, že mitochondriální poškození může přímo souviset s nízkou oplozovací schopností rozmraženého spermatu při inseminaci cervikální metodou.

V důsledku (nejen) výše uvedených důvodů existuje pro mražení a rozmrazování celá řada protokolů a jejich použití se odvíjí jednak od metody uchování inseminační dávky, tak od metody inseminace, která bude použita.

Koncentrace spermií v ejakulátu určeném ke kryokonzervaci by měla být nejméně  $3 \times 10^9$  v 1 ml s motilitou nejméně 70 %. Normální koncentrace se pohybuje od  $3,5 \times 10^9$  až  $6,0 \times 10^9$  na 1 ml u beranů a  $2,5 \times 10^9$  v 1 ml pro kozly (Edmondson et al., 2012).

Stupeň ředění se odvíjí od požadovaného standardizovaného počtu spermií v inseminační dávce. Tradiční poměr ředění se pohybuje v poměru od 1 : 2 do 1 : 5; dle novějších ředících protokolů se poměr pohybuje mezi 1 : 10 až 1 : 15 (Salamon et Maxwell, 2000).

Ředidla používaná k přípravě mražených inseminačních dávek by měla být připravena tak, aby poskytovala spermiím energii, isotonický osmotický tlak, pufovací systém a chránila je před chladovým šokem (Edmondson et al., 2012).

Nejčastějším typem ředidla beraního spermatu jsou ředidla na bázi citrátu, žloutku a monosacharidů glukózy nebo fruktózy nebo mléka.

V rámci výzkumu se objevují poměrně uspokojivé výsledky s ředidly na bázi trisacharidů jako např. rafinóza (Bucak et al., 2013) a lipidů jako je lecitin (Shahzad et al., 2016) nebo komplexních polysacharidů jako je například arabská guma (Ali et Zeitoun, 2017).

Z důvodu ochrany při mražení se přidává glycerol – jeho optimální koncentrace se pohybuje v rozmezí 4 – 6 % (Salamon et Maxwell, 2000) nebo 5 – 8 % (Louda a kol., 2001).

Glycerol lze do semene dodat jako separátní ředící frakci, kdy se semeno po odběru předředí na poloviční dávku konečného ředění a po postupném zchlazování na 4 - 5 °C s následnou ekvilibrací 1,5 – 2 hodin se přidá zbývající část ředidla s glycerínem. Dvoukrokové ředění se uplatňuje především u mléčných ředidel neboť vykazuje příznivější výsledky přežití spermií během kryokonzervace. Naproti tomu jednokrokové přidání glycerolu je výhodnější u ředidel na bázi žloutku, kdy se semeno naředí v požadovaném poměru i s požadovaným množstvím glycerínu při teplotě 30 °C s následným chlazením. Ekvilibrace trvá 1,5 – 2 hodiny při teplotě 5 °C (Louda a kol., 2001; Edmondson et al., 2012).

Velká část principů dlouhodobého uchovávání kozlího spermatu je stejná jako u semene beranů. Nicméně, jak již bylo zmíněno, kozlí semenná plazma, která má pozitivní účinky na

motilitu spermií, jejich membránovou integritu a odolnost proti chladovému šoku a oxidativním stresům zároveň obsahuje proteiny, které spermie poškozují během skladování. Jedná se zejména o výše zmíněnou glykoproteinovou lipázu produkovanou Cowperovými žlázami. Z toho důvodu se doporučuje promývání ejakulátu a separaci semenné plazmy ihned po odběru (Edmondson et al., 2012).

Nejčastěji používanými ředidly kozlího spermatu jsou ředidla na bázi odtučněného mléka s glukózou nebo Tris-glukózo-citrátovo-žloutkové. Glycerol se přidává v množství 6 – 7 %.

Poslední výzkumy prokazují, že přidání cholesterolu ve formě cholesterolem obalenými cyklodextriny (CLC) má pozitivní vliv na procento životaschopných spermií u hřebců po rozmrazení (Šichtař et Janošíková, 2017). Salmon et al. (2016) zkoumali stejný efekt u semene kozlů; jejich výsledky ukazují, že přidání CLC do mléčného ředidla zlepšuje odolnost kozlích spermií proti poškození způsobených semennou plazmou a chrání spermie během skladování po dobu 24 hodin při teplotě 5 °C. Výzkum pak dále naznačuje, že po ověření výsledků *in vivo*, přidání cholesterolem obalených cyklodextrinů do ředidla by mohlo vést k odstranění potřeby centrifugace semenné plazmy.

Pozitivní vliv na vlastnosti spermií po rozmražení má také včelí mateří kašička. Alcay et al. (2016) dospěli k uspokojivým výsledkům s přidáním mateří kašičky v poměru 0,25, 0,50 a 0,75 % do ředidla na bázi sojového lecitinu s finálním poměrem  $150 \times 10^6$  na 1 ml spermií. Vyšší poměr (0,50 a 0,75 %) mateří kašičky prokázal pozitivní vliv na motilitu spermií a integritu plazmové membrány, akrozómu a DNA ihned po rozmražení a následně, i přes klesající kvalitu, po 6 hodinách inkubace.

Stejně jako u beraního semene lze ředit jedno- nebo dvoukrokově. Dvoukrokové ředění však neposkytuje výrazné výhody a proto se většinou postupuje jednokrokově, což proces usnadňuje a minimalizuje manipulaci se semenem před mražením (Edmondson et al., 2012). Při zchlazování uvádějí Louda a kol. (2001) uchování naředěného semene 2 hodiny při teplotě 10 – 12 °C, následně po dobu 2 hodin při teplotě 8 °C a dále při teplotě 4 °C.

Kroyoprezervaci beraního a kozlího semene lze provádět do forem pelet – kuliček nebo pejet – dutinek.

#### 3.4.3.4.1 Pejety

Naředěné semeno se plní do plastových dutinek – pejet o objemu 0,25 ml (4 cm) nebo 0,50 ml (6 cm). Ty se následně v horizontální poloze, tak aby se nedotýkaly, chladí zhruba 4



cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 7 – 10 minut při teplotě – 80 až – 125 °C. Zmražené pejety se poté ponoří do tekutého dusíku, kde se rychle zmrazí na finální požadovanou teplotu – 196 °C (Louda, 2001; Edmondson et al., 2012).

Shiple et al., (2007) uvádějí následující mrazící protokol: rychlost mražení 4 °C za minutu do teploty – 12 °C, poté 40 °C za minutu v teplotním rozsahu – 12 °C až – 40 °C a konečně 50 °C za minutu v teplotním rozpětí – 40 °C až – 140 °C s následným uložením do tekutého dusíku.

Mrazícím protokolem se v poslední době zabývala studie Fang et al. (2016). Autoři zkoumali vliv rychlosti mražení na fosfolipidy plazmatické membrány beraních spermií. Dospěli k závěru, že sperma mražené rychlostí – 40 °C za minutu vykazovalo lepší výsledky v distribuci fosfolipidů v plazmatické membráně, její funkci a následnou fertilizační schopností oproti rychlostem – 1, – 20, – 60 a – 80 °C za minutu.

#### 3.4.3.4.2 Pelety

Nařaděné zchlazené semeno se nakapává v množství 0,1 až 0,3 ml kapátkem zchlazeným na 4 °C do důlků o průměru 0,5 až 0,8 cm zhotovené důlkovačem v suchém ledu. Doba zmrazování se pohybuje od 7 do 10 minut. Po této době se zmražené pelety přesypou do řádně označených plastových kelímků naplněných tekutým dusíkem. Ty se pak ukládají do kontejnerů (Louda, 2001; Edmonson, 2012).

#### 3.4.3.5 Rozmrazování

Inseminální dávky ve formě pelet se rozmrazují buď vhozením kuliček do ředidla zahřátého na teplotu 40 °C (tzv. „mokrý“ rozmrazování). „Suché“ rozmrazování lze provést vložением pelet do zkumavky a ponořením do vodní lázně 40 °C. Semeno je následně uloženo do vodní lázně o teplotě 30 °C do doby inseminace (Shiple et al., 2007).

Pejety se rozmrazí vložением dutinek do vodní lázně o teplotě 35 – 40 °C po dobu 30 vteřin (Shiple et al., 2007).

K inseminaci se používají dávky, ve kterých aktivita spermií po rozmražení dosahuje 40 % a více (Louda a kol., 2001).

### 3.5 Kontrola reprodukčního cyklu a synchronizace říje

Jak již bylo řečeno, ovce i koza se řadí mezi hospodářská zvířata se sezonní pohlavní aktivitou. Z chovatelského hlediska je žádoucí manipulovat říjí i během období anestrů.

Zároveň správné načasování umělé inseminace, a to nejen v rámci jednotlivých říjových cyklů během plodného období, je jedním z kritických faktorů pro úspěšné zabřeznutí. Stimulace říje a její synchronizace se tak řadí mezi hojně využívané biotechnologické metody, které úzce souvisí s umělou inseminací (Horák a kol., 2004; Fantová a kol., 2015).

V současné době se k vyvolání říje a její synchronizaci využívají tři základní strategie, které se velice často kombinují. Jedná se o podávání hormonálních přípravků, manipulaci fotoperiodicity pomocí melatoninu a tzv. beraní efekt (Dardente et al., 2016).

### 3.5.1 Beraní efekt a melatonin

Beraní efekt je nejstarší chovatelskou praxí jak ovlivnit reprodukci samic. Přítomností samce lze úspěšně modifikovat tři reprodukční období samic – pubertu, anestrus a estrus (Louda a kol., 2001).

Jedná se o praxi, kdy se stádo samic vystaví přítomnosti sexuálně aktivních samců, což v důsledku vyvolá sekreci luteinizačního hormonu LH a synchronizovanou ovulaci (Dardente et al., 2016).

Náhle setkání s beranem může ovlivnit dřívější nástup a synchronizaci puberty u jehniček (Louda a kol., 2001).

Náhlá přítomnost berana nebo kozla ve stádě samic, které jsou před koncem sezónního anestru, vyvolá říji u většiny samic během 6 dnů. Samice by ovšem neměly být vystaveny kontaktu se samcem v průběhu předchozích 3 až 4 týdnů (Edmondson et al., 2012).

První říje po přiřazení samce k samicím je většinou krátká a bez výrazných projevů (tzv. tichá říje). U koz se pulzativní sekrece LH zvyšuje ihned po kontaktu s kozlem. V závislosti na plemeni a období v roce se preovulační vlna LH dostavuje během 51 – 53 hodin po zjištění přítomnosti samce. Následná ovulace vede k utvoření žlutého tělíska, avšak v rámci krátkého cyklu s dobou trvání 5 – 7 dní a s nízkou sekrecí progesteronu. Po luteolýze se dostavuje nový cyklus s novou preovulační vlnou během něhož dochází k ovulaci 8 dní po přiřazení kozla. Během tohoto druhého cyklu se vytvoří dostatečně zralé *corpus luteum*, což následně vede k normální sekreci progesteronu a tedy standardnímu 21-dennímu cyklu (Lopez-Sebastián et al., 2014).

U ovcí se předovulační vrchol LH dostavuje zhruba 27 hodin a ovulace nastává v průměru asi 41 hodin po příchodu berana do stáda. Žluté tělísko je často různé kvality. Některé může trvat jako u normálního cyklu a zaniká kolem 13. dne po ovulaci. Jiné může, stejně jako u koz, zanikat předčasně – k reovulaci pak dochází 6 – 8 dnů po jeho zániku (Louda a kol., 2001).

Na úspěšnosti použití beraního efektu k vyvolání říje se kromě faktorů jako jsou kvalita *libida sexualis* u samce (Delgadillo et al., 2006), délka předchozí izolace samce a samic, resp. novost samce pro samice (Rivas-Muñoz et al., 2007; Delgadillo et al., 2009, De St Jorre et al., 2014) výživový stav a doba od posledního porodu (Galllego-Calvo et al., 2014), podílí především plemeno a jeho sezónnost (Anel et al., 2005).

Beraní efekt může indukovat ovulaci kdykoliv během sezonního anestru u plemen, která vykazují nižší sezónnost jako např. koza kreolská nebo Murciano-Granadina; u ovcí např. Ile de France nebo Merino d'Arles (Dardente et al., 2016).

U některých vysoce sezonních plemen nemá však beraní efekt tak spolehlivý účinek aby vyvolal říji během hlubokého anestru a pouze přiblíží začátek připouštěcího období pokud se tato technika použije ke konci anestru (Dardente et al., 2016).

Účinnost této techniky u vysoce sezonních plemen se však v poslední době zvyšuje v souvislosti s ovlivňováním fotoperiodicity, kdy jak samci, tak samice jsou vystaveni umělé regulaci světelného dne ať již pouhým svícením, případně i za použití melatoninu.

Delgadillo et al. (2015) zjistili, že přítomnost sexuálně aktivního kozla během anestru dostatečně narušuje reprodukční útlum během anestru. Ve studii použili samce, jejichž vlastní reprodukční sezónnost byla ovlivněna upravením světelného režimu na 16 hodin světla (intenzita min. 300 luxů) a 8 hodin tmy po dobu 2 měsíců během podzimu a začátkem zimy a subkutánní aplikace melatoninu. 1,5 měsíce po skončení světelného ošetření vykazovali kozlové výraznou sexuální aktivitu v období od ledna do června. Po přiřazení takto stimulovaných kozlů k samicím v anestru byl nástup říje 100%. Autoři dále poukazují na to, že stálá přítomnost těchto samců zabránila u samic nástupu anestru.

Jejich výsledky potvrzují Chasles et al. (2016), kteří uvádějí vyšší výskyt ovulace (86 %) během měsíce března po kontaktu s kozly s fotoperiodickým ošetřením během podzimu.

K obdobným výsledkům u ovcí dospěli Abecia et al. (2015), kteří zkoumali vliv vystavení bahnic přítomnosti beranů, jejichž reprodukční aktivita byla podpořena světelným režimem a aplikací tří podkožních melatoninových implantátů. Jejich výsledky dokládají, že stálá přítomnost takto ošetřených beranů prodloužila ovariální aktivitu bahnic v jarním období, tedy v období typickém pro anestrus.

V praxi je použití beraního efektu za pomoci úpravy světelného režimu a s pomocí melatoninu mocným nástrojem k manipulaci reprodukční aktivity mimo klasické plodné období. Nicméně vzhledem k tichým říjím a krátkému estrálnímu cyklu indukovanému beraním efektem je v rámci umělé inseminace, kde je načasování kritické, potřeba

identifikovat samice v říji a inseminaci opakovat v průběhu několika dní. Z praktického hlediska se tak jeví tradičně používané hormonální metody vyvolání a synchronizace říje přesnější a praktičtější (Dardente et al., 2016).

### 3.5.2 Hormonální synchronizace říje

Umělá inseminace se nejčastěji provádí po hormonální synchronizaci říje. Ta se provádí buď aplikací gestagenů, zejména progesteronu nebo prostaglandinů, zejména prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) (Edmondson et al., 2012).

#### 3.5.2.1 Progesteron a syntetické gestageny

Princip užití gestagenů pro synchronizaci říje spočívá v jejím oddálení. Exogenní gestageny (progesteron nebo jeho analogy) se tak používají k umělé kontrole doby trvání luteální fáze (Edmondson et al., 2012). Umělá kontrola životnosti žlutého tělíska, které ovlivňuje sekreci luteinizačního hormonu (LH) z hypofýzy, nebo manipulace hladiny cirkulujícího progesteronu umožňují regulaci estru a ovulace (Abecia et al., 2012).

Nejčastější forma aplikace je transvaginální ve formě intravaginálních polyuretanových pesarů/houbiček nebo CIDR (controlled intravaginal drug-releasing device) vaginálních tělísek napuštěných gestageny. Nejpoužívanější komerční forma gestagenů jsou fluorogestonacetát (FGA) v koncentracích 20 – 40 mg, medroxyprogesteron v koncentracích 50 – 60 mg nebo 0,3 g progesteronu (Abecia et al., 2012).

Další možností je enterální podání melengestrolacetátu. Jak u ovcí tak u koz lze podávat v množství 0,22 mg na jedince po dobu 14 dnů, případně dávku rozdělit do dvou podání denně (2  $\times$  0,125 mg na jedince). První říje po vysazení přípravku však vykazuje nízké hodnoty fertility a proto se doporučuje oplodnění až při druhé říji po vysazení přípravku. Metoda navíc neumožňuje přesné dávkování, jež vyžaduje pro uspokojivou účinnost (Edmondson et al., 2012).

Alternativou je také aplikace ušního implantátu Norgestometu, používaného u skotu. 1,5 až celý implantát v dávce 3 až 6 mg se aplikuje subkutánně u kořene ucha; ponechává se v místě 7 – 9 dní (Edmondson et al., 2012).

Tampony nebo tělíska se u ovcí ponechávají 9 až 14 dní; říje nastupuje zhruba 48 hodin po vyjmutí (Abecia et al., 2012).

U koz se pesary ponechávají 16 – 18 dní, zatímco CIDR tělíska se vyjímají po 18 – 21 dnech. U většiny koz se pak říje dostavuje během 24 – 36 hodin (Edmondson et al., 2012) nebo 48 hodin (Abecia et al., 2012) po vyjmutí.

Ošetření progesteronem nebo jeho analogy lze za účelem větší synchronizace kombinovat s intramuskulární aplikací koňského sérového gonadotropinu (eCG) v době odstranění gestagenů. eCG se u ovcí aplikuje v množství 250 až 750 mezinárodních jednotek (m. j.) v závislosti na plemenu, sezóně a věku bahnice (Hill et al., 1998). Louda a kol. (2001) uvádějí aplikaci 500 m. j. eCG.

U koz je možné aplikovat dávky až do 1000 m. j. (Abecia et al., 2012).

Synchronizaci lze také podpořit přiřazením samce „prubíře“ 24 hodin po vysazení gestagenu. Některé synchronizační protokoly obsahují podání prostaglandinů 24 hodin před vysazením zdroje progesteronu s následnou aplikací eCG 24 až 48 hodin nebo v době vyjmutí zdroje progesteronu (Edmondson et al., 2012).

V době fyziologického anestru se nejčastěji používá právě kombinace progesteronu a eCG. Gestagen je do organismu dodáván po dobu 14 dnů a následuje aplikace gonadotropinu – buď folikulostimulační hormon (FSH) nebo koňský choriový gonadotropin (eCG) 48 hodin před vyjmutím zdroje gestagenu. Edmonson et al. (2012) uvádějí dávku 300 – 400 m. j. U koz je standartním protokolem dávkováno 600 m. j. v období od února do června, tj. hlubokém anestru a 500 m. j. od července do srpna. Mezi září a lednem se eCG aplikuje současně s vyjmutím pesaru v dávce 400 m. j.

Dlouhé (14 dní) progesteronové protokoly úspěšně synchronizují říji, ovšem s variabilní fertilitou (procentem zabřeznutí) (Faigl et al., 2012). Menchaca et Rubianes (2004) se domnívají, že je to z důvodu dlouhotrvající progesteronové nabuzení (priming) může snižovat hladinu progesteronu na subluteální úroveň ke konci ošetření. Vzhledem k tomu, že LH vlna se opakuje po 5 – 7 dnech, delší dodávání progesteronu není žádoucí (Abecia et al., 2012).

Jako přijatelný se zdá být kratší protokol, kdy ošetření progesteronem probíhá 5 – 7 dnů. Protokol zahrnuje aplikaci eCG (200 až 400 m.j.) a luteolytické dávky prostaglandinu F2 $\alpha$  v době vyjmutí progesteronových implantátů. V porovnání s dlouhým protokolem během terénních experimentů se krátký protokol (6 dní) prokázal jako úspěšnější než dlouhý (43,5 % zabřeznutí vs. 37,8 %; inseminace laparoskopicky) (Menchaca et al., 2017).

### 3.5.2.2 Prostaglandiny

Alternativní metodou synchronizace říje a ovulace je indukce luteolýzy, zánik žlutého tělíska a následné vyvolání folikulární fáze s ovulací. Primárním luteolytickým faktorem u ovcí a koz je prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). Aplikace exogenního PGF2 $\alpha$  nebo jeho analogů je tak účinným prostředkem k vyvolání luteolýzy 5. – 6. den estrálního cyklu (Edmondson et al., 2012).

Výhodou použití prostaglandinů je intramuskulární injekční aplikace – odpadá aplikace vaginálních pesarů a minimalizuje se tak mimo jiné vaginální mikrobiotická kontaminace, zlepšuje se komfort a welfare zvířat a v neposlední řadě je hormon metabolizován plícemi (99 %) a nedochází tak k uvolňování reziduí (Abecia et al., 2012).

Nevýhodou je však potřeba aplikovat hormon během existence aktivního žlutého tělíska, které bude k PGF2 $\alpha$  rezponzivní. Responsivita žlutého tělíska k PGF2 $\alpha$  nastává od třetího dne estrálního cyklu do doby přirozené luteolýzy (Rubianes et al., 2003). Zvířata v anestru nebo v časně, případně pozdní luteální nebo folikulární fázi tak nebudou na ošetření exogenním PGF2 $\alpha$  odpovídat žádoucím způsobem (Abecia et al., 2012).

Jednou injekční aplikací PGF2 $\alpha$  lze očekávat prokazatelné projevy říje u zhruba 60 – 70 % ošetřených samic během 30 až 60 hodin (Edmondson et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že nelze vědět přesně v jaké fázi estrálního cyklu se skupina samic právě nachází, aplikují se dvě injekce PGF2 $\alpha$  v rozmezí 9 – 11 dnů, kdy je předpoklad, že všechny samice budou v době druhé injekce v polovině luteální fáze a budou tak na aplikovaný hormon reagovat (Abecia et al., 2012).

Dlouhý protokol naopak navrhuje Fierro et Olivera-Muzante (2017). Dokládají úroveň úspěšnosti při aplikaci prostaglandinu v rozmezí 15 až 16 dnů obdobou jako při použití progesteronu a eCG.

Použití prostaglandinů k synchronizaci se doporučuje pouze u cyklujících samic, tj. v plodném období, případně na jeho začátku nebo konci. Možným řešením je navození ovulační aktivity během anestru použitím beraního efektu, případně melatoninu (Abecia et al., 2012).

## **3.6 Metody inseminace**

### **3.6.1 Intravaginální**

Intravaginální inseminace se provádí zavedením pipety do pochvy a deponací inseminační dávky do nejhlubší, kraniální, části pochvy. Inseminace se provádí bez poševního zrcadla (Louda a kol., 2001; Faigl et al., 2012); v případě, že je použito pro lepší viditelnost, by zrcadlo mělo být lubrikováno (Edmondson et al., 2012). Při zavádění inseminační pipety je její špička mírně zvednutá směrem ke kosti křížové, tak aby nebyla zavedena do uretry. Inseminační dávka se umísťuje do horní části poševní klenby (Louda a kol., 2001). Deponace

co nejbliže krčku děložnímu je žádoucí, neboť maximalizuje míru úspěšnosti měřenou procentem zabřeznutí (Edmondson et al., 2012).

Nejlepších výsledků se dosahuje při použití čerstvého nebo chlazeného semene v objemu 0,2 ml. Dávka by měla obsahovat minimálně  $400 \times 10^6$  (ovce) a  $300 \times 10^6$  (koza) progresivně pohyblivých spermií (Faigl et al., 2012). Kukovics et al. (2011) uvádějí počet 50 až 100 milionů spermií.

Vaginální inseminace je rychlá a jednoduchá metoda pro využití v praxi, kterou při použití čerstvého nebo chlazeného semene lze docílit sice nízké, ale přesto uspokojivé procento zabřeznutí. U ovcí lze použitím čerstvého semene při vaginální inseminaci očekávat 20 – 60 % úspěšnost v zabřeznutí (Shipley et al., 2007).

Její nevýhodou je však vysoká spotřeba semene a nižší procento zabřeznutí při použití kryokonzervovaného semene jak u ovcí z důvodu neprůchodnosti děložního krčku, tak u koz z důvodu špatné mrazitelnosti semene (Faigl et al., 2012). Například Richardson et al. (2012), kteří porovnávali cervikální a vaginální inseminaci hormonálně synchronizovaných ovcí 57 hodin po vyjmutí progesteronových pesarů rozmraženým semenem v koncentraci  $800 \times 10^6$ , získali ve své studii úspěšnost pouhých 27,6 % zabřezlých.

Z důvodu jednoduchosti a také z důvodu legislativy omezující použití laparoskopické inseminace v severní Evropě, především ve Švédsku a Norsku (Faigl et al., 2012), ale snahy o praktické využití vaginální inseminace mraženým semenem přesto existují.

V Norsku se po sérii studií, během kterých se dosahovalo 50 % (Crilly et al., 2016) a 67,4 % (Paulenz et al., 2005) úspěšného zabřeznutí, se vaginální inseminace ovcí mraženým spermatem stala od roku 2002 doporučenou metodou umělé inseminace. V rozsáhlé terénní studii v roce 2008, během které bylo vaginálně inseminováno zhruba 20 000 ovcí v přirozené říji dávkou  $200 \times 10^6$  rozmražených spermií, bylo procento nepřeběhlých (non return rate NRR) 67,3 % (Nordstoga et al., 2010).

Obdobná studie, ovšem ve výrazně menším měřítku, se uskutečnila ve Velké Británii za účelem ověření metody v tamních podmínkách. 20 ovcí plemene Cheviot Mule bylo během plodného období inseminováno dávkou  $400 \times 10^6$ . Počet zabřezlých ovcí byl 10, potvrzující výsledky 50 % úspěšného zabřeznutí z Norska, které ovšem pocházely z poloviční dávky spermií v inseminační dávce. Autoři jako možný důvod poukazují na plemennou rozdílnost (Crilly et al., 2016).

Ve snaze aplikovat výše zmíněnou metodu provedli Nordstoga et al. (2010) terénní studii vaginální inseminace mraženým spermatem u Norské mléčné kozy. Inseminace 476 koz byla prováděna chovateli v celkové dávce  $400 \times 10^6$  - u poloviny koz byla dávka deponována

ve dvou pejetách najednou, u druhé poloviny se vkládaly dvě pejety s 12 hodinovou prodlevou. Jednorázová inseminace dvojitou dávkou vedla k 64,3 % zabřeznutí (NRR); úspěšnost zabřeznutí u dvoukrokové inseminace byla 62 %.

### 3.6.2 Intracervikální

Intracervikální, neboli vnitrokrčková inseminace se provádí za použití poševního spekula – zrcadel a světelného zdroje k identifikaci ektocervixu. Zrcadla se zavádí do pohlavního traktu do hloubky 10 – 13 cm. Inseminační dávka se deponuje do hloubky 5 – 12 mm (Faigl et al., 2012) nebo až 20 mm do kanálku děložního krčku, tj. za 1. nebo druhou 2. příčnou řasu (Louda a kol., 2001).

Při deponaci inseminační dávky je třeba dbát na to, aby se semeno nevracelo do pipety nebo do pochvy, případně aby se tak dělo minimálně, neboť reflux semene vede k nižší efektivnosti, tedy fertilizaci (Álvarez et al., 2012). Zajímavé výsledky v tomto kontextu nedávno prezentovali Macías et al. (2017) – navrhli nový typ násady na inseminační pipetu DARIO, která by měla reflux minimalizovat. Výsledky jejich praktického testu potvrzují, že při použití DARIO násady se fertilita po cervikální inseminaci zlepšila o 9,8 % (49,6 % vs. 59,4 %).

Inseminační dávka čerstvého semene by měla obsahovat  $1 \times 10^9$  spermií. Při použití chlazeného semene by počet spermií měl být 1,5-násobek (Edmondson et al., 2012). Míra zabřeznutí po intracervikální inseminaci čerstvým nebo chlazeným semenem umožňuje její použití při hormonální synchronizaci říje. Ideální doba pro inseminaci je zhruba 55 hodin po vyjmutí progesteronových tampónů, nebo 15 – 17 hodin od nástupu zjištěné říje (Faigl et al., 2012).

Při použití rozmraženého semene je inseminační dávka 0,2 ml s minimálním počtem  $200 \times 10^6$  motilních spermií (Faigl et al., 2012). Čunát a kol. (2013) uvádějí jako optimální dobu pro úspěšnou inseminaci 56 – 59 hodin po ukončení synchronizace při objemu inseminační dávky 0,5 – 0,8 ml.

Míru zabřezávání u ovcí lze očekávat mezi 40 % až 80 % (Shipley et al., 2007). Vyšší rozmezí potvrzuje Paulenz et al. (2005) s 75,4 %, ovšem bez hormonálně synchronizované říje. Čunát a kol. (2013) uvádějí rozmezí 17,65 % až 72,22 % s průměrem 51,49 % s dlouhým synchronizačním protokolem a v závislosti na plemeni. Ještě nižší úspěšnost uvádějí Richardson et al. (2012), a to 36,2 % zabřeznutí.



Lepších výsledků v zabřezávání ovcí v experimentální studii docílili Horta et al. (2010) po vaginální aplikaci misoprostolu s turbetalin sulfátem 6 hodin před umělou inseminací (60,7 % u vaginální inseminace a 70,6 % u cervikální inseminace).

Vzhledem k tomu, že anatomie děložního krčku kozy umožňuje lepší průchodnost pipety, lze intracervikální metodou inseminace v podstatě dosáhnout intrauterinní deponace inseminační dávky a je tedy mnohem hojněji využívána (Faigl et al., 2012).

Inseminace se provádí v den říje a postup je podobný jako u ovcí. S pomocí spekula se vpravuje pipeta s inseminační dávkou o objemu 0,2 – 0,5 ml. S dobrou organizací inseminace lze dosáhnout 80 – 90 % březosti po první inseminaci. Inseminace mraženým spermatem dosahuje širokého rozmezí úspěšnosti 15 % až 85 %. To je ovlivněno mnoha faktory, především však různou úrovní chovu a organizace inseminace a zejména pak metodikou krátkodobé a dlouhodobé konzervace semene a tedy zachování oplodňovací schopnosti spermií (Louda a kol., 2001).

### **3.6.3 Intrauterinní**

Intrauterinní metoda inseminace spočívá v deponování inseminační dávky přímo do dělohy. Vnitroděložní deponace umožňuje použití menší dávky semene. Klade též nižší nároky na počet potřebných spermií v dávce, zatímco objem semenné dávky zůstává stejný a lze tak dosáhnout přesnějšího ředění (Faigl et al., 2012). Zároveň má tato metoda nejpriznivější výsledky v zabřezávání při použití rozmraženého spermatu. Způsoby, kterými lze u ovcí a koz doručit inseminační dávku přes krček děložní, jsou dva – laparoskopicky nebo transcervikálně.

#### **3.6.3.1 Laparoskopická**

Laparoskopická inseminace je invazivní metoda inseminace, která se provádí za použití speciálního optického zařízení zavádí inseminační dávka přes stěnu břišní přímo do děložního rohu, tedy do místa blíže k místu oplodnění (Edmondson et al., 2012).

Mezi její výhody se tak řadí míra zabřezávání, neboť metoda obchází problematickou partii děložního krčku a transport spermií přes něj a lze tak dosáhnout vyššího procenta oplodnění než u ostatních metod inseminace, zejména pak rozmraženým semenem (Faigl et al., 2012; Casali et al., 2017).

Vzhledem k tomu, že se jedná o invazivní chirurgický zákrok, laparoskopie tak s sebou nese i řadu nevýhod a rizik. Kromě toho, že invazivní zákrok může vést ke zraněním, případně infekcím, anestezie a manipulace se zvířetem vedou ke stresu a negativně tak

ovlivňují efektivitu laparoskopie (McCappin et Murray, 2011). Zároveň metoda vzbuzuje otázky v problematice životní pohody zvířat – welfare. V neposlední řadě vyžaduje vysokou odbornou způsobilost, je náročná na technické vybavení a organizaci práce, čímž se stává i ekonomicky náročnou (Shiple et al., 2007; Čunát a kol., 2013).

Laparoskopie se u větších hospodářských zvířat často provádí 10 mm laparoskopem se sklonem zorného úhlu kamery 30°. U malých přežvýkavců lze však efektivně využít laparoskop s průměrem 5 – 6 mm s úhlem pohledu 0°.

Přestože se u konvenční laparoskopie zavádí laparoskop do dutiny břišní v okolí pupku, laparoskopická inseminace je rychlejší skrze více kaudálně umístěné vstupní portály pro laparoskop a inseminační sondu (Edmondson et al., 2012).

Z důvodu lepší vizualizace vnitřních orgánů a pohyblivosti nástrojů se dutina břišní těsně před výkonem naplňuje CO<sub>2</sub> Veressovou jehlou. Feranti et al. (2013) též zmiňují – v praxi používanou – insuflací okolním vzduchem přiváděným za pomoci ruční pumpičky.

Před samotným výkonem samice nedostává potravu po dobu 24 – 36 hodin (Shiple et al., 2007). Luther (2008) uvádí kratší dobu vyhladovění, a to 16 hodin. Omezený je i přístup k vodě po dobu zhruba 12 hodin.

Samice jsou 15 – 30 minut před výkonem ošetřeny celkovou anestezií. Pro samotný výkon jsou pak polohovány do hřbetní pozice; v případě použití laparoskopické klece, otáčí se tak, aby samice byla v pozici hlavou dolů a v úhlu 45°. Vlno v oblasti 10 – 20 cm kraniálně od mléčné žlázy je oholena a ošetřena dezinfekcí. V místech zavedení sond, 5 – 7 cm kraniálně od vemínka a 3 – 4 cm laterálně od ventrální mediální roviny, je aplikována lokální anestezie (Shiple et al., 2007; Edmondson et al., 2012).

Po provedení dvou řezů 6 – 10 mm se zavádí vodící trokary na laparoskop (většinou vlevo), do druhého se zavádí inseminační aplikační pipeta. Po identifikování dělohy laparoskopem se zavádí inseminační dávka, která je rozdělena do obou děložních rohů v oblasti uterotubulárního spojení (Čunát a kol., 2013; Ari et Öztürkler, 2017). Nicméně, dávku lze také aplikovat pouze do jednoho děložního rohu – u ovcí nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v procentu zabřeznutí po inseminaci do jednoho vs. obou rohů (Perkins et al., 1996).

Po aplikaci inseminační dávky se vytáhne pipeta, následně laparoskop. Po deflaci se vytahují vodící trokary. Rány se sešívají nebo sponkují. Po zásahu je doporučena lokální a celková profylaktická dávka antibiotik, případně protitetanové sérum. Inseminovaná ovce nebo koza by měla být ponechána 1 až 2 hodiny v klidu odpočívat (Shiple et al., 2007; Edmondson et al., 2012).

Doba procedury se liší podle zkušenosti operátora – pohybuje se průměrně mezi 5 – 10 minutami (Luther, 2008). Velmi zkušený operátor ji dokáže provést v rozmezí 1,5 až 5 minut (Edmondson et al., 2012). S dobrou organizací a zkušeným týmem tak lze touto metodou inseminovat až 300 samic za den (Shipley et al., 2007).

V rámci pokusů o zefektivnění metody ve snaze minimalizovat tkáňové trauma a bakteriální kontaminaci nedávno testovali Silva-Meirelles et al. (2017) laparoskopickou inseminaci prostřednictvím jednoho přístupového portálu s pozitivními výsledky a průměrným časem inseminace 5,92 minut (Silva-Meirelles et al., 2017).

Ideální doba laparoskopické inseminace je 48 – 65 hodin po odejmutí progesteronového zdroje (Luther, 2008; Faigl et al., 2012; Čunát a kol., 2013).

Inseminační dávka jak beraního, tak kozlího semene by měla obsahovat min.  $20 - 50 \times 10^6$  progresivně motilních spermií (Faigl et al., 2012; Luther, 2008).

Úspěšnost metody lze očekávat v průměrném rozmezí 60 – 75 %. Při použití čerstvého semene se míra zabřeznutí pohybuje v rozmezí 70 – 100 % a při použití rozmraženého semene v rozmezí 40 – 80 % (Shipley et al., 2007). Edmondson et al. (2012) uvádějí jak pro čerstvé, tak pro rozmražené sperma rozmezí 20 – 90 % zabřeznutí. Čunát a kol. (2012) uvádějí při použití mraženého spermatu v podmínkách ČR 59,8 % zabřeznutí.

Úspěšnost laparoskopie, stejně jako ostatních metod inseminace ovcí a koz, je ovlivněna mnoha faktory – kvalitou semene (David et al., 2015), kondicí (podle systému hodnocení bodového skóre (BCS – Body Condition Score) bahnice nebo kozy (Fukui et al., 2010; Slavova et al., 2015), období v roce a zkušeností a zručností technika-operátora (Anel et al., 2005).

Mezi další faktory se ale řadí například i lokalita provedení inseminace (přímo na farmě vs. inseminační centrum), množství eCG použitého pro synchronizaci říje (vyšší množství snižuje míru zabřeznutí), a míra manipulace s bahnicemi v období 4 až 6 týdnů před provedením laparoskopie (více manipulace vede k horším výsledkům inseminace) (McCappin et Murray, 2011).

### 3.6.3.2 Transcervikální

Transcervikální metoda inseminace spočívá v překonání děložního krčku a deponaci inseminační dávky pipetou přímo na kraj dělohy. Vzhledem k anatomické stavbě děložního krčku se především u ovcí (v menší míře u koz) jedná o málo používanou, náročnou metodu, vyžadující vysokou odbornost inseminačního technika (Louda a kol., 2001; Casali et al., 2017).

Techniku transcervikální inseminace u ovcí, která spočívala ve fixaci děložního krčku kleštěmi a zavedení 17-gauge zakulacené jehly, připojené k inseminační pipetě do cervikálního kanálu popsali jako první Fukui et Roberts (1977).

Později se začal uplatňovat tzv. Guelph systém – technika, ve které je ovce ve hřbetní pozici a s končetinami fixovanými k sobě v upravené kleci, a při níž se do pochvy zavede lubrikovaný vaginoskop. Přes vaginoskop se zavádí světelný zdroj a dále chirurgické kleště, jimiž technik přichytí děložní krček a posunuje ho kaudálně do pozice přístupné inseminačnímu nástroji. Druhou rukou pak penetruje inseminačním nástrojem děložní hrdlo. Oběma rukama pak následně manipuluje jak děložním hrdlem, tak inseminačním nástrojem, kterým se pokouší překonat cervikální řasy a proniknout do těla dělohy (Halbert et al., 1990; Candappa et Bartlewski, 2011; Casali et al., 2017).

Halbert et al. (1990), autoři Guelph techniky, uvedli 50 % zabřeznutí po intracervikální inseminaci čerstvým semenem ( $400 \times 10^6$  spermií) a 68 % zabřeznutí po inseminaci mraženým semenem ( $150 \times 10^6$ ). Procento obahnění bylo 55 % a 40 %. V kontrolní skupině provedli autoři i laparoskopickou inseminaci – výsledky byly 70 % zabřeznutí a 68 % obahnění.

Obecně se procento zabřeznutí ovcí po transcervikální inseminaci pohybuje mezi 40 – 70 % (čerstvé semeno) a 30 – 70 % (mražené semeno). Inseminační dávka v rozmezí 0,2 – 0,5 ml by měla obsahovat min.  $100 - 200 \times 10^6$  spermií. Zkušený a technicky zdatný inseminátor dokáže penetrovat děložní hrdlo až u 75 – 85 % ovcí (Faigl et al., 2012).

U koz se transcervikální inseminace provádí obdobným způsobem jako u ovcí, nicméně je jednodušší. Inseminační pipeta by neměla pronikat do větší hloubky než 38 mm, aby nedošlo k perforaci děložní stěny. Inseminační dávka čerstvého semene by měla obsahovat  $150 \times 10^6$  pohyblivých spermií; rozmraženého min.  $200 \times 10^6$ . Ideální doba inseminace je 49 až 65 hodin po vyjmutí progesteronových pesarů. Procento zabřeznutí se pohybuje mezi 50 % až 85 % v závislosti na zkušenosti inseminátora, typu nástroje a kvalitě semene. Použití čerstvého semene vede k vyššímu procentu zabřeznutí (Edmondson et al., 2012; Faigl et al., 2012).

Mezi nevýhody metody se kromě náročnosti a nižší míry úspěšnosti řadí i fakt, že není vhodná pro inseminaci jehniček. Kromě toho s sebou tato metoda inseminace nese vyšší riziko cervikálního poranění a infekce (Faigl et al., 2012). V neposlední řadě, Wulster-Radcliffe et al. (2004) dokládají, že samotná manipulace katetru přes cervikální kanál vede k nižší míře zabřezávání a následných porodů.

I přes její nevýhody se snahami metodu (resp. její výsledky) u ovcí vylepšit zabývala řada autorů. Jednotlivé návrhy a řešení zahrnovaly použití specializovaných inseminačních nástrojů/katetrů přizpůsobených anatomii ovčího děložního hrdla (Wulster-Radcliffe et al., 2004; Álvarez et al., 2012), případně použití farmakologických prostředků za účelem cervikální dilatace.

Jako nadějně se jeví použití k dilataci hrdla použití prostaglandinů E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub>, které indukují cervikální uvolnění a umožily by tak lepší průchodnost a deponaci inseminační dávky.

Bartlewski et Candappa (2015) testovali použití Cervidilu, poševního pesaru obsahujícího dinoproston (prostaglandin E<sub>2</sub>) používaný v humánní medicíně k přípravě děložního hrdla před porodem. Při jeho použití dosahovala během transcervikální inseminace penetrace děložního hrdla 82,5 % a doba potřebná k penetraci se pohybovala okolo 54 sekund (pesar vnitroděložně po dobu 12 hodin) a 38 sekund (pesar po dobu 24 hodin). Celkem 4 z 36 úspěšně penetrovaných ovcí během plodného období zabřezly a následně se obahnily.

Nedávné výsledky výzkumu embryotransferu u ovcí a koz popisují techniku manipulace a fixaci děložního hrdla skrz pochvu a katetrizaci s pomocí rektální nebo vaginální manipulace jedním nebo dvěma prsty. Porovnání výsledků použití této techniky transcervikální inseminace s ostatními metodami provedli Casali et al. (2017). Procento oplodnění pro metodu cervikální, transcervikální a laparoskopickou byly 36,0 %, 42,3 % a 50,2 %. Kromě nižšího procenta oplodnění než u laparoskopické byla transcervikální metoda inseminace též nejnáročnější na čas (11,4 bahnic / hodinu vs. 85,5 cervikálně a 56,8 laparoskopicky).

## 4 Závěr

Umělá inseminace je progresivní biotechnologickou metodou, kterou je z mnohých důvodů žádoucí využívat v chovech malých přežvýkavců. I přesto se tak děje poměrně omezeně, a to i v chovatelsky vyspělých zemích s vysokými početními stavy, dobrou infrastrukturou a organizací chovů a je soustředěno zejména na šlechtění.

Hlavními limitujícími faktory umělé inseminace ovcí a koz jsou morfologická stavba děložního krčku, snižující se kvalita spermií s postupem času a dále snížená mrazitelnost semene. Mezi další podstatné faktory se řadí plemenná příslušnost, sezónní plodnost, způsob synchronizace říje, tělesná kondice a faktor lidský.

Metoda samotné inseminace závisí na délce a způsobu uchování semene. Při použití rozmraženého spermatu je nejlepších výsledků dosahováno u laparoskopicky provedené intrauterinní deponace inseminační dávky. Výjimkou je relativně vysoké procento zabřeznutí u rozmraženého semene deponováno vaginálně v Norsku. To je z velké části přičítáno plemenné příslušnosti tamních ovcí a koz.

Pro zlepšení výsledků umělé inseminace u ovcí a koz se mnohé výzkumy soustředí na zvýšení oplozovací schopnosti rozmraženého spermatu skrze různá složení ředidel a nalezení optimálního mrazícího protokolu.

Z důvodů legislativních a ekologických jsou také snahy minimalizovat využití hormonů k manipulaci sezónní plodnosti a synchronizaci říje. Jako nadějně se jeví ovlivňování hladiny melatoninu buď jeho exogenním dodáním, nebo upravením světelného režimu a použití beraního efektu.

V neposlední řadě se výzkum soustředí na samotné metody inseminace, ať už laparoskopické nebo transcervikální, kde se jako přínosné ukazuje použití dilatačních prostředků.

Řadu výsledků výzkumů ve výše uvedených oblastech je však i přes uspokojivé závěry v laboratorních podmínkách potřeba do budoucna ověřit v praxi a místních podmínkách.

## Seznam použité literatury

Abecia, J., Forcada, F., González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130 (3-4). 173-179.

Ali, M., Zeitoun, M. 2017. Privilege of Gum Arabic inclusion in semen extender compared with egg yolk on the Herri ram's subsequent fertility outcomes. *International Journal of Animal Research*. 1 (15).

Álvarez, M., Chamorro, C., Kaabi, M., Anel-López, L., Boixo, J., Anel, E., Anel, L., de Paz, P. 2012. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*. 131 (3-4). 153-159.

Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Fuente, L. F. de la, Paz, P. de. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 63 (4). 1235-1247.

Ari, U., Öztürkler, Y. 2017. Intrauterine Artificial Insemination Techniques in Small Ruminants: Transcervical and laparoscopic artificial insemination. 1. Conference: Problems and Perspectives for Development of Modern Cryobiological Reproductive Technology and its Role in Intensification of Animal Production Dedicated to the 70th Anniversary of Invention.

Arranz, J., Lagriffoul, G., Guerin, I., Chemineau, P. 1995. Maitrise de la production spermatique des bkliers par des traitements associant la lumikre et l'utilisation de milatonine. *Rencontres Recherches Ruminant*. (2). 425-428.

Bucek, Milerski, M., Mareš, V., Konrád, R., Roubalová, M., Škaryd, V., Rucki, J., Hakl, P. 2017. Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2016. ČMSCH. Praha.

Candappa, I.B.R., Bartlewski, P. 2011. A Review of Advances in Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) in Sheep, with the Special Reference to Hormonal Induction of Cervical Dilation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. *The Open Reproductive Science Journal*. 3 (1). 162-175.

Bartlewski, P., Candappa, I. 2015. Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology*. 84 (9). 1594-1602.

Bucak, M., Sariözkan, S., Tuncer, P., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., Çevik, M. 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 89 (1). 24-30.

Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J., Mezzalira, A., Menchaca, A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 103. 30-35.

Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J. A., Chemineau, P., Keller, M. 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Animal Reproduction Science*. 168. 86-91.

Chemineau, P., Malpoux, B., Pelletier, J., Lebouef, B., Delgadillo, J., Deletang, F., Pobel, T., Brice, G. 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.* 9 (1). 45-60.

Chesneau, D., Guillaume, D., Chemineau, P., Malpoux, B. 2017. Continuous light after 2 months of long days stimulates ram testis volume and increases fertility in spring. *Animal*. 11 (07). 1189-1195.

Crilly, J., Söderquist, L., Holmström, A., Sargison, N. 2016. Proof of concept of ovine artificial insemination by vaginal deposition of frozen-thawed semen under UK sheep-farming conditions. *Veterinary Record*. 178 (21). 5321-532.

Čunát, L., Hegedúšová, Z., Vejnar, J., Štolc, L., Louda, F., Vejčík, A. 2013. Využití inseminace ovcí v chovatelské praxi: uplatněná certifikovaná metodika. Vyd. 1. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky. Praha. ISBN: 978-80-213-2428-2.

Dardente, H., Lomet, D., Robert, V., Decourt, C., Beltramo, M., Pellicer-Rubio, M. 2016. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*. 86 (1). 324-332.

David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P., Druart, X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. 161. 75-81.

Delgadillo, J. A., Flores, J. A., Véliz, F. G., Duarte, G., Vielma, J., Hernandez, H., Fernandez, I. G. 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reproduction Nutrition Development*. 46 (4). 391-400.

Delgadillo, J. A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P. A. R., Martin, G. B. 2009. The 'male effect' in sheep and goats—Revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research*. 200 (2). 304-314.

Delgadillo, J. A., Flores, J. A., Hernández, H., Poindron, P., Keller, M., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I. G., Chemineau, P. 2015. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Hormones and Behavior*. 69. 8-15.

Edmondson, M., Roberts, J., Baird, A., Bychawski, S., Pugh, D. 2012. *Theriogenology of Sheep and Goats*. Sheep and Goat Medicine. Elsevier. s. 150-230.

Faigl, V., Vass, N., Jávora, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., Cseh, S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 60 (1). 115-129.

Fair, S., Hanrahan, J. P., O'Meara, C. M., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M. P., Lonergan, P., Evans, A. C. O. 2005. Differences between Belclare and Suffolk



- ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 63 (7). 1995-2005.
- Fantová, M. a kolektiv. 2015. Chov koz. 4. vydání. ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz, z.s. vydalo nakladatelství Brázda, s.r.o. Praha. ISBN: 978-80-209-0410-2.
- FAO Assesements. 2015. FAO commission on genetic resources for food and agriculture.: The second report on the state of he world's animal genetic resources for food and agriculture. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/a-i4787e.pdf>
- Feranti, J., Brun, M., Zanella, E., Messina, S., Schuh, R., Santos, F., Brambatti, G. 2013. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65 (3). 687-693.
- Fierro, S., Olivera-Muzante, J. 2017. Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*. 180. 78-84.
- Foote, R. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science*. 80 (2). 1-10.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., Nasr-Esfahani, M. H. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73 (4). 480-487.
- Fukui, Y., Roberts, E. 1977. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*. 8 (2-3). 77-81.
- Fukui, Y., Kohno, H., Okabe, K., Katsuki, S., Yoshizawa, M., Togari, T., Watanabe, H. 2010. Factors Affecting the Fertility of Ewes after Intrauterine Insemination with Frozen-Thawed Semen During the Non-Breeding Season. *Journal of Reproduction and Development*. 56 (4). 460-466.
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M. C., Guzmán, J. L., Zarazaga, L. A. 2014. Role of body condition score and body weight in the control of seasonal reproduction in Blanca Andaluza goats. *Animal Reproduction Science*. 151 (3-4). 157-163.
- Gillan, L., Maxwell, M. 1998. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Vth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants.: J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54. 271-283.
- Gillan, L., Maxwell, W., Evans, G. 2004. *Reproduction, Fertility and Development*. 16 (4). 447-454.
- Gordon, I. 2004. *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Pub. Cambridge, MA. ISBN: 0851998623.

- Halbert, G., Dobson, H., Walton, J., Sharpe, P., Buckrell, B. 1990. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*. 33 (6). 1231-1243.
- Horák, F. a kolektiv. 2012. Chováme ovce. Vyd. v češtině 1. Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda. Praha. ISBN: 978-80-209-0390-7.
- Horta, A., Barbas, J., Marques, C., Baptista, M., Vasques, M., Pereira, R., Mascarenhas, R., Cavaco-Gonçalves, S. 2010. Improvement of Fertility in Artificially Inseminated Ewes Following Vaginal Treatment with Misoprostol Plus Terbutaline Sulphate. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (6). 412-416.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M., Bisbal, A., Fernández-Santos, M., Garde, J., Soler, A. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*. 132 (1-2). 88-95
- Jorre De St. Jorre, T., Hawken, P.A.R., Martin, G.B. 2014. New understanding of an old phenomenon: uncontrolled factors and misconceptions that cast a shadow over studies of the 'male effect' on reproduction in small ruminants. *Turkish Journal of Veterinarz and Animal Sciences*. 38. 625-636.
- Kukovics, S., Gyoker, E., Nemeth, T., Gergatz, E. 2011. Artificial Insemination of Sheep - Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level. Manafi, Milad (ed.), Milad Manafi. *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech. ISBN: 978-953-307-312-5.
- Louda, F. a kolektiv. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Vyd. 1. Česká zemědělská univerzita. Praha. ISBN: 80-213-0702-1.
- Louda F, Bezdíček, J. 2017. Příprava beranů na připouštěcí období, odběr spermatu a výroba inseminačních dávek. *Cattle Research*. 1: 39-49.
- Luther, J. 2008. Application of Laparoscopic Artificial Insemination Techniques to the North Dakota Sheep Industry. *Sheep Res. Rep.* . 24-26.
- Macías, A., Ferrer, L., Ramos, J., Lidón, I., Rebollar, R., Lacasta, D., Tejedor, M. 2017. Technical Note: A new device for cervical insemination of sheep – design and field test. *Journal of Animal Science*. 95 (12). 5263-5269.
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M. 2014. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*. 151 (3-4). 137-147.
- Maxwell, W., Watson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 55-65.
- McCappin, N., Murray, R. 2011. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. *Veterinary Record*. 168 (4). 99-99.

- Menchaca, A., Dos Santos Neto, P., Cuadro, F. 2017. Estrous synchronization treatments in sheep: Brief update. *Animal reproduction*. 41 (1). 340-344.
- Menchaca, A., Rubianes, E. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 16 (4). 403-413.
- Moses, D., Heras, M., Valcárcel, A., Pérez, L., Baldassarre, H. 1995. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*. 27 (1). 25-29.
- Nordstoga, A., 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. 2007. Techniques for Artificial Insemination of Goats. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier. 529-534.
- O'Hara, L., Hanrahan, J., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A., Lonergan, P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*. 73 (4). 541-549.
- O' Meara, C. M., Hanrahan, J. P., Prathalingam, N. S., Owen, J. S., Donovan, A., Fair, S., Ward, F., Wade, M., Evans, A. C. O., Lonergan, P. 2008. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 69 (4). 513-522.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Adnoy, T., Nordstoga, A., Andersen Berg, K. 2005. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Veterinary Record*. 156 (12). 372-375.
- Perkins, N., Hill, J., Pedrana, R. 1996. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. *Theriogenology*. 46 (3). 541-545.
- Quan, G., Wu, G., Wang, Y., Li, D., Ma, Y., Hong, Q. 2016. Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Ruminant Research*. 134. 14-21.
- Reece, W. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 1. české vyd. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Rehman, F. U., Qureshi, M. S., Wang, X. D. 2013. Semen Extenders and Artificial Insemination in Ruminants. *Veterinaria*. (1). 1-8.
- Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J. A. 2007. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *Journal of Animal Science*. 85 (5). 1257-1263.
- Robinson, T.J. 1973. Factors involved in the failure of sperm transport and survival in the female reproductive tract. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 18. 103-109.

- Rubianes, E., Menchaca, A., Carbajal, B. 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 $\alpha$ . *Animal Reproduction Science*. 78 (1-2). 47-55.
- Salamon, S., Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 77-111.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., Sharafi, M. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 68 (2). 276-280.
- Salmon, V., Leclerc, P., Bailey, J. 2017. Novel technical strategies to optimize cryopreservation of goat semen using cholesterol-loaded cyclodextrin. *Cryobiology*. 74. 19-24.
- Shipley, C.F.B., Buckrell, B.C., Mylne, M.J.A., Pollard, J., Hunton, J.R. 2007. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier. 629-641
- Silva-Meirelles, J., Castro, M., Bergstein, T., Ferrari, M., Dornbusch, P. 2017. Inseminação em ovelhas por videolaparoscopia por meio de acesso único: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69 (5). 1163-1166.
- Simões, J. 2015. Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 4 (2). 157-165.
- Slavova, P., Laleva, S., Popova, Y. 2015. Effect of body condition score and live weight of fertility of merino sheep after induction of oestrus in the out-of-breeding season. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 31 (2). 235-243.
- Stupka, R. a kolektiv. 2013. Chov zvířat. 2. vyd. Česká zemědělská univerzita. Praha. ISBN: 978-80-87415-66-5.
- Šichtař, J., Janošíková, M. 2017. Využití epididymálních spermií v asistované reprodukci koní. *Veterinářství*. 67 (2). 104-107.
- Šmerda, J. 1980. Reprodukce hospodářských zvířat I. SPN. Praha. 270 s.
- Tuncer, P., Bucak, M., Sariözkan, S., Sakin, F., Yeni, D., Çiğerci, İ., Ateşşahin, A., Avdatek, F., Gündoğan, M., Büyükleblebici, O. 2010. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*. 61 (1). 89-93.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Fantova, E., Quintín-Casorrán, F., Sevilla-Mur, E., Yániz, J. 2014. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Animal Reproduction Science*. 146 (1-2). 15-20.
- Wulster-Radcliffe, M., Wang, S., Lewis, G. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*. 62 (6). 990-1002.

Wusiman, A., Wang, Y., Ren, K., Zhou, G., Fu, X., Suo, L., Fan, Z., Wang, L., Zhu, S. 2012. Semen Storage at 23, 4 or -196°C and its Application to Artificial Insemination in Small-tail Han Sheep. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7 (4). 299-308.

## ELEKTRONICKÉ ZDROJE

Anonym 1: The sheep and goat sector in the EU: Main features, challenges and prospects [online]. EPRS: European Parliamentary Research Service. September 2017. [cit. 2018-03-30]. Dostupné z <[http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2017/608663/EPRS\\_BRI\(2017\)608663\\_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2017/608663/EPRS_BRI(2017)608663_EN.pdf)>.

Anonym 2: Dispositif Génétique Chiffres clés Ruminants 2017 [online]. France Génétique Elevage. Février 2018. [cit. 2018-03-30]. Dostupné z <[http://idele.fr/no\\_cache/recherche/publication/idelesolr/recommends/dispositif-genetique-chiffres-cles-ruminants-2017.html](http://idele.fr/no_cache/recherche/publication/idelesolr/recommends/dispositif-genetique-chiffres-cles-ruminants-2017.html)>.

Anonym 3: Laparoskopická inseminace [online]. Romanovská ovce.cz. 22. října 2017 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z <<https://www.romanovskaovce.cz/novinky/laparoskopicka-inseminace.html>>.

Bařina, V.: Reprodukce ovčí [online]. Náš chov. 22. ledna 2002. [cit. 2017-12-28]. Dostupné z <<http://naschov.cz/reprodukce-ovci/>>.

Blichfeldt, T., Lewis, R.: Sheep breeding in Norway [online]. The Norwegian Association of Sheep and Goat Breeders (NSG). 22. listopad 2015. [cit. 2018-04-05]. Dostupné z <<https://www.nationalsheep.org.uk/workspace/pdfs/blichfeldtthor22112015103318.pdf>>.

FAOSTAT Live Animals [online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. [cit. 2018-03-28]. Dostupné z <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>.

Fantová, M., Nohejlová, L.: Kdo bude pokračovatelem Libora Čunáta? [online]. Náš chov. 18. května 2015. [cit. 2018-04-05]. Dostupné z <<http://naschov.cz/kdo-bude-pokracovatelem-libora-cunata/>>.