

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci
spermatu u beranů plemene valašská ovce**

Bakalářská práce

Hana Lorencová

Chov hospodářských zvířat

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

Konzultant: Ing. Filipp G. Savvulidi, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u beranů plemene valašská ovce" 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 22.4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martinu Ptáčkovi Ph.D., za odbornou pomoc, trpělivost a vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Filippu Georgijeviči Savvulidimu, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné rady a konzultace v rámci této práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, blízkým, přátelům a spolužákům za podporu a motivaci během studia a při psaní této práce.

Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u beranů plemene valašská ovce

Souhrn

Bakalářská práce byla zaměřená na téma Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u beranů plemene valašská ovce. Cílem bakalářské práce bylo popsat využití moderních kryoprotektorů při konzervaci semene a navržení postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popř. zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

Valašská ovce je původní české hrubovlnné plemeno s trojstrannou užitkovostí (maso, vlna, mléko). Od roku 1999 je valašská ovce součástí genetických zdrojů České republiky. Proto je nezbytné pro záchranný program ochrany tohoto plemene vytvořit dostatečný reservoir inseminačních dávek od geneticky cenných jedinců v populaci.

Umělá inseminace je nejprogresivnější metodou pro moderní chov ovcí. Inseminaci lze provést čerstvým, chlazeným nebo mraženým spermatem. Jedinou možností pro dlouhodobé uchování inseminačních dávek je zmrazení spermií pomocí kapalného dusíku. Kryokonzervace spermatu berana je nejdůležitějším postupem při vývoji programu konzervace valašského plemene. I když se dnes příliš nepoužívá, především kvůli nízké kvalitě zmrazeného a rozmrazeného beraního spermatu. Důvodem je, že nejsou dostatečně ověřená ředidla pro malé přežvýkavce. Proto je důležité vytvářet modifikace stávajících ředidel, které zlepšují parametry zejména dlouhodobě konzervovaných dávek.

Ředidla používaná k ředění spermatu malých přežvýkavců byla vyvinuta k ochraně a udržení spermatu během zpracování a skladování. Kryoprotektory, které se přidávají do ředícího média, aby chránily buňku před kryo-poškozením, se dělí na intracelulární a extracelulární kryoprotektory. Nejčastěji používaným intracelulárním kryoprotektantem je glycerol. V této práci budou dále zmíněny také amidy, dimethylsulfoxid a extracelulární kryoprotektanty jako je vaječný žloutek, cukry, antioxidanty a vitamíny, antifreeze proteiny.

Na konci této práce byla připravena koordinovaná tabulka s moderními kryoprotektory a navrženy nejlepší kryoprotektory. Nejlepší kryoprotektory, který byly navrženy pro valašské berany jsou následující: glycerol dále thehalóza a vaječný žloutek. V rámci kryokonzervačního programu by měli být dále ověřeny a následně testovány u valašských ovcí.

Bakalářská práce může být přínosem pro chovatele valašských ovcí, kteří chtějí získat aktuální informace o kryoprotektorech používaných při konzervaci spermatu.

Klíčová slova: genová rezerva, inseminace ovcí, průtoková cytometrie, CASA, ředidlo

Modern cryoprotectors used for the ram semen preservation in Wallachian sheep

Summary

The bachelor thesis was focused on the topics of modern cryoprotectants used in the preservation of sperm in rams of the Wallachian sheep breed. The aim of the bachelor thesis was to describe the use of modern cryoprotectants in seed preservation and design procedures for optimizing the production of insemination doses, or improving success in subsequent insemination.

Wallachian sheep is an original Czech coarse wool breed with three-sided performance (meat, wool, milk). Since 1999 Wallachian sheep belongs to the genetic reserves of the Czech Republic. Therefore, it is essential to develop a conservation program for this breed.

Artificial insemination is the most progressive method for modern sheep breeding. Insemination can be performed with fresh, chilled or frozen semen. Sperm freezing with the use of the liquid nitrogen is the only option for the long-term preservation of insemination doses. Cryopreservation of ram sperm is the most important procedures in the development of Wallachian breed conservation program. Although it's not used as much these days, mainly due to the low quality of frozen and thawed lamb sperm. This is because diluents for small ruminants are not well tested. Therefore, it's important to create a modification of existing diluents, which especially improve the parameters of long-term preserved doses.

Diluents used to dilute small ruminant semen have been developed to protect and maintain sperm during processing and storage. Cryoprotectors, which are added to the dilution medium to protect the cell from cryo-damage, are divided into intracellular and extracellular cryoprotectants. The most commonly used intracellular cryoprotectant is glycerol. Amides, dimethyl sulfoxide and extracellular cryoprotectants such as egg yolk, sugars, antioxidants, vitamins, antifreeze-proteins will also be mentioned in this work.

At the end of this work, a coordinated table with modern cryoprotectors was prepared and the best cryoprotectors were designed. The best cryoprotectors that have been designed for the Wallachian ram are as follows: glycerol, thehalose and egg yolk. As part of the cryopreservation program, they should be further verified and subsequently tested in Wallachian sheep.

The bachelor thesis can be a benefit for Wallachian sheep breeders who wants to get current information about cryoprotectors used in sperm conservation.

Keywords: gene reserve, insemination of sheep, flow cytometry, CASA, thinner

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární přehled	10
3.1	Charakteristika plemene	10
3.2	Stručný historický vývoj plemene	11
3.3	Program uchování genových rezerv	11
3.4	Mléčná užitkovost	12
3.5	Vlna	12
3.6	Maso	13
3.7	Inseminace ovcí	13
3.7.1	Výběr a příprava ovcí na inseminaci	14
3.7.2	Intravaginální inseminace	14
3.7.3	Cervikální inseminace	15
3.7.4	Laparoskopická inseminace	16
3.8	Sperma	17
3.8.1	Spermie	17
3.8.2	Semenná plazma	17
3.8.3	Požadavky na čerstvý beraní ejakulát	18
3.8.4	Faktory ovlivňující parametry spermatu	19
3.8.4.1	Sezónnost	19
3.8.4.2	Věk	19
3.8.4.3	Zdravotní stav	19
3.8.4.4	Tělesná kondice	20
3.8.4.5	Dědičnost	20
3.9	Rozdíl mezi umělou vagínou a elektroejakulací	20
3.10	Hodnocení spermatu	21
3.10.1	Makroskopické hodnocení spermatu	21
3.10.2	Mikroskopické hodnocení spermatu	22
3.10.3	Tepelný test přežitelnosti	22
3.10.4	CASA (Computer assisted sperm analysis)	23
3.10.5	Hodnocení spermatu pomocí průtokové cytometrie	24
3.10.5.1	Průtoková cytometrie a její princip	24
3.10.6	Fluorescenční mikroskopie	25
3.11	Krátkodobá konzervace beraního spermatu	26

3.11.1	Ředidla.....	26
3.11.2	Stanovení stupně ředění	26
3.11.3	Zpracování spermatu.....	27
3.12	Dlouhodobá konzervace beraního spermatu	27
3.12.1	Plnění do pejet/pelet	27
3.12.2	Zpracování spermatu.....	28
3.13	Ředidla a jejich složení	29
3.13.1	Komerčně dostupné extensity spermatu pro beranní spermie.....	29
3.14	Kryoprotektory	30
3.14.1	Intracelulární kryoprotektiva	30
3.14.1.1	Glycerol.....	30
3.14.1.2	Amidy.....	31
3.14.1.3	Dimethylsulfoxid.....	31
3.14.2	Extracelulární kryoprotektiva	31
3.14.2.1	Vaječný žloutek, sojový lecitin.....	32
3.14.2.2	Odstředěné mléko	32
3.14.2.3	Cukry.....	32
3.14.2.4	Antioxidanty	33
3.14.2.5	Aminokyseliny.....	34
3.14.2.6	Vitamíny.....	34
3.14.2.7	Antifreeze proteiny (AFP)	35
3.14.2.8	Syntetické inhibitory ledových krystalů.....	36
3.14.3	Moderní kryoprotektory a fertilizační schopnost kryokonzervovaných spermií	37
4	Závěr	39
5	Seznam literatury	40
6	Seznam obrázků	50
7	Seznam tabulek	51

1 Úvod

Ovce byly domestikovány před více než 10 000 let a stále se těší velké oblibě po celém světě. Díky jejich chovu může člověk využívat jejich produkty, jako je například maso, mléko, vlna, nebo kůže. Pro naši zemi jsou typická 2 plemena Šumavská ovce a Valašská ovce. Valašská ovce je hrubovlné plemeno s trojstrannou užitkovostí, která je na našem území chována již od 14 století a byla zařazena do genových zdrojů České republiky.

V chovech ovcí se využívá spíše přirozená plemenitba a umělá inseminace v tomto odvětví není dostatečně optimalizována. Největší prostor pro zdokonalování je zřejmě v konzervaci spermatu, a proto je důležité používat kvalitní ředidla a kryoprotektory, které chrání buňky před poškozením. Nejčastějším kryoprotektorem, který se používá je glycerol.

2 Cíl práce

Důležitým bodem záchranného programu původních valašských ovcí je vytvoření dostatečného reservoáru kvalitních inseminačních dávek dlouhodobě uchovávaných v tekutém dusíku. Obecně je známo, že sperma u malých přežvýkavců má nízkou toleranci vůči konzervaci. Proto všechny informace, které vedou ke zlepšení kryokonzervace, jsou důležité s ohledem na záchranu původního českého plemene ovcí. Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků tématicky zaměřených na využití moderních kryoprotektorů při konzervaci semene. Dalším cílem bakalářské práce bude navržení možných postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popř. zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika plemene

Valašská ovce je původní české hrubovlnné plemeno s trojstrannou užitkovostí (maso, vlna, mléko), přizpůsobené horským podmínkám a salašnickému způsobu chovu. Plemeno je zařazeno do genových zdrojů ohrožených druhů zvířat v ČR. Řadí se do skupiny cápových ovcí chovaných v oblasti karpát a na Balkáně (Horák et.al 2012). Plemeno je menšího až středního tělesného rámce charakteristické výbornou chodivostí, konstituční pevností a pastevní schopností (Milerski, 2016). Vyznačuje se dlouhověkostí, nenáročností a přizpůsobivostí k extrémním klimatickým podmínkám. Horák et al. (2012) uvádějí živou hmotnost beranů 45-55 kg, u bahnic 35-40 kg. Hlava je klínovitá, u beranů mírně klabonosá, v čele úzká (Horák & Treznerová, 2010). Uši jsou poměrně krátké, rohatost se vyskytuje u obou pohlaví, rohy jsou šroubovitě, přímé nebo lyrovitého tvaru. Krk má valaška delší, hrud' úzkou a mírně klenutou, hřbet rovný a úzký, zad' je mírně sražená a pánev široká (Horák et.al 2012). Končetiny jsou suché s pravidelným postojem, středně dlouhé s pevnou spěnkou, pevné paznehty (Horák & Treznerová, 2010). Smíšená hrubá vlna s charakterem splývavosti. Charakteristickým znakem je rouno s krátkou a jemnou podsadou s hrubými a dlouhými pesíky. Pesíky jsou málo pružné a hrubé. Průměr nejhrubších pesíků dosahuje až 150 µm (sortiment F). Podsada je velmi jemná 10-30 µm. Pesíky spolu s podsadou tvoří charakteristické, mírně zvlněné pramínky, které dosahují při jedné stříži ročně délky 30-40 cm. Rouno je splývavé (Milerski, 2016). Valašské ovce mají nejednotné zbarvení. V minulosti se vyskytovali černé a pigmentované, v současnosti převažuje bílé zbarvení, strakaté, šedé a ojediněle černé (Horák et.al 2012). Valaška se řadí mezi pozdní plemena s výraznou sezonní pohlavní aktivitou. Jehnice se poprvé zapouští ve věku 16.-18. měsíci, a to v době, kdy dosáhne minimální hmotnosti 32 kg. Plodnost na obahněnou bahnici se pohybuje v rozmezí 130-160 % s průměrem kolem 150 %. Produkce mléka za laktaci je uváděna v rozmezí od 60 do 130 litrů (Horák & Treznerová, 2010). V následující tabulce je uvedený chovný cíl valašské ovce dle Milerski, 2016.

Tabulka 1 Chovný cíl valašské ovce (Milerski, 2016)

Plodnost na obahn. %	Odchov do 14 dnů %	Živá hmotnost v kg jehňat ve 100 dnech		Věk v měsících pro zařazení do plemen.		Živá hmot. v kg pro zařazení do plemen.	
		beránci	jehničky	berani	Jehnice	berani	jehnice
150	140	22	20	10-12	10-12	38	33

3.2 Stručný historický vývoj plemene

Valašské ovce se na území ČR dostaly v 14. století spolu s valašskou kolonizací Karpat. Během 15.-16. století se rozšířily do Beskyd a Slezska. Postup Valachů na západ ustál. Posun valašského chovu za pravý břeh řeky Moravy proběhl v 18. století založením několika salaší v Chříbech. Na přelomu 40-50. let minulého století začal proces zušlechťování valašských ovcí. Tento proces byl ukončen v roce 1982 uznáním plemene zušlechtěná valaška na Slovensku (Milerski, 2016). V roce 2010 byl uznán první šlechtitelský chov původní valašky u Ing. Jana Vejčíka v Dlouhé Stropnici v době uznávání bylo 104 čistokrevných bahnic ve stádě (Horák et.al 2012). Na obrázku č.1 můžeme vidět berana valašské ovce (osobní archiv).



Obrázek 1 Valašský beran (osobní archiv)

3.3 Program uchování genových rezerv

Program ochrany genofondu původních plemen se datuje od roku 1994. Zájemci o chov plemen zařazených do Národního programu musí dodržet různá kritéria jako je technologie, ustájení a výživa musí odpovídat požadavkům na plnou realizaci a manifestaci genofondu. Tento program je dotován státem. Do národního programu jsou zahrnuta plemena skotu, koz, ovcí, koní, prasat, drůbeže a králíků. Mezi plemena ovcí patří šumavka a valaška (Němeček, n.d.). V roce 1999 byla valašská ovce zařazena do programu genových rezerv České republiky. Důvody uchování valašských ovcí jsou zejména jejich jedinečný původ a vlastnosti. Svaz chovatelů ovcí a koz v České republice SCHOK je pověřen vést plemenné knihy a centrální databázy (Milerski, 2016). Zvířata, které chceme zaevidovat jako genetický zdroj je potřeba přihlížet zejména na odpovídající exteriér a k jejich vzájemné příbuznosti. Pro uchování se používá kryokonzervace. Cíl je uchování cca 1000-1500 inseminačních dávek a 100–150

zmrazených zárodků. Tyto údaje dávají velkou pravděpodobnost obnovení chovu valašských ovcí i v případě jejího úplného zániku (Milerski, 2016). V tabulce č. 2 je uveden vývoj početných stavů genetických zdrojů valašské ovce.

Tabulka 2 Vývoj početných stavů populace genetického zdroje valašských ovcí (Němeček, 2020).

Rok	2007	2009	2011	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Počet zvířat	218	301	493	564	803	900	978	988	1059	952
Počet chovů	17	21	32	30	50	53	51	50	51	52

3.4 Mléčná užitkovost

Ovčí mléko je jednou z funkčně aktivních mléčných potravin a je považováno za výživový zdroj (Mohapatra et al., 2019). Mléko se skládá z vody a sušiny. Hlavními složkami sušiny jsou bílkoviny, minerální látky, mléčný tuk a laktóza. Obsahuje také vitamíny a enzymy. Ovčí mléko v porovnání s mlékem kravským má dvojnásobný obsah tuku a vyšší obsah bílkovin asi o 75 %, nepatrně vyšší obsah minerálních látek a přibližně stejný obsah laktózy (Ondruch, n.d.). Dojivost ovcí je ovlivněna řadou faktorů (výživa, plemeno, zdravotní stav atd.). Chuť ovčího mléka je lehce nasládlá, oproti kravskému mléku je charakteristicky bohatší a krémovější (Horák et al. 2012). Horák & Treznerová (2010) udávají produkci mléka valašské ovce 60-130 litrů za laktaci (využití mléka i k výrobě sýrů). Obvyklá laktace trvá 200 dní. Raynal-Ljutovac et al. (2008) uvádějí složení ovčího mléka, které je prezentováno v tabulce č. 3.

Tabulka 3 Složení ovčího mléka (Raynal-Ljutovac et al. 2008)

	Celkový obsah pevných látek (%)	Tuky (%)	Bílkoviny (%)	Kasein (%)	Laktóza (%)
Průměr	18,1	6,82	5,59	4,23	4,88
Min.	14,4	3,60	4,75	3,72	4,11
Max.	20,7	9,97	7,20	5,01	5,51

3.5 Vlna

Vlna je textilní surovina se specifickými vlastnostmi (Horák et al. 2012). Kvalita vlny se vyhodnocuje rutinním hodnocením, které zahrnují střední průměr vlákna, základní vlastnosti, variační koeficient, faktor pohodlí, jemnost odstředění, charakteristiku stříže, jemnost, zakřivení vláken a čistý výtazek rouna (Holman & Malau-Aduli, 2012). Ovčí vlna je výsledkem určitých biochemických procesů ovlivněných genetickými faktory a stravou, která se odráží v růstu vlny, množství a kvalitě potravy (Erlac et al., n.d.). Patkowska-Sokoła et al., (2009) analyzoval chemické složení ovčí vlny od ovcí z Polska, Sýrie a Řecka. Složení ovčí vlny bylo následující. Mikroprvky: Al, Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Sr, Ti, Zn, a těžké kovy: As, Cd, Hg,

Pb.Makroprvky: Ca, P, Na, K, Mg, S. Valašská ovce se řadí mezi hrubovlnná plemena. Vlna dosahuje délky 20 cm a je splývavého charakteru s vysokým podílem mrtvých vlasů. Vlna ovcí se často používá jako izolační materiál (Horák & Treznerová, 2010). Roční stříž potní vlny beranů je 2,0-3,0 kg, bahnic 1,5-2,0 kg. Horák et.al (2012) uvádí výtěžnost vlny 65 až 70 %.

3.6 Maso

Ovčí maso se řadí k celosvětově důležité komoditě. Složení masa a nutriční hodnoty jsou bohaté na vitamíny, esenciální polynenasycených mastných kyselin a minerálů (Ponnampalam et al., 2016) Jehněčí maso je považováno za dobře stravitelné, výživné, dietické a poměrně bohaté na bílkoviny. Maso ovcí se vyznačuje vysokou vláknitostí, křehkostí a šťavnatostí. Zbarvení ovčího masa se mění od růžové až po sytě červené. Barva masa závisí na věku jedince při porážce a na výživě. Ovčí a jehněčí maso je charakteristické svojí vůní a chutí (Horák et.al 2012). Existuje mnoho faktorů ovlivňujících kvalitu masa. Tyto faktory můžeme rozdělit na vnitřní (věk, plemeno, pohlaví, geny atd.) a na vnější (počasí, výživa, postupy při porážce atd.). Jednu z nejdůležitějších rolí zde má výživa (de Lima Júnior et al., 2016) Horák et al. (2012) uvádí denní přírůstek v odchovu 180-220 g. Cena ovčího masa se v roce 2019 se pohybuje okolo 45 Kč za kg v případě jatečných jehňat. U jatečných ovcí je cena výrazně nižší, 15 Kč za kg (Bucek Pavel & Škaryd, 2020). Ceny jehňat a ovcí viz tabulka č.4.

Tabulka 4 Ceny jehňat a ovcí ve třídě A (Kč/kg ž.hm) (Bucek et al. 2019)

Rok	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Jatečná jehňata	43	46	47	48	45	46	47	45	45
Jatečné ovce	16	17	17	18	18	17	18	17	15

3.7 Inseminace ovcí

V chovu ovcí se využívají dvě metody inseminace umělá a přirozená (Bancheva et al., 2021). Umělá inseminace je nejprogresivnější metodou plemenitby. Horák et.al (2012) uvádí, že při přirozené plemenitbě může beran připustit 50-80 bahnic ročně. Při umělé inseminaci je možné inseminovat 500-600 ovcí (Horák et.al 2012).

Základním postupem pro vývoj programů při konzervaci spermatu je umělá inseminace. Umělá inseminace se provádí spíše v zahraničí, kde je dosaženo lepších poznatků v tomto oboru. U nás se umělá inseminace v chovu ovcí běžně neprovádí kvůli specifickým problémům, které jsou většinou spojeny se snížením počtem chovaných ovcí a koz, nedostatečnou synchronizací říje, obtížnou detekcí doby ovulace ve velkých stádech a s technikou aplikace spermatu (Alvarez et al., 2019). Odběr semene se provádí pomocí umělé vagíny. Odebrané sperma se posuzuje makroskopicky i mikroskopicky (Horák et.al 2012). Objem inseminátu a počet pohyblivých spermií se liší v závislosti na druhu umělé inseminace (vaginální, cervikální, transcervikální intrauterinní, laparoskopické intrauterinní) a v jakém stavu je uchováno sperma (čerstvé, tekuté, zmrazené) (Macías et al., 2020). Při umělé inseminaci u malých přežvýkavců se nejčastěji používá čerstvé sperma, jelikož zmrazené sperma má obvykle

nižší míry oplození (Jiménez-Rabadán et al., 2016). Nejdůležitější předností umělé inseminace, je pomoc při zachování genetické rozmanitosti původních plemen a druhů (Lv et al., 2019).

3.7.1 Výběr a příprava ovcí na inseminaci

Reprodukční cyklus u ovcí a beranů je možno rozdělit na období pohlavního klidu – anestrů, který je ovlivňován ročním obdobím. Berani jsou plodní celý rok, mají celoroční spermioogenezi. V průběhu roku se však mění množství a kvalita semene. Na podzim je semeno beranů nejkvalitnější, což se musí respektovat při inseminaci zmrazeným spermatem (Horák, 1999). Tvorba spermatu beranů trvá 6-8 týdnů, proto je nezbytné před touto dobou ukončit přípravu beranů na připouštění. Berani se kontrolují a ošetřují se jim paznehty. Horák, (2012) uvádí, že kondice by se měla pohybovat okolo 4 bodů. Pro inseminaci se můžou používat pouze zdraví a plemenářsky hodnotní berani. Plemenářské vlastnosti mají být podstatně lepší než stádo ovcí, do kterého byli přiděleni. Mladí berani se zařazují do umělé inseminace až tehdy, když jsou známy vlastnosti jejich potomstva a výsledky plodnosti. Pohlavní aktivitu a vlastnosti ejakulátu může do značné míry ovlivňovat venkovní prostředí, hlavně soubor výživových a meteorologických faktorů. (Gamčík, Kozumplík a kol., 1984).

Ovce se řadí mezi polyestrická zvířata s různorodou pohlavní sezónností. Jejich pohlavní cyklus je ovlivňován délkou světelného dne, výživou a plemenem. V našich podmínkách říje u ovcí nastupuje kolem 60–120 dne po letním slunovratu. Říje u ovcí trvá zpravidla 20–48 hodin. K ovulaci u ovcí většinou dochází 24 až 36 hodin po říji a při němž se uvolní 1–4 vajíčka. Říje se opakuje za 16–23 dnů, jestliže samice nezabřežne (Rysová Lucie, 2017). Ovce by měli být v době připouštění ideálně v kondici 3 body. Detekce ovcí prubíří. Prubíř je beran, který vyhledává říji ve stádě nejčastěji se používají vazektomovaný berani, tj. beran, který má přerušené chámovody (Horák et.al 2012). Také se využívá beranního efektu, kterému by měla být bahnice vystaveny 14 dnů před začátkem připouštění. Berani produkují feromony, které spouštějí sexuální aktivitu bahnic. Pro zvolení správné doby umělé inseminace se hodnotí barva poševního hleny a stav děložního krčku. Nejoptimálnější je doba, kdy hlen poševní vytéká čirý, nebo mírně zakalený a děložní krček je otevřen. (Staněk, 2009).

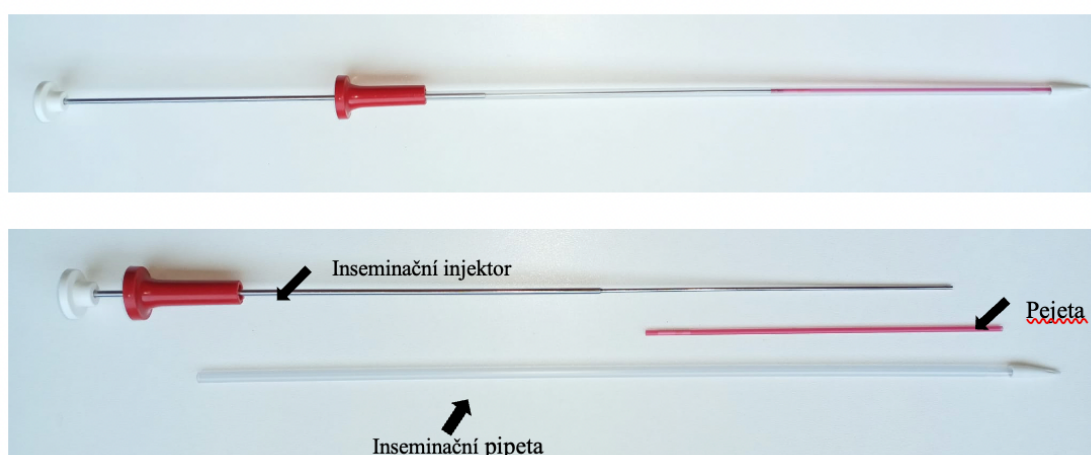
3.7.2 Intravaginální inseminace

Intravaginální inseminaci je možné provádět s čerstvým, nebo chlazeným spermatem není vhodné použití mraženého spermatu (Faigl a kol., 2011). Při této metodě se inseminační dávka vpravuje do horní části poševní klenby. Pipetu zavádíme mírně zvednutou a dáváme přitom pozor, aby nedošlo k zasunutí pepity do močové trubice (Staněk, 2009). Pro vaginální inseminaci se využívá katetr. V intravaginální inseminaci se používá objem a počet pohyblivých spermií v rozmezí od 0,3 do 0,5 ml a počet pohyblivých spermií je 300 až 400 x 10⁶ (Macías et al., 2020). Vaginální inseminace je rychlá a lze ji provést i v polních podmínkách (Faigl a kol., 2011). Masoudi et al., (2017) ve svém výzkumu zkoumá míru zabřezávání při vaginální inseminaci. Sperma bylo odebráno pomocí umělé vagíny a naředěno s extenderem 1:1. Inseminovalo se čerstvým spermatem. Bylo inseminováno 150 ovcí. Výsledky vykazovali 62% úspěšnost míry zabřeznutí. Roostaei-Ali Mehr et al., (2013) ve svém

výzkumu také zkoumal úspěšnost intravaginální inseminací. V jeho experimentu bylo 206 ovcí inseminováno pomocí tekutého spermatu odebraného od 7 beranů. Ejakulát byl spojen a rozdělen na dvě stejné části následně byl zředěn s extenderem na bázi mléka a Tris-glukózou obsahující 0,3125 % kyseliny kapronové. Ejakuláty z prvního odběru byly ochlazeny na 5 °C během 2 hodin, inkubovány 52 hodin při 5 °C a inseminovány. Z druhého odběru byly ejakuláty naředěny a ihned inseminovány. Výsledky ukázaly značné rozdíly ve srovnání počtu jehňat. Vyšší procenta vykazovali výsledky, který byly inkubovány 52 hodin 69,6 % ve srovnání s ihned inseminovanou dávkou, která měla menší procenta a to 46,15 %. Na závěr můžeme říct, že přidání kyseliny kapronové k Tris-glukóze je užitečné pro sperma beranů, pokud je sperma inkubováno po dobu 52 hodin při 5 °C.

3.7.3 Cervikální inseminace

Cervikální inseminace by měla být provedena do 24 hodin od odběru spermatu, aby se dosáhlo přijatelné míry březosti. Kvůli zvláštní anatomii ovčího cervikálního kanálu je omezený objem inseminátu (Cseh et al., 2012). Děložní čípek je lokalizován pomocí zrcátka vybaveného světelným zdrojem a sperma je uloženo do prvního záhybu děložního čípku (Schoenian, 2019). V cervikální inseminaci se nejčastěji využívá kombinace chlazeného a čerstvého spermatu. Doporučený objem a počet pohyblivých spermií pro chlazené sperma je 0,2 ml a 400×10^6 (Macías et al., 2020). Gil et al., (2003) ve svém výzkumu zkoumal úspěšnost cervikální inseminace. V tomto výzkumu byl použit extender Bioexcell v konečné koncentraci 1600×10^6 spermií /ml. Výsledky plodnosti vykazovali z 970 uměle inseminovaných se 335 nevrátilo do říje 21 dní po inseminaci dalších 327 ovcí se nevrátilo do říje 36 dní po inseminaci. Z posledně jmenovaných ovcí bylo 262 diagnostikováno jako březí pomocí ultrasonografie 50 dní po inseminaci poslední ovce. Na obrázku č. 2 můžeme vidět pipetu pro cervikální inseminaci ovcí, která se skládá z inseminační pipety, pejety a inseminačního injektoru (osobní archiv).



Obrázek 2 Pipeta pro cervikální inseminaci ovcí, systém MiniTub GmbH (osobní archiv)

3.7.4 Laparoskopická inseminace

Laparoskopická inseminace je nitroděložní metoda používaná u malých přežvýkavců. Rozvoj laparoskopické inseminace je nejvýznamnějším vývojem v umělé inseminaci ovcí v posledních letech. Inseminace může být spojena s komplikacemi v důsledku nedostatečné přípravy, špatné techniky nebo selhání vybavení (Swanand, 2018). Tato metoda vyžaduje chirurgickou zručnost. Laparoskopickou inseminaci je doporučeno provádět pod mírnou sedací, protože celková délka výkonu trvá zhruba 10-15 minut i s přípravou. Po ukončení inseminace je žádoucí, aby ošetřená plemence byla schopna sama odejít a okamžitě přijímat potravu. Při zákroku může dojít k ruptuře břišních orgánů, krvácení dělohy, hematomu. Při inseminaci dochází k uložení spermatu přes stěnu břišní, přímo do děložních rohů (Sathe, 2018). Požadovaný objem inseminovaných spermií je 0,05 ml a 20-25 milionů aktivních spermií. Vhodně naředěný ejakulát lze použít k inseminaci až 50 ovcí. Úspěch inseminace se pohybuje okolo od 60 % do 80 % a závisí na správné synchronizaci říje, výběru ovce a znalosti reprodukční fyziologie (Cseh et al., 2012). Pro laparoskopickou inseminaci jsou vhodné mladé, zdravé ovce s odpovídající tělesnou kondicí. Příprava zvířat na synchronizaci říje začíná několik týdnů před skutečným datem zákroku. Jedná se o očkování, odčervení a zvýšení roviny výživy k dosažení ideální kondice (Swanand, 2018). Masoudi et al., (2017) ve svém výzkumu zkoumal účinnost laparoskopické inseminace. Sperma bylo odebráno pomocí umělé vagíny od beranů plemene Zandi. Ejakulát byl zředěn s extenderem Tris, frukózou a kyselinou citronovou v koncentraci 1:1. Výsledky vykazovali míru zabřezávání o 62 % lepší než třeba u metody vaginální, kde byl použit stejný extender a koncentrace. Laparoskopická inseminace je zobrazena na obrázku č.3 (Swanand, 2018).



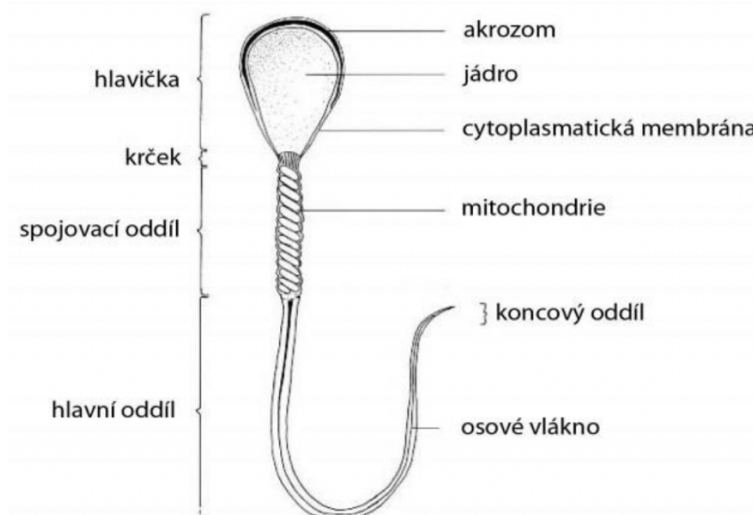
Obrázek 3 Laparoskopická inseminace (Swanand, 2018)

3.8 Sperma

Semeno neboli sperma či ejakulát se skládá z buněčné části spermii a z tekuté části čili semenné plazmy (Juyena & Stelletta, 2012). Má druhově specifickou barvu, konzistenci a pach. Množství vyloučené při ejakulaci se také druhotně liší. Přežvýkavci se vyznačují malým objemem ejakulátu a s velkou koncentrací spermii. Základní hodnoty ejakulátu jsou ovlivňovány mnoha zevními i vnitřními faktory jako je roční období, věk, výživa, ustájení a zdravotní stav (Marvan et al., 2011).

3.8.1 Spermie

Spermie jsou konečným produktem spermatogeneze. Spermie vzniká v semenotvorných kanálcích varlat. Spermatogeneze můžeme rozdělit do tří fází. První fáze zahrnuje poliferaci. Druhá fáze se nazývá meióza, při níž dochází ke vzniku spermatid. Poslední fáze se označuje jako diferenciaci, při které vznikají spermie (Plant & Zeleznik, 2014). Spermie se skládá ze dvou hlavních částí, bičíku a hlavičky. Většina spermii v ejakulátu nikdy nedosáhne vejcovodu. Pouze několik desítek spermii se přiblíží k vajíčku a pouze jedna se nakonec účastní oplození. Semeno odebrané pro umělou inseminaci je ředěno tak, aby byl získán větší počet inseminačních dávek. Počet spermii pro inseminaci je druhotně odlišný, ale blíží se 125 milionům u ovcí, 10 milionům u skotu a 2 miliardám u prasat a koní (Reece, 2011). Popis spermie je vyobrazen na obrázku č.4 podle (Morel,2003).



Obrázek 4 Popis spermie (Morel, 2003)

3.8.2 Semenná plazma

Semenná plazma tvoří svým objemem hlavní podíl ejakulátu u berana a kozla to je 70-75 % (Marvan et al., 2011). Semenná plazma je tekutá část a zprostředkovává chemickou funkci ejakulátu. Její pH je druhotně rozdílné u beranů je mírně kyselé. K objemu ejakulátu nejvíce přispívají přidatné pohlavní žlázy známé jako semenné váčky, bulbouretrální žlázy a prostata.

Sekrece semenných váčků tvoří u většiny přežvýkavců hlavní část semenné plazmy (Juyena & Stelletta, 2012). Semenná plazma vytváří v samičím pohlavním ústrojí vhodné prostředí pro přežití spermií. Je bohatá na elektrolyty, fruktózu, kyselinu askorbovou a další vitamíny. U jednotlivých druhů zvířat se složení semenné plazmy liší (Reece, 2011). Mezi složky semenné plazmy patří organické sloučeniny (peptidy, kyselina citronová, lipidy, aminokyseliny, hormony a cytokiny), ionty (sodné, vápenaté, draselné, hořečnaté a další.) a energetické sloučeniny jako je fruktóza a sorbitol. Semenné plazma také obsahuje dusíkaté látky jako je močovina, kyselina močová nebo amoniak (Juyena & Stelletta, 2012). V tabulce č.5 je uvedeno složení semenné plazmy podle (Juyena & Stelletta, 2011).

Tabulka 5 Složení semenné plazmy u berana (Juyena & Stelletta, 2011)

Složka	Beran
Fruktóza (mg/dl)	150-600
Glukóza (mg/dl)	0,9-1,6
Kyselina citronová (mg/dl)	110-260
Proteiny (mg/dl)	2,30-2,50
Lipidy (mg/dl)	254-396
Fosfolipidy (mg/dl)	/
Kyselina glutamová (mg/dl)	4,5-5,2
Na (mg/dl)	120-258

3.8.3 Požadavky na čerstvý beraní ejakulát

Ejakulát berana nesmí obsahovat žádné cizí příměsy, patogenní mikroorganismy, plísňe ani shluky spermií. Vzhled ejakulátu je bělavý, smetanovitá tekutina. Marvan et al., (2011) udává průměrný objem ejakulátu 1ml a koncentrace 2×10^6 v 1 mm^3 . Z jednoho ejakulátu se průměrně připraví deset inseminačních dávek (Horák et.al 2012). Tabulka č.6 odkazuje na složení ejakulátu u beranů (Louda et.al.2009).

Tabulka 6 Požadavky na čerstvý beraní ejakulát (Louda et al. 2009)

Konzistence	Zrnitá
Objem	$0,5 \text{ cm}^3$
Barva	Bělavá, šedá
Pach	Nevýrazný
Koncentrace v 1 mm^3	2×10^6
Aktivita	Minimálně 70 %
Patologické spermie	Maximálně 15 %
Nezralé spermie	Do 2 %
pH	6,2-6,9

3.8.4 Faktory ovlivňující parametry spermatu

3.8.4.1 Sezónnost

Berani, kteří žijí v mírných zeměpisných šířkách (40–50°) vykazují nepřetržitý proces spermiogeneze. Sexuální chování se mění se změnami hmotnosti varlat s vrcholem v létě-podzim a poklesem na jaře. Plemena ovcí a koz, které pocházejí z tropických oblastí (10-30°) vykazují malou nebo žádnou sezónnost (Avdi et al., 2004). Berani a kozli vykazují nejvyšší sexuální aktivitu na podzim, se zkracujícími se světelnými dny, během období rozmnožování (Hafez & Hafez, 2000). Fotoperiodické signály nebo způsob, jakým jsou tyto signály přenášeny ke vzniku sezónních reprodukčních změn, se mezi plemeny liší. Takový rozdíl je spojen s genetickými charakteristikami souvisejícími se zeměpisnou šířkou původu. Sezónní změny v hormonálních hladinách fungují jako klíčové regulátory spermatogeneze. Velikost varlat a sekrece testosteronu vykazuje maximálního vrcholu krátce po letním slunovratu, které jsou následovány periferními reakcemi, jako je sexuální a agresivní chování (Milczewski et al., 2015).

3.8.4.2 Věk

Beran, od kterého je získáván ejakulát, musí být v chovné dospělosti. Je to věk vhodný k zařazení zvířat do chovu. Raná plemena se zařazují do chovu v 8-10 měsících, ostatní ve 12-18 měsících. Jedince by se měli zařadit do chovu až při dosažení 70-75 % hmotnosti (Horák, 2012). Postpubertálním obdobím produkce spermií u beranů má nízkou kvalitu, ale výrazně se zlepšuje během několika měsíců (Osinowo et al., 1988). Ntemka et al., (2019) ve svém výzkumu rozdělil do dvou věkových skupin tři berany ve věku 2-6 let a čtyři ve věku 9-13 let. Výsledkem je, že berani do 13 let měli výbornou motilitu a životaschopnost spermií. Uvedl, že berani si dokážou uchovat vysokou kvalitu spermatu, až do věku 13 let dostupnou pro umělou inseminaci.

3.8.4.3 Zdravotní stav

V chovu ovcí je důležitá plodnost beranů, která je výrazně ovlivněna faktory životního prostředí. Pro efektivitu reprodukce je důležité správné vedení beranů před i během období rozmnožování (Hitit et al., 2021). Nejčastějším patogenem pohlavního systému samců s celosvětovým rozšířením je *Brucella ovis*. *Brucella ovis* způsobuje různé problémy (hlavně epididymitidu), která vede k reprodukčnímu selhání (Gouletsou & Fthenakis, 2015).

Některé viry mohou být také původci onemocnění varlat. Infekce virem ovčích neštovic může vést k modulární orchitidě s přítomností světlých, diskrétních subkapsulárních ložisek na povrchu varlat (Gouletsou & Fthenakis, 2015). Carrera-Chávez et al., (2016) ve svém výzkumu zkoumal kvalitu spermií u přirozeně infikovaných beranů s *brucella ovis*. Výsledky této studie naznačovali významné ovlivnění kvality spermatu, pohyblivost, sníženou koncentraci spermií a zvýšené abnormality u pozitivních beranů na *brucella ovis*.

3.8.4.4 Tělesná kondice

Hodnocení tělesného stavu se udává na stupnici 1-5 (Horák et.al 2012). V období rozmnožování by měla u beranů být kondice okolo 3,5-4,0. Musíme dbát na to, aby berani nadměrně neztloustli, protože berani s vyšší kondicí nad 4 mají snížené libido. Akumulace tuku v šourku ohrožuje termoregulaci ve varlatech, čímž snižuje kvalitu spermií (Gouletsou & Fthenakis, 2015). Maurya et al., (2010), ve své studii zkoumal vliv bodování tělesného stavu na reprodukční účinnost beranů Malpura. Bylo studováno sexuální chování, měření šourku, vlastnosti spermatu a endokrinní reakce. Berani byli rozdělení do tří skupin. V první skupině byli berani s tělesnou kondicí 2,5 ve druhé skupině s kondicí 3 a ve třetí skupině s kondicí 4body. Studie byla prováděna po dobu 45 dnů a po celou dobu beranům bylo přidávána koncentrovaná směs a pastva. Nejlepší reprodukční výsledky vykazovala skupina s tělesnou kondicí 3.

3.8.4.5 Dědičnost

Berani by měli být vyšetřeni, aby se ověřilo, zda jsou dobře vyvinutí pro své plemeno a věk. Musí být bez zjevných fyzických vad. Důležité je zajistit, aby nepřenesli dědičné vady na své potomky jako je například pupeční kýla, entropium a testikulární hypoplazie. Koeficient dědičnosti se pohybuje v rozmezí od 0,01 do 0,05 (Gouletsou & Fthenakis, 2015). David et al., (2007), ve svém výzkumu zkoumal genetické faktory, které ovlivňují vlastnosti produkce spermatu (koncentrace spermatu, objem ejakulátu, počet spermií a pohyblivost). Ejakulát byl odebraný od beranů plemene Lacoune ve věku 1 rok a 2 roky. Zjistil, že největší vliv na ejakulát má vnější prostředí. Odhady dědičnosti byly střední pro objem, počet spermií, koncentraci a nižší pro mortalitu. Genetické korelace mezi věky se ve všech znacích lišily, což znamená že charakteristiky spermatu odpovídaly různým znakům u mladých a dospělých beranů.

3.9 Rozdíl mezi umělou vagínou a elektroejakulací

U malých přežvýkavců se používají dvě metody pro odběr spermatu, a to elektroejakulace a umělá vagína. Odběr pomocí umělé vagíny je preferovanou metodou, tato technika však vyžaduje odbornost. U některých druhů se kvalita spermií může lišit v závislosti na metodě odběru po rozmrazení (Jiménez-Rabadán et al., 2016).

K odběru spermatu se nejčastěji používá umělá vagína. Umělá vagína se skládá z vnějšího válce, vnitřní vložky a sběrače. K odběru je zapotřebí připravit teplou vodu (40-50 °C), která je napuštěna mezi vnější válec a vnitřní vložku. Důležitou součástí je také vzduchový ventil, který se dá regulovat podle potřeby. Vazelína je využívána k lubrikaci pochvy, aby nedošlo k poranění penisu.

Druhý způsob odběru je elektroejakulace, u kterého může být beran připoután na bok. Namazaná bipolární elektroda je vložena do konečnicku. Vytažený penis je držen kouskem gázy, aby se usnadnilo vložení žaludu do odměrné sběrné trubice. Sběrná trubice má průměr 10 až 15 mm. Po několika krátkých elektrických stimulacích dochází k ejakulaci (Kos et. al, 2019). Elektroejakulace je méně spolehlivá než umělá pochva. Vzorky mohou být kontaminovány

močí a lišit se kvalitou. Larsen John WA, (2021) uvádí objem spermatu z umělé vagíny 0,5 až 1,8 ml a koncentraci spermíí $2,5-6 \times 10^9/\text{ml}$. Spermie získané elektroejakulací mají nižší koncentraci, ale větší objem (Larsen John WA, 2021). Marco-Jiménez et al. (2005) uvedli, že spermie berana odebraná elektroejakulací byla odolnější vůči poškození mrazem, než když byla odebrána umělou vagínou. Mattner & Voglmayr, (1962) také porovnával rozdíl mezi umělou vagínou a elektroejakulací. Elektroejakulace měla za následek vyšší objem a hodnoty pH, ale nižší koncentraci spermíí. Rozdíly v charakteru spermatu, byly mírně vyšší u elektroejakulace než u odběru umělou vagínou. Kolísání celkového počtu spermíí bylo mnohem větší u elektroejakulace než u odběru provedený umělou vagínou. Na obrázku č.5 můžeme vidět odběrovou umělou vagínu. Obrázek č.6 popisuje elektroejakulátor, který se skládá z: 1. rektální sondy, 2. generátoru elektrických impulzů, 3. spojovacího kabelu sondy, 4. ovladače (Kos et. al, 2019).



Obrázek 5 Odběrová vagína (osobní archiv)



Obrázek 6 Elektroejakulátor (Kos, 2019)

3.10 Hodnocení spermatu

3.10.1 Makroskopické hodnocení spermatu

Makroskopické hodnocení ejakulátu se provádí okamžitě po jeho odběru. Posuzuje se objem, barva, zápach a přítomnost cizích příměsů (Pugh D. G., 2012).

Objem ejakulátu se pohybuje v rozmezí 0,7-3 ml (Marvan et al., 2011). Objem lze určit zvážením vzorku nebo pomocí odměrných značek na odběrové zkumavce, nalitím spermatu do odměrného válce (Mocé & Graham, 2008). Množství může být ovlivněno věkem, zdravotním stavem, dovedností sběrače, ročním obdobím a frekvencí sběru. Berani mají malý objem ejakulátu a vyšší koncentraci (Hafez & Hafez, 2000).

Sperma beranů má mléčně bílou až krémovou barvu. Odstíny červené barvy signalizují výskyt krve v důsledku poranění penisu při odběru. Hnědé nebo šedé semeno naznačuje kontaminaci nebo infekci reprodukčního traktu berana (Hafez & Hafez, 2000).

Pach není specifický, zapáchá po beranovi (vlně). Změna pachu upozorňuje na změnu kvality ejakulátu, ta souvisí zpravidla se zvětšeným množstvím moči, hnisu nebo krve. (Gamčík & Kozumplík, 1984).

Ejakulát berana by neměl být znečištěn chlupy a neměl by obsahovat písek, krev, vazelinu, kožní parazity, moč ani hnis (Gamčík & Kozumplík et al., 1984).

3.10.2 Mikroskopické hodnocení spermatu

Při mikroskopickém hodnocení spermatu posuzujeme koncentraci, motilitu, morfologické vady (Pugh D. G., 2012).

Koncentrace spermatu u beranů by se měla pohybovat v rozmezí $3,5 \times 10^9$ až 6×10^9 spermii v cm^3 (Hafez & Hafez, 2000). Koncentrace spermii je potřebná k určení, jak moc je zapotřebí naředit vzorek. Ke stanovení koncentrace se používá několik metod. Hemacytometr se používá po naředění v čirém ředidle (Graham, 1996). Další metodou je spektrofotometr, který využívá viditelné nebo fluorescenční světlo. Metody vyžadují stanovení koncentrace spermii ze standardních křivek specifický pro každý druh. To je důležité, protože velikost a tvar spermii ovlivňují množství zákalu ve vzorku měřené viditelným světlem nebo množství emitované fluorescence. Další metodu, kterou lze využít je průtoková cytometrie (Mocé & Graham, 2008).

Motilita spermii je nejběžnější metodou v laboratořích. Motilita udává procenta pohyblivých spermii ve vzorku spermatu (Graham, 1996). Tato metoda může být užitečná, i když hodnotí pouze jeden jediný důležitý atribut spermii. Motilita se dá hodnotit pomocí fotografické analýzy, nebo systémem počítačové analýzy spermii (CASA). Kromě procenta pohyblivých spermii CASA hodnotí také rychlost pohyblivých buněk (Mocé & Graham, 2008). Systém CASA snímá obraz, který je digitalizován a poté přenášen na monitor. Speciální algoritmy pomáhají rozlišovat pohyblivé a nepohyblivé spermie. Rychlost hlavičky na skutečné dráze a průměrná rychlost mezi body měření se hodnotí u pohyblivých spermii (Zemánková, 2015).

Morfologické vady lze hodnotit pomocí automatických morfometrických odhadů nebo vizuálně (Mocé & Graham, 2008). Spermatozoální abnormality lze rozdělit na primární a sekundární abnormality. Primární abnormality, o kterých se víme, že vznikají ve varlatech během spermiogeneze. Sekundární vznikají poté, co spermie opustí varle. S poruchou plodnosti souvisejí velké defekty (Graham, 1996).

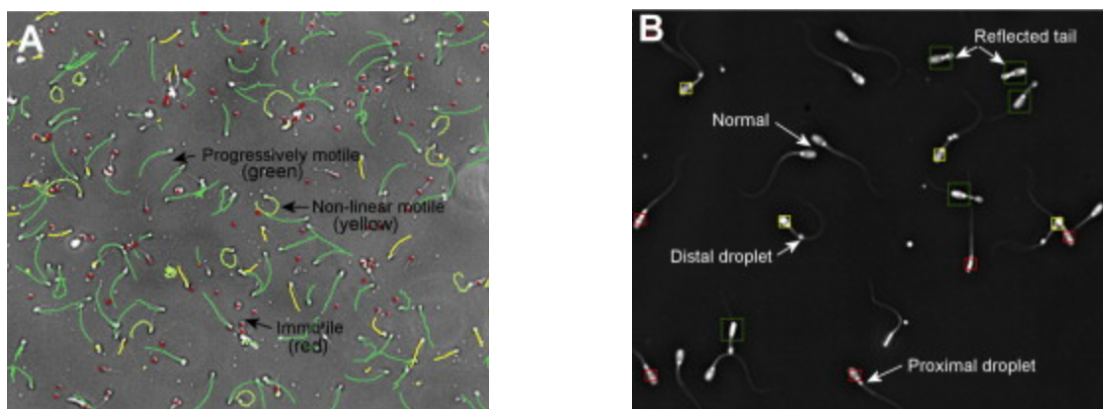
3.10.3 Tepelný test přežitelnosti

Test příležitosti hodnotí dlouhodobou přežitelnost spermii (Sonar a kol., 2014). Semeno se zředí s roztokem a inkubuje se při teplotě 37°C v suché lázni (Osugwuh & Palomo, 2017). Teplota by měla stimulovat podmínky v reprodukčním traktu samice (Sonar a kol., 2014). Osugwuh & Palomo (2017) ve svém výzkumu pro tepelný test příležitosti použil roztok

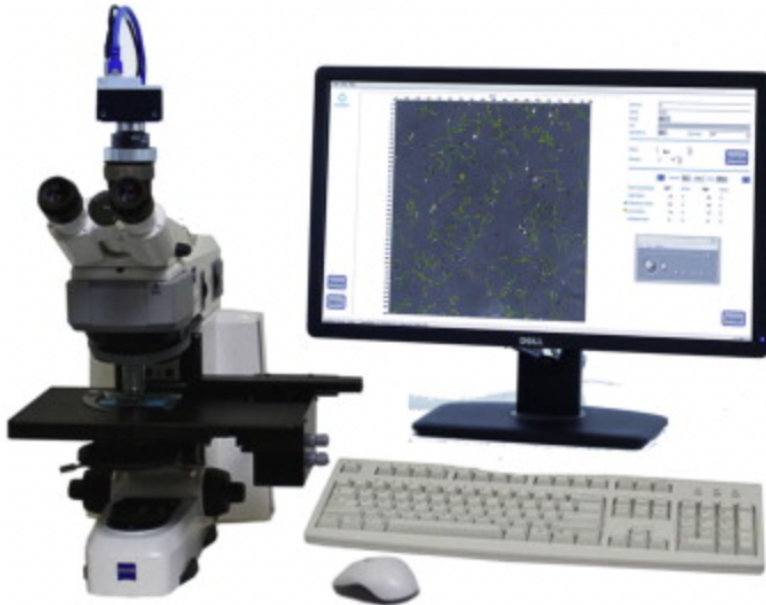
Tris (hydroxymethyl-aminoethan) – kyselina citrónová-glukóza (TCG). Vyhodnocoval všechny parametry ihned (0 h) a po 4 hodinách inkubace po rozmrazení.

3.10.4 CASA (Computer assisted sperm analysis)

CASA (computer assisted sperm analysis) je počítačem asistovaná analýza spermií. Je to systém, který se skládá z kamery, kontrastního mikroskopu a softwaru (Zadeh Hashem et al., 2017). CASA poskytuje zejména informace o kinematických parametrech jako je: celková pohyblivost (%), progresivní pohyblivost (%), průměrnou rychlost dráhy ($\mu\text{m/s}$), křivočarou rychlost ($\mu\text{m/s}$), přímou rychlost ($\mu\text{m/s}$). Počítačová asistovaná analýza spermatu podporuje také objektivní hodnocení spermií, jako je morfologie spermií, životaschopnost spermií, fragmentaci spermií a akrozomové reakce. CASA vyniká svojí vysokou přesností a spolehlivostí. V systémech mohou uživatelé vybrat počet snímků a rychlost snímání snímku, které se následně analyzují. CASA umožňuje hodnotit i další parametry, jako je intenzita a velikost, které jsou užitečné pro rozlišení hlaviček spermií a dalších buněk (Tsakmakidis, 2010). Pro analýzu spermií existuje více systémů CASA, a přestože jsou systémy založeny na podobných principech, existuje mezi systémy několik rozdílů v hardwaru a softwaru. Některé systémy používají samostatný mikroskop, zatímco nastavení mikroskopu je zabudováno v některých speciálně navržených zařízeních. Některé systémy používají širokopásmové osvětlení ve viditelném spektru a objektivy s 10X nebo 20X negativním nebo pozitivním fázovým kontrastem v kombinaci s odpovídajícími kondenzory. Jiné systémy jsou vybaveny jinými typy osvětlení a speciálními filtry pro detekci fluorescence. Výsledky CASA jsou ovlivňovány mnoha faktory jako je například: extender spermatu, rychlost získávání rámečku, koncentrace spermií a typ komory (Brito et al., 2016). Na obrázku č.7 můžeme vidět pohyb spermií (A) a morfologii (B) spermií v programu CASA. Pohled na celý systém CASA uvádí obrázek č.8 (Amann & Waberski, 2014).



Obrázek 7 Zobrazení A) pohyb spermií. Zobrazení B) morfologie spermií (Amann & Waberski, 2014)



Obrázek 8 Pohled na systém CASA (Amann & Waberski, 2014)

3.10.5 Hodnocení spermatu pomocí průtokové cytometrie

3.10.5.1 Průtoková cytometrie a její princip

Průtoková cytometrie je nejpokročilejší metoda. Tato metoda je založená na měření kvality, množství částic včetně buněk, jádra, chromozomálních struktur, různých částic s velikostí a stukturou v proudící suspenzi pomocí leserů a detektorů (Korkmaz & Çil, 2020). Používání průtokové cytometrie je však omezeno náklady na přístrojové vybavení, potřebou zkušeného operátora a relativně složitou přípravou vzorků a vyhodnocování dat. Tato metoda je nejčastěji používána především pro výzkumné účely, validaci jiných metod a kalibraci různých přístrojů. V posledních letech se využití průtokové cytometrie pro zpracování spermatu zvýšilo (Brito et al., 2016). Sperma lze analyzovat jako celek pro rozlišení jednotlivých populací spermií. Například spermie s poškozenými cytoplazmatickými membránami lze odlišit od spermií s nepoškozenými cytoplazmatickými membránami. Bylo vyvinuto několik fluorescenčních barviv pro použití, což umožňuje výzkumníkům zkoumat funkční stav a specifické buněčné procesy. Průtoková cytometrie hodnotí životaschopnost spermií, integritu akrozomů, fragmentaci DNA, mitochondriální aktivitu, lipoperoxidaci, apoptotické změny a oxidační stres (Kuo & Gwo, 2021). Každá spermie prochází paprskem, rozptyluje světlo a vydává fluorescenční světlo. Používá se více laserů nebo lasery kombinované s LED. Nejčastěji nové stolní přístroje používají kombinaci modrého laseru (488nm) s fialovým laserem (405nm). Signály přijímané fotodetektory jsou elektronickým systémem převedeny na elektrické signály a poté na číselné hodnoty. Vizualizaci události, které nás zajímají lze zjistit pomocí histogramů (Brito et al., 2016). Průtoková cytometrie je formou fluorescenční mikroskopie. Rozdíl mezi nimi je, že zatímco u mikroskopie jako takové je možnost získávání dat omezená na malý počet buněk oproti tomu průtoková cytometrie zpracovává informace z velkého počtu

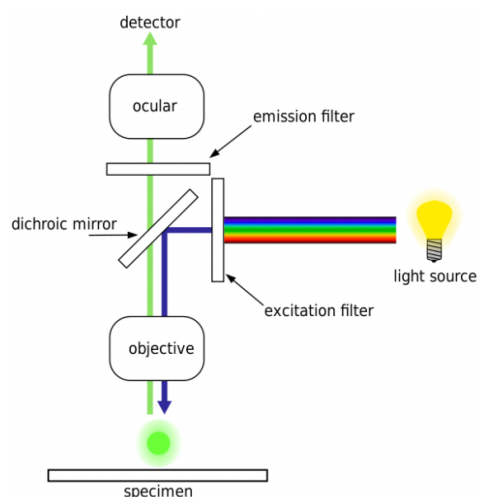
buněk za jednotku času (Ploem,1999). Obrázek č. 9 uvádí moderní průtokový cytometr NovoCyte model 3000 (osobní archiv)



Obrázek 9 Moderní průtokový cytometr NovoCyte model 3000 (osobní archiv)

3.10.6 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie nabízí funkční informace o buněčných aktivitách (Maddipatla & Tankam, 2022). Mikroskopie má vynikající časové rozlišení. Fluorescenční mikroskopie se také používá pro studium živých buněk. Je možné měřit pH, koncentraci volného vápníku, mezibuněčnou komunikaci. Princip fluorescenční mikroskopie je založen na zobrazení molekuly v minimálním množství díky záření (fluorescenci) molekul (fluorochromu) po dopadu ultrafialového světla. Proces zahrnuje absorpci světelné energie (fotonu) indikátorem a následnou emisi části této světelné energie. K fluorescenci dochází v nanosekundách. Vyšší energii prokazuje světlo s krátkou vlnovou délkou než světlo s dlouhou vlnovou délkou. Světlo emitované indikátorem má proto obvykle delší vlnovou délku než absorbované světlo. Tuto změnu nazýváme Stokesův posun. Při fluorescenční mikroskopii se využívá tzv. fluoroforů. Fluorofory se v mikroskopii uplatňují díky svým fluorescenčním vlastnostem a schopnosti excitace. Schopnost excitace spočívá v tom, že po dodání dostatečné množství energie se přesune elektron z valenčních orbitalů na vyšší energetickou hladinu (Sanderson et al., 2014). Schéma fluorescenčního mikroskopu je vyobrazeno na obrázku č.10 (Hampl, 2013).



Obrázek 10 Schéma fluorescenčního mikroskopu (Hampl, 2013)

3.11 Krátkodobá konzervace beraního spermatu

Při krátkodobé konzervaci beraního spermatu se dosahuje stavu anabiózy, a to snížením okolní teploty prostředí k hranici kolem 16 °C. Důležitou roli v krátkodobé konzervaci hraje vhodné složení ředidel. Tento způsob uchování spermatu vynakládá velké úsilí na kvalitu ředidel. Ředidla umožňují uskladnění naředěného spermatu na 5-6 hodin při teplotě 15 °C. Další možnosti uchování spermatu jsou při teplotě 3-5 °C na 12 až 24 hodin. Tři faktory, které ovlivňují plodnost při krátkodobé konzervaci spermatu jsou: typ ředidla, kvalita spermatu a počet spermií v jedné inseminační dávce (Smital Jaroslav, 2001).

3.11.1 Ředidla

Ředidla, které se nejčastěji používají při krátkodobé konzervaci jsou na bázi ředidla TRIS, vaječného žloutku, mléka odstředěného a plnotučného, citrátu sodného a komerčních ředidel jako je andromed, tryladyl, bioxccl, optixcel (Salamon & Maxwell, 2000). Naředěný ejakulát si zachová oplozovací schopnost až na 40 hodin (Weberová, 2017).

Odstředěné nebo rekonstituované mléko při ředění spermatu by se mělo zahřát na 92-95 °C po dobu 8-10 minut, aby nedošlo k toxikaci pro spermie, proto se musí inaktivovat laktein v proteinové frakci (Salamon & Maxwell, 2000).

3.11.2 Stanovení stupně ředění

Weberová, (2017) uvádí stupeň ředění pro krátkodobou konzervaci, která se pohybuje v poměru 1:3 až 1:5. Stupeň ředění může ovlivnit oplozovací schopnost a závisí na aktivitě a koncentraci získaného ejakulátu (Weberová, 2017). Fernandez-Abella et al., (2003) ve svém experimentu použil poměry ředění 1:1, 1:2 a 1:4.

3.11.3 Zpracování spermatu

Při krátkodobé konzervaci se ředění provádí ihned po odběru přímo ve sběrači. Teplota semene i ředidla se pohybuje okolo (25-30 °C). Teplota, by měla být stejná jak u semene, tak u ředidla. Do vyhřáté odměrné pipety se nasaje množství ředidla, které jsme stanovili a nechá se po stěně sběrače stékat do spermatu, současně se musí pomalu otáčet se sběračem. Poté se promísí opakovaným nasáváním a vypouštěním (Weberová, 2017).

Sperma se chladí na 15 °C. Poté se musí během 30 minut schladit v ledničce na 3-5 °C. K inseminaci lze uskladněné sperma použít do 12-24 hodin (Weberová, 2017).

Fernandez-Abella et al., (2003) ve svém experimentu srovnával chlazené sperma skladované po dobu 6 hodin při teplotě 15 °C a chlazené sperma při teplotě 5 °C po dobu 24 hodin v extenderu na bázi odstředěného mléka a citrátu trisodném. Uvedl, že výsledky naznačují, že prodloužení doby inseminace chlazeným spermatem na 5 °C během 24 hodin a zlepšilo o 35,5 % zabřezávání ovcí při cervikální inseminaci.

3.12 Dlouhodobá konzervace beraního spermatu

Kryokonzervace spermií je jedním z nejdůležitějších postupů ve vývoji biotechnologií pro asistovanou inseminaci. U hospodářských zvířat použití kryokonzervovaného spermatu se v posledních letech stala významnější. Hodnoty kvality spermií se mezi druhy a jednotlivci po rozmrazení liší (Yánez-Ortiz et al., 2021). Zmrazení biologického materiálu umožňuje časově neomezené uchování genofondu a vysoce hodnotných plemenných jedinců, kteří přispívají k udržení ohrožených druhů a plemen (Zemánková, 2017). Úspěšná kryokonzervace spermatu vyžaduje udržení životaschopné populace spermií s neporušenou strukturou a funkční integritou plazmatické membrány. Nejvýhodnější je skladování spermií v kapalném dusíku, který má teplotu -196 °C (Fraser et al., 2014).

3.12.1 Plnění do pejet/pelet

Inseminační dávky se po naředění a schlazení semene plní do pelet (Japonská metoda) nebo pejet (Francouzská metoda).

Zmrazování spermatu v peletách je rychlé a levné, ale řízení počtu pelet a rozeznání je problematické, protože skutečné vzorky spermatu se nedají nijak označit. Pelety se mrazí na mělkých prohlubních v suchém ledu (suchý led je pevný druh oxidu uhličitého), který má teplotu -78,5 °C. Pelety mají objem 0,1 – 0,3 ml. Zmrazí se na 2-4 minuty. Pelety jsou poté ponořeny do kapalného dusíku pro skladování (Purdy, 2006).

Plastové pejety jsou dražší a pracnější než peletová technika. Pejety se zmrazují buď v parní lázni nad kapalným dusíkem, nebo v mrazicím stroji s řízenou rychlostí. Pejety mají objem 0,25 a 0,5 ml. Výhodou je, že se dají jednotlivé pejety označit (Purdy, 2006). Pejety se uzavírají pomocí těsnícího prášku, který vytváří pevnou zátku při kontaktu s vodou. Další metodou na uzavírání pejet jsou plastové kuličky (Savvulidi et al. 2021).

Na obrázku č.11 můžeme vidět pejety v tekutém dusíku (osobní archiv). Forma suchého ledu viz obrázek č.12 (Hampton,2015).



Obrázek 11 Pejetý v tekutém dusíku (osobní archiv)



Obrázek 12 Forma suchého ledu (Hampton,,2015)

3.12.2 Zpracování spermatu

Ředidla pro dlouhodobou konzervaci by měla mít pufrovací kapacitu, adekvátní pH a vhodnou osmolalitu. Ředidla by měla chránit spermie před poškozením (Salamon & Maxwell, 2000). Důležité je, aby byl vzorek spermatu správně naředěn. Měl by být k dispozici dostatečný počet spermií a dostatečné množství ředidla. Vzorky se ředí dvěma způsoby buď konkrétními objemy ředidel, nebo ředěním spermatu se specifickou koncentrací spermií. Míra ředění je 1:1-1:23. Purdy, (2006) uvádí lepší způsob ředění v koncentraci spermií od 80 do 500 x 10⁶ buněk/ml. Nejčastěji používaná ředidla jsou na bázi Tris, citrátu a cukru, mléka, laktózy a sacharózy. Nejpoužívanější kryoprotektantní látkou je glycerol. Jeho optimální koncentrace je v rozmezí 6-8 % pro spermie zamrazené rychle ve formě pelet. Při pomalém mrazení v peletách se doporučuje koncentrace glycerolu 3-4 %. Dále se používají komerčně vyráběná ředidla bez živočišných látek lze najít pod názvem Andromed, Biociphos, Optidyl, Ovixel, Andromed CSS (Hegedúšová et al., 2012).

Naředěné sperma se ochladí na teplotu na 4-5 °C během 1,5-4 hodiny (Purdy, 2006). Chlazení je adaptace spermií na snížený metabolismus. Doba, po kterou spermie zůstávají v kontaktu s glycerolem před zmrazením, během kterého pronikají do spermatu se nazývá ekvilibrace (Salamon & Maxwell, 2000).

Zmrazení semene se provádí v pejetách o objemu 0,25 a 0,5 ml v kapalném dusíku (-196 °C). Rychlost, kterou jsou pejety mrazeny má vliv na parametry spermatu po rozmrazení a jeho fertilizační schopnost (Salamon & Maxwell, 2000). Savvulidi et al., (2021) cílem jeho studie bylo optimalizovat konvenční metodu zmrazování spermií v párách kapalného dusíku. Spermie byly zmrazeny v brčkách konvenční metodou zmrazování prostřednictvím statické expozice dávek spermií par v tekutém dusíku nebo čtyřmi různými modifikovanými metodami zmrazování. Při použití optimalizovaného zmrazovacího postupu byly všechny parametry rozmražených spermií významně lepší ve srovnání s konvenční metodou: procento

životaschopných rozmražených spermií se zvýšilo až na 48,3 %, procento spermií s poškozením plazmatické membrány po rozmrazení kleslo na 6,58 %. Závěrem řekl, že pro kryokonzervaci spermatu berana valašského by měl být rutinně používán optimalizovaný zmrazovací postup místo konvenční metody.

Lv et al., (2019) uvádí rozmrazování pelet po dobu 30-60 sekund při teplotě 35-40 °C. Pelety je možné rozmrazovat ve dvou metodách v předehřátém rozmrazovacím roztoku (mokrý metoda) nebo v suchých skleněných zkumavkách (suchá metoda). (Lv et al., 2019). Naopak Purdy, (2006) uvádí rozmrazování pejet ve vodní lázni o teplotě 37 °C na 12-30 sekund.

3.13 Ředidla a jejich složení

Ředidla, která se používají k ředění spermatu malých přežvýkavců byla vyvinuta k tomu, aby chránila a udržovala spermie během zpracování a skladování (Maksimović et al., 2018). Používaná ředidla pro konzervaci spermatu by měla mít adekvátní pH a pufrční kapacitu, vhodnou osmolalitu. Ředidla by měla chránit spermie před kryogenním poškozením (PLOEM, 1999). Sperma může být ihned použito k inseminaci nebo být naředěno a skladováno. Sperma by mělo být naředěno v závislosti na počáteční koncentraci, zpracování a skladování podle toho, zdali se použije čerstvé nebo zmražené. Většina ředitel jsou založena na bázi TRIS, vaječném žloutku a dalších kryoprotektiv. Komerční ředidla koncentráty obsahují kryoprotektiva a přidání vaječného žloutku a dvakrát destilovanou vodu (Larsen WA John, 2021). Larsen WA John (2021), uvádí složení ředidla na bázi Tris v následující tabulce č 7. V tabulce č.8 můžeme vidět složení citrátového ředidla.

Tabulka 7 Složení ředidla na bázi Tris (Larsen WA John, 2021).

Tris	3,63g
Fruktóza	0,50g
Kyselina citronová	1,99g
Vaječný žloutek	14ml
Penicilin	100 000 iu
Streptomycin	100mg
Destilovaná voda	100ml

Tabulka 8 Složení citrátového ředidla (L. WA John,2021).

Citrát sodný	2,37 g
Glukóza	0,50 g
Vaječný žloutek	15 ml
Penicilin	100 000 iu
Streptomycin	100 mg
Destilovaná voda	100 ml

3.13.1 Komerčně dostupné extendery spermatu pro beranní spermie

Komerčně vyráběná ředidla bez živočišných látek lze najít pod názvem Andromed, Optixel, Bioxcel, Ovixcel, Andromed CSS (Hegedúšová et al., 2012).

Andromed je ředidlo na bázi sójového lecitinu bez vaječného žloutku pro zmrazení beraního, kozího, býčího semene (Murphy et al., 2017). Živočišné proteiny neobsahuje kombinace lecitinu a glycerolu. Jejich použitím se snižuje riziko přenosu patogenů a virů při udržení stejné oplozovací schopnosti spermií. Bousseau et al., (1998) navrhuje Andromed a Bioxcel jako vhodnou náhradou za běžná média na bázi žloutku jako je např. Triladyl

Bioxcel (extender na bázi sójového lecitinu) se běžně používá jako kryokonzervační médium pro sperma beranů a kozlů. Bioxcel zachovává pohyblivost spermií po rozmrazení, ale naopak hůře toleruje kolísání teplot (Murphy et al., 2017).

Optixel je dostupně vyráběné ředidlo, které je podobné vaječnému žloutku bez obsahu bílkovin (Murphy et al., 2017).

3.14 Kryoprotektory

Kryoprotektory jsou látky, které se přidávají do ředícího média. Přidání kryoprotektivních činidel k ředidlům je důležité pro ochranu spermií před poškozením mrazem, udržení pohyblivosti, schopnost oplodnění a zachování integrity membrány spermií. Kryoprotektory se rozdělují na intracelulární a extracelulární kryoprotektivní činidla (Allai et al., 2018). Nejčastějším používaným kryoprotektantem je glycerol. Ten působí tak, že rychle vytěsňuje intracelulární vodu, a tak minimalizuje tvorbu ledových krystalů ve spermatu (Paul et al., 2021). U většiny druhů jsou média složena z pufru Tris, extracelulárního kryoprotektiva vaječného žloutku, intracelulární kryoprotektiva glycerolu, zdroje energie glukóza. Další přísady jako jsou antibiotika, antioxidanty a vitamíny (Yánez-Ortiz et al., 2021). Jako objemová činidla ke zvýšení teploty skelného přechodu zmrazovacího nastavovadla se používají neprostupující ochranné látky včetně cukrů a proteinů. Ultra-tepelně ošetřené mléko a vaječný žloutek se často přidávají jako činidla modifikující membránu, aby se zvýšila kryostability spermií (Sieme et al., 2016). Podle Quan et al., (2015) je v současnosti nejčastěji používaným extracelulárním kryoprotektantem vaječný žloutek.

3.14.1 Intracelulární kryoprotektiva

Mezi osmoticky neaktivní se řadí propustné (permeační) kryoprotektivní látky, protože jsou rovnoměrně distribuovány v intracelulárním a extracelulárním prostoru. Přidání však představuje osmotický stres pro buňky, protože voda se pohybuje rychleji přes buněčnou membránu ve srovnání s prostupujícími kryoprotektivními činidly (Sieme et al., 2016). Propustným kryoprotektivním činidlem byla přisuzována řada různých kryoprotektivních vlastností. Především snižují teplotu nukleace ledu a velikost ledových krystalů (Yánez-Ortiz et al., 2021).

3.14.1.1 Glycerol

Glycerol je nejpronikavější kryoprotektant používaný v ředidlech pro zmrazení beraního semene. Množství glycerolu přidaného do ředidel je omezené kvůli jeho potenciální cytotoxicitě. Koncentrace, která je doporučena poskytující nejžádanější míru přežití je 4 % a 7 %. Koncentrace vyšší než 6 % jsou škodlivé, protože glycerol snadněji proniká do spermatu (Allai et al., 2018). Rychlost membránové difúze se změní po proniknutí glycerolu do lipidové dvojvrstvy, což způsobí snížení koncentrace elektrolytu a osmotické smrštění objemu spermií, které těmto gametám umožňuje odolávat nízkým teplotám (Holt,2000). Glycerol může způsobit

problémy po rozmrazování, protože není z plazmatické membrány zcela odstraněn. (Yánez-Ortiz et al., 2021). (Öztürk et al., 2020) ve svém výzkumu smíchal trehalózu 60 mM s glycerolem 3% v malé koncentraci (1,5 % - 3 %). Dále zkoumal samotný glycerol 5% ten vykazoval lepší výsledky v pohyblivosti 42 %, životaschopnosti spermií 52 %, mitochondriální aktivitě 45 % než trehalóza 60mM smíchaná s 3% glycerolem.

3.14.1.2 Amidy

Mezi propustné kryoprotektanty patří také amidy, zejména methylformamid a dimethylformamid. Výhodou amidů ve srovnání s glycerolem je menší osmotické poškození kvůli nižší molekulové hmotnosti amidů. Účinky amidů se mezi druhy liší kvůli kryokonzervaci odolnosti spermií (Yánez-Ortiz et al., 2021). Když dojde k nahrazení glycerolu methylformamidem a dimethylformamidem, dojde k většímu zachování motility, mitochondriálního membránového potenciálu, životaschopnosti a akrozomální integrity po postupech zmrazování a rozmrazování (Öztürk et al., 2020). Alvarez et al., (2020), vyhodnocoval účinnost 5% dimethylformamidu. Sperma bylo odebráno umělou vagínou. Ředidlem použitím v této studii bylo ředilo na bázi Tri-kyseliny citrónové. Výsledek byl, že dimethylformamid vykazoval vyšší hodnoty před zmražením pro inseminaci. Pohyblivost byla 66 % před zmrazením a po rozmrazení 55 %.

3.14.1.3 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) se řadí mezi intracelulární kryoprotektanty. Má schopnost srážet roztok pod bodem mrazu. Podporuje vitifikaci prostředí, aby se zabránilo intracelulární krystalizaci ledu. DMSO má tři způsoby působení při různých koncentracích. Vytváří tři vodíkové vazby s vodou a indukuje ztenčení membrány. Toto ztenčení zvyšuje tekutost hydrofobních lipidových membrán, což umožňuje kryoprotektantu a molekulám vody volně se pohybovat přes membránu. Dimethylsulfoxid může indukovat póry v buněčné membráně a dezintegrovat lipidovou dvojvrstvu při vyšších koncentracích (Rakha et al., 2018). Najafi et al., (2017), ve svém výzkumu porovnávali účinek dimethylsulfoxid v koncentracích 7% a 5% v ředidlu na bázi sójového lecitinu. Výsledek byl, že při 5% koncentraci má dimethylsulfoxid lepší životaschopnost o 8 % a integritu mebrány o 5 % než v 7% koncentraci (DMSO).

3.14.2 Extracelulární kryoprotektiva

Extracelulární kryoprotektiva lze rozdělit na osmoticky aktivní molekuly a osmoticky neaktivní sloučeniny. Do osmoticky aktivních můžeme zařadit disacharidy (sacharóza, trehaóza). Naopak do osmoticky neaktivních sloučenin patří polysacharidy a proteiny (Sieme et al., 2016).

3.14.2.1 Vaječný žloutek, sojový lecitin

Vaječný žloutek chrání spermie před škodlivými účinky chladového šoku, zachovává pohyblivost spermií, snižuje ztrátu akrozomálních enzymů a udržuje mitochondriální membrány. Nevýhodou vaječného žloutku je zvýšené riziko mikrobiální kontaminace a zvýšení pravděpodobnosti přítomnosti škodlivých metabolitů nebo endotoxinů, které mohou mít negativní účinky na životaschopnost a pohyblivost spermií. Snižuje koncentrace glycerolu v médiu. Koncentrace vaječného žloutku v ředidlech se značně liší. Použití relativně vyšších koncentrací nemusí nutně vést ke zvýšenému zachování motility spermií (Allai et al., 2018). Vozaf et al., (2021) ve svém výzkumu zkoumali účinnost vaječného žloutku v ředidle Triladyl v poměru 1:10. Výsledkem toho výzkumu bylo, že vaječný žloutek má výbornou motilitu a 50% životaschopnost spermií,

Sojový lecitin je rostlinná složka, kterou lze použít pro uchování spermií. Lecitin chrání membránu spermií stabilizací a náhradou fosfolipidů, čímž zvyšuje toleranci k procesu zmrazování (Allai et al., 2018).

3.14.2.2 Odstředěné mléko

Bai et al., (2020), ve svém výzkumu porovnával účinky vitamínu B12 s odstředěným mlékem. Zjistili, že optimální poměr ředění odstředěného mléka je 1:3. Ve srovnání s B12 odstředěné mléko v poměru 1:3 prodloužilo dobu skladování spermatu (48 h vs 18 h, skladování při nízké teplotě 4 °C) a zvýšilo index přežití spermatu. Závěrem bylo, že odstředěné mléko je účinnější, pohodlnější a výživnější než vitamín B12.

3.14.2.3 Cukry

Cukr má několik funkcí slouží jako energetický substrát pro spermie během inkubace a udržuje osmotickou rovnováhu ředidel. Mezi cukry, které se používají pro skladování semene berana patří monosacharidy (glukóza, fruktóza, galaktóza) i disacharidy (sacharóza, trehalóza). Allai et al., (2018) navrhl glukóza jako vhodnější v koncentraci 0,50g než fruktózu, laktózu nebo rafinózu v extenderu na bázi Tris.

3.14.2.3.1 Sacharóza

Sacharóza jako hlavní složka syntetických ředidel. Sacharóza byla použita, aby chránila integritu akrozomu spermií. Syntetické antioxidanty byly přidány k ředidlům sacharózy, aby inhibovaly peroxidaci fosfolipidů spermií, zejména nenasycených mastných kyslin (Salamon & Maxwell, 2000). Jafaroghli et al., (2011), ve svém experimentu porovnával 3 různé koncentrace sacharózy. První koncentrace byla 50 mM. Druhá koncentrace 70 mM a třetí koncentrace 100 mM. Při své studii použil ředidlo na bázi Tris. Výsledky byly jednoznačné. Nejlepší motilitu měla koncentrace 100 mM 55 % a nejhorší koncentrace 50 mM 49 %. Uvedl, že při koncentraci 50 mM byla nejhorší i životaschopnost 51 % a integrita membrány 45 %.

3.14.2.3.2 Trehalóza

Trehalóza je disacharid, který se skládá ze dvou molekul D-glukózy a stabilizuje membránové fosfolipidy vazbou na jejich polární hlavní skupiny. Pokud membrána není stabilizována, dochází k několika trhlinám ve vnitřní a vnější vrstvě buněčné membrány, což vede k buněčné dehydrataci a osmotické nerovnováze. Trehalóza zabraňuje dehydrataci buněk a stabilizuje buněčnou membránu. Projevuje svůj ochranný účinek v extracelulárním prostředí (Öztürk et al., 2020). (Mustafa N. Bucak & Tekin, 2007) ve svém výzkumu uvedl, že ve srovnání s taurinem a glutathionem bylo nejvyššího ochranného účinku dosaženo při použití trehalózy během skladování beraního semene. Trehalóza poskytuje výsledky pro motilitu spermatu a rozmrazení, mitochondriální aktivitu a integritu akrozomů. Bohlool et al., (2015) ve svém výzkumu porovnával theralózu v různých koncentracích, a to v extenderu na bázi sojového lecitinu. Došel k závěru, že motilita spermií byla nejvyšší při koncentraci 100 mM a s 7% glycerolem a to 27 %. Také životaschopnost spermií a integrita membrány byla vyšší v koncentraci 100 mM o 47 % než u trehalózy v koncentraci 50 mM. Öztürk et al., (2020), také zkoumal trehlózu ale s přidavkem glycerolu. Použil trehalózu 60 mM s 3% glycerolem a trehalózu 100 mM s 1,5% glycerolem. Pohyblivost spermií byla vyšší u koncentrace trehalózu 60 mM s 3% glycerolem a o to 10 %. Také životaschopnost byla vyšší a to o 6 %.

3.14.2.3.3 Rafinóza

Rafinóza je trisacharid, který snižuje tvorbu intracelulárních ledových krystalů prostřednictvím své interakce s membránovými lipidy a proteiny během kryokonzervace (Allai et al., 2018). Bucak et al., (2013) uvedl, že extender Tris s přidavkem 10mM rafinózy vedl k vyšším procentům integrity akrozomu o 50 %, mitochondriální aktivitě o 29 % a životaschopnosti spermií o 40 %. Rafinóza při koncentraci 10 mM měla i výbornou motilitu 46 %. Jafaroghli et al., (2011), tato studie vyhodnocovala rafinózu s ředidlem Tris v koncentraci 1:4. Zkoumal rozdíl mezi koncentracemi 50, 70 a 100 mM. Výsledky byly lepší, když byla použita koncentrace 70 a 100 mM. Motilita u koncentrace 100 mM byla okolo 59 % naopak nižší při 70 mM 54 %. Nejhorší motilitu vykazovala koncentrace 50 mM a to 50 %. Míra početí byla také nejlepší u 100 mM a to 44 %.

3.14.2.4 Antioxidanty

Savčí spermie mají antioxidační obranný systém. Mezi, které patří superoxiddismutáza, kataláza, glutathionreduktáza a glutathionperoxidáza. Dále tam patří neenzymatické antioxidanty, jako je kyselina askorbová, methionin (Allai et al., 2018). Mezi nejúčinnější antioxidanty používané při skladování spermií patří Resveratrol a Glutathion. Resveratrol je přírodní rostlinný polyfenol, který se používá jako antioxidant a terapeutické činidlo (Al-Mutary, 2021). Větší zachování integrity akrozomu zmrazených a rozmražených spermií, aniž by to ovlivnilo hodnoty proměnných motility spermií u ovcí má obohacení o 5 mM glutathionu do zmrazovacího média. Výsledky ukázali motilitu 55 % a progresivní motilitu 10 %. (Yánez-Ortiz et al., 2021).

Rateb et al., (2020) ve svém výzkumu zkoumal methionin v koncentraci 0,3 mM v extenderu tris s vaječným žloutkem. Výsledkem bylo, že methionin zlepšil motilitu o 91 % i životaschopnost spermií o 94 %.

Silva et al., (2011), cílem této studie bylo vyhodnotit účinek superoxiddismutázy a redukovaného glutathinu. Ředidlo používané při tomto výzkumu bylo na bázi Tris-vaječný žloutek. Superoxiddismutáza se rozdělila na tři koncentrace 25, 50 a 100 U/ml to samé glutathion 2, 5 a 7 mM. Nejlepší výsledky měla superoxiddismutáza při koncentraci 25 U/ml a to celkovou motilitu z 71 % a progresivní motilitu 11 % naopak při koncentracích 50 a 100 U/ml byla motilita o 30 % menší. Glutathion při koncentraci 5mM vykazoval jak celkovou motilitu, tak progresivní lépe než při koncentracích 2 a 7 mM a to o 8 %.

3.14.2.5 Aminokyseliny

Neenzymatické aminokyseliny jsou důležité pro svou antioxidační vlastnost. Aminokyseliny jsou přítomny v semenné plazmě ve vysoké koncentraci. Bucak et al., (2009) uvádí suplementaci extenderů pomocí aminokyselin v doporučené koncentraci 10 mM (např. taurin, hypotaurin, glutamin, glycin a cystein). Jeho výsledek byl, že snížili fragmentaci DNA a zlepšili motilitu, životaschopnost, integritu membrány a plodnost beranních spermií po rozmrazení.

Cystein chrání spermie před toxickými metabolity kyslíku s glutathionem udržuje kvalitu spermií a zabraňuje ztrátám membrány a integritě akrozomu spermatu berana (Allai et al., 2018). Çoyan et al., (2011), ve svém výzkumu porovnával Cystein ve třech koncentracích. Sperma bylo odebráno od 5 dospělých beranů Merino ve věku (1 a 2 roky). Používané ředidlo bylo na bázi Tris. První koncentrace byla 1mM. Druhá 2mM a třetí 4mM. Při koncentraci 1mM byla lepší motilita o 10 % než při koncentraci 3mM tam motilita byla 54 %. Nejhorší motilitu obsahovala koncentrace 2mM a to 44 %. Pokud šlo o integritu membrány, tak nejlepší výsledky vykazovala koncentrace 1 mM a to 6,9 %. Naopak mitochondriální aktivitu vykazovala nejvíce koncentrace 2mM 66 %.

Methionin je další aminokyselina, která může být přidána do spermatu berana. Çoyan et al., (2010) uvedl, že při koncentraci 1,2 a 4 mM methionin zlepšuje motilitu spermií, mitochondriální aktivitu a životaschopnost beranních spermií během skladování do 24 h. Pak se kvalita zhoršuje o 4 % na pohyblivosti.

Bucak et al., (2009), ve své studii použil glutamin s aminokyselinovým roztokem. Glutamin při koncentraci 2,5 mM vykazoval o 10 % menší pohyblivost než glutamin s koncentrací 5 mM. Glutamin 5 mM poskytl kryoprotektivní účinek a zlepšil motilitu po rozmrazení, integritu membrány a zvýšil aktivitu katalázy o 2 %.

3.14.2.6 Vitamíny

Přítomnost vitamínu hraje důležitou roli v kvalitě spermií. Významný účinek mají minimálně čtyři vitamíny. Mezi ně patří alfa-tokoferol, je jedním z primárních antioxidantů spermií, který je zastoupen ve spermatu. Dále vitamín E, vitamín B12 a kyselina askorbová.

Vitamín E je hlavní lipofilní antioxidant, který chrání polynenasycené mastné kyseliny ve tkáních před peroxidací. Allai et al., (2018) uvedl, že přidání vitamínu E v různých formách (Trolox, a-tokoferol) do médií pro konzervaci spermatu berana může zlepšit kvalitu spermií. Kheradmand. A et al., (2006) uvedli, že přidání 1 nebo 2 mg vitamínu E do pufru vaječný žloutek/citrát zlepšilo motilitu a integritu membrány spermií v chlazeném semene beranu Dewry & Gohain, (2018) ve svém experimentu porovnával vitamín E ve dvou koncentracích v 1mM a 2mM v extenderu Tris. Výsledek vitamínu E v koncentraci 2mM vykazoval lepší výsledky než v koncentraci 1mM, kde byla zhoršena motilita o 5 % tak i životaschopnost spermií o 3 %. Silva et al. (2013), ve své studii zkoumal působení vitamínu E naředěný v ředidlu Tris-vaječný žloutek. Vitamín E v různých koncentracích 30,60 a 120 μ M. Výsledky byly následující. Nejlépe na tom byl vitamín E v koncentraci 30 μ M jeho celková motilita byla o 3 % lepší než při koncentracích 60 a 120 μ M naopak lepší progresivní motilitu měl vitamín E při koncentraci 120 μ M a to o 4 %.

Kyselina askorbová, známá jako vitamín C je rozpustná ve vodě. Vitamín C hraje roli při udržování genetické integrity spermií tím, že brání oxidativnímu poškození spermií DNA (Allai et al., 2018).

Vitamín B12 je další ve vodě rozpustný vitamín, který funguje jako koenzym v řadě biochemických reakcí, jako je syntéza methioninu a metabolismus větvených aminokyselin. Modifikovaný Tris citrátový roztok nebo Tris extender doplněný vitamínem B12 v koncentraci 2 mg/ml zlepšil kinematiku spermií u kříženců a beranů Dallagh v tekuté a zmrazené formě (Dzul-Rosado et al., 2013). Hamedani Ma & Ahangari Yj, (2013), jeho studie byla provedena za účelem zkoumání různých koncentrací vitamínu B12 v ředidlu na bázi Tris. Sperma odebral od 6 beranů pomocí elektroejakulátu. Koncentrace vitamínu B12 byly tři. První 1 mg/ml. Druhá 2 mg/ml a třetí 3mg/ml. Výsledky vedli k tomu, že přidáním vitamínu B12 při koncentraci 2mg/ml se zlepšila motilita o 80 % naproti tomu při koncentraci 1 a 2 mg/ml se motilita pohybovala okolo 70 %. Životaschopnost vykazovala též lepší výsledky u koncentrace 2mg/ml a to 85 %. U koncentrací 3mg/ml vykazovala životaschopnost lepší výsledky než u 1mg/ml a to o 2 %.

3.14.2.7 Antifreeze proteiny (AFP)

Antifreeze proteiny jsou dobře známé specifické proteiny. Poskytují ochranu buněk snížením bodu tuhnutí, zabráněním rekrytalizace, úpravou procesu tvorby ledových krystalů a interakcí s plazmatickými membránami při nízkých teplotách (Xin et al., 2018). Tyto proteiny snižují ztrátu motility, udržují životaschopnost, funkčnost membrán a integritu akrozomu ve zmrazeném a rozmrazeném spermatu. Existují čtyři typy AFP (typ I, typ II, typ III a glykoprotein (AFGP) (Correia et al., 2021). Tyto proteiny jsou ve velkých koncentracích v tělesných tekutinách určitých antarktických organismů, což vede k jejich toleranci vůči velmi nízkým teplotám. Antifreeze proteiny se v současnosti komerčně nevyrábí, protože izolace z mořských druhů je obtížná a drahá. Pro kryokonzervaci spermatu u malých přežvýkavců se používají jen zřídka (Yánez-Ortiz et al., 2021). Correia et al., (2021) ve svém výzkumu porovnával antifreeze typ I a typ II. Použil extender Tris v koncentraci s antifreeze proteinem

0,5 µg/ml. Výsledkem výzkumu bylo že, typ I má lepší motilitu o 5 % a lepší integritu membrány o 12 % než typ II.

3.14.2.8 Syntetické inhibitory ledových krystalů

Syntetické inhibitory ledových krystalů (SIB), jsou sloučeniny, které interagují přímo s jádry nebo krystaly ledu za účelem modifikace jejich struktury a/nebo rychlosti růstu. Mezi syntetické blokátory ledu patří 1,3- cyklohexyndiol (1,3- CHD) a 1,4- cyklohexandiol (1,4 CHD), který díky své chemické struktuře specificky tlumí růst ledových krystalů (Eisenberg et al., 2012). Výhodou komerčně dostupných chemických inhibitorů ledových krystalů je, že jsou levné a mohly by být dobrou náhradou za antifreeze proteiny. Tvorba ledu může vážně ovlivnit životaschopnost zmrazených spermií. Přírodní nebo syntetické inhibitory ledových krystalů se používají k úpravě struktury ledového krystalu během zmrazování a rozmrazování. Syntetické inhibitory ledových krystalů mohou modifikovat strukturu ledového krystalu pomocí mřížkového párování s dostupnými místy na povrchu bazální roviny ledového krystalu. Další výhodou je, že na rozdíl od antidreeze proteinů, které mohou tvořit smrtelně jehlové ledové krystaly. Díky své nepropustnosti mohou extracelulární inhibitory ledových krystalů indukovat buněčnou dehydrataci, a nakonec snížit letálně intracelulární tvorbu ledu (Quan et al., 2015). Quan et al., (2015) ve svém výzkumu porovnával 1,3- cyklohexyndiol a 1,4- cyklohexandiol při koncentracích 50mM a 200mM. Použil extender Tris. Nejlepší výsledky měl 1,4- cyklohexandiol při koncentraci 50mM a 1,3- cyklohexyndiol při koncentraci 200mM. U obou výsledky vykazovali výbornou motilitu a životaschopnost na opak u 1,4- cyklohexandiol při koncentraci 200mM a 1,3- cyklohexyndiol při koncentraci 50mM byla motilita a životaschopnost zhoršena.

3.14.3 Moderní kryoprotektory a fertilizační schopnost kryokonzervovaných spermií

Kryoprotektor	Extender	Koncentrace	Motilita	Životaschopnost spermií
Glycerol (Öztürk et al., 2020)	Tris	5% glycerol	↑	↑
Glycerol (Najafi et al., 2017)	Na bázi sójového lecitinu	7 % glycerol	↑	↑
Glycerol (Bohlool et al., 2015)	Na bázi sojového lecitinu	3% glycerol	↑	↑ ↓
Dimethylsulfoxid (Najafi et al., 2017)	Na bázi sójového lecitinu	7 % DMSO	↓	↓
Diethylsulfoxid (Najafi et al., 2017)	Na bázi sójového lecitinu	5 % DMSO	↓	↑
Vaječný žloutek (Vozaf et al., 2021)	Triladyl	V poměru 1:10	↑	↑ ↓
Trehalóza (Öztürk et al., 2020)	Tris	60 Mm	↑	↑
Trehalóza (Bohlool et al., 2015)	Na bázi sojového lecitinu	100 Mm	↑	↑
Trehalóza (Bohlool et al., 2015)	Na bázi sojového lecitinu	50 Mm	↓	↓
Glutathion (Shi et al., 2020)	Tris-egg yolk	200 Mm	↓	↑
Methionin (Rateb et al., 2020)	Tris-egg yolk	0,3mM	↑	↑
Vitamín E (Espina-Ávila et al., 2021)	Triladyl	10mg/ml	↑	↑

Vitamín E (Dewry & Gohain, 2018)	Tris	1mM	↓	↓
Vitamín E (Dewry & Gohain, 2018)	Tris	2mM	↑	↑
Antifreeze proteiny Typ I. (Correia et al., 2021).	Tris	0,5 µg/ml	↑	↑
Antifreeze proteiny Typ III. (Correia et al., 2021).	Tris	0,5 µg/ml	↓	↓
Syntetické inhibitory ledových krystalů 1,3-cyklohexandiol (Quan et al., 2015).	Tris	50mM	↓	↓
Syntetické inhibitory ledových krystalů 1,3-cyklohexandiol (Quan et al., 2015).	Tris	200mM	↑	↑
Syntetické inhibitory ledových krystalů 1,4-cyklohexandiol (Quan et al., 2015).	Tris	50mM	↑	↑
Syntetické inhibitory ledových krystalů 1,4-cyklohexandiol (Quan et al., 2015).	Tris	200mM	↓	↓

Tabulka 9 Moderní kryoprotektory a fertilizační schopnost kryokonzervovaných spermií

4 Závěr

Valašská ovce se chová na našem území již po staletí a po celou dobu si uchovala svou odolnost a nenáročnost. V dnešní době lze toto plemeno nalézt jen sporadicky, a to převážně v užitkových chovech a v horských a podhorských oblastech. V roce 1999 bylo toto plemeno zařazeno do genetických zdrojů České republiky.

Důležitým bodem záchranného programu původních valašských ovcí je vytvoření dostatečného rezervuáru kvalitních inseminačních dávek dlouhodobě uchovávaných v tekutém dusíku. Použití tekutého dusíku k dlouhodobé konzervaci spermií, se jeví jako nejlepší a v dnešní době také nejvíce praktikovanou metodou skladování inseminačních dávek.

V této práci byly sepsány nejnovější dosavadní poznatky, týkající se moderních kryoprotektorů při konzervaci beranních spermií. Informace byly čerpány zejména ze zahraničních zdrojů (výzkumů). Tyto perspektivní výsledky je důležité testovat v rámci záchranného programu při kryokonzervaci původních valašských ovcí. Nejlépe ze všech zmíněných kryoprotektorů vyšel glycerol, který měl vysoký procento motility i životaschopných spermií. Trehalóza v extenderu na bázi sojového lecitinu v koncentracích 100Mm vykazovala lepší výsledky než v koncentraci 50Mm, naopak blokátor ledu 1,4cyklohexandiolu vykazoval lepší výsledky v koncentraci 50mM než v koncentraci 200mM.

I přes využití kryoprotektiv v ředidlech dochází k poškození spermií při procesu zmrazování a rozmrazování inseminačních dávek, a proto je tedy důležité se v tomto odvětví zlepšovat.

5 Seznam literatury

- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., el Amiri, B. 2018. a Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 192 . 6–17. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.03.019.
- Al-Mutary, M. G. 2021. Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review. *Journal of King Saud University - Science*. 33 (1). 101226. doi: 10.1016/J.JKSUS.2020.10.023.
- Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., Paz, P. de, Anel, L. 2019. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*. 54 (S4). 32–40. doi: 10.1111/RDA.13523.
- Alvarez, M. C. L., Rola, L. D., Duarte, J. M. B. 2020. Comparison between Three Cryoprotectants in the Freezing of Mazama americana Semen Collected by Artificial Vagina. *Biopreservation and Biobanking*. 18 (5). 351–357. doi: 10.1089/BIO.2020.0012/ASSET/IMAGES/LARGE/BIO.2020.0012_FIGURE1.JPEG.
- Amann, R. P., Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81 (1). 5-17.e3. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.004.
- Avdi, M., Banos, G., Stefos, K., Chemineau, P. 2004. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology*. 62 (1–2). 275–282. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.10.004.
- Bai, Y. Y., Xu, X., Yu, X. J., Guo, J., Dong, X. X., Wang, X. Y., Zhao, Z. A., Wang, J. 2020. Skimmed Milk Diluent Promotes the Sperm Motility and Conception Rate of Dorper Sheep Compared to Vitamin B12 Diluent. *Cryo Letters*. 41 (6). 358–364. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33990813/>
- Bancheva, T. (B., Stoycheva, S. (S., Dimitrova, T. (D., Markov, N. (M. 2021. Web of Science. . Retrieved September 7, 2021, from <https://www-webofscience-com.infozdroje.czu.cz/wos/woscc/full-record/WOS:000686570700033>
- Bohlool, Z., Mohammadi, M., Mehr, M. R. A., Hossein-Zadeh, N. G. 2015. Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents. *Animal Production Science*. 55 (5). 666–671. doi: 10.1071/AN13431.

- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50 (5). 699–706. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00175-7.
- Bucak, M. N., Keskin, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Başpınar, N., Cenariu, M. C., Bilgili, A., Öztürk, C., Kurşunlu, A. N. 2013. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology*. 67 (1). 34–39. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2013.04.007.
- Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., Waberski, D. 2016. a Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*. 85 (9). 1507–1527. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.01.002.
- Bucak, Mustafa N., Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 73 (1–3). 103–108. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.12.001.
- Bucak, Mustafa Numan, Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Ulutaş, P. A. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*. 81 (1). 13–17. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2008.10.003.
- Bucek Pavel, S. J., Škaryd, R. J. 2020. ČMSCH, a.s. - Ročenky chovu ovcí a koz. . Retrieved September 6, 2021, from <https://www.cmsch.cz/plemenarska-prace/ku-kontrola-uzitkovosti/chovatelske-rocenky/rocenky-chovu-ovci-a-koz/>
- Carrera-Chávez, J. M., Quezada-Casasola, A., Pérez-Eguia, E., Itzá-Ortíz, M. F., Gutiérrez-Hernández, J. L., Quintero-Elisea, J. A., Tórtora-Pérez, J. L. 2016. Sperm quality in naturally infected rams with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*. 144 . 220–224. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2016.09.021.
- Correia, L. F. L., Espírito-Santo, C. G., Braga, R. F., Carvalho-de-Paula, C. J., da Silva, A. A., Brandão, F. Z., Freitas, V. J. F., Ungerfeld, R., Souza-Fabjan, J. M. G. 2021. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 98 . 194–200. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2020.11.001.
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., Akalin, P. P., Ataman, M. B., Ömür, A. D., Güngör, Ş., Küçükğünay, S., Özkalp, B., Sariözkan, S. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*. 89 (3). 426–431. doi: 10.1016/J.RVSC.2010.03.025.

- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., Akalin, P. P. 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*. 63 (1). 1–6. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2011.04.001.
- Cseh, S., Faigl, V., Amiridis, G. S. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130 (3–4). 187–192. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.01.014.
- David, I., Druart, X., Lagriffoul, G., Manfredi, E., Robert-Granié, C., Bodin, L. 2007. Genetic and environmental effects on semen traits in Lacaune and Manech tête rousse AI rams. *Genetics Selection Evolution*. 39 (4). 405–419. doi: 10.1051/GSE:2007011.
- de Lima Júnior, D., de Carvalho, F., da Silva, F., do N Rangel, A., Novaes, L., Difante, G. 2016. Intrinsic factors affecting sheep meat quality: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 29 (1). doi: 10.17533/UDEA.RCCP.V29N1A01.
- Dewry, R. K., Gohain, S. 2018. Effect of Vitamin E on the Quality of Frozen Ram Semen. . doi: 10.30954/2277-3371.01.2018.7.
- Dzul-Rosado, K., Peniche-Lara, G., Tello-Martín, R., Zavala-Velázquez, J., Pacheco, R. de C., Labruna, M. B., Sánchez, E. C., Zavala-Castro, J. 2013. *Rickettsia rickettsii* isolation from naturally infected *Amblyomma parvum* ticks by centrifugation in a 24-well culture plate technique. *Open Veterinary Journal*. 3 (2). 101–5. doi: 10.4314/OVJ.V3I2.
- Erlac, E. (E., Lutkic, A. (L., Soljagic, I. (S. (n.d.) Web of Science. . Retrieved September 6, 2021, from <https://www-webofscience-com.infozdroje.czu.cz/wos/woscc/full-record/WOS:A1996UN93200002>
- Eisenberg, D. P., Taylor, M. J., Rabin, Y. 2012. Thermal expansion of the cryoprotectant cocktail DP6 combined with synthetic ice modulators in presence and absence of biological tissues. *Cryobiology*. 65 (2). 117–125. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2012.04.011.
- Espina-Ávila, J. A., Magaña-Monforte, J. G., Aké-Villanueva, J. R., Aké-López, J. R. 2021. Effect of the use of vitamin “E” in the diluent on the viability of ram sperm. *Tropical Animal Health and Production*. 53 (2). doi: 10.1007/S11250-021-02764-6.
- Fernandez-Abella, D., Preve, M. O., Villegas, N. 2003. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*. 60 (1). 21–26. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01041-5.
- Fraser, L., Strzezek, J., Kordan, W. 2014. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*. 147 (3–4). 119–127. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.04.010.

- Gamčík P., Kozumplík J. a kolektiv, 1984: Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda, Bratislava.
- Gil, J., Rodriguez-Irazaqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 59 (5–6). 1157–1170. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01178-0.
- Gouletsou, P. G., Fthenakis, G. C. 2015. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology*. 181 (1–2). 130–135. doi: 10.1016/J.VETMIC.2015.07.016.
- Graham, J. K. 1996. Analysis of Stallion Semen and its Relation to Fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 12 (1). 119–130. doi: 10.1016/S0749-0739(17)30299-7.
- Hafez ESE, Hafez B, editors. 2000. *Reproduction in Farm Animals* 7 edition. WileyBlackwell, Philadelphia.
- Hamedani Ma, T. A., Ahangari Yj 2013. Účinky suplementace vitamínem B 12 na kvalitu ovčích spermií . Retrieved April 21, 2022, from <https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/128222>
- HAMPL, Vladimír, et al. 2012. Fluorescenční mikroskopie (online)
- Hegedúšová, Z., Štolc, L., Louda, F., Čunát, L., Vejnar, J. (n.d.) EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS ON RAM SPERM TRAITS DURING STORAGE. .
- Hitit, M., Özbek, M., Ayaz-Guner, S., Guner, H., Oztug, M., Bodu, M., Kirbas, M., Bulbul, B., Bucak, M. N., Ataman, M. B., Memili, E., Kaya, A. 2021. Proteomic fertility markers in ram sperm. *Animal Reproduction Science*. 235 . 106882. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106882.
- Holman, B. W. B., Malau-Aduli, A. E. O. 2012. A Review of Sheep Wool Quality Traits. Email: Aduli.MalauAduli@utas.Edu.Au; *Annual Review & Research in Biology*. 2 (1). 1–14. Retrieved from www.sciencedomain.org
- Holt, W. v. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1–3). 3–22. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00152-4.
- HORÁK, František. 1999. *Chov ovcí*. Brázda, Praha
- HORÁK, F. A KOL. 2012. *Chováme ovce*. Brázda, Praha
- Horák, F., Treznerová, K. 2010. *Světový genofond ovcí a koz*. Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR. Brno.

- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M. J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*. 96 (1). 58–63. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2010.11.010.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D.,
- Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 167 . 103–108. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.02.013.
- Juyena, N. S., Stelletta, C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33 (4). 536–551. doi: 10.2164/JANDROL.110.012583.
- Kheradmand. A, Homayoun, b., j., a. 2006. , January 1 comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. . *Iranian journal of veterinary research (ijvr)*.
Isbn: 3333333333. Retrieved from <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=52882>
- Korkmaz, F., Çil, B. 2020. The use of flow cytometry in semen quality analyses. *Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 15 (1). 76–83. doi: 10.17094/ATAUNIVBD.614120.
- Kos. V. Andrlíková. M, Ledabylová A., Marková. B., Koudelová. A., Novotný. R., Vránová. L., Čech. S., M. (2019) *Příručka pro praktická cvičení z andrologie*. .
- Kuo, T.-Y., Gwo, J.-C. 2021. Quality assessment of cryopreserved Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) sperm through ultrastructural and flow cytometry analysis. *Cryobiology*. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2021.09.005.
- Larsen John WA 2021. Ram Reproductive Management - Management and Nutrition - Merck Veterinary Manual. . Retrieved September 16, 2021, from <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-sheep/ram-reproductive-management?query=Ram%20Management>
- Larsen WA John 2021. Ram Reproductive Management - Management and Nutrition - Merck Veterinary Manual. . Retrieved February 28, 2022, from <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-sheep/ram-reproductive-management?query=Ram%20Management>
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., Quan, G. 2019. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking*. 17 (2). 171–182. doi: 10.1089/BIO.2018.0113/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG.

- Macías, A., Martín, E., Laviña, A., Ferrer, L. M., Lidón, I., Rebollar, R., Tejedor, M. T. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow device. *Animal Reproduction Science*. 221 . 106551. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2020.106551.
- Maddipatla, R., Tankam, P. 2022. Development of high-speed, integrated high-resolution optical coherence microscopy and dual-channel fluorescence microscopy for the simultaneous co-registration of reflectance and fluorescence signals. *Optics and Lasers in Engineering*. 149 . 106823. doi: 10.1016/J.OPTLASENG.2021.106823.
- Maksimović, N., Milovanović, A., Barna, T., Petrović, V. C., Pantelić, V., Lazarević, M., Stojanov, I. 2018. Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science*. 48 (4). 717–723. doi: 10.4314/sajas.v48i4.13.
- Masoudi, R., Zare Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A., Sharafi, M. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 74 . 77–80. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2016.11.012.
- Mattner, P. E., Voglmayr, J. K. 1962. A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2 (4). 78–81. doi: 10.1071/EA9620078.
- Milczewski, V., Chahad-Ehlers, S., Spencoski, K. M., Morais, R. N., Thomaz Soccol, V. 2015. Quantifying the effect of seasonality on testicular function of Suffolk ram in lower latitude. *Small Ruminant Research*. 124 . 68–75. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2014.12.012.
- Marvan, F a KOL. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, Praha
- Maurya, V. P., Sejian, V., Kumar, D., Naqvi, S. M. K. 2010. Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94 (6). e308–e317. doi: 10.1111/J.1439-0396.2010.01012.X.
- Milerski, I. M. 2016. *Metodika uchování genetického zdroje zvířat Plemeno: Valašská ovce*. .
- Mocé, E., Graham, J. K. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 105 (1–2). 104–118. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2007.11.016.
- Mohapatra, A., Shinde, A. K., Singh, R. 2019. Sheep milk: A pertinent functional food. *Small Ruminant Research*. 181 . 6–11. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2019.10.002.

- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S. 2017. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*. 100 (2). 1541–1554. doi: 10.3168/JDS.2016-11646.
- Najafi, A., Daghigh-Kia, H., Dodaran, H. V., Mehdipour, M., Alvarez-Rodriguez, M. 2017. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 177 . 35–41. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.12.004.
- Němeček Tomáš (n.d.) Valašská ovce – Genetické zdroje. . Retrieved April 17, 2022, from <http://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/ovce/narodni-program-ovce-valasska-ovce/>
- Ntemka, A., Kiossis, E., Boscós, C., Theodoridis, A., Kourousekos, G., Tsakmakidis, I. 2019. Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Ruminant Research*. 178 . 15–17. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2019.07.004.
- Ondruch, T. (n.d.) PASME OVCE, VALAŠI I N F O R M A C E PRO CHO VATELE OVCÍ.
- Osinowo, O. A., Ahmed, M. S., Ekpe, G. A. 1988. Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different ages. *Theriogenology*. 29 (2). 381–386. doi: 10.1016/0093-691X(88)90241-5.
- Osuagwuh, U. I., Palomo, M. J. 2017. Effect of semen washing on thawed ram spermatozoa subjected to a four hour post-thawing thermal evaluation test. *Small Ruminant Research*. 155 . 81–86. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2017.09.010.
- Öztürk, A. E., Bodu, M., Bucak, M. N., Ađır, V., Özcan, A., Keskin, N., İli, P., Topraggaleh, T. R., Sidal, H., Bařpınar, N., Dursun, ř. 2020. a The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. *Cryobiology*. 95 . 157–163. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2020.03.008.
- Paul, R. K., Kumar, D., Singh, R. 2021. Carboxymethyl cellulose and glycerol act synergistically as cryoprotectant during cryopreservation of ram semen. *Cryobiology*. 101 . 61–66. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2021.06.001.
- Plant TM, Zeleznik AJ. 2014. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Academic Press.
- PLOEM, J. S. 1999. Fluorescence Microscopy. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. 3–13. doi: 10.1016/B978-012447836-7/50003-8.
- Ponnampalam, E. N., Holman, B., Scollan, N. 2016. Sheep: Meat. *Encyclopedia of Food and Health*. 750–757. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00620-6.

- Pugh D. G., N. (Nickie) B. 2012. Sheep & Goat Medicine . Retrieved from https://books.google.cz/books?id=s-Z311q6C1cC&pg=PA168&dq=Macroscopic+evaluation+of+sperm+ram&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiOv_-8sMj0AhVOQ_EDHda-BcQQ6AF6BAgLEAI#v=onepage&q=Macroscopic%20evaluation%20of%20sperm%20ram&f=false
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63 (3). 215–225. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2005.02.015.
- Quan, G. B., Li, D. J., Ma, Y., Zhu, L., Lv, C. R., Hong, Q. H. 2015. Cryopreservation of ram spermatozoa in the presence of cyclohexanhexol-derived synthetic ice blocker. *Small Ruminant Research*. 123 (1). 110–117. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2014.11.007.
- Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Zafar, Z., Naseer, A., Hussain, I., Blesbois, E., Santiago-Moreno, J. 2018. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*. 122 . 61–67. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.09.003.
- Rateb, S. A., Khalifa, M. A., Abd El-Hamid, I. S., Shedeed, H. A. 2020. Enhancing liquid-chilled storage and cryopreservation capacities of ram spermatozoa by supplementing the diluent with different additives. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 33 (7). 1068. doi: 10.5713/AJAS.19.0338.
- REECE W. O., 2011: Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat, překlad: Jiří Cibulka a et.al., Grada, Praha.
- Roostaei-Ali Mehr, M., Chambary, B., Ghavi Hossein-Zadeh, N. 2013. Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination. *Small Ruminant Research*. 115 (1–3). 82–85. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2013.09.004.
- Rysová Lucie 2017. Pohlavní cyklus u ovcí - Agropress.cz. . Retrieved December 3, 2021, from <https://www.agropress.cz/pohlavni-cyklus-u-ovci/>
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1–3). 77–111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014 (10). pdb.top071795. doi: 10.1101/PDB.TOP071795.
- Sathe, S. R. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants-A Procedure Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 5 (OCT). doi: 10.3389/FVETS.2018.00266.

- Savvulidi, F. G., Ptacek, M., Malkova, A., Beranek, J., Stadnik, L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science*. 66 (2021) (No. 2). 55–64. doi: 10.17221/226/2020-CJAS.
- Schoenian 2019. *Ovce 201: Rozmnožování u ovce*. . Retrieved March 8, 2022, from <http://www.sheep101.info/201/ewerepro.html>
- Shi, L., Jin, T., Hu, Y., Ma, Z., Niu, H., Ren, Y. 2020. Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5 °C. *Small Ruminant Research*. 189 . 106139. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2020.106139.
- Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169 . 2–5. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.02.004.
- Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., Guerra, M. M. P. 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 137 (1–2). 37–44. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.12.002.
- Silva, S. v., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., Guerra, M. M. P. 2011. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (5). 874–881. doi: 10.1111/J.1439-0531.2011.01758.X.
- Smital Jaroslav 2001. Ředění a konzervace kančího spermatu pro účely inseminace | *Náš chov*. . Retrieved March 12, 2022, from <https://naschov.cz/redeni-a-konzervace-kanciho-spermatu-pro-ucely-inseminace/>
- Sonar BP, Tiwari RP, Poyam MR, Mishra G, Sahu SB. 2014. Effect of post-thaw thermal resistance test on motility, membrane integrity and migration capacity of sperm in Gir bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*.
- Staněk. S. 2009 - Chov ovcí - reprodukce ovcí - inseminace ovcí a koz. Retrieved December 3, 2021, from <https://www.zootechnika.cz/clanky/chov-ovci/reprodukce-ovci/inseminace-ovci-a-koz.html>
- Swanand. R, Sathe. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants- A Procedure Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 5 (OCT). doi: 10.3389/FVETS.2018.00266.
- Tsakmakidis, I. A. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*. 92 (1–3). 126–130. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2010.04.017.

- Vozaf, J., Makarevich, A. v., Balazi, A., Vasicek, J., Svoradova, A., Olexikova, L., Chrenek, P. 2021. Cryopreservation of ram semen: Manual versus programmable freezing and different lengths of equilibration. *Animal Science Journal*. 92 (1). e13670. doi: 10.1111/ASJ.13670.
- Weberová G. 2017. Aspekty spermatologického vyšetření čerstvého ejakulátu beranů. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně
- Xin, M., Tučková, V., Rodina, M., Kholodnyy, V., Dadras, H., Boryshpolets, S., Shaliutina-Kolešová, A., Linhart, O. 2018. Effects of antifreeze proteins on cryopreserved sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm motility variables and fertilization capacity. *Animal Reproduction Science*. 196 . 143–149. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.07.007.
- Yánez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., Yeste, M. 2021. b Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. 106904. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106904.
- Zadeh Hashem, E., Haddad, R., Eslami, M. 2017. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*. 150 . 30–39. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2017.03.002.
- Zemánkový N. 2017. Aspekty spermatologického vyšetření inseminačních dávek beranů. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně

6 Seznam obrázků

Obrázek 1 Valašský beran (osobní archiv).....	11
Obrázek 2 Pipeta pro cervikální inseminaci ovčí, systém MiniTub GmbH (osobní archiv) ...	15
Obrázek 3 Laparoskopická inseminace (Swanand, 2018).....	16
Obrázek 4 Popis spermie (Morel, 2003)	17
Obrázek 5 Odběrová vagína (osobní archiv)	
Obrázek 6 Elektroejakulátor (Kos, 2019).....	21
Obrázek 7 Zobrazení A) pohyb spermii. Zobrazení B) morfologie spermii (Amann & Waberski, 2014)	23
Obrázek 8 Pohled na systém CASA (Amann & Waberski, 2014).....	24
Obrázek 9 Moderní průtokový cytometr NovoCyte model 3000 (osobní archiv)	25
Obrázek 10 Schéma fluorescenčního mikroskopu (Hampl, 2013).....	26
Obrázek 11 Pejety v tekutém dusíku (osobní archiv)	
Obrázek 12 Forma suchého ledu (Hampton,,2015)	28

7 Seznam tabulek

Tabulka 1 Chovný cíl valašské ovce (Milerski, 2016).....	10
Tabulka 2 Vývoj početných stavů populace genetického zdroje valašských ovcí (Němeček, 2020).....	12
Tabulka 3 Složení ovčího mléka (Raynal-Ljutovac et al. 2008).....	12
Tabulka 4 Ceny jehňat a ovcí ve třídě A (Kč/kg ž.hm) (Bucek et al. 2019)	13
Tabulka 5 Složení semenné plazmy u berana (Juyena & Stelletta, 2011).....	18
Tabulka 6 Požadavky na čerstvý beraní ejakulát (Lauda et al. 2009).....	18
Tabulka 7 Složení ředidla na bázi Tris (Larsen WA John, 2021).	
Tabulka 8 Složení citrátového ředidla (L. WA John,2021).	29
Tabulka 9 Moderní kryoprotektory a fertilizační schopnost kryokonzervovaných spermií	38