

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. IVANA HÁJKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chovu a šlechtění zvířat



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



**Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů
ejakulátu u hřebců**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.

Vypracovala:
Bc. Ivana Hájková

Brno 2016



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Ivana Hájková**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Chov koní a agroturistika
Název tématu: **Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu u hřebců**
Rozsah práce: 50

Zásady pro vypracování:

1. Studium doporučené literatury.
2. Pomoc při odběru ejakulátu hřebců a jeho vyšetření.
3. Periodické vyšetření kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu u hřebců
4. Získávání a vyhodnocení podkladů reprodukční výkonnosti hřebců
5. Vyhodnocení dosažených výsledků statistickými metodami
6. Sepsání diplomové práce podle pokynů vedoucího DP a její předání k oponentuře

Seznam odborné literatury:

1. GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. 3. vyd. Bratislava: Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
2. LOUDA, F. *Inseminace hospodárskych zoiřat se základy biotechnických metod*. ČZU Praha, 2001. 225 s. ISBN 80-213-0702-1.
3. VĚŽNÍK, Z. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. VÚVeL Brno, 2004. 197 s. ISBN 80-86895-01-7.

Datum zadání diplomové práce: říjen 2014

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

L. S.


Bc. Ivana Hájková
Autorka práce




prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Vedoucí práce


prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Vedoucí ústavu


doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu u hřebců vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce prof. Ing. Ladislavu Máchalovi, DrSc. za odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Denise Vassové, za částečné vedení při tvorbě diplomové práce. Dále také děkuji panu Ing. Ondřeji Mamicovi Ph. D., za umožnění návštěv v reprodukčním centru hřebčince Tlumačov, státního podniku, za asistenci při zpracování vzorků v laboratoři reprodukčního centra a za ochotu odpovídat a konzultovat mé dotazy.

ABSTRAKT

Hodnocení kvality ejakulátu je důležitým prvkem v hodnocení plodnosti hřebce. Kvalitní ejakulát produkovaný v dostatečném množství je předpokladem pro úspěšnou inseminaci v chovu koní. Za účelem posouzení kvality ejakulátu je používáno mnoho laboratorních metod hodnocení. Vybranými laboratorními metodami se zabývá i tato diplomová práce.

Základními parametry posuzovanými u ejakulátu v této práci jsou hodnocení aktivity, koncentrace spermií v ejakulátu a morfologická analýza spermií. Pro použití ejakulátu na výrobu inseminační dávky je potřeba zhodnotit i objem odebraného ejakulátu. Minimální objem ejakulátu u hřebce by měl být 20 ml. Aktivita čerstvého semene by měla dosahovat minimálně 60 %. Za normální hodnotu koncentrace spermií hřebčího ejakulátu je považováno alespoň 100×10^6 v 1 ml semene. Minimální množství morfologicky normálních spermií v ejakulátu hřebce je požadováno nad hranicí 60 %.

V této diplomové práci byla zkoumána skupina plemenných hřebců ustájených v hřebčinci Tlumačov, státním podniku. Hřebci byly zařazeni do plemnitby pro rok 2015. Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů bylo provedeno u 47 vzorků čerstvého ejakulátu, které byly získávány od 12 plemenů během připouštěcí sezóny. Odběry ejakulátu probíhaly od dubna do července roku 2015. Ihned po každém odběru byl změřen objem odebraného ejakulátu a byla zaznamenána aktivita spermií. K dalšímu hodnocení patřilo počítání koncentrace spermií a hodnocení morfologické stavby spermií.

Pro morfologickou analýzu byly nátěry barveny dvěma metodami – barvení dle B. T. Farellyho a barvení metodou Byghošť. Při analýze bylo zjišťováno procento morfologických vad spermií, které byly rozděleny do následujících kategorií: vady akrozomu, vady hlavičky, vady spojovací části, vady bičíku, abnormálně vyvinuté spermie a nezralé spermie. Součástí výzkumu bylo také teoretické porovnání obou použitých barvicích metod vzhledem k výskytu morfologických vad a odhad korelačních vztahů mezi kvalitativními a kvantitativními ukazateli ejakulátu u hřebců.

Klíčová slova: ejakulát, spermie, hřelec, morfologické vady spermií, hodnocení spermatu

ABSTRACT

Evaluation of semen quality is an important element in the evaluation of stallion fertility. Quality ejaculate produced in sufficient quantities is a prerequisite for successful insemination in horse breeding. To assess the quality of ejaculate is used by many laboratory evaluation methods. Selected methods are also engaged in this thesis.

The basic parameters considering in the ejaculate in this thesis are the evaluation of activity, sperm concentration and morphological sperm analysis. For using ejaculate in producing insemination doses need to be assessed volume of ejaculate too. Minimum volume of the ejaculate of stallions should be 20 ml. The activity of fresh semen should be at least 60 %. Normal sperm concentration value of stallions ejaculate is considered at least 100×10^6 in 1 ml of semen. The minimum amount of morphologically normal stallions sperm is required above the threshold value of 60 %.

In this thesis we studied a group of stallions which were stabled in Zemský hřebčinec Tlumačov, s.p. Stallions were included in breeding season for 2015. Evaluation of quantitative and qualitative parameters were performed od 47 samples of fresh semen, which were collected from 12 stallions during the breeding season. Semen collecting was from April to July 2015. Immediately after each semen collecting was measured volume of ejaculate and sperm activity was recorded. To further evaluation were counting sperm concentration and morphology of sperm evaluation.

For mophological analysis were preparations stained by two methods – B. T. Farelly staining and method Byghoš' (Jaškovski et al. 1968). The analysis was determined by the percentage of morphological sperm defects, which were divided into the following categories: acrosome defects, sperm head defects, sperm mid-piece defects, sperm tail defects, abnormal forms of sperm and immature sperm. The research also used a theoretical comparison of the two methods of stainings due to occurrence of morphological defects and estimate the correlation relationships between qualitative and quantitative parameters of the ejaculated os stallions.

Keywords: stallions ejaculate, sperm, morphological sperm defects, evauation of semen

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Biologie ejakulátu	11
3.2	Spermatogeneze – vývoj spermií	13
3.2.1	Fáze rozmnožování	13
3.2.2	Fáze růstu	14
3.2.3	Fáze zrání	14
3.3	Morfologie spermií.....	17
3.3.1	Hlavička spermie	18
3.3.2	Bičík spermie	19
3.4	Výskyt morfologických vad spermií	20
3.4.1	Morfologické vady hlavičky spermie	22
3.4.1.1	Vady akrozomu	22
3.4.1.2	Vady tvaru a vnitřní struktury hlavičky.....	24
3.4.2	Morfologické vady bičíku spermie	27
3.4.2.1	Vady mitochondriálního oddílu.....	27
3.4.2.2	Vady hlavního oddílu	28
3.4.3	Nezralé spermie	32
3.5	Morfologické vady ve vztahu k plodnosti.....	33
3.6	Metody laboratorního hodnocení ejakulátu	34
3.6.1	Makroskopické metody.....	35
3.6.2	Mikroskopické metody	36
3.6.2.1	Aktivita spermií.....	36
3.6.2.2	Koncentrace spermií	37
3.6.2.3	Morfologické hodnocení spermií	38

3.6.2.4	Testy přežitelnosti a rezistence.....	39
3.6.3	Biochemické metody	40
4	MATERIÁL A METODIKA.....	41
4.1	Materiál	41
4.2	Metodika	45
4.2.1	Odběr ejakulátu.....	45
4.2.2	Hodnocení aktivity.....	46
4.2.3	Hodnocení koncentrace spermií.....	46
4.2.4	Příprava vzorků pro morfologické hodnocení	47
4.2.5	Barvení vzorků pro morfologické hodnocení	47
4.2.5.1	Barvení dle B. T. Farellyho	47
4.2.5.2	Barvení metodou Byghoš'.....	48
4.2.6	Hodnocení morfologických vad spermií.....	48
4.2.7	Statistická analýza.....	49
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
5.1	Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu u jednotlivých hřebců.....	50
5.2	Porovnání barvicích metod u kvalitativních a kvantitativních ukazatelů	62
6	ZÁVĚR	73
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
9	SEZNAM TABULEK	80
10	SEZNAM GRAFŮ	81
11	SEZNAM PŘÍLOH.....	82
12	PŘÍLOHY	83

1 ÚVOD

Umělá inseminace má u koní stejně jako u jiných hospodářských zvířat velký význam. Kvůli nesnadnosti a ekonomické nevýhodnosti převozu koní, nejčastěji převozu klisen za plemeníky, je inseminace čerstvým či mrazeným spermatem hojně využívána. Stejně tak je inseminace využívána pro zvýšení efektivity využití samotných plemeníků. Díky umělé inseminace může plemník pomocí inseminačních dávek oplodnit mnohonásobně více klisen, než při přirozené plemenitbě. Tímto lze získat více potomků od jednoho hřebce a urychlit tak odhad jeho plemenné hodnoty. Další výhodou umělé inseminace je omezení přenosu pohlavních chorob ze samce na samici a naopak. Při odběru je ejakulát podroben laboratornímu vyšetření, díky kterému lze stanovit reprodukční schopnost plemníka a kontrolovat tak stav jeho pohlavních orgánů a produkci semene. Před zařazením hřebce do plemenitby je kontrolována především kvalita ejakulátu, která je jedním z ukazatelů reprodukční výkonnosti.

Kvalita ejakulátu je posuzována na úrovni kvalitativních a kvantitativních ukazatelů. Mezi kvantitativní ukazatele řadíme např. objem, barvu a typický pach ejakulátu. Kvalitativní znaky zahrnují aktivitu, koncentraci spermií v ejakulátu a morfologickou stavbu spermií. Především aktivita a správná morfologická stavba spermií má zásadní vliv na plodnost plemníka. Každá část spermie má svůj specifický úkol, pokud bude tedy nějaká část porušena nebo změněna, spermie nemusí být schopná oplození. Stejně tak pokud je z nějakého důvodu, ať už kvůli narušení morfologické stavby nebo jiných poruch, spermie neschopna pohybu, nemůže se dostat na místo oplození a narušuje tím plodnost plemníka. V případě mražení inseminačních dávek se provádí další funkční vyšetření ejakulátu, které vyžadují speciální laboratorní vybavení. Jedná se o různé testy přežitelnosti, chladové a tepelné testy, které nám ukazují kvalitu ejakulátu pro oplození a vhodnost ke konzervaci.

Kontrolní vyšetření ejakulátu zahrnující základní laboratorní metody před i během připouštěcí sezóny může pomoci odhalit případné poruchy plodnosti. Mírné výkyvy v naměřených hodnotách ejakulátu u jednoho hřebce během sezóny nemusí nutně znamenat poruchu. Kvalita ejakulátu závisí na mnoha vnějších i vnitřních vlivech, jako jsou kvalita ustájení a výživy, aktuální zdravotní stav a psychická pohoda. Významným vlivem je i sportovní využití plemníka.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyšetření ejakulátu plemenných hřebců zařazených do plemenitby pro rok 2015, ustájených v Zemském hřebčinci Tlumačov, státním podniku a hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu. Součástí hodnocení kvalitativních ukazatelů bylo morfologické vyšetření spermií za pomoci dvou rozdílných metod barvení. A dále porovnání výsledků barvicích metod při hodnocení výskytu morfologických vad.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biologie ejakulátu

Ejakulát je popisován jako tekutina skládající se ze dvou složek – buněčná část obsahující spermie a tekutá část, která se nazývá semenná plazma (Marvan a kol., 1992). U hřebců se k těmto složkám přidává ještě hlenovitá část, tzv. hlenová zátka. Tato biologická tekutina je vytvářena u pohlavně dospělých samců ve varletním ústrojí a přídatných pohlavních žlázách. U hřebců je semeno ejakulováno ve 3 frakcích. Hlavní funkcí ejakulátu je zabezpečení oplození samičích pohlavních buněk a podíl na vzniku nových jedinců (Kliment a kol., 1983).

Nejčastěji má ejakulát vzhled bělavé viskózní tekutiny (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992), avšak druhově se mohou vyskytovat rozdíly v konzistenci, barvě, pachu i objemu. Hodnocené parametry ejakulátu mají velkou individuální variabilitu. Rozdíly u jednotlivých zvířat jednoho druhu mohou být způsobeny typem ustájení, výživou, zdravotním stavem, věkem a intenzitou pohlavního využívání samce (Marvan a kol., 1992).

Podstatnou část ejakulátu tvoří semenná plazma vytvářena v přídatných pohlavních žlázách (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Největší podíl (až 95 %) má semenná plazma u hřebce. Biochemicky se semenná plazma druhově velmi liší (Kliment a kol., 1983). Obecně je semenná plazma tvořena anorganickými látkami (např. sodíkem, draslíkem, chlórem a fosforem) a organickými látkami (bílkovinami, cukry, tuky). Mohou se zde také vyskytovat odloupané epitelie z pohlavních cest a další buněčně elementy, jako např. bílé krvinky (Komárek a kol., 1964). Největší význam mají v semenné plazmě sekrety ze žlázy měchýřkovité a předstojné. Sekrety bulbouretrální žlázy jsou důležité v první frakci ejakulátu, kdy mají pročistit vývodné cesty před tím, než zde budou procházet spermie (Holub a kol., 1969). Semenná plazma vytváří příznivé prostředí pro spermie, zabezpečuje jejich výživu a energii a umožňuje pohyb spermií. Přítomnost semenné plazmy také značně zvětšuje objem ejakulátu, což je důležité pro transport semene samičími pohlavními orgány (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Druhou částí ejakulátu tvoří spermie, sice v menším zastoupení tj. 5 %, avšak v ejakulátu jde o nejdůležitější složku. Spermie jsou nositeli zárodečné hmoty a genetické informace, kterou poté předávají do samičí pohlavní buňky. V ejakulátu musí spermie

vykazovat pohyblivost, schopnost přežití a hlavně oplození schopnost (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

U ejakulátu můžeme makroskopicky hodnotit tyto vlastnosti: objem, barva, konzistence, pach, obsah cizích příměsí a další (Kliment a kol., 1983). Objem ejakulátu může značně kolísat od 30 do 200 ml dle plemenné příslušnosti hřebců. U teplotokrevných hřebců lze na jeden odběr získat průměrně 45 ml, u středně těžkých 60 ml a u těžkých plemen lze získat 150 ml (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Věžník a kol. (2000) uvádí, že minimální objem ejakulátu na jeden odběr by měl být 20 ml. U hřebců je typická barva semene mléčně bílá až šedobílá s modravým odstínem, což závisí na koncentraci spermií v ejakulátu (Gamčík a kol., 1988). Konzistence je spíše vodnatá, pokud však nebyl odstraněn hlen, může být semeno hustšího charakteru (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Dále lze určovat pH semene. To se pohybuje nejčastěji v rozmezí 6,7 – 7,5. Pokud naměříme pH vyšší než 7,8, tedy výrazně alkalické, znamená to, že ejakulát nebyl získán celý. První vodnatá frakce má totiž pH od 8,1 do 8,8 (Louda a kol., 2001). Podle Gamčíka, Kozumplíka a kol. (1992) se výrazně alkalické pH ejakulátu ($\text{pH} > 7,8$) vyskytuje u velmi řídkých ejakulátů. U nižších hodnot pH, např. při pH 6, pozorujeme ustávání pohybu spermií (Louda a kol., 2001).

Celkem se v ejakulátu vyskytuje 6 až 48 miliard spermií. Toto číslo je v závislosti na objemu a koncentraci spermií v ejakulátu. Dále je počet spermií ovlivněn frekvencí odběru semene (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Koncentrace spermií se může pohybovat v rozmezí $0,1 - 0,3 \times 10^6/\text{mm}^3$. Koncentrace $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$ může dosahovat frakce bohatá na spermie. Jako husté semeno označujeme to, které má koncentraci větší než $0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$, středně husté semeno je s koncentrací $0,08 - 0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ a řídké semeno je takové, které má koncentraci $0,03 - 0,08 \times 10^6/\text{mm}^3$ (Louda a kol., 2001). Oligospermie nastává při koncentraci pod $0,03 \times 10^6/\text{mm}^3$ (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Gamčík a kol. (1988) v požadavcích na čerstvé sperma hřebce uvádí, že minimální koncentrace spermií v 1 mm^3 je 100 000. Do celkového počtu spermií se také počítají patologicky změněné spermie. Počet patologických spermií celkem nesmí přesáhnout 40 %, z toho může být maximálně 15 % primárních změn (Věžník a kol., 2000).

K vlastnostem ejakulátu patří také pohyb spermií. Správný pohyb by měl být přímočarý, směrem za hlavičkou. V ejakulátu zdravého hřebce se vyskytuje od 65 do 80 % spermií pohybujících se progresivním pohybem. Dále můžeme v ejakulátu

pozorovat spermie s nekoordinovaným pohybem nebo i spermie nepohyblivé. Pohyb spermií však závisí také na teplotě a pH (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Čerstvý ejakulát vykazuje typický hřebčí pach. Nežádoucí jsou přimíseniny, jako je moč, krev a hnis. Dále se také v ejakulátu nesmí vyskytovat trus a chlupy, což souvisí se správnou hygienou odběru spermatu (Gamčík a kol., 1988).

3.2 Spermatogeneze – vývoj spermií

Vývoj a dozrávání samčích pohlavních buněk začíná s nástupem pohlavní dospělosti samce a končí jeho senilitou. Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlete v pravidelných cyklech (Kliment a kol., 1983). Dle Marvana a kol. (1992) lze cyklus vývoje spermií rozdělit na dvě hlavní etapy. První etapou je tzv. spermatocytogeneze, ve které dochází ke vzniku spermatid meiotickým a mitotickým dělením. Ve druhé etapě pak probíhá přeměna kulatých spermatid na zralé spermie, což nazýváme spermiogenezi (Šmerha a kol. 1964).

Spermatogeneze je specializovaný proces buněčného dělení a změn (Cupps, 1991). Stočené semenotvorné kanálky se zakládají už během embryonálního vývoje a můžeme zde najít prvopohlavní buňky (gonocyty) a podpůrné buňky (Sertoliho buňky). Po narození jedince vznikají z gonocytů mateřské buňky – spermatogonie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Sertoliho buňky představují spolu se zárodečným epitelem podporu pro vývoj zárodečných buněk ve spermie, a Leydigovy buňky, které vyplňují prostor v pojivové tkáni mezi semenotvornými kanálky, produkují hormony pro kontrolu spermatogeneze. Každý cyklus v semenotvorných kanálcích u hřebce trvá 12 dní a celková doba spermatogeneze je asi 57 dní (Cupps, 1991).

Marvan a kol. (1992) uvádí, že spermatocytogenezi můžeme rozdělit do třech fází – fáze rozmnožování, růstu a zrání.

3.2.1 Fáze rozmnožování

Spermatogeneze probíhá po celý dospělý život samce, současně zralé spermie kontinuálně odcházejí, a proto je nutné, aby se epitel semenotvorných kanálků pravidelně obnovoval (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Tato rozmnožovací fáze je charakterizována několikanásobných dělením spermatogonií v semenotvorných kanálcích. Současně probíhá jejich diferenciací dělením na spermatogonie typu A a intermediální spermatogonie, ze které následně vzniká spermatogonie typu B (Marvan

a kol., 1992). Spermatogonie jsou uloženy v systému dutinek Sertoliho buněk a probíhá zde mitotické dělení všech fází spermatogonií. Představují pásmo mitotické činnosti – pásmo mitózy (Holub a kol., 1969). Změnami v jádře a dalším růstem spermatogonií typu B začíná další fáze (Marvan a kol., 1992).

3.2.2 Fáze růstu

Podle Klimenta a kol. (1983) se spermatogonie typu B dále meioticky dělí na spermatocyty I. řádu, které se dalším přibíráním zásobních látek zvětšují a představují tak fázi růstu. Primární spermatocyty, jak se také nazývají, tvoří druhou řadu buněk v zárodečném epitelu. Dále se tyto buňky dostávají do lumen semenotvorného kanálku, kde později probíhá další důležité dělení – meióza. Meiotické dělení je již základem další fáze spermatocytogeneze – fáze zrání (Marvan a kol., 1992).

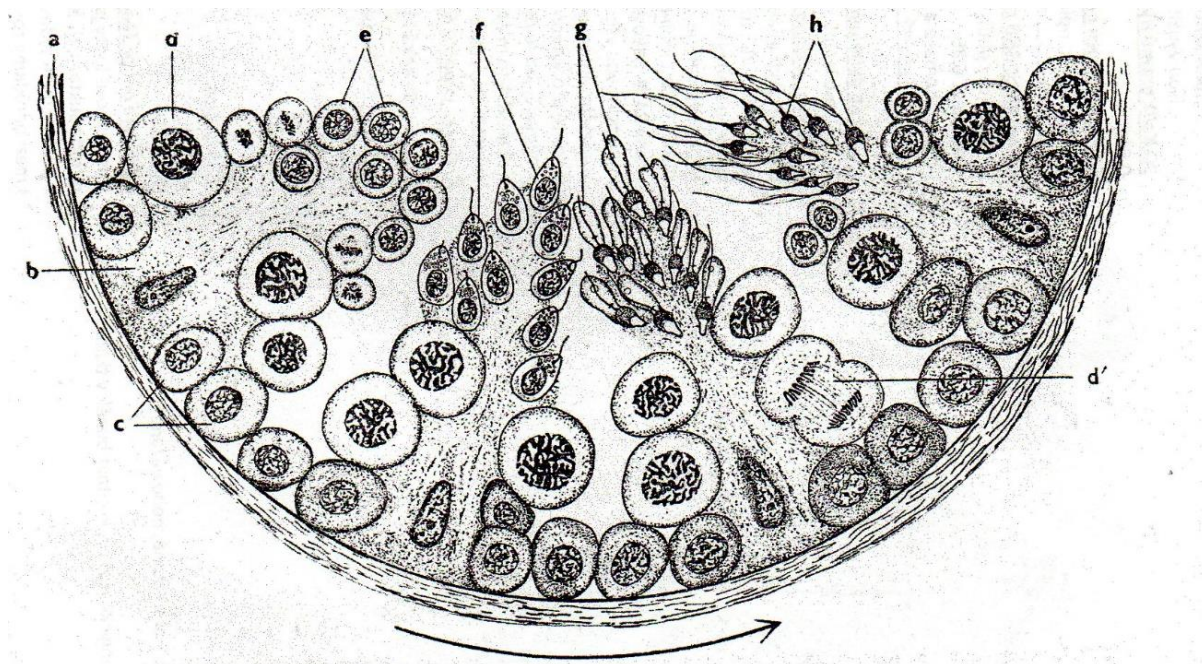
3.2.3 Fáze zrání

Pro tuto fázi je charakteristické dělení buněk meiózou, při kterém dochází k redukci počtu chromozomů (Šmerha a kol., 1964). Jedná se o dvě po sobě jdoucí buněčné dělení – první a druhé zrací dělení. V první fázi meiózy vznikají ze spermatocytů I. řádu spermatocyty II. řádu neboli sekundární spermatocyty. Následuje druhé zrací dělení, při kterém ze sekundárních spermatocytů vznikají spermatidy (Marvan a kol., 1992). Po tomto dělení mají buňky pouze haploidní počet chromozomů.

Jak popisuje Kliment a kol. (1983) z jednoho primárního spermatocytu vznikají dva sekundární spermatocyty. Dále z každého sekundárního spermatocytu druhým dělením vznikají dvě spermatidy, tudíž na konci meiózy máme 4 spermatidy.

Během spermatogeneze je stadium spermatocytů I. řádu a meiózy považováno za kritickou fázi. Pokud dojde k narušení procesu v této fázi, hrozí, že vzniknou spermie neschopné oplození. Toto může nastat především u mladých jedinců (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Spermatidy vstupují do poslední etapy spermioogeneze. Jsou nejpočetněji zastoupenými buňkami s zárodečným epitelu semenotvorných kanálků a vytváří v nich 3 – 4 vrstvy (Holub a kol., 1969). Tyto buňky už se dále nedělí, vzniká tak stejný počet spermií. Genetický potenciál ve spermatidě se během metamorfózy zachová, pouze jádro se mění na hlavičku spermie a z organel a cytoplazmy vzniká bičík (Kliment a kol., 1983).



Obrázek 1 Schéma spermatogeneze: a – bazální blanka, b – Sertoliho buňka, c – spermatogonie, d – spermatocyt I. řádu, d' – dělicí se spermatocyt I. řádu, e – spermatocyty II. řádu, f – spermatidy, g – spermatidy přeměňující se ve spermie, h – spermie. Šipka znázorňuje směr od nejmladších k nejstarším vývojovým fázím spermie (Komárek a kol., 1964)

Proces morfologické přeměny – metamorfózy – zahrnuje několik stadií. Jedná se o se Golgiho stadium, stadium akrozomové čepičky, stadium kaudální manžety a stadium zrání spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Marvan a kol. (1992) uvádí, že první změny probíhají v organele buňky zvané Golgiho komplex – podle toho Golgiho stadium. Zde se začíná formovat akrozomální váček. Jeho základ se tvoří u jádra spermatidy a centrioly se přesouvají k okraji buňky. Z jednoho centriolu přiloženého k buněčné membráně později vyrostou vlákna bičíku (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Založený akrozomální váček, který se začíná zvětšovat a spojovat s jádrem, představuje stadium akrozomové čepičky. Nakonec pokrývá akrozomová čepička celou přední část jádra spermatidy (Kliment a kol., 1983). Postupně se v akrozomálním váčku začínají hromadit hydrolytické enzymy a jiné látky a mění se v akrozom (Marvan a kol., 1992). Pro vývoj bičíku jsou důležité centrioly postupující do protilehlého postavení s akrozomem. Z distálního centriolu se formuje

osové vlákno bičíku a v proximálního centriolu vzniká tzv. Jensenův kroužek, který odděluje mitochondriální a hlavní oddíl bičíku. Proximální centriol vytváří také strukturu krčku spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Další stadium – kaudální manžety – charakterizuje vznik přechodné vývojové součásti spermie – kaudální manžety. Ta se podílí na stavbě implantační jamky při bázi hlavičky a spojovacího oddílu bičíku. Spermatida nabývá tvaru hrušky, což je dáno tím, že v tomto stádiu se začíná hromadit cytoplazma v okolí osového vlákna (Kliment a kol., 1983). Z původně kulaté spermatidy se začíná formovat oválná hlavička spermie. V této fázi je dokončeno tvarování jádra a kondenzace nukleoplazmy (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Hromadící se cytoplazma se odlučuje a pokrývá celou spermii cytoplazmatickou membránou (Marvan a kol., 1992).

Posledním stadiem je stadium zrání spermií. V této fázi se dokončuje vývoj akrozomu a bičíku spermie – posledním vyvíjejícím oddílem je mitochondriální oddíl (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Při vývoji mitochondriálního oddílu se na zrajících spermiích zachovává zbytek cytoplazmy, tzv. cytoplazmatická kapka. Spermie dozrávají, když se nepotřebná protoplazmatická kapka ztratí, a postupně se spermie uvolňují z cytoplazmy Sertoliho buněk (Kliment a kol., 1983).

Šmerha a kol. (1964) uvádí, že cytoplazmatická kapka se odlučuje nejčastěji až v nadvarleti. Pokud ovšem samec přílišně pohlavně zatížen, do ejakulátu se dostávají i nezralé spermie, které můžeme snadno pozorovat podle zůstávající cytoplazmatické kapky.

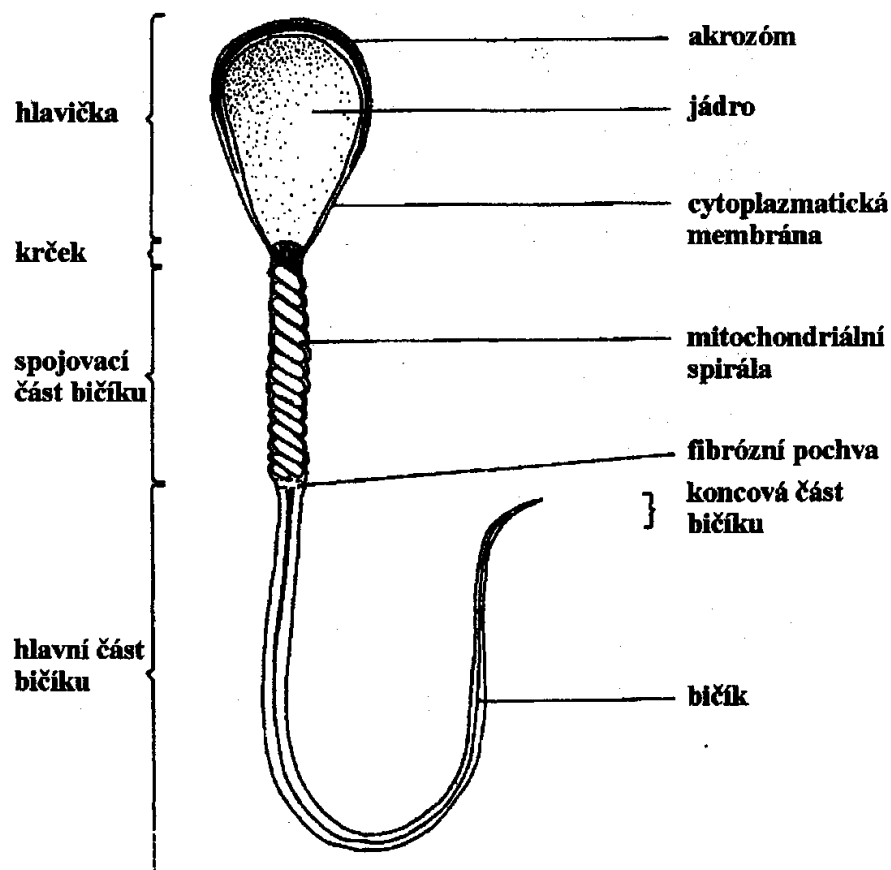
Dle Brita (2007) dochází ke konečnému dozrávání spermií v nadvarleti a zde také získávají svoji schopnost oplození. Tento proces může trvat 9 – 14 dní.

„Znalost průběhu spermatogenní činnosti varlat plemeníků jednotlivých druhů hospodářských zvířat je důležitá při jejich využívání v umělé inseminaci. Na základě denní produkce spermií se u plemeníků jednotlivých druhů zvířat stanovuje frekvence odběru spermatu, která zajišťuje efektivní využívání jejich genetického potenciálu při realizaci šlechtitelského programu. Denní produkce spermií je ovlivňována přímo hmotností a velikostí varlat, spermatogenní aktivitou parenchymu varlat, velikostí ocasu nadvarlete a nepřímo pak ročním obdobím, nervovým typem plemenika, věkem, technikou chovu a ostatními vlivy“ (Louda a kol., 2001, s. 193).

3.3 Morfologie spermii

Při oplození má spermie plnit tyto základní funkce: aktivní vyhledání vajíčka (samičí pohlavní buňky), průnik do této samičí buňky a přenos genetické informace. Tomuto napomáhá samotná morfologická stavba spermie – bičík pro aktivní pohyb, akrozom zabezpečující penetraci do vajíčka a v jádru hlavičky je uložena genetická informace (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Jak již bylo uvedeno, spermie vznikají v semenotvorných kanálcích varlat. Normální zdravá spermie se skládá ze dvou základních částí – hlavičky a bičíku (Holub a kol., 1969). Podle Brita (2007) je zde další část spermie, a to krček, který spojuje hlavičku s bičíkem. Rozměry hřebčí spermie v μm jsou: hlavička spermie – délka 6,27 a šířka 3,21; bičík spermie – spojovací část 8,6 a hlavní část 43,7; délka celé spermie 57,55 – 59,7 (Věžník a kol., 2000).



Obrázek 2 Morfologická struktura spermie (Louda a kol., 2001)

3.3.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie (*caput spermii*) je oválně protáhlá, kdy přední třetina hlavičky je rozšířená. Hlavička je relativně plochá a na podélném průřezu má přibližně eliptický tvar (Brito, 2007). Je tvořena především z jádra spermatidy, v přední části je pokryta akrozomem, v zadní části pak hlavičku pokrývá pouze cytoplazmatická membrána a postakrozomální čepka. Celá hlavička spermie je pokryta buněčnou membránou, která pak přechází na bičík. Z celkové hmotnosti spermie připadá na hlavičku 51 % hmotnosti a na bičík 49 % hmotnosti celé spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Důležitou funkcí hlavičky při oplození je přenos dědičného materiálu, přičemž musí být plně vyvinutý akrozomální systém a nukleoplazma (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Nukleoplazma, homogenní a kompaktní struktura, vyplňuje téměř celý prostor hlavičky, proto je tvar hlavičky podmíněn tvarem nukleoplazmy. Hlavička by měla mít celkově symetrický tvar, jinak ji lze považovat za projev choroby a příčinu poruch plodnosti. Nachází se zde haploidní počet chromozomů a chromatin (komplex deoxyribonukleové kyseliny a proteinů) je uspořádán ve formě kompaktní hmoty. Jádro hlavičky také obaluje dvojvrstvá jaderná membrána, která je u báze hlavičky o něco silnější (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). „*Bazální část hlavičky je prohloubená v podobě implantační jamky hlavičky, do níž se vkládá hlavice bičíku, která slouží ke spojení bičíku s hlavičkou*“ (Marvan a kol., 1992, s. 57).

Přední části hlavičky pokrývá akrozom. Jedná se o cytoplazmatický čepičkovitý útvar, který se nachází mezi nukleovou a buněčnou membránou (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Akrozom vyplňuje tzv. akrozomová hmota, která je složena z mnoha enzymů (hyaluronidáza, akrozín a další). Tyto enzymy jsou nedílnou součástí při narušení vnějších obalů oocyty a proniknutí spermie do vajíčka (Marvan a kol., 1992).

Tu část hlavičky spermie, která není pokrytá akrozomem, pokrývá postakrozomální čepka. Pokud je spermie neporušená, je spojená s buněčnou membránou (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Podle Klimenta a kol. (1983) pokrývá tato vrstva až 40 % zadní části jádra. Na rozdíl od akrozomu, který je velmi citlivý na osmotické změny a může podléhat degenerativním změnám, je postakrozomální čepka odolnější vůči vnějším vlivům (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.3.2 Bičiek spermie

Pohybovým orgánem spermie je její bičiek (*flagellum spermii*), který je cytoplazmatického původu. Podle struktury a funkční podstaty dělíme části bičieku na krček, spojovací část, hlavní a koncový oddíl (Holub a kol., 1969).

Krček spermie je krátký spojovací úsek mezi hlavičkou a bičíkem. Z ventrální strany je krček připevněn k bazální části hlavičky spermie a zezadu připojen k vláknům bičieku (Brito, 2007). Podle jeho morfologického základu můžeme krček označovat jako centriolový (implantační) oddíl. Je totiž složen ze dvou centriol (proximální a distální) a segmentové chordy. Strukturálně se jedná o nejsložitější část spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Osové vlákno (probíhající celým bičíkem a tvořící tak jeho podklad) navazuje na distální centriol a je obklopeno různými útvary lokalizovanými podle částí bičieku (Marvan a kol., 1992).

Kromě centriol obsahuje krček i několik malých mitochondrií. V místě, kde se dvě kolmé mitochondrie začínají zamotávat do mitochondriálního helixu, začíná mitochondriální (střední) oddíl neboli spojovací část bičieku. Tento oddíl je tvořen osovým vláknem (axonemou), které je obklopeno vnějšími hustými vlákny a mitochondriálním pláštěm (Brito, 2007). Vnitřní kruh osového vlákna je tvořen devíti dubletovými vlákny. Jedno z vláken je vždy duté (mikrotubuly) a druhé plné. Z každého z těchto elementů vystupují dva výběžky tvořeny bílkovinou zvanou dynein – jedná se o kontraktilní bílkovinu bičieku, která zabezpečuje pohyb spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Dubletová vlákna sahají od jejich vzniku v krčku, přes celou délku střední oddílu, až k hlavnímu oddílu bičieku. V proximální části středního oddílu jsou vlákna nejtlustší a postupně se zužují směrem ke konci hlavního oddílu. V koncovém oddílu bičieku už tyto vlákna nenajdeme (Brito, 2007).

Na střední oddíl navazuje hlavní část bičieku. Je to nejdelší část bičieku i celé spermie. Stejně jako u mitochondriálního oddílu, i tento oddíl je tvořen komplexem osových vláken (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Zvláštností této části je, že je obalen fibrózní pochvou z proteinových vláken. Fibrózní pochva končí několik mikrometrů od konce bičieku, kde hlavní oddíl přechází v koncový oddíl bičieku. Proteinová vlákna poskytují strukturální podporu a pružnost pro efektivní přenos pohybu z krčku na souvislý pohyb bičieku (Brito, 2007).

Koncový (terminální) oddíl bičíku tvoří pouze osová vlákna tvořená dvojicí mikrotubul. Ke konci bičíku dvojice mikrotubulů zaniká a zůstávají zde pouze jednoduché mikrotubuly (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Konec bičíku, celý bičík i hlavičku pokrývá souvislá dvojvrstvá cytoplazmatická membrána, která chrání celou spermii. Fosfolipidy tvořící cytoplazmatickou membránu jsou velmi citlivé na změny vnějšího prostředí, jako je změna osmotického tlaku, změna teploty atd. Např. při propírání spermií v roztoku NaCl se může tato vrstva poškodit a odhalit tak akrozom a mitochondriální oddíl (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.4 Výskyt morfologických vad spermií

Hodnocení morfologické stavby spermií, stejně tak hodnocení aktivity spermií, je jedním z nejdůležitějších ukazatelů kvality ejakulátu. Jedná se o poměrně náročnější úkol než hodnocení kvantitativních ukazatelů, protože vyžaduje určité znalosti a zkušenosti a je také časově náročnější. Pro dobré posouzení morfologie je třeba znát normální morfologickou stavbu spermie a umět ji odlišit od abnormálně utvářených spermií (Lipenský a kol., 2014). Morfologicky vadné spermie jsou dlouhodobě spojovány s neplodností a sterilitou u samečů. Vyskytují se jako morfologické defekty, patrné při klinickém vyšetření, až po abnormality, které jsou méně zjevné. Vliv na výskyt těchto vad může mít životní prostředí, genetický základ jednice nebo kombinace obojího. Ačkoliv je vliv prostředí považován za nejběžnější příčinu vzniku morfologicky vadných spermií, lze pozorovat rostoucí význam vlivů genetického původu (Chenoweth, 2005).

Procento morfologicky normálních spermií má pozitivní vliv na plodnost hřebců. Morfologické abnormality mohou znamenat biologický stres, trauma, vystavení působení toxinů nebo poškození spermií způsobené kryokonzervací. Ačkoliv je u ejakulátu morfologické vyšetření v normě, po zmrazení (kryokonzervaci) a rozmrazení inseminační dávky a po následné inseminaci klisny, může být plodnost neuspokojivá (Cowell a Ronald, 2002).

Lipenský a kol. (2014) uvádí, že morfologicky vadné spermie zahrnují všechny spermie, které vykazují vady odlišující se od normální morfologické stavby. Abnormality spermií mohou být klasifikovány jako primární, sekundární nebo terciární, podle původu jejich vzniku. Jiní vědci však upřednostňují jinou klasifikaci: srovnání závažných vad s méně významnými vadami (*major versus minor defects*) (Cowell a Ronald, 2002).

Primární vady mohou vznikat od procesu spermatogeneze až po příchod spermií do ocasu nadvarlete. Zahrnují vady hlavičky spermie, jako jsou vady tvaru hlavičky, vady v nukleoplazmě a vady akrozomu. Dále sem řadíme vady středního oddílu bičíku a vývojové vady spermií (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Podle Cowella a Ronalda (2002) se mezi primární vady řadí i přítomnost cytoplazmatické kapky.

Dle Chenowetha (2005) jsou primární vady způsobeny poškozením epitelu semenotvorných kanálků. Dále uvádí předpoklad, že primární defekty jsou více nepříznivé pro samčí plodnost než vady sekundární.

Sekundární vady jsou připisovány delšímu pobytu spermií v ocasu nadvarlete, kde jsou spermie uchovávány, než dojde k ejakulaci (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Dle Brita (2007) mohou být sekundární vady způsobeny také průchodem spermií vývodními pohlavními cestami při ejakulaci. Řadíme sem některé vady hlavičky, vady akrozomu (roztrhnutí či rozvolnění), torze a roztrhnutí bičíku a nezralé formy spermií (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Cowell a Ronald (2002) terciární vady připisují nevhodné manipulaci s ejakulátem při odběru. Tato poškození spermií mohou také vznikat při nesprávném zhotovení preparátu, který používáme pro morfologické hodnocení. Stejně jako u vad sekundárních zde můžeme pozorovat uvolnění akrozomu. Dále sem také patří potrhání a torze bičíku a oddělení bičíku od hlavičky spermie (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Další skupinu vad popisují Gamčík, Kozumplík a kol. (1992), primární vady vyčleňují do další skupiny a nazývají ji teratoidní spermie. Jedná se o vývojové vady, kdy má spermie atypický tvar hlavičky (asymetrická hlavička, abnormální velikost) nebo má spermie více hlaviček. Dále se mohou vyskytovat různé tvary bičíku a spermie se zmnoženým bičíkem (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Některé teratoidní spermie jsou tak silně deformované, že jdou stěží rozeznat jako spermie. Tyto spermie mají narušenou plazmatickou membránu, což se projeví při barvení preparátů. Je však nutné rozeznat tyto degenerativní formy spermií od jiných buněk – krvinek či odloupaného epitelu (Brito, 2007). Teratoidní spermie vznikají jako odpad ve fázi metamorfózy spermatidy. Pokud se však vyskyt těchto „nepovedených“ forem spermií zvýší přes 5 %, lze předpokládat závažnější poruchy spermatogeneze (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Do vad většího významu pro plodnost samců zahrnujeme morfologické abnormality hlavičky a středního oddílu bičíku spermie (Cowell a Ronald, 2002). Dále jsou hlavní

vady definovány následujícími kritérii: primární vady spermie, větší procento zastoupení těchto vad a jejich konzistentní výskyt (Chenoweth, 2005).

Různé formy torze bičíku řadíme do vad vedlejších. Tyto vady pravděpodobně plodnost významně neovlivňují (Cowell a Ronald, 2002). Brito (2007) uvádí, že použití tohoto systému rozdělení vyžaduje značné množství dat, které popisují účinky konkrétních vad na plodnost, což u hřebců nemáme.

Cowell a Ronald (2002) dodávají, že morfologické vady spermii mohou být také klasifikovány jako vady, které lze kompenzovat a ty, které nelze.

Mezi kompenzovatelné vady patří pohyblivost spermii a abnormality bičíku. U těchto vad lze zvýšit plodnost zvětšením inseminační dávky (větším počtem spermii v jedné dávce). Vady, které však nelze vykompenzovat zvětšením ID, zahrnují především abnormality hlavičky spermie (Cowell a Ronald, 2002).

V této diplomové práci je použito dělení morfologických vad podle Gamčíka, Kozumplíka a kol. (1992), kteří morfologické vady rozdělují na malformace hlavičky, ke kterým jsou zahrnuty vady tvaru hlavičky, vady na akrozomu a vady vnitřní struktury. Dále vady rozdělují na malformace bičíku spermii a nezralé spermie.

3.4.1 Morfologické vady hlavičky spermie

Na hlavičce můžeme pozorovat mnoho odchylek od normální morfologické stavby. Jednotlivé vady lze rozdělit do dvou skupin, a to na vady akrozomu a vady hlavičky (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.4.1.1 Vady akrozomu

Korektní morfologická stavba, stejně jako zachovaná funkčnost akrozomu a jeho enzymů, je jedním z nejdůležitějších faktorů pro schopnost spermie proniknout do vajíčka a oplodnit ho. Při narušení akrozomální hmoty tedy spermie ztrácí svoji schopnost oplození (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Vady akrozomu u hřebců nejčastěji zahrnují knoflíkový defekt (*knobbed acrosome defect*), zbobtnání akrozomu a částečně či úplně svlečený akrozom (Brito, 2007).

Dle Loudy a kol. (2001) je nejčastější vadou akrozomu jeho zbobtnání. K tomuto defektu může dojít jak v pohlavních cestách samce, tak při manipulaci s ejakulátem, zejména při kontaktu ejakulátu s vodou. Bobtnání akrozomu je popsáno jako narušení

propustnosti protoplazmatického obalu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Po takovém narušení obvykle akrozom praská a uvolní se akrozomální hmota (Louda a kol., 2001).

Knoflíkový defekt se na světelném mikroskopu jeví jako korálek na vrcholu hlavičky spermie. Podoba toho knoflíkového defektu se může měnit od korálkového vzhledu vyčňívajícího nad vrchol hlavičky, až po vtlačování do hlavičky a jejího zplošťování. Tento defekt akrozomu je tvořen přebytkem akrozomálního matrix a skládáním membrány akrozomu přes špičku hlavičky. V akrozomálním matrix jsou pak zachyceny granula a inkluze obsažené v membránových vezikulech (Brito, 2007).

Chenoweth (2005) uvádí, že spermie mající knoflíkový defekt buďto postrádají schopnost penetrace do vajíčka (navázání a průnik přes zonu pellucidu), nebo je tato schopnost snížena.

Brito (2007) potvrzuje tuto domněnku a dodává, že taková spermie může mít změněnou funkci plasmatické membrány a může tak dojít k předčasné spontánní akrozomální reakci.

Tato akrozomová vada může být způsobena mnoha faktory. Nejčastěji jde o faktory prostředí, jako jsou tepelný stres a toxiny, a faktory genetického původu. U hřebců však knoflíkové defekty genetického původu nebyly pozorovány (Brito, 2007).

Dalšími vadami, které souvisejí s nerovnoměrným rozdělení akrozomální hmoty, jsou kondenzace akrozomové hmoty na předním okraji, granulace akrozomu a perzistující akroblast. V takovém případě se toto nahromadění hmoty projeví nerovnoměrným zbarvením akrozomu a akrozom nabývá mapovitého nebo mramorovaného vzhledu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Svlečení akrozomu, částečné či úplné, je dle Chenowetha (2005) často spojeno s knoflíkovým defektem akrozomu. Při barvení takto narušený akrozom může mít nepravidelný vrásčitý nebo shrnutý vzhled (Chenoweth, 2005). Hlavička s plně svlečeným akrozomem je v přední části zúžena a rovnoměrně zbarvena. Někdy zde po svlečení akrozomu zůstává půlměsícovitý útvar zvaný perzistence ekvatoriálního segmentu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992) a vysvlečený akrozom lze v některých případech pozorovat nedaleko hlaviček (Louda a kol., 2001).

Shrnování nebo svlékání akrozomu značí buněčné stárnutí spermie. Jde tedy o sekundární vadu, která vzniká při dlouhodobém setrvávání spermií v ocasu nadvarlete (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Abnormality akrozomu jsou často spojeny s defekty dalších částí spermie, což podle Brita (2007) naznačuje poruchu spermatogeneze. Využívání elektronové mikroskopie ukázalo, že skutečný výskyt vad akrozomu může být mnohem vyšší, než bylo pozorováno světelným mikroskopem (Brito, 2007).

3.4.1.2 Vady tvaru a vnitřní struktury hlavičky

Výskyt morfologických vad hlaviček je poměrně vysoký. Obvykle jde o nejrozšířenější nebo druhé nejrozšířenější vady spermií (Brito, 2007). Nejčastěji se jedná o vady tvaru hlavičky nebo vady její vnitřní struktury (vady struktury nukleoplazmy) (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Tvarové deformity se mohou projevit změnou velikostí hlavičky při nesprávném rozdělení deoxyribonukleové kyseliny – malé či obrovské hlavičky (mikrocefalie, makrocefalie) a změnou v utváření báze hlavičky (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Zmenšené či zvětšené hlavičky jsou pravděpodobně důsledkem narušení spermatogeneze ve fázi spermatocytů I. a II. řádu, které pak mají nerovnoměrné rozdělení jaderného chromatinu (Brito, 2007). Makrocefalické hlavičky často mohou být diploidní, triploidní nebo dokonce tetraploidní (Chenoweth, 2005).

Dále Chenoweth (2005) uvádí, že působení toho defektu na plodnost je nejasné. Avšak můžeme předpokládat, že změněný počet chromozomů ve větším množství spermií v ejakulátu by ohrozil plodnost.

Samotný tvar hlavičky je dán tvarem jejího vnitřního jádra (Brito, 2007). Gamčík, Kozumplík a kol. (1992) popisují různé tvary, kterých mohou hlavičky nabývat. Lze pozorovat hlavičky zúžené, oválné, hruškovité a citrónovité. In vitro studie ukazují, že spermie s kuželovitým nebo hruškovitým tvarem hlavičky měly sníženou schopnost vázat se na zonu pellucidu (Brito, 2007).

Mezi vady vnitřních struktur patří nejčastěji nerovnoměrné rozdělení jaderné hmoty (chromatinu), granulovaná nukleoplazma a vakuoly (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Mnohé studie ukazují, že utváření morfologie hlavičky je důvěrným ukazatelem abnormální struktury chromatinu, a tím i plodnosti (Severa a kol., 2009).

Varner a kol. (2000) ve své studii uvádí, že všichni hřebci mají určitou úroveň abnormalit chromatinu. Stupeň těchto abnormalit pak určuje závažnost narušení plodnosti hřebce. Příčiny těchto abnormalit jsou z velké části dány vnitřními faktory, jak uvádí Brito (2007). Dále jsou popisovány vnější příčiny, jako jsou traumatické poškození varlat

a tepelný stres. U některých hřebců se zvyšuje procento abnormalit chromatinu bez zjevné příčiny a toto procento dále progresivně roste s přibývajícím věkem hřebců (Varner a kol., 2000).

Nerovnoměrné zbarvení jaderné hmoty může také ukazovat na granulaci nukleoplazmy. Tato porucha vzniká na začátku fáze kaudální manžety, která charakterizuje dokončení tvaru jádra a kondenzaci nukleoplazmy. Jedná se o poruchu diferenciaci nukleoplazmy a vzniká tak granulovaná struktura chromatinu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Jako další vadu vnitřní struktury popisují Gamčík, Kozumplík a kol. (1992) vakuoly v jádře. Vakuoly vznikají již během spermatogeneze, tudíž jde o primární vadu nukleoplazmy. Jaderné vakuoly se mohou vyskytovat s invaginací (vnitřním vchlípením) jaderné membrány do jádra nebo bez ní (Brito, 2007).

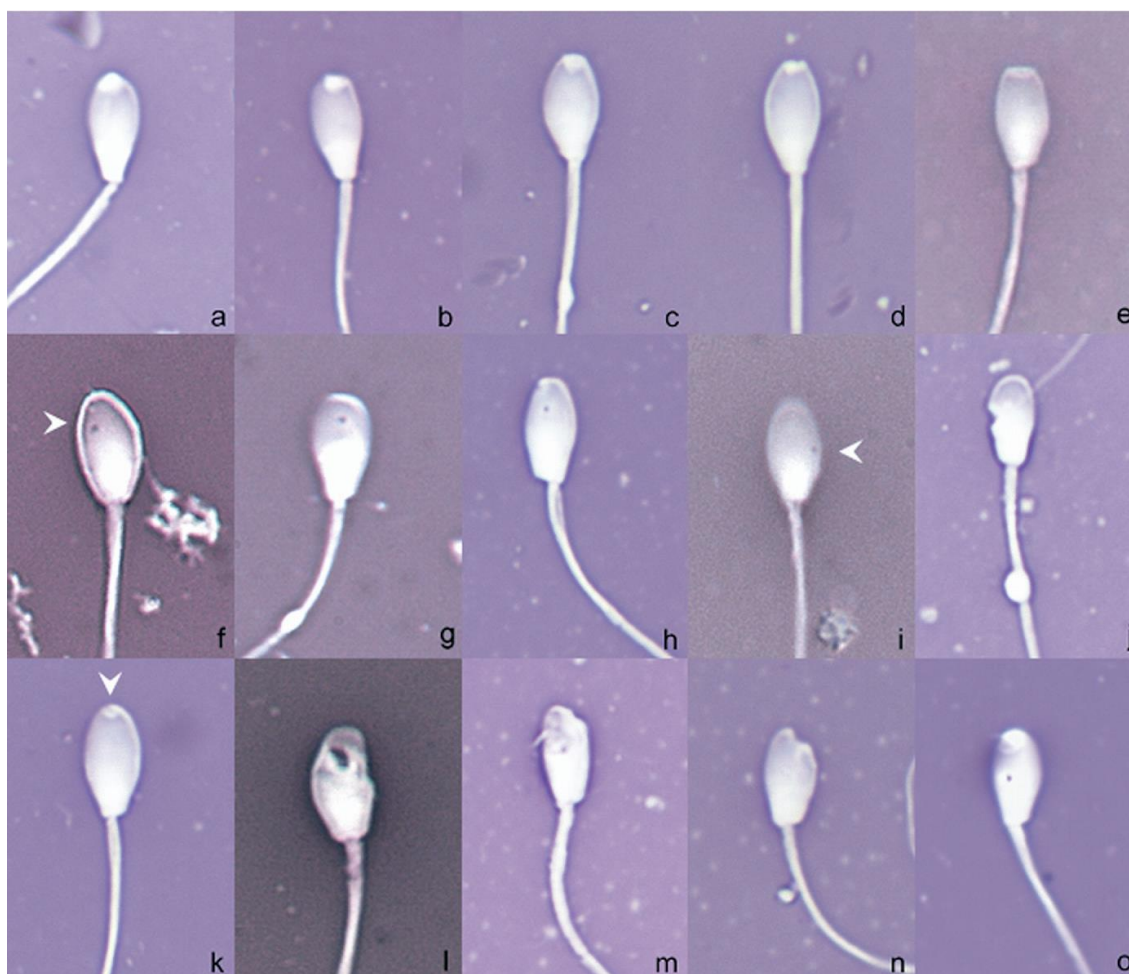
Ve světelném mikroskopu pozorujeme vakuoly jako neobarvená, ostře ohraničená místa na hlavičce spermie. Nejčastěji se nacházejí při apikálním okraji nukleoplazmy a v ekvatoriálním segmentu hlavičky (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Dle Brita (2007) však lze tyto vakuoly pozorovat kdekoliv na hlavičce. Vakuoly umístěné na vrcholu hlavičky mohou také souviset s vadami akrozomu a můžeme tyto vady pozorovat současně (Brito, 2007). Chenoweth (2005) dodává, že mnoho hlaviček obsahující vakuoly mělo zcela uvolněný akrozom.

Gamčík, Kozumplík a kol. (1992) doplňují, že zvýšený výskyt vakuol v hlavičce spermie mohou také doprovázet další tvarové a cytochemické změny, které mohou být způsobeny poruchou spermatogeneze zánětlivého původu.

Při změnách báze hlavičky pozorujeme tvarové abnormality, jako je plochá, vtáhnutá, rozšířená či zúžená báze. Dále může docházet k vyosení připojení bičíku (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Neméně důležitou vadou mohou být vyskytující se dekapitované spermie. Rozpad spermií či oddělení hlaviček od bičíků může být způsobeno mnoha faktory, které ovlivňují spermatogenezi nebo dozrávání spermií. Dekapitace spermií je často spojena s defektním vývojem hlavičky (Chenoweth, 2005). Podle Brita (2007) se volné hlavičky běžně vyskytují v ejakulátu do 5 %. Dále uvádí, že abnormální výskyt volných hlaviček by mohl znamenat poruchy spermatogeneze nebo také stárnutí spermií v pohlavním traktu samce.

Love (2011) udává, že morfologické vady hlaviček představují největší procento morfologicky změněných spermií. Dále upozorňuje na negativní korelaci mezi abnormalitami hlaviček a plodností hřebců.



Obrázek 3 Morfologie hlavičky spermie. Knoflíkový defekt akrozomu (a – e), vakuoly v jádře (f – l), krátery v jádře způsobené velkými vakuolami (j, l – n), současný nález vakuoly i kráteru v jádře (o) (Brito, 2007, upraveno)



Obrázek 4 Zdvojení bičíku (a, b), spermie se zmožením hlaviček a bičíků (c – e) (Brito, 2007, upraveno)

3.4.2 Morfologické vady bičíku spermie

Bičík spermie a jeho funkčnost je nezbytný pro naplnění jedné z nejdůležitějších vlastností spermie, a to pohyblivosti. Vady bičíku často vedou ke změně směru a charakteru pohybu či úplné imobilitě spermii. Za charakteristický považujeme přímý rotační pohyb (Věžník a kol., 2000). Louda a kol. (2001) rozděluje morfologické vady bičíku na vady v mitochondriálním oddílu a vady hlavní části bičíku. Za vážné vady považujeme hlavně abnormality mitochondriálního oddílu neboli spojovací části bičíku (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.4.2.1 Vady mitochondriálního oddílu

Spojovací část bičíku je tvořena mitochondriálními vlákny, proto také často hovoříme o mitochondriálním oddílu. Mezi nejčastější vady řadíme zkrácení nebo prodloužení mitochondriálního oddílu, dále jeho zúžení, ztlustění nebo přerušení v některé jeho části. U zdravé spermie by měl být poměr mezi délkou hlavičky a délkou mitochondriálního oddílu 1:1,5 (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Louda a kol. (2001) dále uvádí jako vadu možné rozvázání mitochondriální spirály, kterou pozorujeme jako nitkovitý závit. Tuto vadu lze také popisovat jako vývrtkovitý defekt (*corkscrew-sperm defect*) (Chenoweth, 2005). Pokud dojde k přerušení v části mitochondriálního oddílu, probíhá zde pouze holé osově vlákno nebo nitkově vyvinutá mitochondriální spirála (Louda a kol., 2001).

Chenoweth (2005) také do této skupiny přiřazuje tzv. pseudokapku („*pseudo-droplet*“ *defect*) a charakterizuje ji především jako lokální zesílení mitochondriálního oddílu. Vada je lehce zaměnitelná se zadržanou cytoplazmatickou kapénkou. Podrobnější pohled však odhalí nepravidelný tvar ztlustění, což značí nepravidelnost uspořádání mitochondrií (Chenoweth a Lorton, 2014).

Vývrtkovitý defekt je vada popisována také jako nepravidelné rozdělení mitochondrií, které pod mikroskopem vypadají jako vývrtka (Chenoweth, 2005). Ultrastrukturální vzhled naznačuje, že tento defekt má společnou etiologii s pseudokapkou, což podle Chenowetha a Lortona (2014) dokazuje jejich společný výskyt u neplodných hřebců.

Dále Brito (2007) popisuje jako běžnou vadu distální mitochondriální reflex (*distal midpiece reflex*) – DMR. Jedná se o ohnutí distální oblasti tohoto oddílu do tvaru písmene J. V ohybu je téměř vždy zachycena cytoplazmatická kapénka. Tato vada pravděpodobně vzniká v souvislosti se změnou pH prostředí při průchodu spermií nadvarletem vyvolanou nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (Brito, 2007).

Defekt mikrotubulární hmoty (*microtubular mass defect*) zahrnuje další vadu – otok mitochondriálního oddílu. Tato vada se vyskytovala zejména u hřebců s vadami v ejakulátu, jako jsou pseudokapky, vývrtkovitý defekt a zadržané cytoplazmatické kapénky (Brito, 2007). Podobné strukturální defekty byly pozorovány u sterilních hřebců, kterým bylo diagnostikováno virové onemocnění. Při ultrastrukturním vyšetření se ukázalo, že abnormální strukturální rysy byly způsobeny nahromaděním rozvolněných mitochondrií (Chenoweth a Lorton, 2014), přičemž nemusí být narušena struktura osového vlákna (Brito, 2007).

Pesch a kol. (2006) dodává, že nepravidelné uspořádání mikrotubulů s kombinací s jejich absencí v osovém vláknu, mělo za následek nulový pohyb spermií ve zkoumaném hřebčím ejakulátu.

3.4.2.2 Vady hlavního oddílu

Skupinu vad hlavního oddílu bičíku tvoří zejména tvarové vady jako zdvojení bičíku, různé stupně torze bičíku a jeho ohnutí, nalomený (zlomený) bičík a další anomálie v jeho uložení (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Stupně ohnutí bičíku mohou zahrnovat především stočení bičíku kolem protoplazmatické kapky, nepravidelné stočení až úplné

zavinutí bičíku do klubka. Mezi vady hlavního oddílu se dále řadí abaxiální upevnění bičíku k hlavičce (Louda a kol., 2001).

Ve své publikaci Louda a kol. (2001) však upozorňuje na skutečnost, že tyto vady mohou velmi často vznikat nesprávným postupem při zhotovení nátěru.

Mezi nejčastější vady spermií patří jednoduché stočení bičíku, které také zahrnuje již výše zmíněný distální mitochondriální reflex (Chenoweth, 2005). Bičík se ohýbá buď kolem protoplazmatické kapénky, nebo ohyb může nastat z důvodu abnormálního vývoje mikrotubulů. Úplné zavinutí bičíku je zapříčiněno narušením při spermatogenezi. Bičík musí proniknout buněčnou membránou, v důsledku poruchy k tomu však nedojde a bičík se vyvíjí uvnitř membrány (Věžník a kol., 2004).

Další pozorovanou vadou je tzv. Dag defekt, pojmenovanou podle býka, u kterého byla tato vada poprvé identifikována. Ačkoliv je tato vada popisována u býku, je zaznamenán výskyt podobné vady (*Dag-like defect*) i u hřebců. Je možné pozorovat současné zadržení cytoplazmatické kapénky a několikanásobné stočení bičíku (Chenoweth, 2005). Dag defekt představuje absenci abaxiálního souboru fibril bičíku (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Louda a kol. (2001) tento defekt popisuje jako abnormální vývin bičíku, u kterého jsou bičíkové fibrily abnormálně uspořádány a vnější skupina fibril většinou chybí.

Dle dalších výzkumů bylo dokázáno, že výskyt Dag defektu má genetický základ a je vázán na recesivní gen (Brito, 2007). V některých případech je však tato vada spojována i se zvýšenou hladinou zinku. Výskyt Dag defektu může poukazovat na poruchy varlete nebo nadvarlete. Pokud se vada vyskytuje do 4 % v ejakulátu, je to považováno za normální. Avšak více než 50% výskyt se považuje za vážnou poruchu plodnosti (Chenoweth a Lorton, 2014).

Zdvojení bičíku Brito (2007) považuje za neobvyklou vadu, která je spojena se zdvojením implantační jamky a replikací distálního centriolu, ze kterého se formují dvě osová vlákna. U zdvojeného bičíku se většinou zachovává mitochondriální systém (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Spermie se dvěma bičíky může mít normálně utvářenou hlavičku s normální nukleoplazmou. Často však mohou vznikat i spermie se dvěma hlavičkami spojeny jedním společným mitochondriálním oddílem. Takové deformity vznikají při neúplném rozdělení buňky v průběhu spermatogeneze (Brito, 2007).

Chenoweth (2005) dále popisuje vadu zvanou pahýlový defekt („*tail stump*“ *defect*). U této vady dochází k určitému „zakrnění“ bičíku. Z hlavičky pak místo plnohodnotného bičíku vystupuje pouze malý pahýl. K této vadě dochází při narušení vývoje distálního centriolu. Sledování morfologie spermií u býků prokázala možný genetický původ (pokud bylo takto změněno více než 25 % spermií v ejakulátu). Kromě toho byla zjištěna velmi nízká koncentrace spermií v ejakulátu a prakticky nebyl zaznamenán pohyb spermií (Chenoweth a Lorton, 2014).

Hlavního oddílu se také týkají méně časté vady, jako je abnormální vývoj a aplazie některých struktur. Absence některých mitochondriálních listů je zodpovědná za strukturální slabost bičíku v konkrétní části, ve které může dojít k fraktuře. Nejčastěji ke zlomeninám dochází v oblasti Jensenova kroužku, tedy v oblasti, která rozděluje mitochondriální a hlavní oddíl bičíku (Brito, 2007).

Nezanedbatelným problémem může být tzv. syndrom imobility. Při této vadě mají spermie rozrušenou strukturu osového vlákna. Zároveň je zde částečná nebo úplná absence dyneinových vláken (protein zabezpečující pohyb spermie), chaoticky uspořádané mikrotubuly, nebo chybějí radiální výběžky (Chenoweth, 2005). Je třeba poznamenat, že komplex osového vlákna obsahuje více než 200 bílkovin, takže chybné uspořádání některých z nich, by bylo následkem chybného genetického kódování (Chenoweth a Lorton, 2014).

Brito (2007) uvádí, že výskyt konkrétních vad mitochondriálního a hlavního oddílu bičíku a jejich vliv na plodnost hřebců je obtížné zjistit, protože se tyto vady většinou vyskytují současně s ostatními vadami spermií. Love a kol. (2000) také nepozoroval žádnou závislost plodnosti na ohybech či zlomeninách, nicméně zvýšení abnormalit středního oddílu a podílu svinutých bičíků vedlo ke snížení plodnosti.



Obrázek 5 Morfologické abnormality hlavního oddílu bičíku. Ohnutí bičíku v distální části spojovacího oddílu (a, b), stočení bičíku (c – e), Dag – defekt (f – j), jednoduché ohnutí bičíku (k), svinutí bičíku a zadržení cytoplazmy (l, m), abnormální vyvinutí bičíku (n, o) (Brito, 2007, upraveno)

3.4.3 Nezralé spermie

Mezi tuto skupinu spermií Gamčík, Kozumplík a kol. (1992) řadí spermie se zadržanou cytoplazmatickou kapénkou. Jedná se o pozůstatek při vývoji spermie ve spermatogenezi. V nadvarletí, kde dochází ke zrání spermií, se v normálním případě cytoplazmatická kapénka přesouvá postupně od krčku až po konec bičíku, kde se od spermie oddělí (Love a kol., 2000). Pesch a kol. (2006) uvádí, že jde o vadu s častým výskytem a jedná se o poruchu procesu zrání spermií.

Love a kol. (2000) však dodává, že nezralé spermie jsou také typické pro mladé hřebce a pro hřebce s častými odběry, kdy spermie nestihají mezi jednotlivými odběry dozrávat.

Cytoplazmatická kapénka může být uložena v různých částech spermie. Lze ji pozorovat na krčku spermie, nazývanou proximální kapénka. Také se může vyskytovat v distálních částech bičíku, kam se přesouvá postupným dozráváním, a jde tedy o distální kapénku (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). In vitro studie u býků prokázaly snížení fertility při vyšším výskytu spermií s proximálními kapénkami (nad 10 %), protože takové spermie nejsou schopny vázat a proniknout do zony pellucidy. Naopak u distálních kapének prokázaly chovatelské zkoušky u skotu nevýznamný vliv na plodnost (Brito, 2007). Jasko a kol. (1990) dodává, že negativní korelace mezi procentem proximálních kapének a plodností u hřebců je také asi třikrát větší, než u distálních kapének.



Obrázek 6 Nezralé spermie. Proximální kapka (k), zadržaná cytoplazma (l), defekt mikrotubulární hmoty (m), distální kapka (n, o) (Brito, 2007, upraveno)

Pro zachování normální plodnosti by výskyt cytoplazmatických kapének neměl přesáhnout 2 % v ejakulátu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Lze však pozorovat rozdíly dle druhů plemenů. Musíme také brát v úvahu individualitu každého z plemenů. Pokud však pozorujeme vyšší výskyt nezralých forem spermií, může to mít souvislost s dalšími vývojovými vadami, které je třeba také nadále sledovat (Louda a kol., 2001).

V ejakulátu se mohou vyskytovat další formy nezralých spermií. Jedná se o spermie ve vývojovém stadiu spermatogonií, spermatocytů I. a II. řádu a spermatid. Nálezy takovýchto forem spermií poukazuje na poškození epitelu semenotvorných kanálků a poruchy v transformaci buněk. Často jsou také doprovázeny výskytem spermií s primárními vadami (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Ve své publikaci Turner (2007) popisuje zvýšený výskyt zárodečných buněk jako následek testikulární degenerace, způsobené různými vlivy (traumatické poškození varlat, lokální infekce, působení toxinů, nutriční nedostatky nebo tepelný stres). Pozorování hřebci zároveň vykazovali velmi nízkou produkci spermií a tedy jejich nízkou koncentraci v ejakulátu. U testikulární degenerace závisí na povaze působících vlivů, např. v případě poškození způsobeného tepelným stresem, se po odstranění vlivu spermatogeneze vrátila do normálního stavu (Turner, 2007).

Při morfologickém posouzení hodnotíme také přítomnost jiných buněčných elementů, především bílé krvinky a epitel z pohlavních cest (Brito, 2007).

3.5 Morfologické vady ve vztahu k plodnosti

Popsané morfologické vady a abnormality spermií mohou vést k poruchám plodnosti hřebců. Při morfologickém vyšetřování lze pozorovat přirozenou variabilitu mezi ejakuláty jednotlivých plemenů, ale i variabilitu mezi ejakuláty od jednoho plemene (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Je proto také důležité opakovat vyšetření ve více denních intervalech, nelze vyvodit závěry z jednorázového odběru (Louda a kol., 2001). Love a kol. (2000) uvádí, že výsledky morfologického vyšetření mohou být také proměnlivé v průběhu celé připouštěcí sezóny, a proto je důležité provádět kontrolní vyšetření pravidelně v rozmezí 2 – 4 týdnů.

Výskyt morfologických vad v rozmezí 5 – 10 % v ejakulátu je považováno za fyziologické. Je však vhodné rozlišit procentuální výskyt vad primárního charakteru (vývojové anomálie), které jsou považovány za jednu z hlavních příčin

neplodnosti (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Card a kol. (2005) dodává, že za přípustný stav se považuje hodnota normospermii 50 % v ejakulátu hřebce. Dále je důležitým hlediskem hodnocení plodnosti posouzení výsledků inseminace a procento zabřezlých klisen (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Dle některých studií lze posoudit vztah morfologických vad na plodnost. Jak uvedl Jasko a kol. (1990), na výsledném procentu zabřezlých klisen se nejvíce podílely vady a abnormálně vyvinuté hlavičky. Dále Brito (2007) uvádí negativní vliv jednotlivých vad bičíku na pohyblivost spermii. Při vyšším výskytu těchto vad, zejména vad na mitochondriálním oddílu a přítomnosti proximální cytoplazmatické kapénky, se aktivita spermii v ejakulátu výrazně snižuje nebo vymizí úplně (Brito, 2007).

Ejakulát od jednotlivých hřebců se může výrazně lišit, pokud jde o morfologii spermii. Proto i velké množství abnormalit může být pro hřebce normální. Nicméně, u hřebců s vysokou plodností a pravidelnými odběry pozorujeme obvykle nízký výskyt morfologických vad (Malmgren, 1997).

Je však důležité si uvědomit, že jednotlivé spermie mohou mít větší počet vad. Z tohoto důvodu je pak velice obtížné dokázat, která z daných abnormalit má větší vliv na plodnost (Veeramachaneni, 2011).

3.6 Metody laboratorního hodnocení ejakulátu

Obecným cílem hodnocení ejakulátu je posoudit vyhlídky na plodnost jednotlivých hřebců nebo jednotlivých vzorků ejakulátu čerstvě odebraných, chlazených, a rozmražených. Cílem laboratorního vyšetření je porovnat, zda jsou kvantitativní a kvalitativní parametry v souladu s minimálními požadavky na biologickou hodnotu hřebčího spermatu (Samper, 2009).

Vyšetřujeme sperma mladých plemeníků před zařazením do plemenitby, zjišťujeme kvalitu jejich ejakulátu a vhodnost ke konzervaci. Vyšetřuje se také ejakulátu hřebců v reprodukci již zařazených. Vyšetřuje se každý odebraný ejakulát a zjišťuje se jeho použitelnost – provedou se základní spermilogická vyšetření. Pro pravidelnou kontrolu úrovně spermatogeneze se využívá dalších speciálních vyšetření (Kliment a kol., 1983). Pro posouzení plodnosti je třeba brát v úvahu roční období (připouštěcí sezónu), věk hřebce, zdravotní stav, podmínky ustájení a jeho reprodukční minulost (Cupps, 1991).

Laboratorní metody vyšetření můžeme rozdělit do tří základních skupin: makroskopické metody, mikroskopické metody a biochemické metody (Gamčík,

Kozumplík a kol., 1976). Dále Gamčík, Kozumplík a kol. (1992) uvádí rozdělení metod na základní metody, které hodnotí kvalitu ejakulátu před použitím v inseminaci (vyšetřování čerstvého a zmrazeného ejakulátu), a speciální metody, které se používají při kontrole zdravotního stavu plemeníka, při snížení plodnosti a při změnách základních ukazatelů.

3.6.1 Makroskopické metody

První hodnocení ejakulátu probíhá bezprostředně po jeho odběru. Jedná se o hodnocení, při kterém není potřeba speciálních laboratorních přístrojů. Makroskopicky lze zhodnotit objem ejakulátu, dále barvu, pach, hustotu, konzistenci, obsah hlenu a cizích přímísenin (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

Objem ejakulátu lze stanovit v kalibrovaném odměrném válci nebo také vážením na automatických vahách, kdy se pak objem udává v gramech (Louda a kol., 2001). Výsledný objem je značně variabilní v závislosti na plemeni (teplokrevná plemena mají poměrně nižší objem ejakulátu než plemena chladnokrevná), věku a intenzitě využívání plemeníka a na dalších faktorech (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Podle Sampera (2009) by měl být objem stanoven s ohledem na přítomnost hlenu v ejakulátu. Můžeme tedy určit objem celkový nebo objem ejakulátu bez hlenové frakce, která je před měřením oddělena od vzorku.

Barvu posuzujeme ve zkumavce nebo odměrném válci prohlédnutím ejakulátu proti světlu (Louda a kol., 2001). Odstín závisí na hustotě a konzistenci ejakulátu, přičemž by barva měla být mléčně bílá, u hřebce často s namodralým odstínem (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Nepřípustná je barva nažloutlá nebo nazelenalá (přímísení moči, případně hnisu), nebo načervenalá (přítomnost krve) (Louda a kol., 2001). Konzistence se může měnit v závislosti na počtu spermií v ejakulátu, z krémové, mléčné až po vodnatou, což naznačuje snížení počtu či úplnou absenci spermií. Barva a konzistence poskytuje důležité údaje o vhodnosti spermatu k dalšímu zpracování (Samper, 2009).

Dále lze okem zhodnotit hustotu a zrnitost a přítomnost cizích přímísenin. Dobrý ejakulát by neměl obsahovat žádné přímíseniny, jako jsou chlupy, nečistoty z předkožky, moč, hnis, krev a dále také nečistoty pocházející z umělé vagíny, jako např. vazelína (Louda a kol., 2001).

Pach hodnotíme čichem, čerstvý ejakulát vykazuje neutrální až jemný typický hřebčí pach. Podle neobvyklého zápachu lze také odhalit přítomnost nežádoucích přímísenin (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.6.2 Mikroskopické metody

Do komplexu mikroskopických vyšetření patří především hodnocení aktivity spermií, koncentrace spermií, posouzení morfologické stavby spermií a testy přežitelnosti a rezistence (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

3.6.2.1 Aktivita spermií

Pohyblivost spermií byla dlouho považována za hlavní kritérium při posuzování plodnosti. Cílem posouzení aktivity je určit poměr pohyblivých spermií a spermií s progresivním pohybem vpřed (Malmgren, 1997). Bezprostředně po odběru se ze sběrače odebere kapka spermatu, smíchá se s přehřátým citrátem sodným ($39^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) a po přikrytí tenkým krycím sklíčkem se aktivita posuzuje mikroskopem při zvětšení 200 – 300 krát. Aktivita se hodnotí nejméně na třech zorných polích odhadem vyšetřujícího. Procento aktivity stanovuje zastoupení spermií pohybujících se vpřed za hlavičkou (Louda a kol., 2001).

Dále mohou být pozorovány nefyziologické druhy pohybu, jako je nepohyblivost, pohyb v kruhu, pohyb okolo hlavičky, zpětný pohyb a trhavý (přerušovaný) pohyb (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Takovéto změny v pohybu mohou nastat, pokud se prodlužuje doba od odběru po vyhodnocení. V ejakulátu dochází k tzv. vitální degeneraci, kdy se pohyb stává kruhovým, trhavým a přerušovaným až se pohyb zastaví úplně (Louda a kol., 2001). Vyhodnocení aktivity spermií je subjektivním odhadem vyšetřujícího, což znamená jistou nevýhodu v proměnlivosti výsledků mezi různými vyšetřujícími. Spolehlivost výsledků tedy do jisté míry závisí na úrovni zkušenosti vyšetřujícího (Malmgren, 1997).

Kvůli některým nevýhodám subjektivního hodnocení, byl kladen důraz na vývoj objektivních metod. Pro objektivní posouzení byla použita metoda mikrofotografie s časovou prodlevou, její vícenásobná expozice a přehrávání jednotlivých snímků (Malmgren, 1997). Pohybující se spermie jsou zobrazeny jako nejasné stíny, naopak nepohyblivé spermie jsou naprosto zřetelné. Nicméně tyto metody jsou zdouhavé a náročné na pracovní sílu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Dále k tomuto vyšetření lze přiřadit hodnocení vířivosti pohybu. Pohyb spermií se zde hodnotí dle třech stupňů: velmi rychlý vířivý pohyb v širokých, tmavých a rychle pohybujících se vlnách; pomalý vířivý pohyb v tenkých průsvitných vlnách; bez hromadného vířivého pohybu (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Tato hodnota vyjadřuje společný stupeň hustoty a pohyblivosti spermií. Na rozdíl od hodnocení aktivity, se vířivost hodnotí v nativním, tedy nezředěném ejakulátu, na podložním sklíčku s důlkem při menším zvětšení (100 – 200 krát). Tato metoda hodnocení je jen orientační, aktivita je významnějším ukazatelem oplozovací schopnosti (Louda a kol., 2001).

3.6.2.2 Koncentrace spermií

Koncentrace nebo také hustota představuje počet spermií na jednotku objemu, udává se většinou v milionech na mm^3 nebo ml. Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu lze provést několika způsoby. Hustotu lze stanovit odhadem, hemocytometricky v Bürkerově počítací komůrce nebo za použití spektrofotometru (Samper, 2009). Za nejpřesnější metodu je považována metoda hemocytometrická, avšak tato metoda je značně pracná (Louda a kol., 2001).

V melanžéru se musí důkladně promíchat ve správném poměru sperma a zředňovací roztok (nejčastěji 3% NaCl), poté se kápne několik kapek do rýhy Bürkerovy komůrky překryté krycím sklíčkem (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Správným zatlačením na sklíčko se vytvoří duhové zbarvení, což znamená, že spermie jsou stejnoměrně rozvrstveny po celé ploše komůrky (Kliment a kol., 1983). Spermie se počítají v jednotlivých čtverečcích pod mikroskopem se zvětšením 300 – 400 krát. V 10 čtverečcích o velikosti $1/16 \text{ mm}^2$ nebo $1/25 \text{ mm}^2$ se spočítají všechny spermie, které jsou uvnitř čtverce a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají levé a horní strany čtverce. Koncentraci v 1 mm^3 zjistíme výpočtem. Tento postup se poté opakuje ještě jednou, a pokud není rozdíl větší než 15 %, počítá se s průměrem obou měření (Louda a kol., 2001).

Fotometrický přístroj pracuje na principu měření světla procházejícího roztokem ejakulátu a izotonického roztoku. Podle stupně zakalení se určuje koncentrace spermií. Pro správnost měření je potřeba mít přístroj správně zkalibrován (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976). Použitím přístroje lze odbourat nepřesnosti způsobené subjektivním pozorováním hodnotitele. Jeho další výhodou je také rychlost měření a malá potřeba ejakulátu (Louda a kol., 2001). Dle Věžníka a kol. (2000) je však měření koncentrace

pomocí fotometru považováno za méně přesné. Dodává, že stanovení je pouze orientační, a proto je doporučováno kontrolní měření pomocí Bürkerovy komůrky (Věžník a kol., 2000). Samper (2009) uvádí další nevýhodu, a to neschopnost přístroje rozlišit spermie od jiných nežádoucích buněk (odloupaný epitel, krvinky).

Přesné stanovení koncentrace spermií v ejakulátu má velký význam při vytváření inseminačních dávek a při jejich komerčnímu prodeji, zejména pokud se zaručuje určitý počet spermií v inseminační dávce (Samper, 2009).

3.6.2.3 Morfologické hodnocení spermií

Hodnocení morfologického obrazu spermií je podstatnou složkou analýzy ejakulátu, poskytuje mnoho důležitých informací pro posouzení plemenné hodnoty hřebce a kvality jednotlivých vzorků spermatu, jak již bylo uvedeno dříve ve vztahu k plodnosti (Brito a kol., 2011). Poruchy spermatogeneze mohou vést k různým morfologickým abnormalitám spermií, které pak ovlivňují plodnost vytvořením defektní zygoty nebo mohou blokovat oplození zdravými spermii (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Morfologické vyšetření spermií vyžaduje speciální mikroskopickou techniku a hodnotitele se značnými znalostmi a zkušenostmi. Vyhodnocení je také velmi časově náročné, jak kvůli přípravě nátěrů k hodnocení, tak kvůli samotnému hodnocení (Lipenský a kol., 2014). K posouzení je potřeba napočítat alespoň 200 spermií a stanovit procento abnormálních a morfologicky změněných spermií. Pro hodnocení se používá nejméně 1000 násobné zvětšení obarveného nátěru (Věžník a kol., 2000). Dále Věžník a kol. (2004) dodává, že při hodnocení je také nutné určit poměr normospermií k vadným spermii, kvalifikovat jednotlivé vady a určit přítomnost jiných buněčných elementů (nezralé formy spermií). Vyšetření se provádí vždy na čerstvém spermatu, zbaveném hlenovité frakce, která by mohla narušit zobrazení spermií (Brito, 2007). Kapku ejakulátu je třeba promíchat na předeřátém hodinovém sklíčku se zředěvacím roztokem, nejčastěji se používá fyziologický roztok NaCl. Takto zředěné sperma se jednorázovou Pasteurovou pipetou přenesou na okraj podložního sklíčka a roztěrovým sklíčkem se provede nátěr. Poté se nátěr nechá 1 – 3 minuty zaschnout na termostatické desce při teplotě 35 – 39°C (Louda a kol., 2001).

Pro zkoumání morfologie hřebčích spermií bylo navrženo mnoho různých barvicích technik. Obarvené nátěry vzorků spermatu jsou pak hodnoceny ve světelném poli mikroskopu (Samper, 2009). Mezi nejčastější metody barvení se řadí barvení podle

Farellyho, podle Hancocka (pufrovaným roztokem Giemsky), metoda Byghošť, metody WELS I, II. a X., metoda dle Karrassa – Kördela a další (Louda a kol., 2001). Každá z těchto barvicích metod je zaměřena na jinou část spermie. Na tvarové vady se zaměřuje např. Farelly a Byghošť, na vady akrozomu např. metoda Hancocka nebo Karrassa – Kördela (Gamčík, Kozumplík a kol., 1976).

Samper (2009) uvádí, že v obarvených nátěrech byl výskyt morfologických vad vyšší ve srovnání v hodnocení neobarveného preparátu. Což může znamenat, že barvicí metody mohou do určité míry spermie také poškozovat. Gamčík, Kozumplík a kol. (1976) také dodává, že nesprávný postup či neopatrná manipulace při zhotovování nátěru může způsobovat různé umělé změny, které lze zaměnit s abnormalitami. Jedná se především o vady na hlavičce (dekapitace hlavičky, poškození akrozomu) a bičíku spermie (roztrhnutý či potrhaný bičík). Ball (2008) dále upozorňuje, že chladový šok před fixací a barvení nátěru, může způsobovat vady na akrozomu a mitochondriálním oddílu bičíku. Další rozdíly ve výsledcích mezi jednotlivými metodami barvení lze přičíst špatné interpretaci vad, špatnému zobrazení či neznalosti hodnotitele. Nicméně správná kvantifikace a kvalifikace specifických vad spermií může pomoci určit diagnózu a odhadnout prognózu reprodukčních problémů plemeníka (Brito a kol., 2011).

Věžník a kol. (2000) popisuje a doporučuje metodu hodnocení morfologie spermií SASMO (striktní analýza spermatické morfologie) pomocí speciálního programu. Tento program slouží k přesnějšímu hodnocení morfologickému obrazu. Využívá se zde speciálního mikroskopu připojenému k počítači s programem SASMO. Při analýze se bere v úvahu celá spermie a hodnotí se veškeré vady, které se na spermií vyskytují (Věžník a kol., 2004).

3.6.2.4 Testy přežitelnosti a rezistence

Jako nepřímý ukazatel fertility ejakulátu se používají testy přežitelnosti spermií – termický test a dlouhodobý test přežitelnosti (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992). Hodnotí se aktivita spermií v ejakulátu po krátkodobém tepelném testu a dlouhodobém chladovém testu přežitelnosti. Výsledná aktivita spermií ukazuje biologickou hodnotu a oplozovací schopnost spermií. Z těchto testů vyplývá vysoká korelace mezi výsledky a skutečnou plodností (Louda a kol., 2001). Dále zkouška rezistence spermií zkoumá odolnost cytoplazmatické membrány vůči působení roztoku NaCl. Během testu probíhá postupné zvyšování koncentrace NaCl. Výsledná koncentrace, při níž ustává veškerý

pohyb v ejakulátu, je ukazatelem odolnosti vůči nepříznivým vlivům (Gamčík, Kozumplík a kol., 1992).

3.6.3 Biochemické metody

Tyto metody zahrnují zkoumání metabolismu spermií a tím posuzují životnost a oplozovací schopnost ejakulátu. Jedná se např. o zjišťování hladiny fruktózy, která je zdrojem energie pro spermie. K hodnocení se používá dehydrogenační zkouška, při které je sledována rychlost fruktolýzy vzhledem v počtu pohyblivých spermií. Dalším testem může být zkouška anaerobního metabolismu, při které se stanovuje obsah fruktózy (Louda a kol., 2001).

Gamčík, Kozumplík a kol. (1976) řadí do biochemických metod také určování pH ejakulátu. Stanovení koncentrace vodíkových iontů lze provést dvěma způsoby: indikátorovým papírkem nebo pH metrem. Hodnota pH je dána činností přídatných pohlavních žláz. Měření pH je nutné provést ihned po odběru, s životními pochody spermií se totiž pH může měnit (Louda a kol., 2001). S přibývajícím časem mezi odběrem spermatu a měřením, můžeme získat nižší hodnoty pH, kvůli zvyšování obsahu látek metabolismu spermií (kyselina mléčná). Naopak zvýšené pH může znamenat kromě získání neúplného ejakulátu také kontaminaci ejakulátu močí, zánět pohlavního ústrojí plemeníka nebo kontaminaci získaného ejakulátu vazelínou z umělé vagíny (Ball, 2008). Louda a kol. (2001) dodává, že ejakuláty s naměřenou nižší nebo vyšší hodnotou pH mají sníženou oplozovací schopnost a je nevhodné takové ejakuláty používat k inseminaci.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Materiálem použitým pro hodnocení kvantitativních a kvalitativních ukazatelů byl čerstvý ejakulát 12 plemenných hřebců zařazených do plemenitby pro rok 2015. Tito hřebci byli v majetku Zemského hřebčince Tlumačov, státního podniku. Sledováni byli hřebci různých plemen, 7 teplokrevných hřebců různých plemen, 3 chladnokrevní hřebci, 1 hřelec plemene Huculský kůň a 1 hřelec plemene Český sportovní pony.

Odběr semene probíhal během připouštěcí sezóny 2015, od poloviny dubna do konce července. Byly provedeny 4 odběry a celkem bylo získáno 47 vzorků čerstvého ejakulátu.

1979 Quentino

Holštýnský teplokrevník, tmavý hnědák, narozen 21. 3. 2011.

Tento hřelec po Quick Fire, z matky T – Casina po Cassini I je vítězem výběru mladých hřebců do plemenitby ČT v roce 2013, díky jeho silnému a technicky bezchybnému skoku. Má také výborný exteriér, vyrovnaný rámec a konstituci. V roce 2014 obsadil první místo mezi skokovými hřebci v 70denním testu teplokrevných hřebců, s výsledkem 8,58 bodů.

Otec Quick Fire byl na holštýnském Körungu hodnocen jako prvotřídní sportovec. Mateřský otec Cassini I patří mezi velikány holštýnského i světového chovu.

2745 Oskar

KWPN, bělouš, narozen 20. 4. 1996.

Hřelec po Celano, z matky Jodessa po Darnels byl do České republiky importován z Holandska. Jedná se o skokově velmi nadaného hřebce s velmi dobrým charakterem. Ve 100denním testu hřebců obsadil 6. místo z 19-ti účastníků. Jako pětiletý se ve finále KMK umístil na 2. místě. Jeho vlastní výkonnost v parkurových soutěžích je na úrovni „TT“. Na Mistrovství České republiky se pravidelně umísťuje na předních příčkách. V žebříčku nejlepších koní ve skokových soutěžích se umístil na 2. místě v letech 2005 a 2006 a v roce 2009 byl na 1. místě. Do plemenné knihy ČT má zapsáno již 13 klisen.

Otec Celano působil jako holštýnský kůň v Holandsku, také získal mnoho mezinárodních úspěchů. Matka Jodessa plemene KWPN také působila v Holandsku.

1875 Canturino

Holštýnský kůň, tmavý hnědák, narozen 25. 4. 2005.

Tento hřebec po Canturo, z matky Raffiness po Mytens představuje vzor sportovního koně s perfektním exteriérem, charakterem i pohybem. Jeho dokonalý hřebčí výraz doplňuje velmi dobrá technika skoku, vynikající vznos a prostor nad skoky. V roce 2009 absolvoval test hřebců v Německu. Jeho výborné hodnocení – celkový index 110,99 ho zařadil mezi nejlepší hřebce v testu. Jeho hříbata se projevují výraznou ušlechtilostí, což je dáno vysokým podílem plnokrevníka. Ve třetí generaci najdeme z dnešního pohledu nejúspěšnějšího producenta skokových koní Landgrafa I.

Otec Canturo měl velké úspěchy na nejvýznamnějších světových parkurových kolbištích. Mateřský otec Mytens byl charizmatickým plnokrevníkem s nádherným exteriérem a jeho potomci sbírali úspěchy na německých šampionátech ve všestrannosti.

5171 Lord Weingard

Oldenburský kůň, ryzák, narozen r. 2001.

Vynikající hřebec po Lordanos, z matky Weinland po Landadel je mimořádně kvalitním hřebcem. V roce 2004 absolvoval 30denní test s excelentním celkovým výsledkem 8,29 a zvláště vynikajícím výsledkem 8,63 za skok. Působí jak v chovu, tak ve sportu. Velmi rychle se dostal do mezinárodního parkurového sportu a v roce 2010 sbíral úspěchy ve tříhvězdičkových T parkurech. Potomci Lorda Weingarda jsou také úspěšní sportovci, jeho nejstarší potomci již dosáhli úspěchů v T parkurech. Tímto získal 145 bodů v rámci odhadu plemenných hodnot Německé jezdecké federace 2013.

Otec Lordanos patří v současnosti mezi nejlepší německé skokové plemeny, vítězí v mnoha těžkých parkurech. Mateřský otec Landadel je jedním z nejúspěšnějších synů hřebce století Landgrafa I.

2815 Catalin IV – 33 (I MT)

Furioso, hnědák, narozen r. 1990.

Mohutný, souladný hřebec po Catalin IV – Mot., z matky 808 Furioso XLVI – 3 po Furioso XLVI – Mot. byl využíván ve voltižních soutěžích na domácích i mezinárodních kolbištích. Jeho předností je konstituční tvrdost a dobré charakterové vlastnosti.

Otec Catalin IV patří k Motešické linii, kterou založil hřebec Catalin K. Matka 808 Furioso XLVI patří k Pohořelické linii, kterou založil hřebec 34 Furioso XLVI.

1321 Catango HT

Český teplokrevník, hnědák, narozen r. 2005.

Catango HT po Catango Z, z matky Julie po Grand Step je ušlechtilý hřebec s dobrými sportovními předpoklady. Ve 100denním testu hřebců byl hodnocen známkou 8,1 bodů a byl velmi dobře hodnocen při skoku ve volnosti. V roce 2009 zvítězil v kategorii čtyřletých v KMK, v roce 2010 byl druhý v kategorii pětiletých. V roce 2011 v kategorii šestiletých zvítězil a začlenil se mezi plemeníky, kteří jsou zařazeni v akceleračním programu Českého teplokrevníka. V současné době působí ve sportu v parkurových soutěžích stupně ST**.

Otec Catango Z je považován za jednoho ze zlepšovatelů skokových koní v ČR v posledních letech. Mateřský otec Grand Step je potomkem světově známého plemeníka Granus.

2048 Olly

České sportovní pony, hnědák, narozen 7. 4. 2011.

Hřebec po 1524 Orion s.v., z matky 65/15 Amálka po 3761 Filip je typickým představitelem plemene Český sportovní pony se všemi požadovanými vlastnostmi. Po založení PK v roce 2000 je toto plemeno šlechtěno na všestranné jezdecké využití s důrazem na tvrdou konstituci, nenáročnost a odolnost. Důraz je také kladen na dobrý charakter, ovladatelnost a ochotu k práci. Olly je všestranný, jak při použití na práci pod sedlem, tak ve spřežení. Ve výkonostních zkouškách dosáhl bodového hodnocení 8,1 a byl tak zařazen do akceleračního programu.

Jeho předci ve třetí generaci dosáhli výkonnosti „T“ v parkurovém skákání.

1847 Pietrosu Nelson

Huculský kůň, hnědák, narozen 14. 5. 2009.

Hřebec po Pietrosu XI-I L, z matky Oušor IX-13 L po Oušor IX L je temperamentním hřebcem s dobrou mechanikou pohybu a dobrým charakterem. Pochází z linie Pietrosu a je jedním z mála hřebců z této linie, kteří působí v ČR. Je použitelný jak na práci pod sedlem, tak na práci v zápřahu. Pietrosu Nelson byl vybrán jako genový zdroj a je jen ojediněle příbuzný s klisnami chovanými v ČR.

Otec Pietrosu XI-I L je typickým představitelem přes 80 let staré linie Pietrosu. Matka Oušor IX-13 L je vítězkou v kategorii klisen na Mezinárodním chovatelském šampionátu v Topolčiankách v roce 2008.

1889 Armin Q

Hafling, ryzák, narozen 18. 1. 2010.

Mladý, sportovně nadaný hřebec po Alkatras, z matky Dalmazia po Aslan – Z byl do České republiky importován z Itálie. Tento hřebec je v moderním typu haflinga s vyrovnaným charakterem, s vynikající mechanikou pohybu s výraznou akcí předních končetin a velmi dobrým skokovým stylem. V roce 2012 byl zařazen do chovu po körungungu v Meranu, kde se umístil na pátém místě z celkového počtu 46 hřebců. S bodovým hodnocením 8,9 bodů je zařazen do akceleračního programu. Výkonnostní zkoušky nahradil úspěšným absolvováním řady skokových parkurů stupně ZM a Z. Nadějný je i v drezúrních soutěžích a díky své ovladatelnosti má velký potenciál v soutěžích všestrannosti.

Řadíme ho do linie A, je oboustranně prochován na slavného Afghana I. Má 0% příměs arabské krve.

2943 Dahoman IV – CZ „Tamarix“

Shagya arab, bělouš, narozen 1. 3. 2001.

Tento hřebec po 4 Dahoman XI / Dahoman X – 3, z matky 583 Koheilan IV – 57 / Tamariška je ideálním typem koně, středně velkého rámce a všestranně využitelného. Výkonnostní zkoušky vykonal v NŽ Topolčianky s hodnocením 9,43 bodů za typ a pohlavní výraz, 8,59 bodů získal za exteriér a 8,80 bodů za výkonnost. S výsledným počtem 8,99 bodů je zařazen do třídy E. Tento hřebec je třináctou generací uchované linie plemene Shagya-Arab bez přílivu genů jiných plemen.

Řadíme ho k linii založené originálním arabským hřebcem Dahomanem, který se narodil v roce 1846 v Sýrii. V jeho rodokmenu se vyskytují kmeny Shagya, Koheilan, Siglavy Bagdady a Gazal.

1435 Markon

Českomoravský belgický kůň, ryzák, narozen 4. 3. 2007.

Hřebec Markon po 2670 Mazur, z matky 55 / 237 Hera po 2715 Azur je typickým představitelem plemene Českomoravský belgický kůň s výborným charakterem a ochotou k práci. V roce 2009 absolvoval výkonnostní zkoušky s hodnocením 8,24 bodů za exteriér a 8,60 bodů za výkon. S počtem 59,3 % původních genů byl zařazen do genových zdrojů českomoravského belgického koně. Řadíme ho k linii 9 Marquis de Vraimont. Jeho dvě dcery jsou zařazeny v chovu.

1700 Ryho

Slezský norický kůň, ryzák, narozen 3. 3. 2009

Tento hřebec po 2637 Ryo, z matky 72 / 838 Jana po 2415 Hugo je jedním ze dvou posledních žijících potomků po 2637 Ryo působících v chovu. Je středního rámce, dobrého charakteru a klidného temperamentu. V roce 2011 vykonal výkonnostní zkoušky chladnokrevných hřebců s body 7,72 za exteriér a 7,66 za výkon. Řadíme ho do méně početné linie 2500 Ritz Vulkan VIII. S počtem 52,8 % původních genů byl vybrán do genových zdrojů Slezského norického koně.

4.2 Metodika

4.2.1 Odběr ejakulátu

Odběry se uskutečnily v prostorách reprodukčního centra Zemského hřebčince Tlumačov. Vybraní hřebci byli odebíráni na fantomu za použití umělé vaginy typu Missouri. Louda a kol. (2001) popisuje postup přípravy umělé pochvy pro býky, obdobný postup byl použit i pro hřebce.

Před odběrem byla pro každého hřebce zvlášť připravena umělá vagina. Do gumové vložky byla napuštěna voda o teplotě 40 – 42°C a dále se vložka dofoukla vzduchem tak, aby tlakem simulovala pohlavní cesty klisny. Jako sběrač ejakulátu byla použita jednorázová vložka z polyethylenu, která byla na jednom konci zatavena a vložena do vnitřního prostoru vaginy. Vnitřní stěny jednorázové vložky byly vymazány bílou vazelínou, která zde zajišťuje přirozenou kluzkost.

Ve většině případů byli hřebci naučeni ke skoku na fantoma bez přítomnosti klisny a stačil jim pouze přítomný pach moči řjící se klisny. V ojedinělých případech byla nutná přítomnost klisny.

Po odběru byl zatavený konec sběrače s odebraným ejakulátem odstřižen a ejakulát se přelil do sterilního a předehřátého odměrného válce pro zjištění objemu odebraného ejakulátu. Ejakulát byl přecezen přes sterilní gázu, kde se měly zachytit nečistoty a hlenová část. Objem ejakulátu byl tedy měřen bez hlenové frakce. Dále bylo v laboratoři reprodukčního centra provedeno stanovení aktivity.

4.2.2 Hodnocení aktivity

Stanovení aktivity spermií bylo provedeno subjektivní metodou pozorování vzorku pod mikroskopem. Ihned po odběru a změření objemu ejakulátu byla odebrána kapka ejakulátu a přenesena na podložní sklíčko předehřáté na teplotu $39^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Následně byla kapka přikryta tenkým krycím sklíčkem.

Pro posuzování aktivity se používá mikroskop s fázovým kontrastem a vyhřívací destičkou, která je vyhřátá na teplotu $38 - 40^{\circ}\text{C}$. Aktivita byla hodnocena při 200 až 300 násobném zvětšení. Pro určení aktivity je potřeba zhodnotit minimálně tři zorná pole a procentické zastoupení spermií pohybujících se přímočaře vpřed za hlavičkou bylo určeno odhadem. Zároveň byla provedena kontrola ostatních nežádoucích druhů pohybu (pohyb v kruhu, trhavý, zpětný) a případné shlukování spermií.

4.2.3 Hodnocení koncentrace spermií

Koncentrace spermií byla stanovena pomocí hemocytometrické metody počítáním v Bürkerově komůrce. Hodnocení bylo provedeno podle postupu, který popsal Louda a kol. (2001).

Do melanžéru byl nasát 3% roztok NaCl ke značce /4975 μl / a obsah se nechal vytéct do baňky. Dále se mikropipetou nasálo sperma po značku 25 μl a přidalo se do stejné baňky jako roztok NaCl. Obsah baňky se pečlivě promíchal 1 – 2 minuty. Kapka zředěného a promíchaného spermatu se kápala na hranu krycího sklíčka Bürkerovy komůrky a kapka se nechala vtéci do prostoru mřížky. Krycí sklíčko se jemně zatlačilo palci, pokud se objevily duhové skvrny, byla komůrka připravena k počítání.

Bürkerova komůrka byla položena pod mikroskop a spermie se počítaly pod 300 až 400 násobném zvětšení. Spermie byly spočítány v 10 čtvercích o velikosti $1/25 \text{ mm}^2$. Započítány byly všechny spermie, které byly uvnitř čtverečku a ty, jejichž hlavičky ležely nebo se dotýkaly horní a levé strany čtverce. Dále byl postup počítání zopakován na druhé mřížce Bürkerovi komůrky. Hodnoty byly poté zprůměrovány a průměrný počet spermií byl vynásoben číslem 5000, což značilo koncentraci spermií v 1 mm^3 .

4.2.4 Příprava vzorků pro morfologické hodnocení

Pro jednotlivé vzorky byly v předstihu nachystány podložní sklíčka, která byla popsána zkratkami pro jednotlivé hřebce a typy barvení. Tyto sklíčka byla předeřhřata na vyhřívací desce na teplotu $39^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Dále bylo použito podložní sklíčko s důlkem, ve kterém proběhlo zředění spermatu. Do důlku byla přenesena kapka ejakulátu a dvě kapky fyziologického roztoku a opatrnými krouživými pohyby bylo sperma promícháno. Jednorázovou pipetou pak byla kapka zředěného ejakulátu přenesena na kraj podložního sklíčka a roztěrovým sklíčkem se zbroušenou hranou byl vytvořen nátěr.

Jednotlivé nátěry se nechaly na vyhřívací desce zaschnout a suchá podložní sklíčka s nátěry byla dána do speciální krabice na sklíčka, aby mohla být bezpečně převezena do laboratoře reprodukce Ústavu chovu a šlechtění hospodářských zvířat Mendelovy univerzity v Brně, kde probíhalo další zpracování a zkoumání.

4.2.5 Barvení vzorků pro morfologické hodnocení

Vzorky pro morfologickou analýzu byly hodnoceny pomocí dvou rozdílných metod barvení. První metodou bylo barvení dle B. T. Farellyho a druhé barvení bylo metodou Byghošť (Jaškovski a spol. 1968). Metodický návod metod, podle kterého se postupovalo při barvení nátěrů, popsal Louda a kol. (2001) a také Gamčík, Kozumplík a kol (1992).

4.2.5.1 Barvení dle B. T. Farellyho

Tato metoda je využívána k posouzení patologických a nezralých spermií, dále k vyšetření akrozomu a střední části bičíku. Výhoda této metody je v rychlosti barvení preparátů.

Suchá podložní sklíčka s nátěry byla fixována v roztoku formaldehydu po dobu 15 sekund. Následně se sklíčka opláchla slabým proudem vody. Dále byl preparát

ponořen do 5% roztoku anilinové modři na 15 sekund a následovalo další opláchnutí slabým proudem vody. Poslední barvení bylo v 0,5% roztoku krystalické violeti po dobu 4 – 6 sekund. Preparát se naposledy opláchl slabým proudem vody a nechal se uschnout na vyhřívací desce. Suché obarvené preparáty byly připraveny na mikroskopické posouzení.

4.2.5.2 Barvení metodou Byghošť

Touto metodou lze pozorovat primární změny hlavičky a bičíku spermie. Po barvení má hlavička spermie barvu podobnou květu černého bezu a bičík spermie je zbarven do tmavě fialové.

U suchých reparátů se provedla fixace nátěrů v 96% roztoku ethanolu po dobu 30 sekund. Po vyjmutí z ethanolu se preparáty opláchly slabým proudem vody a následovala fixace 1% roztokem eosinu po dobu 15 sekund. Znovu se preparáty opláchly slabým proudem vody a proběhla poslední fixace barvivem Byghošť po dobu 15 – 30 sekund. Barvivo Byghošť se skládá z methylenové modři, genciánové violeti, glycerolu a vody. Po vyjmutí preparátu z barviva se naposledy opláchnul slabým proudem vody a nechal se uschnout na vyhřívací desce. Suché obarvené preparáty byly připraveny na mikroskopické posouzení.

4.2.6 Hodnocení morfologických vad spermií

Z ejakulátu každého hřebce byly vytvořeny vždy dva nátěry, jeden byl obarven metodou dle Farellyho a druhý byl obarven metodou Byghošť.

Morfologické preparáty byly hodnoceny mikroskopicky při 1000 až 1500 násobném zvětšení za použití olejové imerze. V každém vzorku bylo hodnoceno 200 spermií, u kterých byly pozorovány morfologické vady. Pozorované morfologické vady byly rozděleny na vady na akrozomu, vady na hlavičce, vady spojovací části, vady bičíku, abnormální vývoj spermií a nezralé spermie. Přičemž vady hlaviček byly dále rozděleny na dekapitaci hlavičky, vady krčku a ostatní vady hlavičky spermie. Také vady bičíku se dále dělí na Dag defekt a ostatní vady bičíku spermie. Mezi vyšetřovanými spermii byl také zjišťován počet normospermií.

Hodnocení a porovnání těchto kvalitativních ukazatelů ejakulátu bylo provedeno pro každého hřebce a každou barvicí metodu zvlášť.

Při hodnocení morfologických vad spermií byly pořízeny fotografie nátěrů programem QuickPHOTO INDUSTRIAL 3.0 CZ. Fotografie morfologických vad viz Příloha 16 – 21.

4.2.7 Statistická analýza

Ke zhodnocení veškerých dat byl použit program Microsoft Excel. Získaná data kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu byla vyhodnocena pomocí statistického programu STATISTICA verze 12, hodnocení průkaznosti rozdílů mezi jednotlivými typy barvení a jednotlivými typy morfologických vad bylo provedeno t – testem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Hodnocení kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu u jednotlivých hřebců

Pro zpracování výsledků bylo použito celkem 47 vzorků čerstvého ejakulátu získaného od 12 plemenných hřebců zařazených do plemenitby pro rok 2015. Zjištěné hodnoty objemu, aktivity, koncentrace, patologických spermií a normospermií u jednotlivých hřebců během odběrů jsou uvedeny a popsány v tabulkách 1 – 12.

Tabulka 1 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Quentino

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	10	25	50	25
Aktivita [%]	85	80	70	80
Koncentrace [10^6 / ml]	460	540	215	440
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	51,5	30,5	38	43
barvení Bydgošť	60,5	37,5	39,5	40,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	48,5	69,5	62	57
barvení Bydgošť	39,5	62,5	60,5	59,5

U hřebce Quentina se během odběrů pohyboval objem ejakulátu v rozmezí od 10 do 50 ml a jeho průměrná hodnota byla 27,5 ml. Aktivita spermií se pohybovala od 70 do 85 % a průměrná hodnota byla 78,75 %. Naměřená koncentrace ejakulátu se pohybovala od 215 do $540 \times 10^6/\text{ml}$ a její průměrná hodnota byla $413,75 \times 10^6/\text{ml}$. Výskyt morfologických vad se pohyboval v rozmezí od 30,5 do 51,5 % s průměrem 40,75 % při barvení metodou B. T. Farellyho a výskyt morfologických vad při barvení metodou Bydgošť se pohyboval v rozmezí od 37,5 do 60,5 % a průměrný výskyt byl 44,5 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejnižší objem odebraného ejakulátu byl získán při prvním odběru, zároveň zde byl zjištěn nejvyšší výskyt morfologických vad u obou metod barvení. Hodnocení

jednotlivých morfoloických vad viz Příloha 1. Ve vzorku z prvního odběru bylo zjištěno celkem 34,42 % vad hlaviček a z toho 22,13 % dekapitovaných hlaviček při barvení metodou Byghošť. Vysoké procento vad hlaviček bylo zjištěno i u druhého barvení, avšak mezi jednotlivými odběry nebyly zjištěny velké výkyvy. Ve třetím odběru byl zjištěn velký výskyt vad akrozomů při barvení metodou Byghošť, a to 3,37 %. Celkově bylo také zjištěno velké procento výskytu nezralých spermií, nejvíce v prvním odběru při barvení metodou B. T. Farellyho, a to 16,03 %. Při prvním a čtvrtém odběru bylo také zjištěno vyšší procento abnormálně vyvinutých spermií.

Tabulka 2 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Oskar

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	85	110	130	100
Aktivita [%]	60	60	65	70
Koncentrace [10^6 / ml]	222,5	240	157,5	127,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	46,5	33,5	37,5	42
barvení Bydgošť	51	34	36,5	39,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	53,5	66,5	62,5	58
barvení Bydgošť	49	66	63,5	60,5

U hřebce Oskara byly zjištěny hodnoty objemu ejakulátu během odběrů v rozmezí od 85 do 130 ml a průměrný objem byl 106,25 ml. Aktivita spermií se pohybovala v rozmezí od 60 do 70 % s průměrem 63,75 %. Hodnoty koncentrace se pohybovaly z rozmezí od 127,5 do 240×10^6 /ml a její průměrná hodnota byla $186,85 \times 10^6$ /ml. Morfoloické vady se během odběrů vyskytovaly v rozmezí od 33,5 do 46,5 % s průměrnou hodnotou 39,85 % při barvení metodou B. T. Farelly a v rozmezí od 34 do 51 % s průměrem 40,25 % při barvení metodou Bydgošť. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejnižší objem ejakulátu byl získán při prvním odběru a v laboratoři pak byly zjištěny i nejvyšší hodnoty morfoloických vad v ejakulátu z tohoto odběru. Hodnocení jednotlivých morfoloických vad viz Příloha 2. Nejvíce se v tomto vzorku objevovaly vady hlaviček, a to 22,56 % z toho bylo 11,28 % morfoloických vad krčku při barvení

metodou Byghošť. Také vysoké procento vad hlaviček bylo pozorováno ve čtvrtém odběru, a to 19,27 % a z toho bylo 16,8 % dekapitovaných hlaviček při barvení metodou B. T. Farelly. Dále bylo v prvním odběru zjištěno 14,39 % vad bičíků při barvení metodou Farelly, což bylo ojediněle vysoké procento vad bičíků u tohoto hřebce. Ve všech odběrech byl zaznamenán vysoký výskyt nezralých spermií při obou typech barvení.

Tabulka 3 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Canturino

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	30	70	110	80
Aktivita [%]	75	80	70	65
Koncentrace [10^6 / ml]	610	550	522,5	207,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	42	45,5	45,5	39,5
barvení Bydgošť	46,5	42,5	39	42,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	58	54,5	54,5	60,5
barvení Bydgošť	53,5	57,5	61	57,5

Hřelec Canturino vykazoval během odběrů velké výkyvy v objemu odebraného ejakulátu, hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 30 do 110 ml a průměrná hodnota byla 72,5 ml. Zjištěná aktivita se pohybovala od 65 do 80 % a její průměrná hodnota byla 72,5 %. Koncentrace ejakulátu se pohybovala v rozmezí od 207,5 do 610×10^6 /ml s průměrem $472,5 \times 10^6$ /ml. Morfologické vady se vyskytovaly v rozmezí od 39,5 do 45,5 % a průměrnou hodnotou 43,1 při barvení metodou B. T. Farelly a při barvení metodou Byghošť se pohybovaly hodnoty v rozmezí od 39 do 46,5 % s průměrnou hodnotou 42,6 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejnižší hodnoty koncentrace byly naměřeny při čtvrtém odběru, kdy byla zároveň vyhodnocena i nejnižší aktivita spermií. Naopak při tomto odběru a barvení metodou B. T. Farelly byl zjištěn nejnižší výskyt morfologických vad. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 3. Během odběrů byla pozorována malá procenta jednotlivých morfologických vad, kromě vad bičíků při druhém odběru a barvení metodou B. T. Farelly, kdy bylo zjištěno 10 % vad bičíků a při třetím odběru a barvení

metodou Byghošť, kdy bylo zjištěno 9 % vad bičíků. Velkým problémem u toho hřebce může představovat zjištění velkého výskytu nezralých spermií, který byl ve všech odběrech, kromě třetího odběru – barvení metodou Byghošť, více než 20 %.

Tabulka 4 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Lord Weingard

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	20	45	50	55
Aktivita [%]	80	75	85	85
Koncentrace [10^6 / ml]	222,5	577,5	282,5	250
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	44,5	32,5	33,5	29,5
barvení Byghošť	49	32,5	29,5	41,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	55,5	67,5	66,5	70,5
barvení Byghošť	51	67,5	70,5	58,5

Lord Weingard měl hodnoty objemu odebraného ejakulátu v rozmezí od 20 do 55 ml s průměrem 42,5 ml. Zjištěná aktivita byla v rozmezí od 75 do 85 % a její průměr byl 81,25 %. Rozmezí naměřené koncentrace během odběrů bylo od 222,5 do 577,5 $\times 10^6$ /ml s průměrnou hodnotou 333,1 $\times 10^6$ /ml. Výskyt morfologických vad se pohyboval v rozmezí od 29,5 do 44,5 % s průměrem 35 % při barvení metodou B. T. Farelly. Výskyt vad při barvení metodou Byghošť byl v rozmezí od 29,5 do 49 % s průměrem 38,1 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

V prvním odběru byl získán nejnižší objem a zároveň byla naměřena nejnižší koncentrace spermií v ejakulátu. V tomto odběru byly zjištěny také nejvyšší hodnoty morfologických vad při obou metodách barvení. Nejvíce vad bylo zjištěno na hlavičkách při barvení metodou Byghošť, a to 40,68 % a z toho 29,2 % dekapitovaných hlaviček. Podle Brita (2007) by zvýšený výskyt dekapitovaných hlaviček mohl být způsoben buněčným stárnutím spermií v nadvarleti, k čemuž dochází při méně častých odběrech ejakulátu. Během našeho zkoumání však tento hřelec chodil na odběry ejakulátu pravidelně. Také barvení B. T. Farelly odhalilo vysoké procento vad hlaviček, a to 15,96 % a z toho 10,16 % vad krčku spermie. Ve druhém a čtvrtém odběru bylo zjištěno

vyšší procento nezralých spermií, 10,5 % a 17,29 % při barvení metodou Byghošť. U této metody bylo také zjištěno 3,95 % abnormálně vyvinutých spermií ve čtvrtém odběru. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 4.

Tabulka 5 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Catalin

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	80	90	95	75
Aktivita [%]	90	70	85	75
Koncentrace [10^6 / ml]	240	395	590	337,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	46,5	29,5	38,5	32,5
barvení Bydgošť	37	31,5	43,5	36,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	53,5	70,5	61,5	67,5
barvení Bydgošť	63	68,5	56,5	63,5

U hřebce Catalina byly zjištěny hodnoty objemu v rozmezí od 75 do 95 ml a jeho průměrná hodnota byla 85 ml. Aktivita se pohybovala v rozmezí od 70 do 90 % s průměrnou hodnotou 80 %. Koncentrace spermií v ejakulátu se pohybovala v rozmezí od 240 do $590 \times 10^6/\text{ml}$ a průměrná hodnota byla $390,5 \times 10^6/\text{ml}$. Zjištěný výskyt morfologických vad se pohyboval od 29,5 do 46,5 % s průměrem 36,75 % při barvení metodou B. T. Farelly a při barvení metodou Byghošť se pohyboval v rozmezí od 31,5 do 43,5 % s průměrem 37,1 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejvyšší koncentrace byla naměřena při třetím odběru, ve kterém byla zjištěna i vysoká aktivita. Avšak v tomto odběru obě metody barvení odhalily velmi vysoké procento výskytu nezralých spermií, a to 19,98 % při barvení metodou B. T. Farelly a až 29,5 % při barvení metodou Byghošť. Louda a kol. (2001) upozorňuje, že výskyt nezralých spermií v ejakulátu u zdravého jedince by neměl přesáhnout 2 %. Avšak Colebrander a kol. (2003) ve své práci uvádí, že výskyt spermií s cytoplazmatickými kapénkami, tedy nezralých spermií do 25 % v ejakulátu je stále v normě. Při prvním odběru bylo dále zjištěno 23,02 % vadných hlaviček při barvení metodou B. T. Farelly. Alarmující je také zjištění vysokého výskytu abnormálně vyvinutých spermií v prvním

odběru při barvení metodou Bydgošť, který byl 24 %. Podle některých autorů by narušení cytoplazmatické membrány spermie mohlo být způsobeno samotným barvením. Při našem pozorování však jedno či druhé barvení nezpůsobovalo narušení spermií ve větší míře. Vzhledem k věku hřebce, kterému bylo v době odběrů 25 let, nejsou zjištěné hodnoty vadných hlaviček a abnormálně vyvinutých spermií nijak neočekávané, bereme-li v úvahu vliv vysokého věku na sníženou schopnost semenotvorného epitelu varlat a průběh spermatogeneze. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 5.

Tabulka 6 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Catango HT

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	20	50	30	35
Aktivita [%]	70	65	75	70
Koncentrace [10^6 / ml]	510	580	777,5	365
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	49,5	35	31,5	48
barvení Bydgošť	46,5	40	31,5	50
Normospermie [%]				
barvení Farelly	50,5	65	68,5	52
barvení Bydgošť	53,5	60	68,5	50

Hřelec Catango HT měl hodnoty objemu pohybující se v rozmezí od 20 do 50 ml a jeho průměrná hodnota byla 33,75 ml. Aktivita se pohybovala v rozmezí od 65 do 75 % s průměrnou hodnotou 70 %. Naměřená koncentrace se pohybovala v rozmezí od 365 do $777,5 \times 10^6$ /ml a její průměrná hodnota byla $558,1 \times 10^6$ /ml. Morfologické vady se pohybovaly v rozmezí od 31,5 do 49,5 % s průměrnou hodnotou 41 % při barvení metodou B. T. Farelly a v rozmezí od 31,5 do 50 % s průměrem 42 % při barvení metodou Bydgošť. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejvyšší koncentrace spermií byl naměřena při třetím odběru, u kterého bylo zároveň zjištěno i nejvyšší procento aktivity. Tento ejakulát vykazoval nejvyšší procento normospermií u obou barvení. V prvním odběru barvení B. T. Farelly odhalilo 23,5 % vad hlaviček, z toho 12 % dekapitovaných hlaviček a 10 % vad krčku. Také u barvení

Byghošť bylo zjištěno 14,5 % vad hlaviček u prvního odběru. Ve třetím odběru u stejného barvení bylo zjištěno 10,78 % vad bičíků a vysoké procento nezralých spermií při prvním a druhém odběru. Vyšší výskyt vad bičíků byl zjištěn i u barvení B. T. Farelly ve druhém a čtvrtém odběru a přesahoval více než 14 %. Při stejném barvení bylo zjištěno 13,22 % vad spojovacího oddílu ve čtvrtém odběru. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 6.

Tabulka 7 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Olly

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	10	25	20	10
Aktivita [%]	60	60	70	60
Koncentrace [10^6 / ml]	415	720	360	517,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	42	41	41,5	42,5
barvení Bydgošť	40	43	40	39
Normospermie [%]				
barvení Farelly	58	59	58,5	57,5
barvení Bydgošť	60	57	60	61

U hřebce Ollyho se objem ejakulátu během odběrů pohyboval v rozmezí od 10 do 25 ml a jeho průměrná hodnota byla 16,25 ml. Tyto nízké objemy ejakulátu jsou dány plemennou příslušností hřebce. Aktivita se pohybovala v rozmezí od 60 do 70 % s průměrnou hodnotou 62,5 %. Koncentrace ejakulátu se pohybovala v rozmezí od 360 do 720 $\times 10^6$ /ml a průměr byl 503,1 $\times 10^6$ /ml. Zjištěné morfologické vady se pohybovaly v rozmezí od 41 do 42,5 % s průměrem 41,75 % při barvení metodou B. T. Farelly a při barvení metodou Bydgošť se morfologické vady pohybovaly v rozmezí od 39 do 43 % s průměrnou hodnotou 40,5 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Největší objem byl naměřen při druhém odběru, kdy byla zjištěna i nejvyšší koncentrace ejakulátu. Výskyt morfologických vad nevykazoval velké výkyvy mezi jednotlivými odběry a metodami barvení, rozdíly se vyskytovaly v zastoupení jednotlivých vad. Metodou barvení Bydgošť bylo zjištěno 3,81 % vad akrozomu v prvním odběru, přes 11 % vad hlaviček v prvním a čtvrtém odběru, převážně se jednalo o vady

tvarové a vady vnitřní struktury. Vady hlaviček odhalila také druhá metoda barvení, kdy ve čtvrtém odběru bylo zjištěno 17,29 % vad hlaviček, také převážně vady tvaru a vnitřní struktury. V tomtéž odběru bylo zjištěno 11,37 % vad spojovacího oddílu.

Obě metody barvení odhalily zvýšený výskyt nezralých spermií, při druhém odběru 25,41 % (Byghošť) a 24,4 % (B. T. Farely). Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 7.

Tabulka 8 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Pietrosu Nelson

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]		40	40	60
Aktivita [%]		70	75	65
Koncentrace [10^6 / ml]		385	505	370
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farely		44,5	44,5	53,5
barvení Byghošť		47	40	60
Normospermie [%]				
barvení Farely		55,5	55,5	46,5
barvení Byghošť		53	60	40

Hřebec Pietrosu Nelson byl zařazen do analýzy až při druhém odběru. Objem ejakulátu se pohyboval v rozmezí od 40 do 60 ml a jeho průměr byl 46,6 ml. Aktivita se pohybovala v rozmezí od 65 do 75 % s průměrnou hodnotou 70 %. Změřená koncentrace se pohybovala v rozmezí od 370 do 505×10^6 /ml s průměrem 420×10^6 /ml. Morfologické vady se vyskytovaly v rozmezí od 44,5 do 53,5 % s průměrnou hodnotou 47,5 % při barvení metodou B. T. Farely a v rozmezí od 40 do 60 % s průměrem 49 % při barvení metodou Byghošť. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Největší objem byl získán při čtvrtém odběru, ale zároveň zde byla zjištěna nejnižší aktivita, což může také souviset s vysokým výskytem morfologických vad u obou metod barvení v tomto odběru. Při barvení metodou Byghošť bylo zjištěno 28,03 % vad bičíků u čtvrtého odběru. U téhož odběru bylo zjištěno 10,8 % vad hlaviček při barvení metodou B. T. Farely a u třetího odběru bylo zjištěno 10,38 % vad spojovacího oddílu. Metoda Farely odhalila velmi vysoká procenta nezralých spermií při všech odběrech a metoda

Byghošť ukázala 31,01 % nezralých spermií při druhém odběru. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 8.

Tabulka 9 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Armin Q

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	25	50	30	35
Aktivita [%]	60	70	80	65
Koncentrace [10^6 / ml]	172,5	562,5	380	242,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	48	34	35,5	43
barvení Byghošť	40	35,5	27,5	43
Normospermie [%]				
barvení Farelly	52	66	64,5	57
barvení Byghošť	60	64,5	72,5	57

Hřebec Armin Q vykazoval hodnoty objemu v rozmezí od 25 do 50 ml a jeho průměr byl 35 ml. Zjištěná aktivita se pohybovala v rozmezí od 60 do 80 % s průměrem 68,75 %. Koncentrace spermií v ejakulátu byla od 172,5 do 562,5 $\times 10^6$ /ml a průměrná hodnota byla 339,3 $\times 10^6$ /ml. Výskyt morfologických vad se pohyboval v rozmezí od 34 do 48 % a průměrem 40,1 % při barvení metodou B. T. Farelly. Při barvení metodou Byghošť byly morfologické vady v rozmezí od 27,5 do 43 % a průměrem 36,5 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Při druhém odběru byl získán největší objem ejakulátu s nejvyšší koncentrací spermií. V tomto vzorku byl pozorován jeden z nejnižších výskytů morfologických vad ze všech odběrů.

Ve vzorku z prvního odběru bylo pozorováno 27,92 % vad hlaviček a z toho 20,08 % dekapitovaných hlaviček při barvicí metodě Farelly. I u druhého barvení bylo pozorováno zvýšené množství vad hlaviček v tomto odběru, a to 15,32 %. Dále barvení metodou Byghošť odhalilo 3 % abnormálně vyvinutých spermií ve čtvrtém odběru. Vzorek ze čtvrtého odběru obsahoval 11,46 % vad bičků, které ukázalo barvení Farelly. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Přílohy 9.

Tabulka 10 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Dahoman

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	3	65	20	20
Aktivita [%]	80	70	70	70
Koncentrace [10^6 / ml]	365	297,5	435	167,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	32	15	36	41,5
barvení Bydgošť	44	25,5	27,5	42,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	68	85	64	58,5
barvení Bydgošť	56	74,5	73	57,5

U hřebce Dahomana byly pozorovány velké výkyvy v získávaném objemu ejakulátu, který se pohyboval v rozmezí od 3 do 65 ml, a jeho průměrná hodnota byla 27 ml. Aktivita byla hodnocena v rozmezí od 70 do 80 % s průměrem 72,5 %. Naměřená koncentrace spermií byla od 167,5 do $435 \times 10^6/\text{ml}$ a její průměrná hodnota byla $316,25 \times 10^6/\text{ml}$. Morfologické vady byl zjištěny v rozmezí od 15 do 41,5 % s průměrem 31,1 % při barvení metodou B. T. Farelly a při barvení metou Bydgošť byly v rozmezí od 25,5 do 44 % s průměrem 34,8 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

V prvním odběru byly získány pouze 3 ml objemu ejakulátu. Hřelec byl při tomto odběru mírně neklidný a projevoval se sníženým pohlavním chováním typickým pro hřebce. Naopak aktivita u toho odběru byla nejvyšší zjištěná, i když zde bylo pozorováno nejvíce morfologických vad u obou metod barvení. Barvení Bydgošť v prvním odběru odhalilo 40,05 % vad hlaviček, z toho 27,19 % dekapitovaných hlaviček a 11,87 % vad krčku. U tohoto odběru nebyly objeveny vady bičíku, což může souviset s vysokou aktivitou u tohoto ejakulátu. V prvním odběru při barvení metodou Farelly bylo také zjištěno vyšší procento vad hlaviček, a to 15,03 %. Vady hlaviček se dále objevovaly i dalších odběrech, avšak ne v takovém množství jako při prvním odběru. Další zjištěnou vadou bylo 11,79 % vad spojovacího oddílu ve čtvrtém odběru při barvení metodou Farelly. Na rozdíl od prvního odběru, kde vady bičíku nebyly pozorovány, se u dalších odběrů tyto vady vyskytovaly kolem 15 %. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 10.

Tabulka 11 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Markon

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	180	150	160	200
Aktivita [%]	65	55	60	50
Koncentrace [10^6 / ml]	175	350	270	157,5
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	52	35,5	28	39,5
barvení Bydgošť	50	34,5	32,5	36,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	48	64,5	72	60,5
barvení Bydgošť	50	65,5	67,5	63,5

U hřebce Markona byly hodnoty objemu ejakulátu během odběrů v rozmezí od 150 do 200 ml, což bylo nejvíce z odebíraných ejakulátů, a jeho průměrná hodnota byla 172,5 ml. Aktivita se pohybovala v rozmezí od 50 do 65 % s průměrem 57,5 %. Koncentrace spermií v ejakulátu byla v rozmezí od 157,5 do 350×10^6 /ml a její průměrná hodnota byla $238,1 \times 10^6$ /ml. Zjištěné morfologické vady se pohybovaly v rozmezí od 28 do 52 % s průměrnou hodnotou 38,75 % při barvení metodou B. T. Farelly a v rozmezí od 32,5 do 50 % s průměrem 38,3 % při barvení metodou Bydgošť. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

Nejvyšší získaný objem ejakulátu byl získán při čtvrtém odběru a zároveň zde byla zjištěna nejnižší aktivita, která svou hodnotou byla pod hranicí minimálních požadavků na čerstvý ejakulát u hřebců. Podle Loudy a kol. (2001) je požadovaná hodnota aktivity minimálně 60 % u ejakulátu, který je určen pro tvorbu inseminační dávky, čemuž by ejakulát z tohoto odběru nevyhověl. Tato nízká aktivita u ejakulátu ze čtvrtého odběru však mohla být způsobena velkým množstvím hlenové frakce, která byla i po přecezení přes gázu v ejakulátu přítomna. Z morfologického hlediska byl nejhorší ejakulát získán při prvním odběru, kde bylo při barvení metodou Bydgošť pozorováno 23,28 % vad hlaviček, z toho 14,36 % dekapitovaných hlaviček. U barvení Farelly bylo také pozorováno velké množství vad hlaviček u prvního odběru, a to 33,19 % vad hlaviček celkem, z toho 21,3 % dekapitovaných hlaviček a 11,89 % vad krčku. Dále byly pozorovány vady bičíku při druhém a čtvrtém odběru u obou typů barvení a výskyt se

pohyboval kolem 10 až 14 %. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 11.

Tabulka 12 Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Ryho

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Objem [ml]	50	55	70	75
Aktivita [%]	85	80	70	80
Koncentrace [10^6 / ml]	465	412,5	255	280
Patologické spermie celkem [%]				
barvení Farelly	40	20,5	34,5	38
barvení Bydgošť	30,5	24,5	33	41,5
Normospermie [%]				
barvení Farelly	60	79,5	65,5	62
barvení Bydgošť	69,5	75,5	67	58,5

Hřebec Ryho vykazoval objem ejakulátu během odběrů v rozmezí od 50 do 75 ml a jeho průměrná hodnota byla 62,5 ml. Zjištěné hodnoty aktivity se pohybovaly v rozmezí od 70 do 85 % s průměrem 78,75 %. Koncentrace se pohybovala v rozmezí od 255 do 465×10^6 /ml a její průměrná hodnota byla $353,1 \times 10^6$ /ml. Výskyt morfologických vad se pohyboval v rozmezí od 20,5 do 40 % s průměrnou hodnotou 33,25 % při barvení metodou B. T. Farelly a při barvení metodou Bydgošť se pohybovala v rozmezí od 24,5 do 41,5 % s průměrem 32,3 %. Zjištěné průměrné hodnoty viz Příloha 15.

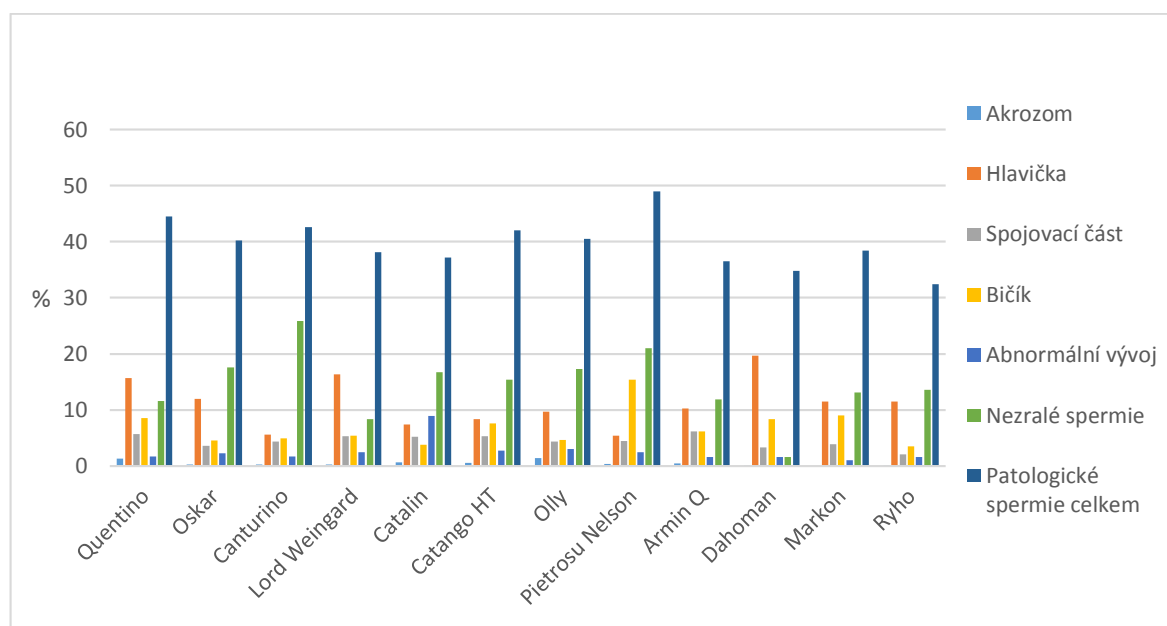
Nejnižší objem ejakulátu byl získán při prvním odběru, přičemž byla pozorována nejvyšší aktivita a byla naměřena nejvyšší koncentrace spermií v ejakulátu. Barvení Farelly u tohoto odběru ukázalo nejvyšší výskyt morfologických vad. Bylo zde pozorováno 26 % vad hlaviček, z toho 15,5 % dekapitovaných hlaviček a 10 % vad krčku. V prvním odběru bylo také zjištěno 3,44 % abnormálně vyvinutých spermií metodou barvení Bydgošť. Ve druhém a čtvrtém odběru bylo také pozorováno vyšší procento výskytu vad hlaviček a krčku u obou metod barvení. Během odběrů byl výskyt nezralých spermií vcelku nízký, kromě čtvrtého odběru, kdy bylo pozorováno 20,5 % nezralých spermií barvicí metodou Bydgošť. Hodnocení jednotlivých morfologických vad viz Příloha 12.

Aurich a kol. (2003) ve své studii porovnávali parametry ejakulátu u norických hřebců podle věku. Z této studie vyplývá, že hřebci ve věku do šesti let vykazují nižší hodnoty v objemu ejakulátu a vyšší procenta výskytu normospermií (nad 40 %). U hřebců starších sedmi let stoupá objem ejakulátu, zároveň je zde ale pozorováno snížené procento normospermií (pod 36 %). Dále je z této studie patrné, že se zvyšujícím se objemem klesá procento aktivních spermií, což naznačuje i naše hodnocení chladnokrevných hřebců.

5.2 Porovnání barvicích metod u kvalitativních a kvantitativních ukazatelů

U většiny hřebců se nejvíce morfologických vad vyskytovalo při prvních odběrech a ejakuláty tak nebyly příliš kvalitní, což je dáno začátkem sezóny, kdy hřebci nemají ještě zcela nastartovanou spermatogenezi.

Výkyvy ve výskytu morfologických vad mezi jednotlivými odběry u jednotlivých hřebců mohlo být spojeno s ročním obdobím (jaro, léto) a teplotními výkyvy, ve kterých odběr probíhal. Na toto poukázal ve svém pokusu Janett a kol. (2003), ve kterém zkoumal vliv počasí na parametry ejakulátu u teplotokrevných hřebců. Zjistil, že při vyšších letních teplotách jsou také zvýšené nároky na organismus hřebce a může to být jedním z vlivů na vznik morfologicky vadných spermií.



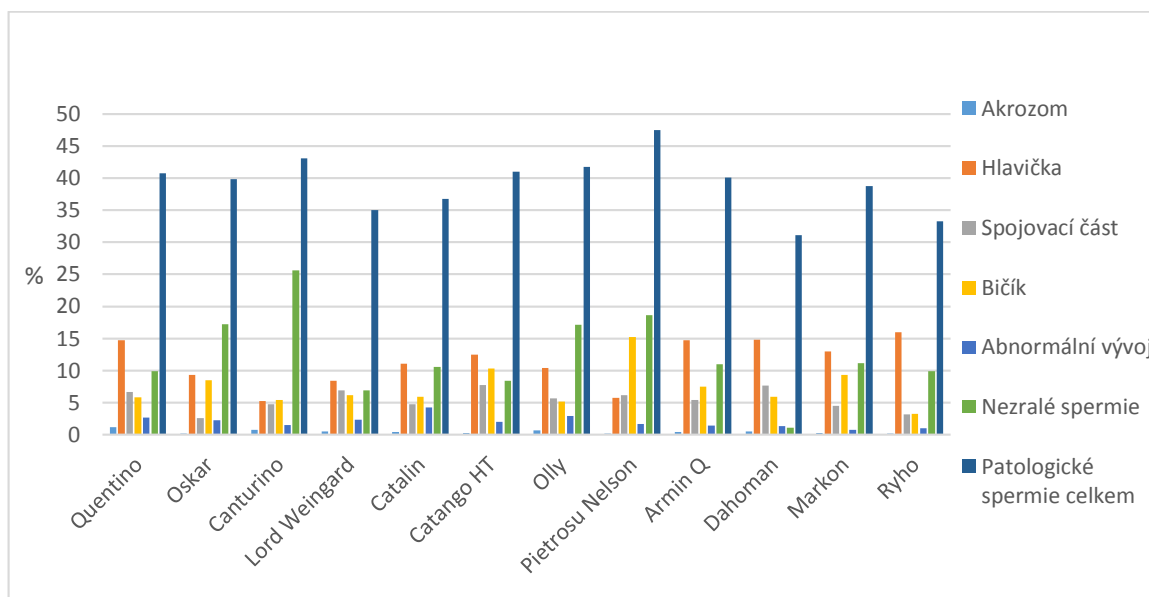
Graf 1 Porovnání výskytu jednotlivých morfologických vad u hřebců – Bygghöf

V grafu č. 1 jsou znázorněny rozdíly ve výskytu morfologických vad při barvení metodou Byghošť u jednotlivých hřebců.

Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce v Příloze 13. Z těchto dat vyplývá, že největší výskyt pozorovaných patologických spermií byl $49 \pm 10,15$ % u hřebce Pietrosu Nelson. Tato hodnota (51 % normospermií) je těsně nad hranicí přípustnosti minimálně 50 % normospermií v ejakulátu, kterou uvádí Colebrander a kol. (2003). Pokud by se procento normospermií snížilo pod tuto hranici, bylo by nutné podrobit ejakulát tohoto hřebce speciálním testům. Naopak nejnižší výskyt byl $32,38 \pm 7,05$ % u hřebce Ryho.

Vady akrozomu se nejvíce vyskytovaly u hřebce Ollyho, a to $1,45 \pm 1,6$ %. Naopak u hřebce Markona nebyla tato vada pozorována. Vady hlaviček, zahrnující dekapitované hlavičky, vady krčku a skupina ostatních vad hlaviček se nejvíce vyskytovaly u hřebce Dahomana se $19,71 \pm 13,83$ % a nejnižší výskyt měl hřelec Pietrosu Nelson se $5,4 \pm 2,18$ % a hřelec Canturino se $5,56 \pm 2,92$ %. Pozorované vady spojovací části byly nejvíce u hřebce Armin Q, u kterého se vyskytovaly $6,13 \pm 2,09$ %. Nejmenší podíl těchto vad měli hřebci Ryho se $2,1 \pm 0,72$ % a Oskar se $3,6 \pm 2,32$ %.

Vady bičíku se nejvíce vyskytovaly u hřebce Pietrosu Nelson se $15,38 \pm 10,99$ % a nejmenší výskyt byl zaznamenán u hřebce Ryho se $3,47 \pm 0,72$ % a také u hřebce Catalin se $3,75 \pm 1,56$ %. Vývojové abnormality spermií byly nejvíce pozorovány u hřebce Catalina se $8,88 \pm 10,09$ %. Nejméně vývojových abnormalit měli hřebci Markon se $0,99 \pm 0,81$ %, Ryho se $1,6 \pm 1,41$ %, Armin Q se $1,61 \pm 1,12$ % a Dahoman se $1,61 \pm 1,44$ %. Výskyt nezralých spermií byl pozorován nejvíce u hřebce Canturino se $25,85 \pm 6,25$ % a také u hřebce Pietrosu Nelson se $21,01 \pm 8,93$ % a nejméně u hřebce Dahomana se $1,61 \pm 1,01$ %.



Graf 2 Porovnání výskytu jednotlivých morfologických vad u hřebců - Farelly

V grafu č. 2 jsou znázorněny rozdíly ve výskytu morfologických vad při barvení metodou B. T. Farelly u jednotlivých hřebců.

Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce v Příloze 14. Z těchto dat vyplývá, že nejméně patologických spermií se vyskytovalo u hřebce Dahomana s $31,13 \pm 11,43$ % a podobně jako u předchozího barvení i u hřebce Ryho s $33,25 \pm 8,8$ %. Nejvyšší výskyt byl pozorován u hřebce Pietrosu Nelson, také podobně jako u předchozího barvení, s $47,5 \pm 5,2$ %.

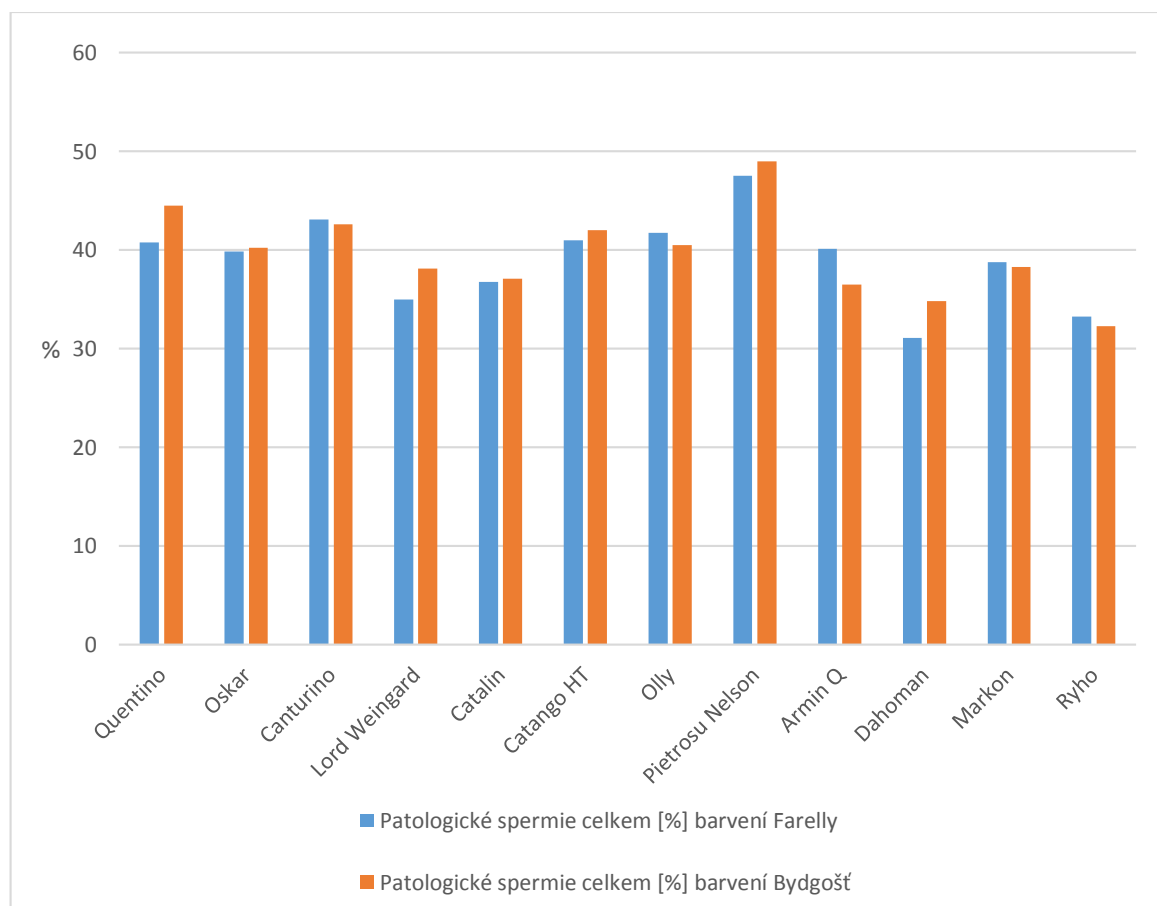
Vady akrozomu se vyskytovaly nejvíce u hřebce Quintino s $1,12 \pm 0,49$ % a nejmenší výskyt byl zaznamenán u hřebců Oskara s $0,12 \pm 0,24$ % a Ryha s $0,13 \pm 0,25$ %. Pozorované vady hlaviček se nejvíce vyskytovaly u hřebce Ryho s $15,93 \pm 7,32$ % a nejméně u hřebců Canturino s $5,23 \pm 2,55$ % a Pietrosu Nelson s $5,75 \pm 4,43$ %. Méně frekventované vady spojovací části byly nejvíce pozorovány u hřebců Dahomana s $7,59 \pm 3,82$ % a Catanga HT s $7,71 \pm 4,11$ %. Nejmenší výskyt těchto vad byl zaznamenán u Oskara s $2,58 \pm 0,8$ %.

Největší výskyt vad bičíku byl zaznamenán u hřebců Pietrosu Nelson s $15,1 \pm 6,31$ % a Catango HT s $10,28 \pm 5,03$ %. Nejméně se pak tyto vady vyskytovaly u hřebce Ryho s $3,23 \pm 1,92$ %. Abnormální vývoj spermií byl pozorován nejvíce u hřebce Catalina s $4,22 \pm 0,87$ %. Louda a kol. (2001) uvádí přípustnou míru výskytu vývojových abnormalit do 5 %, což i tento hřebec splňuje. Nejméně se vývojové vady vyskytovaly

u hřebců Markona s $0,71 \pm 0,46$ % a Ryha s $0,99 \pm 0,39$ %. Nezralých spermií v ejakulátu měli nejvíce hřebci Lord Weingard s $25,59 \pm 4,13$ % a Pietrosu Nelson s $18,66 \pm 3,42$ %. Nejméně jich pak ve svém ejakulátu měl hřelec Dahoman s $1,09 \pm 0,61$ %.

Během odběrů byly patrné rozdíly mezi hřebci, jak vlivem věku, tak příslušností k plemeni. Určité rozdíly byl pozorovány i vlivem barvicí metody. Colebrander a kol. (1992) ve své studii pozoroval vliv plemene s přihlédnutím na další vnitřní i vnější vlivy a zjistil, že u koní teplokrevných plemen je obvyklá hodnota normospermií kolem 70 % a u chladnokrevných a méně prošlechtěných plemen se hodnota normospermií pohybuje kolem 55 %.

Věžník a kol. (2004) udává, že v ejakulátu, který je určen pro umělou inseminaci, se nesmí vyskytovat více než 40 % patologických spermií. Dle našeho hodnocení (průměr patologických spermií ze všech odběrů) by tomu požadavku nevyhověli hřebci Quentino, Canturino, Catango HT, Olly a Pietrosu Nelson.



Graf 3 Porovnání patologických spermií u jednotlivých hřebců dle metody barvení

V grafu č. 3 jsou znázorněny rozdílné hodnoty patologických spermií dle barvení u jednotlivých hřebců.

Během morfologické analýzy a zjišťování výskytu jednotlivých morfologických vad v ejakulátu u hřebců proběhlo také porovnání jednotlivých metod barvení nativních vzorků při hodnocení morfologických vad spermií. V tabulce 13A a 13B jsou uvedeny hodnoty výskytu jednotlivých morfologických vad rozděleny podle typu barvení preparátů.

Tabulka 13A Srovnání výskytu morfologických vad spermií podle typu barvení

Barvení Farelly	Průměr [%]	Minimum [%]	Maximum [%]	Sm. odchylka
Akrozom	0,42	0	1,54	0,42
Hlavička	11,3	2,5	33,19	7,46
Spojovací část	5,45	0,49	13,22	3,09
Bičík	7,33	0,5	19,14	4,52
Abnormální vývoj	1,98	0	5,06	1,23
Nezralé spermie	12,27	0,49	31,31	7,55
Patologické spermie celkem	39,08	15	53,5	7,84

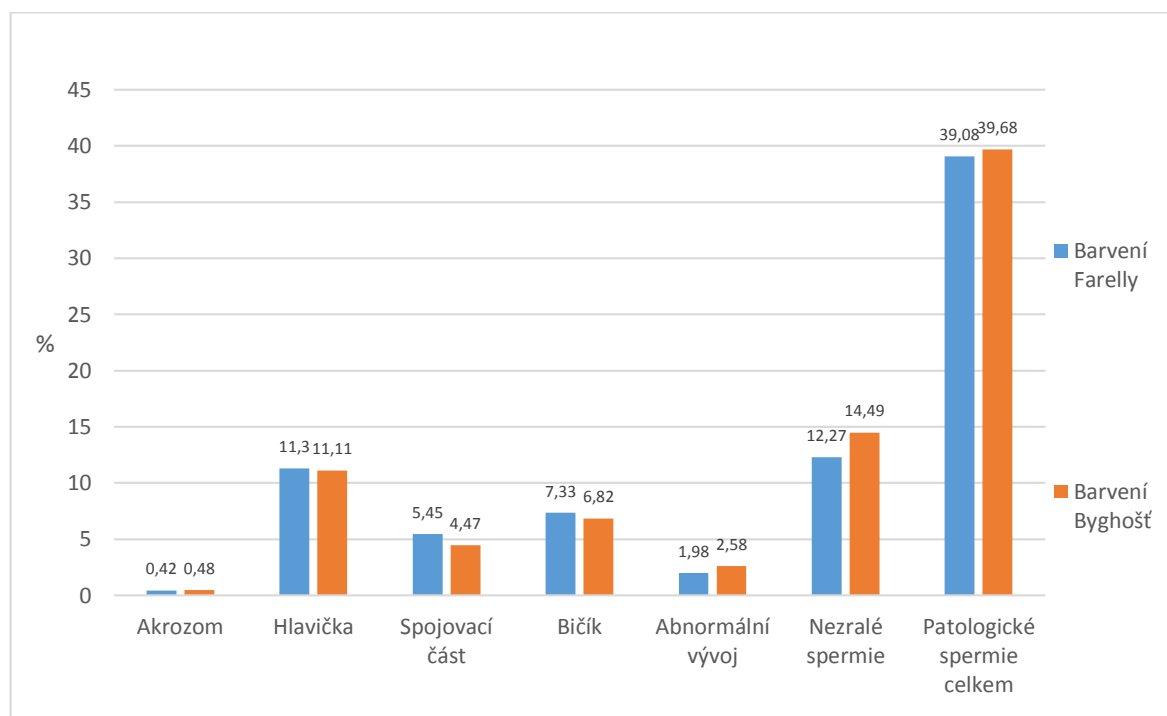
Tabulka 13B Srovnání výskytu morfologických vad spermií podle typu barvení

Barvení Byghošt'	Průměr [%]	Minimum [%]	Maximum [%]	Sm. odchylka
Akrozom	0,48	0	3,81	0,82
Hlavička	11,11	2,9	40,68	8,38
Spojovací část	4,47	0,49	9	2,41
Bičík	6,82	0	28,03	4,69
Abnormální vývoj	2,58	0	5,39	1,26
Nezralé spermie	14,49	0,5	31,01	7,8
Patologické spermie celkem	39,68	24,5	60,5	7,85

Z tabulek vyplývá, že průměrné hodnoty zjištěných morfologických vad u obou barvicích metod jsou srovnatelné a mezi jednotlivými vadami nebyly pozorovány významné rozdíly při použití těchto barvicích metod. U metody barvení dle

B. T. Farellyho bylo pozorováno $39,08 \pm 7,84$ % patologických spermií celkem a u barvicí metody Byghošť byla celková hodnota patologických spermií $39,68 \pm 7,85$ %.

Nejvyšší rozdíly mezi jednotlivými vadami bylo pozorováno u nezralých spermií. Při barvení dle Farellyho se tato vada vyskytovala v $14,49 \pm 7,8$ % a při barvení metodou Byghošť byly nezralé spermie pozorovány v $12,27 \pm 7,55$ %. Procentuální rozdíl mezi těmito hodnotami činil 2,22 %.



Graf 4 Porovnání výskytu morfologických vad dle typu barvení

V grafu č. 4 jsou znázorněny rozdíly mezi hodnotami jednotlivých morfologických vad spermií u při použití typu barvení dle Farellyho a barvení metodou Byghošť.

V tabulce 14 jsou uvedeny průměrné hodnoty morfologických vad dle typu barvení a je zde uvedena statistická průkaznost. Z této tabulky tedy vyplývá, že rozdíly zjištěných morfologických vad mezi těmito typy barvení nejsou statisticky průkazné ($P > 0,05$).

Tabulka 14 Porovnání výskytu morfologických vad dle typu barvení

	Barvení Farelly	Barvení Byghošť	p-hodnota
Akrozom	0,42 ± 0,29	0,48 ± 0,46	0,69
Hlavička	11,3 ± 3,59	11,11 ± 4,38	0,84
Spojovací část	5,45 ± 1,63	4,47 ± 1,14	0,09
Bičík	7,33 ± 3,15	6,82 ± 3,3	0,58
Abnormální vývoj	1,98 ± 0,97	2,58 ± 2,06	0,16
Nezralé spermie	12,27 ± 6,42	14,49 ± 6,16	0,59
Patologické spermie celkem	39,08 ± 4,49	39,68 ± 4,51	0,72

Porovnání dvou barvicích metod také provedla ve svém pokusu i Banaszewska a kol. (2015). V této studii šlo o srovnání barvení spermií pomocí dusičnanu stříbrného a barvení komplexem eosinu a genciánové violeti. Bylo zde zjištěno, že způsob barvení a použitá chemická činidla měla podstatný vliv na rozměry a tvar hřebčích spermií. V závěru je zde upozorněno, že by měla být navržena a sjednocena technika barvení spermií pro morfologickou analýzu, což by umožnilo srovnávání výsledků mezi laboratořemi a zvýšila by se hodnota morfologické analýzy spermií v předvídání a vyhodnocování plodnosti.

Součástí statistické analýzy zjištěných dat byl odhad korelačních vztahů mezi jednotlivými kvalitativními a kvantitativními ukazateli ejakulátu dle typu barvicí metody a korelace jednotlivých morfologických vad mezi sebou také dle typu barvení.

V tabulkách 15 a 16 jsou uvedeny zjištěné korelační vztahy mezi aktivitou, koncentrací a objemem a mezi jednotlivými morfologickými vadami pro jednotlivá barvení.

Tabulka 15 Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 1 - Byghošť

Proměnná	Koncentrace / 10 ⁹ v ml	Objem [ml]	Akrozom [%]	Hlavička [%]	Spojovací část [%]	Bičík [%]	Nezralé spermie [%]	Abnormální vývoj [%]	Patologické spermie celkem [%]
Aktivita [%]	0,23	-0,39*	-0,03	0,18	0,06	-0,26	-0,11	0,1	-0,05
	p = 0,124	p = 0,006	p = 0,842	p = 0,235	p = 0,670	p = 0,082	p = 0,444	p = 0,516	p = 0,756
Koncentrace / 10⁹ v ml		-0,41*	0,003	-0,2	-0,13	0,03	0,21	-0,09	-0,04
		p = 0,004	p = 0,979	p = 0,186	p = 0,367	p = 0,847	p = 0,165	p = 0,552	p = 0,776
Objem [%]			-0,3	-0,23	-0,16	0,09	0,18	-0,22	-0,13
			p = 0,037	p = 0,116	p = 0,282	p = 0,545	p = 0,228	p = 0,146	p = 0,379

Červené hodnoty: statisticky dokázaná průkaznost $p < 0,05$; hodnoty s * značí $p < 0,01$

Tabulka 16 Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 1 - Farelly

Proměnná	Koncentrace / 10 ⁹ v ml	Objem [ml]	Akrozom [%]	Hlavička [%]	Spojovací část [%]	Bičík [%]	Nezralé spermie [%]	Abnormální vývoj [%]	Patologické spermie celkem [%]
Aktivita [%]	0,23	-0,39*	0,23	0,18	0,13	-0,37*	-0,17	0,31	-0,09
	p = 0,124	p = 0,006	p = 0,115	p = 0,215	p = 0,367	p = 0,01	p = 0,254	p = 0,033	p = 0,555
Koncentrace / 10⁹ v ml		-0,41*	0,12	-0,24	-0,16	-0,01	0,23	0,05	-0,06
		p = 0,004	p = 0,412	p = 0,107	p = 0,283	p = 0,944	p = 0,125	p = 0,722	p = 0,676
Objem [%]			-0,33	-0,15	-0,31	0,15	0,16	-0,24	-0,08
			p = 0,023	p = 0,317	p = 0,033	p = 0,301	p = 0,285	p = 0,099	p = 0,599

Červené hodnoty: statisticky dokázaná průkaznost $p < 0,05$; hodnoty s * značí $p < 0,01$

Z tabulky 15 i 16 vyplývá, že zde existuje negativní korelace mezi získaným objemem ejakulátu a aktivitou spermií ($r = -0,39$, $P < 0,01$) a mezi objemem ejakulátu a koncentrací spermií v ejakulátu ($r = -0,41$, $P < 0,01$). Dále byla potvrzena negativní korelace mezi objemem ejakulátu a vadami akrozomu, jak u barvení metodou B. T. Farellyho ($r = -0,33$, $P < 0,05$), tak u barvení metodou Byghošť ($r = -0,30$, $P < 0,05$). Další korelační vztahy byly zjištěny pouze u metody Farellyho.

Jedním ze statisticky potvrzených vlivů byla negativní korelace mezi objemem ejakulátu a výskytem vad spojovacího oddílu ($r = -0,31$, $P < 0,05$). Předpokládaný negativní vliv vyššího výskytu vad bičíku na aktivitu spermií ($r = -0,37$, $P < 0,01$) u této metody barvení byl také potvrzen. Tuto negativní korelaci potvrdil ve své studii i Love (2011), kde uvádí statisticky průkazný vliv ohnutých bičíků ($r = -0,44$, $P < 0,05$) a plně svinutých bičíků ($r = -0,42$, $P < 0,05$) na celkovou aktivitu spermií. Také Hellander a kol. (1991) zkoumal ejakulát teplokrevného hřebce, u kterého byla prokázána nízká plodnost. V ejakulátu pozoroval velmi vysoké procento vad bičíků (až 85 %) a téměř nulovou aktivitu. Prokázal tak negativní vliv vad bičíků na aktivitu, čímž tak potvrzuje výše zjištěný korelační vztah.

Dále byla překvapivě objevena pozitivní korelace mezi aktivitou spermií a výskytem abnormálně vyvinutých spermií ($r = 0,31$). Je možné, že tímto způsobem dochází ke kompenzaci této vady.

Aurich a kol. (2003) ve své studii provedené na norických hřebcích zjistili pozitivní korelaci mezi aktivitou spermií a procentem výskytu normospermií u hřebců do šesti let ($r = 0,43$, $P < 0,01$) a u hřebců mezi sedmi a devíti lety ($r = 0,64$, $P < 0,01$). U nás byl však tento vztah statisticky neprůkazný.

V tabulce 17 a 18 jsou znázorněny korelační vztahy mezi výskytem jednotlivých morfologických vad.

Tabulka 17 Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 2 - Bygghöst

Proměnná	Hlavička	Spojovací část	Bičík	Abnormální vývoj	Nezralé spermie	Patologické spermie celkem
Akrozom	0,09	0,2	-0,18	0,11	-0,03	0,14
	p = 0,550	p = 0,184	p = 0,228	p = 0,472	p = 0,838	p = 0,348
Hlavička		-0,25	-0,2	-0,02	-0,49*	0,39*
		p = 0,090	p = 0,177	p = 0,905	p = 0,001	p = 0,006
Spojovací část			0,05	0,27	-0,12	0,02
			p = 0,723	p = 0,067	p = 0,426	p = 0,909
Bičík				-0,09	-0,13	0,24
				p = 0,532	p = 0,384	p = 0,108
Abnormální spermie					0,1	0,38*
					p = 0,486	p = 0,009
Nezralé spermie						0,28
						p = 0,054

Červené hodnoty: statisticky dokázaná průkaznost $p < 0,05$; hodnoty s * značí $p < 0,01$

Tabulka 18 Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 2 - Farelly

Proměnná	Hlavička	Spojovací část	Bičík	Abnormální vývoj	Nezralé spermie	Patologické spermie celkem
Akrozom	0,09	0,1	-0,24	0,18	0,17	0,24
	p = 0,529	p = 0,519	p = 0,110	p = 0,238	p = 0,245	p = 0,104
Hlavička		0,2	-0,46*	0,04	-0,43*	0,36
		p = 0,185	p = 0,001	p = 0,771	p = 0,003	p = 0,012
Spojovací část			0,1	0,12	-0,44*	0,24
			p = 0,522	p = 0,410	p = 0,002	p = 0,101
Bičík				-0,14	0,05	0,19
				p = 0,335	p = 0,716	p = 0,203
Abnormální spermie					-0,003	0,43*
					p = 0,984	p = 0,003
Nezralé spermie						0,17
						p = 0,252

Červené hodnoty: statisticky dokázaná průkaznost $p < 0,05$; hodnoty s * značí $p < 0,01$

Z tabulky 17, kde jsou uvedeny korelace u barvení metodou Byghošť, je patrná negativní korelace mezi výskytem morfologicky vadných hlaviček a výskytem nezralých spermií ($r = -0,49$, $P < 0,01$). Dále byla zjištěna pozitivní korelace mezi výskytem vadných hlaviček a celkovým počtem patologických spermií ($r = 0,39$, $P < 0,01$). Pozitivní vliv byl zjištěn také při výskytu nezralých spermií na celkový počet patologických spermií ($r = 0,38$, $P < 0,01$).

Z tabulky 18, kde jsou znázorněny korelace u barvení dle B. T. Farellyho, vyplývá negativní korelace mezi výskytem vadných hlaviček a výskytem morfologických vad bičíků ($r = -0,46$, $P < 0,01$) a také byla zjištěna negativní korelace mezi vadnými hlavičkami a výskytem nezralých spermií v ejakulátu ($r = -0,43$, $P < 0,01$). Také u tohoto typu barvení výskyt vadných hlaviček pozitivně koreloval s celkovým počtem patologických spermií ($r = 0,36$, $P < 0,05$). Mezi vadami spojovací části a výskytem nezralých spermií byl prokázán negativní vztah ($r = -0,44$, $P < 0,01$). Byla zde také potvrzena pozitivní korelace mezi výskytem nezralých spermií a celkovým počtem patologických spermií ($r = 0,43$, $P < 0,01$).

Z obou typů barvení vyplývá negativní vliv výskytu morfologicky vadných hlaviček na patologické spermie celkem. Jasko a kol. (1990) potvrzuje negativní vliv patologických hlaviček na celkovou plodnost hřebce. Dále uvádí negativní korelaci mezi počtem nezralých spermií v ejakulátu a plodností hřebců. Také Pesch a kol. (2006) ve své studii potvrzuje tento negativní vliv nezralých spermií, který byl hodnocen podle zabřezávání klisen.

Celkově bylo u barvení dle B. T. Farellyho odhaleno více korelačních vztahů než u barvení metodou Byghošť. Dle tohoto zjištění lze říci, že je Farellyho metoda barvení vhodnější pro hodnocení morfologických vad spermií a hodnocení plodnosti u hřebců.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu plemenných hřebců v majetku Zemského hřebčince Tlumačov s. p. Největší podíl práce zahrnovala morfologická analýza spermií a porovnání rozdílných barvicích metod při výskytu morfologických vad. Další součástí výzkumu bylo určení vzájemných korelací mezi kvalitativními a kvantitativními znaky ejakulátu. Zejména byly sledovány korelační vztahy mezi výskytem jednotlivých morfologických vad a aktivitou, koncentrací spermií nebo objemem ejakulátu. Vzájemné korelace byly také sledovány u jednotlivých morfologických vad mezi sebou.

Při hodnocení jednotlivých ukazatelů ejakulátu u plemenných hřebců během připouštěcí sezóny byly zjištěny tyto hodnoty:

- Získaný objem ejakulátu od všech hřebců během všech odběrů se pohyboval v rozmezí od 3 ml do 200 ml. Průměrná hodnota objemu za celé sledované období byla 60,9 ml.
- Aktivita spermií od všech hřebců během všech odběrů byla pozorována v rozmezí od 50 % do 90 %. Průměrná aktivita byla 71,4 %. Po celou dobu sledování bylo posouzení aktivity prováděno jedním vyšetřujícím.
- Ejakuláty od hřebců vykazovaly koncentrace v rozmezí od $127,5 \times 10^6/\text{ml}$ do $777,5 \times 10^6/\text{ml}$. Průměrná hodnota koncentrace byla $376,5 \times 10^6/\text{ml}$.
- Výskyt morfologicky zdravých spermií se při barvení metodou Byghošť pohyboval v rozmezí od 39,5 % do 74,5 %. Průměrně se vyskytovalo 60,5 % normospermií.
- Výskyt morfologicky zdravých spermií se při barvení metodou dle B. T. Farelyho pohyboval v rozmezí od 46,5 % do 85 %. Průměrně se vyskytovalo 61,1 % normospermií.

Po vyhodnocení jednotlivých vzorků ejakulátů odebíraných během připouštěcí sezóny 2015 a dle zjištěných výsledků morfologické analýzy lze posoudit, kteří plemenní hřebci měli nejlepší ejakuláty. Mezi hřebce, kteří odevzdávali nejkvalitnější ejakuláty, patřili: Dahoman s celkovým počtem normospermií 68,9 % (barvení dle Farelyho) a 65,2 % (barvení Byghošť), Ryho s celkovým počtem normospermií 67,7 % (barvení Byghošť) a 66,75 % (barvení dle Farelyho) a Lord Weingard s celkovým počtem normospermií 65 % (barvení dle Farelyho) a 61,9 % (barvení Byghošť). Naopak hřebci

s nejméně kvalitním ejakulátem – Pietrosu Nelson s počtem normospermií 51 % (barvení Byghošť) a 52,5 % (barvení dle Farellyho) a Canturino s celkovým počtem normospermií 56,9 % (barvení dle Farellyho) a 57,4 % (barvení Byghošť) – by měli být podrobeni dalšímu vyšetření a jejich ejakulát by měl být posouzen pomocí speciálních testů pro přesnější vyhodnocení možné reprodukční poruchy.

Mezi hřebci a také mezi jednotlivými odběry byla pozorována určitá míra variability. Tato variabilita byla dána plemennou příslušností – hřelec příslušící k pony plemeni dával v průměru nejnižší objem ejakulátu, naopak chladnokrevní hřebci odevzdávali nejvyšší objemy. V rámci teplokrevných hřebců byl získávaný objem také variabilní, což je dáno individualitou každého hřebce. Další výkyvy mezi kvalitou ejakulátu byly způsobeny působením mnoha vnějších i vnitřních vlivů, které také působí na každého hřebce jinak. U všech hřebců také hrál významnou roli vliv věku, četnosti odběrů a jejich sportovního zatížení. Hřebci šlechtění na sportovní výkonnost pak mají přirozeně sníženou reprodukční schopnost, což je dáno negativním vztahem produkčních a reprodukčních vlastností.

Statistickou analýzou byly zaznamenány některé korelační vztahy mezi proměnnými. Pozitivní korelace byla zjištěna mezi procentem celkového výskytu patologických spermií a vadami hlaviček a taktéž mezi výskytem vývojových abnormalit spermií. Pozorované negativní korelace byly mezi aktivitou a výskytem vadných bičků a dále mezi aktivitou a objemem získaného ejakulátu. Objem ejakulátu také negativně koreloval s koncentrací spermií.

Při porovnání metod barvení preparátů byly pozorovány minimální rozdíly. Zjištěné rozdíly ve výskytu morfologických vad nebyly statisticky průkazné. Avšak metoda barvení dle Farellyho ukázala více korelačních vztahů mezi výskytem jednotlivých morfologických vad.

Pro doplnění hodnocení plodnosti hřebců by mělo být také zařazeno hodnocení zabřezávání klisen po inseminaci ejakulátem konkrétních hřebců. Hodnocení kvality ejakulátu je jedním ze základních kritérií při výběru hřebců, kteří budou zařazeni do plemenitby. Před zařazením do plemenitby nebo před příchodem hřebce na inseminační stanici je provedena kontrola ejakulátu pomocí základních i speciálních laboratorních metod. Ejakulát je dále preventivně kontrolován i během připouštěcí sezóny, aby mohly být zjištěny případné vady spermií. Některé z těchto metod jsou prováděny v předložené diplomové práci.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AURICH C., ACHMANN R., AURICH J. E., 2003: Semen parameters and level of microsatellite heterozygosity in Noriker draught horse stallions. *Theriogenology* 60, 371 – 378.

BALL B. A., 2008: Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A review. *Journal of Equine Science* 28, 650 – 665.

BANASZEWSKA D., ANDRAZSEK K., ZDROWOWICZ E., DANIELEWICZ A., 2015: The effect of selected staining techniques on stallion sperm morphometry. *Livestock Science* 175, 128 – 132.

BRITO F. C., 2007: Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 249 – 264.

BRITO F. C., GREEN L. M., KELLEMAN A., KNOBBE M., TURNER R., 2011: Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* 76, 745 – 750.

CARD C., 2005: Cellular associations and differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 64, 558 – 567.

COLEBRANDER B., PUYK H., ZANDEE A. R., 1992: Evaluation of stallion for breeding. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* 88, 29 – 37.

COLEBRANDER B., GADELLA B. M., STOUT T. A., 2003: The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals Journal* 38, 305 – 311.

COWELL R. L., RONALD D. T., 2002: *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2nd ed. Mosby, St. Louis, 288 s. ISBN 0-323-01317-1

CUPPS P. T., 1991: *Reproduction in domestic animals*. 4th ed. Academic press, San Diego, 670 s. ISBN 0-12-196575-9

GAMČÍK P. (ed.), 1988: *Veterinárno-chovateľská kontrola reprodukcie úžitkových zvierat*. Príroda, Bratislava, 336 s.

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

GAMČÍK P., KOZUMPLÍK J. a kol., 1964: *Umelá inseminácie a andrológia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava. 566 s.

HELLANDER J. C., SAMPER J. C., CRABO B. G., 1991: Fertility of a stallion with low sperm motility and high incidence of an unusual sperm tail defects. *Veterinary Record* 128, 449 – 451.

HOLUB A. (ed.), 1969: *Fyziologie hospodárskych zvierat*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 673 s.

CHENOWETH, P., 2005: Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64, 457 – 468.

CHENOWETH P. J., LORTON S. P., 2014: *Animal andrology, Theories and Applications*. CABI publishing, Oxfordshire, 584 s. ISBN-13: 978-1-78064-316-8

JANETT F., THUN R., NIEDERER K., BURGER D., HÄSSIG M., 2003: Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453 – 461.

JASKO D. J., LEIN, D. H., FOOTE R. H., 1990: Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions. *Journal of American Medical Association* 197, 389 – 394.

KLIMENT J. a kol., 1983: *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava, 376 s.

KOMÁREK V. a kol., 1964: *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 387 s.

LIPENSKÝ J. a kol., 2014: *Základy hodnocení morfologického obrazu spermií kance*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 32 s. ISBN 978-80-7403-122-9

LOUDA F., ČEŘOVSKÝ J., JEŽKOVÁ A., STÁDNÍK L., 2001: *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 1. vydání, 225 s.

LOVE C. C., 2011: Relationship between sperm motility, morphology and the fertility in stallions. *Theriogenology* 76, 547 – 557.

LOVE C. C., VARNER D. D., THOMPSON J. A., 2000: Intra and inter – stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Journal of Reproduction and Fertility* 56, 93 – 100.

MALMGREN L., 1997: Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48, 523 – 530.

MARVAN F. a kol., 1992: *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, Praha, 304 s. ISBN 80-209-0226-0

PESCH S., BOSTEDT H., FAILING K., BERGMANN M., 2006: Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science* 91, 285 – 298.

SAMPER J. C., 2009: Equine breeding management and artificial insemination. *Elsevier Health Sciences*, 310 s.

SEVERA L., MÁCHAL L., ŠVÁBOVÁ L., MAMICA O., 2009: Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. *Animal Reproduction Science* 119, 50 – 55.

ŠMERHA J. a kol., 1964: *Biologie rozmnožování hospodářských zvířat*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 342 s.

TURNER R. M., 2007: Pathogenesis, diagnosis and management of testicular degeneration in stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 278 – 284.

VARNER D. D. a kol., 2000: Techniques for evaluation selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science* 60 – 61, 493 – 509.

VEERAMACHANENI D. N., 2011: Spermatozoal morphology. In: McKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D.: *Equine reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, 3288 s. ISBN-13: 978-0-8138-1971-6

VĚŽNÍK Z. a kol., 2004: *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 258 s.

VĚŽNÍK Z. a kol., 2000: *Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemenů*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 141 s.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr 1.: Schéma spermatogeneze (Komárek a kol., 1964)

Obr 2.: Morfologická struktura spermie (Louda a kol., 2001)

Obr 3.: Morfologie hlavičky spermie (Brito, 2007, upraveno)

Obr 4.: Zdvojení bičíku, spermie se zmnožením hlaviček a bičíků (Brito, 2007, upraveno)

Obr 5.: Morfologické abnormality hlavního oddílu bičíku (Brito, 2007, upraveno)

Obr 6.: Nezralé spermie (Brito, 2007, upraveno)

9 SEZNAM TABULEK

- Tab 1.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Quentino
- Tab 2.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Oskar
- Tab 3.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Canturino
- Tab 4.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Lord Weingard
- Tab 5.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Catalin
- Tab 6.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Catango HT
- Tab 7.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Olly
- Tab 8.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Pietrosu Nelson
- Tab 9.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Armin Q
- Tab 10.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Dahoman
- Tab 11.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Markon
- Tab 12.: Souhrn zjištěných hodnot objemu, aktivity, koncentrace a morfologie spermií – Ryho
- Tab 13A.: Srovnání výskytu morfologických vad spermií podle typu barvení – Farelly
- Tab 13B.: Srovnání výskytu morfologických vad spermií podle typu barvení – Byghošť
- Tab 14.: Porovnání výskytu morfologických vad dle typu barvení
- Tab 15.: Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 1 – Byghošť
- Tab 16.: Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 1 – Farelly
- Tab 17.: Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 2 – Byghošť
- Tab 18.: Odhad korelačních vztahů mezi proměnnými 2 – Farelly

10 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1.: Porovnání výskytu jednotlivých morfologických vad u hřebců – Byghošť

Graf 2.: Porovnání výskytu jednotlivých morfologických vad u hřebců – Farelly

Graf 3.: Porovnání patologických spermií u jednotlivých hřebců dle metody barvení

Graf 4.: Porovnání výskytu morfologických vad dle typu barvení

11 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Quentino
- Příloha 2.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Oskar
- Příloha 3.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Canturino
- Příloha 4.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Lord Weingard
- Příloha 5.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Catalin
- Příloha 6.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Catango HT
- Příloha 7.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Olly
- Příloha 8.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Pietrosu Nelson
- Příloha 9.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Armin Q
- Příloha 10.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Dahoman
- Příloha 11.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Markon
- Příloha 12.: Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Ryho
- Příloha 13.: Zjištěné hodnoty jednotlivých morfologických vad u hřebců – Byghošť
- Příloha 14.: Zjištěné hodnoty jednotlivých morfologických vad u hřebců – Farelly
- Příloha 15.: Zjištěné průměrné hodnoty za všechny odběry od jednotlivých hřebců
- Příloha 16.: Fotografie nátěru – Byghošť
- Příloha 17.: Fotografie nátěru – Byghošť
- Příloha 18.: Fotografie nátěru – Byghošť
- Příloha 19.: Fotografie nátěru – Byghošť
- Příloha 20.: Fotografie nátěru – Byghošť
- Příloha 21.: Fotografie nátěru – Farelly

12 PŘÍLOHY

Příloha 1 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Quentino	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	1,48	0,5	3,37	0
Hlavička [%]	34,42	10	6,27	12
z toho dekapacitace hlaviček	22,13	0	2,41	0
krček	8,36	5	1,93	2,5
ostatní vady hlavičky	3,93	5	1,93	9,5
Spojovací část [%]	3,44	3	7,23	9
Bičík [%]	10,33	13	5,3	5,5
z toho dag efekt	0,49	1,5	0	1
ostatní vady bičíku	9,84	11,5	5,3	4,5
Abnormální vývoj [%]	1,48	1,5	1,45	2,5
Nezralé spermie [%]	9,35	9,5	15,9	11,5
Patologické spermie celkem [%]	60,5	37,5	39,5	40,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Quentino	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	1,46	0,48	1,54	0,99
Hlavička [%]	17,98	8,23	14,73	17,9
z toho dekapacitace hlaviček	10,2	1,94	5,39	1,98
krček	4,86	2,42	4,43	1,98
ostatní vady hlavičky	2,92	3,87	4,91	13,94
Spojovací část [%]	7,77	4,84	7,32	6,43
Bičík [%]	4,37	9,68	3,47	5,53
z toho dag efekt	0	0	0	0,49
ostatní vady bičíku	4,37	9,68	3,47	5,04
Abnormální vývoj [%]	3,89	1,45	1,06	4,05
Nezralé spermie [%]	16,03	5,81	9,72	8,01
Patologické spermie celkem [%]	51,5	30,5	38	43

Příloha 2 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Oskar	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,98	0	0	0
Hlavička [%]	22,56	6,63	8	10,5
z toho dekapacitace hlaviček	6,87	0	1	8,5
krček	11,28	1,7	2	0
ostatní vady hlavičky	4,41	4,93	5	2
Spojovací část [%]	4,41	1,97	1,5	6,5
Bičík [%]	5,39	2,95	7,5	2,5
z toho dag efekt	0	0,49	0	1
ostatní vady bičíku	5,39	2,46	7,5	1,5
Abnormální vývoj [%]	1,96	1,97	1	4
Nezralé spermie [%]	15,7	20,2	18,5	16
Patologické spermie celkem [%]	51	34	36,5	39,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad – Farelly

Oskar	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,48	0	0	0
Hlavička [%]	4,37	7,5	6	19,27
z toho dekapacitace hlaviček	0,48	0	0	16,8
krček	0,99	1	1	0
ostatní vady hlavičky	2,9	6,5	5	2,47
Spojovací část [%]	3,36	1,5	2,5	2,96
Bičík [%]	14,39	7,5	8	3,95
z toho dag efekt	3,36	0	1	0
ostatní vady bičíku	11,03	7,5	7	3,95
Abnormální vývoj [%]	1,92	2,5	1	3,46
Nezralé spermie [%]	22,05	14,5	20	12,35
Patologické spermie celkem [%]	46,5	33,5	37,5	42

Příloha 3 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Canturino	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,49	0	0,5	0
Hlavička [%]	4,41	6,42	7	4,4
z toho dekapacitace hlaviček	0,49	0,49	0,5	0
krček	1,47	0,49	1	1,47
ostatní vady hlavičky	2,45	5,44	5,5	2,93
Spojovací část [%]	5,38	1,98	4,5	5,37
Bičik [%]	5,39	2,97	9	2,45
z toho dag efekt	1,47	0,99	0,5	0,98
ostatní vady bičíku	3,92	1,98	8,5	1,47
Abnormální vývoj [%]	1,47	1,98	1,5	1,95
Nezralé spermie [%]	29,37	29,17	16,5	28,34
Patologické spermie celkem [%]	46,5	42,5	39	42,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Canturino	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,98	1	0,98	0
Hlavička [%]	8,79	4	2,94	5,17
z toho dekapacitace hlaviček	0,49	0	0,49	0
krček	4,88	0	0,49	0,94
ostatní vady hlavičky	3,42	4	1,96	4,23
Spojovací část [%]	5,86	3	3,91	6,11
Bičik [%]	1,47	10	5,87	4,23
z toho dag efekt	0,49	0	0,49	0
ostatní vady bičíku	0,98	10	5,38	4,23
Abnormální vývoj [%]	0,98	2	0,49	2,35
Nezralé spermie [%]	23,93	25,5	31,31	21,63
Patologické spermie celkem [%]	42	45,5	45,5	39,5

Příloha 4 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Lord Weingard	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0	0	0,49	0,49
Hlavička [%]	40,68	10	8,36	6,41
z toho dekapacitace hlaviček	29,2	1	0,98	0,49
krček	9,99	3,5	5,41	2,96
ostatní vady hlavičky	1,49	5,5	1,97	2,96
Spojovací část [%]	1,49	3	7,87	8,89
Bičík [%]	0,99	7	9,34	4,44
z toho dag efekt	0	0,5	0	0,49
ostatní vady bičíku	0,99	6,5	9,34	3,95
Abnormální vývoj [%]	2,97	2	0,98	3,95
Nezralé spermie [%]	2,97	10,5	2,46	17,29
Patologické spermie celkem [%]	49	32,5	29,5	41,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Lord Weingard	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,97	0	0,49	0,47
Hlavička [%]	15,96	9,5	3,95	4,22
z toho dekapacitace hlaviček	5,8	2	0,99	0,94
krček	10,16	7,5	2,96	3,28
ostatní vady hlavičky	3,39	4	3,94	4,68
Spojovací část [%]	6,29	4	8,87	8,43
Bičík [%]	6,77	7	5,42	5,15
z toho dag efekt	0	0,5	0	0,47
ostatní vady bičíku	6,77	6,5	5,42	4,68
Abnormální vývoj [%]	2,9	1,5	1,97	2,81
Nezralé spermie [%]	8,22	6,5	8,87	3,75
Patologické spermie celkem [%]	44,5	32,5	33,5	29,5

Příloha 5 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Catalin	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	1,5	1	0	0
Hlavička [%]	8,5	13,5	4,5	3
z toho dekapacitace hlaviček	3	2,5	1	0,5
krček	0	6	0,5	0,5
ostatní vady hlavičky	5,5	5	3	2
Spojovací část [%]	7	3	2	9
Bičík [%]	1,5	4,5	4	5
z toho dag efekt	0,5	0,5	1	1,5
ostatní vady bičíku	1	4	3	3,5
Abnormální vývoj [%]	24	4	3,5	4
Nezralé spermie [%]	16,5	5,5	29,5	15,5
Patologické spermie celkem [%]	37	31,5	43,5	36,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Catalin	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,46	0,5	0,49	0
Hlavička [%]	23,02	6,5	5,36	9,35
z toho dekapacitace hlaviček	9,21	0,5	0,49	0,98
krček	5,06	2	0	1,97
ostatní vady hlavičky	8,75	4	4,87	6,4
Spojovací část [%]	7,83	4,5	0,97	5,42
Bičík [%]	3,22	9	7,31	3,94
z toho dag efekt	0,92	2,5	1,46	1,48
ostatní vady bičíku	2,3	6,5	5,85	2,46
Abnormální vývoj [%]	5,06	3	4,39	4,43
Nezralé spermie [%]	6,91	6	19,98	9,36
Patologické spermie celkem [%]	46,5	29,5	38,5	32,5

Příloha 6 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Catango HT	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	2	0	0	0
Hlavička [%]	14,5	4,34	8,24	6,19
z toho dekapacitace hlaviček	4	0	0,48	2,45
krček	5,5	1,93	4,85	1,96
ostatní vady hlavičky	5	2,41	2,91	1,78
Spojovací část [%]	5	5,3	5,82	4,9
Bičík [%]	5,5	9,64	4,36	10,78
z toho dag efekt	2	1,45	0,97	1,96
ostatní vady bičíku	3,5	8,19	3,39	8,82
Abnormální vývoj [%]	2	1,45	1,94	5,39
Nezralé spermie [%]	17,5	19,28	11,15	13,73
Patologické spermie celkem [%]	46,5	40	31,5	50

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Catango HT	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,5	0	0,48	0
Hlavička [%]	23,5	6,41	6,2	13,72
z toho dekapacitace hlaviček	12	0,49	1,91	4,41
krček	10	1,48	1,43	1,96
ostatní vady hlavičky	1,5	4,44	2,86	7,35
Spojovací část [%]	4	8,38	5,25	13,22
Bičík [%]	4,5	14,78	7,63	14,2
z toho dag efekt	2,5	2,46	0,95	1,96
ostatní vady bičíku	2	12,32	6,68	12,24
Abnormální vývoj [%]	2,5	0,99	2,39	1,96
Nezralé spermie [%]	14,5	4,44	9,55	4,9
Patologické spermie celkem [%]	49,5	35	31,5	48

Příloha 7 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Oly	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	3,81	0,49	0,48	1
Hlavička [%]	11,91	7,34	8,57	11
z toho dekapacitace hlaviček	0,48	0,98	0,48	0,5
krček	0,95	0,98	1,9	2
ostatní vady hlavičky	10,48	5,38	6,19	8,5
Spojovací část [%]	3,34	2,44	4,29	7,5
Bičík [%]	1,91	6,35	3,82	6,5
z toho dag efekt	1,43	1,46	0,48	2
ostatní vady bičíku	0,48	4,89	3,34	4,5
Abnormální vývoj [%]	4,29	0,98	4,29	2,5
Nezralé spermie [%]	14,76	25,41	18,57	10,5
Patologické spermie celkem [%]	40	43	40	39

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Oly	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,95	0	0,98	0,49
Hlavička [%]	9,54	5,88	8,79	17,29
z toho dekapacitace hlaviček	0,95	0,98	0,49	1,48
krček	1,43	0	0,98	1,48
ostatní vady hlavičky	7,16	4,9	7,32	14,33
Spojovací část [%]	4,77	0,49	5,86	11,37
Bičík [%]	3,34	8,79	1,95	6,42
z toho dag efekt	2,39	0,49	0	0,49
ostatní vady bičíku	0,95	8,3	1,95	5,93
Abnormální vývoj [%]	4,3	1,46	2,93	2,97
Nezralé spermie [%]	19,09	24,4	20,99	3,95
Patologické spermie celkem [%]	42	41	41,5	42,5

Příloha 8 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Pietrosu Nelson	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]		0	0,99	0
Hlavička [%]		2,9	6,91	6,39
z toho dekapacitace hlaviček		1,45	0,49	0
krček		0,97	6,42	4,43
ostatní vady hlavičky		0,48	0	1,96
Spojovací část [%]		1,45	7,41	4,43
Bičík [%]		8,24	9,87	28,03
z toho dag efekt		0,97	0,49	0
ostatní vady bičíku		7,27	9,38	28,03
Abnormální vývoj [%]		3,39	0,99	2,95
Nezralé spermie [%]		31,01	13,83	18,2
Patologické spermie celkem [%]		47	40	60

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Pietrosu Nelson	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]		0	0	0,49
Hlavička [%]		2,5	3,95	10,8
z toho dekapacitace hlaviček		1	1,48	0
krček		0,5	1,98	5,89
ostatní vady hlavičky		1	0,49	4,91
Spojovací část [%]		1,5	10,38	6,38
Bičík [%]		18,5	7,91	19,14
z toho dag efekt		0,5	0,49	0
ostatní vady bičíku		18	7,42	19,14
Abnormální vývoj [%]		1,5	1,48	1,96
Nezralé spermie [%]		20,5	20,77	14,72
Patologické spermie celkem [%]		44,5	44,5	53,5

Příloha 9 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Bygghošt'

Armin Q	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,99	0	0,47	0,5
Hlavička [%]	15,32	9	5,68	11
z toho dekapacitace hlaviček	7,41	3	0,47	0
krček	5,93	3,5	2,37	4,5
ostatní vady hlavičky	1,98	2,5	2,84	6,5
Spojovací část [%]	7,41	3	7,11	7
Bičík [%]	4,94	7	6,17	6,5
z toho dag efekt	0	1	1,9	1
ostatní vady bičíku	4,94	6	4,27	5,5
Abnormální vývoj [%]	1,98	0,5	0,95	3
Nezralé spermie [%]	9,38	16	7,11	15
Patologické spermie celkem [%]	40	35,5	27,5	43

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Armin Q	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,49	0	0,49	0,48
Hlavička [%]	27,92	6	12,32	12,42
z toho dekapacitace hlaviček	20,08	0	6,41	1,43
krček	6,37	2	3,94	3,82
ostatní vady hlavičky	1,47	4	1,97	7,17
Spojovací část [%]	4,41	3	5,92	8,12
Bičík [%]	3,92	7	7,4	11,46
z toho dag efekt	0	0,5	0,99	1,43
ostatní vady bičíku	3,92	6,5	6,41	10,03
Abnormální vývoj [%]	0,98	2,5	0	1,91
Nezralé spermie [%]	10,29	15,5	9,37	8,6
Patologické spermie celkem [%]	48	34	35,5	43

Příloha 10 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošt'

Dahoman	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,49	0	0	0
Hlavička [%]	40,05	10	12,28	16,5
z toho dekapacitace hlaviček	27,19	0	0,98	2,5
krček	11,87	2	2,95	2,5
ostatní vady hlavičky	0,99	8	8,35	11,5
Spojovací část [%]	0,49	1	4,42	7,5
Bičík [%]	0	13,5	5,89	14
z toho dag efekt	0	0	1,47	1,5
ostatní vady bičíku	0	13,5	4,42	12,5
Abnormální vývoj [%]	0,49	0,5	1,96	3,5
Nezralé spermie [%]	2,47	0,5	2,45	1
Patologické spermie celkem [%]	44	25,5	27	42,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Dahoman	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,49	0,5	0,49	0,47
Hlavička [%]	15,03	5,5	27,73	10,85
z toho dekapacitace hlaviček	5,82	0	15,08	1,89
krček	2,42	0	5,84	1,89
ostatní vady hlavičky	6,79	5,5	6,81	7,07
Spojovací část [%]	9,7	3,5	5,35	11,79
Bičík [%]	2,91	4	0,98	15,56
z toho dag efekt	0,97	0	0,49	0,94
ostatní vady bičíku	1,94	4	0,49	14,62
Abnormální vývoj [%]	1,94	0,5	0,97	1,89
Nezralé spermie [%]	1,94	1	0,49	0,94
Patologické spermie celkem [%]	32	15	36	41,5

Příloha 11 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošť

Markon	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0	0	0	0
Hlavička [%]	23,28	7,78	7,5	7,4
z toho dekapacitace hlaviček	14,36	0,49	2,5	2,47
krček	7,43	6,32	3,5	2,96
ostatní vady hlavičky	1,49	0,97	1,5	1,97
Spojovací část [%]	4,95	1,46	5	3,95
Bičík [%]	4,46	10,2	7	14,3
z toho dag efekt	0	0	1,5	0
ostatní vady bičíku	4,46	10,2	5,5	14,3
Abnormální vývoj [%]	1,98	0	1	0,99
Nezralé spermie [%]	15,35	15,06	12	9,86
Patologické spermie celkem [%]	50	34,5	32,5	36,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Markon	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0	0,97	0	0
Hlavička [%]	33,19	4,37	5,14	9,05
z toho dekapacitace hlaviček	21,3	0,97	1,4	0,94
krček	11,89	0,97	2,34	2,89
ostatní vady hlavičky	0	2,43	1,4	5,22
Spojovací část [%]	6,44	0,97	4,2	6,15
Bičík [%]	2,97	10,21	9,33	14,52
z toho dag efekt	0	0	1,4	0
ostatní vady bičíku	2,97	10,21	7,93	14,52
Abnormální vývoj [%]	0,49	0,49	1,4	0,47
Nezralé spermie [%]	8,91	18,48	7,93	9,31
Patologické spermie celkem [%]	52	35,5	28	39,5

Příloha 12 Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Byghošt'

Ryho	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,49	0	0	0
Hlavička [%]	8,86	13,72	8,5	15
z toho dekapacitace hlaviček	1,48	3,92	0,5	0,5
krček	5,9	8,33	6	8,5
ostatní vady hlavičky	1,48	1,47	2	6
Spojovací část [%]	2,95	2,45	1,5	1,5
Bičík [%]	2,95	3,43	4,5	3
z toho dag efekt	1,97	0	0,5	0
ostatní vady bičíku	0,98	3,43	4	3
Abnormální vývoj [%]	3,44	1,47	0	1,5
Nezralé spermie [%]	11,81	3,43	18,5	20,5
Patologické spermie celkem [%]	30,5	24,5	33	41,5

Hodnocení jednotlivých morfologických vad - Farelly

Ryho	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
Akrozom [%]	0,5	0	0	0
Hlavička [%]	26	11,71	9,5	16,5
z toho dekapacitace hlaviček	15,5	1,95	5	0
krček	10	5,37	4	11
ostatní vady hlavičky	0,5	4,39	0,5	5,5
Spojovací část [%]	1	0,49	2,5	8,5
Bičík [%]	0,5	3,9	5	3,5
z toho dag efekt	0	1,46	0	0
ostatní vady bičíku	0,5	2,44	5	3,5
Abnormální vývoj [%]	0,5	1,46	1	1
Nezralé spermie [%]	11,5	2,93	16,5	8,5
Patologické spermie celkem [%]	40	20,5	34,5	38

Příloha 13 Zjištěné hodnoty jednotlivých morfologických vad u hřebců - Byghošť

Hřelec	Akrozom	Hlavička	Spojovací část	Bičík	Abnormální vývoj	Nezralé spermie	Patologické spermie celkem
Quentino	1,34 ± 1,49	15,67 ± 12,72	5,67 ± 2,92	8,53 ± 3,78	1,73 ± 0,51	11,56 ± 3,05	44,5 ± 10,74
Oskar	0,25 ± 0,49	11,92 ± 7,27	3,6 ± 2,32	4,59 ± 2,32	2,23 ± 1,26	17,6 ± 2,14	40,25 ± 7,51
Canturino	0,26 ± 0,29	5,56 ± 1,35	4,31 ± 1,61	4,95 ± 2,99	1,73 ± 0,28	25,85 ± 6,25	42,63 ± 3,07
Lord Weingard	0,25 ± 0,28	16,37 ± 16,28	5,31 ± 3,62	5,44 ± 3,58	2,48 ± 1,28	8,31 ± 7,03	38,13 ± 8,86
Catalin	0,63 ± 0,75	7,38 ± 4,7	5,25 ± 3,3	3,75 ± 1,56	8,88 ± 10,09	16,75 ± 9,85	37,13 ± 4,92
Catango HT	0,5 ± 1	8,32 ± 4,42	5,26 ± 0,41	7,57 ± 3,12	2,7 ± 1,81	15,42 ± 3,67	42 ± 8,13
Olly	1,45 ± 1,6	9,71 ± 2,12	4,39 ± 2,21	4,65 ± 2,2	3,02 ± 1,6	17,31 ± 6,33	40,5 ± 1,73
Pietrosu Nelson	0,33 ± 0,57	5,4 ± 2,18	4,43 ± 2,98	15,38 ± 10,99	2,44 ± 1,28	21,01 ± 8,93	49 ± 10,15
Armin Q	0,49 ± 0,4	10,25 ± 4,03	6,13 ± 2,09	6,15 ± 0,88	1,61 ± 1,12	11,87 ± 6,75	36,5 ± 6,75
Dahoman	0,12 ± 0,25	19,71 ± 13,83	3,35 ± 3,27	8,35 ± 6,69	1,61 ± 1,44	1,61 ± 1,01	34,75 ± 9,85
Markon	0	11,49 ± 7,86	3,84 ± 1,66	8,99 ± 4,25	0,99 ± 0,81	13,07 ± 2,62	38,38 ± 7,92
Ryho	0,12 ± 0,25	11,52 ± 3,32	2,1 ± 0,72	3,47 ± 0,72	1,6 ± 1,41	13,56 ± 7,71	32,38 ± 7,05

Příloha 14 Zjištěné hodnoty jednotlivých morfologických vad u hřebců - Farelly

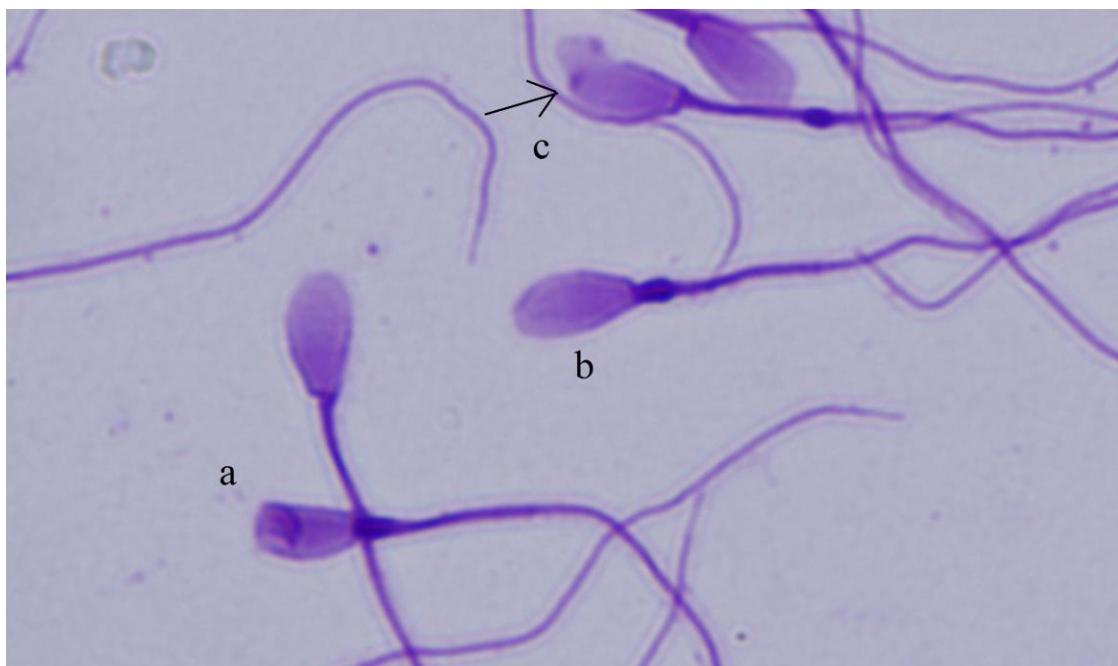
Hřelec	Akrozom	Hlavička	Spojovací část	Bičík	Abnormální vývoj	Nezralé spermie	Patologické spermie celkem
Quentino	1,12 ± 0,49	14,71 ± 4,58	6,59 ± 1,29	5,76 ± 2,74	2,61 ± 1,58	9,89 ± 4,39	40,75 ± 8,82
Oskar	0,12 ± 0,24	9,29 ± 6,78	2,58 ± 0,8	8,46 ± 4,35	2,22 ± 1,03	17,23 ± 4,55	39,88 ± 5,62
Canturino	0,74 ± 0,49	5,23 ± 2,55	4,72 ± 1,51	5,39 ± 3,57	1,46 ± 0,87	25,59 ± 4,13	43,13 ± 2,93
Lord Weingard	0,48 ± 0,4	8,41 ± 5,65	6,9 ± 2,24	6,09 ± 0,94	2,3 ± 0,68	6,84 ± 2,29	35 ± 6,56
Catalin	0,36 ± 0,24	11,06 ± 8,15	4,68 ± 2,84	5,87 ± 2,75	4,22 ± 0,87	10,56 ± 6,44	36,75 ± 7,5
Catango HT	0,25 ± 0,28	12,46 ± 8,15	7,71 ± 4,11	10,28 ± 5,03	1,96 ± 0,69	8,35 ± 4,71	41 ± 9,08
Olly	0,61 ± 0,46	10,38 ± 4,87	5,62 ± 4,48	5,13 ± 3,08	2,92 ± 1,16	17,11 ± 9,04	41,75 ± 0,65
Pietrosu Nelson	0,16 ± 0,28	5,75 ± 4,43	6,09 ± 4,45	15,18 ± 6,31	1,65 ± 0,27	18,66 ± 3,42	47,5 ± 5,2
Armin Q	0,37 ± 0,24	14,67 ± 9,33	5,36 ± 2,19	7,45 ± 3,1	1,35 ± 1,1	10,94 ± 3,12	40,13 ± 6,56
Dahoman	0,49 ± 0,01	14,78 ± 9,48	7,59 ± 3,82	5,86 ± 6,59	1,33 ± 0,71	1,09 ± 0,61	31,13 ± 11,43
Markon	0,24 ± 0,49	12,94 ± 13,66	4,44 ± 2,52	9,26 ± 4,77	0,71 ± 0,46	11,16 ± 4,92	38,75 ± 10,04
Ryho	0,13 ± 0,25	15,93 ± 7,32	3,12 ± 3,69	3,23 ± 1,92	0,99 ± 0,39	9,86 ± 5,68	33,25 ± 8,8

Příloha 15 Zjištěné průměrné hodnoty za všechny odběry od jednotlivých hřebců

Hřelec	T/CH	Četnost odběrů během sezóny	Objem [ml]	Motilita [%]	Koncentrace [10 ⁶ / ml]	Patologické spermie celkem [%]	
						barvení Farelly	barvení Byghošť
Quentino	T	***	27,5 ± 16,58	78,75 ± 6,29	413,75 ± 139,37	40,75 ± 8,82	44,5 ± 10,74
Oskar	T	*	106,25 ± 18,87	63,75 ± 4,79	186,85 ± 53,17	39,85 ± 5,62	40,25 ± 7,51
Canturino	T	*	72,5 ± 33,04	72,5 ± 6,46	472,5 ± 180,41	43,1 ± 2,93	42,6 ± 3,07
Lord Weingard	T	***	42,5 ± 15,55	81,25 ± 4,79	333,1 ± 164,75	35 ± 6,56	38,1 ± 8,86
Catalin	T	*	85 ± 9,13	80 ± 9,13	390,5 ± 147,51	36,75 ± 7,5	37,1 ± 4,92
Catango HT	T	*	33,75 ± 12,5	70 ± 4,08	558,1 ± 171,48	41 ± 9,08	33 ± 20,93
Olly	T	*	16,25 ± 7,5	62,5 ± 5	503,1 ± 158,63	41,75 ± 0,65	40,5 ± 1,73
Pietrosu Nelson	T	**	46,6 ± 11,55	70 ± 5	420 ± 73,99	47,5 ± 5,19	49 ± 10,15
Armin Q	CH	**	35 ± 10,8	68,75 ± 8,54	339,3 ± 171,92	40,1 ± 6,56	36,5 ± 6,75
Dahoman	T	**	27 ± 26,57	72,5 ± 5	316,25 ± 113,95	31,1 ± 11,43	34,8 ± 9,72
Markon	CH	**	172,5 ± 22,17	57,5 ± 6,46	238,1 ± 89,48	38,75 ± 10,04	38,3 ± 7,92
Ryho	CH	**	62,5 ± 11,90	78,75 ± 6,29	353,1 ± 101,68	33,25 ± 8,8	32,3 ± 7,05

*T - teplokrevný, CH - chladnokrevný; Četnost odběrů: * méně častý, ** pravidelný, *** velmi častý*

Příloha 16 Fotografie nátěru - Byghošť



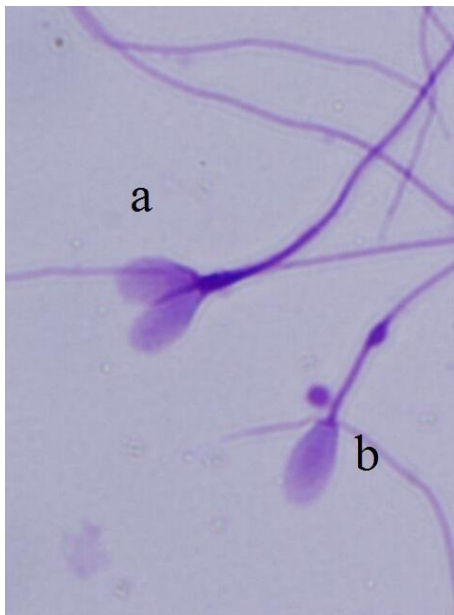
Morfologické vady při barvení metodou Byghošť. Deformace hlavičky (a), pseudokapka (b), knoflíkový defekt akrozomu (c).

Příloha 17 Fotografie nátěru - Byghošť



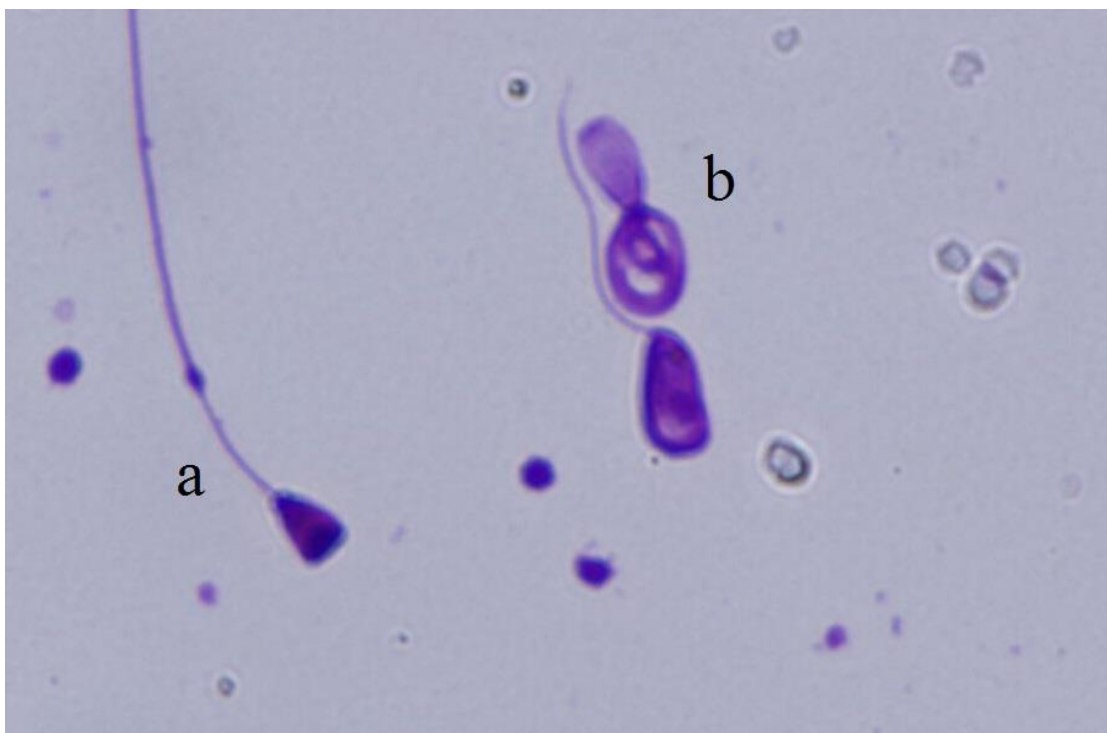
Morfologické vady při barvení metodou Byghošť. Dekapitovaná hlavička (a), krátery v jádře způsobené velkými vakuolami (b), ztlustění spojovací části (c).

Příloha 18 Fotografie nátěru - Byghošť



Morfologické vady při barvení metodou Byghošť. Spermie se dvěma hlavičkami (a), nezralá spermie (b).

Příloha 19 Fotografie nátěru - Byghošť



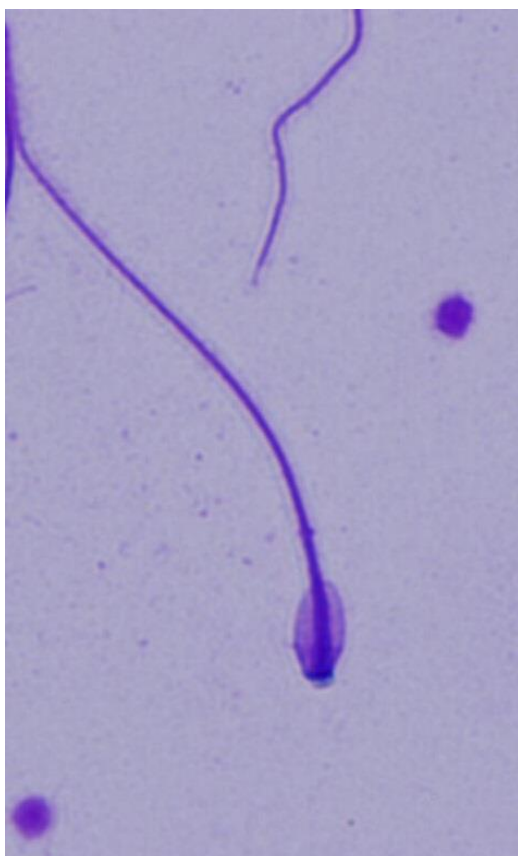
Morfologické vady při barvení metodou Byghošť. Abnormální vývoj spermie (a), Dag defekt (b).

Příloha 20 Fotografie nátěru - Byghošť



Morfologická vada při barvení metodou Byghošť. Pahýlový defekt.

Příloha 21 Fotografie nátěru - Farelly



Morfologická vada při barvení metodou dle Farellyho. Zlomení bičíku v krčku.