

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

---

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Rozdíly v aktivitě spermií hřebců

Autor diplomové práce:

Bc. Lucie Novotná

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

České Budějovice, 2018



Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Lucie Novotná

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Miroslavu Maršálkovi, CSc., Ing. Janě Křížkové a Mgr. Veronice Čoudkové za odborné vedení práce, pomoc a dobré rady při konzultacích a vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za trpělivost a velkou podporu při studiu své rodině.

## ABSTRAKT

Jedním z hlavních předpokladů úspěšné umělé inseminace je kvalitní ejakulát. Tato diplomová práce se zabývá vlivem podílu rychlostních frakcí spermií na plodnost. Vzorky ejakulátu byly vyhodnoceny objektivní počítačovou metodou CASA, systémem SCA. Sledování motility spermií bylo provedeno u 75 vzorků získaných od 12 hřebců, zařazených do inseminace čerstvým spermatem v Zemském hřebčinci v Písku. U vzorků byla sledována celková a progresivní motilita, podíl rychlých, středně rychlých a pomalých spermií. Věk sledovaných hřebců se pohyboval v rozmezí 3–21 let. Průměrná plodnost dosahovala 56,19 %. Celková motilita měla průměrnou hodnotu 78,07 %, průměr progresivní motility byl 38,35 %. Dále byly spermie rozděleny na 3 rychlostní frakce a průměrné procentuální zastoupení jednotlivých frakcí ve vzorcích bylo následující: 27,30 % rychlých spermií, 21,27 % středně rychlých spermií a 29,50 % pomalých spermií. Dále bylo zjištěno průměrné procentuální zastoupení rychlých progresivních spermií (13,43 %), středně rychle progresivních spermií (24,92 %) a neprogresivních spermií (39,72 %). Byla prokázána kladná korelace mezi plodností a podílem rychle motilních spermií ( $r=0,34$ ). Dále byl prokázán rozdíl mezi jednotlivými hřebci ( $p$ -hodnota  $< 0,01$ ) v průměrném procentuálním zastoupení rychlých spermií v ejakulátu. Hřelec s největším podílem rychlých spermií v ejakulátu a nejlepší březostí byl hřelec plemene welsh part-bred. Naopak nejhorší výsledky březosti a jedno z nejnižších procent rychle motilních spermií měl norický hřelec. Největší úspěšnost zabřeznutí byla zjištěna po druhé inseminaci. Výsledky této práce dokázaly, že kvalita ejakulátu velice významně ovlivňuje dobré zabřeznutí, avšak je to jen jeden z mnoha působících faktorů.

**Klíčová slova:** hřelec, motilita, CASA

## **ABSTRACT**

One of the requirements for a successful artificial insemination is the quality of stallion's ejaculate. This thesis deals with influence of sperm velocity fraction on fertility. Semen samples in this thesis were evaluated by using an objective computerized method CASA, system SCA. Sperm motility in monitoring was performed in 75 samples from 12 stallions involved in artificial insemination fresh sperm in ZH Písek. Total and progressive motility, rapid, medium and slow motility were monitored. Stallion's age was from 3–21 years. The average of fertility was 56,19 %. The average of total motility was 78,07 %. The average of progressive motility was 38,35 %. Furthermore, the spermatozoa were divided into 3 velocity fractions and the average percentage of the individual fractions in the samples was as follows: 27,30 % rapid spermatozoa, 21,27 % medium spermatozoa and 29,50% slow spermatozoa. Then the average percentage of rapid progressive spermatozoa (13,43 %), medium progressive spermatozoa (24,92 %) and non-progressive spermatozoa (39,72 %) were found. There was a positive correlation between fertility and the rate of rapid motile spermatozoa ( $r=0,34$ ). The difference between individual stallions ( $p$ -value  $< 0,01$ ) in the mean percentage of rapid spermatozoa in the ejaculate was demonstrated. The stallion with the highest rate of rapid motile spermatozoa and the best pregnancy was welsh part-bred stallion. On the other hand, the worst pregnancy results and one of the lowest percentages of rapid motile spermatozoa had noriker stallion. The highest success rate of pregnancy was found after the second insemination. The results of this work have shown that the quality of the ejaculate has a very significant effect on good pregnancy but it is just one of many acting factors.

**Key words:** stallion, motility, CASA

# OBSAH

1. Úvod .....	9
2. Literární přehled .....	10
2.1. Pohlavní soustava hřebce .....	10
2.1.1. Varle ( <i>testis</i> ) .....	10
2.1.2. Nadvarle ( <i>epididymis</i> ) .....	11
2.1.3. Chámovod ( <i>ductus deferens</i> ).....	11
2.1.4. Přídavné pohlavní žlázy ( <i>glandulae genitales accessoriae</i> ) .....	12
2.1.5. Pyj ( <i>penis</i> ) .....	13
2.2. Ejakulát hřebce .....	13
2.2.1. Semenná plazma.....	13
2.2.2. Spermie.....	14
2.2.3. Spermatogeneze .....	15
2.3. Odběr spermatu od hřebců .....	16
2.4. Hodnocení ejakulátu.....	17
2.4.1. Barva, konzistence a pach ejakulátu .....	18
2.4.2. Objem ejakulátu .....	18
2.4.3. Koncentrace spermií.....	18
2.4.4. pH ejakulátu .....	19
2.4.5. Morfologické vyšetření spermií .....	19
2.4.6. Motilita spermií .....	20
3. Hypotéza.....	21
4. Cíl práce .....	22
5. Materiál a metodika .....	23
5.1. Materiál .....	23
5.2. Metodika.....	23
5.3. Zpracování dat.....	24
6. Výsledky a diskuze.....	26
6.1. Hodnocení sledovaných ukazatelů ejakulátu hřebců.....	26
6.2. Hodnocení vztahu plodnosti a rychlostních frakcí spermií.....	27
6.3. Porovnání podílu rychlých spermií u jednotlivých hřebců .....	29
6.4. Hodnocení inseminačního indexu jednotlivých hřebců .....	32

7. Závěr.....	36
8. Seznam literatury.....	38



## 1. Úvod

Význam chovu koní se značně změnil. Zatímco dříve byl kůň využíván především jako pracovní síla v zemědělství, dnes je využíván hlavně ke sportovním a hobby účelům. Každý požaduje co nejkvalitnějšího sportovního koně. Vzhledem k rozšíření umělé inseminace je možnost využít k reprodukci plemeníky z celého světa. Umělá inseminace snižuje riziko přenosu pohlavních nákaz, eliminuje zranění hřebce nebo klisny na rozdíl od přirozené plemenitby, je levnější a je zde možnost využít již nežijící plemeníky.

To, že hřebec podává vynikající sportovní výkony, ale ještě neznamena, že bude i vynikající plemeník. Proto jedním z důležitých požadavků na zařazení do plemenitby je vyšetření ejakulátu. Kvalita ejakulátu závisí na mnoha vnitřních i vnějších faktorech. Mezi vnitřní faktory patří například plemeno, věk, zdravotní stav. Mezi vnější faktory pak například výživa nebo ošetřování. Ejakulát hřebce musí splňovat určité parametry (objem, aktivita, hustota nebo morfologie spermií). Nejčastěji hodnoceným parametrem kvality ejakulátu je motilita spermií. Pohyb spermií v ejakulátu se dá rozdělit na progresivní a neprogresivní. Podle rychlosti pohybu je možné rozdělit spermie na pomalé, středně rychlé a rychlé.

V této práci byla pomocí objektivní počítačové metody CASA (Computer-assisted semen analysis) hodnocena motilita spermií v ejakulátu vybraných hřebců a výsledky byly dány do souvislosti se zabřezáváním klisen po inseminaci.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Pohlavní soustava hřebce

Pohlavní soustava je jediná soustava, která slouží k zachování druhu, nikoli jedince. Jako taková není bezpodmínečně nutná pro zachování života jedince a umělé odstranění některých jejích orgánů neohrožuje život. Skládá se z pohlavních žláz (varlat), jejich vývodů (nadvarlat a chámovodů), přídatných pohlavních žláz (měchýřkovitých žláz, bulbouretrálních žláz a prostaty) a pářícího orgánu pyje. Pohlavní žlázy produkují kromě pohlavních buněk také pohlavní hormony. Ty svým účinkem podmiňují sekundární pohlavní znaky a temperament a regulují pohlavní cyklus (POPESKO *et al.*, 1992).

#### 2.1.1. Varle (*testis*)

Varlata jsou párové pohlavní žlázy, které mají tuhoelastickou konzistenci (MARVAN *et al.*, 1998). Produkují samčí pohlavní buňky spermie a samčí pohlavní hormon testosteron (POPESKO *et al.*, 1992). Varlata hřebce jsou poměrně malá, vejčitého a ze stran mírně zploštělého tvaru. Délka varlat je 10–12 cm a hmotnost se pohybuje mezi 400–600 g. K dorzálnímu okraji varlete se podélně přikládá nadvarle, které je na kraniálním konci rozšířené v hlavu nadvarlete a na kaudálním konci v ocas nadvarlete. Varlata jsou spolu s nadvarlaty uložena v šourku mimo dutinu břišní. Poloha varlat v šourku je horizontální (MARVAN *et al.*, 1998).

Vazivovým obalem varlete jsou tvořeny přepážky, které oddělují lalůčky varlete. V těchto lalůčcích jsou stočené semenotvorné kanálky varlete, ve kterých probíhají jednotlivé fáze spermatogeneze. Kromě zárodečného – spermatogenního epitelu se ve stěnách kanálků nachází podpůrné (Sertoliho) buňky, v nichž dochází k poslednímu stádiu spermatogeneze – metamorfóze spermatid na spermie. Ve vymezeném vazivu mezi stočenými semenotvornými kanálky se nachází velké intersticiální (Leydigovy) buňky. Obsahují velké množství agranulárního endoplazmatického retikula, ve kterém je produkován samčí pohlavní hormon testosteron (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

### **2.1.2. Nadvarle (*epididymis*)**

Nadvarle je párový orgán kyjovitého tvaru přiléhající k varleti. Pohlavní buňky se zde shromažďují a dozrávají (FLADE *et al.*, 1990). Skládá se z hlavy, těla a ocasu (THOMPSON *et al.*, 1979).

Hlava nadvarlete se skládá z 15 – 20 lalůčků, složených z klíček odvodných kanálků varlete. Všechny odvodné kanálky se na přechodu hlavy a těla spojují v jednotný vývod nadvarlete. Tento vývod měří u hřebce asi 50 metrů a slouží jako rezervoár spermií až do ejakulace (MARVAN *et al.*, 1998).

Spermie z varlete přechází do hlavy nadvarlete, zahušťují se a poškozené a přestálé spermie jsou zde fagocytovány. V hlavě nadvarlete vykazují spermie intenzivní respiraci a sníženou glykolýzu, v ocasu nadvarlete je tomu obráceně. V těle nadvarlete se spermie setkávají se sekrety s vysokým obsahem tuků a dalších látek zvyšujících odolnost jejich povrchových membrán. Morfologickým znakem dozrání spermií je odloučení protoplazmatické kapky. V nadvarletí jsou spermie nepohyblivé a jejich celková aktivita metabolismu je nízká. Tento klidový stav (anabióza) prodlužuje životnost spermií. Nadvarletem projde spermie za 8-11 dní (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003). Oplozovací schopnost ve vývodu nadvarlete si spermie zachová 2–3 týdny (MARVAN *et al.*, 1998).

### **2.1.3. Chámovod (*ductus deferens*)**

Chámovod je párová silnostěnná trubička, která spojuje vývod nadvarlete s močovou trubicí. Začíná na ocasu nadvarlete, od úrovně hlavy nadvarlete ho cévy a nervy doprovází do dutiny břišní, odkud přechází do dutiny pánevní a nakonec přes močový měchýř až do močové trubice (MARVAN *et al.*, 1998). U hřebců je poslední část chámovodu rozšířená v ampulu chámovodu, jejíž žláznatá část vylučuje sekret, který stimuluje metabolickou aktivitu spermií. Do močové trubice se spermie z ampul chámovodů dostávají spolu se sekretem měchýřkovitých žláz ejakulačním kanálkem (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

#### 2.1.4. Přídavné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*)

Nachází se na pánevní části močové trubice. Jejich sekret se při ejakulaci mísí se spermiemi a vytváří velkou část ejakulátu (semennou plazmu). Tento sekret je přirozeným ředidlem spermií a slouží k úpravě prostředí pro spermie při jejich průchodu močovou trubicí a v pochvě. Mezi přídavné pohlavní žlázy patří semenné vajíčky, předstojná a bulbouretrální žláza (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

**Semenné vajíčky** jsou párový orgán protáhlého tvaru ležící na dorzální ploše močového měchýře (KLIMENT *et al.*, 1983). Tato strukturálně složitá tubulózní žláza vylučuje bělavý a slabě zásaditý sekret hromadící se v rozšířených nitrolalůčkových a mezilalůčkových vývodech. Při ejakulaci se tento sekret vylučuje pomocí stahů hladké svaloviny vývodů do močové trubice (MARVAN *et al.*, 1998). Sekret se vylučuje na konci ejakulace a tvoří 10–40 % objemu ejakulátu. Obsahuje fruktózu, která slouží jako zdroj energie pro spermie a další látky, jako je například kyselina askorbová nebo citronová. pH tohoto sekretu je mírně kyselé (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

**Předstojná žláza** (prostata) je nepárová žláza ležící na začátku močové trubice, kaudálně od vyústění chámovodů a měchýřkovitých žláz. U hřebce se tělo prostaty rozděluje na dva laloky spojené můstkem. Prostata se skládá ze sekrečních tubulů, které jsou navzájem spojené intersticiálním vazivem. Sekret prostaty má zásaditou reakci, je řídké mlékovité konzistence a charakteristicky zapáchá. Četnými vývody je odváděn do močové trubice (MARVAN *et al.*, 1998). Při ejakulaci je sekret vylučován těsně před spermiemi a spolu s nimi. Neobsahuje cukry, ale má relativně vysoký obsah anorganických solí, které udržují stálý osmotický tlak v ejakulátu (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

**Bulbouretrální žláza** (Cowperova žláza) je párová žláza ležící na močové trubicí před jejím výstupem z pánve. Sekret se vylučuje převážně na konci ejakulace (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003). U hřebce je kulovitěho tvaru s hladkým povrchem. Parenchym žlázy je rozdělen na drobné lalůčky složené z rozvětvených sekrečních tubulů. Výměšek žlázy je u hřebce odváděn několika vývody do močové trubice (MARVAN *et al.*, 1998).

### **2.1.5. Pyj (*penis*)**

Pyj je kopulační orgán, který slouží k přenosu spermatu do pohlavních orgánů samice během páření. Má válcovitý tvar a dvě části: fixovanou část – kořen pyje a volnou část – tělo pyje. Volný kraniální konec pyje je zakončen žaludem a v ochablém stavu je ukryt v kožním vaku (předkožce). Délka pyje u hřebce je 50 – 60 cm a průměr 5 – 6 cm. Žalud hřebce je mohutný, má kloboučkovitý tvar s vyvýšeným valem na obvodu a centrální jamku. Pyj se skládá z párového topořivého tělesa, nepárového houbovitého tělesa, močové trubice, pomocných svalů, cév a nervů (MARVAN *et al.*, 1998).

## **2.2. Ejakulát hřebce**

Ejakulát hřebce je složen ze spermií a semenné plazmy (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003). Složení hřebčího ejakulátu a jeho kvalita jsou značně rozdílné. Závisí na mnoha faktorech, jako je například výživa, věk, plemeno nebo pohlavní využívání hřebce (KOMÁREK *et al.*, 1964).

### **2.2.1. Semenná plazma**

Jedná se o tekutinu obsahující převážně sekrety přídatných pohlavních žláz. Je určena k výživě a transportu spermií a stimulaci jejich pohybu. U hřebce tvoří semenná plazma 97–98 % ejakulátu. Z chemických sloučenin je v ní zastoupena kyselina citronová, kyselina askorbová, aminokyseliny, bílkoviny, prostaglandiny, androgeny, estrogeny a enzymy. V hřebčím spermatu je malé množství fruktózy, tudíž jako hlavní zdroj energie slouží glukóza (CIBULKA *et al.* 2004). Ejakulát hřebce je složen ze 3–4 frakcí. První frakci (předpermiovou) tvoří sekrety bulbouretrálních žláz, druhá frakce je bohatá na spermie a pochází z ocasu nadvarlete, třetí želatinózní (pospermiová) frakce, obsahující velké množství kyseliny citrónové, má původ v semenných váčcích. Poslední frakce je vodnatý sekret vylučovaný na konci ejakulace a je směsí celého ejakulátu (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984).

### 2.2.2. Spermie

Spermie jsou transportéry genetického materiálu samce na místo oplození. Mají schopnost pohybu a oplození. Skládají se z hlavičky a bičíku (ŠŤASTNÝ A ŠŤASTNÁ 2015). Spermie obsahující malý heterochromozom Y se nazývají androspermie a spermie s větším heterochromozomem X se nazývají gynospermie (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

**Hlavička** spermie se vytváří především z jádra spermatidy. Přední část hlavičky pokrývá akrozom, který obsahuje enzymy, umožňující rozpuštění obalů vajíčka. Zadní část tvoří cytoplazmatická membrána a postakrozomální čepička. Hlavička je tvaru silně zploštělého oválu. Na hlavičku připadá 51 % hmotnosti spermie. Hlavička slouží k přenosu otcovské genetické informace, uložené v jádře, do vajíčka (CIBULKA *et al.* 2004). Jádro hlavičky je vyplněné nukleoplazmou a dědičný materiál je v jádru hlavičky v podobě DNA (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984).

**Bičík** je pohybové ústrojí spermie. Při procesu pohybu má důležitou roli mitochondriální aparát, vyrábějící energii (ATP), a komplex axiálních vláken, což je místo, kde se tato energie mění na mechanickou – na pohyb spermie (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984). Bičík je tvořen spojovacím, hlavním a koncovým (terminálním) oddílem. S hlavičkou je bičík spojen krátkým krčkem. Krček obsahuje dva centrioly. Distální centriol obklopuje devět příčně segmentovaných provazců (chord). Z distálního centriolu vystupuje osová vlákna, tvořené 9 + 2 duplety mikrotubulů. Spojovací oddíl je charakteristický velkým množstvím mitochondrií. Hlavní oddíl je nejdelší částí bičíku a jeho podkladem je osová vlákna, obklopené nesegmentovanými chordami a obalené fibrózní pochvou. Koncový oddíl tvoří pouze osová vlákna. Celou spermii kryje nepřerušovaná dvouvrstvá cytoplazmatická membrána, sloužící jako základní ochrana. Je vysoce permeabilní, acidorezistentní a citlivá na změny osmotického tlaku (JELÍNEK, KOUDELA *et al.*, 2003).

### 2.2.3. Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces transformace zárodečných epitelových buněk na spermie. V tomto procesu se vyskytují dva typy dělení, a to mitóza, při níž každá nová buňka zůstává diploidní a meióza, při které je každá nová buňka haploidní. Zralá spermie má tudíž poloviční počet chromozomů (REECE, 2011). Spermie se vyvíjí v semenotvorných kanálcích varlat. Začátek tvorby spermií je při nástupu pohlavní dospělosti, což je u hřebce mezi 10–12 měsíci. Ze začátku nemá tvorba spermií cyklický charakter, což má za následek vyšší procento patologických forem spermií. Po dosažení pohlavní dospělosti probíhá spermiogeneze v pravidelných cyklech v přesných časových intervalech. Každý nový cyklus začíná asi o  $\frac{1}{4}$  délky cyklu později. Ve stěně semenotvorných kanálků se proto vyskytují 4 generace buněk. Délka spermiogenního cyklu je u hřebce 54 dní (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984).

Kmenové buňky (spermatogonie), které jsou uloženy v bazální části semenotvorných kanálků, se mitoticky dělí, a z každé spermatogonie vznikne jedna stejná buňka, která zůstane uložena na původním místě a druhá, nazývaná spermatogonie typu A, která migruje přes Sertoliho buněčnou bariéru do vrstvy buněk blízko dutiny kanálku. Spermatogonie typu A prodělávají mitotické dělení, zahrnující někdy několik generací buněk. Tak vzniká velké množství spermatogonií typu B. Tyto buňky se naposledy mitoticky dělí a výsledkem je vytvoření primárních spermatocytů s diploidním počtem chromozomů. Primární spermatocyty se dále meioticky dělí a vznikají z nich sekundární spermatocyty, z nichž vznikají po druhém meiotickém dělení spermatidy s haploidním počtem chromozomů (REECE, 2011).

Po opuštění varlat nejsou spermie ještě plně zralé a nejsou ještě oplození schopné (YOUNG, 1931). Aby se z kulatých a nepohyblivých spermatid staly štíhlé a pohyblivé spermie, musí projít metamorfózou neboli spermiohistogenezí, která trvá asi 18 dní. Během tohoto procesu se vytváří akrozom a pohybové ústrojí v podobě bičíku. Spermie se uvolňují ze semenotvorných kanálků do vývodných semenných cest a putují do ocasu nadvarlete, kde jsou uloženy až do ejakulace a nevykazují aktivní pohyb (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984). Proces vývoje spermií probíhá ve vlnách, takže je zásobování zralými spermii plynulé (DINGER, NOILES, 1986 a JOHNSON *et al.*, 1997). Pokud nedojde k ejakulaci do 3–4 týdnů, spermie degenerují,

odumírají a dochází k jejich resorpci, a tím k redukci těch, které by mohly mít vývojové vady (MARENGO *et al.*, 2007).

Nově vytvořené spermie nejsou pohyblivé. Jsou transportovány do nadvarlete a při průchodu nadvarletem získávají schopnost pohybovat se přímo dopředu. Schopnost oplodnit vajíčko získávají spermie až po určité době v pohlavním ústrojí samice. Zde dochází ke kapacitaci spermie. Při kapacitaci dochází k biochemickým změnám způsobujícím destabilizaci plazmatické membrány. Kontakt spermií se zónou pellucidou vajíčka probíhá v oblasti akrozomu za účasti hormonu akrozinu (CIBULKA *et al.* 2004).

### **2.3. Odběr spermatu od hřebců**

Dle vyhlášky č. 380/2003 se může odebírat sperma pouze od hřebců, kteří splňují veterinární požadavky. Hřebci nesmí vykazovat žádné příznaky nákazy. Po dobu 30 dnů před prvním odběrem a během odběrového období nesmí být použit pro přirozenou plemenitbu.

Pro odběr vysoce kvalitního ejakulátu je nezbytné zachování normálního sexuálního chování a dobré libido (SIEME *et al.*, 2004). Před odběrem se musí umýt penis hřebce teplou vodou, aby se předešlo kontaminaci spermatu (SPRAYBERRY, ROBINSON, 2015). Sperma se odebírá především pomocí umělé vaginy, vymazané sterilní vazelinou, a fantomu nebo říjící se klisny (DUŠEK *et al.*, 2007). Umělé vaginy mohou být různého typu a konstrukce. Prvním typem je umělá vagina s jednorázovým sběračem ejakulátu dle Paršutina, v modifikaci Petelíková, Müller, Matoušek. Vyrobená je z hliníku, má gumovou vložku, délka je 54 cm a průměr 14 cm. Sběrač je použit jednorázový z PVC folie, který je obalen molitanem, aby se sperma ochránilo před chladovým šokem. Do mezistěny se nalévá teplá voda, aby teplota umělé vaginy byla v době odběru 40–42 °C. Dalším typem je otevřená umělá vagina typu Krakov. Tato vagina je 40 cm dlouhá o průměru 14 cm, kostra je z plastů a má ventilek na dolévání teplé vody. V ústí je molitanová vložka. Při odběru do tohoto typu vaginy je dosaženo podstatně nižší mikrobiální kontaminace, vyšší hustoty ejakulátu a lepší hygiena odběru. Sperma je zachycováno do předeřháté a tepelně izolované sterilní nádoby opatřené gázou. Ejakulát je zachycován bez výměšků přídatných pohlavních žláz (KLIMENT *et al.*, 1983). GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* (1984) uvádějí další typy umělých vagin. U prvního typu Missouri, navrženého



Mc Kenziem, dochází k zúžení vchodu pryžovým prstencem, protože je předpoklad, že reflex ejakulace je vyvolán třením u báze penisu. Typ Mississippi, který byl navržen Berlinerem, je založen na principu dráždění receptorů na žaludu penisu.

Samotný odběr probíhá tak, že se hřebec přivede k fantomu nebo říjící klisně, připraví se a se ztopořeným penisem se nechá naskočit. Penis se uchopí za předkožku, vsune do připravené umělé vaginy a nechá se odsemenit (DUŠEK *et al.*, 2007). Tlak v umělé vagině by měl být 530 kPa a upravuje se přifouknutím nebo vypuštěním vzduchu z prostoru mezi kovovým pouzdem a gumovou vložkou, kde je již voda.

Za optimální počet odběrů se považuje 2–3 skoky týdně. K odběru ejakulátu do umělé vaginy je potřeba v průměru 2,2 pokusů. Ejakulace trvá v průměru 13,3 sekundy (KLIMENT *et al.*, 1983).

## 2.4. Hodnocení ejakulátu

Kvalita ejakulátu se liší nejen mezi jednotlivými hřebci, ale kolísá i v rámci jednoho a téhož jedince. Z tohoto důvodu by u získaného ejakulátu mělo být provedeno makroskopické a mikroskopické vyšetření, které slouží k získání lepší představy o současné kvalitě získaného ejakulátu (ŠTRUPL *et al.*, 1983). Makroskopické vyšetření se provádí bezprostředně po odběru ejakulátu a stanovuje se objem získaného spermatu, barva, konzistence, pach a obsah cizích přímísenin. Mikroskopické vyšetření spermatu zahrnuje stanovení koncentrace, aktivity a morfologie spermií, koncentrace vodíkových iontů a procenta živých a mrtvých spermií (KLIMENT *et al.*, 1983).

Po odběru je důležité, aby bylo sperma udrženo při teplotě 34–37 °C, bylo chráněno před světlem, teplotními extrémy a chemikáliemi než se dostane do laboratoře k analýze (MUNROE, WEESE, 2011). Veškeré předměty, které přijdou do kontaktu se spermatem, musí být zahřáté na tělesnou teplotu (Brinsko *et al.*, 2011). Sperma se laboratorně vyšetřuje z hlediska použitelnosti pro plemenitbu a schopnosti jeho konzervace. Ze zdravotního hlediska se sperma vyšetřuje pravidelně na obsah infekčních zárodků (KLIMENT *et al.*, 1983).

### 2.4.1. Barva, konzistence a pach ejakulátu

Barva a konzistence spermatu je vizuálně posuzována v procházejícím nebo dopadajícím světle ve sběrači. Sperma hřebce by mělo mít mléčně bílou barvu (KLIMENT *et al.*, 1983). Druhové rozdíly v barvě spermatu vyplývají většinou z objemu a hustoty ejakulátu. Barvu může též ovlivnit výživa, přirozená barviva krmiv, probíhající zánětlivý proces apod. Konzistence spermatu hřebce je spíše vodnatá s příměsí hlenu. Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Ejakulát hřebce má obvykle slabý specifický hřebčí pach (ŠŤASTNÝ, ŠŤASTNÁ, 2015).

### 2.4.2. Objem ejakulátu

Objem ejakulátu závisí na plemeni, věku, období, frekvenci odběrů a vydráždění před odběrem. Objem hřebčího ejakulátu se pohybuje v rozmezí od 25 do 300 ml. Průměrný objem ejakulátu dospělého hřebce je 50–70 ml. Objem ejakulátu se stanoví buď měřením v předeřtáté kalibrované nádobě, nebo vážením přímo ve sběrači (MUNROE, WEESE, 2011).

LOUDA *et al.*, (2001) uvádí, že objem ejakulátu je u chladnokrevných plemen 150 cm<sup>3</sup>, u teplotokrevných 60 cm<sup>3</sup> a u lehkých – arabských 45 cm<sup>3</sup>. Dle MAIRA *et al.*, (2013) může být objem ovlivněn počtem odběrů. Čím vyšší je frekvence odběrů, tím je objem menší. Naopak se objem dá zvýšit vydrážděním hřebce před odběrem. Dále GAMBOA *et al.*, (2006) uvádí, že objem stoupá na jaře a v létě, zatímco na podzim a v zimě objem ejakulátu klesá. Nejlepší kvality dosahuje sperma v období od března do května.

### 2.4.3. Koncentrace spermií

Koncentrace spermií je vyjádřena počtem spermií v 1 mm<sup>3</sup> a je ukazatelem pro určení stupně ředění spermatu. Celkový počet spermií v ejakulátu je získán, vynásobí-li se počet spermií v 1 mm<sup>3</sup> objemem ejakulátu. Koncentrace dobrého spermatu se pohybuje v rozmezí 30 000–300 000 v mm<sup>3</sup> (KLIMENT *et al.*, 1983). Rozmezí je však velmi variabilní a je dáno funkční aktivitou semenotvorného epitelu varlat, věkem, zdravotním stavem, technikou odběru. Plemeníci s opakovaně nízkou koncentrací spermií v ejakulátu, která je geneticky podmíněna, jsou z plemenitby vyřazováni (LOUDA *et al.*, 2001). Množství produkovaných spermií se s věkem

zvyšuje, protože se zvětšuje délka semenných kanálků (SAMPER *et al.*, 2007). Koncentrace spermií nemá vypovídající hodnotu o kvalitě získaných spermií (POWER, 1963). Koncentrace se stanovuje mikroskopickým počítáním spermií v Bürkerově komůrce nebo fotometrem (KLIMENT *et al.*, 1983). Spektrofotometrie je velmi rychlá a přesná metoda. Principem je prostupnost zákalu semene paprskem světla (JOHANSSON, 2008).

#### **2.4.4. pH ejakulátu**

pH ejakulátu se pohybuje nejčastěji v rozmezí od 6,7–7,5. Změnu hodnoty pH může značit zánět přídatných pohlavních žláz, varlat nebo nadvarlat. Výrazně alkalické pH (7,8 a více) signalizuje, že nebyl získán celý ejakulát, protože první vodnatá frakce má pH 8,1–8,8 a ovlivňuje tak celkové pH spermatu (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984). Při nepříznivé hodnotě pH může být vážně ovlivněna oplozovací schopnost spermií. pH 7–7,5 umožňuje maximální projev potenciální motility spermií. Nižší pH snižuje motilitu spermií a membránovou integritu, vyšší pH vede ke znehybnění spermií způsobenému poklesem jejich mitochondriální aktivity (CONTRI *et al.*, 2013).

#### **2.4.5. Morfologické vyšetření spermií**

Morfologie spermií je důležitý parametr pro hodnocení kvality spermatu. Počet abnormálních spermií je důležitý pro stanovení fertility, selekci plemeníků a odhadu vhodnosti ejakulátu ke skladovatelnosti pro účely umělé inseminace (KUSTER *et al.*, 2004). Oplozovací schopnost spermií je vázaná na správný vývoj hlavičky, která je nositelem genetické informace. Pro penetraci vajíčka je nezbytný správně vyvinutý akrozom (ŠŤASTNÝ, ŠŤASTNÁ, 2015). Ke vzniku morfologických abnormalit spermií mohou vést poruchy spermatogeneze (MALMGREN, 1997). Vyšší procento morfologicky změněných spermií může mít za následek poruchy plodnosti (SAACKE *et al.*, 2000). Více morfologických abnormalit se vyskytuje mimo připouštěcí sezónu (VAN DER HOLST, 1975). Morfologické změny, které vznikly během vývoje spermií a jejich přesunu do nadvarlete se nazývají primární. Sekundární změny vznikají mezi ejakulací a vyšetřením ejakulátu (BARTH *et al.*, 1989). Hodnotí se nejdůležitější části spermií, a to hlavička, akrozom, spojovací část

a bičík (ŠŤASTNÝ, ŠŤASTNÁ, 2015). Spermie, která má jakkoli poškozený akrozom není schopná oplodnit vajíčko (THUNDATHIL *et al.*, 2000 a JASKO *et al.*, 1990). V ejakulátu zdravého a normálně plodného hřebce se vyskytuje přibližně 4 % primárních a kolem 20 % sekundárních změn (GAMČÍK, KOZUMPLÍK *et al.* 1984).

#### **2.4.6. Motilita spermií**

Motilita neboli pohyblivost by se měla zjišťovat co nejdříve, protože s přibývajícím časem klesá (MAIR *et al.*, 2013). Fyziologický je přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou (progresivní pohyb) a udává se v procentech. Přímý progresivní pohyb značí plnohodnotnost spermie (MORTIMER, 1997). U spermií se může vyskytnout též nefyziologický pohyb, jako je například pohyb na místě okolo hlavičky, do kruhu, kmitavý, přerušovaný apod. Ve spermatu se objevují též spermie bez pohybu (statické). Dobrý ejakulát obsahuje alespoň 70 % progresivních spermií. U hřebců se vyskytuje častěji aglutinace (ŠŤASTNÝ, ŠŤASTNÁ, 2015). Důležitá není jen samotná motilita, ale i rychlost progresivního pohybu (CUPPS, 1991). Pohyb spermií je nutnou podmínkou pro jejich průnik do vaječné buňky. Je mnoho faktorů, které motilitu spermií ovlivňují. Z endogenních faktorů je to například věk dárce, doba pobytu spermií v nadvarleti, zásoba ATP a další. Z exogenních faktorů pak například viskozita, pH prostředí, teplota apod. (VĚŽNÍK *et al.*, 2004). Jako nej přesnější objektivní metoda hodnocení spermatu se používá počítačová analýza CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), která k hodnocení kvalitativních parametrů (motility) využívá kombinaci mikroskopu, kamery a počítačového softwaru (LOVE, 2012). Analýza spermatu pomocí CASA ukázala, že ejakuláty se spermii s vyšší průměrnou rychlostí mají lepší fertilizační schopnost (BIRKHEAD *et al.*, 2008).

Progresivní pohyb spermií může být při teplotě 22 °C až o 25 % nižší než při teplotě 37 °C. Při nižším pH je snížena motilita, při zvýšeném pH jsou spermie znehybněné. Mimo připouštěcí sezonu klesá motilita a zvyšuje se počet nefyziologických spermií (SAMPER *et al.*, 2007).

### 3. Hypotéza

V současné době je umělá inseminace velmi rozšířenou metodou v reprodukci koní. Ne vždy jsou však výsledky uspokojivé. Na zabřeznutí klisny má vliv četné množství vnitřních a vnějších faktorů. Kromě samotné kvality ejakulátu hřebce se významně uplatňují také další faktory, jako je například správná detekce říje, kvalitní inseminační technik, a mnoho dalších.

Pro zpracování práce byly formulovány následující hypotézy:

- Objektivně zpracované informace o kvalitě spermatu hřebců mohou poskytnout detailní informace o charakteristikách pohybu spermií v ejakulátu jednotlivých hřebců a zároveň tak poskytnout informace o jejich potenciální plodnosti.
- Spermie v ejakulátu jsou rozlišovány podle rychlosti jejich pohybu na rychlé, střední a pomalé. Jen spermie s progresivním pohybem jsou oplození schopné, proto lze předpokládat, že hřebci s vyšším podílem rychlých progresivních spermií v ejakulátu budou dosahovat vyššího počtu zabřezlých klisen, tzn. vyššího procenta plodnosti.
- Jelikož je kvalita spermatu ovlivněna velkým množstvím faktorů, lze předpokládat, že se kvalita spermatu bude lišit mezi jednotlivými hřebci.

## 4. Cíl práce

Kvalita ejakulátu je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících úspěšnou reprodukci. Za přední ukazatel pro posuzování kvality ejakulátů a odhadu potenciální plodnosti je všeobecně považována motilita spermií.

Cílem této práce bude porovnat ejakuláty různých hřebců z hlediska podílu jednotlivých subpopulací spermií, vytvořených podle rychlosti pohybu, a tyto výsledky porovnat s úrovní zabřezávání klisen po inseminaci.

V návaznosti na formulované hypotézy byly stanoveny následující cíle práce:

- Objektivně vyhodnotit motilitu spermií hřebců s využitím metody Computer-Assisted Semen Analysis (CASA).
- Zastoupení jednotlivých subpopulací motilních spermií v ejakulátech hřebců porovnat s úrovní zabřezávání klisen po inseminaci.
- Porovnat jednotlivé hřebce z hlediska procentuálního zastoupení pomalých, středně rychlých a rychlých spermií v ejakulátu.

## **5. Materiál a metodika**

### **5.1. Materiál**

Sledování kvalitativních parametrů ejakulátu bylo provedeno na 12 plemenných hřebcích, kteří byli v majetku Zemského hřebčince Písek. Zastoupení plemen hřebců bylo následující: 4 hřebci plemene královský holandský jezdecký kůň (KWPN), 3 holštýnští hřebci, shagya-arab, starokladrubský kůň, českomoravský belgický kůň, norický kůň a welsh part-bred. Věk hřebců se pohyboval v rozmezí 3 až 21 let. Všichni hřebci byli využíváni v inseminaci čerstvým spermatem. Od hřebců byl odebírán ejakulát a následně byl zpracován formou krátkodobě konzervovaných inseminačních dávek čerstvého zchlazeného spermatu.

### **5.2. Metodika**

Vzorky byly získány během připouštěcí sezóny 2018 (leden až červenec). Od hřebců bylo v osmi odběrových termínech (leden 11, únor 9, duben 9, květen 17, červen 19 a červenec 10 vzorků spermatu) získáno celkem 75 vzorků ejakulátu. U odebraných vzorků byly sledovány parametry motility spermii. Vzorky ejakulátů byly získávány za běžného provozu reprodukčního centra a prioritou bylo zajištění potřebného množství ejakulátu pro výrobu inseminačních dávek, které byly následně distribuovány chovatelům.

Vlastní odběry ejakulátu probíhaly v prostorách Zemského hřebčince v Písku. Hřebci byli odebíráni na fantomu za přítomnosti klisny. Sperma bylo odebíráno do uzavřené umělé vagíny typu Colorado. Bezprostředně po odběru hřebce byl odebraný ejakulát přefiltrován přes sterilní gázu a následně byl stanoven objem ejakulátu v kalibrované kádince, temperované na teplotu 37 °C. Poté bylo sperma naředěno předeřátým ředidlem (37 °C) (INRA 96) v poměru 1:1-2. Vzorky ejakulátů byly po naředění 20 minut ekvilibrovány při pokojové teplotě bez přístupu světla a následně byly umístěny do chladničky, kde byly zchlazeny na 5 °C. Takto zchlazené vzorky ejakulátu byly převezeny do laboratoře ZF JU v Českých Budějovicích, kde byly vyhodnoceny parametry motility pomocí objektivní metody CASA (počítačové analýzy spermatu) za použití komerčního systému SCA (Sperm Class Analyzer, Microptic SL, Barcelona, Španělsko). Součástí tohoto systému je optický mikroskop s fázovým kontrastem a

vyhříváním stolcem (37 °C), digitální kamera zabudovaná v mikroskopu pro zachycení obrazů a jejich přenosu do počítače.

Motilita spermií byla stanovena prostřednictvím modulu Sperm Class Analyzer® Motility and concentration. Tento modul pro automatickou analýzu motility a koncentrace spermií je založen na analýze 16 na sebe navazujících digitalizovaných fotografických snímků získaných z jednoho pole. Těchto 16 po sobě jdoucích fotografií je pořízeno s odstupem 0,64 s, což znamená rychlost snímání obrazu jedné fotografie každých 40 ms. Spermie jsou detekovány automaticky. Vzorky jsou analyzovány pod negativním fázovým kontrastem (Ph-) a 10x objektivem (100x zvětšení) se zeleným filtrem. Pro analýzu byly vzorky ředěny na koncentraci 30-50x10<sup>6</sup>/ml. Předehřáté Leja podložní sklíčko (4komorové, hloubka 20 mikronů) bylo naplněno 3 µl naředěného spermatu a bylo hodnoceno 10 zorných polí, přičemž v jednom zorném poli bylo analyzováno cca 100-200 spermií. Na základě křivočaré rychlosti (curvilinear velocity, VCL) byly spermie rozlišeny podle rychlosti pohybu na rychlé (> 90 µm/s), středně rychlé (45 – 90 µm/s), pomalé (10 – 45 µm/s) a statické (< 10 µm/s). Spermie byly považovány za progresivní při nejméně 75 % přímosti (straightness, STR). U vzorků spermatu byly měřeny následující hodnoty - MOT (celková motilita, %), PMOT (progresivní motilita, %), RAP\_MOT (rychlé spermie, %), MED\_MOT (středně rychlé spermie, %), SLOW\_MOT (pomalé spermie, %), RAP\_PMOT (rychlé progresivní spermie, %), MED\_PMOT (středně rychlé progresivní spermie, %).

### **5.3. Zpracování dat**

Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu Statsoft Statistica 12 CZ. Rozdíly mezi hřebci v jednotlivých parametrech motility byly analyzovány pomocí jednofaktorové ANOVY, využitím Tukeyova testu. Závislost mezi parametry motility spermií a zabřezáváním klisen byla hodnocena pomocí korelační a regresní analýzy. Statistická průkaznost byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$ .



Pro vyjádření základních statistických charakteristik byly použity následující symboly:

- $n$  – četnost souboru
- $\bar{x}$  - výběrový průměr
- $S_x$  – směrodatná odchylka
- $V_x$  – variační koeficient
- Min – minimální hodnota
- Max – maximální hodnota

## 6. Výsledky a diskuze

### 6.1. Hodnocení sledovaných ukazatelů ejakulátu hřebců

Zpracováno bylo celkem 75 vzorků ejakulátu od 12 hřebců, kteří byli zařazeni do inseminace čerstvým spermatem pro připouštěcí sezonu 2018. Věk hřebců se pohyboval v rozmezí 3–21 let, přičemž průměrný věk hřebců byl 9,32.

Z tabulky 1 vyplývá, že plodnost se u zkoumaných vzorků pohybovala mezi hodnotami 30,00–74,03 %, přičemž průměrná plodnost byla 56,19 %. Dle VARNERA, (2008) by měla plodnost dosahovat 75 %. Ani jeden ze zkoumaných vzorků tuto hranici nespĺňuje. Celková motilita spermií se pohybovala v rozmezí 30,30–99,98 % s průměrem 78,07 %. LOVE, (2012) uvádí, že celková motilita by měla dosahovat alespoň 65 %. U zkoumaných vzorků byla tato hodnota v průměru vyšší, než je požadované minimum. Celková progresivní motilita měla rozmezí 2,67–77,55 %, s průměrnou hodnotou 38,35 %. Doporučená minimální hodnota celkové progresivní motility je dle LOVE, (2012) minimálně 45 %. Dle GAMČÍKA A KOZUMPLÍKA *et al.*, (1984) by měla být tato hodnota minimálně 60 %, protože je v kladné korelaci s plodností. Této hodnoty průměr zkoumaných vzorků nedosáhl. Zastoupení rychlých spermií se pohybovalo mezi 1,54–71,69 %, průměr byl 27,30 %. U středně rychlých spermií bylo zjištěno rozmezí 4,29–45,10 % a průměrná hodnota 21,27 %. Rozmezí pomalých spermií se pohybovalo mezi 6,73–54,55 %, průměr byl 29,50 %. Dále byla zjištěna rychlá progresivní motilita, a to 0,40–42,11 % s průměrnou hodnotou 13,43 %. Středně rychlá progresivní motilita byla 2,15–50,13 %, průměr 24,92 %. Poslední zjištěnou hodnotou bylo procento neprogresivních spermií, a to 15,42–66,47 %, průměr 39,72 %.

ŠIMONÍK *et al.* (2015) potvrzují, že ejakulát se skládá z heterogenních populací spermií – pomalých, středních a rychlých spermií.

**Tabulka 1: Základní sledované ukazatele ejakulátu hřebců**

	Počet vzorků	Průměr	Minimum	Maximum	Rozptyl	Směrodatná odchylka
<b>Plodnost</b>	75,00	56,19	30,00	74,03	102,24	10,11
<b>MOT</b>	75,00	78,07	30,30	99,98	263,96	16,25
<b>PMOT</b>	75,00	38,35	2,67	77,55	312,34	17,67
<b>RAP_MOT</b>	75,00	27,30	1,54	71,69	277,75	16,67
<b>MED_MOT</b>	75,00	21,27	4,29	45,10	73,58	8,58
<b>SLOW_MOT</b>	75,00	29,50	6,73	54,55	116,30	10,78
<b>RAP_PMOT</b>	75,00	13,43	0,40	42,11	79,95	8,94
<b>MED_PMOT</b>	75,00	24,92	2,15	50,13	123,12	11,10
<b>NONP</b>	75,00	39,72	15,42	66,47	141,11	11,88

Zkratky: MOT – celková motilita; PMOT – progresivní motilita; RAP\_MOT – rychlé spermie; MED\_MOT – středně rychlé spermie; SLOW\_MOT – pomalé spermie; RAP\_PMOT – rychlé progresivní spermie; MED\_PMOT – středně rychle progresivní spermie; NONP – neprogresivní spermie

## 6.2. Hodnocení vztahu plodnosti a rychlostních frakcí spermií

U sledovaných vzorků byl dále vyhodnocen pomocí korelační analýzy vztah mezi plodností a procentuálním zastoupením jednotlivých rychlostních frakcí spermií, a též vliv věku na procentuální zastoupení jednotlivých rychlostních frakcí spermií.

Z výsledků uvedených v tabulce 2 je patrné, že byla určena statisticky významná kladná korelace mezi plodností a rychle se pohybujícími spermii. Korelační koeficient mezi plodností a rychlými spermii se rovnal 0,34, což dokazuje hypotézu, že nejvyšší plodnost byla zjištěna u hřebců s největším podílem rychlých spermií v ejakulátu. Naopak statisticky významná záporná korelace byla zjištěna mezi plodností a pomalými spermii. Tento korelační koeficient byl -0,25. To znamená, že plodnost byla nejhorší u hřebců s největším zastoupením pomalých spermií v ejakulátu. U progresivní motility vyšel korelační koeficient 0,32, tudíž je statisticky prokázáno, že plodnost není závislá jen na rychlosti, ale též na progresi. Z hodnot progresivní motility vyšel nejvyšší korelační koeficient u středně rychle progresivních spermií, a to 0,29.

Vztah mezi pomalými, středními a rychlými subpopulacemi spermií a fertilitou in vivo je nejasný, nicméně v práci GIBB *et al.* (2014) je zdůrazněn

pozitivní vztah rychle se pohybujících spermií a plodností klisen. Také JASKO *et al.* (1990) zjistili významnou korelaci mezi parametry motility a plodností. Ve své studii uvedli, že u progresivní motility spermií se střední rychlostí bylo zjištěno větší procento zabřezávání. Dle NEWCOMBA, (1999) se snížilo zabřeznutí po inseminaci při použití spermatu s nízkou motilitou. VOSS, (1981) tvrdí, že ačkoli je vztah mezi motilitou a plodností u hřebců špatný, pohyblivost spermií a kvalita pohybu spermií jsou stále nejspolehlivějšími odhady v praxi.

Mezi věkem a procentuálním zastoupením jednotlivých rychlostních frakcí spermií vyšel statisticky významný záporný korelační koeficient u rychlých progresivních spermií, a to -0,26. Tím bylo statisticky prokázáno, že se zvyšujícím se věkem hřebců se snižuje množství rychlých progresivních spermií v ejakulátu.

**Tabulka 2: Korelace mezi jednotlivými sledovanými ukazateli ( $p < 0,05$ )**

	Průměry	Sm.odch.	Plodnost	MOT	PMOT	RAP_MOT	MED_MOT	SLOW_MOT	RAP_PMOT	MED_PMOT	NONP	Věk
Plodnost	56,19	10,11	1,00	0,20	0,32	0,34	0,03	-0,25	0,27	0,29	-0,20	0,08
MOT	78,07	16,25	0,20	1,00	0,76	0,69	0,64	-0,06	0,53	0,78	0,24	-0,17
PMOT	38,35	17,67	0,32	0,76	1,00	0,94	0,40	-0,63	0,85	0,91	-0,45	-0,19
RAP_MOT	27,30	16,67	0,34	0,69	0,94	1,00	0,18	-0,65	0,84	0,82	-0,46	-0,20
MED_MOT	21,27	8,58	0,03	0,64	0,40	0,18	1,00	-0,11	0,05	0,60	0,28	0,02
SLOW_MOT	29,50	10,78	-0,25	-0,06	-0,63	-0,65	-0,11	1,00	-0,55	-0,57	0,85	0,04
RAP_PMOT	13,43	8,94	0,27	0,53	0,85	0,84	0,05	-0,55	1,00	0,55	-0,55	-0,26
MED_PMOT.	24,92	11,10	0,29	0,78	0,91	0,82	0,60	-0,57	0,55	1,00	-0,28	-0,10
NONP	39,72	11,88	-0,20	0,24	-0,45	-0,46	0,28	0,85	-0,55	-0,28	1,00	0,05
Věk	9,32	5,99	0,08	-0,17	-0,19	-0,20	0,02	0,04	-0,26	-0,10	0,05	1,00

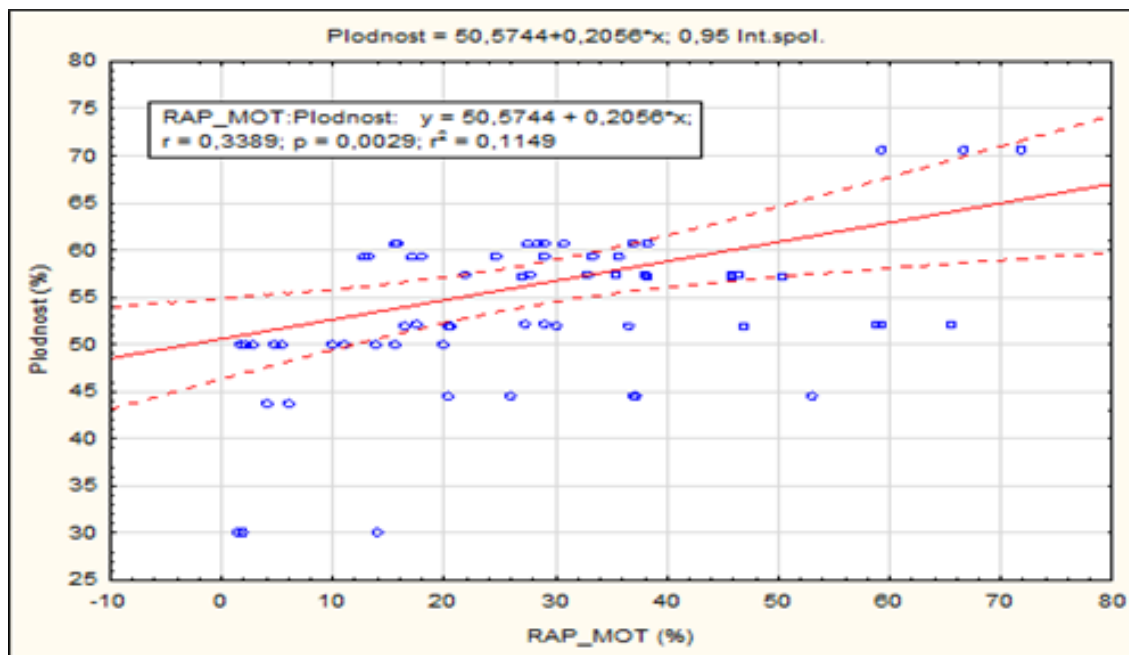
*Pozn.: červeně zvýrazněné korelační koeficienty jsou průkazné ( $p < 0,05$ )*

Další podrobné hodnocení se týká rychlých spermií, jelikož se prokázala nejvyšší míra závislosti mezi touto proměnnou a plodností. Nejprve byla tato závislost hodnocena regresní analýzou, jejíž výsledek je v Grafu 1. Regresní rovnice, charakterizující přímku v grafu 1, má tvar:

$$\text{Plodnost (\%)} = 50,57 + 0,21 * \text{RAP\_MOT}$$

Tato rovnice vysvětluje pouze 11 % variability závisle proměnné. Vyplývá z ní, že pokud se zvýší podíl rychlých spermií o 5 %, tak plodnost stoupne o 1 %.

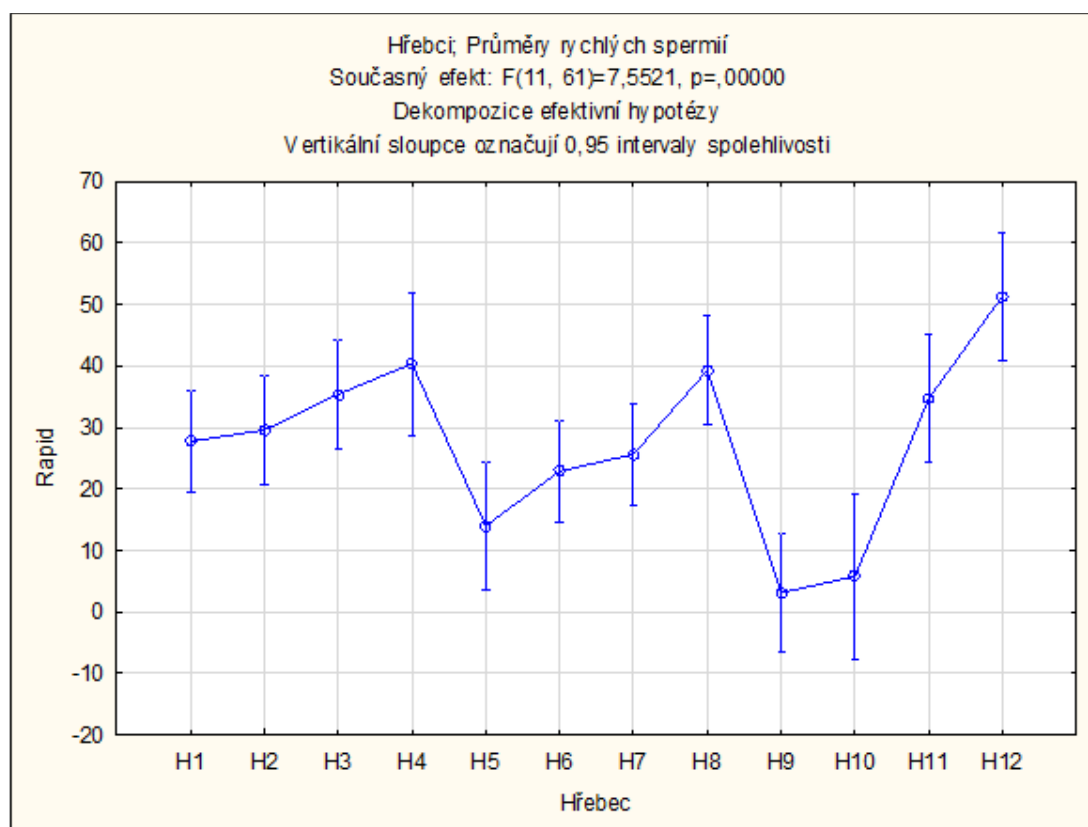
Graf 1: Graf přímky popisující závislost plodnosti na podílu rychlých spermií v ejakulátu



### 6.3. Porovnání podílu rychlých spermií u jednotlivých hřebců

Pomocí jednofaktorové anovy byla hodnocena otázka rozdílnosti jednotlivých hřebců z hlediska podílu rychlých spermií v ejakulátu. Na hladině spolehlivosti 0,05 byla zamítnuta nulová hypotéza, že se jednotliví hřebci mezi sebou neliší. Z grafu č. 2 je patrný rozdíl mezi průměrným procentuálním zastoupením rychlých spermií u sledovaných jedinců, který je statisticky průkazný (p-hodnota < 0,01). To, že byly mezi jednotlivými hřebci významné rozdíly, může být způsobeno mnoha faktory. Nejvíce rychlých spermií v ejakulátu měl hřebec welsh part-bred, naopak nejméně rychlých spermií bylo ve vzorku hřebců číslo 9 (KWPN) a 10 (norik).

Graf 2: Průměrné zastoupení rychlých spermií v ejakulátu jednotlivých hřebců



V tabulce č. 3 je zobrazen výsledek mnohonásobného porovnání procenta rychlých spermií u jednotlivých hřebců. Nejvíce rychlých spermií, a to 51,36 %, měl hřelec welsh part-bred a průkazně nejvýrazněji se lišil od norického hřebce (5,82 %) a hřebce KWPN číslo 9 (3,14 %). Tito dva hřebci vykazovali nejmenší zastoupení rychlých spermií ve vzorku. DOWSETT a KNOTT, (1996) uvádí, že jedním z faktorů, ovlivňující rozdíly v množství i kvalitě ejakulátu, je věk a plemeno hřebce. Například zjistili, že chladnokrevní hřebci mají sice větší počet spermií v ejakulátu, ale nižší motilitu spermií než teplokrevní hřebci. Že mají chladnokrevní hřebci menší procento progresivně motilních spermií potvrzuje i STOUT a COLENBRANDER, (2011). Též PARLEVLIE *et al.*, (1994) tvrdí, že je průkazný rozdíl mezi vlastnostmi ejakulátu tažných a jezdeckých typů hřebců. Toto bylo potvrzeno i v této práci. Jedno z nejnižších procent rychlých spermií měl norický hřelec číslo 10. DOWSETT a PATTIE, (1982) ve své práci zmiňují, že pony hřebci mají nejhorší reprodukční vlastnosti ejakulátu. Tato práce došla k opačnému výsledku. Nejvíce rychlých spermií měl ve vzorku hřelec welsh part-bred. Tento hřelec měl i druhé nejvyšší procento březosti.

**Tabulka 3: Mnohonásobné porovnání jednotlivých hřebců z hlediska procenta rychlých spermií**

HSD při nestejných N; proměnná Rapid Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 135,57, sv = 61,000													
Č. buňky	Hřelec	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
		(27,73)	(29,58)	(35,40)	(40,35)	(14,02)	(22,88)	(25,66)	(39,27)	(3,14)	(5,82)	(34,65)	(51,36)
1	H1		1,00	0,98	0,92	0,78	1,00	1,00	0,78	0,02	0,49	1,00	0,08
2	H2	1,00		1,00	0,97	0,62	0,99	1,00	0,92	0,01	0,36	1,00	0,15
3	H3	0,98	1,00		1,00	0,17	0,68	0,91	1,00	0,00	0,10	1,00	0,58
4	H4	0,92	0,97	1,00		0,08	0,61	0,82	1,00	0,00	0,03	1,00	0,97
5	H5	0,78	0,62	0,17	0,08		0,99	0,91	0,05	0,94	1,00	0,21	0,00
6	H6	1,00	0,99	0,68	0,61	0,99		1,00	0,29	0,15	0,81	0,90	0,01
7	H7	1,00	1,00	0,91	0,82	0,91	1,00		0,57	0,06	0,63	0,99	0,04
8	H8	0,78	0,92	1,00	1,00	0,05	0,29	0,57		0,00	0,04	1,00	0,89
9	H9	0,02	0,01	0,00	0,00	0,94	0,15	0,06	0,00		1,00	0,00	0,00
10	H10	0,49	0,36	0,10	0,03	1,00	0,81	0,63	0,04	1,00		0,12	0,00
11	H11	1,00	1,00	1,00	1,00	0,21	0,90	0,99	1,00	0,00	0,12		0,51
12	H12	0,08	0,15	0,58	0,97	0,00	0,01	0,04	0,89	0,00	0,00	0,51	

ROUSSET *et al.*, (1986) ve své práci potvrzuje nejen průkazný vliv plemene na vlastnosti ejakulátu, ale navíc uvádí průkazný rozdíl i mezi jednotlivými hřebci v rámci jednoho plemene, což se potvrdilo i v této práci. Dle výzkumu GOTTSCHALK *et al.*, (2016) vykazují angloarabští hřebci nejvyšší počet progresivních spermií ze všech zkoumaných teplokrevných i chladnokrevných plemen a co se týče věku, největší procento progresivních spermií se nacházelo u teplokrevných hřebců mezi 3 – 6 roky a u chladnokrevných hřebců mezi 7 – 18 roky. Tyto údaje potvrzuje též AMANN *et al.*, (1987), naopak je vyvrací DOWSETT a KNOTT, (1996), kteří udávají, že od 10. roku klesá kvalita ejakulátu hřebců. Z toho je patrné, že věk a plemeno hřebce má velký vliv na kvalitu ejakulátu. Dalším z mnoha faktorů ovlivňujících kvalitu ejakulátu je správná funkčnost a velikost varlat nebo genetické založení jedince. Jako příklad uvádí GOTTSCHALK *et al.*, (2016) rýnského chladnokrevníka, pro kterého je typická nižší progresivní motilita. Kvalitu ejakulátu ovlivňuje dále roční období, správný odběr a manipulace s ejakulátem po odběru a frekvence odběrů. Dle JANETT *et al.*, (2003) bylo největší procento motility u hřebců zjištěno v zimě, na jaře a na podzim, nejnižší pak v létě. LOUDA *et al.* (2001) doplňuje, že kvalita ejakulátu se snižuje s prodlužující se dobou po odběru. Dochází k degeneraci spermií, při které se snižuje rychlost přímočarého pohybu. Frekvenci odběrů doporučují autoři PICKETT *et al.*, (1989) a SIEME *et al.*, (2004) jednou za dva dny. Při této frekvenci byla prokázána lepší kvalita ejakulátu než při každodenním odběru. Druhé nejvyšší zastoupení rychlých spermií měl hřelec plemene shagya-arab (40,35 %), následován

hřebcem č. 8 plemene KWPN s 39,27 %, kteří se také průkazně lišili od hřebců č. 10 (norik) a 9 (KWPN).

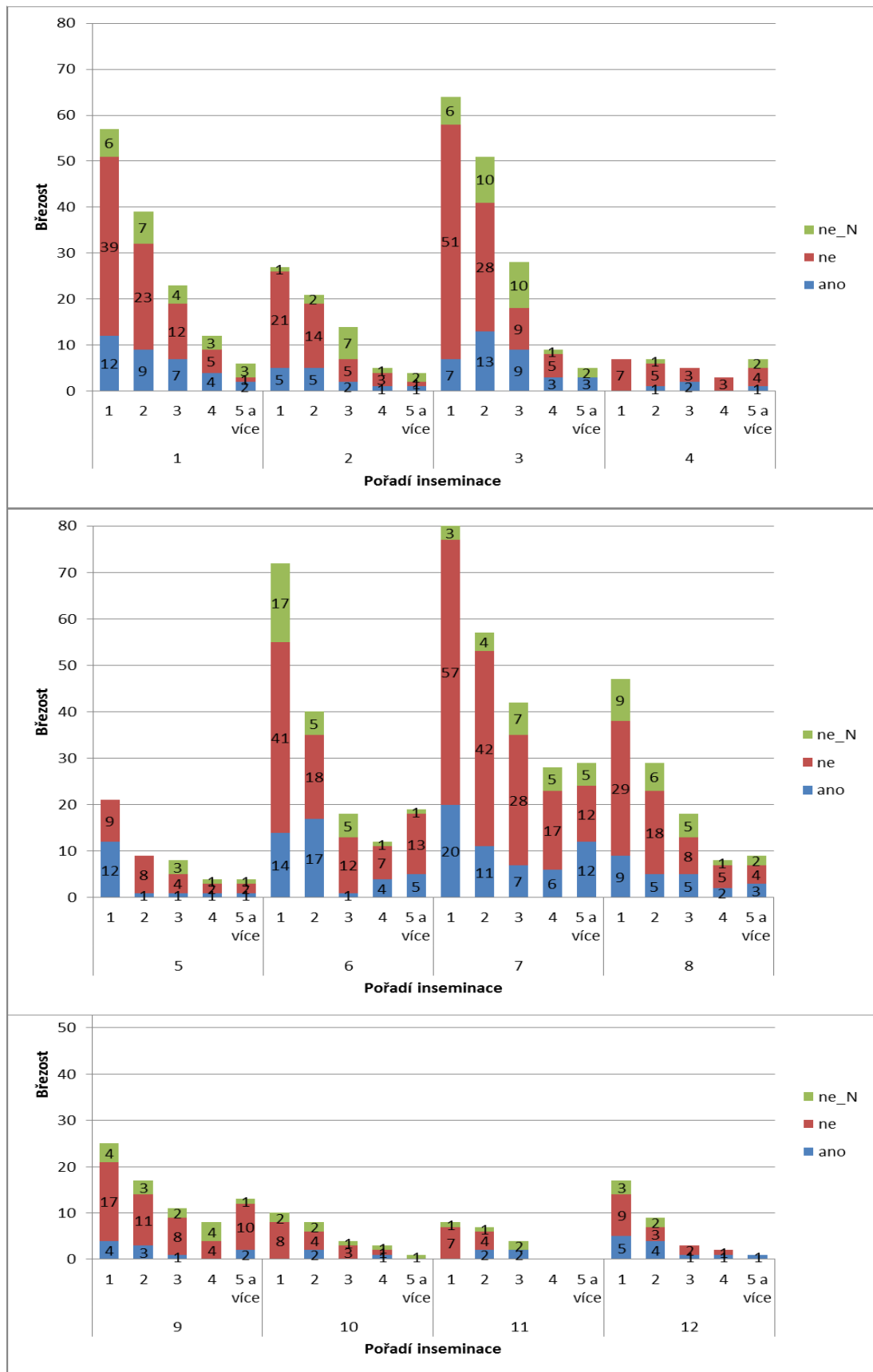
#### **6.4. Hodnocení inseminačního indexu jednotlivých hřebců**

Následující podkapitola se zabývá výsledky zabřezávání klisen. Bylo vyhodnoceno procento zabřezlých klisen po jednotlivých hřebcích a inseminační index. Dále bylo sledováno, který hřelec měl nejvíce inseminovaných klisen a ve kterém měsíci skončili chovatelé klisen s připouštěním.

Z následujícího grafu č. 3 je patrné, že mezi nejvíce vytížené hřebce patřili hřebci plemene KWPN. Hřebcem číslo 7 (KWPN) bylo inseminováno celkem 80 klisen a hřebcem číslo 6 (KWPN) 72 klisen. Naopak mezi nejméně žádané hřebce patřil hřelec plemene shagya-arab a ČMB. Hřebcem plemene shagya-arab bylo inseminováno pouze 7 klisen a hřebcem plemene ČMB 8 klisen. Zajímavým údajem, který lze zjistit z těchto grafů, je to, kolik chovatelů využilo po neúspěšné inseminaci další možnost připouštění. Například při porovnání KWPN hřebců číslo 7 a 6 bylo zjištěno, že u hřebce číslo 6 vzdalo následnou inseminaci 24 % chovatelů, zatímco u hřebce číslo 7 skončili s inseminacemi po prvním nevydařeném pokusu pouze 4 % chovatelů. Jedním z možných důvodů může být skutečnost, že inseminační dávka hřebce číslo 7 je dražší v porovnání s ostatními hřebci. Poplatek za další inseminační dávky je tak zanedbatelný a z ekonomického hlediska se chovateli vyplatí udělat maximum pro úspěšné zabřeznutí. Dalším pravděpodobným důvodem ukončení inseminace po neúspěšném pokusu by mohl být i konec připouštěcí sezony.



**Graf 3: Počty inseminovaných klisen po jednotlivých hřebcích (ano = zabřezla, ne = nezabřezla a byla opět inseminována, ne\_N = nezabřezla a další inseminace neproběhla)**



V tabulce číslo 4 je zaznamenáno procento březích klisen po 1., 2. a 3. inseminaci. Jak je možné vidět v tabulce, nejhorší průměrná březost byla po první inseminaci (14 %). Nejvyšší procento březích klisen bylo po druhé inseminaci (24 %). Z jednotlivých hřebců měl nejvyšší procento březosti hřebec welsh part-bred (29 %). Nejhůře dopadli hřebci plemene shagya-arab, norik a českomoravský belgik. Ti měli procento březích klisen po první inseminaci 0 %. Jak už bylo napsáno výše, hřebec plemene welsh part-bred měl nejvyšší procento rychlých a nejmenší procento pomalých spermií v ejakulátu. Naopak norický hřebec patřil mezi hřebce s nejnižším procentem rychlých spermií a s nejvyšším procentem pomalých spermií. Tyto údaje znovu potvrzují kladnou korelaci mezi zastoupením rychlých spermií v ejakulátu a plodností.

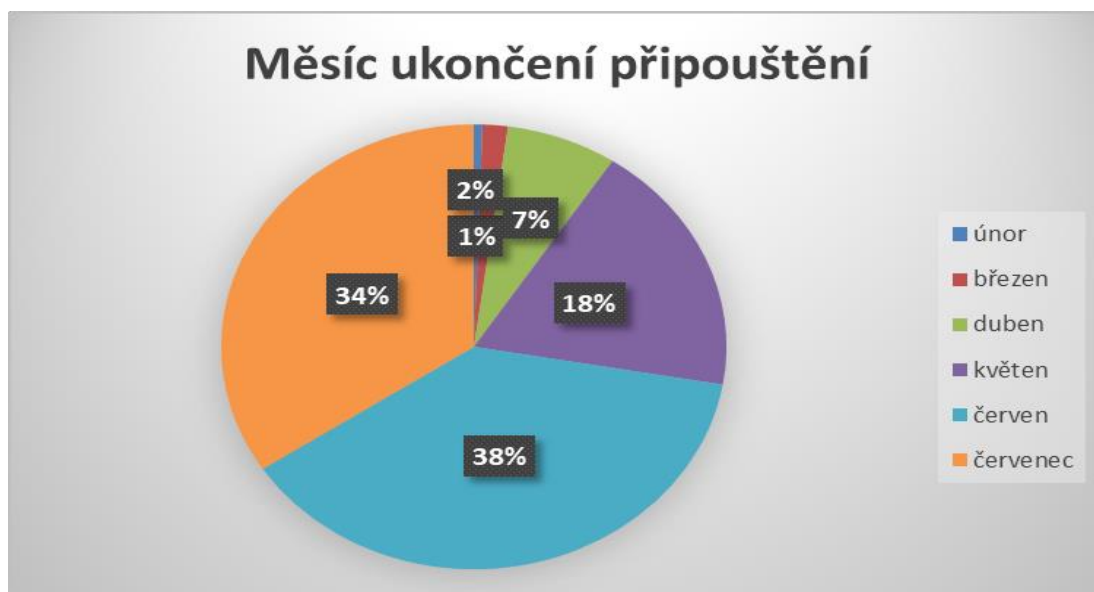
Ovšem jak už bylo řečeno, dobré zabřeznutí ovlivňuje mnoho vnitřních i vnějších faktorů, ne vždy je chyba na straně hřebce. Vliv na zabřeznutí může mít například doba mezi odběrem a vlastní inseminací. GAMČÍK A KOZUMPLÍK *et al.* (1984) doporučují, aby bylo naředěné sperma použito do 30 minut od jeho získání. To znamená, že výsledná plodnost a parametry ejakulátu mohou být negativně ovlivněny přepravou na delší vzdálenosti. Důležitý faktor, ovlivňující dobré zabřeznutí, je sám chovatel. Ten by měl zajistit správnou detekci říje, kvalitní krmení a péči o klisnu a v neposlední řadě zamezit nadměrnému stresu klisny. ŠTRUPL *et. al* (1983) uvádí, že je velmi důležité zajistit klisně dostatek bílkovin, vitamínů a minerálních látek. Dle KUDLÁČE (1995) je asi 30 % jalovosti zaviněno lidským faktorem. V neposlední řadě březost ovlivňuje též kvalifikovanost inseminačního technika.

**Tabulka 4: Procento březosti po 1., 2. a 3. inseminaci**

Hřebec	podíl zabřelých (%)		
	Inseminace		
	1.	2.	3.
1	21	23	30
2	19	24	14
3	11	25	32
4	0	14	40
5	10	11	13
6	19	43	6
7	25	19	17
8	19	17	28
9	16	18	9
10	0	25	0
11	0	29	50
12	29	44	33
<b>Průměr</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>23</b>

Na grafu číslo 4 je zobrazeno, v jakém měsíci ukončili chovatelé zapouštění po neúspěšné inseminaci. Je patrné, že 38 % chovatelů přestalo zapouštět svojí klisnu v červnu a 18 % chovatelů v květnu. Z toho se lze vyvodit závěr, že důvodem pro skončení zapouštění nebyl konec připouštěcí sezony, což je konec července, ale rozhodnutí chovatelů. Z toho vyplývá, že jedním z důležitých faktorů, ovlivňujících úspěšné zabřeznutí, je sám chovatel.

**Graf 4: Měsíc ukončení připouštění**



## 7. Závěr

Cílem této práce bylo porovnat ejakuláty různých hřebců z hlediska podílu jednotlivých frakcí spermií, vytvořených podle rychlosti pohybu spermií, a tyto výsledky porovnat s úrovní zabřezávání klisen po inseminaci. Objektivní metodou CASA bylo zhodnoceno 75 vzorků ejakulátu od 12 hřebců ze Zemského hřebčince v Písku, kteří byli v připouštěcí sezóně 2018 zařazeni do inseminace čerstvým spermatem.

V rámci objektivního hodnocení sledovaných ukazatelů byly zjištěny následující hodnoty. Celková motilita spermií se pohybovala v rozmezí 30,30–99,98 % (průměr 78,07 %). Doporučená hranice je alespoň 65 % motilních spermií a ta byla u zkoumaných vzorků v průměru vyšší. Progresivní motilita byla 2,67–77,55 % (průměr 38,35 %). Minimální doporučený podíl progresivně motilních spermií je 45 %. Této hodnoty průměr zkoumaných vzorků nedosáhl. Z pohledu jednotlivých rychlostních frakcí byl ve sledovaných vzorcích největší průměrný podíl pomalých spermií (29,50 %), následoval průměrný podíl rychlých spermií (27,30 %) a nakonec průměrný podíl středně rychlých spermií (21,27 %). Co se týče jednotlivých rychlostních frakcí u progresivní motility, největší průměrné procentuální zastoupení měly neprogresivní spermie (39,72 %), následovalo průměrné zastoupení středně rychlých progresivních spermií (24,92 %) a nejmenší procentuální podíl měly rychlé progresivní spermie (13,43 %). Plodnost se pohybovala mezi hodnotami 30,00–74,03 % (průměr 56,19 %). Z tohoto údaje vyplývá, že plodnost u zkoumaných hřebců byla nízká a ani v jednom případě nebyla překročena doporučená hranice 75 %.

Byla prokázána kladná korelace ( $r=0,34$ ) mezi plodností a podílem rychlých spermií v ejakulátech hřebců. To znamená, že nejvyšší plodnost byla zjištěna u hřebců s největším podílem rychlých spermií v ejakulátu. Pro úspěšné zabřeznutí klisny je proto nejvýznamnějším parametrem procento rychlých spermií v ejakulátu.

Dále byl prokázán významný vliv hřebce. Z jednotlivých hřebců měl nejvyšší podíl rychlých spermií plemník welsh part-bred (51,36 %). Tento jedinec měl i nejvyšší procento březích klisen po první inseminaci (29 %). Nejméně rychlých spermií měl plemník KWPN (3,14 %). Procento březích klisen po první inseminaci

u tohoto hřebce bylo 16 %. Nejvíce klisen zabřezlo po 2. inseminaci, a to 24 % v porovnání s 1. a 3. inseminací, při kterých bylo dosaženo v průměru 14 % a 23 %. Mezi nejvíce vytížené hřebce patřil plemník KWPN s počtem 80 inseminovaných klisen. Naopak nejméně žádaný byl hřebec plemene shagya-arab s počtem 7 inseminovaných klisen za připouštěcí sezonu. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že mnoho chovatelů ukončilo zapouštění po první neúspěšné inseminaci. Například u jednoho z hřebců plemene KWPN vzdalo další inseminace 24 % chovatelů. Nejvyšší procento ukončení připouštění bylo v červnu, důvodem tedy nebyl konec připouštěcí sezony, ale rozhodnutí chovatelů.

Na základě zjištěných výsledků lze doporučit, že ejakuláty jednotlivých hřebců by měly být pravidelně vyšetřovány z hlediska jejich kvality. Hřebci s nízkým procentem motilních spermií by z inseminace měli být vyřazeni, případně by daná situace měla být řešena. Úspěšné zabřeznutí klisny je však kromě kvality ejakulátu ovlivněno mnoha dalšími faktory. V tomto směru je velmi významná činnost chovatele.

## 8. Seznam literatury

- AMANN, R., THOMPSON, JR., SQUIRES, E., PICKETT, B.: *Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions*. J Reprod Fertil Suppl 27, 1–6, 1978.
- AURICH, C.: *Recent advantages in cooled-semen technology*. Animal Reproduction Science 107, 268–275, 2008.
- BARTH, A., OKO, R.: *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989, 285 s.
- BIRKHEAD, T. R., HOSKEN, D. J., PITNICK, S.: *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic Press, 2008.
- BRINSKO, S.P., ROWAN, K.R., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L.: *Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa*. Theriogenology 53, 1641–1655, 1999.
- CIBULKA, J., FUČÍKOVÁ, A., HÄRTLOVÁ, H., JÍLEK, F., LÁNSKÁ, V., SEDMÍKOVÁ, M.: *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. 2004. ISBN 80-213-1247-5, 200 s.
- CONTRI, A., GLORIA, A., ROBBE, D., VALORZ, C., WEGHER, L., CARLUCCIO, A.: *Kinematic study on the effect of pH on bullspermfunction*. Anim. Reprod. Sci., 136, 252-259, 2013.
- CUPPS, P. T.: *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, 4th Edit., 1991. ISBN 0-12-196575-9, 670 s.
- DINGER, J. E., NOILES, E. E.: *Prediction of daily sperm output in stallions*. Theriogenology 26, 61–67, 1986.
- DOWSETT, K., KNOTT, L. M.: *The influence of age and breed on stallion semen*. Theriogenology 46, 397–412, 1996.
- DOWSETT, K., PATTIE, W.: *Characteristics and fertility of stallion semen*. J Reprod Fertil Suppl 32, 1–8, 1982.
- DUŠEK, J. et al.: *Chov koní*. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha, 2007. ISBN 978-80-209-0388-4, 398 s.
- FLADE, J. E et al.: *Chov a športové využitie koní*. Bratislava: Příroda, vydavateľstvo kníh a časopisů, 1990. ISBN 80-07-00252-9, 451 s.

- GAMBOA, S., RODRIGUES, A.S., HENRIQUES, L., BATISTA, C., RAMALHO-SANTOS, J.: *Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa*. Acta Vet Scand. 48, 14, 2006.
- GAMČÍK, P., KOZUMPLÍK, J.: *Andrólogia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava, 1984. 344 s.
- GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., AITKEN, R. J.: *The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress*. Biology of Reproduction 91, 1-10, 2014.
- GOTTSCHALK, M., SIEME, H., MARTINSSON, G., DISTL, O.: *Analysis of breed effects on semen traits in light horse, warmblood, and draught horse breeds*. Theriogenology 85, 1375–1381, 2016.
- JANETT, F., THUN, R., BETTSCHEN, S., BURGER, D., HASSIG, M.: *Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions*. Anim Reprod Sci 77, 213–221, 2003.
- JASKO, D. J., LEIN, D. H., FOOTE, R. H.: *Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases*. Journal of the American Veterinary Medical Association 197, 389–394, 1990.
- JELÍNEK, P., KOUDELA, K. et al.: *Fyziologie hospodárskych zvierat*. MZLU Brno, Brno, 2003. ISBN 80 – 7157 – 644 – 1, 275 s.
- JOHANSSON, C. S., MATSSON, F. C., LEHN-JENSEN, H., NIELSEN, J. M., PETERSEN, M. M.: *Equine spermatozoa viability comparing the Nucleo Counter SP-100 and the eosin-nigrosin stain*. Animal Reproduction Science 107, 325–326, 2008.
- JOHNSON, L., BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D. et al.: *Factors affecting spermatogenesis in the stallion*. Theriogenology 48, 1199–1216, 1997.
- KLIMENT, J. et al.: *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Príroda Bratislava, 1983. ISBN 80–07–00027–5, 378 s.
- KOMÁREK, V. et al.: *Anatomie a fyziologie hospodárskych zvierat*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha, 1. vyd., 1964, 387 s.
- KUDLÁČ, E.: *Pohlavní činnost u klisen a její ovlivňování*. Reprodukce koní, sborník referátů III. výroční konference ČHS, 1–5, 1995.
- KUSTER, C.E., SINGER, R.S., ALTHOUSE, G.C.: *Determining sample size for the morphological assessment of sperm*. Theriogenology 61, 691-703, 2004.

- LOUDA, F. et al.: *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU v Praze, 2001. ISBN 80-213-0702-1, 225 s.
- LOVE, C. C.: *Measurement of concentration and viability in stallion sperm*. Journal of Equine Veterinary Science 32, 464-466, 2012.
- MAIR, T. S., LOVE, S., SCHUMACHER, J., SMITH, R. KW, FRAZER, G. S.: *Equine Medicine, Surgery and Reproduction*. Vyd. 2, Saunders Elsevier, 2013. ISBN 978-0-7020-2801-4.
- MALMGREN, L.: *Assessing the quality of raw semen; a review*. Theriogenology 48, 523-530, 1997.
- MAREE, L, van der HORST, G.: *Quantification and identification of sperm subpopulations using computer-aided sperm analysis and species-specific cut-off values for swimming speed*. Biotechnic Histochem 88, 181-93, 2014.
- MARENGO, S. R.: *Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane*. Animal Reproduction Science 105, 52-63, 2007.
- MARVAN, F.: *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 2. Praha: Brázda, 1998. ISBN 80-209-0273-2.
- MORAN, D. M., JASKO, D. J., SQUIRES, E. L., AMANN, R. P.: *Determination of temperature and cool rate induced cold shock in stallion spermatozoa*. Theriogenology 38, 999-1012, 1992.
- MORTIMER, S. T.: *A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals*. Human Reproduction Update 3, 403-439, 1997.
- MÜLLER, Z.: *Nové reprodukční metody v plemenitbě koní*. In: *Chov a šlechtění koní v současných ekonomických podmínkách*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. ISBN 80-7375-006-6, 147 s.
- MUNROE, G. A. a WEESE, J. S.: *Equine Clinical Medicine, Surgery, and Reproduction*. Manson Publishing/The Veterinary Press, 2011. ISBN 978-1-84076-119-1.
- NEWCOMBE, JR.: *Evaluation of the fertilising capacity of frozen-thawed horse semen*. Vet Rec. 145, 46-47, 1999.



- PARKS, J. E., LYNCH, D. V.: *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes*. *Cryobiology* 29, 255–256, 1992.
- PARLEVLIET, J., KEMP, B., COLENBRANDER, B.: *Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions*. *J Reprod Fertil Suppl* 101, 183–187, 1994.
- PICKETT, B., AMANN, R., MCKINNON, A., SQUIRES, E., VOSS, J.: *Frequency of ejaculation*. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, Colorado State University Bulletin: Anim Reprod Lab, Fort Collins, 73–81, 1989.
- POJPRASATH, T., LOHACHIT, C., TECHAKUMPHU, M., STOUT, T., THARASANIT, T.: *Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender*. *Theriogenology*, 75, 1742–1749, 2011.
- POPESKO, P. et al.: *Anatómia hospodárských zvierat*. Príroda, Bratislava, 1992. ISBN 80-07-00542-0, 693 s.
- POWER, J. H.: *A study of canine semen: physical factors which may effect the elektrolyte concentration in the ejaculate*. *Irish Veterinary Journal*, 17, 226–231, 1963.
- PRICE, S., AURICH, J. E., DAVIES-MOREL, M., AURICH, C.: Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 °C. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 261–266, 2008.
- REECE, W. O.: *Fyziologie domácích zvířat*. Grada Publishing, Praha, 1998. ISBN 80 – 7169 - 547 – 5, 449 s.
- ROUSSET, H., CHANTELOUBE, P., MAGISTRINI, M., PALMER, E.: *Assessment of fertility and semen evaluations of stallions*. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 25–31, 1986.
- SAACKE, R.G., DALTON, J.C., NADIR, S., NEBEL, R.L., BAME, J.H.: *Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality*. *Animal Reproduction Science* 60, 663-667, 2000.
- SAMPER, J. C., PYCOCK, J. F., MCKINNON, A. O.: *Current therapy in equine reproduction*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2007. ISBN 978-0-7216-0252-3, 492 s.

- SIELHORST, J., HAGEN, CH., BEHRENDT, D., SCHUETTE, B., BURGER, D., MARTINSSON, G., SIEME, H.: Effect of Multiple Freezing of Stallion Semen on Sperm Quality and Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40, 56–61, 2016.
- SIEME, H., KATILA, T., KLUG, E.: *Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions*. *Theriogenology* 61, 769-784, 2004.
- ŠIMONÍK, O., ŠICHTAŘ, J., KREJCARKOVÁ, A., RAJMON, R., STÁDNÍK, L., BERAN, J., DOLEŽALOVÁ, M., BINIOVÁ, Z.: Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. *Indian Journal of Animal Sciences* 85, 3-11, 2015.
- SPRAYBERRY, K. A. a ROBINSON, N. E.: *Robinson's current therapy in equine medicine*. 7th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-4555-5.
- STOUT, T., COLENBRANDER, B.: *Reproductive parameters of draft horse, friesian and warmblood stallions*. 2nd ed. John Wiley & Sons, United Kingdom, 1362-1366, 2011.
- ŠTRUPL, J. et al.: *Chov koní*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1983. 416 s.
- ŠŤASTNÝ, P. a ŠŤASTNÁ, D.: *Všeobecná reprodukcia zvierat*. Nitra: Nitra, 2015. ISBN 978–80–552–1307–1.
- THOMPSON, D. L., PICKETT, B. W., SQUIRES, E. L., AMANN, R. P.: *Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions*. *Journal of Reproduction and Fertility* 27, 13–17, 1979.
- THUNDATHIL, J., MEYER, R., PALASZ, A. T. et al.: *Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production*. *Theriogenology* 54, 921–934, 2000.
- VAN DER HOLST, W.: A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non breeding season. *J. Reprod. Fertil* 23, 87–89, 1975.
- VARNER, D.D., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., BLANCHARD, T.L., HARTMAN, D.L., BLISS, S.B.: *Semen processing for the subfertile stallion*. *Journal of Equine Veterinary Science* 28, 677–685, 2008.

- VĚŽNÍK, Z. et al.: *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. Brno, 2004. ISBN 80-86895-01-7.
- VOSS, JL, PICKETT, BW, SQUIRES, EL.: *Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility*. J Am Vet Med Assoc. 178, 287–289, 1981.
- Vyhláška č. 380/2003 Sb., o veterinárních požadavcích na obchodování se spermatem, vaječnými buňkami a embryi a o veterinárních podmínkách jejich dovozu ze třetích zemí Příl. 9 B Požadavky na zvířata přijímaná do střediska pro odběr spermatu ovcí, koz nebo koňovitých: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100051181.html>. [cit. 2018-11-16].
- WATSON, P. F.: *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. Animal Reproduction Science 6061, 481–492, 2000.
- YOUNG, W. C.: *A study of the function of the epididymis. III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig*. Journal of Experimental Biology 8, 151–164, 1931.