

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**



**Charakteristika ejakulátu malých přežvýkavců**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Jakub Beránek**

**Obor studia: Živočišná produkce**

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

© ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

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

V Praze dne 20.4.2018

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu své práce Ing. Martinu Ptáčkovi Ph.D. za poskytnutí odborných rad, věcné připomínky, veškerý čas, který mi věnoval, a především za trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, přítelkyni a v neposlední řadě také přátelům a spolužákům za podporu a motivaci při studiu.

## **Souhrn**

Cílem této práce je literární shrnutí poznatků o ejakulátu malých přežvýkavců – beranů a kozlů.

Sperma neboli ejakulát je produkt samčí pohlavní soustavy, složený ze spermií a semenné plazmy. Spermie vznikají během spermatogeneze, ke které dochází ve varlatech. Následně jsou uloženy v nadvarlatech, kde dozrávají. Nejčastější metodou jeho získávání je odběr do umělé vaginy nebo pomocí elektroejakulace, méně častým způsobem odběru je jeho získávání post-mortem.

Makroskopicky u odebraného ejakulátu hodnotíme objem, barvu a cizí příměsi. Mikroskopicky lze hodnotit koncentraci, pH, motilitu a morfologii. Mezi biologické zkoušky řadíme tepelné testy přežitelnosti, zkoušku rezistence, zkoušku odolnosti vůči chladovému šoku a stanovení živých a mrtvých spermií pomocí jejich barvení. Ejakulát lze také vyšetřit pomocí specializovaných metod, jako je počítačová analýza (CASA), hypoosmotický test (HOS), nebo průtoková cytometrie. Na tyto metody je vhodné se v budoucnu zaměřit a dále je rozvíjet, neboť mají potenciál hodnotit vzorky velmi rychle a objektivně.

Kvalita ejakulátu je ovlivněna řadou vnitřních a vnějších faktorů, mezi které řadíme frekvenci odběru, roční období, věk a zdraví zvířete, jeho tělesnou kondici, dědičnost, velikost rohů, varlat a šourku.

Zpracování ejakulátu spočívá v jeho ředění a výrobě inseminačních dávek, které je možné krátkodobě skladovat v tekutém stavu, nebo zmrazit. Těmito inseminačními dávkami se následně provádí inseminace.

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

## Summary

The aim of this work is to collect knowledge about the ejaculate of small ruminants - rams and goats.

Sperm, i.e. ejaculate is a product of the male genital system and is composed of spermatozoa and seminal plasma. Spermatozoa are formed during spermatogenesis in the testicles. Subsequently, they are stored in epididymis where they become mature. The most common method of the collection of sperm is the collection with an artificial vagina or electroejaculation, the post-mortem collection is used less frequently.

We inspect the volume, colour and the content of foreign impurities in the ejaculate macroscopically. The concentration, pH, motility and morphology can be assessed microscopically. Biological tests, such as the thermal test, resistance test, cold shock resistance test and the determination of live and dead sperm by their staining are commonly used. Ejaculate can also be inspected using specialized methods such as computer analysis (CASA), hyposmotic test (HOS) or flow cytometry. These methods have the potential to assess samples very quickly and objectively and should therefore be focused on and further developed in the future.

The quality of the ejaculate is affected by various internal and external factors, e.g. the frequency of collection, season, age and health of the animal, its body scale condition, heritability, size of the horns, testicles and scrotum.

The ejaculate is extended and the insemination doses are produced. The doses can be stored in a liquid state for a short time or frozen. Later on, the insemination is carried out using these insemination doses.

**Keywords:** sperm, ram, buck, volume, motility, concentration, survivability

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce.....	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Anatomie pohlavních orgánů samců.....	3
3.1.1 Varlata a šourek.....	3
3.1.2 Vývodné pohlavní cesty.....	3
3.1.3 Nadvarlata a chámovody.....	3
3.1.4 Přídavné pohlavní žlázy.....	4
3.1.5 Penis.....	4
3.2 Spermatogeneze.....	5
3.3 Neurohumorální řízení.....	5
3.4 Ejakulát.....	6
3.5 Odběr ejakulátu.....	6
3.5.1 Odběr do umělé vagíny.....	6
3.5.2 Elektroejakulace.....	7
3.5.3 Odběr ejakulátu post-mortem.....	8
3.6 Hodnocení ejakulátu.....	9
3.6.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu.....	9
3.6.1.1 Barva.....	9
3.6.1.2 Objem.....	9
3.6.1.3 Cizorodé příměsi.....	9
3.6.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu.....	10
3.6.2.1 Koncentrace.....	10
3.6.2.2 Motilita.....	10
3.6.2.3 pH .....	11
3.6.2.4 Hodnocení vířivého pohybu.....	11
3.6.2.5 Morfologické vady.....	11
3.6.3 Biologické zkoušky ejakulátu.....	12
3.6.4 Specializované vyšetření ejakulátu.....	12
3.6.4.1 Počítačová analýza ejakulátu (CASA).....	12
3.6.4.2 Hypoosmotický test (HOS).....	14
3.6.4.3 Průtoková cytometrie.....	14

3.6.4.4 Vyšetření struktury chromatinu spermií (SCSA) .....	15
3.7 Vlivy působící na kvalitu ejakulátu.....	15
3.7.1 Frekvence odběru.....	15
3.7.2 Roční období.....	16
3.7.3 Věk.....	18
3.7.4 Zdravotní stav.....	19
3.7.5 Tělesná kondice a krmný režim.....	20
3.7.6 Dědičnost.....	21
3.7.7 Velikost varlat a šourku.....	22
3.7.8 Velikost rohů.....	22
3.8 Zpracování .....	23
3.8.1 Ředění.....	23
3.8.2 Konzervace.....	24
3.8.2.1 Konzervace v tekutém stavu.....	24
3.8.2.2 Konzervace mrazením.....	24
3.8.2.3 Rozmrazení.....	25
3.9 Inseminace.....	25
3.9.1 Intravaginální metoda.....	26
3.9.2 Intracervikální metoda.....	26
3.9.3 Intrauterinní transcervikální metoda.....	27
3.9.4 Intrauterinní laparoskopická metoda.....	27
4 Závěr.....	28
5 Seznam použité literatury.....	29

# 1 Úvod

Reprodukční ukazatelé jsou důležitým atributem, který má vliv na kvalitě následné produkce. Ovce a kozy patří mezi nejstarší a nejvýznamnější druhy hospodářských zvířat. Člověku přináší široké využití od produkce mléka a masa přes produkci vlny až po zachování přirozeného rázu krajiny díky jejich pastvě. Jedním z předpokladů pro dobrou reprodukci jsou samci s kvalitním ejakulátem, kteří jsou využiti v přirozené plemenitbě, nebo od kterých je odebírán ejakulát pro výrobu inseminačních dávek.



## **2 Cíl práce**

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

## **3 Literární přehled**

### **3.1 Anatomie pohlavních orgánů samců**

#### **3.1.1 Varlata a šourek**

Varlata jsou dvě párové žlázy uložené v šourku. Jejich hlavními funkcemi je produkovat samčí pohlavní buňky – spermie a hormon testosteron. Tvarem připomínají vejce s mírným zploštěním po stranách (Marvan a kol., 2011). V poměru k tělu jsou oproti ostatním hospodářským zvířatům poměrně velká. Jejich hmotnost se u beranů, kteří již dosáhli pohlavní dospělosti, pohybuje okolo 150–300 g (Notter a kol., 1981; Tekpetey a Amann, 1988), u kozlů okolo 190 g (Youngquist a Threfall, 2007).

Aby se spermie správně tvořily, potřebují teplotu o 3–4 °C nižší, než je teplota těla. Z toho důvodu jsou uloženy mimo břišní dutinu v šourku, kam u přežvýkavců sestupují těsně před narozením zvířete. Pokud by k sestoupení jednoho nebo obou varlat nedošlo, došlo by k jednostrannému, popřípadě oboustrannému kryptorchismu. V prvním případě je zvíře stále plodné, nicméně tato porucha je dědičná a samci se k reprodukci nepoužívají (Marvan a kol., 2011). Pokud je zvíře postiženo oboustranným kryptorchismem, lze jej v chovu využít jako prubíře (Horák a kol., 2012).

Šourek je kožní vak lahvovitého tvaru uložený ve stydké krajině mezi stehny, uvnitř kterého najdeme svisle uložená varlata. Na jeho povrchu je kůže, hustě porostlá srstí (Jelínek a Jelínek, 2002). U své báze je šourek přežvýkavců zřetelně zaškrbený (Marvan a kol., 2011).

#### **3.1.2 Vývodné pohlavní cesty**

Slouží k uskladnění a odvodu spermií. Skládají se z přímých kanálků, varletní sítě, odvodných kanálků varlete, vývodu nadvarlete, chámovodu a močové trubice (Marvan a kol., 2011).

#### **3.1.3 Nadvarlata a chámovody**

Z varlat spermie pokračují do nadvarlat. Ta jsou složena ze tří částí - hlavy, těla a ocasu. V prvních dvou částech spermie dozrávají a v ocasu se uskladňují. Hlava leží na dorzokaudální hranici varlete a je tvořena sítí 13–20 tubulů, složených z odvodných kanálků varlete, které navazují na semenotvorné kanálky. Tubuly v hlavě nadvarlete se spojují a vytváří tělo nadvarlete.

Na opačném pólu varlete leží ocas nadvarlete, který vzniká rozšířením těla. Nadvarle má strukturu spirálově zakroucené trubice. Může dosahovat délky okolo 70 m (Yungquist a Threlfall, 2007; Hafez a Hafez, 2000). Nadvarlata produkují sekret mírně kyselého povahy, který vyživuje spermie, blokuje jejich motilitu, čímž zabraňuje plýtvání jejich energie. Dochází zde také k resorpci látek, které vznikly rozpadem neejakulovaných spermií.

Na nadvarlata navazují chámovody. Mají tvar trubice, která spojuje nadvarlata s močovou trubicí. Stěna chámovodu je složena ze sliznice, svaloviny a serózy. V pánevním úseku se u přežvýkavců rozšiřuje a vytváří ampule chámovodu, která obsahuje rozvětvené tubulózní žlázy, produkující sekret hlenovité konzistence (Marvan a kol., 2011).

### **3.1.4 Přídavné pohlavní žlázy**

Produktem těchto žláz jsou sekrety, které ústí do močové trubice a mají za úkol spermie ředit, vyživovat a vytvářet pro ně vhodné prostředí v močové trubicí a samičích pohlavních orgánech. Patří mezi ně měchýřkovitá, předstojná a bulbouretrální žláza.

Mechýřkovitá žláza je párová žláza protáhlého tvaru (Jelínek a Jelínek, 2002). Vylučuje sekret, který významně přispívá k objemu ejakulátu (Noakes a kol., 2001). U většiny hospodářských zvířat se předstojná žláza skládá z těla a roztroušené části. U berana a kozla ovšem tělo chybí a najdeme u nich pouze její roztroušenou část. Její sekret má mlékovitou konzistenci a dává spermatu zápach charakteristický pro daný druh. Bulbouretrální žláza má oválný tvar (Marvan a kol., 2011).

### **3.1.5 Penis**

Penis je orgán, pomocí kterého se ejakulát dostane do pohlavního ústrojí samice. U beranů a kozlů dosahuje délky v rozmezí 30–50 cm a je poměrně tenký. Na jeho konci se nachází žalud, který je širší než tělo penisu a je oddělen zúženým krčkem. Pokud je v klidovém stavu, vytváří přibližně v polovině své délky esovité ohbí, které se nachází kaudálně od báze šourku.

U beranů a kozlů v úrovni krčku žaludu na povrch vystupuje močová trubice, která pokračuje výběžkem dlouhým přibližně 4 cm (Marvan a kol., 2011). Tento výběžek se může při ejakulaci pohybovat a díky tomu rozptýlit semeno po celé oblasti děložního krčku (Reece, 2009).

## 3.2 Spermatogeneze

Proces, při kterém se tvoří nové spermie, se nazývá spermatogeneze. Uplatňují se při ní dva typy buněčného dělení – mitóza a meióza. Vznikají v semenotvorných kanálcích ze spermatogonií mitotickým dělením. Ze spermatogonie vznikne jedna stejná buňka, která zůstává uložena na svém původním místě, a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A. Spermatogonie A se dále mitoticky dělí po několik generací, až z nich vznikají spermatogonie typu B, které se posledním mitotickým dělením přemění na primární spermatocyty s počtem chromozomů  $2n$ . Ty se meioticky dělí na spermatidy s haploidním počtem chromozomů (Reece, 2009). Spermatidy se v blízkosti lumen kanálku postupně z nepohyblivých buněk přeměňují na potenciálně pohyblivé, s již vytvořeným bičíkem. Tento děj se nazývá spermiogeneze. Dozrálé spermatidy jsou během poslední fáze spermiogeneze uvolněny do lumen semenotvorných kanálků jako spermie. Tyto ještě nepohyblivé spermie jsou pomocí kontraktilních elementů a tekutiny, jež je secernována semenotvornými kanálky, transportovány do nadvarlat, kde následně získávají schopnost se pohybovat (Noakes a kol., 2001; Youngquist a Threfall, 2007).

## 3.3 Neurohumorální řízení

Mozková kůra vyhodnocuje podněty z vnějšího a vnitřního prostředí. Po jejich zpracování vyšle informace do hypotalamu, který svými releasing hormony ovlivňuje adenohipofýzu v syntéze luteinizačního hormonu (LH). LH stimuluje leydigovy buňky ve varlatech k sekreci testosteronu. Pokud je hladina testosteronu vysoká, inhibuje další sekreci LH. Nízká hladina testosteronu naopak vyvolává větší sekreci LH. Uplatňuje se zde negativní zpětná vazba. Testosteron difunduje z intersticiální tkáně do semenotvorných kanálků, kde ovlivňuje spermatogenezi podporou meiotického procesu (Noakes a kol., 2001).

Dalším gonadotropním hormonem hypofýzy je folikulostimulační hormon (FSH), který je secernován předním lalokem hypofýzy. FSH stimuluje produkci proteinu vázajícího androgeny (ABP) sertoliho buňkami. Tento protein je secernován do lumen semenotvorných kanálků a váže zde testosteron a další androgeny. Tím je stabilizována jejich koncentrace a zajištěno jejich přiměřené množství potřebné pro spermatogenezi. Sertoliho buňky také secernují inhibin, který inhibuje sekreci FSH (Reece, 2009).

### 3.4 Ejakulát

Ejakulát je tekutina skládající se ze dvou částí – semenné plasmy a spermií. Je vylučován jednorázově na konci ejakulace (Gamčík a kol., 1992).

Semenná plasma je produktem přídatných pohlavních žláz a v malém množství také varlat, nadvarlat, chámovodů a močové trubice (Marvan a kol., 2011). Je důležitá pro funkci spermií, jejich přežití a transport (Hamahah a Gatti, 1998).

Spermie se skládají z hlavičky a bičíku. Jsou dlouhé přibližně 70  $\mu\text{m}$  (hlavička 8  $\mu\text{m}$ ). Hlavička má zploštělý oválný tvar. V hlavičce je uloženo jádro nesoucí DNA. Přední část je pokryta akrosomem. Je to struktura čepičkovitého tvaru, obsahující enzymy, které se podílí na oplození vajíčka. Bičík spermie zprostředkovává její aktivní pohyb. Skládá se z krčku, středního, hlavního a koncového oddílu (Hafez a Hafez, 2000).

### 3.5 Odběr ejakulátu

K odběru ejakulátu se využívá několik metod. Nejčastěji se používá odběr do umělé vaginy. Méně častou metodou je odběr pomocí elektroejakulace (Gamčík a kol., 1992). Je také možné ejakulát odebírat ejakulát post-mortem (Kaabi a kol., 2003).

#### 3.5.1 Odběr do umělé vaginy

Umělá vagina se skládá z pevného vnějšího pláště tvaru trubky (délka 200–210 mm, průměr 50–55 mm) a vnitřní gumové vložky (délka 320–360 mm, průměr 30–35 mm) (Gamčík a kol., 1992). Před odběrem se mezera mezi pláštěm a vnitřní vložkou naplní vodou o teplotě 40–55 °C, strana, kde dochází k vniknutí penisu, se nalubrikuje vazelínou a na opačný konec se připevní skleněný sběrač (Hošek, 2016).

Odběr do umělé vaginy (AV) je uváděn jako nejspolehlivější metoda a je doporučován (Malejane a kol., 2014). Při odběru do AV dosahují vzorky menšího objemu a větší koncentrace oproti elektroejakulaci (EE) (Hošek, 2016). Rozdíly v parametrech ejakulátu za použití AV a EE porovnával Matthews a kol. (2003). Dle této studie lze pomocí AV shromáždit kvalitnější vzorky, dostačujících parametrů se ovšem dá dosáhnout i pomocí EE.

**Tabulka č. 1: Parametry ejakulátu při využití AV a EE**

	Umělá vagina	Elektroejakulace
Objem [ml]	1,1	1,3
Progresivní pohyb	2,5	2,5
Koncentrace (*10 <sup>3</sup> /ml)	1671,9	1115,8

Zdroj: Matthews a kol. (2003).

Aby bylo možné využívat odběru do umělé vaginy, je nutné, aby se samec tuto metodu odběru nejprve naučil, po týdenním tréninku již ale berani nemají s odběrem problém (Malajane a kol., 2014). Tato metoda je také časově náročnější (Matthews a kol., 2003).

### 3.5.2 Eltektroejakulace

Další metodou je elektroejakulace. Využívá se k ní bipolární elektroda vsunutá do konečníku (Hošek, 2016). Elektroda má tvar tyčinky o délce 320–400 mm a průměru 0–5 mm.

Před odběrem se konečník vypláchne vlažným roztokem NaCl o koncentraci 1–2 %. To ulehčí přechod elektrického proudu. Následně se sterilní gázou očistí předkožkový otvor a pokud je znečištěný, může se použít fyziologický roztok k jeho opláchnutí. Stimulace trvá okolo tří minut, během kterých se do elektrody pouští elektrický proud v intervalech 2–5 sekund o napětí 10–30 V (Gamčík a kol., 1992). Malajane a kol. (2014) ve svém experimentu napětí postupně zvyšoval, dokud beran neejakuloval.

Rozdíly ve vzorcích odebraných pomocí AV a EE zkoumali ve své studii Aral a Aral (2002). Ti také uvádějí, že spermie v ejakulátu odebraném pomocí EE mají horší motilitu. Tapaloaga a Tapaloaga (2016) zkoumali vliv metody odběru na morfologii spermií. Sledovanými parametry byly délka, šířka, obvod a plocha hlavičky. Metoda odběru v tomto ohledu nemá výrazný vliv.

Metoda odběru ejakulátu pomocí EE může také ovlivnit parametry ejakulátu konzervovaného zmrazením. Ejakulát kozlů, získaný pomocí EE vykazuje po rozmrazení horší parametry než při odběru pomocí AV. Vliv metody odběru na kvalitu ejakulátu, který byl následně zmrazený, je u beranů nižší (Ramon a kol., 2016).

Malajane a kol. (2014) také uvádí problém, který doprovází tuto metodou odběru, bolest, kterou zvířatům způsobuje elektrický proud. Tuto bolest doprovází hlasové projevy a kontrakce svalů zadních končetin. Tyto projevy ustávají přibližně do čtyř měsíců. Je to pravděpodobně tím, že si zvířata zvyknou na tento druh stresu.

Hošek (2016) uvádí, že tato metoda je méně spolehlivá. Odebrané vzorky se mohou lišit v množství, kvalitě a mohou být kontaminovány močí.

### 3.5.3 Odběr ejakulátu post-mortem

Tato metoda je chirurgická. Před odběrem se šourek vyčistí. Varlata s nadvarlaty se pomocí skalpelu pečlivě vyjmou z jejich obalů. Poté se od sebe varlata a nadvarlata oddělí. Ejakulát je získáván z ocasu nadvarlete. Na jeho spodním konci se provede několik řezů, které umožní vyplavení ejakulátu. Ten je shromážděn do ředidla, předehřátého na teplotu 37 °C (Abu a kol., 2016). Při odběru je důležité, aby vzorek nebyl kontaminován krevními sraženinami a cizími tkáněmi. Také je vhodné, aby se řezy vyhnuly cévám.

Vzorky lze odebírat až 48 hodin po smrti zvířete (Kaabi a kol., 2003). Bergstein-Galan a kol. (2017) doporučuje odebrání vzorku co nejdříve po smrti zvířete, neboť smrtí zvířete se prodlužuje doba skladování a jeho parametry se začínají zhoršovat. Pokud nelze odebrat spermie z nadvarlat ihned, je doporučeno je skladovat při teplotě 5 °C. Při této teplotě je doporučeno také uchovávat nezmrazené vzorky ejakulátu (Shaken a kol., 2008). Vhodně skladované spermie si dokáží udržet parametry srovnatelné s odběrem do AV i 24 hodin po smrti (Bergstein-Galan a kol., 2017).

Výhodami této metody jsou možnost odběru vzorku po náhlé smrti a možnost zachování genetikého materiálu hodnotných nebo ohrožených zvířat (Abu a kol., 2016).

**Tabulka č. 2: Parametry ejakulátu po určitém čase**

	0 h	24 h	48 h
Motilita [%]	79,93	69,00	50,60
Koncentrace (*10 <sup>9</sup> /ml)	2,86	1,91	1,93
Živé spermie [%]	83,40	71,27	60,47
Integrita akrosomu [%]	92,87	89,00	88,00

Zdroj: Abu a kol. (2016)

## **3.6 Hodnocení ejakulátu**

### **3.6.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu**

Při makroskopickém hodnocení ejakulátu se posuzuje barva, hustota, zrnitost, pach, obsah příměsí a objem (Louda a kol., 2001).

#### **3.6.1.1 Barva**

Barva ejakulátu se může lišit od krémově bílé barvy přes světle žlutou až po žlutou (Ahmad a Noakes, 1996). Je ovlivněna jeho hustotou, konzistencí a příměsemi. Pokud je ejakulát kontaminován krví, může mít načervenalou barvu. Při kontaminaci hnisem nebo močí žlutozelenou (Gamčík a kol., 1992). Koncentrace ovlivňuje zbarvení na krémovou ( $2.5\text{--}4 \times 10^9/\text{ml}$ ), mléčnou ( $0.5\text{--}1.5 \times 10^9/\text{ml}$ ) a syrovátkovou ( $<0.1 \times 10^9/\text{ml}$ ) (Youngquist a Threfall, 2007).

#### **3.6.1.2 Objem**

Objem ejakulátu se určuje ihned po odběru. Jeho objem se určuje s přesností na 0,1 ml (Maurya a kol. 2010). Pohlavně dospělý a zdravý beran vyprodukuje 1–1,5 ml ejakulátu, kozel 0,4–3 ml. Množství ejakulátu může výrazně ovlivnit metoda odběru. Pokud sperma odebíráme pomocí elektroejakulace, může být jeho objem o 2–3 ml vyšší. Množství může také ovlivnit roční období, během kterého provádíme odběr (Gamčík a kol., 1992).

#### **3.6.1.3 Cizorodé příměši**

Ejakulát může být znečištěn chlupy, předkožkovými nečistotami, vazelínou, kožními parazity, prachem, pískem, krví, močí, nebo hnisem. K dalšímu využití se zpracovává pouze ejakulát bez znečištění (Gamčík a kol., 1992).



### 3.6.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Při mikroskopickém hodnocení ejakulátu se posuzuje koncentrace, aktivita spermií, pH, vířivost a morfologické vady spermií (Gamčík a kol., 1992).

#### 3.6.2.1 Koncentrace

Koncentraci spermií v ejakulátu určujeme počtem spermií v 1 ml. U berana i kozla se koncentrace pohybuje 2 - 5 x 10<sup>6</sup> spermií v 1 ml ejakulátu (Youngquist a Threfall, 2007).

Lze ji určit jejich odpočítáváním pod mikroskopem pomocí hematocytometru. Tento nástroj byl zprvu určen k počítání krevních buněk, avšak lze jej využít i při sčítání spermií.

Hematocytometr je mikroskopické sklíčko s přesně narýsovanými komůrkami. Na sklíčko se nanese sperma a následně je manuálně spočítán počet spermií v jedné komůrce (Hafez a Hafez, 2000). Tato technika je časově velmi náročná, patří ovšem k nejpřesnějším ze všech metod (Root Kustritz, 2010).

Další metodou, pomocí které je možné určit koncentraci spermií, je fotokolorimetrická metoda. Hodnota se určí na základě zakalení roztoku (Louda a Hegedušová, 2009). Tento způsob rozboru je rychlý a relativně jednoduchý. Jeho využití lze uplatnit dle typu přístroje k rozboru zředěného i nezředěného spermatu (Louda a kol., 2001; Vanderwall, 2008).

Metodou, při které se dá změřit koncentrace spermií, je pomocí spermatodenzimetru podle Karrase. Do Karrasova klínu se přidá 0,1 cm<sup>3</sup> spermatu společně s 10 ml 1% roztoku NaCl. Po promísení se na stupnici odečte hodnota, kterou je ještě možné patrně vidět.

Koncentrace spermií ve vzorku se dá také orientačně odhadnout pod mikroskopem při 100–200 násobném zvětšení na základě jejich vzájemné vzdálenosti a prostorovém uspořádání (Louda a kol., 2001).

#### 3.6.2.2 Motilita

Motilitou, nebo také aktivitou, se rozumí přímočarý pohyb spermie za hlavičkou, který je vyjádřen v %. Nežádoucí je pohyb na místě a zpětný pohyb (Louda a Hegedušová, 2009). Nejčastěji se hodnotí optickým mikroskopem za použití 200–400 násobného zvětšení. Malé množství naředěného vzorku spermatu fyziologickým roztokem nebo citrátem sodným se aplikuje na podložní sklíčko a následně zakryje sklíčkem krycím. Optimální teplota vzorku se uvádí 37 °C (Gungor a kol., 2017; Pradiee a kol., 2016; Louda a kol., 2001).

K dalšímu zpracování se používá sperma, které obsahuje minimálně 70 % aktivních spermií (Pradieé a kol., 2016).

Tufarelli a kol. (2010) ve své studii hodnotí motilitu spermií na stupnici 1–5, kdy hodnota 1 určovala nepohyblivé spermie a 5 velmi rychlý progresivní pohyb.

### **3.6.2.3 pH**

pH ejakulátu se pohybuje u beranů okolo 6,4–7,2. Kvalitní ejakuláty mají pH 6,4–6,6. Kozlí ejakulát se pohybuje v hodnotách pH 6,2–7,5. Obecně platí, že čím je řidší ejakulát, tím je vyšší hodnota pH (Gamčík a kol., 1992). pH by mělo být stanoveno ideálně do 15 minut po odběru kvůli rychlým životním pochodům spermií (Louda a kol., 2001). Greyling a Grobbelaar (1983) doporučují měřit pH vzorku pH-metrem ihned, jak je to možné.

### **3.6.2.4 Hodnocení vířivého pohybu**

Toto hodnocení úzce souvisí s hustotou a motilitou. Při 10–50 násobném zvětšení kvalitního ejakulátu lze pozorovat pohyb ve vlnách, které se rychle střídají. Pokud pozorujeme řidší ejakulát, pohyb je pomalejší. U řidších ejakulátů je pohyb velmi málo výrazný (Youngquist a Threfall, 2009).

### **3.6.2.5 Morfologické vady**

Morfologické vady spermií můžeme rozlišit na dva typy – primární a sekundární. Primární změny vznikají v době spermatogeneze až do jejich příchodu do ocasu nadvarlete. Mezi tyto změny můžeme zařadit degenerativní formy spermií, změny tvaru hlavičky, akrozómu, bičíku a mnoho dalších vývojových anomálií.

Sekundární změny vznikají při příliš dlouhém pobytu spermií v nadvarletí, během ejakulace ve vývodných cestách, špatnou manipulací a přípravou preparátu. Mezi tyto změny patří změny hlavičky, akrozomu a bičíku (Louda a kol., 2001).

Mezi zvýšeným výskytem morfologických vad spermií a plodností je prokázána souvislost, a proto jejich vyhodnocení může být pomocný ukazatel při inseminaci (Tizado a kol., 2016; de Paz, 2011).

### **3.6.3 Biologické zkoušky ejakulátu**

Pomocí těchto metod sledujeme odolnost spermií vůči různým vnějším vlivům. Do této skupiny testů řadíme krátkodobý tepelný a dlouhodobý chladový test přežitelnosti, zkoušku rezistence, zkoušku odolnosti vůči chladovému šoku a stanovení množství živých a mrtvých spermií pomocí jejich barvení.

Při krátkodobém tepelném testu přežitelnosti zahřejeme ejakulát na 38 °C a v hodinových intervalech posuzujeme aktivitu spermií.

Dlouhodobým chladovým testem zjišťujeme aktivitu spermií po určitém čase ve vzorku zchlazeném na 1–3 °C. Dobré ejakuláty mají 50% aktivitu po 96 hodinách.

Při zkoušce rezistence se malé množství vzorku zkoumaného ejakulátu smísí s 1% roztokem NaCl a na základě jeho množství a času, během kterého spermie ještě vykonávaly přímočarý pohyb, se určí hodnota rezistence spermatu.

Zkouška odolnosti vůči chladovému šoku se provádí ponořením kapiláry do vodní lázně o teplotě 0 °C na 10 minut. Procento spermií, jež zkoušku přežily, vyjadřuje odolnost.

Metoda barvení využívá toho, že živé spermie nepropouštějí skrze svoji membránu barviva na rozdíl od spermií mrtvých či oslabených. Jako barviva se používají například roztok eosínu, nigrosínu, opálové modři, atd. (Louda a kol., 2001).

### **3.6.4 Specializované vyšetření ejakulátu**

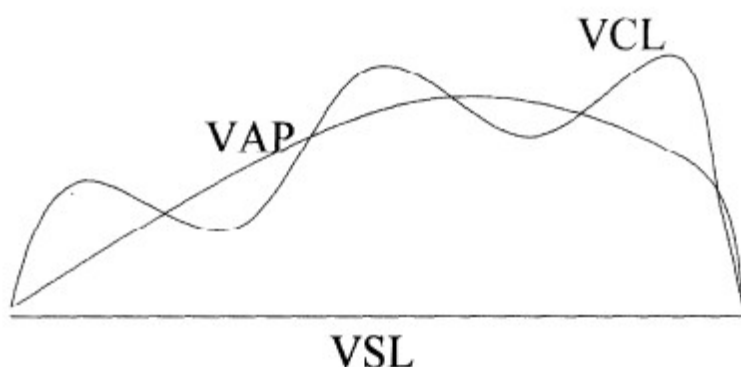
#### **3.6.4.1 Počítačová analýza ejakulátu (CASA)**

Počítačová analýza ejakulátu, která byla vyvinuta v 70. letech. Zkratka pochází z anglického Computer Assisted Sperm Analysis (někdy také nazývána CASMA – Computer Assisted Sperm Motility Analysis). Je to metoda rozboru, při které se analyzují snímky vzorků pomocí speciálně vyvinutého počítačového software (Dott et al., 1979; Mortimer 1994). Snímky jsou pořizovány pomocí speciálního mikroskopu s videokamerou.

Tímto způsobem lze zkoumat koncentraci, motilitu a morfologii ispermií. Výhodou je, že rozbor je více objektivní a přesný, než při hodnocení člověkem. Během krátkého časového intervalu dokáže analyzovat velké množství spermií. Nevýhodou tohoto systému je vysoká pořizovací cena a nutnost standardizace parametrů přístroje pro daný druh před použitím. Na přístroji je možné nastavit frekvence pořizování snímků (15–60 Hz), zvětšení mikroskopu, velikost sledovaných objektů, počet a velikost sledovaných polí.

Analýzou motility je možné vyhodnotit křivkovou rychlost (VCL), což je průměrná rychlost měřená na dráze, kterou spermie urazí z bodu A do bodu B, průměrnou rychlost (VAP), průměrnou přímočarou rychlost (VSL), která představuje průměrnou rychlost měřenou na přímce z bodu A do bodu B, amplitudu posunutí hlavičky v  $\mu\text{m}$  (ALH), frekvenci, se kterou hlavička spermie protne průměrnou dráhu spermie (BCF). Z těchto hodnot lze vypočítat přímost (STR;  $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$  v procentech) a linearitu (LIN;  $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$  v procentech) (Verstegen a kol., 2002).

### Obrázek č. 1: Hodnoty naměřené pomocí CASA



Zdroj: Verstegen a kol., (2002).

Při pozorování morfologie spermie se CASA jeví jako velmi výhodný, neboť je možné analyzovat parametry, u kterých by to nebylo manuálně možné, pozorování je mnohem přesnější a objektivnější (Verstegen a kol., 2002).

Olivares a kol. (2017) při svém experimentu s beráním ejakulátem měli parametry přístroje nastavené na 25 snímků za sekundu, zvětšení mikroskopu  $\times 100$ . Počítač prováděl rozbor na ploše  $24 \times 24 \text{ mm}$  ve vzorku objemu  $10 \mu\text{l}$ . Plocha objektů, kterou počítač vyhodnotí jako hlavičku spermie, byla  $18\text{--}60 \mu\text{m}^2$ . Vzorek je vhodné udržovat při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Dle rychlosti křivkového pohybu (VCL) byly spermie zařazovány do skupin – pod  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  byly klasifikovány jako nepohyblivé,  $10\text{--}45 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  středně pohyblivé a rychlé nad  $75 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Jako spermie s progresivním pohybem byly klasifikovány ty, které dosahovaly STR nad 80 %.

### 3.6.4.2 Hypoosmotický test (HOS)

Tímto testem se hodnotí funkčnost plasmatické membrány bičíku spermie. Vzorek ejakulátu se smísí s hypoosmotickým roztokem. Pokud je buněčná stěna v pořádku, bičík spermie se začne kroutit, zvětšovat svůj buněčný objem a následně bobtnat (Gadea, 2005).

Jako hypoosmotický roztok se používá například roztok fruktózy s citrátem sodným, nebo roztok sacharózy. Doba, za jakou se test vyhodnocuje, se pohybuje okolo 15–60 minut. Ideální teplota pro vzorek je 37 °C (da Silvia a kol., 2010; Vasquez a kol., 2010).

Membrány spermií různých druhů mají různé vlastnosti, což může mít vliv na výsledky testu. Nalley a Arifantini (2014) ve své studii určovali ideální postup, kterým provádět tuto metodu u beranů, zejména dobu. Roztok byl připraven ze 7,35 g citrátu sodného a 13,52 g fruktózy. Následně se smísilo 10 µl ejakulátu se 2 ml hypoosmotického roztoku.

Tyto vzorky byly uchovávány při teplotě 37 °C a každých 15 minut byly pozorovány. Výsledky ukázaly, že ideální doba je 30 min.

### 3.6.4.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, jejíž pomocí lze hodnotit různé vlastnosti buněk včetně spermií, jako je například jejich počet, koncentrace, velikost, integrita membrán, akrozómu, nebo kvalita DNA (Ormerod, 2000). Tyto parametry jsou detekovány pomocí optického systému, který zaznamenává, jak jednotlivé částice rozptylují a vyzařují záření (Fernando a kol., 2016).

Analyzované buňky se označí vhodným barvivem a následně rozptýlené v tekutém médiu prochází průtokovým cytometrem, kde jsou ozařovány laserem. Nejčastěji je využíván argonový laser o excitační vlnové délce 488 nm. Barviva, jež jsou navázána v analyzované buňce, absorbují světlo o určité vlnové délce a následně vyzařují světlo s odlišnou vlnovou délkou. Buňky s různými vlastnostmi pak vykazují rozdílnou fluorescenci (Ormerod, 2000). Fluorescenční světlo je pomocí čoček a filtrů vedeno na detektory, které sbírají data do počítače (Fernando a kol., 2016).

Jednou z metod, která využívá průtokovou cytometrii, je cell sorting, neboli třídění buněk, které lze aplikovat při sexaci spermií. Vychází z toho, že spermie se samčím chromozomem Y obsahuje méně DNA než samičí spermie s chromozomem X (Ormerod, 2000). DNA se obarví pomocí barviva, jež se na ni naváže. Chromozom X na sebe tedy naváže více barviva než chromozom Y (Seidel a kol., 2007).

### 3.6.4.4 Vyšetření struktury chromatinu spermii (SCSA)

SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) je test, založený na průtokové cytometrii. Tato metoda slouží k vyšetření DNA. Definuje abnormální strukturu chromatinu jeho zvýšenou náchylností k denaturaci, která vypovídá o jeho odlišnostech (Garcia-Macias a kol., 2006). Tyto poruchy mohou vzniknout během spermatogeneze, nebo vlivem jiných faktorů, jako jsou např. teplotní či oxidativní stres, nebo vliv kyselého prostředí (Aoki et al., 2006). Spermie jsou barveny akridinovou oranží. Jednovláknová, poškozená DNA fosforeskuje červeně a dvojitý řetězec nedenaturované DNA zeleně (Falchi a kol., 2018).

## 3.7 Vlivy působící na kvalitu ejakulátu

### 3.7.1 Frekvence odběru

U beranů je doporučeno odebírat ejakulát 1–2x denně, 5x za týden. U mladších plemenů je doporučena frekvence odběru nižší. Frekvence odběru u kozlů je 1–2x za den po dva dny za sebou, poté alespoň jeden den sexuální pauzy (Louda a kol., 2001).

Není doporučeno dělat odběr příliš často. Kaya a kol. (2002) beranům odebíral ejakulát jednou, třikrát, šestkrát a osmkrát denně. Následně byl hodnocen jeho objem a koncentrace, motilita spermii, množství spermii a počet spermii s abnormalitami. Se zvyšující frekvencí odběru se parametry ejakulátu zhoršovaly.

**Tabulka č. 3: Vliv frekvence odběru na objem ejakulátu**

	1x denně	3x denně	6x denně	8x denně
Objem [ml]	1.1	0.8	0.5	0.4
Koncentrace [ $\times 10^9$ ml <sup>-1</sup> ]	3.8	3.5	2.4	1.9
Motilita [%]	89.8	74.9	63.7	65.7
Mrtvé spermie [%]	5.8	4.8	6.2	3.4
Abnormality spermii [%]	4.8	6.9	9.0	8.6

Zdroj: Kaya a kol., 2002

### 3.7.2 Roční období

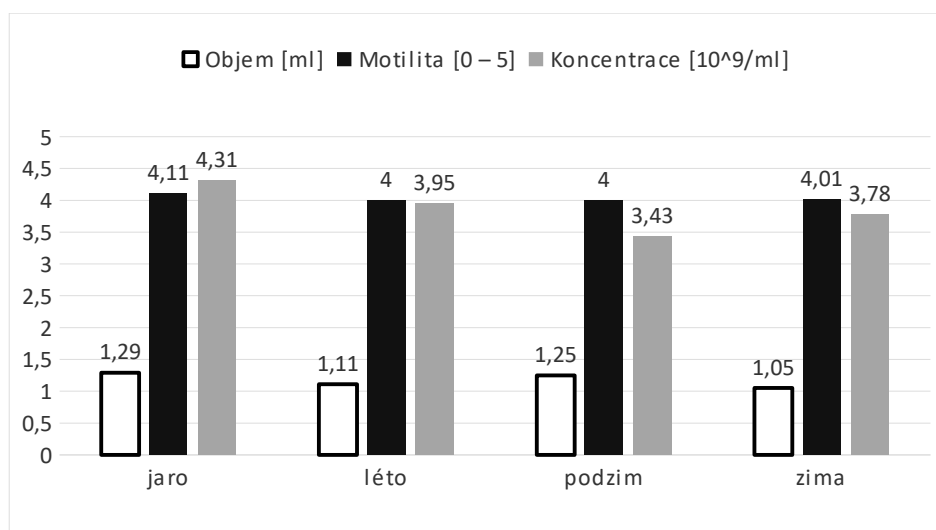
Kvalita ejakulátu je závislá na ročním období. Nejlepších parametrů dosahuje na podzim a na jaře. Během léta a zimy bývají parametry ejakulátu horší. Sezónnost také závisí na plemeni a na zeměpisné šířce. V našich podmínkách dochází k vrcholu plodného období ovcí a beranů v druhé polovině roku, kdy se zkracuje světelný den (Louda a kol., 2001; Chesneau a kol., 2016). Exotická plemena mohou vykazovat nižší sezónnost (Malejane a kol., 2014).

Ve studii, kterou prováděl Benia a kol. (2018), lze například vidět vyšší proměnlivost objemu, na rozdíl od hodnot, které naměřil Malejane a kol. (2014) v dalších parametrech, jako například motilita nebo abnormality, ovšem byla kvalita ejakulátu nižší v zimě.

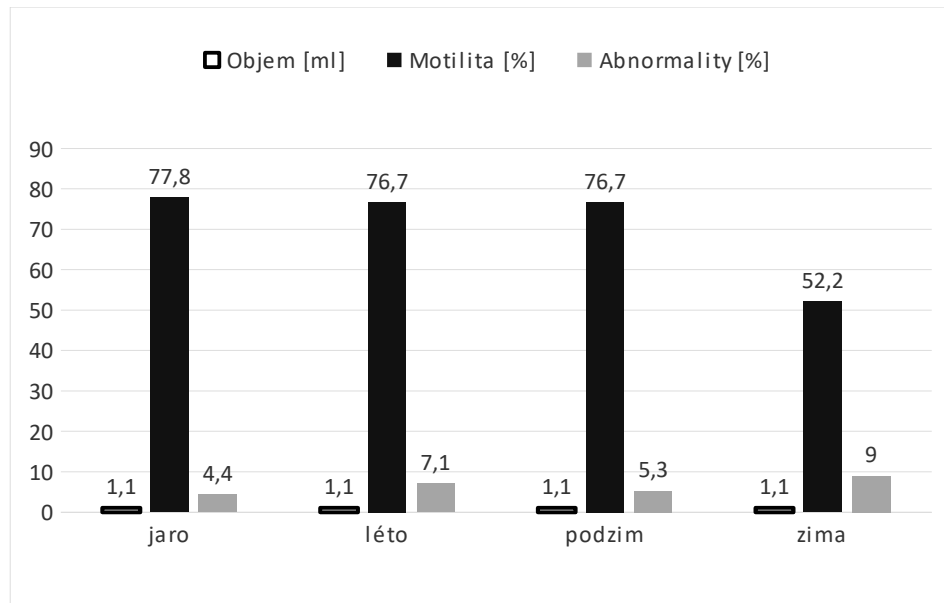
Zamiri a kol. (2010) vyzorovali nejlepší parametry ejakulátu (objem, hustota, progresivní motilita a procentuální zastoupení normálních spermií) na podzim a během časných zimních měsíců. Ve studii prováděné Karagiannidis a kol. (2000) vzešly nejlepší parametry ejakulátu odebíraného na podzim.

Rozdíly lze také pozorovat v morfologii spermií. Dle Montanero a kol. (2014) je možné pozorovat jasné sezónní chování morfologických parametrů, přičemž největší velikosti dosahují spermie na podzim a v zimě.

**Graf č. 1 a 2: Vliv ročního období na parametry ejakulátu**



Zdroj: Benia a kol. (2018)



Zdroj: Malejane a kol. (2014)

**Tabulka č. 4: Vliv ročního období na parametry ejakulátu**

Měsíc	Objem	Koncentrace (10 <sup>9</sup> /ml)	Abnormality (%)	Motilita (%)
leden	1.04	4.33	10.4	78.1
únor	0.88	4.37	10.5	78.0
březen	0.86	3.98	13.9	73.5
duben	0.97	3.53	13.7	71.3
květen	0.93	3.44	14.2	69.3
červen	1.09	4.12	11.8	73.3
červenec	1.19	4.24	13.4	76.7
srpen	1.24	4.33	13.6	78.2
září	1.20	4.47	12.2	79.6
říjen	1.38	4.56	9.4	82.0
listopad	1.50	4.60	7.9	85.6
prosinec	1.60	4.84	9.2	84.9

Zdroj: Zamiri a kol. (2010)



### 3.7.3 Věk

Proces spermatogeneze začíná během období pohlavního dospívání – puberty, ve věku 4–6 měsíců. Kvalitní ejakulát však plemenci produkují až ve vyšším věku (Youngquist a Threfall, 2007).

Ejakulát nedospělých jedinců má horší kvalitu. Samci nubijské kozy od 8 měsíců začínají produkovat kvalitní ejakulát s motilitou a morfologií spermií srovnatelný se samci starými 1–5 let, objem a koncentrace se ovšem zvyšuje až do 2 let (Skalet, 1986).

Dle Benia a kol. (2018) mají berani i ve věku 18 měsíců stále horší motilitu a koncentraci spermií než dospělí plemenci ve věku 3–4 let (viz tabulky č. 5 a 6). Akpa a kol. (2012) tvrdí, že k plemenitbě by měli být používáni berani starší než 24 měsíců, protože mladší berani mají větší množství morfologických abnormalit spermií.

Dulaimi a kol. (2015) prováděli studii, která zkoumala vliv věku beranů na velikost a tvar hlavičky spermií. Zjistili, že spermie mladších beranů mají menší hlavičky, než hlavičky spermií beranů dospělých. Na základě těchto parametrů lze přibližně indikovat dospělost jedince.

**Tabulka č. 5: Parametry ejakulátu v závislosti na věku jedince**

Věk	18 měsíců	3 - 4 roky
Objem (ml)	1,18	1,29
Motilita (1-5)	3,8	4,42
Koncentrace ( $10^9$ /ml)	4,01	4,25

Zdroj: Benia a kol. (2018)

**Tabulka č. 6: Velikost hlavičky spermií v závislosti na věku jedince**

	12 měsíců	36 měsíců	72 měsíců
Délka [ $\mu$ m]	7,91	7,95	8,54
Šířka [ $\mu$ m]	4,49	4,51	4,9
Plocha [ $\mu$ m <sup>2</sup> ]	28,01	28,21	30,2
Obvod [ $\mu$ m]	22,71	23,01	24,09

Zdroj: Dulaimi a kol., 2015

### 3.7.4 Zdravotní stav

Fertilitu samců může negativně ovlivnit zhoršený zdravotní stav způsobený špatnou péčí o zvířata, vlivem různých bakteriálních či virových onemocnění, parazitů a jiných činitelů (Tsakmakidis, 2010).

Gouletsou a Fthenakis (2015) ve své práci uvádí souhrn častých mikrobiálních chorob malých přežvýkavců. Mezi ně patří záněty varlat a nadvarlat (orchitida, epididymitida), přídavných pohlavních žláz, penisu, předkožky a šourku.

Jako nejčastější původce zánětů varlat a nadvarlat uvádí bakterie rodu *Brucella* a *Truperella*. *Brucella ovis* způsobuje chronické onemocnění, charakterizované změnami varlat a nadvarlat, které mohou vést až ke ztrátě plodnosti (Iwaniak, 2002). Carrera-Chavez a kol. (2016) porovnával ejakulát zdravých beranů s ejakulátem beranů nakažených bakterií *Brucella ovis*. Ejakulát nakažených plemenů vykazoval horší charakteristiku. Dle Youngquist a Threfall (2007) je *Brucella ovis* hlavní příčinou snížené plodnosti v Austrálii, na Novém Zélandě a na západě USA.

Virus neštovic způsobuje vředy, jež se mohou nacházet na různých částech těla, včetně penisu a předkožky. Tento virus je celosvětově rozšířen, může napadnout více druhů zvířat a má zoonotický potenciál. Průběh onemocnění se může lišit od subklinického až po úmrtí zvířete. V místě vředů hrozí infikování jinými patogeny (Gouletsou a Fthenakis, 2015).

Ekto a endoparazité mohou na fertilitu zvířete působit nepřímo, například zhoršením jeho tělesné kondice, poruchami hormonální činnosti, nebo mohou přímo způsobit degeneraci gonád (Yunusa a kol., 2016; Yunusa a kol., 2011).

V případě zjištění nákazy je nutné vyhodnotit, zda je vhodná léčba, popřípadě zvolit utracení zvířete. Pokud se přistoupí k léčbě, volí se vhodná antibiotika, antivirotika, popřípadě antiparazitika (Gouletsou a Fthenakis, 2015)

### 3.7.5 Tělesná kondice a krmný režim

Maurya a kol. (2010) se zabýval reprodukčními ukazateli beranů v souvislosti s tělesnou kondicí. Bylo zkoumáno sexuální chování, parametry ejakulátu, rozměry šourku a hormony, konkrétně u ejakulátu byl sledován objem, motilita, koncentrace a progresivní pohyb spermií. Zvířata byla rozdělena do tří skupin a následně jim byl upraven režim krmné dávky, dokud nedosáhly požadované kondice. V první skupině byli berani s tělesnou kondicí 2,5, v druhé 3,0 a ve třetí 4,0. Tělesná kondice byla hodnocena na stupnici 1–5, kdy 1 představuje úplně vyhublá a 5 velmi ztučnělá zvířata. Zvířata ve všech třech skupinách prokazovala plodnost, ovšem nejlepších reprodukčních parametrů dosáhla zvířata s tělesnou kondicí 3,0. Ejakulát těchto zvířat dosahoval většího objemu, a spermie měly lepší motilitu. Koncentrace se mezi skupinami výrazně nelišila.

Přetučnělost vlivem vysokoenergetické diety může podmiňovat vyšší množství podkožního tuku v oblasti šourku. Tento tuk může interferovat s termoregulačními mechanismy varlat, nezbytnými pro spermatogenezi (Labuschagne a kol., 2002).

Tufarelli a kol. (2011) uvádí, že kvalitní strava, jež ovlivňuje tělesnou hmotnost, má výrazný dopad na charakteristiku ejakulátu. V této studii měl ejakulát beranů s nižší krmnou dávkou, jež vedla ke snížení jejich tělesné kondice, horší parametry než ejakulát beranů s krmnou dávkou zvýšenou.

Krmení méně kvalitními krmivy může zvýšit podíl nezralých a morfologicky abnormálních spermií. (Dana a kol., 2000).

**Tabulka č. 7: parametry ejakulátu v závislosti na tělesnou kondici**

	BCS 2,5	BCS 3,0	BCS 4,0
Objem (ml)	0,67	1,13	0,89
Motilita (0-5)	4,16	4,58	4,47
Koncentrace *10 <sup>6</sup> /ml	3246,9	3527,6	3453,58
Motilita (%)	75,2	86,2	80,6

Zdroj: Maurya a kol. (2010)

### 3.7.6 Dědičnost

Dle Furstoss a kol. (2007) má hlavní vliv na ukazatele ejakulátu vnější prostředí. Ve své studii určoval u kozlů plemene alpine a saanen koeficient dědivosti pro objem spermatu, celkový počet spermií, koncentraci, motilitu spermií vyjádřenou na stupnici 0–5 a procento pohyblivých spermií. Hodnoty koeficientu dědivosti u zjišťovaných parametrů se pohybovaly v rozmezí 0,05–0,32 pro plemeno saanen a 0,03–0,34 u plemene alpine. Detailněji jsou výsledky prezentovány v tabulce č. 8. Podobné hodnoty zjistil Bodin a kol. (2007) také u beranů.

**Tabulka č. 8: Heritabilita jednotlivých ukazatelů ejakulátu**

	Plemeno Saanen	Plemeno Alpine
Koncentrace	0,32	0,34
Množství spermií	0,15	0,25
Objem ejakulátu	0,25	0,29
Motilita 0 - 5	0,12	0,17
Motilita [%]	0,05	0,03

Zdroj: Furstoss a kol. (2007)

U ovcí lze pozorovat výrazné meziplemenné rozdíly v plodnosti (Louda a kol. 2001). Mohammed a kol. (2013) křížil plemeno koz aradi saudi (A) s plemenem syrian damascus (D). Parametry ejakulátu byly sledovány u čistokrevných zvířat a u kříženců  $\frac{1}{2}D\frac{1}{2}A$  a  $\frac{3}{4}D\frac{1}{4}A$ . Ejakulát hybridů těchto dvou plemen vykazoval lepší hodnoty než ejakulát čistokrevných potomků (viz tabulka č. 9).

**Tabulka č. 9: Parametry ejakulátu v závislosti na plemenné příslušnosti**

	Aradi	Damascus	$\frac{1}{2}D\frac{1}{2}A$	$\frac{3}{4}D\frac{1}{4}A$
Objem (ml)	1,55	1,46	1,58	1,56
Koncentrace *10 <sup>9</sup> /ml	3,6	7,1	7,2	7,1
Motilita (%)	79,1	79,5	84,8	81,6
Živé spermie (%)	80,9	86,9	88,4	87,6
Abnormální spermie (%)	7,3	8,1	8,2	11,1

Zdroj: Mohammed a kol. (2013)

### 3.7.7 Velikost varlat a šourku

Kvalitou ejakulátu a rozměry varlat se ve své studii zabýval Turri a kol (2014). Zjistil pozitivní korelaci s parametry ejakulátu. Mia a kol. (2013) uvádějí, že o parametrech ejakulátu může vypovídat také scrotální obvod. Dle Rege a kol. (2000) lze na základě těchto rozměrů vybírat mladé plemeny. Velikost varlat a šourku souvisí s věkem a hmotností zvířete (Youngquist a Threfall, 2007; Bongso a kol., 1982).

**Tabulka č. 10: Parametry ejakulátu v závislosti na scrotálním obvodu**

Scrotální Obvod (cm)	Objem (ml)	Koncentrace *10 <sup>9</sup> /ml	Motilita (%)	Živé spermie (%)
17	0,40	1,36	80,11	90,20
18	0,45	2,32	79,78	86,24
19	0,49	2,40	78,41	84,79
20	0,47	2,63	80,73	84,78
21	0,58	2,46	77,83	87,14
22	0,60	2,80	81,25	89,58
23	0,79	3,25	80,00	88,93

Zdroj: Mia a kol. (2013)

### 3.7.8 Velikost rohů

Rohy jsou sekundární sexuální znak a jsou používány pro souboje mezi samci v období páření, z čehož lze usoudit, že nejdominantnější samci s nejvyvinutějšími rohy jsou přirozeně vybráni k reprodukci. Studie provedena Toledano (2007) ukazuje, že motilita spermií může být spojena s kvalitou rohů. Santiago-Moreno a kol. (2016) ve své studii uvádí, že symetrie, velikost a průměr rohů pravděpodobně mohou ovlivnit počet a koncentraci spermií.

## 3.8 Zpracování

### 3.8.1 Ředění

Pomocí naředění ejakulátu můžeme získat jeho větší objem, díky kterému je možné oplodnit větší množství samic a také s jeho pomocí zajistíme vhodné podmínky pro přežívání spermií in vitro. Stupeň ředění se pohybuje v poměr 1:3 až 1:8, v závislosti na objemu, koncentraci, aktivitě spermií a technologii konzervace (Gamčík a kol., 1992).

K ředění se používají ředidla na bázi látek, jako je například citrát sodný, cukry, mléko, glycerol, vaječný žloutek, tris (hydroxymethyl-aminometan) atd. (Salamon a Maxwell, 1995a; Salamon a Visser, 1972). Skladovatelnost ejakulátu lze také zlepšit přidáním antioxidantů, mastných kyselin, kravského sérového albuminu, nebo např. antibiotik (Allai a kol., 2017; Salvador a kol., 2003; Quan a kol., 2016).

Ředidla je možné připravit, nebo jsou k dostání také komerčně vyráběná pod názvy jako např. Ovipro, Optidyl, Triladyl a Andromed CSS, atd. (Hegedüšová a kol., 2012; Louda a kol., 2001).

Louda a kol. (2001) uvádí, že pro zředění ejakulátu v tekutém stavu lze například využít žloutko-citrátové ředidlo, kde se použije 30 % vaječného žloutku a 70 % citrátu sodného o pH 6,7). Z mléka, vaječného žloutku, bezvodé glukózy a fosforečnanu draselného lze připravit ředidlo na bázi mléka.

Quan a kol. (2006) ve své studii používal ředidlo připravené z Tris, glukózy, kyseliny citrónové, penicilinu, streptomycinu, kravského sérového albuminu a vaječného žloutku.

Pro ředění ejakulátů, které se konzervují mražením, se využívají ředidla jiného složení. Louda a kol. (2001) pro kryokonzervaci jako vhodné ředidlo uvádí žloutko-laktózové za použití vodného roztoku laktózy, vaječného žloutku, glycerolu a ředidlo TRIS za použití tris, kyseliny citronové a fruktózy. Choquepuma a kol. (2017) ve své studii používal ředidlo složené z tris, sójového lecitinu a glycerolu.

Obecně platí, že žloutková ředidla a ředidla na bázi sóji poskytují lepší ochranu ve srovnání s ředidly na bázi mléka. Kasimanickam a kol. (2011) uvádí sójová ředidla jako vhodnou náhražku ředidel živočišného původu, protože existují obavy z mikrobiální kontaminace.

### **3.8.2 Konzervace**

Pro konzervaci ejakulátu se nejčastěji používají dvě metody – skladování v tekutém stavu a kryokonzervace, neboli zmrazení (Allai a kol., 2017). Při skladování je nutné zpomalení metabolismů spermií, což vede k prodloužení jejich životaschopnosti (Maxwell a Salamon, 1993).

#### **3.8.2.1 Konzervace v tekutém stavu**

V tekutém stavu se konzervuje ejakulát, určený k přímému použití. Skladuje se v teplotách okolo 4 °C. Spermie si uchovávají uspokojivou oplozovací schopnost až 48h po odběru (Hegedüšová a kol., 2012; Louda a kol., 2001).

Při použití čerstvého ejakulátu se procento zabřeznutých ovcí uvádí až 75 %. Každým dnem skladování klesá oplozovací schopnost o 10–35 %. Pravděpodobnost zabřeznutí je možné zvýšit dobře načasovanou laparoskopickou inseminací. Za použití této metody je možné zabřeznutí i s ejakulátem starým 8 dní (Salamon a kol., 1979).

#### **3.8.2.2 Konzervace mrazením**

Konzervovat ejakulát zmrazením je možné francouzskou metodou – v pejetách nebo japonskou metodou – v peletách.

Při zmrazování ejakulátu do pelet je nejprve nutné provést ekvilibraci po dobu 2–3 hodin při teplotě 2–4 °C. Poté se 0,1–0,3ml dávky zmrazují 7 minut na suchém ledě, na plastové desce nebo na hliníkové folii při teplotě -79 °C. Poté se pelety vloží do kontejneru s tekutým dusíkem.

Po zředění a ekvilibraci se ejakulát plní do pejet o délce 65 mm a průměru 0,3 mm. Poté, co jsou pejety hermeticky uzavřeny, se mohou zamrazit. Nejprve je nutné je umístit na minimálně 30 sekund přibližně 5 cm nad hladinu kapalného dusíku a poté je do něj vložit. Objem dávky v jedné pejetě je 0,2–0,5 ml (Gamčík a kol., 1992; Salamon a Maxwell, 1995a).

Mrazení má na spermie negativní efekt. Motilitu si zachová průměrně asi 50 % spermií, fertilitu si ovšem vlivem defektů vzniklých nízkou teplotou zachová pouze 20–30 % (Salamon a Maxwell, 1995b). Dle Choquepuma a kol. (2017) má kryokonzervace negativní vliv také na morfologické parametry spermií, jako je např. délka, šířka, plocha a obvod hlavičky.

Kvalitu ejakulátu po rozmrazení lze zlepšit použitím vhodného ředidla. Salmon a kol. (2017) porovnával parametry ejakulátu, který byl zředěn pomocí ředidla na bázi odtučněného mléka a cyklodextrinu s obsahem cholesterolu oproti žloutkovému ředidlu. Spermie v ejakulátu, jenž byl zředěn žloutkovým ředidlem, po rozmrazení vykazovaly horší parametry.

Nur a kol. (2011) srovnávali vliv rychlosti mrazení na motilitu, integritu akrozomu a strukturu chromatinu. Shromážděné vzorky ejakulátu byly zředěny v poměru 1:5 a pak během 1 hodiny ochlazeny na teplotu 5 °C podrobeny ekvilibraci po dobu 2 hodin. Poté byly dávky o objemu 0,25 ml mrazeny dvěma různými rychlostmi. První skupina vzorků byla mražena pomalu, rychlostí 0,5 °C za minutu, od 5 °C do -20 °C. Druhá skupina byla mražena rychle, rychlostí 5 °C za minutu, od 5 °C do -20 °C. Obě skupiny vzorků pak byly zmrazeny až do teploty -120 °C rychlostí 25 °C za minutu a následně uloženy v kapalném dusíku. Rozmrazení bylo prováděno po dobu 30 min na teplotu 37 °C. Analýza ejakulátu po rozmrazení ukázala, že mezi dvěma mrazicími křivkami nebyly významné rozdíly v defektech akrozomu a chromatinu. Významný rozdíl byl však zaznamenán v motilitě spermií ve prospěch pomalého mrazení.

### **3.8.2.3 Rozmrazení**

Pejety se rozmrazují při teplotě 37 °C. Rozmrazování pelet se provádí suchou metodou ve zkumavce, nebo mokrou metodou v roztoku při teplotě 37–45 °C. Je doporučeno rozmrazovat dvě a více pelet v jedné zkumavce (Salamon and Maxwell, 1995a).

Nur a kol. (2011) ve své studii rozmrazovali vzorky ejakulátu při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

## **3.9 Inseminace**

Inseminaci lze provést pomocí několika technik, a to intravaginálně, intracervikálně a intrauterinně. Intrauterinní inseminaci můžeme dále rozdělit na transcervikální a laparoskopickou metodu (Daskin a kol., 2016; Anel a kol., 2006). U ovcí není umělá inseminace natolik rozšířena jako u jiných domácích druhů. Výsledky jsou ovlivněny vlivem pleménika a plemenice, farmou a v neposlední řadě inseminačním technikem (Shackell a kol., 1990; Donovan a kol., 2004; Paulenz a kol., 2004). U koz lze umělou inseminací podstatně snížit samčí neplodnost, která někdy přesahuje až 30 % (Kliment, 1998).



Umělá inseminace poskytuje genetický zisk a umožňuje použití spermatu ze stád, která se nachází v různých oblastech země, nebo vysoce hodnotných živočišných zvířat, která zemřela (Silvia-Mairrelles, 2017).

**Tabulka č. 11: Parametry inseminační dávky při použití různých metod inseminace**

Metoda	Typ semene	Objem [ml]	Koncentrace v 1 ml
Intravaginální	Pouze čerstvé	0,2	1000 x 10 <sup>6</sup>
Intracervikální	Pouze čerstvé	0,2	2000 x 10 <sup>6</sup>
Intrauterinní transcervikální	Čerstvé nebo zmrazené	0,5	200 – 400 x 10 <sup>6</sup>
Intrauterinní laparoskopická	Čerstvé nebo zmrazené	0,05	400 – 800 x 10 <sup>6</sup>

Zdroj: Youngquist a Threfall (2017)

### 3.9.1 Intravaginální metoda

Při intravaginální metodě se čerstvá nebo zchlazená inseminační dávka aplikuje za použití inseminační pipety co nejhluběji do pochvy. Tato metoda je společně s intracervikální metodou nejvíce používána, je však nejméně spolehlivá. Uvádí se, že pomocí intravaginální inseminace zabřežne 20–60 % samic (Youngquist a Threfall, 2007; Anel a kol., 2006; Mourad a kol., 2003; Robinson a kol., 1970).

### 3.9.2 Intracervikální metoda

Inseminační dávka je aplikována pomocí inseminační pipety do děložního krčku v nejhlubším možném místě, bez použití síly k průniku. (Youngquist a Threfall, 2007; Anel a kol., 2006; King a kol., 2004). Dle Kerton a kol. (1984) je tato metoda účinnější než metoda intravaginální. Na výsledky má vliv hloubka zasunutí a také tvar katetru (Macías a kol., 2017). Youngquist a Threfall (2007) doporučují vaginu vypláchnout fyziologickým roztokem nebo mlékem, pokud ovce během příprav na inseminaci močila.

### **3.9.3 Intrauterinní transcervikální metoda**

V praxi není příliš využívána. Při této metodě je nejprve nutné plemenci stabilizovat ve hřbetní poloze s vyvýšenými zadními končetinami (Casali a kol., 2017) Pochva se rozšíří pomocí poševního zrcadla se světelným zdrojem s vnějším průměrem 30 mm. Identifikuje se děložní krček a kleštěmi se uchopí. Správné uchopení usnadňuje vstup do dělohy a průchod inseminačního zařízení. Tato část postupu vyžaduje mnoho odborných znalostí. Po průchodu děložního krčku se inseminační dávka aplikuje do dělohy (Youngquist a Threfall, 2007).

### **3.9.4 Intrauterinní laparoskopická metoda**

Tato metoda se provádí za použití speciálního zařízení a malého množství spermatu. Plemence se zafixuje ve hřbetní poloze s hlavou směrem dolů, pod úhlem přibližně 45°. Poté se 10–20 cm kraniálně od mléčné žlázy zastříhne srst a místo se dezinfikuje. Následně se zavede trokar a kanyla, skrze kterou je zavedena inseminační pipeta. Tento postup se provádí dvakrát, pro aplikaci inseminační dávky do obou děložních rohů. Po odstranění zařízení se může v místě punkce objevit krvácení, které lze zastavit přitlačením na ránu, stehy nebo sponkami. Můžou být podána profylaktická antibiotika (Youngquist a Threfall, 2007).

Ricardo Aké-Villanueva a kol. (2017) ve své studii dosáhl 60–70% spolehlivosti této metody. Anel a kol. (2006) uvádí, že je možná až 80%.

Laparoskopická metoda může být také použita k diagnostice patologických stavů reprodukčních orgánů plemenic a jejich následnému vyřazení (Anel a kol., 2005). Ve studii, kde Masoudi a kol. (2017) porovnával spolehlivost jednotlivých metod inseminace, měla laparoskopická metoda nejlepší výsledky. Nevýhodou ovšem je její složitost, relativně vysoká cena, potřeba vyškolených techniků a problémy týkající se dobrých životních podmínek zvířat (Anel a kol., 2006).

## 4 Závěr

Pro dosažení uspokojivých reprodukčních ukazatelů je důležité, abychom měli k dispozici kvalitní ejakulát.

Ze souhrnu vyplývá, že na jeho kvalitu mají vliv vnější a vnitřní faktory. Mezi vnější faktory patří frekvence a metoda odběru, roční období a výživa. Mezi vnitřní řadíme dědičné vlivy, zdravotní stav zvířete, jeho věk a rozměry. Pokud jsou negativní faktory těchto vlivů eliminovány, můžeme získat kvalitní vzorky.

Po odběru je nutné vyhodnotit jeho parametry. K tomu se využívá subjektivních metod, při kterých záleží na pozorovateli, jeho schopnostech a zkušenostech, nebo metod, jež jsou založeny na využití informačních technologií, jako je CASA a průtoková cytometrie. Na tyto metody je vhodné se v budoucnu zaměřit a dále je rozvíjet, neboť mají potenciál hodnotit vzorky velmi rychle a objektivně.

Důležitou částí postupu je také ředění a konzervace ejakulátu s následnou přípravou inseminačních dávek. Různé postupy mohou mít vliv na jejich finální kvalitu. Na reprodukci má také vliv zvolené metody inseminace.

## 5 Seznam použité literatury

- Abu, A. H., Kisani, A. I., Ahemen, T. 2016. Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary World*, 9(12), 1440–1444.
- Aoki, V. W., Emery, B. R., Liu, L., Carrell, D. T. 2006. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.* 27. 890-8.
- Ahmad, N., Noakes, D. E., 1996. Seasonal variations in the Semen quality of young British goats. *British Veterinary Journal.* 152(2), 225-236.
- Aké-Villanueva, J. R., Aké-López, J. R., Segura-Correa, J. C., Magaña-Monforte, J. G., & Aké-Villanueva, N. Y. 2017. Factors affecting conception rate of hair ewes after laparoscopic insemination with chilled semen under tropical conditions. *Small Ruminant Research.* 153, 114–117.
- Akpa, G. N., Suleiman, I., Alphonsus, C., Adu, A. 2012. The variation of age, hair type and body condition score with sperm morphology and cation concentration in yankasa ram. *Elixir Appl. Biology.* 47, 8629-8632.
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., & El Amiri, B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science.* ISSN 0378-4320
- Anel L., Kaabi M., Abroug B., Alvarez M., Anel E., Boixo J. C., De La Fuente L.F., Paz P., 2005. Factors influencing the fertility of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 63(4), 1235–1247.
- Aral, F., Aral, S. 2004. Comparison of semen collection methods in merino rams. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 28(1), 47-53.
- Benia, A. R., Ait-Amrane, A., Belhamiti, T. B., Selles, S. M. A., Saadi, M. A., Kaidi, R. 2018. Effect of season and age on main characteristics of sperm production in the Ouled-Djellal rams. *Livestock Research for Rural Development.* 20(1).
- Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Bertol, M. A. F., Abreu, A. C. M. R., Busato, E., Kozicki, L. E., Bicudo, S. D. 2017. Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18–25 °C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology.* 96, 69-75.

- Bodin, L., Robert-Granié, Ch., Manfredi E., Lagriffoul, G., Druart, X., David, I. 2007. Genetic and environmental effects on semen traits in Lacaune and Manech tête rousse AI rams (Open Access publication) *Genetics Selection Evolution*. 39(4), 405-419
- Bongso, T. A., Jainudeen, M. R., Siti Zahrah, A. (1982). Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology*, 18(5), 513–524.
- Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J. M., Mezzalira, A., Menchaca, A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*, 103, 30–35.
- da Silva, M. C., Oliveira Moura, L. C., das Neves Snoecle, P. P. 2010. Different solutions of hypoosmotic test for ram semen. *Revista brasileira de medicina veterinaria*. 32(3). 146-150.
- Dana, N.; Tegegne, A.; Shenkoru, T., 2000: Feed intake, sperm output and seminal characteristics of Ethiopian highland sheep supplemented with different levels of leucaena (*Leucaena leucocephala*) leaf hay. *Animal Feed Science and Technology*. 86, 239–249
- de Paz, P., Mata-Campuzano, M., Tizado, E. J., Álvarez, M., Álvarez-Rodríguez, M., Herraiz, P., & Anel, L. 2011. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*. 76(7), 1313–1325.
- Donovan, A., Hanrahan, J. ., Kummen, E., Duffy, P., & Boland, M. . 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*. 84(3–4), 359–368.
- Dott, H. M., Foster, G. C. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of Reproduction and Fertility*. 55. 161-166.
- Dulaimi, M. K. H. A. L., Tapaloaga, D., Tapaloaga, P., Petcu, Carmen D. 2015. Results Regarding Some Morphometric Features of Spermatozoa in Ram. *Conference Agriculture for Life, Life for Agriculture, Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 6, 232-235.
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M. T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F., Ledda, S. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207, 1–6.

- Furstoss, V., David, I., Leboeuf, B., Guillouet, P., Boué, P., Bodin, L. 2009. Genetic and non-genetic parameters of several characteristics of production and semen quality in young bucks. *Animal Reproduction Science*. 110(1), 25-36.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 53(5), 431-444.
- Gamčík, P., Kozumplík, J. a kol. 1992. *Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda. Bratislava, 298 s. ISBN 80-07-00540-4.
- Garcia-Macias, V., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Garde, J.J., Anel E., Anel L., Paz, P. de. 2006. Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*. 66(8), 1921-1930.
- Gouletsou, P. G., Fthenakis, G. C. (2015). Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 130-135
- Greyling, J. P. C., Grobbelaar, J. A. N., 1983. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13(4).
- Gungor, S., Ozturk, C., Omur, A. D. 2017. Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. *Veterinárni Medicína*. 62(5), 245-252.
- Hafez B., Hafez E. S. E. 2000. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 509 s. ISBN 0683305778.
- Hamamah, S., Gatti, J. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*. 13(4), 20-30.
- Hegedúšová, Z., Štolc, L., Louda, F., Čunát, L., & Vejnar, J. 2012. Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 60(6), 111-116.
- Horák, F., Axmann, R., Červený, Č., Doležal, P., Doskočil, J., Hošek, M., Hrbek, I., Humpál, J., Jůzl, M., Klimeš, J., Kuchtík, J., Literák, I., Mareš, V., Milerski, M., Novák, J., Pindák, A., Šlosárková, S., Šustová, K., Švéda, J., Tuza, J., Vagenknechtová, M., Veselý, P., Zeman, L. 2012. *Chováme ovce*. Brázda. 384 s. ISBN 978-80-209-0390-7.
- Hošek, M. 2014. *Sheep and goat insemination*. Mendel University in Brno, Brno. 116 s. ISBN 978-80-7509-411-7.

- Chesneau, D., Guillaume, D., Chemineau, P., Malpoux, B. 2017. Continuous light after 2 months of long days stimulates ram testis volume and increases fertility in spring. *Animal*. 11(7), 1189-1195
- Choquepuma, W., Ordoñez, C., Quispe, H., & Cucho, H. 2017. Effect of freezing on the ram sperm morphometric parameters. *SPERMOVA*. 1(7), 48–52.
- Choquepuma, W., Ordoñez, C., Quispe, H., Cucho, H. 2017. Effect of freezing on the ram sperm morphometric parameters. *Spermova*. 7(1), 48-52.
- Iwaniak, W., 2002. Ovine epididymitis in rams caused by *Brucella ovis*. *Medycyna Weterynaryjna*. 58(3), 181-184.
- Jelínek, F., Jelínek, K. 2002. *Morfologie hospodářských zvířat*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice. ISBN 80-7040-550-3.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 167, 103-108.
- Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Anel, L., Paz, P., Herraiz, P., Rouissi, H. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem *Theriogenology*. 60(7), 1249-1259.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., & Pelzer, K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. *Small Ruminant Research*, 99(2–3), 208–213.
- Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*. 44(2), 153-158.
- Kerton D. J., McPhee S. R., Davis I.F., White M.B., Banfield J.C., Cahill L.P. 1984. A comparison of insemination techniques in Corridale ewes. *Animal Production in Australia*. 15, 701.
- King, M. E., McKelvey, W. A. C., Dingwall, W. S., Matthews, K. P., Gebbie, F. E., Mylne, M. J. A., Robinson, J. J. 2004. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 62(7), 1236–1244.

- Kliment, J. 1989. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda. Bratislava. 392 s. ISBN: 800-70-002-75.
- Labuschagne, H. S.; Schwalbach, L. M. J.; Taylor, G. J.; Webb, E. C., 2002: The effect of age on reproductive and productive characteristics of young Bonsmara Bulls fed a high-energy diet. Proceedings of the 39th National Congress of the South African Society of Animal Science, Christiana, 13–16. May, p. 154.
- Louda F., Hegedüšová Z. 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktor šlechtitelské práce. Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín. 37 s. ISBN 978-80-87144-12-1.
- Louda, F., Čerovský, J., Jeřková, A., Stádník, L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita, Praha. 225 s. ISBN 80–213–0702–1.
- Malejane, C. M., Greyling, J. P. C., Raito, M. B. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. Agriculture, Dairy & Animal Science. 44 (1), 26-32.
- Carrera-Chavez, J. M., Quezada-Casasola, A., Perez-Eguia, E., Fabian Itza-Ortiz, M., Alberto Quintero-Elisea, J., Luis Gutierrez-Hernandez, J., Luis Tortora-Perez, J. 2016.
- Martínez-Rodríguez, C., Alvarez, M., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Anel, L., De Paz, P., Tizado, J. E. 2016. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. Reproduction, Fertility and Development. 28(11), 1825-1837.
- Marvan, F., Hampl, A., Hlořánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2007. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda, Praha. 304 s. ISBN 978-80-213-1658-4.
- Masoudi, R., Zare Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A., & Sharafi, M. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. Cryobiology. 74, 77–80.
- Matthews, N., Bester, N., Schwalbach, L. M. J. 2003. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electro-ejaculation. South African Society for Animal Science. 4(1), 28-30.



- Maurya, V. P., Sejian, V., Kumar, D., Naqvi, S. M. K. 2010. Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94(6), 308-317.
- Maxwell, WM, & Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*. 5(6), 613-638.
- Mia, M. M., Khandoker, M. A. M. Y., Husain, S. S., Faruque, M. O., Notter, D. R., Apu, A. S. 2013. Genetic and Phenotypic Parameters for Semen Characteristics and Their Relationship with Scrotal Circumference in Black Bengal Bucks. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 3(4), 709-717.
- Mohammed, K. M., Khalil, M. H., Al-Saef, A. M. 2013 Genetic analysis for semen traits in a crossing program of Saudi Aradi with Damascus goats. *Small Ruminant Research*. 112(1-3), 7-14.
- Montanero, J., Bravo, J. A., Calero, R., Montanero, J., Roy, T. J. 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Research*. 119(1-3), 114-119.
- Mortimer, D., *Practical laboratory andrology*. 1994. Oxford University Press, New York. 416 s. ISBN 0-19-506595-6.
- Mourad R., Mahjoub A., Mohsen B. S., Narjess L., Lotfi S. 2003. Using the Ram Effect as an Alternative to Ecg Before Artificial Insemination of Barbarine Ewes *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2(4), 225-230.
- Nalley, W. M. M., Arifiantini, R. I. 2013. THE HYPO-OSMOTIC SWELLING TEST IN FRESH GARUT RAM SPERMATOZOA. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 38(4).
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W., 2001. *Arthurs veterinary reproduction and obstetrics / edited by: David E. Noakes, Timothy J. Parkinson, Gary C. W. Saunders*, Edinburgh. 868 s. ISBN 0-7020-2556-9.
- Notter, D. R., Lucas, J. R., McClaugherty, F. S. 1981. Accuracy of estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. *Theriogenology*, 15(2), 227–234.

- Nur, Z., Ustuner, B., Sagirkaya, H., Gunay, U., Dogan, I., Zik, B.; Tutuncu, S., Ozguden, C. G. 2011. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2011, 58(4):267-272
- Olivares, C. C. S., de Souza-Fabjan, J. M. G., Balaro, M. F. A., Brandão, F. Z., da Fonseca, J. F., Freitas, V. J. F., de Oliveira, R. V. 2017. Comparison of Different Sperm Selection Techniques in Ram Frozen - Thawed Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45(1), 1-11.
- Ormerod, M. G. 2000. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. 3rd ed. Oxford University Press, New York. 276 s. ISBN:0-19-963824.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B., & Berg, K. A. 2004. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*. 61(9), 1719–1727.
- Pradieé, J., Cardoso, T. F., Silva, E. F., Gonçalves, A. O., Gastal, G. D. A., Mondadori, R. G., Vieira, A. D., Lucia, T., Pegoraro, L. M. C, Rosa, C. E. 2016. Effect of  $\beta$ -mercaptoetanol and cysteine on post-thawing quality and oxidative activity of ram sperm and on the viability of vitrified sheep embryos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 68(5), 1309-1315.
- Quan, G. B., Wu, G. Q., Wang, Y. J., Li, D. J., Ma, Y., & Hong, Q. H. 2016. Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Ruminant Research*. 134, 14–21.
- Reece, W. O., *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. 4th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, Ames. 577s. ISBN 978-0-813-81451-3.
- Rege, J. E. O., Toe, F., Mukasa-Mugerwa, E., Tembely, S., Anindo, D., Baker, R. L., & Lahlou-Kassi, A. 2000. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. *Small Ruminant Research*. 37(3), 173–187.
- Robinson, T.J., Moore, N.W., Lindsay, D.R., Fletcher, I.C., & Salamon, S. 1970. Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of spermatozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(5), 767.
- Root Kustritz, M. V. 2007. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Theriogenology*. 68(3), 329-337.

- Salamon, S., Visser, D. 1972. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal of Biological Sciences*. 25(3), 605-618.
- Salamon, S., Maxwell W. M. C., 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37(3-4), 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995b. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 38(1-2), 1-36.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., Firth, J.H. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5 °C. *Animal Reproduction Science*. 2(4), 373–385.
- Salmon, V. M., Castonguay, F., Demers-Caron, V., Leclerc, P., & Bailey, J. L. 2017. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*. 177, 1–11.
- Salvador, I., Silvestre, M. A., Viudes-de-Castro, M. P., Gomez, E. A., Yaniz, J. 2007. Effect of Different Extenders and Washing of Seminal Plasma on Buck Semen Storage at 5 C°. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6(2), 272-277.
- Samper, J. C. 2007. *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders Elsevier, St. Louis. 310 s. ISBN: 9781416052340.
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Brunet, A., & López-Sebastián, A. 2007. Horn quality and postmortem sperm parameters in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *Animal Reproduction Science*. 99(3–4), 354–362.
- Sarasa, M., Serrano, E., Soriguer, R. C., Granados, J., Fandos, P., Gonzalez, G., Joachim, J., Pérez, J. M. 2011. Negative effect of the arthropod parasite, *Sarcoptes scabiei*, on testes mass in Iberian ibex, *Capra pyrenaica*. *Veterinary Parasitology*. 175(3-4), 306-312.
- Seidel, G. E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*. 68. (3). 443-446.
- Shaken, M., Roshanfekar, H., Mamoei, M., Mirzadeh, Kh. 2008 Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3(6), 400-408.

Schakell, G. H., Kyle, B., Littlejohn, R. P., 1990. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. *Proc New Zeal Soc Anim Prod.* 50, 427–430.

Silva-Meirelles, J. R., Castro, M. L., Bergstein, T. G., Ferrari, M. V., & Dornbusch, P. T. 2017. Inseminação em ovelhas por videolaparoscopia por meio de acesso único: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia.* 69(5), 1163–1166.

Skalet, L.H. 1986. Effects of age and season on the spermiogram of Nubian male goats. MSc Thesis, Tuskegee University

Sperm quality in naturally infected rams with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research.* 144, 220-224.

Tapaloaga, D, Tapaloaga, P. 2016. Assessment of Some Morphometric Parameters in Ram Sperm Correlated with the Collection Method. 5th International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", Agriculture and Agricultural Science Procedia. 10, 340-354.

Tekpetey, F. R., Amann, R. P. 1988. Effects of exogenous melatonin prior to the breeding season on testis weight and epididymal androgen receptors in rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 5(3), 257–264.

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

Tufarelli, V., Lacalandra, G. M., Aiudi, G., Binetti, F., Laudadio, V. (2010). Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), 339–345.

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

Vanderwall, D. K. 2008. Counting Spermatozoa with a Hemacytometer. *Journal of Equine Veterinary Science.* 28(4), 244-246.

Vásquez, J., Florentini, E. A., Camargo, L. A., Gonzales, J., & Valdivia, M. (2013). Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. *Livestock Science*, 157(2–3), 618–622.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1), 149-179.

Youngquist, R. S., Threfall, W. R. 2007. *Current therapy in large animal heriogenology*. Saunders, Philadelphia. 1061 s. ISBN 978-0-7216-9323-1.

Yunusa A. W., Sonnie J. O., Peter I. R., Oluyinka O. O. 2016. Testicular pathology, gonadal and epididymal sperm reserves of Yankasa rams infected with experimental *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. *Veterinary World* 9(7), 759-765.