

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Porovnání ředidel pro ejakulát býků ve vztahu
k přežitelnosti spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Neužilová

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Porovnání ředidel pro ejakulát býků ve vztahu k přežitelnosti spermií" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Luďkovi Stádníku, Ph.D. za vedení práce a Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za odborný dohled, pomoc s analýzou laboratorních a statistických dat, ochotu a jeho cenné rady.

Děkuji také svým nejbližším a kolegům za jejich podporu, kterou mi poskytli během celé doby studia.

Porovnání ředidel pro ejakulát býků ve vztahu k přežitelnosti spermií

Souhrn

Inseminace je jednou z klíčových metod prováděné šlechtitelské práce v chovu skotu. Pro úspěšně provedenou inseminaci je však důležité získání a uchování kvalitních inseminačních dávek, s vysokým procentem živých spermií. Mezi důležité faktory, které výslednou přežitelnost spermií ovlivňují, patří zejména vlastnosti používaných ředidel.

Cílem diplomové práce bylo zjistit vliv různých typů ředidel na aktivitu spermatických buněk býčího ejakulátu po rozmrazení. Hypotézou byl předpoklad, že odlišné komponenty obsažené v ředidlech mají na kvalitu spermatických buněk také odlišné účinky, a to zejména přítomnost vaječného žloutku.

Pro hodnocení byla vybrána 3 komerčně nabízená ředidla. Dvě založená na bázi vaječného žloutku – Optidyl®, kde je žloutek přidáván již ve výrobě a Bull-x-cell®, do kterého je čerstvý žloutek přidáván při jeho přípravě a jedno bezvaječné – AndroMed®.

Pro odběr ejakulátu bylo použito 12 býků dvou různých plemen z jedné inseminační stanice. Od těchto dvanácti býků bylo získáno během tří odběrových dnů 15 ejakulátů splňujících vstupní požadavky. Každý ejakulát byl rovnoměrně rozdělen na 3 díly a každý z dílů nařazen jedním z ředidel. Všechny připravené vzorky inseminačních dávek byly za stejných podmínek zmrazeny a uloženy do tekutého dusíku. Následně byly v laboratoři postupně rozmrazovány a jejich kvalita byla ověřována krátkodobým tepelným testem přežitelnosti. Získané výsledky byly statisticky zhodnoceny.

Ihned po rozmrazení nebyla zaznamenána výrazná odlišnost aktivity spermií v jednotlivých ředidlech (Optidyl® 51,2 %, Bull-x-cell® 50,1 %, AndroMed® 50 %). Nicméně v průběhu krátkodobého tepelného testu byla zjištěna na hladině významnosti ($p \leq 0,05$) statistická významnost v časech pozorování 1,5 a 2 hodiny mezi ředidlem žloutkovým Optidyl® (28,6 % a 20 %) a bezžloutkovým AndroMed® (22,8 % a 14,1 %). V ředidle Optidyl® byla také, jako v jediném, zjištěna nejvyšší maximální hodnota aktivity spermatických buněk ihned po rozmrazení ID (80 %). Ředidlo Optidyl®, kam je vaječný žloutek přidáván již při výrobě, lze tedy jednoznačně doporučit. Jako důležitý faktor byla hodnocena také individualita jednotlivých býků.

Klíčová slova: skot, plodnost, spermie, motilita, oplození

Comparison of diluters for bull semen in relation to sperm survivability

Summary

The insemination is one of the key methods of the performed cattle breeding. In order for the insemination to be successful it is important to get and store high quality insemination doses, which contain high percentage of live sperms. One of the important factors, which particularly effect the final survival of the sperms, is the dilution quality.

The main aim of this diploma thesis was to find out the impact of the different types of dilution on the bull semen activity after defrosting. According to the hypothesis, the different components contained in the dilutions have also a different impact on sperm cells, especially the presence of an egg yolk.

Three commercially sold dilutions were chosen for the evaluation. Two dilutions were on the egg yolk basis - Optidyl®, to which production the egg yolk is added; Bull-x-cell®, to which is the fresh egg yolk added during its preparation; and AndroMed® which is eggless.

For the collection of the ejaculate were used twelve bulls of two different breeds from one insemination station. Fifteen ejaculates which met the necessary entering requirements were gained from those twelve bulls within three days. Each ejaculate was equally divided into three parts and each of those was diluted with one of the dilutants. All the prepared insemination doses were frozen under the same conditions and were then stored in liquid nitrogen. They were then subsequently defrosted one by one and their quality was checked by a short-term thermal survivability test. Gained results were then statistically evaluated.

Right after the defrosting, no distinct difference in the sperm activity was recorded in the diluents (Optidyl® 51,2 %, Bull-x-cell® 50,1 %, AndroMed® 50 %). Nevertheless, during the short-term thermal test a statistical significance was recognized ($p \leq 0,05$) and so, during the observation times 1 hour and 30 minutes and 2 hours in the yolk diluents Optidyl® (28,6 % a 20 %) and in the eggless diluents AndroMed® (22,8 % a 14,1 %). The highest maximal value of the sperm cell activity right after defrosting was discovered only in one of the diluents, Optidyl® - ID (80 %). Diluent Optidyl®, where the egg yolk is added already in its production, is, therefore, definitely to be recommended. The individuality of each bull was also assed as an important factor.

Keywords: cattle, fertility, sperm, motility, fertilization

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Cíl práce..... | 9 |
| 3. Literární rešerše..... | 10 |
| 3.1.Historie inseminace a používání ředidel..... | 10 |
| 3.2.Spermatogeneze..... | 11 |
| 3.3.Spermie a jejich metabolismus..... | 12 |
| 3.4.Pohlavní aktivita býků..... | 13 |
| 3.5.Býčí ejakulát a ejakulace..... | 14 |
| 3.6.Podmínky pro výběr býků do inseminace..... | 15 |
| 3.6.1. Odchov plemenných býků..... | 15 |
| 3.6.2. Hodnocení zkoušky vlastní užitkovosti..... | 17 |
| 3.6.3. Výživa a krmení býčků v odchovu..... | 17 |
| 3.7.Odběr ejakulátu..... | 19 |
| 3.7.1. Hodnocení znaků kvality čerstvě odebraného ejakulátu..... | 21 |
| 3.7.1.1.Stanovení objemu ejakulátu..... | 22 |
| 3.7.1.2.Stanovení koncentrace spermií..... | 22 |
| 3.7.1.3.Stanovení aktivity spermií..... | 23 |
| 3.7.1.4.Stanovení živých a mrtvých spermií..... | 23 |
| 3.7.1.5.Morfologický počet spermií..... | 24 |
| 3.7.2. Ředění a ředidla ejakulátu..... | 24 |
| 3.7.2.1.Požadavky na ředidla..... | 25 |
| 3.7.2.2.Význam vaječného žloutku v ředidlech..... | 25 |
| 3.7.2.2.1. Ochranné účinky LDL při kryokonzervaci..... | 26 |
| 3.7.3. Výroba inseminačních dávek..... | 27 |
| 3.7.3.1.Identifikace inseminačních dávek..... | 27 |
| 3.7.3.2.Konzervace ejakulátu..... | 28 |
| 3.7.3.3.Rozmrazování inseminačních dávek..... | 28 |
| 3.7.3.4.Hodnocení zmrazeného ejakulátu..... | 29 |
| 3.7.3.5.Změny působící na kvalitu inseminační dávky..... | 29 |
| 3.8.Vlivy působící na úroveň reprodukce..... | 30 |
| 3.8.1. Vliv technologie ustájení..... | 30 |
| 3.8.2. Vzájemný vztah mléčné užitkovosti a plodnosti..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 3.8.3. Vliv výživy..... | 31 |
| 3.8.4. Vliv zdravotního stavu..... | 31 |
| 3.8.5. Vliv kondice..... | 32 |
| 3.8.6. Vliv věku..... | 32 |
| 4. Materiál a metodika..... | 34 |
| 4.1.Charakteristika odebraných býků..... | 34 |
| 4.2.Příprava ředidel..... | 34 |
| 4.2.1. AndroMed®..... | 35 |
| 4.2.2. Optidyl®..... | 35 |
| 4.2.3. Bull-x-cell®..... | 35 |
| 4.3.Odběr a zpracování spermatu..... | 36 |
| 4.4.Hodnocení přežitelnosti spermií..... | 36 |
| 4.5.Statistické vyhodnocení výsledků..... | 37 |
| 5. Výsledky..... | 40 |
| 5.1.Výsledky statistiky vlivu ředidla..... | 40 |
| 5.1.1. AndroMed®..... | 40 |
| 5.1.2. Optidyl®..... | 40 |
| 5.1.3. Bull-x-cell®..... | 41 |
| 5.2.Výsledky statistiky dle plemene..... | 41 |
| 5.3.Výsledky statistiky dle býka..... | 41 |
| 5.4.Korelační analýza..... | 42 |
| 6. Diskuze..... | 43 |
| 7. Závěr..... | 47 |
| 8. Seznam literatury..... | 48 |
| 9. Seznam použitých zkratk..... | 53 |
| 10. Samostatné přílohy..... | 54 |
| 10.1. Seznam tabulek..... | 54 |
| 10.2. Seznam grafů..... | 54 |
| 10.3. Seznam obrázků..... | 54 |

1. ÚVOD

Inseminace hospodářských zvířat je v dnešní době jednou z nejefektivnějších, nejlepších a hlavně základní biotechnickou metodou v rozmnožování zvířat, které jsou u nás využívány. Jedná se o nejúčinnější a nejrozšířenější metodu způsobu přenosu požadovaných genetických vlastností v populaci daného plemene či druhu.

Zavedení inseminace do chovu skotu umožnilo lidstvu posunout hranice šlechtitelské práce na tak vysokou úroveň, že je v současné době nejvíce využívanou metodou v plemenitbě dojného skotu. Výrobou inseminačních dávek s možností konzervace a dlouhodobého uchovávání semene došlo k umožnění využití světového obchodu. Což vede společně se zvyšováním užitkovosti k posílení ekonomické stránky a tím také k zajištění základního kritéria v chovu skotu, kterým je zisk.

Nezbytnou součástí přípravy inseminačních dávek jsou ředidla býčího ejakulátu. Bez ředidel by nebylo možno zajistit vhodné podmínky a prostředí pro přežívání spermií mimo živý organismus. Pro ředění odebraného ejakulátu jsou stanoveny podmínky, při jejichž nedodržení dochází k znehodnocování celého odběru. Proto musí ředidla zajišťovat optimální podmínky pro přežitelnost spermií a pro zajištění jejich základních životních funkcí.

Vhodná ředidla musí zajistit dostatečné množství energie odebraným spermiím, pH ředidel musí dosahovat optimálních hodnot, musí být zajištěn vhodný osmotický tlak, puřovací schopnost, výše hladiny elektrolytu a samozřejmě je sterilita, hygienická čistota a netoxicitata. Pokud jsou všechny tyto podmínky dodrženy, mohou vznikat kvalitní inseminační dávky, které zajistí rychlejší genetický pokrok, možnost využívání kvalitnějších býků, nebo býků ze zahraničí a v neposlední řadě může být využíván individuální přípařovací plán.

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zjištění, zda má použití různých druhů komerčně vyráběných ředidel vliv na aktivitu a přežitelnost spermií v odebraném býčím ejakulátu. Vybrány byly tři druhy ředidel, s rozdílným zastoupením jednotlivých komponentů obsažených v ředidlech a pomocí jedné z biologických zkoušek ejakulátu, konkrétně pomocí využití tepelného testu přežitelnosti, zjišťována aktivita spermatických buněk po rozmrazení ejakulátu.

Hypotézou je předpoklad, že odlišné zastoupení jednotlivých složek, především přítomnost vaječného žloutku, má kladné účinky na přežitelnost spermatických buněk po rozmrazení inseminačních dávek při jejich dlouhodobém uchovávání v parách tekutého dusíku.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Historie inseminace a používání ředidel

Kořeny inseminace skotu spadají někam na začátek dvacátého století. První pokusy o provedení inseminace hospodářských zvířat proběhly v Rusku okolo roku 1930 a v následujících deseti letech byly inseminační dávky komerčně využívány také v Anglii a USA (Peters et Ball, 1995). Zásadní rozvoj však nastal až v druhé polovině dvacátého století. Spojován je se jménem Osborndale Ivanhoe (1952 – 1963), býkem holštýnského plemene, který byl od roku 1958 ve Spojených státech amerických opakovaně využíván k inseminaci. Osborndale Ivanhoe měl obrovský genetický potenciál, zplodil mnoho slavných potomků a dal základy inseminaci chovu holštýnského skotu (Spahr et Opperman, 1995).

Boštík et Hudeček (2008) uvádí, že u nás, ještě v tehdejší Československé republice, vznikla 1. inseminační stanice plemenných býků v roce 1946 v Osíku u Litomyšle a tím došlo k zavedení inseminace býků do běžné praxe. Byla to také první inseminační stanice ve střední Evropě. V roce 1948 následovala výstavba stanic v Královohradeckém kraji a to v Chlumci nad Cidlinou, Polici nad Metují, Semechnicích u Dobrušky, Jeřicích na Hořicku a dále i v ostatních krajích. Jednalo se o období po druhé světové válce, kdy bylo nutné zajistit rozvoj českého zemědělství, pozvednout proces šlechtění a vymýtit pohlavní choroby, které se ve stádech markantně rozšířily. Inseminace nabývala na profesionální úrovni. V druhé polovině padesátých let byl zaveden odhad plemenné hodnoty býků metodou CC testu, která byla v polovině osmdesátých let nahrazena přesnější metodou BLUP (Říha et al., 1999).

Vyráběné inseminační dávky bylo nutné naředit, aby došlo k zajištění vhodného prostředí pro přežitelnost spermií. Při normálních podmínkách mají totiž spermie schopnost přežít pouze 24 hodin. Využívána začala být ředidla na typu glycerinu, která tuto dobu výrazně prodloužila. Inseminační dávky byly po naředění uchovávány krátkodobě (3 – 4 dny) v čerstvém stavu, nebo mražené při teplotě $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ na suchém ledu.

Bylo však nutné řešit otázku dlouhodobé konzervace semene. To měly zajišťovat biologické kontejnery určené pro uchovávání inseminačních dávek v tekutém dusíku, které jsou využívány dodnes. První úspěšné zmražení ejakulátu bylo provedeno v roce 1950 Smithem a Polgem (Louda et Čeřovský, 1994). Kryokonzervace se tak stala revoluční metodou v chovu skotu. Jednou z prvních inseminačních stanic u nás, která zavedla zmrazování dávek pomocí tekutého dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, byla v roce 1964 stanice v Polici nad Metují. Kontejner byl americké výroby a umožňoval uskladnit až 70 000 inseminačních dávek. Získat v této

době cokoliv ze západních zemí bylo prakticky nemožné, proto se jednalo o velmi významný počin (Kadečka, 2008).

Organizačně spadala inseminace zpočátku pouze do činnosti pokrokových chovatelů, postupně však byly veškeré chovatelské organizace zrušeny a tuto činnost převzal stát. Nad veškerými inseminačními stanicemi tak dohlížel Státní plemenářský podnik a chovatelé neměli možnost do inseminace jakkoliv zasahovat. Zvrat nastal až v roce 1989, kdy došlo k privatizaci inseminačních stanic a pracovišť, která zajišťovala inseminaci. Opět se k této činnosti dostali chovatelé a od roku 1990 byly zakládány různé chovatelské organizace. V roce 1996 byla založena Českomoravská společnost chovatelů s.r.o., zastoupená jednotlivými svazy chovatelů, která dodnes zajišťuje veškerou inseminační činnost prováděnou na území našeho státu (Hofírek et al., 2009).

Zavedením inseminace do běžné praxe a tím i umožněním dlouhodobé konzervace inseminačních dávek došlo k ohromnému navýšení možnosti umělého oplodňování od jediného pleménika. Zmražené inseminační dávky se daly lehce a jednoduše přepravovat po celém světě, čímž bylo umožněno zvýšení příbuznosti jednotlivých plemen skotu, a tím i celkového genetického vylepšení populací (Kulovaná, 2002).

3.2.Spermatogeneze

Ke spermatogenezi, neboli tvorbě samčích pohlavních buněk – spermií, dochází ve stočených semenotvorných kanálcích varlat. Celá spermatogeneze, která u býků trvá 35 dní, je rozdělena do dvou fází. Jedná se o období spermatocytogeneze a období spermatohistogeneze. Spermatocytogeneze je období zahrnující množení spermatogonií, jejich dělení až po následný vznik spermatid s polovičním počtem chromozomů (Tichý et al., 2004).

Spermatocytogeneze probíhá uvnitř semenotvorných kanálků, kde se nachází kmenové buňky, zodpovědné za vznik spermatogonií a Sertoliho buňky, zajišťující ochranu a výživu vyvíjejícím se spermiím. Ve středu kanálku je pak shromažďována varletní tekutina, která je secernována Sertoliho buňkami. Kmenové buňky mají kulovitý tvar a jsou umístěny při bazální části semenotvorných kanálků. Nazývají se spermatogonie (Reece, 1998).

Peters et Ball (1995) popisují, že spermatogonie dále prochází mitotickým dělením a vznikají dvě buňky dceřiné se stejným počtem chromozomů. Jedna z těchto buněk zůstane na původní bazální části kanálku, druhá dceřiná buňka, nazývaná spermatogonie typu „A“ prochází přes stěnu Sertoliho buněk a migruje do blízkosti středu kanálku. „A“ spermatogonie prodělávají další mitotické dělení a vzniká tak mnoho buněk, nazývaných spermatogonie typu „B“.

Posledním mitotickým dělením dochází k tvorbě primárních spermatocytů. Jedná se o kulovité buňky uložené v zárodečném epitelu nad spermatogoniemi, se světlou cytoplazmou a hrubou strukturou jader. Primární, nebo také spermatocyty I. řádu obsahují stále ještě dvě sady chromozómů (Tichý et al., 2004).

Při dalším dělení, které je již meiotické, dochází ke vzniku sekundárních spermatocytů. Sekundární spermatocyty, nebo také spermatocyty II. řádu jsou uloženy blíže středu kanálku a jsou v porovnání s primárními spermatocyty menší. V průběhu dalšího meiotického dělení vznikají spermatidy, které mají již poloviční počet chromozómů. Z jedné spermatogonie vznikne u býka v průběhu těchto dělení 64 spermatid (Reece, 1998).

V období spermatohistogeneze dochází k přetvoření spermatid ve zralou spermii. K dozrávání spermatid dochází v blízkosti centrálního středu semenotvorného kanálku a zahrnuje v sobě procesy změn cytoplazmatických a jaderných, které jsou označovány jako spermiogeneze. Během spermiogeneze dojde také k vytvoření bičíků a tím k přeměně nepohyblivých spermatid na buňky relativně pohyblivé. Po dozrání spermatid dojde k vytvoření spermií, které přechází do středu kanálku a společně s varleční tekutinou jsou splavovány do hlavy nadvarlete. V nadvarleti pak spermie prochází řadou morfologických a metabolických změn a současně dochází ke zvyšování jejich pohyblivosti. Děje se tak v závislosti na přítomnosti dihydrotestosteronu, derivátu testosteronu a případně aldosteronu z kůry nadledvin. Po průchodu nadvarletem jsou spermie shromažďovány v ocasu nadvarlete (Peters et Ball, 1995).

3.3.Spermie a jejich metabolismus

Spermie jsou samčí pohlavní buňky, které mají za úkol vyhledat vajíčko, proniknout do něj a přenést genetickou informaci. Býčí spermie dosahuje velikosti 68,9 – 73,9 μm (Věžník et al., 2004). Celý povrch pokrývá cytoplazmatická membrána, která je tvořena stejně jako u ostatních obratlovců hlavou, krčkem a ocasem (Tichý et al., 2004).

Na hlavě se nachází akrozom, dále následuje postakrozomální oblast, která nasedá na krček. Krček odděluje hlavu spermie a ocas spojovací částí bičíku. Následuje prstenec, hlavní část bičíku a koncová část bičíku (Hafez et Hafez, 2000).

Hlavička má oválný a ze stran zploštělý tvar. Velikost hlavičky v poměru délka x šířka x tloušťka dosahuje rozměrů 9,5 x 4,1 x 1,6 μm . Převážnou část hlavičky od apikálního konce pokrývá akrozom. Jedná se o organelu obsahující glykosaminoglykany a enzymy (kyselou fosfatázu, hyaluronidázu, neuraminidázu a trypsinu podobnou protoázu – akrosin), které jsou schopny rozštěpit při akrozomální reakci zónu pellucidu oocyty a umožnit tak průnik

spermiím. Nejdůležitější organelou hlavičky je poměrně malé jádro, které je nositelem genetické informace (Tichý et al., 2004).

Krček obsahuje proximální centriol, který je uložen centrálně. Podélně je pak uloženo devět segmentovaných chord. Krček tak umožňuje spojení postakrozomální pochvy hlavičky a spojovací části bičíku o délce 14,8 μm (Věžník et al., 2004).

Bičík, který je dlouhý v rozmezí 50 – 55 μm je nejdelší částí spermie. Složen je ze tří segmentů – středního, hlavního a koncového. Jeho funkcí je zajišťování aktivního pohybu spermií směrem vpřed za hlavičkou a tím k možnosti posunu k oocytu.

Pohyb spermie zajišťuje energie ve formě ATP, která vzniká v mitochondriální spirále a je přeměňována na mechanickou energii za pomoci komplexu axiálních vláken. Proces přeměny ATP v sobě zahrnuje reversibilní hydrolyzu na ADP. Energie, která při této reakci vznikne je přenesena do vláken bičíku, který je za pomoci svých vnitřních struktur schopen vykonat pohyb. Energie potřebná pro pohyb spermií je získávána také dýcháním, kdy jsou spermie za přítomnosti kyslíku schopny přeměnit respirační kyselinu mléčnou nebo pyrohroznovou na energii (Věžník et al., 2004).

Pohyblivost, nebo také motilita je závislá i na pH prostředí. Mírně zásadité prostředí motilitu podporuje, mírně kyselé prostředí pak motilitu tlumí. Hodnota pH 4, tedy pH poševního prostředí, motilitu spermií úplně zastaví. Protože pohyb spermií je vždy proti proudu, dochází ke stimulaci pohybu produkcí sekretů. Býčí spermie přežívá v pohlavním ústrojí samice až několik dní, schopnost oplodnit oocyt má však pouze 20 – 30 hodin (Tichý et al., 2004).

3.4. Pohlavní aktivita býků

Hofírek et al. (2009) uvádí, že vývoj samčích pohlavních orgánů je započat již během embryonálního stádia, kdy dochází působením maskulinních faktorů k založení varlat. Ještě během nitroděložního vývoje sestupují varlata do šourku. V prvním měsíci života se začíná formovat předkožkový vak, ve druhém měsíci se v předkožkovém vaku uvolňuje hrot pyje. Esovité zakřivení pyje se formuje ve třetím měsíci života. Sekreční činnost varlat je dána již při jejich tvorbě v embryonálním stádiu. Produkce androgenů však po narození prudce klesá a navyšuje se až s růstem varlat cca ve 3. - 4. měsíci. Následně se začínají utvářet semenotvorné kanálky a po pátém měsíci jsou býci schopni spermiogeneze. Spermie se v semenotvorných kanálcích začínají objevovat od 7 měsíce života, od 10 měsíce je možno prověřovat u býků kvalitu ejakulátu. Plnohodnotného ejakulátu je však dosahováno až po jednom roce života. Pro účely inseminace začínají být býci využíváni ve věku 2 – 3 let stáří (Peters et Ball, 1995).

Pohlavní dospělost nastává u býků mléčných plemen o něco dříve než u masných plemen. Je to dáno zejména hmotností, kdy jedinci s větším tělesným rámcem dosahují obecně pohlavní dospělosti při dosažení vyšší hmotnosti než jedinci s malým tělesným rámcem. Z části je dosažení pohlavní dospělosti ovlivněno také geny s pleiotropním účinkem (Říha et al., 2004).

Pohlavní aktivita u dospělých býků ve stádě se projevuje po celou dobu. Býk vyhledává říjící se plemence, zaznamenává jejich hlasové projevy. Při vyhledávání využívá své smysly a to zejména čich a zrak. Využívá pachových podnětů – feromonů a registruje plemence, které na sebe naskakují. K plemenicím se přibližuje, očichává jejich slabiny, očichává a olizuje jejich moč. Jedná se o tzv. lokomoční - sblížovací reflex. Po očichání následuje reflex objímací, doprovázený flémováním a hrdelním bučením býka. Býk pokládá plemenci hlavu na záď a pokouší se o vzeskok. Následuje reflex kopulační a ejakulační (Louda et al., 2007).

Jedním ze základních požadavků dobré plodnosti býka je výraz jeho libida. Libido je hodnoceno podle síly a rychlosti nástupu a průběhu jednotlivých reflexů, zejména kopulačního reflexu, tedy schopnosti páření. Hofírek et al (2009) uvádí, že u býků zařazených do umělé inseminace je libido hodnoceno v pěti stupních. Nejsilnější stupeň pohlavní aktivity je označován jako L4 a projevuje se prudkým chováním, nástupem erekce již při pouhém spatření plemence a reflexem vzeskoku zpravidla do 2 minut. Označení L3 značí normální stupeň pohlavní aktivity s reflexem vzeskoku do 5 minut. Stupně L2 a L1 jsou označovány jako slabší s realizací vzeskoku do několika desítek minut a stupeň označený jako L0 odpovídá nedostatečné pohlavní aktivitě býka s naprostým nezájmem o plemenci či atrapu. K vzeskoku zpravidla vůbec nedojde.

3.5. Býčí ejakulát a ejakulace

Ejakulát býků je tvořen bělavou nažloutlou smetanovitou tekutinou viskózního charakteru, slabě zásadité reakce a charakteristické vůně po čerstvě nadojeném mléce. Ejakulát obsahuje dvě složky. Tekutou částí, která zaujímá také větší část (90-95 %) je semenná plazma. Podstatně menší, buněčnou částí jsou spermie. Býčí ejakulát se vyznačuje malým objemem s velkou koncentrací spermií, která činí 0,2 - 2 mil./ μ l (Marvan et al., 1992).

Spermie jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích varlat, semenná plazma je produktem přídatných pohlavních žláz. Objem býčího ejakulátu se pohybuje v rozmezí 2 – 10 ml (Louda, 2001). Na tomto poměrně velkém rozdílu v objemu ejakulátu se podílí mnoho faktorů. Mezi nejvýznamnější patří roční období, délka světelného dne, teplota, výživa, věk, podmínky ustájení, ošetřování a celkový zdravotní stav zvířete. Všechny tyto faktory ovlivňují celkovou

funkci pohlavních orgánů, včetně sekreční činnosti přídatných pohlavních žláz. Peters et Ball (1995) uvádí, že na objem býčího ejakulátu má vliv také stáří býka. Mladí býci vyprodukují v průměru 1 – 2 ml, u starších velkých býků je to až 15 ml.

Ejakulace je řízena z reflexního centra páteřní míchy, odkud jsou vysílány podněty pro výron semene. Spermie a tekutina z ampule chámovodu a přídatných pohlavních žláz jsou vypuzeny do močové trubice. Inervací a činností sympatiku dochází k posouvání ejakulátu peristaltickými pohyby močovou trubicí k vnějšímu otvoru na žalud pyje. Peristaltické pohyby zabraňují také zpětnému toku semene a semenné plazmy. Celá ejakulace je podmíněna stimulací sensorických nervů umístěných v žaludu penisu (Reece, 1998).

Kopulace u býka trvá jen několik vteřin a k ejakulaci dochází až v samotném závěru jednorázovým výronem semene. Těsně před vypuzením spermatu dochází k aktivaci bulbouretrálních žláz, které produkují sekret, upravující pH močové trubice. Prostředí močové trubice se tak stává vhodné pro průchod spermii. Sekret neutralizuje kyselé prostředí a zároveň zajistí vnitřní povrch více hladký, pro snazší průchod spermatu (Louda, 2001).

3.6. Podmínky pro výběr býků do inseminace

Podle zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), může být k plemenitbě použito pouze sperma plemeníků, kteří jsou registrováni v ústředním registru plemeníků. Plemeník je registrován na základě žádosti, která obsahuje doklad o výběru plemeníka, doklad o zápisu plemeníka do plemenné knihy, osvědčení o ověření původu nebo o genetickém typu, potvrzení původu a osvědčení o negativním výsledku testů na BLAD a CVM. Při dovozu plemeníků ze zahraničí jsou požadovány ještě další doklady uvádějící např. plemennou hodnotu a genetický typ.

Vybírání jsou většinou býci ze záměrného připařování. Býci pro inseminaci musí dosahovat požadované úrovně rodokmenové hodnoty (RH), což je průměrná aktuální plemenná hodnota nebo selekční index obou rodičů. Dalším kritériem je zdravotní stav, růstový standart a funkční utváření zevnějšku bez zjevných vad a genetických poruch.

3.6.1. Odchov plemenných býků

Před samotným odchovem plemenných býků je nutné neopomenout období do odstavu, které je pro budoucího plemeníka velice důležité. Důraz je kladen zejména na vyrovnaný růst v tomto období, který je základním předpokladem úspěchu býka v testu. Na podmínkách odchovu býčků se nejvíce podílejí chovatelské svazy jednotlivých plemen. Odchov probíhá

různě u jednotlivých typů plemen podle vypracovaných metodik pro provoz a podmínky odchovu (Louda et al., 2007).

Býci mléčných plemen jsou odchováni chovatelem nebo v odchovně plemenných býků, masná plemena jsou odchována ve schválených odchovnách přímo u chovatele nebo v odchovnách plemenných býků a býčci kombinovaných plemen jsou odchováni v centrální odchovně býků. Rozdíl mezi jednotlivými typy plemen je také v provádění zkoušky vlastní užitkovosti, která se u mléčných plemen během odchovu neprovádí (Louda, 2001).

U masných plemen jsou býčci vykupováni do odchoven zpravidla po odstavu. Kromě zkoušky vlastní užitkovosti je dále prováděno testování spotřeby krmiv a u býků využívaných pro inseminaci také prověřování kvality spermatu. Býčci jsou v odchovnách plemenných býků rozděleni do tří turnusů, podle rozmezí měsíců data narození. Důležité je zařadit v turnusu býky do jednotlivých skupin podle hmotnosti, věku a plemene s maximálním počtem do 10 kusů. Početně nejvíce zastoupeným turnusem je první turnus – býci narození od listopadu do března. Prodej pak probíhá v měsících duben až květen. Odchov býčků v odchovnách plemenných býků je rozčleněn do tří období. Jedná se o přípravné období, trvající 30 dní. Po tuto dobu má být zajištěna adaptace býčka do prostředí a podmínek odchovny. Býčkům je zaveden nosní kroužek. Po uplynutí třiceti dnů probíhá vlastní test, trvající 120 dní. Následuje období po skončení testu, trvající minimálně 20 dní, které slouží k přípravě býka pro základní výběr (Malát, 2012).

Býčci kombinovaných plemen s přiměřenou hmotností a bez exteriérových vad, jsou vykupováni do odchoven ve věku cca 120 dní. Ustájení je vazné nebo volné, kdy jsou tvořeny skupiny po 15 kusech. Důležité je zachovat mezi jedinci minimální věkový rozdíl. Cílem testu vlastní užitkovosti je zjišťování růstové schopnosti ve vztahu ke spotřebě krmiv. Zkouška vlastní užitkovosti trvá od 121. do 365. dne věku býka. Do roku 1999 byl test ukončen až ve věku 420 dnů (Kulovaná, 2001).

Každý býk má zaveden v počítači svou evidenční kartu, do které jsou zaznamenávány údaje o průměrném denním přírůstku hmotnosti v období zkoušky, o kapacitě těla a tělesného rámce vyjádřeného výškou v kříži ve 365 dnech věku býka. Doplněny jsou také údaje o hmotnosti býka ke dni výběru pro plemenitbu, průměrný denní přírůstek hmotnosti od narození do výběru a vlastní plemenná hodnota pro růst. Ve věku 14 měsíců jsou býci zařazováni do plemenitby a nabízeny organizacím nebo chovatelům (Louda et al., 2007).

U býčků mléčných plemen není během testace zjišťována jejich vlastní užitkovost, nýbrž je prováděno testovací připarování, díky kterému je získán dostatečný počet informací o vlastnostech dcer pro zvýšení spolehlivosti odhadu PH. Do testace jsou zařazováni býčci maximálně do 24 měsíců věku a samotná testace trvá optimálně 2 – 3 měsíce (nejdéle 6 měsíců).

3.6.2. Hodnocení zkoušky vlastní užitkovosti

Selekčními kritérii pro hodnocení testace zkoušky vlastní užitkovosti jsou průměrný denní přírůstek živé hmotnosti v období testu, výška v kříži, průměrný denní přírůstek od narození do základního výběru a spotřeba jadrných krmiv na 1 kg přírůstku.

Průměrný denní přírůstek v období testu od narození do základního výběru je zjišťován vážením býků, které se provádí při přesunu býka do odchovny a dále pak na začátku a na konci testace a to dva po sobě jdoucí dny. Výška v kříži je měřena na konci testace ve věku 365 dnů. Měřeny jsou i další tělesné rozměry, jako např. výška v kohoutku, šířka a délka pánve atd. Hodnoty se evidují v Evidenční kartě odchovu býka (Louda, 2001).

Ve věku od 10 – 12 měsíců je u býčků prováděna kontrola kvality spermatu a současně s tím i pohlavní aktivity. Zkouška je prováděna jedenkrát týdně a býk je tak zároveň připravován na odběr do umělé vagíny. U odebraného ejakulátu je hodnocen objem, koncentrace a výskyt patologických spermií. Dále se hodnotí vývin varlat a nadvarlat, schopnost vysunování pyje, průběh ejakulace, temperament a pohlavní aktivita zvířete.

Kromě těchto stanovených kritérií je hodnocen exteriér zvířat. Hodnocení provádí předem sestavená komise, složená z pracovníků Českého svazu chovatelů masného skotu i jednotlivých chovatelů. Jednotlivé znaky exteriéru jsou hodnoceny bodovou stupnicí. Zaznamenávají jsou vady exteriéru a výsledky jsou dostupné na webových stránkách ČSCHMS. Selektce se pohybuje v průměru okolo 70 % (Malát, 2012).

3.6.3. Výživa a krmení býčků v odchovu

Plemenní býci jsou jednou z nejcennějších kategorií skotu, neboť právě oni rozhodují o kvalitě celého stáda. Výživa se tedy nepochybně promítne do výsledné kvality odebraného ejakulátu, a proto je při jejím dodržování kladen důraz na plnění požadavků pro potřebu živin provázaných jejich vzájemným poměrem. Důležitým znakem je biologická i dietetická hodnota používaných krmiv. Absolutně nepřipustné je zařazovat hygienicky i dieteticky nekvalitní krmiva, neboť jejich zkrmování má dlouhodobé následky na zdravotní potíže při reprodukci. Kvalita a kvantita spermatu tak může být změněna i s relativně dlouhým časovým

odstupem. Mladí býci jsou navíc ke všem těmto změnám velice vnímaví a snížení bílkovinné složky a energie může zapříčinit trvalé poškození pohlavních žláz (Suchý et al., 2011).

Býčci jsou do odchovny přemístěni ve věku 120 dnů, kdy je zkrmována mléčná krmná směs Laktosan. Hmotnost krmné dávky se pohybuje v rozmezí 0,7 – 0,8 kg na kus a den. Od 2. dne následuje zkrmování krmné směsí typu startér – směs pro časný odchov telat (ČOT). Na konci odstavu je krmná směs startér zkrmována v krmné denní dávce 2,0 – 2,5 kg na býčka. Období odstavu je velice stresový faktor, kdy je zvíře odloučeno od matky, přechází do nového prostředí a navyká si na jinou krmnou směs, proto je velice důležité zajistit v tomto období krmnou dávku s vysokým obsahem energie a nízkým podílem objemné píce. Postupně je krmná směs ČOT nahrazována krmnou směsí pro odchov plemenných býků – BO. Technika krmení probíhá ze začátku 3 x denně, postupem času se krmí pouze 2 x denně. Důležité je během celého odchovu zajistit býkům přístup k čisté pitné vodě (Louda, 2001).

Výživa býků je založena převážně na zkrmování objemných krmiv, sena, kukuřičné siláže, úsušků a krmných okopanin. Důležité je zajistit vysokou kvalitu krmné dávky, uspokojit požadavky na obsah živin a to vše s ohledem na cenu. Dostatečný přísun energie zajišťují koncentrovaná krmiva na bázi obilovin. Krmivo musí obsahovat vyvážený poměr vitaminů, minerálních látek a stopových prvků a to zejména zinku, selenu a mědi, které mají zásadní vliv na kvalitu ejakulátu. Z aminokyselin jsou pro výživu důležité lysin, arginin a tryptofan.

Suchý et al. (2011) uvádí, že na plodnost býků a s tím související také tvorbu semene má negativní vliv nadměrná a jednostranná výživa, časté změny krmné dávky, nadměrný příjem dusíkatých látek, vyšší obsah živočišných krmiv jako například odstředěné mléko, malé množství energie, nedostatek aminokyselin (lysin, methionin, arginin, tryptofan), podávání luštěnin (hrách, bob) a některé zeleniny (kapusta), sušené výpalky, makové, konopné nebo lněné pokrutiny, šrot z vikve, hygienicky a dieteticky narušené krmivo, mykotoxiny, insekticidy, herbicidy, vyšší dávky antibiotik, těžké kovy (olovo, kadmium), nízký obsah zinku, manganu, železa, vápníku, fosforu, nízký obsah vitaminů (A, β -karoten, D, C, B1) a dlouhodobé nedostatečné napájení. Pozitivní vliv na tvorbu semene a plodnost naopak zajišťuje zkrmování lučního sena, jetele, vojtěšky, řepy cukrovky, melasy a lehce stravitelných sacharidů, podávání kompletní krmné dávky s optimálním zastoupením dusíkatých látek, aminokyselin, stopových prvků a vitaminů.

Výživa býků v odchovu je podřízena závaznou metodikou. Hlavními složkami krmné dávky jsou objemná krmiva a jadrné směsi, jejichž zkrmování je prováděno s ohledem na

normovanou potřebu živin býčků. Vzhledem k odlišným nárokům na krmnou dávku u jednotlivých plemen byly na základě jednotlivých šlechtitelských programů stanoveny výše denních přírůstků. Býčci jsou dále krmeny také s ohledem na živou hmotnost a vytížení dle zavedeného systému. Úroveň výživy býčků kombinovaných plemen je stanovena na výši denního přírůstku 1200 g, masná plemena menšího tělesného rámce dosahují denních přírůstků 1300 g, plemena větších tělesných rámců až 1500 g. Kontrolní a dozorovou činnost nad výživou býků provádí dle zákona o šlechtění a plemenitbě ve všech odchovnách Česká plemenářská inspekce (Malát, 2012).

3.7.Odběr ejakulátu

Na inseminační stanice jsou přesouváni pouze plemenní býci prosti nebezpečných nákaz. Proto jsou 30 dní před samotným přesunem býků na inseminační stanice vyšetřeni na boviní tuberkulózu, boviní brucelózu, *Campylobacter foetus* var. *venerealis*, trichomonózu a enzootickou leukózu s negativním výsledkem. Negativní výsledek musí být také na IBR a BVD/MD. Po přesunu na inseminační stanici býků jsou prováděna v prvních 28 dnech ještě další vyšetření. Po tuto dobu jsou býci izolováni v karanténě. Pokud vyjdou všechna vyšetření negativní je možno zařadit býka do provozu a zahájit pravidelné odběry (Hofírek et al., 2009).

CRV (2009) uvádí, že ještě před samotným odběrem ejakulátu je třeba pečlivě připravit umělou vagínu. Používána je umělá vagína zkrácená, 30 cm dlouhá, která je ve své spodní části vybavena sběrací polyetylenovou tubou ve tvaru kornoutu. Vagína musí být před zahájením odběru uchovávána o pokojové teplotě ve vyhříváném prostoru. Velice důležitá je hygiena a sterilita, proto je nutné, aby inseminační technik používal čistý pracovní plášť a vhodnou pracovní obuv. Před samotným zákrokem si pak umyje ruce teplou pitnou vodou a mýdlem. Odběr je prováděn v předem stanovenou dobu, ne dříve než 3 hodiny po nakrmení. U býků do dvou let věku 1 x týdně, starší plemeníci jsou odebíráni i více než dvakrát za týden (Louda et al., 2007).

Louda (2001) vysvětlují, že před odběrem překontroluje technik těsnost mezistěn vagíny a prostor naplní asi 100 cm³ vody, která zajistí teplotu uvnitř vagíny v rozmezí hodnot teploty těla, tedy 38 – 40 °C. Umělá vagína se opatří jednorázovým polyetylenovým sběračem a mezi sběrač a vložku je vložen savý sterilní papír, který slouží k zachycení povrchových nečistot. Takto ošetřenou vagínu vloží technik do termostatu o teplotě 40 °C. Po vyjmutí z termostatu je umělá vagína vymazána sterilní vazelínou pomocí sterilní skleněné tyče. Stěny se dofouknou, tak aby tlak uvnitř dosahoval 530 kPa.

Peters et Ball (1995) ve své publikaci uvádí, že jako atrapa jsou využíváni ostatní kastráti, nebo klidní býci či krávy, které je však nutné pravidelně střídat. Využívány mohou být také uměle zkonstruované makety, označované jako fantóm. Atrapa je umístěna ve vnitřním nebo venkovním připouštědle. Ošetřovatel ji musí pevně zafixovat a před každým odběrem i po odběru ji musí účinně vydezinfikovat a osušit.

Louda et al. (2007) popisují přípravu býka na odběr, kdy je v první řadě provedena řádná a dokonalá očista předkožky pomocí vlažné mýdlové vody. Dále ošetřovatel připravenému býku očistí předkožku a chvostek suchou buničitou vatou a přinutí ho vyskočit na fantóm, pod kterým již čeká inseminační technik. Technik je postaven na pravé straně nebo pod atrapou, vagínu drží v pravé ruce otočenou ústím dolů a na levé ruce má nasazenou jednorázovou rukavici. Býk je vydrážděn, dochází k vysunutí pyje a začnou odkapávat výměšky pohlavních přídatných žláz. V té chvíli dá inseminační technik pokyn ošetřovateli, který umožní býku skok na atrapu. Při skoku technik uchopí býka levou rukou za pyj, odkloní předkožku a zavede pyj do ústí umělé vagíny. Po několika málo sekundách je proveden odběr ejakulátu.

Pro udržení hygienické nezávadnosti odebraného ejakulátu je nutné držet vagínu ústím dolů a neprodleně po odběru dopravit tubu se spermatem do laboratoře, kde laborantka odebere vzorek ejakulátu a stanoví počet spermatických buněk. Pomocí počítače je stanoven počet inseminačních dávek, které je možno z odebraného ejakulátu připravit. Výpočet je proveden na základě koncentrace spermií a objemu odebraného spermatu. Do odebraného semene přidá laborantka ředidlo a zhodnotí pod mikroskopem pohyblivost spermií, která musí dosahovat minimálně 70 % aktivního pohybu vpřed za hlavičkou (CRV, 2009).

Po odběru je nutné umělou vagínu důkladně vyčistit. Vagína je propláchnuta horkou vodou a za pomoci kartáčku vyčištěna 2-3 % sodným roztokem. Následně je vagína dezinfikována 1 % roztokem septonexu, opláchnuta horkou vodou a osušena. Pro dezinfekci vnitřku umělé vagíny je používán 96 % alkohol. Před odběrem je vnitřek umělé vagíny sterilizován germicidní 15 W žárovkou po dobu 5 minut nebo za pomoci autoklávu při teplotě 115 °C, přetlaku 0,7 atm po dobu 10 – 15 minut (Louda, 2001).

Pokud nejsou býci schopni ze zdravotních důvodů odběru pomocí umělé vagíny a jedná-li se o býky zlepšovatele, může ve výjimečných případech dojít k odběru semene pomocí elektroejakulace. Odběr probíhá za použití bipolárních tyčových elektrod, které se zavádí rektální cestou do pánevní krajiny. Ošetřovatel musí připravovanému býkovi zafixovat zadní

končetiny, vyprázdnit rektum a vydezinfikovat předkožku. Pouze pro diagnostické účely je pak prováděn odběr ejakulátu pomocí masáže ampulí chámovodu.

3.7.1. Hodnocení znaků kvality čerstvě odebraného ejakulátu

Požadavky na kvalitu býčího ejakulátu, který je určen pro výrobu inseminačních dávek jsou uvedeny v ČSN 467111 Sperma býka, v přílohách vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 471/2000 Sb., kterou se provádí některá ustanovení zákona číslo 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a v Metodickém pokynu č. 04 Státní veterinární správy ze dne 5.5.1994 (Hofírek et al., 2009).

Hodnocení znaků kvality spermatu probíhá v několika stupních. Prvním stupněm je základní výběr, který musí být zahájen nejpozději do 10 minut po odběru. Zjištěn je objem ejakulátu, provedený ihned po odběru (Peters et Ball, 1995). Ejakulát je posuzován čerstvý ve specializované laboratoři, která zaručí sterilní prostředí o teplotě 20 – 25 °C. Pro posouzení, zda je ejakulát vhodný k dalšímu zpracování či nikoliv je využito mnoho laboratorních metod, které zahrnují makroskopické a mikroskopické hodnocení ejakulátu, biologické a biochemické zkoušky ejakulátu, morfologické vyšetření spermatu, použití fluorescenční mikroskopie, penetrační aktivity spermií, hodnocení zmrazeného spermatu, mikrobiologické vyšetření atd. Stanoven je stupeň ředění (Louda et al., 2008).

U odebraného ejakulátu lze těmito způsoby zjistit jeho celkový objem, počet spermií v inseminační dávce, aktivitu spermatických buněk, množství spermií, které mají schopnost oplodnit vajíčko a zjistit jaká je jejich skutečná oplozovací schopnost. Stanovení počtu životaschopných spermií v odebraném ejakulátu je důležité pro zjištění oplozovací schopnosti vyráběné inseminační dávky. Čím více životaschopných spermií dávka obsahuje, tím vyšší je také její oplozovací schopnost. Svou roli zde hraje i kvalita spermií. Vyšší počet spermií s defektem či morfologicky nedostatečně vyvinutých značí snížení oplozovací schopnosti dávky (Louda et Čeřovský, 1994).

U odebraného ejakulátu je sledováno procento patologických spermií, které slouží jako klíčová informace k dalšímu posuzování. Patologické změny zasahují nejprve cytoplazmu a až poté jádro spermatické buňky. Přípustný výskyt patologických spermií v odebraném ejakulátu je stanoven různě. A pohybuje se v rozmezí od 15 – 20 % (Eibl, 1959).

Podstatu jednotlivých způsobů laboratorních vyšetření vysvětluje ve své publikaci Louda (2001). Po základním zhodnocení následuje makroskopické vyšetření ejakulátu, kdy je zhodnocena barva, objem, konzistence, pach a výskyt cizích příměsí. Mikroskopické

hodnocení odebraného ejakulátu zahrnuje hodnocení aktivity spermií, které se provádí pod světelným mikroskopem. Hodnotí se aktivní pohyb spermií za hlavičkou vpřed. Hodnota se vyjadřuje v procentech a pro kryokonzervaci je nutné minimální aktivita 70 %. Dále je to stanovení hustoty ejakulátu a to dvěma způsoby: fotometricky a hematocytometricky v Bürkerově komůrce.

Principem biologických zkoušek je testování odolnosti spermií vůči nejrůznějším vnějším vlivům. Testovány jsou spermie na základě dlouhodobého chladového šoku, krátkodobého tepelného testu nebo například na působení 1 % roztoku NaCl. Na základě biochemických zkoušek je možno zjistit životaschopnost a oplozovací schopnost spermií podle rychlosti rozkladu fruktózy v semenné plazmě. Morfologické metody vyšetření spermatu jsou založeny na principu barvení nejrůznějšími způsoby.

3.7.1.1. Stanovení objemu ejakulátu

Jedním z nejzákladnějších a také nejsnazších vyšetření býčího ejakulátu, prováděném na inseminačních stanicích je stanovení objemu ejakulátu. U býka je posuzováno kompletně celkové množství získaného ejakulátu, které by nemělo u dospělých dárců poklesnout pod 4 cm³ (Věžník et al., 2004).

Louda (2001) uvádí, že ke stanovení objemu dochází ihned po odběru a to měřením v kalibrovaném válci nebo vážením na automatické váze. Způsob stanovení je závislý na nádobě použité pro odběr. Pokud je ejakulát odebrán do umělohmotných kolektorů využívá se vážení. Ejakulát získaný do nádob se měří většinou v kalibrovaných válcích, popřípadě také vážením a ejakulát o velmi malém objemu je stanoven pomocí mikropipety. Důležité je použití dvouplášťových odměřovacích nádob zakrytých izolačním obalem a pomůcek o teplotě v rozmezí 37 – 38 °C (Věžník et al., 2004).

3.7.1.2. Stanovení koncentrace spermií

Stanovení koncentrace, neboli hustoty býčího ejakulátu je důležitou informativní složkou o jeho kvalitě. Vliv na konečný výsledek mají zejména faktory vnitřního prostředí organismu, které negativně ovlivňují tkáň pohlavního systému býků, zejména funkci semenoplodného epitelu varlat. Dále je výsledek ovlivněn věkem pleménika, zdravotním stavem, připraveností a technikou odběru (Louda, 2001).

Pro zjišťování koncentrace je možno využít několika metod. Metodou, která je používána zejména v rutinních laboratořích a jejíž výsledek je rychlý a poměrně přesný, je použití fotometrické metody stanovení koncentrace. Podstatou je nefelometrické stanovení stupně

zákalu naředěného semene, který je odečítán ze stupnice specificky kalibrovaného nefelometru. Výhodou je spotřeba velmi malého množství semene. Pro stanovení je použito 0,1 ml odebraného ejakulátu, který je zředěn 10 ml fyziologického roztoku nebo citrátu sodného (Věžník et al., 2004).

Další metodou je stanovení koncentrace haematocytometricky. Odebrané býčí semeno je nasáto do melanžeru na červené krvinky po značku 0,5 a doplněno Hayemovým roztokem po značku 1,01. Tato směs, v poměru 1:200 se homogenizuje, několik kapek je odkápnuto na buničitou vatu a následná kapka je kápnuta na počítací plochu Bürkerovy komůrky a zakryta krycím sklíčkem. Následuje počítání spermií podle stanoveného vzorce s přihlédnutím na stupeň zředění, výšku komůrky, počet čtverečků apod. (Hofírek et al., 2009).

Baničková metoda počítání buněk v roztoku je obdobou haematocytometrického počítání buněk. Spermie jsou však počítány v mísících baňkách (Věžník et al., 2004). Využit lze také metodu stanovení spermiodenzimetrem podle Karrase, kdy je do Karrasova klínu odpipetováno potřebné množství ejakulátu a doplněno roztokem. Po promíchání je hodnota odečtena ze stupnice spermiodenzimetru. Ve výjimečných případech lze koncentraci na inseminačních stanicích stanovit za pomoci odhadu (Louda, 2001).

3.7.1.3. Stanovení aktivity spermií

Aktivita spermatických buněk v odebraném ejakulátu je posuzována na základě procentuálního výpočtu spermií, vykazujících aktivní pohyb vpřed za hlavičkou. Hodnocení je prováděno v ejakulátu, který je naředěn fyziologickým roztokem pufovaným fosfátovým puftrem na pH 6,8. Hodnocení je prováděno pod mikroskopem v minimálně třech zorných polích, na podložce předeřáté na teplotu 35 – 37 °C. Výsledná hodnota je udávána buď v procentuálním zastoupení, nebo v bodové stupnici, kdy jeden bod vykazuje aktivitu 20 % (Věžník et al., 2004).

Hofírek et al. (2009) uvádí, že minimální aktivita býčího ejakulátu, který má být následně použit pro umělou inseminaci by měl být nižší než 70 %. Průměrná rychlost, která je zjišťována pomocí spermiofotogrammetrie nebo spermiokinezografie je u býků 80 μm/s.

3.7.1.4. Stanovení živých a mrtvých spermií

Podstata zjišťování zastoupení živých a mrtvých spermií v odebraném ejakulátu je založena na rozdílné afinitě těchto spermií k barvivům. Spermie mrtvé, nebo oslabené dokáží barvivo přijímat. Životaschopné spermie tuto vlastnost postrádají. Barvivo jejich membránou totiž

nedokáže proniknout. Od roku 1940 bylo využíváno barvení spermií za pomoci eozinu, postupně bylo spektrum barviv rozšiřováno (Věžník et al., 2004).

Hofírek et al. (2009) uvádí, že v současnosti je nejvíce používanou metodou barvení eozin-nigrozinem podle Bloma, kdy je na podložní sklíčko kápnuta jedna kapka semene a jedna kapka eozinu. Po půl minutě se přidají dvě kapky nigrozinu. Nátěr je hodnocen pod mikroskopem. Mrtvé spermie jsou po použití nigrozinu růžově zbarvené, odumírající a oslabené jsou zbarvené pouze z části, nebo do polovičky hlavičky a jsou řazeny mezi mrtvé.

3.7.1.5. Morfologický počet spermií

Morfologické změny na spermiích mohou vzniknout buď během vývoje spermií, nazývají se vývojovými změnami a jsou častější, nebo se jedná o změny získané, které vznikají až po úplném ukončení vývoje. Častým jevem vzniku morfologických spermií je narušení meiotické fáze, která zapříčiňuje hojný výskyt mnohojaderných spermatid v ejakulátu, doprovázených výskytem dvojčat spermií, mikro a makrospermií či diplozomních spermií. Během spermiogeneze pak může dojít ke změnám na hlavičce, ve vývoji akrozomu, patologickému spojení krčku, abnormálnímu utváření mitochondriální spirály nebo abnormálním změnám na bičíku spermií. Změny na bičíku pak mohou postihovat spermie i v pozdější fázi při průchodu vývodními cestami. Období dozrávání je spojeno s možnými změnami funkčnosti membrán, zvýšenou permeabilitou, snížením nebo ztrátou enzymatického vybavení nebo snížením celkové úrovně mitochondriální funkce. Dále dochází ke stáčení bičíků, dekapitacím, neboli oddělováním hlaviček nebo k poruchám pohyblivosti spermií (Věžník et al., 2004).

3.7.2. Ředění a ředidla ejakulátu

Před konzervací semene hlubokým zmrazením je nutné provést ředění ejakulátu pomocí vhodného ředidla, které obsahuje složky, zajišťující pro spermie optimální prostředí (Peters et Ball, 1995). Pro výrobu pejet jsou nejčastěji využívána ředidla Tris v kombinaci s 20 % vaječným žloutkem a 6 – 7 % glycerolem. Méně často jsou používána ředidla mléčná obsahující 10 % čerstvého nebo sušeného mléka v kombinaci s 5 – 10 % vaječným žloutkem a 7 – 8 % glycerolem. Pro výrobu pelet jsou pak využívána ředidla obsahující 20 % vaječného žloutku, 3 – 5 % glycerolu a zbytek je doplněn jedenáctiprocentním roztokem vodného roztoku laktózy. Jednou z možností je také doplnění ředidel 3 % roztokem citrátu sodného s pH = 6,7 (Louda et Čerovský, 1994).

3.7.2.1.Požadavky na ředidla

Použitím ředidel dojde k vytvoření vhodných podmínek pro přežití spermií in vitro. Bez jejich aplikace by postupně došlo k poškození spermatických buněk, vedoucích k jejich odumření. Používaná ředidla musí zajistit dostatečné naředění ejakulátu, ochranu spermatických buněk proti chladovému šoku, musí zajistit dostatečný energetický zdroj, dobrou pufrovací schopnost, musí mít nízký obsah elektrolytu, požadovaný osmotický tlak, odpovídající pH, musí být sterilní, netoxické a ekonomicky dostupné (Louda, 2001).

Aby si jednotlivé inseminační dávky uchovaly dostatečnou aktivitu spermatických buněk pro jejich další distribuci a obchod, je nutné naředit odebraný ejakulát vhodným ředidlem, které obsahuje složky zajišťující spermatickým buňkám vhodné prostředí pro jejich přežití. Naředěním býčího ejakulátu je možno získat až několik stovek ID. Veškeré komponenty ředidel jsou rozpuštěny v dvakrát destilované vodě nebo v UHT mléce (Peters et Ball, 1995).

Při zmrazování jsou spermatické buňky bez dodatečné ochrany vystaveny chladovému šoku, který může způsobit jejich rozrušení nebo zničení. Proto jsou pro zajištění dostatečné ochrany těchto buněk využívána ředidla s obsahem vaječného žloutku (Huopalahti et al., 2007). Používána jsou také ředidla mléčná nebo v kombinaci vaječného žloutku a mléka. Jako další komponenty ředidel je používán glycerol, glutamin, tris, kyselina citrónová a fruktóza.

Pro přežití spermií mimo organismus je nutno dodat dostatečné množství energie. V ředidlech je používána jako zdroj energie fruktóza. Kyselina mléčná, která vzniká jako výsledný produkt metabolismu spermií, může zásadně snížit hodnotu pH býčího ejakulátu. Pro zamezení tohoto stavu jsou používány nejrůznější pufrý jako citrát, fosfát nebo tris. Vhodný osmotický tlak zajistí správná koncentrace cukerné složky v ředidle. Pro zajištění sterilního prostředí jsou do ředidel přidávána antibiotika. Ředidla je nutno připravovat vždy čerstvá, ve sterilních a čistých podmínkách, aby bylo zamezeno přenosu virových onemocnění v inseminačních dávkách (Peters et Ball, 1995).

Při výrobě ID dochází k ředění odebraného ejakulátu ihned po odběru, a to za teplotních pokojových podmínek v laboratoři (18 – 22 °C), po zchlazení ejakulátu na 4 °C nebo kombinací obou způsobů. Thun et al. (2002) zjistili, že na kvalitu inseminačních dávek po rozmrazení mají vliv také podmínky, za kterých byl ejakulát ředěn.

3.7.2.2.Význam vaječného žloutku v ředidlech

Jednou z nejdůležitějších složek ředidel býčího ejakulátu je vaječný žloutek, který je využíván při výrobě inseminačních dávek již mnoho let. Hlavní prioritou vaječného žloutku je zajištění

dostatečného přísunu energetické výživy pro spermatické buňky a splnění nutných katabolických požadavků, které umožní vysokou motilitu spermií až po dobu několika hodin (Phillips, 1939). Přidáním obsahu vaječného žloutku do ředidel dochází ke zvýšení odolnosti proti chladovému šoku a celkovému zlepšení přežitelnosti spermatických buněk při následném skladování (Kampschmid et al., 1953).

Při uchovávání naředěného ejakulátu zvyšuje přežitelnost a dlouhověkost spermatických buněk také technologie samotného skladování. Pokud je odebraný a naředění ejakulát ponechán, např. přes noc v chladu při teplotě 4 °C a zmrazován až druhý den, dochází za použití ředidel obsahujících vaječný žloutek k celkově vyšší přežitelnosti a dlouhověkosti spermií (Muiño et al., 2007).

Nejlepší ochranou složkou vaječného žloutku je podle mnoha studií zřejmě LDL (low-density lipoprotein). Pace a Graham (1974) se podrobněji zabývali třemi složkami vaječného žloutku. Jednalo se o složku LDL, ve vodě rozpustnou frakci a granuly s důkazem, že právě použití granul v ředidlech má nejvíce škodlivých účinků na pohyblivost spermií. Podobné tvrzení ve své práci také uplatňují Amirat et al. (2004), kteří uvádí, že při použití žloutku s nízkou hustotou v ředidlech byla po rozmražení zjištěna dvojnásobně vyšší pohyblivost spermií, než u ředidel obsahujících kompletní vaječný žloutek. Rozdílná koncentrace LDL poskytuje totiž lepší ochranu pro spermatické buňky (Moussa et al., 2002). Význam ochranné funkce LDL byl zaznamenán i v dalších studiích u jiných hospodářských zvířat.

Ne všechny složky, které vaječný žloutek obsahuje, jsou tedy pro přežitelnost spermatických buněk vhodné. Amirat et al. (2005) provedli pokusy s čerstvým i zmraženým spermatem ve třech různých typech ředidel se zjištěním, že komerčně vyráběné ředidlo Triladyl, obsahující vaječný žloutek je pro spermie více škodlivé než LDL a Biociphos. Studium možností, jak odstranit škodlivé látky, které vaječný žloutek obsahuje a které mají na spermatické buňky negativní vliv je otázkou budoucnosti a vyžaduje další a podrobnější zkoumání.

3.7.2.2.1. Ochranné účinky LDL při kryokonzervaci

Mechanismus účinku ochranné funkce LDL ve vaječném žloutku není doposud přesně znám. Prověřeno je však několik různých teorií o kladných účincích LDL na zvýšení přežitelnosti spermií při dlouhodobém skladování v tekutém dusíku. Nejčastěji prokázaným mechanismem účinku ochranné funkce LDL je jeho schopnost navázat na sebe spermatické buňky. Vytvořen je tak jakýsi ochranný film, který po dobu skladování uchovává spermie při životě (Watson,

1976; Foulkes, 1977). Podstata ochranné funkce je začlenění fosfolipidů do membrán spermatických buněk a následná výměna několika lipidů (Graham et Foote, 1987).

Známým faktem je, že semenná plazma, která je v ejakulátu obsažena podporuje pohyblivost a oplozovací schopnost spermií. Shannon (1956) však zjistil, že při dlouhodobém skladování dochází k degradaci membrán spermatických buněk působením hlavní bílkoviny, která je v býčí semenné plazmě obsažena. Tomuto nepříznivému rozkladu dokáže zabránit právě přítomnost LDL, který se spojí s plazmatickými membrány spermií a tím zvýší celkovou přežitelnou spermií i při dlouhodobém skladování (Manjunath et al., 2002).

Význam LDL je také v tom, že dokáže snižovat ztrátu fosfolipidů v membránách spermatických buněk a tím zvyšuje jejich odolnost proti chladovému šoku (Parks et Graham, 1992).

3.7.3. Výroba inseminačních dávek

Výroba inseminačních dávek je prováděna dvěma způsoby. Prvním způsobem je japonská metoda výroby, kdy je semeno zmrazováno v peletách (pilulkách) o objemu $0,1 \text{ cm}^3$ a uchováváno v papírových označených krabičkách. Druhým způsobem výroby inseminačních dávek je metoda francouzská. Odebrané sperma se balí do pejet (tyčinek) o objemu $0,25 - 0,5 \text{ cm}^3$ (Louda, 2001).

Pejety i naředěný ejakulát jsou zchlazeny na teplotu $5 \text{ }^\circ\text{C}$ a plnicí stroj při této teplotě provede plnění pejet odpovídajícím ejakulátem. Pro případné ověření paternity jsou od každého býka dvě naplněné označené pejety uschovány. Ostatní hotové inseminační dávky jsou uloženy do sčítacího rámu o kapacitě 175 ID. Aby vše proběhlo v pořádku, dohlíží na celý proces zkušená laborantka (CRV, 2009).

3.7.3.1. Identifikace inseminačních dávek

Odebraný býčí ejakulát, který putuje ihned po odběru do laboratoře, musí být řádně označen a zapsán správný registr býka. U nás se převážně využívá plnění inseminačních dávek pomocí francouzské metody do pejet o objemu $0,25 - 0,5 \text{ cm}^3$ (Louda et Čerovský, 1994). Japonská metoda přestala být u nás používána před více jak dvaceti lety. Jednotlivé, ještě prázdné pejety jsou barevně označeny podle koncového čísla kódu býka a opatřeny jménem býka, plemenem, kódem inseminační stanice a číslem inseminační dávky ve formě čárového kódu (CRV, 2009).

3.7.3.2.Konzervace ejakulátu

Krátkodobá konzervace býčího semene v chladničce při teplotě do + 4 °C je metodou využívanou pouze výjimečně. Celosvětově je využívána pro uchovávání inseminačních dávek konzervace semene zmrazováním a to zejména proto, že při kryokonzervaci je zachována vysoká oplozovací schopnost spermatických buněk a nevyskytují se při něm žádné vážné problémy. Technické problémy, které se v minulosti při kryokonzervaci vyskytovaly, byly převážně odstraněny (Louda et Čeřovský, 1994).

Peters et Ball (1995) uvádí, že v rozvinutých zemích jsou veškeré inseminační dávky uchovávány hlubokým zmrazením. Pejety s inseminační dávkou jsou přemístěny a rovnoměrně rozmístěny do speciálních mrazicích polic umístěných v regálech a odvezeny do mrazicího boxu, řízeného počítačem. Počítač zajistí zchlazení dávek z 5 °C na – 140 °C za 8 minut (CRV, 2009).

Dávky jsou v mrazicích boxech zmrazovány v parách tekutého dusíku podle určité mrazicí křivky a následně laborantkou ukládány do kontejnerů, které jsou uloženy do nádrží s tekutým dusíkem o teplotě – 196 °C, který zajistí jejich dlouhodobé zachování oplozovací schopnosti při skladování a distribuci (Ježková, 2012). Biologické kontejnery pro uchovávání hluboce zmrazených inseminačních dávek jsou vyráběny z austenické oceli, která se vyznačuje vysokou houževnatostí, tažností a schopností nekorodovat. Kontejnery jsou dvouplášťové. Vnitřní plášť je opatřen práškovo-vakuovou nebo vícevrstevnou vakuovou izolací. Objem kontejnerů se pohybuje v rozmezí 5 – 600 litrů (Louda, 2001).

3.7.3.3.Rozmrazování inseminačních dávek

Louda et al. (2008) uvádí, že rozmrazování inseminačních dávek uložené v kontejneru s tekutým dusíkem se provádí v nádobě s čistou vodou o teplotě v rozmezí 35 – 37 °C. S pejetou je doporučeno po vyjmutí z kontejneru nejprve lehce zatřepat, aby odpadla případná kapka tekutého dusíku ze zátky. Do nádoby s teplou vodou je nutné ponořit pejetu celou na dobu 30 – 40 sekund zátkou nahoru. Důležité je rozmrazovat právě ve vodě, protože voda je dobrý vodič a zajistí tak dostatečně rychlé rozmrazení inseminační dávky (Lopatář, 2001).

Při překladu inseminační dávky mezi kontejnery by doba neměla překročit 5 sekund. Současně by nemělo docházet k rozmrazování více jak tří dávek naráz. Doba od rozmrazení do provedení inseminace by pak neměla překročit 15 minut. Rozhodně nikdy nesmí být rozmražená pejeta vrácena zpět do kontejneru (Louda et al., 2008). Inseminační technik by

měl mít na vědomí, že jakákoliv i sebemenší chyba při manipulaci s pejetou během rozmrazování může značně ovlivnit zabřezávání krav.

3.7.3.4.Hodnocení zmrazeného ejakulátu

Hodnocení rozmrazeného ejakulátu je dalším stupněm hodnocení býčího spermatu. Po rozmrazení ejakulátu je nutno zhodnotit aktivitu spermií v inseminační dávce. Hodnocení je prováděno vždy před distribucí dávek inseminačnímu technikovi. Pozitivně je hodnocen aktivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou a výpočet aktivních spermií v inseminační dávce je proveden podle vzorce, kde se promítne objem ejakulátu v odběru, hustota spermií, procento aktivních spermií po rozmrazení a počet všech inseminačních dávek vyrobených z odebraného ejakulátu.

Pokud byla zjištěna zhoršená kvalita odebraného ejakulátu, je proveden dále ještě tepelný test rozmrazeného spermatu. Tento test je prováděn také u mladých býků určených pro testovací přípařování. Podstatou tepelného testu je hodnocení aktivity spermií rozmrazené inseminační dávky uchované při teplotě 38 – 40 °C po uplynutí doby 30 minut. Minimální hodnota pro možnost dalšího použití je 20 % (Louda, 2001).

3.7.3.5.Změny působící na kvalitu inseminační dávky

Při výrobě, chlazení, mrazení, uchovávání a rozmrazování inseminačních dávek působí mnoho činitelů, které více či méně ovlivňují také jejich kvalitu a celkovou oplozovací schopnost. Při kryokonzervaci dochází k chemickým a fyzikálním změnám, které mohou vést ke snížení pohyblivosti a narušení akrozomu nebo plazmatické membrány spermatických buněk. Míra poškození je dána nejen nesprávným technologickým postupem při výrobě a manipulaci s dávkami, ale částečně je také ovlivněna genetikou daného jedince (Thurston et al., 2002). Řada nepříznivě působících faktorů vzniká také při nevhodné případně zcela zbytečné manipulaci s dávkou. Proto je velice důležité zvážit, před každým přeložením nebo přepočítáváním, zda se opravdu jedná o nezbytně nutný krok.

Nejčastější příčinou snížení oplozovací schopnosti inseminačních dávek při nesprávné manipulaci je porušení chladové zóny. Teplota v kontejneru naplněném tekutým dusíkem se pohybuje pod – 196 °C, těsně nad hladinou se pohybuje v rozmezí – 160 až - 140 °C a čím více se dostane dávka nad hladinu, tím kritičtějšími teplotám je vystavena. K porušení chladové zóny dochází ve chvíli, kdy je dávka vystavena nad hladinu kritické teploty, tedy více než – 130 °C (Louda et al., 2008).

3.8. Vlivy působící na úroveň reprodukce

Plodnost býků je jedním z ukazatelů, které se podílí na celkové úrovni reprodukce ve stádě, a proto je od plemenného býka očekávána optimální plodnost. Základní požadavek na plemenného býka je schopnost zapustit a oplodnit velký počet krav. Selektce je v tomto případě opodstatněným požadavkem a je prováděna na schopnost býků použití k plemenitbě, tedy schopnost odběru semene, o velkém množství a kvalitě, do umělé vagíny. Plodnost je vlastnost, na které se z větší části podílí dědičnost. Kromě libida a vývinu primárních pohlavních orgánů se hodnotí počet inseminací potřebných k zabřeznutí plemence, počet nepřeběhlých krav a kvalita semene, jako je hustota semene, objem, aktivní pohyb vpřed za hlavičkou a anatomické i morfologické faktory (Říha et al., 2004).

Kromě plodnosti samců je nutno brát do úvahy také další faktory, které se významně podílí na celkové úrovni reprodukce. Jedná se zejména o technologii ustájení, vzájemný vztah mléčné užitkovosti a plodnosti, výživa, zdravotní stav, kondice a věk.

3.8.1. Vliv technologie ustájení

Podmínky ustájení jako je používaná technologie ustájení, stájové prostředí, intenzita osvětlení, celkové mikroklima a roční období se promítá do celkové reprodukce ve stádě. Zvířata ustájená volně vykazují lepší a intenzivnější projevy říje. Důležité je však přitom dbát na zamezení rizika uklouznutí zvířete zajištěním kvalitní podlahové plochy (Říha et al., 2004).

Pro dobré výsledky reprodukce je nutno zajistit také optimální podmínky mikroklima stájového prostředí. Vnitřní prostor musí být dobře odvětrán tak, aby byl odváděn nahromaděný oxid uhličitý, sirovodík a čpavek. Důležitá je také intenzita osvětlení, která ovlivňuje prostřednictvím melatoninu řízení pohlavních funkcí. Ve slabě osvětlených tmavých prostorách dochází k snížení citlivosti sexuálních center vedoucích k snížení plodnosti samce a k horší detekci říje a nižšímu zabřezávání plemenic (Hofírek et al., 2009).

Klimatické faktory vztahující se k ročnímu období nesou do jisté míry svá určitá úskalí v reprodukci skotu. Významný vliv má zejména teplota stájového prostředí, kdy dlouhodobé působení extrémních teplot má na reprodukci negativní vliv a to zejména u plemenic. Již teploty na 22 °C mohou vést k tepelnému stresu, který způsobuje poruchy metabolismu jako například snížení produkce gonadotropních hormonů adenohipofýzou, což se promítne v celkových výsledcích reprodukce (Lopatář, 2001). Dlouhodobě nízké teploty mohou u býků způsobit podchlazení varlat a nadvarlat, a tím i k poškození spermií.

3.8.2. Vzájemný vztah mléčné užitkovosti a plodnosti

V posledních letech je kladen důraz zejména na zvyšování mléčné užitkovosti, což vede u krav k horší schopnosti reprodukce. Snížená reprodukce se neprojeví u celého stáda, problémy se však dostavují v 10 – 15 % případů (Říha et al., 2004).

Nehasilová (2006) uvádí, že rychlým vzestupem mléčné užitkovosti dochází současně k odbourávání a využívání tělesných rezerv právě v tom okamžiku, kdy by měla být zahájena regenerace pohlavního cyklu a tím i nastartování nové říje. V případě, že není plemenici zajištěn dostatečný příjem živin v optimálním poměru, je vnitřní stabilita organismu porušena a dochází k poruchám pohlavního cyklu, projevujících se ztížením detekce říje nebo její úplnou nemožností odhalení. Částečně se tedy dá vzájemný negativní vztah mléčné užitkovosti na úkor plodnosti ovlivnit zvýšením důrazu na krmnou dávku.

3.8.3. Vliv výživy

Důraz na výživu při hodnocení celkové úrovně reprodukce ve stádě je nutný již během dospívání zvířat. Pokud v tomto období není dodržována správná krmná dávka, dochází k zaostávání ve vývoji varlat, pohlavních orgánů i pohlavních reflexů (Hofírek et al., 2009).

Pro správnou funkci reprodukčního systému je tedy nezbytné zajištění správné výživy. Přesné účinky výživy na reprodukční cyklus je velice těžké stanovit, neboť problémy v důsledku nesprávné výživy zvířat se většinou promítnou až za delší časový úsek. Obecně lze však usoudit, že výživa má vliv na optimální hormonální řízení ve vaječniku a děloze. Při podávání nevhodné výživy dochází mimo jiné také k poruchám správné funkce hypofýzy a hypotalamu, jejichž následkem je snížení produkce gonadotropinů, ovlivnění oogeneze, transportu spermií, fertilizace nebo vývoj časných i pozdějších embryí a plodu (Říha et al., 2004).

3.8.4. Vliv zdravotního stavu

Nejrizikovější skupinou z hlediska kontroly zdravotního stavu jsou jednoznačně dojnice v přechodném období. Jedná se o dobu, kdy dochází k významným hormonálním, metabolickým i morfologickým změnám. V případě, že plemenice není na toto období řádně připravena, mohou se v průběhu porodu vyskytnout problémy. Komplikace pak nastávají také v poporodním období. Produkce mléka nedosahuje požadovaných hodnot, narušena je plodnost a dochází k výskytu různých onemocnění (Illek et al., 2009).

Jedná se o tzv. metabolické poruchy a produkční choroby organismu. Onemocnění, vznikající v důsledku nedostatku či přebytku živin, selháním regulačních systémů nebo kombinací příčin

a následků. Kritickými obdobími jsou příprava na porod, porod a poporodní období. V období přípravy na porod hrozí u krav syndrom ztučnění, steatóza jater nebo deficit fosforu, selenu či mědi. Během porodu hrozí v souvislosti s narušením homeostázy vápníku hypokalcemií a porodní paréza. V poporodním období hrozí u plemenic stav negativní energetické bilance (NEB), kdy výdej energie překračuje její příjem. Obranou organismu je mobilizace tukových rezerv a při vysoké potřebě energie hrozí riziko vzniku steatózy jater, ketózy, jaterního koma nebo acidózy bachorového obsahu (Říha et al., 2004).

3.8.5. Vliv kondice

Jedním z hlavních ukazatelů plodnosti krav je určení kondičního skóre, které subjektivně hodnotí množství tuku v těle. Procentuelní zastoupení v těle plemence je dáno především její výživou. Hodnocení tělesné kondice probíhá každé čtyři týdny a je významné zejména v období stání na sucho a na začátku laktace, kdy včasným podchycením problému a upravením krmné dávky lze předejít následným zdravotním potížím po porodu, poruchám v reprodukci a celkovému snižování kvality mléka (Říha et al., 2004).

Sledování tělesné kondice krav je hodnoceno číselnou stupnicí od 1 (hubená) do 5 (tlustá). V poporodním a rozdojovacím období by se měla pohybovat v rozmezí hodnot 3,5 – 3,75 (Zink, 2014). Nižší nebo naopak vyšší hodnoty vedou ke vzniku negativní energetické bilance po otelení, kdy plemence potřebuje velké množství energie. Využívány jsou pak nahromaděné tělesné tukové rezervy, které játra nestíhají odbourávat a dochází ke vzniku různých zdravotních problémů, jako jsou ketózy, dislokace slezu, mastitidy, opožděné ovulace, mléčná horečka, zadržaná placenta, snížená produkce apod. Říha et al., (2004) uvádí, že pro zaznamenávání krmné dávky slouží jednoduché formuláře, kde jsou hodnoty vynášeny křivkou.

3.8.6. Vliv věku

Na úroveň celkové reprodukce má v neposlední řadě vliv také stáří jedinců. Plemence jsou poprvé inseminovány po dosažení chovatelské dospělosti, ke které dochází u dojného skotu mezi 13 – 16 měsícem života, při dosažení 65 % své tělesné hmotnosti (Šefrová, 2014). I nadále však dochází k dokončování tělesného růstu a vývoje vnitřních orgánů až do dosažení tělesné dospělosti, která je ukončena mezi 4 – 6 rokem života. Jedná se o nejvíce produktivní období reprodukce (Louda et al. 2008).

Plemenní býci jsou k inseminaci využívání od jednoho roku života. U takto mladých býků je ejakulát odebírán pouze 1 x týdně. Nejvyšší kvalita ejakulátu je odebírán u býků 2 – 6 let starých. U starších býků nastává pokles kvality ejakulátu (Hofírek et al., 2009).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Charakteristika odebraných býků

Pro diplomovou práci byli použiti býci holštýnského a českého strakatého plemene, které vlastní certifikovaná inseminační stanice býků Natural spol. s.r.o., Hradištko pod Medníkem s momentální kapacitou čítající téměř stovku masných, mléčných a kombinovaných plemen skotu.

Vzhledem ke špičkovému technickému vybavení inseminační stanice dosahují produkované inseminační dávky v požadavcích plodnosti a zdravotní nezávadnosti vynikající kvality. Stanice tak splňuje vysoké požadavky kladné nejen českou legislativou, ale i celou Evropskou unií.

Pro odběr semene byli použiti tito býci:

1. Fame: registr: NXA 873, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 10.9.2009
2. Girold: registr: MOR 170, plemeno: Český strakatý skot, narozen: 17.11.2007
3. Ilig: registr: RAD 407, plemeno: Český strakatý skot, narozen: 15.12.2009
4. Manitogen: registr: MOR 198, plemeno: Český strakatý skot, narozen: 27.9.2008
5. Milano: registr: NEO 197, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 27.11.2010
6. Mozart: registr: NEA 818, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 14.1.2008
7. Nachos: registr: NEA 954, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 11.1.2009
8. Nektar: registr: NEO 2, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 16.7.2009
9. Northon: registr: NEA 955, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 15.2.2009
10. Origin: registr: NEO 198, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 22.11.2010
11. Partner: registr: NEO 285, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 7.12.2011
12. Patriot: registr: NEO 283, plemeno: Holštýnský skot, narozen: 16.11.2011

Výchozí informace se vstupními hodnotami aktivity spermií, objemu, množství a datu odběru jsou znázorněny v tabulce č. 3.

4.2. Příprava ředidel

Pro diplomovou práci byla vybrána tři komerčně vyráběná ředidla, běžně dostupná na českém trhu. Jednalo se o ředidla s odlišným zastoupením obsažených složek, kdy významná byla zejména přítomnost vaječného žloutku. Ten byl obsažen ve dvou, ze třech použitých ředidel. A to v ředidle Optidyl®, které obsahuje ionizovaný vaječný žloutek a Bull-x-cell®, ke

kterému je žloutek přidáván při jeho přípravě jako čerstvá složka. Třetím ředidlem byl AndroMed®, které složku vaječného žloutku neobsahovalo.

Příprava ředidel probíhala v laboratoři inseminační stanice dle návodů jednotlivých výrobců ráno před zahájením odběru. Před samotným ředěním došlo k zahřátí ředidel na teplotu 38 ± 1 °C.

4.2.1. AndroMed®

Bezžloutkové ředidlo, které dodává na světový trh německá rodinná společnost Minitube International. Společnost byla založena v roce 1970 a nyní působí zejména ve výrobě technologií pro asistovanou reprodukci a produktů pro umělé oplodnění.

Ředidlo neobsahuje živočišnou složku a i přes to je deklarována jeho vysoká účinnost. Je dodáváno ve dvou variantách v lahvičkách o objemu 200 ml a 100 ml. Jednostupňová varianta (200 ml) s ATB složkou, která byla použita k pokusu a dvě dvoustupňové varianty (100 ml), též doplněny o složky antibiotik. Výrobce deklaruje možnost konzervace inseminačních dávek, ale také uchovávání čerstvého spermatu, minimální mikrobiální koncentraci a rychlou a snadnou přípravu (smíchání obsahu lahvičky s 800 ml redestilované vody). Ředidlo obsahuje rostlinné fosfolipidy, Tris, kyselinu citronovou, cukry, antioxidanty, pufrý, redestilovanou vodu a antibiotika (Tylosin, Gentamycin, Spectinomycin, Lincomycin).

4.2.2. Optidyl®

Ředidlo, s obsahem vaječného žloutku je dodáváno na český trh francouzskou certifikovanou společností BIO-VET. Barva je žlutavá a objem balení 0,5 l lahvičky. Ředidlo obsahuje Tris, ionizovaný vaječný žloutek, glycerol a antibiotickou složku, zastoupenou streptomycinem, penicilinem, lincomycinem a spectinomycinem. Ionizace vaječného žloutku je prováděna ve dvou etapách z důvodu sterilizace. K první ionizaci dochází ještě před přidáním ostatních komponentů do směsi, k druhé ionizace po přimíchání všech ostatních složek ředidla.

K přípravě ředidla dochází smícháním obsahu lahvičky s třičtvrtě litrem redestilované vody. Ředění je možno provádět při pokojové teplotě, nebo v kombinaci zředění jedné poloviny při pokojové teplotě a druhé poloviny při snížené teplotě na 4 °C. Po zředění se směs ohřeje na požadovanou teplotu. Doporučené podmínky skladování od výrobce jsou při 5 °C.

4.2.3. Bull-x-cell®

Ředidlo na bázi vaječného žloutku, které vyrábí známá francouzská společnost IMV Technologie. Společnost působí na světovém trhu již padesát let a je světovou jedničkou

v reprodukci a biotechnologických metodách. Ředidlo je uváděno do oběhu jako koncentrát v lahvičkách o objemu 250 ml. Výrobce uvádí dlouhodobě pozitivní výsledky v tepelném testu a vyšší pohyblivosti spermií než u ostatních komerčně vyráběných ředidel. Deklaruje také vysokou plodnost po provedené inseminaci a zachování stability až po dva roky při uchování v pokojové teplotě. K přípravě ředidla dochází smícháním obsahu lahvičky s 250 ml vaječného žloutku a 750 ml redestilované vody.

4.3.Odběr a zpracování spermatu

Odběr ejakulátu byl proveden ve třech různých dnech (24.7, 7.8 a 21.8.2013) a probíhal podle metodických pokynů inseminační stanice. Každý odebraný ejakulát byl nejprve zhodnocen senzoricky. Zjišťována byla přítomnost cizorodých přímísenin, zápach, hustota ejakulátu, jeho množství a subjektivně byla zhodnocena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem výchozí aktivita spermií. K následnému hodnocení byl použit pouze ejakulát s aktivitou vyšší než 70 % a hustotou vyšší než $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^3$.

Po vstupním zhodnocení byl ejakulát rovnoměrně rozdělen na tři díly a každý z dílů naředěn připravenými a zahřátými ředidly podle návodu, udávaného výrobcem tak, aby po naředění bylo získáno 10 milionů aktivních spermií v dávce. Aplikace ředidel byla prováděna sterilními injekčními stříkačkami, pozvolným odkapáváním ředidla do odebraného dílu ejakulátu umístěného ve zkumavce. Po naředění byla zkumavka uzavřena sterilní zátkou.

Po zazátkování byly zkumavky přemístěny na oscilační stolek a obsah promícháván po dobu 10 minut. Následovalo plnění do pejet o objemu 0,25 ml a jejich okamžité chlazení na 4 °C. Ekvilibrace po dobu 120 minut, zajistila dokonalé zchlazení ejakulátu. Následovalo mrazení v přístroji Mini-Digitcool (IMV Technologies, Francie).

Průběh zmrazování ze 4 °C na -140 °C byl řízen počítačem. Následovalo vyjmutí dávek a jejich vložení do kontejneru na skladování inseminačních dávek v tekutém dusíku. Výroba ID byla provedena v rámci rozsáhlejšího pokusu, ve kterém byly hodnoceny různé typy mrazících křivek. Pro výsledky diplomové práce však byly využity pouze pejety, zmrazené standardní mrazící křivkou pro mrazení ejakulátu býků.

4.4.Hodnocení přežitelnosti spermií

Hodnocení rozmrazeného ejakulátu bylo provedeno v laboratoři České zemědělské univerzity v Praze v měsících září – říjen 2013, pomocí krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií. Jedná se jednoduchou, běžně využívanou metodu, která je založena na principu zjišťování poklesu aktivity spermií v čase. Celkem bylo zhodnoceno 135 inseminačních

dávek, ve třech různých odběrech (značení odběrů V, VI, VII). Odběr V ze dne 24.7.2013 odebrání 3 býci (Manitogen, Fame, Mozart), odběr VI ze dne 7.8.2013 odebráno 8 býků (Nektar, Patriot, Origin, Nachos, Partner, Northon, Giroid, Manitogen) a odběr VII ze dne 21.8.2013 odebrání 4 býci (Milano, Manitogen, Origin, Ilig). Celkem tedy bylo hodnoceno 15 ejakulátů od dvanácti různých býků. Z každého odebraného ejakulátu bylo hodnoceno 9 inseminačních dávek, vždy 3 dávky ve třech odlišných typech ředidla (označeno A-AndroMed®, O-Optidyl®, B-Bull-x-cell®).

Pracovní postup:

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 sekund. Poté následovalo jejich vyjmutí, řádné osušení a obsah pejety byl vložen do zkumavky s fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl o pH 6,8) předeřhřátým na 38 °C v suchém termostatu (Thermoblock Falc ®).

Hodnocení aktivity spermatických buněk bylo prováděno v pravidelných intervalech v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hodiny. Aktivita byla hodnocena subjektivně pomocí mikroskopu NIKON Eclipse E200 s fázovým kontrastem při zvětšení 200 x. Všechny vzorky byly hodnoceny stejnou osobou. Hodnocen byl přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou.

4.5. Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky z hodnocení byly průběžně zapisovány do programu MS Excel, čímž byly připraveny k následnému statistickému zhodnocení. Pro statistické vyhodnocení byl použit program STATISTICA 12, za použití metody jednofaktorová ANOVA při opakovaných měřeních.

Na základě modelu byl hodnocen vliv ředidel na aktivitu spermatických buněk v pravidelných časových intervalech při použití krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \tau_i + (\alpha\tau)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} - měřená hodnota závisle proměnné (procento aktivních spermií v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hodiny)

μ - střední hodnota

α_j - efekt j-té úrovně ($j = 1$ – AndroMed®, $n = 45$; 2 – Optidyl®, $n = 45$; 3 – Bull-x-cell®, $n = 45$)

τ_i - efekt i-tého časového okamžiku ($i = 1$ – 0 hod, $n = 135$; 2 – 0,5 hod, $n = 135$; 3

– 1 hod, n = 135; 4 – 1,5 hod, n = 135; 5 – 2 hod, n = 135)

$(\alpha\tau)_{ij}$ - efekt (vliv) společného působení typu ředidla i času

ε_{ijk} - náhodná (experimentální) chyba měření

H_0 : Neexistuje statisticky významný rozdíl přežitelnosti spermií v jednotlivých typech ředidel.

Statistická průkaznost byla hodnocena na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

Vzhledem k odlišnému plemennému složení a několika různých býků při odběru vzorků ejakulátu bylo možné, kromě vlivu působení ředidel na aktivitu spermií, hodnotit také vliv plemene a vliv jednotlivých býků na aktivitu spermatických buněk v časových intervalech při použití krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií, a to podle těchto modelových rovnic:

Vliv plemene:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \tau_i + (\alpha\tau)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} - měřená hodnota závisle proměnné (procento aktivních spermií v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hodiny)

μ - střední hodnota

α_j - efekt j-té úrovně ($j = 1$ – Holštýn, $n = 45$; 2 – Český strakatý skot, $n = 90$)

τ_i - efekt i-tého časového okamžiku ($i = 1$ – 0 hod, $n = 135$; 2 – 0,5 hod, $n = 135$; 3 – 1 hod, $n = 135$; 4 – 1,5 hod, $n = 135$; 5 – 2 hod, $n = 135$)

$(\alpha\tau)_{ij}$ - efekt společného působení plemene i času

ε_{ijk} - náhodná (experimentální) chyba měření

Pro vyhodnocení vlivu plemene na aktivitu spermatických buněk po rozmražení inseminačních dávek za použití krátkodobého tepelného testu byla stanovena nulová hypotéza:

H_0 : Mezi Holštýnským plemenem a plemenem Českého strakatého skotu neexistuje statisticky významný rozdíl v subjektivním hodnocení aktivity spermií při použití krátkodobého tepelného testu.

Vliv býka:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \tau_i + (\alpha\tau)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} - měřená hodnota závisle proměnné (procento aktivních spermií v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hodiny)

μ - střední hodnota

α_j - efekt j-té úrovně ($j = 1$ – Manitogen, $n = 27$; 2 – Fame, $n = 9$; 3 – Mozart, $n = 9$; 4 – Northon, $n = 9$; 5 – Origin, $n = 18$; 6 – Nektar, $n = 9$, 7 - Nachos, $n = 9$; 8 – Ilig, $n = 9$; 9 – Milano, $n = 9$; 10 – Patriot, $n = 9$; 11 – Partner, $n = 9$; 12 – Girolid, $n = 9$)

τ_i - efekt i-tého časového okamžiku ($i = 1$ – 0 hod, $n = 135$; 2 – 0,5 hod, $n = 135$; 3 – 1 hod, $n = 135$; 4 – 1,5 hod, $n = 135$; 5 – 2 hod, $n = 135$)

$(\alpha\tau)_{ij}$ - efekt společného působení býka i času

ε_{ijk} - náhodná (experimentální) chyba měření

Stanovena byla nulová hypotéza:

H_0 : Mezi jednotlivými býky neexistuje statisticky významný rozdíl v aktivitě spermatických buněk po rozmrazení za použití krátkodobého tepelného testu.

5. VÝSLEDKY

5.1. Výsledky statistiky vlivu ředidla

Celkem bylo hodnoceno 135 vzorků s rovnoměrným zastoupením třech různých ředidel. Hodnocení probíhalo za použití krátkodobého tepelného testu, kdy byla aktivita hodnocena subjektivně v pěti pravidelných časových intervalech. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p \leq 0,05$ mezi jednotlivými typy ředidel byl zjištěn v čase 1,5 a 2 hodiny prováděného tepelného testu (tabulka č. 7).

Dochází k zamítnutí nulové hypotézy a pro potvrzení bylo provedeno podrobnější vyhodnocení pomocí Tuckeyovi metody (T – metoda) vyváženého modelu, kdy bylo zjištěno, že statisticky významný rozdíl existuje mezi ředidly AndroMed® a Optidyl® a to jak v čase 1,5, tak také ve 2 hodinách hodnocení testu (tabulka č. 8 a 9).

Rozdíl je patrný také z grafů č. 1 a 2. Graf č. 1 znázorňuje aktivitu spermatických buněk v procentech, zobrazenou na ose y, v jednotlivých typech ředidel, zobrazených na ose x. Graf č. 2 porovnává průměrné hodnoty aktivity spermií v časových intervalech. Po vizuálním zhodnocení lze konstatovat, že nejvyšší aktivity dosáhly spermatické buňky jednoznačně v ředidle Optidyl®. Naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny v ředidle AndroMed®. Rozdíl průměrů aktivity spermií v ředidlech se s prodlužujícím časem zvyšoval.

5.1.1. AndroMed®

Hodnoceno bylo 45 inseminačních dávek z 15 odebraných ejakulátů. Od každého ejakulátu byly hodnoceny vždy tři inseminační dávky. Hodnocena byla aktivita spermatických buněk po rozmrazení ID v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hod. V čase 0 minut dosahovala nejnižší aktivita 40 %, nejvyšší hodnota byla 75 %, průměrně 50 %. S přibývajícím časem se aktivita postupně snižovala tak, že po dvou hodinách byla hodnocena nejvyšší aktivita 50 %, nejnižší 0 % a průměrná hodnota činila 14,1 % (tabulka č. 4).

5.1.2. Optidyl®

Hodnoceno bylo stejně jako u předchozího ředidla 45 inseminačních dávek z 15 odebraných ejakulátů. Od každého odebraného ejakulátu byly hodnoceny vždy tři inseminační dávky. V čase 0 minut, ihned po rozmrazení dosahovala aktivita spermií v nejvyšších hodnotách 80 %, v nejnižších 40 % a průměrně 51,2 %. Po dvou hodinách krátkodobého tepelného testu byly zaznamenány výsledky aktivity nejvýše 55 %, nejméně 5 % a průměrně 20 % (tabulka č. 5).

5.1.3. Bull-x-cell®

Jako v předchozích dvou případech bylo opět hodnoceno 45 inseminačních dávek z 15 odebraných ejakulátů. Od každého odebraného ejakulátu byly hodnoceny tři inseminační dávky. V čase 0 minut po rozmražení byla zaznamenána nejvyšší aktivita 70 %, nejnižší 30 % a průměrně 50,1 %. Po dvou hodinách krátkodobého tepelného testu došlo opět k postupnému snižování aktivity na hodnoty nejvyšší 45 %, nejnižší 0 % a průměrně 16,3 % (tabulka č. 6).

5.2. Výsledky statistiky dle plemene

Pro hodnocení ejakulátu byli odebíráni býci dvou různých plemen odlišných užitkových typů. Jednalo se plemeno mléčného užitkového typu zastoupené devíti býky Holštýnskými a plemeno kombinované, zastoupené třemi býky Českého strakatého skotu. Z celkového počtu 135 hodnocených inseminačních dávek bylo Holštýnské plemeno zastoupeno ve 45 dávkách a Český strakatý skot v 90 dávkách.

Zjištěno bylo, jak uvádí tabulka č. 10, že mezi Holštýnským plemenem a plemenem Českého strakatého skotu neexistuje na hladině významnosti $p \leq 0,05$ statisticky významný rozdíl. Nulová hypotéza je potvrzena. Graficky znázorněno v grafu č. 3, kde na ose x jsou zaznamenána plemena, na ose y je procentuální hodnocení aktivity spermií a barevně vyznačeny statistické výsledky v časových intervalech testu.

5.3. Výsledky statistiky dle býka

Hodnoceno bylo 12 býků různého stáří dvou plemen. Z celkového počtu 135 inseminačních dávek bylo hodnoceno 27 dávek odebraných od býka Manitogena, 9 dávek od Fama, 9 dávek od Mozarta, 9 dávek od Northona, 18 dávek od Origina, 9 dávek od Nektara, 9 dávek od Nachose, 9 dávek od Iliga, 9 dávek od Milana, 9 dávek od Patriota, 9 dávek od Partnera a 9 dávek od Girolda. Ve všech případech byla rovnoměrně v dávkách zastoupena výše uvedená ředidla a z každého odběru hodnoceny 3 inseminační dávky.

Statistické výsledky po podrobnějším vyhodnocení pomocí Scheffého metody nevyváženého modelu dokazují, že na hladině významnosti $p \leq 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v čase hodnocení 0,5 hodiny mezi býky Milano a Mozart, v čase hodnocení 1 hodiny mezi býky Patriot a Mozart a v časech hodnocení 1,5 a 2 hodin mezi býky Milano a Mozart. Pro hladinu významnosti $p \leq 0,01$ existuje statisticky významný rozdíl v čase hodnocení 1 hodiny mezi býky Milano/Mozart a Girold/Mozart (tabulky č. 11 a 12).

Z grafického znázornění (graf č. 4), kde na ose x jsou zanesena jména býků a osa y představuje hodnocenou aktivitu spermií, jasně vyplývá, že nejvyšší přežitelnost spermatických buněk po rozmrazení má dle aktivity hodnocené při krátkodobém tepelném testu ve všech časových úsecích býk Holštýnského plemene Mozart.

5.4.Korelační analýza

Pomocí korelačních matic v programu Statistica 12 byly zjištěny korelační koeficienty mezi hodnocenými ukazateli vlivu býka, ředidla a aktivity spermií v časech 0; 0,5; 1; 1,5 a 2 hodiny. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 13.

Zjištěna byla statistická významnost na hladině významnosti $p \leq 0,01$ mezi ukazateli vlivu býka a aktivity spermií v čase 0 a 2 hodiny a na hladině významnosti $p \leq 0,05$ v časech 0,5; 1 a 1,5 hod testu.

Mezi typem ředidla a aktivitou spermatických buněk byla zaznamenána statistická významnost na hladině $p \leq 0,05$ v časech 1,5 a 2 hodiny prováděného krátkodobého tepelného testu.

6. DISKUZE

Pro hodnocení byli vybráni býci, jejichž vstupní ukazatele splňovaly podmínky ejakulátu, který mohl být dále využíván k inseminaci, tedy výchozí aktivita spermií po odběru dosahovala více než 70 % a hustota byla vyšší než $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^3$. Po rozmrazení ID byly v aktivitě spermií mezi jednotlivými býky zaznamenány statisticky významné rozdíly, na nichž však nebyla diplomová práce založena a mají význam spíše doplňující.

Nejlépších parametrů dosahoval v průběhu celého testu býk Mozart, u kterého činila aktivita spermatických buněk po rozmrazení 60 – 75 % a po dvou hodinách při použití krátkodobého tepelného testu nepoklesla ani v jednom z hodnocených vzorků pod 20 %. Naopak nejhorší výsledky byly zaznamenány u býků Milano, Patriot a Girola, u kterých se po rozmrazení pohybovala aktivita spermií v rozmezí 30 – 60 % a po dvou hodinách krátkodobého tepelného testu byly hodnoty téměř nulové. Samotná individualita býka byla tedy shledána jako velice významná.

Rozdíly v individualitě mohlo zapříčinit hned několik faktorů. Vliv plemene lze v tomto případě zamítnout, neboť nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi hodnocenými plemeny, a to ani v jednom časovém úseku v průběhu krátkodobého tepelného testu. Pro hodnocení byla vybrána pouze dvě plemena, a to býci Holštýnského plemene a Českého strakatého skotu. Jedná se o mléčné a kombinované plemeno, u kterých je pro reprodukci převážně využívána právě umělá inseminace. Statisticky významný rozdíl by byl zřejmě hodnocen v případě zařazení býka masného typu, neboť Louda et al., (2007) uvádí, že u krav bez tržní produkce mléka, tedy u masných plemen je i nadále preferována přirozená plemenitba, která zajišťuje lepší zabřezávání ve stádě, což se zřejmě může odrazit také v kvalitě ID pro účely umělé inseminace.

Hofírek et al (2009) potvrzují, že na celkové pohlavní aktivitě a plodnosti býků se mohou podílet jak endogenní, tak i exogenní vlivy. Jedná se zejména o psychologický profil býka. Tedy to, jestli je býk silný vyrovnaný a živý sangvinik či mírný flegmatik, nebo naopak prudký cholerik či slabý melancholik, kteří jsou pro inseminaci méně vhodní. Dalšími významnými faktory, které ovlivňují výslednou přežitelnost a aktivitu spermií v odebraném ejakulátu mohou být také věk býka, jeho zdravotní stav, výživa, klimatické podmínky a vlivy prostředí.

Vzhledem k tomu, že pro hodnocení aktivity ve všech třech typech ředidel byl použit vždy stejný počet identických vzorků, rozdílných pouze v typu ředidla, lze jednoznačně hovořit o vlivu typu ředidla na přežitelnost spermií bez jakýchkoliv dalších působících faktorů.

Předpokladem bylo, že ředidla, založená na bázi vaječného žloutku budou z hlediska přežitelnosti spermií vykazovat lepší výsledky než ředidlo bezžloutkové (Phillips, 1939; Muiño et al., 2007; Lasley et al., 1942). Nejen že vaječný žloutek je schopen zajistit spermatickým buňkám dostatečné množství energie (Kampschmid et al., 1953), ale při jeho použití v ředidlech je prokázáno také zachování odpovídající motility spermií a soudržnosti jejich membrán, než při použití ředidel bezvaječných (Celeghini et al., 2008).

Výsledky zjištěné po rozmrazení vzorků na začátku krátkodobého tepelného testu v čase 0 hod stanovily nejlepší průměrné hodnoty u ředidla Optidyl® (51,2 %), hůře pak dopadly ředidla Bull-x-cell® (50,1 %) a AndroMed® (50 %).

Pořadí jednotlivých ředidel zůstalo již po celou dobu hodnocení v krátkodobém tepelném testu nezměněno. Po půl hodině pozorování činila průměrná aktivita v ředidle Optidyl® (43,1 %), Bull-x-cell® (41,7 %) a AndroMed® (41,4 %) a po hodině pozorování byly hodnoty v ředidle Optidyl® (36,2 %), Bull-x-cell® (33,7 %) a AndroMed® (32,1 %). Tyto hodnoty však nestačil pro potvrzení statistické významnosti přežitelnosti spermií v jednotlivých typech ředidel.

Změny bylo dosaženo až v čase měření 1,5 hodiny hodnocení v krátkodobém tepelném testu, kdy byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$) v průměrné aktivitě nejlépe hodnoceného ředidla Optidyl® (28,6 %) a v průměrné hodnotě aktivity u ředidla AndroMed® (22,9 %). Ředidlo Bull-x-cell® v čase hodnocení 1,5 hodiny dosahovalo průměrně 24,2 % aktivity spermatických buněk.

Po dvou hodinách působení krátkodobého tepelného testu, bylo opět nejlépe hodnoceno ředidlo Optidyl® (20 %), následoval Bull-x-cell® (16,3 %) a nejhůře dopadl AndroMed® (14,1 %). Mezi průměrnou aktivitou ředidel Optidyl® a AndroMed® byl v čase 2 hodin zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$). Tato skutečnost tedy vyvrací zjištění Jannet et al., (2005), že bezžloutkové ředidlo AndroMed®, je pro dlouhodobé uchování ejakulátu nejlepší.

Předpoklad byl tedy dosažen u žloutkového ředidla Optidyl®. Druhé žloutkové ředidlo Bull-x-cell® dosahovalo průměrně vyšších hodnot aktivity spermií než bezžloutkové ředidlo AndroMed®, statisticky významný rozdíl však prokázán nebyl.

Jedním z důvodů, proč nebylo dosaženo předpokladu u druhého žloutkového ředidla Bull-x-cell® může být zajímavé zjištění, že po rozmrazení byla stanovena minimální aktivita dosahující pod 40 % a to hned ve 4 případech. Jednalo se o 4 různé býky, u každého z nich však bylo použito právě ředidlo Bull-x-cell®. Tyto inseminační dávky by mohly být ještě k inseminaci použity, neboť Filipčík a Hanuláková (2012) uvádí, že po rozmrazení je nutná aktivita spermatických buněk minimálně 30 %, Louda (2001) pak dokonce 20 %, nicméně výskyt takto nízkých hodnot mohl zapříčinit ve výsledku celkové snížení průměrné hodnoty a tím také zjištění statistické neprůkaznosti.

Dalším z důvodů může být právě zmiňovaná rozdílná příprava obou ředidel. Zatím co je ředidlo Optidyl®, do kterého je vaječný žloutek přidán již při jeho výrobě a dvakrát ionizován z důvodu sterilace, tak ředidlo Bull-x-cell® je vyráběno bez přítomnosti vaječného žloutku. Samotný žloutek je přidáván až při přípravě ředidla, a to jako čerstvá neupravovaná složka v poměru 1 díl žloutku a 3 díly redestilované vody. Rozdílná je právě ona dvojnásobná ionizace žloutku, která je použita pouze u ředidla Optidyl®.

Přidaný vaječný žloutek do ředidla Bull-x-cell® je ponechán jako čerstvá nesterilizovaná složka, jehož důsledkem mohou být právě ony nízké hodnoty zjišťované aktivity. Podobných výsledků dosáhli také Thun et al. (2002), kteří ve své práci použili dvě stejná žloutková ředidla, ale rozdílné teplotní podmínky při jejich přípravě. Výsledkem byly zjištěny odlišné hodnoty.

Neméně významný je také fakt, že ve výzkumu nebylo nijak zohledňováno ani samotné složení vaječného žloutku. Některé studie totiž dokazují, že ne všechny frakce vaječného žloutku působí při zamrazování na spermatické buňky pozitivně (Pace et Graham, 1974; Watson, 1976; Quinn et al., 1980).

Kladné účinky jsou připisovány složce LDL (low-density lipoprotein), a to zejména u negativního působení chladového šoku na spermie při zmrazování a následném uchovávání v tekutém dusíku (Pace et Graham, 1974; Amirat et al., 2005). Obdobných výsledků dosáhli také Demianowicz a Strezek (1996) u kanců, kteří porovnávali LDL a HDL složku vaječného žloutku s výsledkem pozitivního působení LDL na motilitu spermií.

Po zhodnocení lze tedy doporučit jako ředidlo s nejlepšími vlastnostmi pro přežitelnost spermií žloutkové ředidlo Optidyl®, ve kterém byla po rozmrazení zjištěna nejvyšší aktivita spermatických buněk, statisticky významná, oproti bezžloutkovému ředidlu AndroMed®, a to

zejména s prodlužujícím se časovým intervalem po rozmrazení při hodnocení v průběhu krátkodobého tepelného testu.

7. ZÁVĚR

Předpoklad, že použití vaječného žloutku v ředidlech pro ejakulát býků, který byl pro diplomovou práci stanoven, byl částečně prokázán. Ze dvou použitých žloutkových ředidel byla statisticky významná průkaznost zjištěna pouze v jediném z nich, a sice v ředidle Optidyl®. Ve druhém žloutkovém ředidle Bull-x-cell® průkaznost zjištěna nebyla, nicméně průměrné hodnoty aktivity v průběhu celého tepelného testu byly vždy o něco vyšší než v ředidle AndroMed®, u kterého výrobce sice deklaruje vysokou přežitelnost spermatických buněk i bez použití vaječné složky, nicméně ředidlům založených na využití vaječného žloutku se rovnat nemůže.

Lze tedy konstatovat, že využití vaječného žloutku v ředidlech má rozhodně nezastupitelný význam a i přes to, že se někteří výrobci snaží vaječný žloutek nahrazovat jinými složkami, nelze je srovnávat s pozitivními vlastnostmi vaječného žloutku, které působí na výslednou kvalitu býčího ejakulátu.

Pozornost by však měla být věnována také postupům při přípravě ředidel. To mohl být jeden z faktorů, který zapříčinil některé nízké hodnoty motility spermií po rozmrazení inseminačních dávek právě v ředidle Bull-x-cell®, kam je žloutek přidáván jako čerstvá komponenta až při přípravě ředidla.

Stejně tak by měla být pozornost zaměřena také na škodlivé složky, které žloutek obsahuje, a které jsou pro spermie smrtící. Po odstranění těchto složek by mohla kvalita ejakulátu značně stoupnout.

8. SEZNAM LITERATURY

AMIRAT, L., ANTON, M., TAINTURIER, D., CHATAGNON, G., BATTUT, I., COURTENS, J.L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129. 535-543.

AMIRAT, L., TAINTURIER, D., JEANNEAU, L., THORIN, C., GÉRARD, O., COURTENS, J.L., ANTON, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61. 895-907.

BOŠTÍK, M., HUDEČEK, I. 2008. Litomyšlsko. Mikroregion Litomyšlsko, H.G.R. Litomyšl spol. s.r.o., 74 – 75.

CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F.C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F., RODRIGUES, P.H.M. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104. 119-131.

CRV. Pohled do plemenářské laboratoře [online]. *Chov skotu*. 13. únor 2009 [cit. 2013-08-02]. Dostupné z <http://www.crv.cz/Portals/0/Files/Nabidka/Vyroba%20sexovanych%20ID.pdf> >.

DAMIANOWICZ, W., STREZEK, J. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Dom Anim*. 31. 279-280.

EIBL, K. 1959. *Lehrbuch der Rinderbesamung*. Berlin-Hamburg.

FILIPČÍK, R., HANULÁKOVÁ, Š. 2012. The evaluation of sperm bull motility. *Animal physiology 2012, Proceeding of international conference, Mendel University in Brno*. 34-39. ISBN: 978-80-7375-616-1.

FOULKES, J.A. 1977. The separation of lipoprotein from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fert*. 49. 277-284.

- GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24, 42-52.
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. 2000. *Reproduction in farm animals*. Blackwell Publishing. USA. p. 509. ISBN-10: 0683305778, ISBN-13: 978-0683305777.
- HOFÍREK, B., DVOŘÁK, R., NĚMEČEK, L., DOLEŽEL R., POSPÍŠIL, Z. 2009. *Nemoci skotu*. Noviko a.s., Brno. 1149 s. ISBN: 978-80-86542-19-5.
- HUOPALAHTI, R., LÓPEZ-FANDIÑO, R., ANTON, M., SCHADE, R. 2007. *Bioactive egg compounds*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 298 s. ISBN-13: 978-3-540-37883-9.
- ILLEK, J., ŠTERC, J., HALOUN, T., SCIORSCI, R.L., BRYDL, E., NEUMAYER, M., ZELINKOVÁ, G. 2009. *Poruchy metabolismu u skotu a jejich řešení*. Česká buiatrická společnost, VFU Brno. 46 s. ISBN: 978-80-86542-21-8.
- JANETT, F., KEO, S., BOOLWEIN, H., HÄSSIG, M., THUN, R. 2005. Comparison of AndroMed, Bioxcell and Triladyl extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch. Tierheilk.* 147. 62.
- JEŽKOVÁ, A. Inseminace je stále klíčovou metodou [online]. *Náš chov*. 16.3.2012 [cit. 2013-07-17]. Dostupné z <<http://naschov.cz/inseminace-je-stale-klicovou-metodou/>>.
- KADEČKA, J. 2008. Reprodukce skotu dnes a dříve. *Chovatelské listy*, 2008 (VIII), 6-7.
- KAMPSCHMIDT, R.F., MAYER, D.T., HERMAN, H.A. 1953. Lipids and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci*, 36, 733-742.
- KULOVANÁ, E. Výběr býků do plemnitby a činnosti ústředních odchoven plemenných býků [online]. *Náš chov*. 19.4.2001 [cit. 2013-08-22]. Dostupné z <<http://naschov.cz/vyber-byku-do-plemenitby-a-cinnost-ustrednich-odchoven-plemennych-byku/>>.
- KULOVANÁ, E. Inseminace – nositelka šlechtitelského pokroku v chovu hospodářských zvířat [online]. *Náš chov*. 22.1.2002 [cit. 2013-08-07]. <<http://naschov.cz/inseminace-nositelka-slechtitelskeho-pokroku-v-chovu-hospodarskych-zvirat/>>.

LASLEY, J.F., EASLEY, G.T., MCKENZIC, F.F. 1942. A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I applicability to the staining of ram spermatozoa. *Anat. Rec.* 82. 167.

LOPATÁŘ, A. 2001. Vliv managementu stáda na reprodukci. *Šlechtitel. září.* 14-18.

LOUDA, F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. ČZU, Praha. 225 s. ISBN: 80-213-0702-1.

LOUDA, F., BJELKA, M., JEŽKOVÁ, A., POZDÍŠEK, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. VÚCHS Rapotín. 43 s. ISBN: 978-80-87144-01-5.

LOUDA, F., ČEŘOVSKÝ, J. 1994. Inseminace a biotechnologické metody v reprodukci hospodářských zvířat. VŠZ Praha. 167 s. ISBN: 80-213-0186-4.

LOUDA, F., VANĚK, D., JEŽKOVÁ, A., STÁDNÍK, L., BJELKA, M., BEZDÍČEK, J., POZDÍŠEK, J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. VÚCHS, Rapotín. 56 s. ISBN: 978-80-87144-05-3.

MALÁT, K. 2012. Testace plemenných býků masných plemen. *Náš chov.* 2012 (4). ISSN: 0027-8068. Dostupné také z < <http://naschov.cz/testace-plemennyh-byku-masnych-plemen/> >.

MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A., MÉNARD, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 67. 1250-1258.

MARVAN, F., HAMPL, A., HLOŽÁNKOVÁ, E., KRESAN, J., MASSANYI, L., VERNEROVÁ, E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. ČZU Praha. 303 s. ISBN: 978-80-213-1658-4.

MOUSSA, M., MARTINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D., ANTON, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 57. 1695-1706.

MUIÑO, R., FERNÁNDEZ, M., PEÑA, A.I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk- based or two egg-yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. *Reprod. Dom. Anim.* 42. 305-331.

NEHASILOVÁ, D. Plodnost – parametr managementu [online]. *Agronavigátor*. 27.1.2006 [cit. 2014-02-17]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=49475&ids=150>>.

PACE, M.M., GRAHAM, E.F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci.* 39. 1144-1149.

PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38. 209-222.

PETERS, A.R., BALL, P.J.H. 1995. *Reproduction in cattle*. 3rd Ed., Blackwell Publishing. Great Britain. p. 242. ISBN: 0-632-04109-9.

PHILLIPS, P.H. 1939. The preservation of bull semen. *J Biol Chem.* 130. 415.

QUINN, P.J., CHOW, P.Y.W., WHITE, I.G. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fert.* 60. 403-407.

REECE, W.O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada Publishing spol. s.r.o., Praha. 456 s. ISBN: 80-7169-547-5.

ŘÍHA, J., JAKUBEC, V., JÍLEK, F., ILLEK, J., KVAPILÍK, J., HANUŠ, O., ČERMÁK, V. 2004. *Reprodukce v procesu šlechtění skotu*. VÚCHS, Rapotín. 144 s. ISBN: 80-903143-5-X.

ŘÍHA, J., MACHATKOVÁ, M., PETELÍKOVÁ, J., JAKUBEC, V., PYTLOUN, J., ŠEREDA, L., PAVLOK A. 1999. *Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat*. VÚCHS Rapotín. 167 s.

SHANNON, P. 1956. Presence of a heat-labile toxic protein in bovine seminal plasma. *J Dairy Sci.* 48. 1362-1365.

SPAHR, S.L., OPPERMAN, G.W. 1995. *The dairy cow today*. U.S. Trends, Breeding and Progress Since 1980. Hoard's Dairyman, Fort Atkinson. p.179. ISBN: 0-932147-26-7

- SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E., HERZIG, I., SKŘIVANOVÁ, E., ZAPLETAL, D. 2011. Výživa a dietetika, II. díl – Výživa přežvýkavců. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. 127 s. ISBN: 978-80-7305-599-8.
- ŠEFROVÁ, J. Řízení reprodukce u samic dojného skotu [online]. Agropress.cz. [cit. 2014-02-17]. Dostupné z <<http://www.agropress.cz/rizeni-reprodukce-u-samic-doj-skotu.php>>.
- THUN, R., HURTADO, M., JANNET, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57 (3), 1087-1094.
- THURSTON, L.M., WATSON, P.F., HOLT, W.V. 2002. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *CryoLetters*, 23, 255-262.
- TICHÝ, F., HORKÝ, D., BUCHTOVÁ, M., GOROŠOVÁ, A., KOCIÁNOVÁ, I., PÁRAL, V., ZIBRÍN, M. 2004. Histologie – mikroskopická anatomie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 275 s. ISBN: 80-7305-495-7.
- VĚŽNÍK, Z. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie a metody spermoanalýzy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno. 189 s. ISBN: 80-86895-01-7.
- WATSON, P.F. 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 °C and deep freezing. *J Thermal Biol.* 1. 137-141.
- ZINK, V. Správný management stáda v jednotlivých fázích mezidobí, prostředek k lepší ekonomice [online]. Agropress.cz. [cit. 2014-01-21]. Dostupné z <http://www.agropress.cz/management_mezidobi.php>.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ID – inseminační dávka

CC test – metoda pro odhad PH býků

BLUP metoda – metoda pro odhad PH býků (pomocí lineárních modelů se smíšenými efekty)

ATP – adenosintrifosfát

ADP – adenosindifosfát

BLAP- syndrom deficience adhezní schopnosti leukocytů

CVM – komplex vertebrálních malformací

RH – rodokmenová hodnota

PH – plemenná hodnota

ČSCHMS – Český svaz chovatelů masného skotu

IBR – infekční bovinní rinotracheitida

BVD/MD – bovinní virová diarea, slizniční choroba

UHT – metoda konzervace potravin „vysokoteplotní úprava“

LDL – low-density lipoprotein

HDL – high-density lipoprotein

NEB – negativní energetická bilance

ATB – antibiotika

A – ředidlo AndroMed®

O – ředidlo Optidyl®

B – ředidlo Bull-x-cell®

* $p \leq 0,05$ – vzorky na hladině významnosti 0,05 (95 %)

** $p \leq 0,01$ – vzorky na hladině významnosti 0,01 (99 %)

10. SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

10.1. Seznam tabulek

| | |
|---|-------|
| Tabulka č. 1: Krmná dávka v období odchovu - období zkoušky vlastní užitkovosti | 55 |
| Tabulka č. 2: Základní charakteristiky odebraného býčího ejakulátu na inseminačních stanicích | 55 |
| Tabulka č. 3: Hodnocení ejakulátů býků po odběru | 55-56 |
| Tabulka č. 4: základní statistiky - ředidlo AndroMed® | 56 |
| Tabulka č. 5: základní statistiky – ředidlo Optidyl® | 56 |
| Tabulka č. 6: základní statistiky - ředidlo Bull-x-cell® | 56 |
| Tabulka č. 7: Výsledky statistiky vlivu ředidla | 56-57 |
| Tabulka č. 8: T- metoda v čase 1,5 hod | 57-58 |
| Tabulka č. 9: T - metoda v čase 2 hod | 58 |
| Tabulka č. 10: Výsledky statistiky dle plemene | 58-59 |
| Tabulka č. 11: Výsledky statistiky dle býka | 59-60 |
| Tabulka č. 12: Scheffeho test podrobnějšího vyhodnocení pro nevyvážený model | 60 |
| Tabulka č. 13: Korelační koeficienty r mezi ukazateli býka, ředidla a aktivity spermií v průběhu krátkodobého tepelného testu | 60 |

10.2. Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf č. 1: Aktivita spermií – ředidla ejakulátu | 61 |
| Graf č. 2: Aktivita spermií [%] v jednotlivých časových intervalech | 61 |
| Graf č. 3: Aktivita spermií – plemena býků | 62 |
| Graf č. 4: Aktivita spermií – býci | 63 |

10.3. Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek č. 1: Udržování vzorků v průběhu krátkodobého tepelného testu | 64 |
| Obrázek č. 2: Spermie pod mikroskopem | 64 |

Tabulka č. 1: Krmná dávka v období odchovu - období zkoušky vlastní užitkovosti (Louda, 2001)

| hmotnost (kg) | doplňková směs (kg) | oves (kg) | objemné krmivo (kg sušiny) |
|---------------|---------------------|-----------|----------------------------|
| 130 – 180 | 2,5 | | 2,0 |
| 181 – 250 | 3,0 | | 2,5 |
| 251 – 320 | 3,5 | | 4,0 |
| 321 – 400 | 4,0 | | 5,0 |
| 401 – 470 | 3,5 | 1,0 | 6,5 |

Tabulka č. 2: Základní charakteristiky odebraného býčího ejakulátu na inseminačních stanicích (Louda et al., 2007)

| Ukazatel | množství | jednotka | poznámka |
|--|---------------------------|-----------------|-------------------|
| Objem | 3 - 12 | cm ³ | |
| celkové množství spermií v odebraném ejakulátu | 5 - 15 x 10 ⁹ | | |
| koncentrace spermií | 0,8 - 2 x 10 ⁶ | mm ³ | |
| Aktivita | 45 - 75 | % | i více |
| pH | 6,4 - 7 | | |
| patologické spermie | < 5 | % | výjimečně do 20 % |

Tabulka č. 3: Hodnocení ejakulátů býků po odběru

| Odběr | Datum | jméno býka | registr | přímíseniny | aktivita [%] | hustota [10 ⁶ /mm ³] | množství [g] | mil. spermií |
|-------|-----------|------------|---------|-------------|--------------|---|--------------|--------------|
| V | 24.7.2013 | Mozart | NEA 818 | 0 | 70 | 0,8 | 18,2 | 10 |
| V | 24.7.2013 | Manitogen | MOR 198 | 0 | 70 | 0,9 | 20,6 | 10 |
| V | 24.7.2013 | Fame | NXA 873 | 0 | 70 | 1,1 | 16,3 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Nektar | NEO 2 | 0 | 70 | 1,8 | 1,5 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Patriot | NEO 283 | 0 | 80 | 0,9 | 2,3 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Origin | NEO 198 | 0 | 80 | 1 | 1,9 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Nachos | NEA 954 | 0 | 80 | 0,9 | 3,4 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Partner | NEO 285 | 0 | 70 | 1,2 | 1,8 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Northon | NEA 955 | 0 | 70 | 0,8 | 3,6 | 10 |
| VI | 7.8.2013 | Giroid | MOR 170 | 0 | 70 | 1,3 | 2,2 | 10 |

| | | | | | | | | |
|-----|-----------|-----------|---------|---|----|-----|------|----|
| VI | 7.8.2013 | Manitogen | MOR 198 | 0 | 70 | 1,1 | 3 | 10 |
| VII | 21.8.2013 | Milano | NEO 197 | 0 | 70 | 1,3 | 10,9 | 10 |
| VII | 21.8.2013 | Manitogen | MOR 198 | 0 | 70 | 1 | 15,7 | 10 |
| VII | 21.8.2013 | Origin | NEO 198 | 0 | 80 | 0,9 | 7,5 | 10 |
| VII | 21.8.2013 | Ilig | RAD 407 | 0 | 70 | 1,2 | 4,7 | 10 |

Tabulka č. 4: základní statistiky - ředidlo AndroMed®

| čas aktivita [%] | 0 hod | 0,5 hod | 1 hod | 1,5 hod | 2 hod |
|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| Maximum | 77 | 70 | 60 | 55 | 50 |
| Minimum | 40 | 25 | 15 | 10 | 0 |
| Průměr | 50 | 41,4 | 32,1 | 22,8 | 14,1 |

Tabulka č. 5: základní statistiky – ředidlo Optidyl®

| čas aktivita [%] | 0 hod | 0,5 hod | 1 hod | 1,5 hod | 2 hod |
|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| Maximum | 80 | 60 | 60 | 55 | 55 |
| Minimum | 40 | 30 | 20 | 10 | 5 |
| Průměr | 51,2 | 43,1 | 36,2 | 28,6 | 20 |

Tabulka č. 6: základní statistiky - ředidlo Bull-x-cell®

| čas aktivita [%] | 0 hod | 0,5 hod | 1 hod | 1,5 hod | 2 hod |
|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| Maximum | 70 | 65 | 55 | 50 | 45 |
| Minimum | 30 | 20 | 10 | 5 | 0 |
| Průměr | 50,1 | 41,7 | 33,7 | 24,2 | 16,3 |

Tabulka č. 7: Výsledky statistiky vlivu ředidla

| | | | | | | | |
|-----------|---|--------------|--------------|-------------|-------------|----------------|----------------|
| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (ředidla x čas) | | | | | | |
| | Sigma-omezená parametrizace | | | | | | |
| | Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | Stupně Volnosti | 0 hod. SČ | 0 hod. PČ | 0 hod. F | 0 hod. P | 0,5 hod. SČ | 0,5 hod. PČ |
| Abs. Člen | 1 | 343526,7 | 343526,7 | 3466,194 | 0,000000 | 238980,7 | 238980,7 |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (ředitla x čas) | | | | | | |
|---------|---|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Sigma-omezená parametrizace | | | | | | |
| | Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | Stupně Volnosti | 0 hod. SČ | 0 hod. PČ | 0 hod. F | 0 hod. P | 0,5 hod. SČ | 0,5 hod. PČ |
| Ředitlo | 2 | 41,1 | 20,6 | 0,207 | 0,812954 | 73,7 | 36,9 |
| Chyba | 132 | 13082,2 | 99,1 | | | 12695,6 | 96,2 |
| Celkem | 134 | 13123,3 | | | | 12769,3 | |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (ředitla x čas) | | | | | | |
|-----------|---|-----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|
| | Sigma-omezená parametrizace | | | | | | |
| | Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | 0,5 hod. F | 0,5 hod. p | 1 hod. SČ | 1 hod. PČ | 1 hod. F | 1 hod. p | 1,5 hod. SČ |
| Abs. Člen | 2484,764 | 0,000000 | 156060,0 | 156060,0 | 1460,757 | 0,000000 | 85629,63 |
| Ředitlo | 0,383 | 0,682459 | 387,8 | 193,9 | 1,815 | 0,166903 | 813,70 |
| Chyba | | | 14102,2 | 106,8 | | | 15606,67 |
| Celkem | | | 14490,0 | | | | 16420,37 |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (ředitla x čas) | | | | | | |
|-----------|---|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|
| | Sigma-omezená parametrizace | | | | | | |
| | Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | 1,5 hod. PČ | 1,5 hod. F | 1,5 hod. P | 2 hod. SČ | 2 hod. PČ | 2 hod. F | 2 hod. p |
| Abs. Člen | 85629,63 | 724,2489 | 0,000000 | 38169,63 | 38169,63 | 351,4884 | 0,000000 |
| Ředitlo | 406,85 | 3,4411 | 0,034930 | 795,93 | 397,96 | 3,6647 | 0,028253 |
| Chyba | 118,23 | | | 14334,44 | 108,59 | | |
| Celkem | | | | 15130,37 | | | |

Tabulka č. 8: T- metoda v čase 1,5 hod

| Č. buňky | Tukeyův HSD test; proměnná 1,5 hod. (hodnoceni-pokus) | | | |
|----------|--|--------|--------|--|
| | Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy | | | |
| | Chyba: meziskup. PČ = 118,23, sv = 132,00 | | | |
| ředitlo | 1 | 2 | 3 | |
| | 22,778 | 28,556 | 24,222 | |

| Č. buňky | Tukeyův HSD test; proměnná 1,5 hod. (hodnoceni-pokus) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 118,23, sv = 132,00 | | | |
|----------|--|----------|----------|----------|
| | ředitlo | 1 | 2 | 3 |
| | | 22,778 | 28,556 | 24,222 |
| 1 | A | | 0,031460 | 0,803547 |
| 2 | O | 0,031460 | | 0,141438 |
| 3 | B | 0,803547 | 0,141438 | |

Tabulka č. 9: T - metoda v čase 2 hod

| Č. buňky | Tukeyův HSD test; proměnná 2 hod. (hodnoceni-pokus) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 108,59, sv = 132,00 | | | |
|----------|---|----------|----------|----------|
| | ředitlo | 1 | 2 | 3 |
| | | 14,111 | 20,000 | 16,333 |
| 1 | A | | 0,020117 | 0,569566 |
| 2 | O | 0,020117 | | 0,217178 |
| 3 | B | 0,569566 | 0,217178 | |

Tabulka č. 10: Výsledky statistiky dle plemene

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (plemeno x čas) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
|-----------|--|-----------|-----------|----------|----------|-------------|-------------|
| | Stupně volnosti | 0 hod. SČ | 0 hod. PČ | 0 hod. F | 0 hod. p | 0,5 hod. SČ | 0,5 hod. PČ |
| Abs. Člen | 1 | 306366,8 | 306366,8 | 3106,686 | 0,000000 | 211680,0 | 211680,0 |
| Plemeno | 1 | 7,5 | 7,5 | 0,076 | 0,783147 | 5,9 | 5,9 |
| Chyba | 133 | 13115,8 | 98,6 | | | 12763,3 | 96,0 |
| Celkem | 134 | 13123,3 | | | | 12769,3 | |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (plemeno x čas) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
|-------|--|-----------|-----------|----------|----------|-------------|-------------|
| | Stupně volnosti | 0 hod. SČ | 0 hod. PČ | 0 hod. F | 0 hod. p | 0,5 hod. SČ | 0,5 hod. PČ |

| | 0,5 hod. F | 0,5 hod. P | 1 hod. SČ | 1 hod. PČ | 1 hod. F | 1 hod. p | 1,5 hod. SČ |
|-----------|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|
| Abs. Člen | 2205,806 | 0,000000 | 137589,0 | 137589,0 | 1264,712 | 0,000000 | 76171,20 |
| Plemeno | 0,062 | 0,804133 | 20,8 | 20,8 | 0,191 | 0,662382 | 0,09 |
| Chyba | | | 14469,2 | 108,8 | | | 16420,28 |
| Celkem | | | 14490,0 | | | | 16420,37 |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (plemeno x čas) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
|-----------|--|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|
| | 1,5 hod. PČ | 1,5 hod. F | 1,5 hod. P | 2 hod. SČ | 2 hod. PČ | 2 hod. F | 2 hod. p |
| Abs. Člen | 76171,20 | 616,9670 | 0,000000 | 34680,00 | 34680,00 | 305,5945 | 0,000000 |
| Plemeno | 0,09 | 0,0007 | 0,978193 | 37,04 | 37,04 | 0,3264 | 0,568772 |
| Chyba | 123,46 | | | 15093,33 | 113,48 | | |
| Celkem | | | | 15130,37 | | | |

Tabulka č. 11: Výsledky statistiky dle býka

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (býk x čas) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
|------------|--|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Stupně volnosti | 0 hod. SČ | 0 hod. PČ | 0 hod. F | 0 hod. p | 0,5 hod. SČ | 0,5 hod. PČ |
| Abs. Člen | 1 | 296773,7 | 296773,7 | 3531,457 | 0,000000 | 206540,1 | 206540,1 |
| Jméno býka | 11 | 2786,8 | 253,3 | 3,015 | 0,001369 | 3112,3 | 282,9 |
| Chyba | 123 | 10336,6 | 84,0 | | | 9656,9 | 78,5 |
| Celkem | 134 | 13123,3 | | | | 12769,3 | |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (býk x čas) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
|------------|--|-----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|
| | 0,5 hod. F | 0,5 hod. P | 1 hod. SČ | 1 hod. PČ | 1 hod. F | 1 hod. p | 1,5 hod. SČ |
| Abs. Člen | 2630,690 | 0,000000 | 134156,7 | 134156,7 | 1599,190 | 0,000000 | 70942,56 |
| Jméno býka | 3,604 | 0,000199 | 4171,5 | 379,2 | 4,520 | 0,000010 | 3920,37 |
| Chyba | | | 10318,5 | 83,9 | | | 12500,00 |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (býk x čas) | | | | | | |
|--------|---|----------|---------|--------|--------|--------|----------|
| | Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | 0,5 hod. | 0,5 hod. | 1 hod. | 1 hod. | 1 hod. | 1 hod. | 1,5 hod. |
| | F | P | SČ | PČ | F | p | SČ |
| Celkem | | | 14490,0 | | | | 16420,37 |

| Efekt | Jednorozm. výsledky pro každou záv. proměnnou (býk x čas) | | | | | | |
|------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy | | | | | | |
| | 1,5 hod. | 1,5 hod. | 1,5 hod. | 2 hod. | 2 hod. | 2 hod. | 2 hod. |
| | PČ | F | p | SČ | PČ | F | p |
| Abs. Člen | 70942,56 | 698,0748 | 0,000000 | 29699,17 | 29699,17 | 329,7040 | 0,000000 |
| Jméno býka | 356,40 | 3,5069 | 0,000273 | 4050,74 | 368,25 | 4,0881 | 0,000041 |
| Chyba | 101,63 | | | 11079,63 | 90,08 | | |
| Celkem | | | | 15130,37 | | | |

Tabulka č. 12: Scheffeho test podrobnějšího vyhodnocení pro nevyvážený model

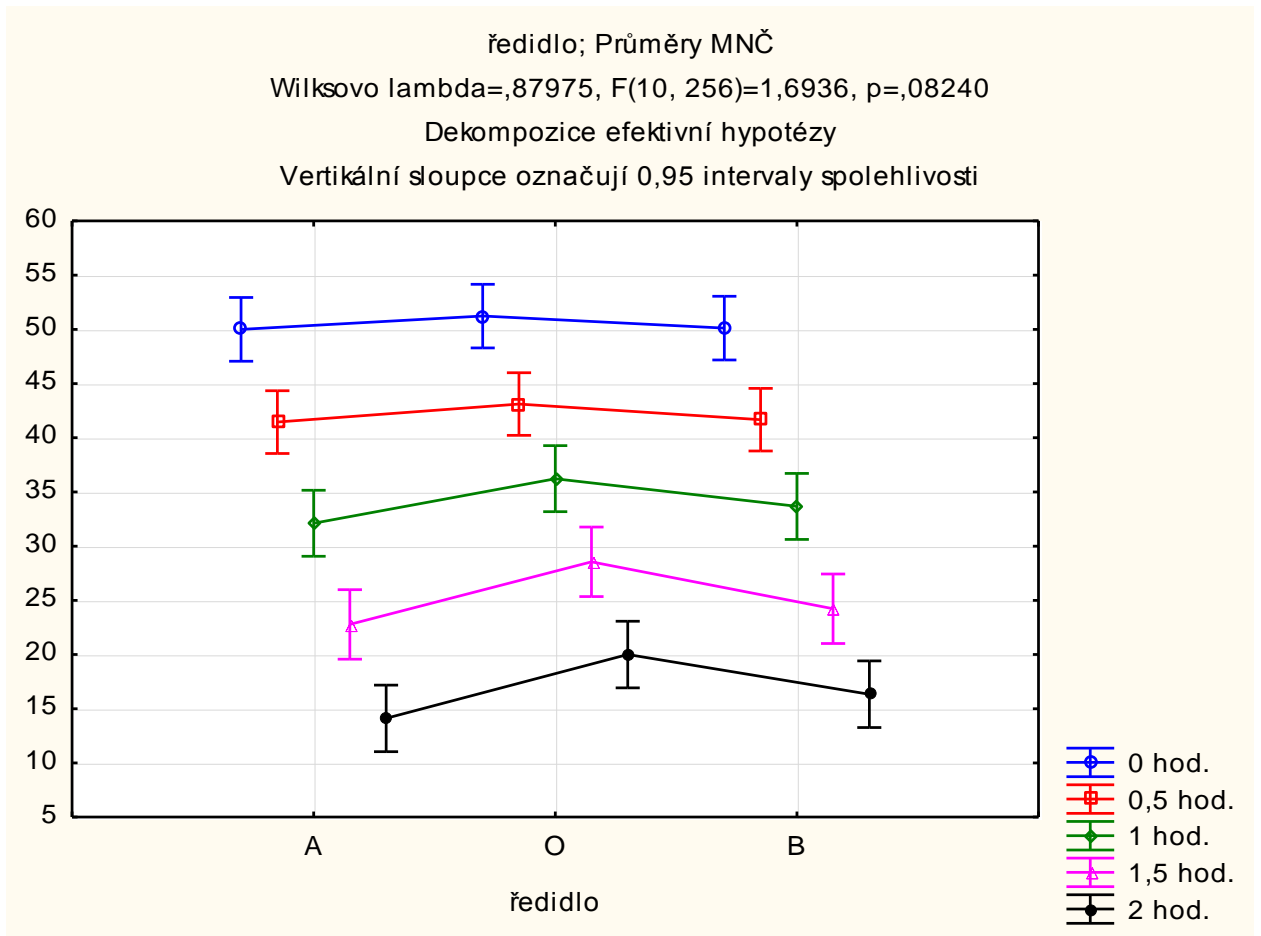
| býk vs. býk čas | Scheffeho test proměnná 0 - 2 hod. | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|--------|
| | 0 hod | 0,5 hod | 1 hod | 1,5 hod | 2 hod |
| Milano/Mozart | | 0,02618 | 0,0019 | 0,01885 | 0,0161 |
| Patriot/Mozart | | | 0,03911 | | |
| Girold/Mozart | | | 0,0096 | | |

Tabulka č. 13: Korelační koeficienty r mezi ukazateli býka, ředidla a aktivity spermií v průběhu krátkodobého tepelného testu

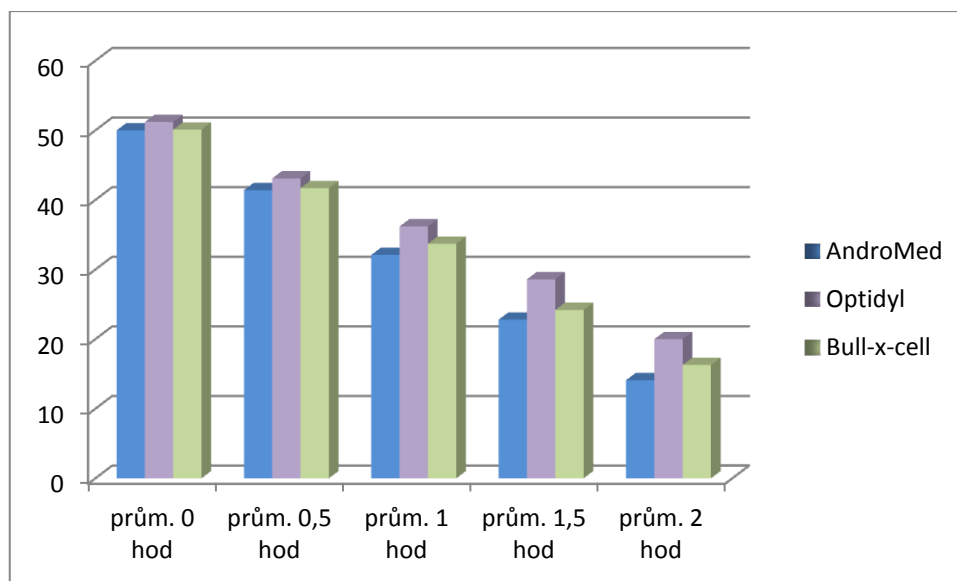
| | Ředidlo | akt0 | akt0,5 | akt1 | akt1,5 | akt2 |
|---------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Býk | 0 | ** -0,2654 | * -0,2061 | * -0,207 | * -0,2069 | ** -0,2605 |
| Ředidlo | 1 | 0,0506 | 0,0699 | 0,162 | * 0,2139 | ** 0,2271 |
| akt0 | | 1 | ** 0,9193 | ** 0,8746 | ** 0,8082 | ** 0,7215 |
| akt0,5 | | | 1 | ** 0,9267 | ** 0,8389 | ** 0,7422 |
| akt1 | | | | 1 | ** 0,9141 | ** 0,8219 |
| akt1,5 | | | | | 1 | ** 0,9091 |

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

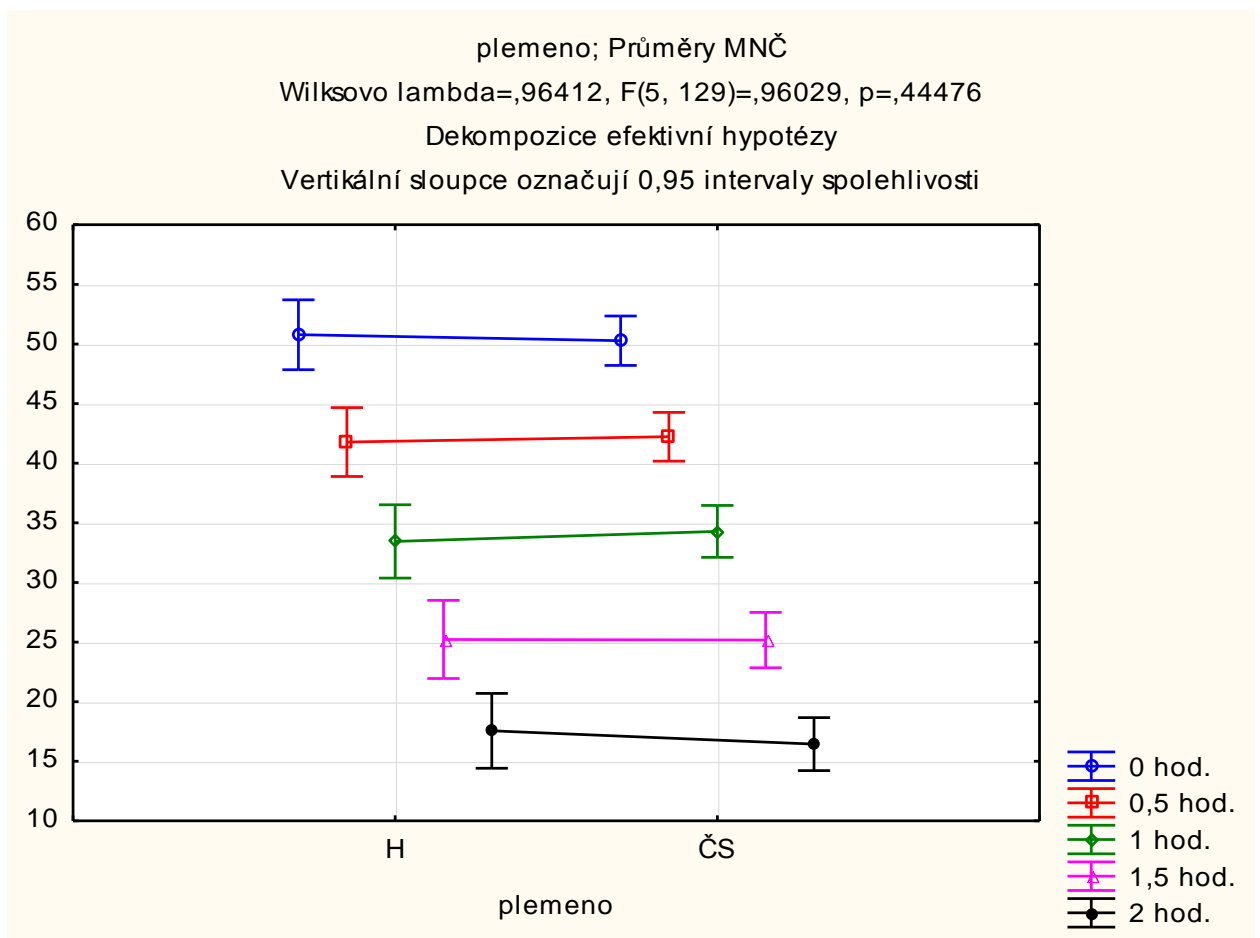
Graf č. 1: Aktivita spermií – ředidla ejakulátu



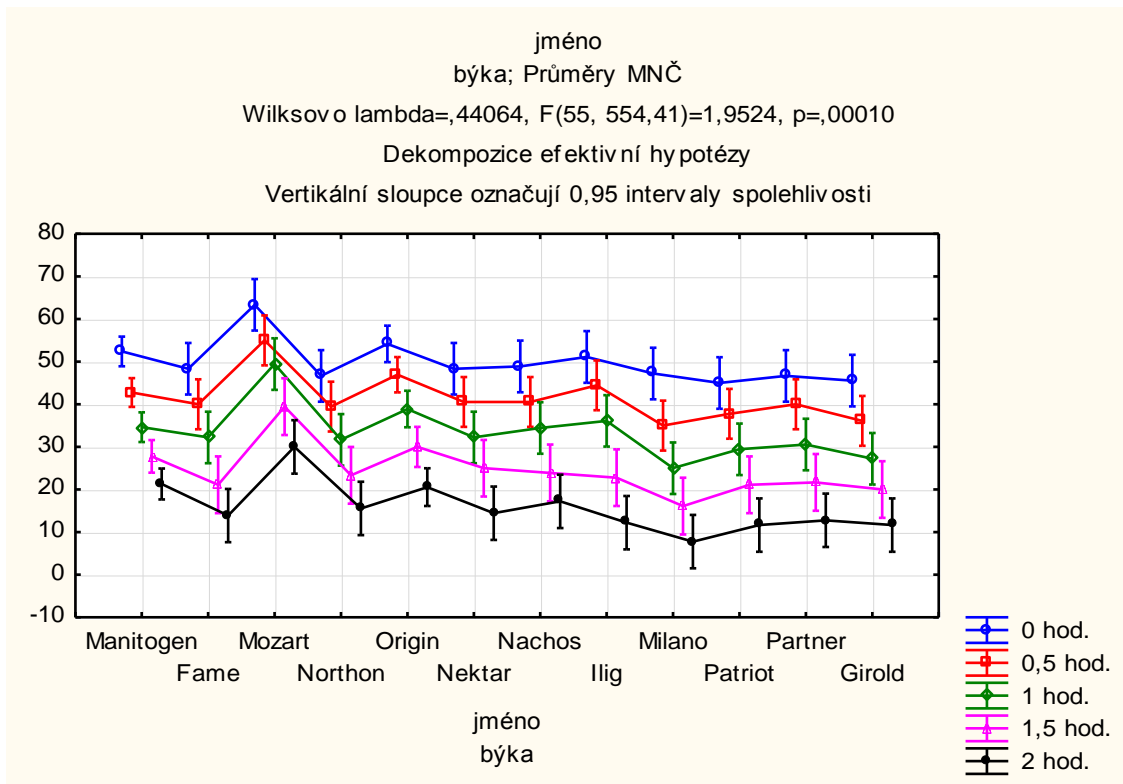
Graf č. 2: Aktivita spermií [%] v jednotlivých časových intervalech



Graf č. 3: Aktivita spermií – plemena býků



Graf č. 4: Aktivita spermií - býci



Obrázek č. 1: Udržování vzorků v průběhu krátkodobého tepelného testu



Foto Bc. Petra Neužilová, 3.10.2013

Obrázek č. 2: Spermie pod mikroskopem

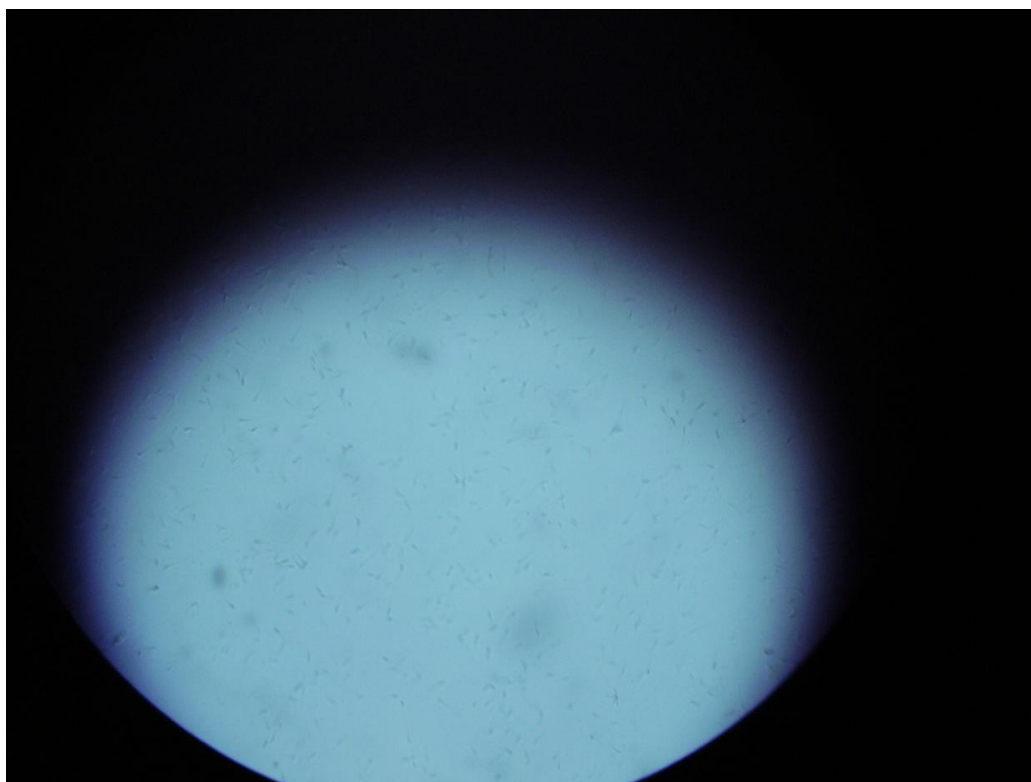


Foto Bc. Petra Neužilová, 3.10.2013