

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz

Bakalářská práce

**Michal Jadrný
Živočišná produkce**

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

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3.5.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu své práce panu Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D., za odbornou pomoc, trpělivost a vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval své rodině za podporu a ohleduplnost při psaní této rešerše.

Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz

Souhrn

Umělá inseminace v chovu ovcí a koz je stejně jako u ostatních hospodářských zvířat žádanou a rozvojovou metodou reprodukce, i když se v dnešní době na našem území příliš nevyužívá. Je tomu zřejmě kvůli nedostatečné poptávce po inseminačních dávkách, která je spojena s poklesem počtu chovaných zvířat u nás.

K inseminaci lze využít několik metod, které se liší v místě uložení inseminační dávky do reprodukčního ústrojí samice. Nejvíce využívanou metodou je intrauterinní laparoskopická inseminace, při které je sperma vpraveno přímo do děložních rohů samice. Tento postup je nejčastěji popisovanou metodou umělé inseminace samic malých přežvýkavců v zahraničních zdrojích. Jedná se o neinvazivní metodu, při které je dosahováno nejlepších výsledků zabřezávání, a to hlavně u ovcí, u kterých je kvůli jejich členitému děložnímu krčku takřka nemožné provést úspěšnou inseminaci jiným způsobem.

Před samotnou inseminací se v chovech ovcí a koz provádí synchronizace říje. Tu lze vyvolat buď přirozenými, nebo umělými způsoby. Mezi přirozené způsoby, využívané především v ekologických chovech, patří „samčí efekt“ nebo „řízení světelného dne“. K umělé synchronizaci říje patří využití gestagenů, prostaglandinů nebo melatoninu.

Aby mohlo dojít k inseminaci samic, je za potřebí inseminačních dávek, které se získávají odběrem ejakulátu od prověřených a geneticky ceněných plemeníků. Odběr se provádí nejčastěji za pomoci umělé vagíny. Lze ale také využít elektroejakulaci, nebo metodu odběru spermatu nazývanou TUMASG. Po odběru dochází k vyšetření a hodnocení spermatu. Hodnotí se objem, koncentrace, motilita, ale i další důležité vlastnosti ejakulátu. K hodnocení se využívá řada metod. V této práci jsou zmíněny metody CASA, FAST, Průtoková cytometrie, Spektrofotometrie a Hemocytometrie. Před chlazením a mražením se ke spermatu přidávají vhodná ředidla s obsahem kryoprotektiv. Ty mají za následek úpravu koncentrace spermií a jejich ochranu před chladovým šokem, kterému jsou spermie vystaveny během zmrazení. Dalším krokem je plnění do pejet/pelet.

Inseminaci lze provést čerstvým, chlazeným nebo mraženým spermatem. Pro dlouhodobou konzervaci inseminačních dávek se dnes využívá hlavně výhod tekutého dusíku. Do budoucna je však tendence ke konzervaci a uskladnění dávek při běžné teplotě a bez využití tekutého dusíku.

Klíčová slova: ovce, kozy, inseminace, hodnocení semene, inseminační dávka

Current knowledge about sheep and goat artificial insemination

Summary

As with other livestock, artificial insemination in sheep and goat farming is a desirable and developing method of reproduction, although it is not widely used in our territory these days. This is probably due to the lack of demand for insemination doses, which is associated with a decrease in the number of animals kept in our country.

Several methods can be used for insemination, which differ in the location of the insemination dose in the female reproductive system. The most commonly used method is intrauterine laparoscopic insemination, in which sperm is introduced directly into the uterine horns of females. This procedure is one described method of artificial insemination of female small ruminants in foreign sources. This is a non-invasive method which achieves the best conception of conception, especially in sheep in which their cervical member is affected so as to perform a successful insemination in another way.

Prior to insemination itself, oestrus is synchronized in sheep and goat farms. This can be induced in either natural or artificial ways. Natural methods, used mainly in organic farming, include the "male effect" or "light day control". Artificial synchronization of oestrus includes the use of progestogens, prostaglandins or melatonin.

In order for insemination of females, insemination doses are needed, which are obtained by taking ejaculate from proven and genetically valued stallions. Collection is most often performed with the help of an artificial vagina. However, it is also possible to use electroejaculation or a method of sperm collection called TUMASG. After collection, the semen is examined and evaluated. Volume, concentration, motility, as well as other important properties of ejaculate are evaluated. A number of methods are used for evaluation. CASA, FAST, Flow Cytometry, Spectrophotometry and Hemocytometry are mentioned in this work. Prior to refrigeration and freezing, suitable cryoprotective diluents are added to the semen. These result in an adjustment of the sperm concentration and their protection against the cold shock to which the sperm will be exposed during freezing. The next step is filling into pellets / pellets.

Insemination can be performed with fresh, chilled or frozen semen. Today, the advantages of liquid nitrogen are mainly used for the long-term preservation of insemination doses. In the future, however, there is a tendency to preserve and store batches at normal temperatures and without the use of liquid nitrogen.

Keywords: sheeps, goats, insemination, seed rating, insemination dose

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Inseminace ovcí a koz	10
3.1.1	Význam inseminace	10
3.1.2	Příprava ovcí a koz k inseminaci	11
3.1.2.1	Vyvolání plodné říje	11
3.1.2.2	Synchronizace říje	12
3.1.2.3	Dilatace ovčího děložního čípku	16
3.1.3	Metody inseminace	16
3.1.3.1	Intravaginální inseminace	16
3.1.3.2	Intracervikální inseminace	16
3.1.3.3	Transcervikální nitroděložní inseminace	17
3.1.3.4	Intrauterinní laparoskopická inseminace	17
3.2	Sexuální aktivita beranů a kozlů	18
3.3	Příprava inseminačních dávek	19
3.3.1	Odběr semene	19
3.3.2	Vyšetření a hodnocení spermatu	21
3.3.2.1	Makroskopické vyšetření	21
3.3.2.2	Mikroskopické vyšetření	21
3.3.3	Metody vyšetření spermatu	22
3.3.3.1	CASA (Computer Aided Sperm Analysis)	22
3.3.3.2	FAST (Flagellar and Sperm Tracking)	22
3.3.3.3	Průtoková cytometrie (Flow cytometry)	23
3.3.3.4	Spektrofotometrie	23
3.3.3.5	Hemocytometrie	24
3.3.4	Sexování spermií	24
3.3.5	Zpracování semene	25
3.3.5.1	Ředění	25
3.3.5.2	Plnění do pejet/pelet	26
3.3.6	Konzervace semene	26
3.3.6.1	Chlazení	27
3.3.6.2	Mrazení	28

3.3.6.3	Budoucnost konzervace spermatu.....	29
3.3.7	Rozmrazení dávek před inseminací	30
4	Závěr.....	31
5	Seznam literatury	32

1 Úvod

V chovu ovcí a koz se umělá inseminace využívá již řadu let. V zahraničí je však technika umělé inseminace používána častěji. Je tomu tak hlavně v zemích s bohatou tradicí chovu ovcí a koz, kterou je například Francie, pro kterou je typická produkce kozích a ovčích produktů. Produkce výrobků, spojená s chovem ovcí a koz, je závislá na sezónní reprodukci malých přežvýkavců. Poptávka po těchto produktech je však po celý rok. Proto je vyvíjen tlak na reprodukci zvířat i mimo přirozené připouštěcí období, se kterou je spojeno využití umělé inseminace a synchronizace říje.

Inseminace má řadu výhod. Mezi ty hlavní patří maximální využití potenciálu vysoko ceněných plemenů a zamezení přenosu pohlavních chorob mezi zvířaty. Pro drobnochovatele může být použití umělé inseminace ulehčením práce v období připouštění. Při chovu jednoho nebo dvou kusů zvířat se nevyplatí chovat kozla nebo berana pro účel připouštění. Říjíce se samice se v tuto dobu musí komplikovaně přepravovat k samci, kde dochází k tzv. připouštění z ruky, což je přirozená metoda reprodukce. Při tomto způsobu se dosahuje nejlepších výsledků zabřeznutí. Chovatelé plemenů však často neumožňují připouštění cizích zvířat, nebo vyžadují testy, které dokládají absenci pohlavních nákaz. Chovatel také musí často vážit dlouhou cestu ke vhodnému samci. Řešením může být právě umělá inseminace, kdy si chovatel objedná požadované inseminační dávky a buďto sám nebo za pomoci inseminačního technika, inseminuje svá zvířata, a tím se vyhne komplikacím s přepravou samic k samci. Inseminace také otevírá možnost zahraničního obchodu s genetickým materiálem beranů a kozlů.

Umělá inseminace je široce využívaná v chovu skotu. U malých přežvýkavců však zatím není zcela naplněn potenciál inseminace. Největší prostor pro zdokonalení je zřejmě v konzervaci semene. U mrazených inseminačních dávek se zatím nedosahuje takové míry zabřezávání, jako u čerstvého nebo chlazeného spermatu. Žádané je také dlouhodobé skladování při přijatelných teplotách.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo shrnout a ucelit co nejvíce dosavadních informací týkajících se metodiky a využití umělé inseminace v chovu ovcí a koz. Snahou bylo získat převahu informací ze zahraničních zdrojů, jelikož obsahují pokročilejší a novější informace.

3 Literární rešerše

3.1 Inseminace ovcí a koz

Umělá inseminace je vysoce účinná technologie v chovu malých přežvýkavců. Hlavně pak v intenzivních chovech. Zrychluje genetický pokrok v populaci, zvyšuje genetický potenciál samců a tím usnadňuje mezinárodní obchod beranů a kozlů a přispívá k zachování genetických zdrojů. Umožňuje lepší kontrolu reprodukce a přispívá ke zdraví zvířat kontrolou infekčních chorob, které jsou přenosné pomocí přirozené plemenitby (Casali et al. 2017).

Inseminace je možná jak u ovcí, tak koz. V dnešní době však není příliš praktikována. Obecně se inseminace ovcí a koz provádí spíše v zahraničí, kde je dosaženo lepších poznatků v této disciplíně. Čunát et al. (2013) uvádí, že je u nás hlavním problémem absence použití inseminace zapříčiněna snížením počtu chovaných ovcí a koz. Příčinou je také nedostatečná synchronizace říje a také obtížná detekce doby ovulace u velkých stád (Fonseca et al. 2017). Podle Jiménez-Rabadán et al. (2016) se umělá inseminace u malých přežvýkavců nejčastěji provádí čerstvým spermatem, jelikož zmrazené sperma obvykle dosahuje nižší míry oplození schopnosti. Kryokonzervace spermií (metoda zmražení a uchování spermií) je však důležitá pro zlepšení plemenné hodnoty a pro maximální využití potenciálu plemeníka.

3.1.1 Význam inseminace

Umělá inseminace v chovu malých přežvýkavců byla velkým pokrokem v řízení reprodukce. Nyní je hlavním nástrojem, pomocí kterého můžeme řídit programy genetického výběru ovcí a koz. Hlavní předností inseminace je plnohodnotné využití genetického potenciálu žádaných plemeníků. Inseminace umožňuje kontrolu reprodukce, rychlejší testování potomků a tím rychlejší genetický pokrok (Colenbrander et al. 2003). Další výhodou je reprodukce mimo přirozené připouštěcí období s následným zvýšením ekonomiky chovu. Díky využití umělé inseminace dochází k mnohonásobnému nárůstu potomků po vynikajícím plemeníkovi, s žádaným genetickým materiálem. Další výhodou je produkce inseminačních dávek do mnoha chovů po celém světě, čímž dochází k rozšíření genetického materiálu bez rizika šíření pohlavních i dalších nákaz, ke kterým dochází při přirozené plemenitbě netestovaných jedinců. Příkladem šlechtitelského využití inseminace je chov ovcí v Austrálii, kde bylo při přirozené plemenitbě získáno 22 jehňat po jednom beranovi za rok. Při použití inseminace čerstvým spermatem se narodilo 500 jehňat po jednom beranovi za rok. Při použití mraženého spermatu, které bylo odebíráno po celý rok, při 9 odběrech týdně, získal chovatel od jednoho berana 12 000 narozených jehňat (Kulovaná 2012). To je tedy hlavní výhodou inseminace prováděné u malých přežvýkavců, kdy jsme schopni od jednoho plemeníka získat několikanásobně větší počet životaschopných potomků, což přirozená plemenitba neumožňuje. Jedním z nejdůležitějších předností umělé inseminace, je pomoc při zachování genetické rozmanitosti původních plemen malých přežvýkavců. U těch došlo v posledních letech ke značnému poklesu, z důvodu chovu komerčních vysoce produktivních plemen, vzniklých za pomoci šlechtitelských technik (Lv et al. 2019).

Díky vyššímu počtu oplodnění schopných samic narůstá i nárok na plodnost samců. To vede k rozvoji reprodukčních programů hlavně v oblasti umělé inseminace, i když se zatím zdaleka nedosáhlo potenciálu tohoto odvětví. Například ve Francii dochází k využití umělé inseminace zhruba u 10 % koz, chovaných na produkci mléka. Ve Španělsku se jedná pouze o 1 % celkové populace. To má za následek pomalou reakci na práci šlechtitelských programů (Iannuzzi et al. 2021).

3.1.2 Příprava ovcí a koz k inseminaci

3.1.2.1 Vyvolání plodné říje

Před samotnou inseminací musí dojít u ovcí a koz k nástupu říje. Koza, stejně jako ovce, je zvíře sezónně polyestrické. To znamená, že k říji dochází v cyklech, které se opakují v intervalu po 13-21 dnech, v průměru však po 17 dnech u ovcí (Schoenian 2019) a po 21 dnech u koz. Samotná říje trvá zhruba 24-36 hodin a je ovlivněna individualitou samice. V období sezónní reprodukce dochází k samovolnému nástupu říje díky zkracování světelného dne. Pohlavní aktivita ovcí a koz je také závislá na ročním období, délce produkčního období nebo na pořadí vrhu (ZOOTECNIKA.CZ 2009). V tomto období tedy většinou nedochází k aplikaci léčiv na vyvolání říje. Jinak je tomu mimo připouštěcí období. Doba vhodná k inseminaci po přirozeném nástupu říje se doporučuje 12-18 hodin od začátku říje (Kulovaná 2002).

Říje u ovcí a koz probíhá zhruba od srpna do prosince. Rozdíly v době nástupu říje závisí zejména na zeměpisné šířce, ale také na plemenné příslušnosti a individualitě zvířat. U koz a ovcí chovaných ve středomoří dochází k obnově pohlavního cyklu v rozmezí srpna až září, zatímco u zvířat chovaných v nejsevernější části Evropy dochází k nástupu mezi říjnem a listopadem (Gómez-Brunet et al. 2012). V rovníkových oblastech naší planety může díky geografickým podmínkám prostředí docházet u koz a ovcí k různě výrazným projevům říje po celý rok (Beránková 2007). Znamená to tedy, že čím blíže rovníku se stádo vyskytuje, tím bude reprodukční období delší, a naopak bude kratší období anestrus. K plemenům, u kterých se vyskytuje delší období říje patří Dorset, Merino nebo Karakulská ovce (Schoenian 2019). Celoroční projevy říje se mohou vyskytovat také u ovcí plemen východofříská, romanovská a finská (Kulovaná 2002). K nejdelšímu reprodukčnímu období, u nás chovaných ovcí, dochází u plemene bergschaf, které dosahuje délky plodného období 250 dní, následuje merinolandschaf a merino s 200 dny dlouhým estrálně aktivním obdobím a texel se 130 dny. Asi 10 % ovcí prodělává celoroční pohlavní aktivitu a to tehdy, pokud jsou samice chovány společně se samci (Kulovaná 2002).

V naší zeměpisné šířce dochází k nástupu říje v druhé polovině srpna a k opakování říjových cyklů může docházet až do přelomu listopadu a prosince. V některých případech může dojít k nástupu říjových cyklů také v jarním období, avšak projevy říje nejsou tak silné, jako je tomu u zvířat říjících se na podzim (Kulovaná 2002). Samice evropských plemen ovcí a koz prodělávají mimo reprodukční období sezónní anestrus, který končí v přelomu srpna a září, kdy dochází k opětovnému nástupu říje. Sezónní anestrus má za následek přímý dopad na

ekonomiku produkce a udržitelnost výrobního procesu, jelikož se v průběhu roku značně mění cena masa a mléka, podle dostupnosti těchto komponentů (Chemineau et al. 2007).

Před samotnou říjí může dojít k uplatnění tzv. „flushingu“. Flushing se využívá hlavně u ovcí a koz se špatnou tělesnou kondicí. Asi měsíc před plánovaným připouštěním samic dochází ke zvýšení energie a bílkovin, aby došlo ke zlepšení výživné kondice. Ideální kondice pro zpuštění samic je na úrovni 3-3,5 BCS (body condition score). Výhodou krmného šoku je zvýšení plodnosti ovcí a koz. Flushing by měl být aplikován nejdéle měsíc po připuštění, kvůli snížení ranné embryonální mortality (Kuchtík 2015).

3.1.2.2 Synchronizace říje

Sezónní reprodukce v chovu ovcí a koz je hlavním omezujícím činitelem, který brání v rozvoji tohoto odvětví (Pellicer-Rubio 2019). V důsledku tohoto fyziologického omezení dochází ve většině zemí k narušení výrobních procesů spojených s produkcí mléka a k následnému nedostatečnému zásobování trhu kozími a ovčími produkty (Balaro et al. 2019; Netto et al. 2020). U reprodukce malých přežvýkavců je tlak na docílení připouštění plemenic i mimo připouštěcí období, tedy v době anestrů, aby byla zajištěna dostatečná produkce masa a mléka mimo přirozené připouštěcí období. To by mělo za následek udržení ekonomiky chovu a výrobních procesů během celého roku. Synchronizace říje má však vliv nejen na zlepšení ekonomiky chovu, ale také na dosažení lepších výsledků reprodukce chovu a šlechtitelského pokroku. Velkou výhodou je pak také snadnější práce v rámci krmení a péče o samice. Pokud se samice ve stádě nacházejí ve stejné nebo podobné reprodukční fázi, poté můžeme zvířata krmit stejnou krmnou dávkou, stejného složení, bez větších rozdílů. To má za následek zvýšení efektivnosti a rychlosti práce (Pellicer-Rubio et al. 2019).

Pro tento účel dochází k synchronizaci říje, kterou lze rozdělit na synchronizaci přirozeným nebo naopak umělým způsobem. Mezi přirozené způsoby ovlivnění nástupu říje patří řízení fotoperiody a náhlé zařazení samce do stáda (ram/buck effect). U umělého způsobu synchronizace říje, se v dnešní době využívá řada přípravků na bázi gestagenů, prostaglandinů nebo melatoninu (Filipčík & Pešan 2019).

3.1.2.2.1 Řízení světelného dne

V současné době dochází ke kontrole sezónní reprodukce pomocí fotoperiodicity u všech hospodářských zvířat obou pohlaví. Využívá se k tomu střídání inhibičních a stimulačních fotoperiod. Pokud při tomto ošetření nedochází k aplikaci melatoninu, ale jedná se pouze o využívání přirozeného světla, jedná se o neinvazivní metodu, která má do budoucna široké uplatnění, vzhledem k současnému tlaku na zlepšení ekologické udržitelnosti chovů (Chemineau et al. 2007). V chovech koz, kde je cílem připouštění v jarním období (duben-květen), se uplatňuje aplikace tzv. „dlouhého dne“ během zimního období, použitím umělého světla. Následně na samice během začátku března působí přirozená fotoperioda, tedy působení krátkých dnů. Následně dochází k nástupu říje asi 60 dní po ukončení inhibičního období. Pro nástup říje v letních měsících se na konci zimy nechávají zvířata vystavit krátkému působení dlouhých dnů, nebo je využito přirozeného dlouhého dne na začátku jara. Stimulační

fáze je pak vyvolána zavedením melatoninu prostřednictvím podkožních implantátů. K říjí dochází 60 dní po aplikaci melatoninu. Tímto způsobem lze reprodukci ovlivnit také v chovu ovcí, nicméně k tomu dochází jen málo (Pellicer-Rubio et al. 2019). Při aplikaci dlouhých dnů, musí na zvířata působit světlo alespoň 16 hodin. Zatímco při krátkém dnu je délka působení světla asi 8 až 12 hodin (Pellicer-Rubio et al. 2019). U samic malých přežvýkavců se dostavuje pohlavní aktivita po zkrácení světelného dne, ke kterému dochází asi 4 až 6 týdnů po nejdelším dnu v roce.

Na kozích farmách, se využívá střídání dlouhého a krátkého dne (LD-SD, long day-short day) společně s využitím samčího efektu, kdy je do stáda přidělen samec, kvůli vyvolání ovulace a říjového chování. Při takovýchto podmínkách lze udržet mimosezónnost připouštění dlouhou dobu na vysoké úrovni (Chemineau et al. 1996). V subtropických oblastech, kde není sezónnost tak výrazná jako v mírných oblastech, nemusí dojít k ošetření samic za předpokladu, že došlo k ošetření samců pomocí uplatnění LD (long day). Dochází i tak k vysoké ovulaci koz a k zabřezávání po přirozené plemenitbě (Delgadillo et al. 2002; Delgadillo et al. 2004). U bahnic dochází k produkci jehňat mimo přirozené připouštěcí období hlavně za pomoci hormonálního ošetření (FGA, eCG).

3.1.2.2.2 Samčí efekt

U samic ovcí a koz lze docílit přerušení období anestrů zařazením sexuálně aktivního samce do stáda. Ve stádě dojde k synchronizaci říje a většina samic začne ovulovat díky působení samčích feromonů. Tento způsob vyvolání říje byl nejprve popsán u ovcí a až poté u koz. U ovcí byl pojmenován jako tzv. beraní efekt (ram effect), u koz pak jako „buck effect“ (Shelton 1960). Po připojení samce ke stádu samic, které prodělávají přirozené období anestrů, dochází velmi brzy k aktivaci ovariálních, folikulárních a luteálních hormonálních drah (Meza-Herrera et al. 2017). K zařazení samce do stáda dochází většinou 3 týdny před začátkem připouštěcího období (Kulovaná 2002). Po zapojení samce ke stádu, dochází k prvním projevům říje za 20-24 hodin (Štolc et al. 2007). K synchronizaci a nástupu říje dochází pouze u samic, které neprodělávají říjový cyklus. Na plemenice, u kterých již nastal říjový cyklus, tento efekt nepůsobí. Cílem zařazení berana do stáda není připuštění samic, avšak pouze stimulace samic. K tomuto účelu se využívají samci, tzv. prubíři nebo vasektomovaní samci. Jsou to samci, kteří působí stimulačně na samice a zároveň vyhledávají jejich říji (SCHOK 2021).

Tento způsob je však náročný na organizaci práce, jelikož na velkých farmách, s velkým počtem chovaných ovcí a koz, je pro tento účel zapotřebí hodně samců. Z toho důvodu dochází k použití samčích feromonů, které mají pozitivní odezvu chovatelů, jelikož jsou feromony, oproti hormonální léčbě, vnímány jako přírodní látky. Problémem by mohl být zákaz použití feromonů v ekologických chovech, avšak feromony nejsou považovány za hormony, tudíž jejich použití není v rozporu se zákonem (Lurette et al. 2016). Jedním z cílů samčího efektu je omezení použití hormonů v reprodukci mimo sezónní období, a to hlavně při použití umělé inseminace (Pellicer-Rubio et al. 2019). Tento způsob je v chovu malých přežvýkavců metodou vyvolání říje bez použití synteticky vyrobených hormonů, což je nedílnou součástí ekologických

chovů, které nesmějí používat syntetické přípravky pro vyvolání nebo synchronizaci říje (Lurette et al. 2016).

Z praktického, ale i ekonomického hlediska, má použití samčího efektu v chovu ovcí řadu výhod. Nejdůležitějšími je možnost dřívějšího nástupu puberty u mladých jehniček (ZOOTEKNIKA.CZ. 2009), dále dřívější vyvolání říjových cyklů u samic po porodu a v neposlední řadě vyvolání říje i v období anestrů, jakožto i synchronizace říje v tomto období (Tenório Filho et al. 2016). Uplatnění tohoto efektu v chovu ovcí může způsobit nárůst a pravidelnost produkce po celý rok (Ferreira-Silva et al. 2016). Samčího efektu může být také využito společně s použitím léčiv aplikovaných samicím, k dosažení kratšího sezónního anestrů a k omezení výskytu krátkých říjí u ovcí po porodu (Monreal et al. 2009). Podle Ferreira-Silva et al. (2017) ošetření progesteronem a inzulinem u bahnic vystavených beranímu efektu, mělo za následek zvýšení výrobních nákladů, bez zlepšení reprodukční výkonnosti.

Podmínkou samčího efektu je oddělení samce před plánovanou synchronizací alespoň na 6 týdnů. Samice nesmí samce vidět, slyšet ani cítit jeho pach, aby po zařazení samce do stáda, samice co nejlépe reagovali na jeho přítomnost (Schoenian 2019). U stád ovcí, které se nacházejí v hlubokém anestrů, může být reakce na samce pouhých 50 % (Louda & Hegedušová 2009). Samčí efekt může být při synchronizaci říje kombinován také například s flushingem (Kulovaná 2002).

3.1.2.2.3 Metody umělé synchronizace říje

V posledních letech došlo k vyvinutí metody umělé inseminace v pevném čase (FTAI). Při této metodě, není nutné složité vyhledávání říjících se samic, jelikož je použito léčebných metod k umělému a synchronnímu vyvolání říje. Podle Cueto et al. (2009) je dnes v chovu ovcí s FTAI nejčastěji využíváno dvou metod k synchronizaci říje. Jedná se o použití intravaginálních tampónů s progestiny v kombinaci s koňským choriovým gonadotropinem (eCG) a použití různých režimů léčby pomocí prostaglandinů. Běžnou metodou pro vyvolání říje je použití léčiv na bázi progesteronu, což je látka produkovaná žlutým tělískem. Dochází k nasimulování březosti a po odbourání veškerého progesteronu z těla, dochází velmi brzy k ovulaci. Progesteron byl dříve používán na krátkou nebo dlouhou dobu k indukci estru u malých přežvýkavců během období rozmnožování (Abecia et al., 2012). Dlouhodobá léčba progesteronem (14-20 dnů) však byla spojena se sníženou plodností u malých přežvýkavců (Zarazaga et al., 2014).

Nejčastěji na trh je uváděna léčba popsána Corteelem et al. (1988). Ta zahrnuje 11. denní léčbu pomocí intravaginálních tampónů, které obsahují FGA (fluorogeston acetát). Dále luteolytické ošetření cloprostenolem a podání eCG 9. den (48 hodin před odebráním tampónu). Inseminovat ovce po synchronizaci říje pomocí poševních tampónů, se doporučuje 48-60 hodin po vyjmutí těchto tampónů (Kulovaná 2002). Použití prostaglandinů je omezeno pouze na samice, které prodělávají cyklickou říji. Mezi běžně používané produkty patří PGF₂alfa a cloprostenol. Cílem aplikace prostaglandinů je zánik CL (žlutého tělíska). Dochází ke dvojité aplikaci v rozmezí 11. dnů. Po podání prostaglandinů stádu plemenic dochází

k synchronizaci říje u 60 až 70 % stáda a to za 30-48 hodin po podání (Schoenian 2019). Při použití prostaglandinů je dosahováno horších výsledků zabřezávání (Kulovaná 2002).

Použitím gestagenů k synchronizaci říje u ovcí, se dosahuje standardně dobrých výsledků. Gestageny mohou být do těla aplikovány několika způsoby. Aplikace je možná prostřednictvím krmiva (MGA), implantací pod kůži, poševními tampóny nebo pomocí vaginálních tělísek, tzv CIDR.

CIDR je tělísko, vyrobené z lékařských silikonových elastomerů a jeho účinkem je uvolňování léčiva v podobě přírodního progesteronu do těla samice po dobu 12-14 dnů. Při neopatrné aplikaci tělíška, hrozí poranění pohlavních cest samice a s tím spojené riziko infekce. Proto se tento způsob vyvolání říje nedoporučuje praktikovat u mladých jehniček. Výsledky ukazují, že tento produkt dosahuje podobných výsledků jako poševní tampóny. Použití CIDRu se uvádí jako nejlepší metoda synchronizace před umělou inseminací, protože lze snadno předpovědět dobu nástupu ovulace. Prokázané výsledky účinnosti CIDRu jsou 50-60 % u bahnic v období anestrů (Kennedy 2008; Schoenian 2019).

Poševní tampóny obsahují gestageny, které působí při nižších koncentracích než přírodní progesteron. Zavádějí se do pohlavního ústrojí samice na dobu 9 až 19 dnů a používají se společně s PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), který se aplikuje po vyjmutí poševního tampónu nebo 48 hodin před vyjmutím. Říje se u samic dostavuje obvykle po 24-48 hodinách po odstranění tampónu (Schoenian 2019). Čunát et al. (2013) doporučují inseminovat ovce po synchronizaci říje poševními tampóny za 50-60 hodin po jejich vyjmutí.

Podkožní implantáty jsou přípravky určené především pro skot. Jedná se o implantáty, který obsahuje syntetický progestagen a jeho účinku lze využít i v chovu malých přežvýkavců, kdy se doporučuje asi třetinová nebo poloviční dávka přípravku pro skot. Na trhu jsou však i podkožní implantáty určené přímo pro ovce a kozy. Délka působení se pohybuje od 9 do 14 dnů a 2 dny před koncem účinku dochází k aplikaci PMSG nebo PGF₂alfa. Po ukončení působení podkožního implantátu dochází k ovulaci za 26 až 30 hodin (Mekuriaw 2014; Schoenian 2019).

MGA (melengesterol acetát) je látka na bázi syntetického progestagenu, přidávaná do krmné dávky. Účinkem této látky je potlačení estrální aktivity. MGA se používá v krmné dávce dvakrát denně, v množství 0,125 mg, po dobu 12-16 dnů. Při této metodě, se navíc aplikuje PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), jako součást hormonální léčby, 5 až 10 hodin po posledním podání MGA. Říje se dostavuje po 2 až 2,5 dnech. V případě přirozené plemenitby je možné do stáda zapojit samce po 48 hodinách. MGA dosahuje podobných průměrných výsledků jako CIDR (Kennedy 2008).

Dalším způsobem, jak vyvolat říji u ovcí a koz v anestrů, je aplikace melatoninu. Jedná se o tzv hormon temnoty, protože se během noci uvolňuje prostřednictvím epifýzy. Melatonin má za úkol napodobit období zkracujících se dnů (Schoenian 2019). Zvířata jsou schopna vnímat délku dne právě díky melatoninu. Zejména ve středomořských zemích začíná častěji docházet k použití melatoninových implantátů, u kterých byla dokázána také zvýšená plodnost. Při použití melatoninu došlo ke zvýšení o 0,20 jehněte na bahnici za rok, a to s častějším výskyt dvojčat než trojčat (Chemineau et al. 1996).

3.1.2.3 Dilatace ovčího děložního čípku

Při transcervikální inseminaci ovcí je hlavním problémem průchod skrz anatomicky komplikovaný děložní čípek. K tomuto způsobu inseminace se často využívá čerstvé sperma, kvůli lepšímu zabřezávání. Tato metoda inseminace dnes není příliš využívána, kvůli komplikovanému provedení. Při aplikaci inseminační dávky skrz děložní čípek, může dojít k jeho poranění inseminačním katetrem. Řešením by mohlo být zvětšení lumenu děložního hrdla. Pro tento účel je zkoumáno mnoho látek, které by dokázaly děložní hrdlo lépe zprůchodnit. Možné je použití antagonistů α_1 -adrenergických receptorů, které způsobují kontrakci a relaxaci myometria. Těmito blokátory jsou prazosin a tamsulosin. Lokální aplikace prazosinu a tamsulosinu na děložní čípek, způsobuje vzdálenější aplikaci katétre do lumenu děložního hrdla. Použitá dávka blokátorů je 4 mg na zvíře. Následkem toho dochází k vyšší úspěšnosti inseminace se zmrazeným a rozmrazeným spermatem, jelikož je díky těmto látkám aplikován hlouběji do děložního krčku (Padilha-Nakaghi et al. 2020).

3.1.3 Metody inseminace

U malých přežvýkavců, především u ovcí, je hlavním problémem inseminace obtížnost projít děložním hrdlem díky jeho výrazné klikatosti (Sathe 2018). Děložní krček bahnice i kozy je malý, úzký, tuhý a klikatý kanálek, který ztěžuje kanylaci a ukládání spermatu do dělohy (Evans & Maxwell 1987; Kershaw et al. 2005). Z tohoto důvodu se sperma nejčastěji vkládá do vstupu děložního krčku (cervikální inseminace) nebo se vpravuje do děložního lumenu stěnou dělohy laparoskopicky (laparoskopická inseminace) (Casali et al. 2017). Technika inseminace úzce souvisí s výsledky zabřezávání. Čím hlouběji se inseminační dávka vpraví do pohlavního ústrojí samice, tím je dosahováno lepších výsledků zabřeznutí (Eppleston et al. 1994).

3.1.3.1 Intravaginální inseminace

Při této metodě se inseminační dávka vpravuje do horní části poševní klenby. Inseminační pipetu zavádíme mírně zvednutou a dáváme přitom pozor, aby nedošlo k zasunutí pipety do močové trubice nebo perforaci stěny poševní (ZOOTEKNIKA.CZ. 2009; Čunát et al. 2013). Jedná se o nejjednodušší způsob inseminace. Při této metodě není vhodné použití mraženého spermatu a úspěšnost této metody je velmi variabilní (Schoenian 2019). Doporučený objem inseminační dávky pro úspěšnou inseminace je 0,3 – 0,5 ml. Počet pohyblivých spermií pak 300 až 400 × 10⁶ (Macías et al. 2020).

3.1.3.2 Intracervikální inseminace

Inseminační dávka se při této metodě aplikuje do děložního krčku, do hloubky asi 1-2 cm, Čunát et al. (2013) uvádí 1,5 cm. K inseminaci se používá poševní zrcadlo, které se vsunuje 10-13 cm hluboko do pochvy. Čím blíže k děloze je inseminační dávka aplikována, tím je větší šance pro zabřeznutí. Porodnost je při použití čerstvého nebo chlazeného spermatu přijatelná, avšak při použití mraženého spermatu se dosahuje nevyhovujících výsledků (Schoenian 2019). K efektivnějšímu použití cervikální metody inseminace byl vynalezen prostředek

k jednoduššímu vpravování inseminační dávky do těla samice a k vyhnutí se retrográdnímu toku. Tento prostředek je označován jako DARIO a při jeho použití dochází k hlubokému ukládání inseminační dávky do děložního krčku ovcí. Za pomoci DARIO dochází k vyšší plodnosti. Potřebné množství inseminační dávky se pohybuje okolo 0,2 ml. Pohyblivých spermií je pak za potřebí 400×10^6 (Macías et al. 2020).

3.1.3.3 Transcervikální nitroděložní inseminace

Inseminační dávka se při transcervikální nitroděložní inseminaci, bez použití laparoskopie, aplikuje za děložní krček, tedy až na okraj dělohy. Tento způsob vyžaduje použití poševního zrcadla a šikovnost technika, který intrauterinní inseminaci provádí (ZOOTEKNIKA.CZ. 2009). Tento způsob je však možné využít zejména u koz. U ovcí je praktikována především laparoskopická inseminace, kvůli nemožnosti projít děložním krčkem, který je u ovcí přirozeně klikatější, a tedy hůře proniknutelný (Lv et al. 2019). Velkým rizikem je poranění děložního krčku při této metodě, proto se dnes v praxi využívá spíše jiných způsobů umělé inseminace (Carneiro et al. 2019). Při této metodě je zapotřebí inseminačních dávek o objemu 0,1 až 0,5 ml a počet pohyblivých spermií by měl být alespoň 60×10^6 (Macías et al. 2020).

3.1.3.4 Intrauterinní laparoskopická inseminace

Při laparoskopické inseminaci dochází k pokoření anatomických bariér reprodukčního ústrojí a k hlubokému intrauterinnímu uložení inseminační dávky. Úspěšnost laparoskopické inseminace je závislá hlavně na správné synchronizaci říje a na dokonalé znalosti fyziologie reprodukční soustavy samice. Při samotném úkonu může dojít k řadě komplikací, zejména kvůli nedostatečné přípravě samice, špatnému provedení, nebo kvůli nedostatečnému vybavení (Sathe 2018). Laparoskopickou inseminaci je doporučeno provádět pod mírnou sedací. Po dokončení úkonu je žádoucí, aby ošetřená plemence sama odešla a byla schopna okamžitě přijímat potravu. Při zákroku může dojít k ruptuře břišních orgánů, vzniku subkutánního emfyzému, peritonitidy, hematomu, intraabdominální adhezi nebo krvácení dělohy (Sathe 2018).

Při intrauterinní laparoskopické inseminaci dochází k uložení spermatu přes stěnu břišní, přímo do děložních rohů. Tento zákrok je minimálně invazivní a trvá asi jen 2-5 minut. Sathe (2018) odhaduje délku úkonu na 10-15 minut i s přípravou. Míra početí se při této metodě pohybuje od 50 do 80 % (Schoenian 2019). Průměrná inseminační dávka o objemu 0,05-0,10 ml, potřebná k oplození jedné samice laparoskopickou metodou, obsahuje 20-25 milionů aktivních spermií. To je nízký počet ve srovnání s intravaginální a transcervikální inseminací (Cseh et al. 2012, Macías et al. 2020). Z jednoho odebraného a zmrazeného ejakulátu tak může být zapuštěno 50 až 100 plemenic (Sathe 2018). Důležitým faktorem pro úspěšnost této metody je výběr vhodných zvířat. Lepších výsledků je dosaženo u mladých ovcí, optimální tělesné kondice (Kenyon et al. 2004; Kleemann & Walker 2005). U zvířat, která byla inseminována při hodnotách BCS pod 2 a naopak nad 4, bylo pozorováno snížení míry březosti, díky snížení životaschopnosti embryí. Doporučená tělesná kondice, ve které by se měli

udržovat bahnice během období reprodukce, je 2,5-3 BCS (Abdel-Mageed 2009). Na zabřeznutí má vliv také stres, kterému vystavujeme samice před plánovanou inseminací. Podle McCappin a Murray (2011) klesla míra těhotenství u bahnic, které byly vystaveny 4 až 6 týdnů před inseminací stresu, vyvolanému manipulací a ošetřováním ovcí.

Tento způsob inseminace je preferován zejména při použití zmrazeného spermatu, protože normálně je plodnost kryokonzervovaných spermií cervikální metodou inseminace extrémně nízká (Salamon & Maxwell 1995). Kromě toho intrauterinní inseminace vykazuje vyšší zabřezávání než inseminace intracervikální také u spermatu čerstvého (dos Santos-Neto et al. 2015). McCappin a Murray (2011) uvádí, že 70 % bahnic zabřezlo po inseminaci zmrazeným spermatem, zatím co po použití čerstvého spermatu došlo k březosti u 58 % testovaných ovcí.

Z těchto důvodů je intrauterinní inseminace, prováděná pomocí laparoskopie, používána ve velkém množství ve spoustě zemích, přestože tato metoda vyžaduje veterinární odbornost a je náročnější co se týče práce a vybavení, které je potřeba k tomuto úkonu. Tato metoda je také oproti ostatním způsobům inseminace cenově náročnější (Batista et al. 2009). I když bylo navrženo několik dalších alternativ, které by nahradily použití laparoskopie, tato technika je stále výchozí metodou pro dosažení vyšší míry zabřeznutí u samic malých přežvýkavců (Casali et al. 2017).

3.2 Sexuální aktivita beranů a kozlů

U mladých plemeníků může docházet k nástupu sexuálního chování už během několika týdnů po narození. Nejpozději se pak dostavuje do 1 roku stáří. K plnohodnotnému dosažení pohlavní dospělosti pak dochází od 4 až 8 měsíců do 1 až 4 let stáří. (Colenbrander et al. 2003)

Berani a kozlové mají stejně jako ovce a kozy reprodukční sezónu, při které jsou sexuálně aktivní. Samci jsou plodní po celý rok, nicméně během roku dochází ke změně množství a kvality spermatu. Během sezónní reprodukce je sexuální chování, produkce spermií a také velikost varlat ovlivněny fotoperiodicitou. Kvalita spermií je ovlivněna ročním obdobím. Koncentraci spermií a objem spermatu snižují vysoké teploty, které mohou být ovlivněny také vysokou relativní vlhkostí nebo nadprůměrnými srážkami. Vyšší pohyblivosti spermií je pak docíleno připouštěcím obdobím. 5–8 % spermií vykazovalo během reprodukční sezóny morfologické anomálie. Avšak mimo připouštěcí období byly zjištěny morfologické anomálie u 10–18 % spermií (Colenbrander et al. 2003).

Sexuální aktivity během nepřipouštěcího období, se dá docílit řadou způsobů, jako je například aplikace intramuskulárního glutamátu buď samostatně nebo v kombinaci s testosteronem. To vyvolává u beranů, kteří jsou v období sexuální inaktivity, zvýšení celkového sexuální chování. Berani, kteří jsou vystaveni této léčbě, vyvolávají u ovcí v období anestrů rychlejší nástup říje, zvýšenou ovulace, počet žlutých tělísek a obecně lepší zabřezávání (Calderón-Leyva et al. 2018). V oblastech, kde se v chovu uplatňuje ve větší míře použití inseminačních dávek, jsou samci vystaveni střídání délek světelného dne. Berani a kozli jsou podrobena nejprve účinkům dlouhých dnů, kdy jsou samci vystaveni světelnému záření

po delší dobu, stejně jako je tomu v letních dnech, a to v intervalu jednoho měsíce. Následně dochází ke zkrácení světelného režimu, a tím k napodobení zimních dnů, po stejný časový interval. To má za následek trvale vysokou produkci spermatu bez sezónních výkyvů na kvalitě semene (Chemineau et al. 2007). V centrech pro odběr spermatu, kde není požadována trvalá produkce inseminačních dávek, se u zvířat chovaných alespoň částečně ve venkovních podmínkách, využívá působení „dlouhých dnů“ (delší světelný interval) po dobu 2 až 3 měsíců. Nejčastěji od prosince do února. Následně dochází buď k návratu k přirozené fotoperiodě, nebo je uplatněna léčba pomocí melatoninových implantátů, které nahrazují působení „krátkých dnů“. To má za následek produkci kvalitního spermatu hlavně v jarním období, což je doba přirozeného připouštěcího období (Malpaux et al. 1995; Chemineau et al. 2007). Vystavením samic i samců nepřetržitému světlu, dochází ke stimulaci říje i mimo přirozené připouštěcí období. Normy na ochranu zvířat však zakazují používání nepřetržitého světla v chovech hospodářských zvířat, kvůli možným poruchám biologických rytmů různých funkcí (Pellicer-Rubio et al. 2019).

Na sexuální aktivitu beranů a kozlů má vliv tzv. samičí efekt. Ten má za následek obdobné působení jako samčí efekt. Jedná se o působení samic na samce, v podobě chemických, vizuálních nebo sluchových signálů. Samci chovaní společně se samicemi, které se nacházejí v říji, mají prokazatelně vyšší kvalitu semene a také vyšší obsah testikulární tekutiny, a to po celý rok. U těchto samců byl naopak zaznamenán pokles koncentrace testosteronu (Giriboni et al. 2017). Denní produkce spermií varlat se uvádí 2,76 až $7,23 \times 10^9$. Mírné odchylky jsou závislé na sezónnosti a plemenné příslušnosti. Denní výdej spermií se pak pohybuje mezi 40 a 80 % celkové denní produkce spermií (Leboeuf et al. 2000).

3.3 Příprava inseminačních dávek

Obecně lze říct, že v oblasti vývoje a uplatnění technologií asistované reprodukce, se berani a kozli berou jako jeden druh, ačkoli jsou mezi nimi drobné rozdíly například v morfologii nebo koncentraci spermií ve spermatu (Zhu et al. 2020). Dalším rozdílem bylo zjištění, že na kozí spermie může být zmrazovací účinek úspěšnější, než na spermie berana (Lv et al. 2019). U kozla je pak největším problémem produkce lipázových enzymů, které způsobují koagulaci ředidel s obsahem vaječného žloutku nebo mléčné bílkoviny (Bajuk et al. 2018). U berana se tento problém nevyskytuje.

3.3.1 Odběr semene

U berana a kozla se odběr semene provádí nejčastěji pomocí umělé pochvy, která by měla co nejpřesněji imitovat pochvu plemence. Měla by také splňovat několik požadavků. Teplota vody uvnitř umělé pochvy musí být stejná, jako teplota vnitřního prostředí pochvy ovce nebo kozy. U malých přežvýkavců se doporučuje voda o teplotě 40-41 °C. Důležitý je také tlak, který vyvíjí samec na stěnu pochvy, který se dá regulovat pomocí vzduchového ventilu. Nespermicidními látkami musí dojít k lubrikaci vnitřku pochvy, aby nedošlo k poranění penisu samce. Pro tento účel se využívá vazelína nebo sonografický gel. Kvůli kontaminaci spermatu,

by nemělo dojít k aplikaci lubrikantu do poslední třetiny pochvy (Kos et al. 2019). Umělá pochva je oproti té, která se používá pro odběr býků, zkrácena na 20 cm. Pro urychlení a vyšší výtěžnost odběru, lze použít říjící se samici jako atrapu. Odběr semene lze provádět 1 až 2krát denně, 5krát za týden. Jiné zdroje uvádějí intenzitu odběru semene na 2 až 3 odběry týdně. V připouštěcím období lze získat 50 až 200 inseminačních dávek za týden. Mimo připouštěcí období, je dosahováno nižší výtěžnosti (Louda & Hegedušová 2009). Četnost odběrů má však vliv na kvalitu spermatu. Doporučená doba odpočinku mezi jednotlivými odběry je 2 až 3 dny, neboť doba sexuálního odpočinku mezi odběry má příznivý vliv na mrazivost spermií (Colenbrander et al. 2003).

Pro odběr spermatu lze využít také elektroejakulaci. Ta se využívá hlavně mimo přirozené připouštěcí období a také u zvířat, která nejsou navyklá na odběr umělou vagínou (Abril-Sánchez et al. 2017). Elektroejakulace se provádí pod anestezií pomocí elektroejakulátoru. Ten se skládá z rektální sondy o délce 20,5 cm a průměru 2,5 cm. Ungerfeld et al. (2021) uvádí délku sondy 30 cm a šířku 1,5 cm. Na sondě jsou připevněny tři pásové elektrody s ampérmetrem. Zdrojem celého zařízení je 12-V baterie. Zvířeti ležícímu na levém boku je do konečníku zavedena sonda s ultrazvukovým gelem, kvůli zlepšení elektrického kontaktu. Elektrické pulzy působí v cyklech: 5 pulzů při 0,1 mA, 20 pulzů při 0,2 mA a 5 pulzů při 0,3 mA. Pokud nedojde ke stimulaci a následné ejakulaci, následuje další série pulzů (Santiago-Moreno et al. 2009). Elektrická stimulace není příliš vhodná z důvodu změny semenné plazmy. To má za následek snížení tolerance na poškození při kryokonzervaci (Lv et al. 2019; Youngquist & Threlfall 2006). Uvádí se, že použití této metody je bolestivé a stresující, a proto méně vhodné. Elektroejakulace má za následek zvýšení koncentrace kortizolu v séru, zvýšení rektální teploty a také srdeční a respirační frekvence. To všechno jsou ukazatelé stresu. Elektrické pulzy navíc poškozují svaly (Ungerfeld et al. 2021).

Poměrně novou metodou a také alternativou pro odběr semene pomocí elektroejakulace, je technika odběru označovaná jako TUMASG. Jedná se o transrektální ultrazvukem vedenou masáž doplňkových pohlavních žláz. Původně se tato metoda využívala u divoce žijících přežvýkavců, jelikož využívá méně elektrických pulzů nebo vůbec žádné. To má za následek nižší hodnoty kortizolu a tím pádem nižší stresové působení na zvířata. Při rektální ultrasonografii jsou v reálném čase pozorovány bulbouretrální žlázy, semenné vajíčky a také ampule chámovodu. Před samotnou masáží dojde nejprve k vytažení penisu a následně je do konečníku vsunuta sonda s karboxymethylcelulózovým gelem. Při TUMASGu dochází ke střídání masáže mezi bulbouretrálními žlázami a ampulemi chámovodu. Současně při tom se praktikuje masáž oblasti močové trubice, kvůli lepšímu průchodu ejakulátu přes močovou trubici. Díky ultrazvukovému skenování dochází ke kontrole chámovodu, která končí v momentě úplného vyprázdnění žláz. Pokud nedojde k ejakulaci, je použito elektrických podnětů o síle 3 V, po dobu 5 s. Mezi podněty jsou vloženy přestávky, které jsou využity pro TUMASG (Abril-Sánchez et al. 2017). V případě aplikace oxytocinu před TUMASGem, dochází k rychlejší elektroejakulaci a ke snížení použitých elektropulzů (Ungerfeld et al. 2016).

Abril-Sánchez et al. (2017) ve své práci srovnává metody elektroejakulace (EE) a TUMASGu a jejich stresové dopady na samce. Uvádí, že při metodě TUMASG dochází

k pozdější ejakulaci a je tedy časově náročnější. U všech aplikací TUMASGu muselo být použito elektrických pulzů, avšak méně, než je tomu u elektroejakulace. Samci se zvukově více projevovali při použití elektroejakulace z čehož je patrné, že je tato metoda pro samce více bolestivá. Srdeční frekvence byla vyšší u EE, a to až o 10 tepů za minutu. Teplota konečníku byla stejná u obou metod. Hodnota kortizolu, který je označován jako ukazatel stresu, byla obecně vyšší v případě EE. Kvalita odebraného spermatu při obou metodách byla srovnatelná. Tyto výsledky dokazují, že metoda TUMASG je vhodnou alternativou odběru spermatu, při které dochází k získání ejakulátu obdobných hodnot jako při EE, avšak za podmínek více vyhovujících a méně stresujících pro samce.

3.3.2 Vyšetření a hodnocení spermatu

3.3.2.1 Makroskopické vyšetření

Ihned po odběru spermatu se provádí hodnocení objemu, konzistence, barvy, pachu, pH a obsahu cizích příměsí. Většinu parametrů lze hodnotit subjektivně, pouhým zrakem. Objem odebraného spermatu se dá nejjednodušeji zjistit vážením nebo měřením. K tomuto účelu se nejčastěji využívá odměrná odběrová zkumavka, na které se přímo odečte hodnota objemu ejakulátu, obvykle v mililitrech (Heidari et al. 2021). Faktory ovlivňující objem ejakulátu jsou věk samce, hmotnost, plemeno, výživa, roční období, způsob a četnost odběru spermatu (Weberová 2017). Konzistence ejakulátu berana a kozla by měla být smetanovitá, hustá a neprůhledná. Barva lehce našedlá až mléčná. Pach beraního spermatu může být cítit po vlně a kozlí sperma má typický kozlí pach. pH se pohybuje od 6,3 do 7,5 u obou druhů (Kos et al. 2019).

3.3.2.2 Mikroskopické vyšetření

To zahrnuje vyšetření koncentrace, životaschopnosti, motility a morfologie. Pohyblivost spermií se dá hodnotit podle stupnice od 0 do 5, kdy 0 označuje sperma bez jakéhokoli pohybu spermií a naopak 5 představuje spermie se značnou pohyblivostí (Ungerfeld et al. 2021). Motilita spermií je ovlivňována kaskádou proteinů. Navzdory pokroku ve výzkumu proteinů a jejich funkcí na spermie, jsou studie prováděné na beranech či kozlech spíše vzácné (Zhu et al. 2020). Koncentraci spermatu lze posoudit více způsoby. Počítačovými systémy, spektrofotometrií, nebo třeba hemocytometrií. Van der Horst (2020) uvádí následující hodnoty koncentrace spermií ve spermatu: $>3 \times 10^9/\text{ml}$ pro berany a $>2 \times 10^9/\text{ml}$ pro kozli. Dále lze provádět test na hypoosmotický otok spermií (HOST), který určuje procento funkčních membrán (Lv et al. 2019; Ungerfeld et al. 2021; Faigl et al. 2012). U spermií, které mají funkční plazmatickou membránu, dochází při hypoosmotických podmínkách k otoku a zvlnění bičíků (Bajuk et al. 2018). Vzorek spermatu je inkubován společně s hypoosmotický bobtnavý roztok (HOS) v poměru 1:15, při teplotě 37 °C a po dobu 15 minut. Následuje hodnocení pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Liu et al. 2020).

3.3.3 Metody vyšetření spermatu

Běžnými problémy neplodnosti samců jsou nízký počet spermií, nízký počet morfologicky odpovídajících spermií a také nízká míra pohyblivosti spermií (Turner 2003). Nízká pohyblivost spermií je nejčastějším důvodem neplodnosti samců a tím pádem dochází k znehodnocení plemeníka a ekonomické ztrátě. Snížená plodnost má také vliv na pokles genetické selekce (David et al. 2015). Proto existuje řada metod pro hodnocení spermatu před mražením, ale také po rozmražení inseminačních dávek.

3.3.3.1 CASA (Computer Aided Sperm Analysis)

Koncentraci a motilitu spermií lze hodnotit systémem počítačové analýzy CASA, což je moderní, přesná a naprosto objektivní technologie, která je založená na pozorování hlaviček spermií (Dorado et al. 2007; Zhu et al. 2020). Základním principem systémů CASA je získávání a analýza po sobě jdoucí sérií snímků, které zobrazují pohyblivost spermií (Bompart et al. 2018). CASA poskytuje informace zejména o kinematických parametrech. Systém dokáže hodnotit následující parametry: celkovou pohyblivost, progresivní pohyblivost, průměrnou rychlost dráhy, přímou rychlost, křivočarou rychlost, amplitudu laterálního posunu hlavičky, frekvenci křížení a linearitu. Součástí moderních systémů CASA jsou také informace o morfologii spermií, životaschopnosti spermií, fragmentaci spermií a akrozomové reakce (van der Horst 2020). Je pořizováno 25 snímků/s, ve 100násobném zvětšení. Van der Horst (2020) uvádí sledování spermií při snímkové frekvenci 50 fps, u některých druhů pak 100 až 169 fps. Sperma je považováno za nepohyblivé, pokud je křivočará rychlost pod 10 $\mu\text{m/s}$; pomalé, pokud je křivočará rychlost mezi 10 a 45 $\mu\text{m/s}$; středně rychlé, pokud je mezi 45 a 75 $\mu\text{m/s}$; a rychlé, pokud je nad 75 $\mu\text{m/s}$. Jako progresivně pohyblivé spermie, jsou uváděny ty, které vykazují přímost nad 80 % (Correia et al. 2021). Inanc et al. (2019) hodnotí motilitu beraního spermatu při teplotě 37 °C a při 10násobném zvětšení. Motilitu hodnotí jako rychlou (> 120 $\mu\text{m/s}$), střední (> 90 $\mu\text{m/s}$), pomalou (> 60 $\mu\text{m/s}$) nebo statickou. Je důležité zdůraznit, že existuje několik systémů počítačové analýzy CASA, a jejich výsledky mezi sebou obvykle nelze hodnotit. Rychlost a počet snímků získaných za sekundu, mohou významně ovlivnit výsledky měření. Čím početnější je lokalizace hlavy spermií a čím nižší je interval mezi snímky, tím lepší je přesnost rekonstrukce trajektorie pohybu spermií. Použitá koncentrace spermií je dalším faktorem, ovlivňujícím výsledky CASA. Proto je důležité vzorky spermatu ředit, jelikož např. při koncentraci $100 \times 10^6/\text{ml}$, bylo zjištěno, že v některých případech nebyla CASA schopna provést měření, kvůli vysokému výskytu spermií. K ředění vzorků pro analýzu CASA lze využít různá média, jako je např. izotonický roztok NaCl, fosfátový pufr (PBS), nebo Bioexcell (Contri et al. 2010).

3.3.3.2 FAST (Flagellar and Sperm Tracking)

Kvůli velkému počtu buněk není možné, pomocí systému CASA, sledovat bičíky spermií. Proto byl objeven tento nový systém, vyvinutý na Univerzitě Birmingham, UK. Jedná se o systém, který kvantitativně hodnotí a analyzuje některé parametry bičíků spermií. Sledování

bičkových křivek umožňuje měření veličin, jako je rozptyl energie, narušení okolního média a viskózní napětí. Tyto veličiny nelze měřit pouhým sledováním hlaviček spermií. Hodnocený vzorek spermatu musí být ředěný, nikoli surový, kvůli křížení cest bičků. FAST pracuje při 169 sn./s a za pomoci modulu pohyblivosti SCA a kontrastní mikroskopie s negativní fází (Gallagher et al. 2019; van der Horst 2020).

3.3.3.3 Průtoková cytometrie (Flow cytometry)

Pomocí průtokové cytometrie se hodnotí celková životaschopnost spermií. Vlastnosti, které lze hodnotit, jsou poškození plazmatické membrány, poškození akrozomů, nebo mitochondriální aktivita. Životaschopné spermie jsou definovány jako buňky s intaktní plazmatickou membránou, intaktním akrozomem a vysokou mitochondriální aktivitou (Savvulidi et al. 2021). Vzorky jsou hodnoceny pomocí průtokových cytometrů, jako je CytoFLEX, Epics V, nebo NovoCyte. Průtokové cytometry jsou vybaveny argonovým laserem. Koncentrace spermií v hodnoceném vzorku bývá upravena na hodnotu 2 až 5×10^6 spermií/ml. Vzorky jsou analyzovány pomocí CytExpert Software 2.0 (Pool et al. 2020). Purdy & Graham (2004) ve své práci používají pro obarvení spermií fluorescenční barvivo SYBR-14 a propidium jodid, pro hodnocení plazmatických membrán. Uvádějí, že všechny spermie ve vzorku, se obarví barvivem SYBR-14, což je odliší od částic vaječného žloutku, použitého v ředidle. SYBR-14 způsobuje, že jádra živých spermií fluoreskují jasně zelenou barvou (Garner et al. 1994). Propidium jodidem se obarví pouze neživotaschopné spermie, které ztrácejí integritu membrány. Obarvená jádra mají červenou barvu. Pro hodnocení poškození akrozomů se využívá barvivo PNA lectin a pro hodnocení mitochondriální aktivity MTR DR (MitoTracker Deep Red). Dalšími hojně využívaným barvivem je EH (ethidium homodimer). K fluorescenci se využívají filtry jako 515 nm filtr s dlouhým průchodem, 525 nm pásmový filtr pro detekci FITC-PNA nebo SYBR-14, 630 nm filtr s dlouhým průchodem pro detekci propidium jodidu (Purdy & Graham 2004; Purdy 2006). Savvulidi et al. (2021) použili cytometr NovoCyte, vybavený fialovým (405 nm), modrým (488 nm) a červeným (640 nm) laserem, a také optické filtry, vhodné pro detekci fluorescenčních signálů.

3.3.3.4 Spektrofotometrie

Pro měření koncentrace spermatu se využívá přístroj, tzv spektrofotometr. Metoda je založena na měření intenzity světla. Jedná se o kvantitativní měření přenosu světla, skrz požadovaný roztok. U domácích druhů zvířat je pro hodnocení koncentrace spermií využíváno vlnových délek mezi 500 a 650 nm. Požadovaný vzorek spermatu se plní do kyvety, což je malá, průhledná, kvádrotvá nádobka, vyrobená z plastu, skla nebo křemene. Kyveta se po naplnění vkládá mezi zdroj světla a detektor, který zachycuje světelný paprsek. Před měřením se provádí kalibrace přístroje, vložením čisté kyvety do komory na vzorky, naplněné 2,9% roztokem citrátu sodného (Anzar et al. 2009). Spektrofotometry nemusí být tak přesné, kvůli neschopnosti odlišit spermie od jiných buněk nebo částic zbytků, obsažených ve spermatu (Brito et al. 2016; Moraes et al. 2019).

3.3.3.5 Hemocytometrie

Hemocytometrie je jedním ze způsobů měření koncentrace spermatu. Jedná se o nejstarší způsob hodnocení koncentrace spermií. Hemocytometr je tlustá skleněná destička, na které jsou odděleny dvě počítací komůrky. Nejprve dochází k přípravě fixačního roztoku, rozpuštěním 1 ml formaldehydu v 99 ml 3,4% citrátu sodného. Následuje ředění spermatu s fixním roztokem. Na hemocytometr se položí krycí sklíčko a kápnutím připraveného vzorku na okraje krycího skla, dojde ke vtažení tekutiny pod krycí sklíčko. Pro vyšetření koncentrace spermatu se využívá Neubauerovy, ale také Bürkerovy mřížky. K vyšetření se využívá mikroskop s fázovým kontrastem, při 200 nebo 400násobném zvětšení. Ve čtverečích hemocytometru se počítají jednotlivé hlavičky spermií (Anzar et al. 2009; Brito et al. 2016).

3.3.4 Sexování spermií

Stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat, je i u ovcí a koz tendence získávat od kvalitních zvířat potomky s preferovaným pohlavím. Po inseminaci sexuálně tříděným spermatem byla již získána mláďata od skotu, prasat, ale také ovcí. Zatím co u skotu je inseminace sexovanými inseminačními dávkami běžnou praxí, u ostatních druhů hospodářských zvířat včetně ovcí a koz, se těchto dávek využívá spíše výjimečně (Qin et al. 2018). Nejspolehlivější metodou pro třídění spermií je průtoková cytometrie založená na rozdílech obsahu DNA mezi gametami, které určují pohlaví plodu. Spolehlivost sexovaných inseminačních dávek se pohybuje v rozmezí 85-95 %. Úspěšnost separace spermií je závislá nejen na obsahu DNA, ale také na tvaru hlavičky spermie. Nejpresněji dochází k třídění spermií u býků, jelikož jejich zploštělý tvar hlaviček spermií nejlépe odpovídá požadovanému tvaru při průtokové cytometrii (Garner 2006). Během procesu sexování dochází k poškození spermií, a to ve větší míře, než je tomu u běžných nesexovaných dávek. Dochází k vystavení spermií mnoha stresorům jako jsou fluorescenční barviva, vysoká rychlost ředění, mechanické poškození, průchod elektrickým polem nebo laserové osvětlení (Anel-López et al. 2018). Dochází k častějšímu poškození membrán, k fragmentaci DNA, ke zhoršené motilitě a k předčasné kapacitaci. Výsledkem toho je horší zabřezávání po inseminaci sexovanými inseminačními dávkami (Qin et al. 2018). Na úspěšnost inseminace sexovanými inseminačními dávkami má vliv mnoho faktorů. Nejdůležitější je včasná a přesná detekce říje, spojená s vhodnou dobou pro inseminaci. Jelikož životaschopnost spermií, tříděných podle pohlaví, je v samičím reprodukčním traktu daleko kratší, než je tomu u běžných inseminačních dávek, je nejlepší doba pro aplikaci sexovaných dávek přesně ve chvíli ovulace. Dalším důležitým faktorem je místo, kam je aplikována inseminační dávka, a také způsob inseminace (Maxwell et al. 2004, Anel-López et al. 2018). Míra úspěšnosti inseminace se zvyšuje, pokud je sperma vpraveno daleko do děložních rohů samice. Další možností, jak zlepšit proces sexace spermií, je přidání antioxidantů během procesu třídění. Antioxidanty mají ochranný účinek na kvalitu a funkci spermií. Těmito antioxidanty jsou AA-2G (kyselina askorbová-2glukosid), glutathion, melatonin nebo vitamín C. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití antioxidantu AA-2G (Qin et al. 2018).

3.3.5 Zpracování semene

3.3.5.1 Ředění

Před konzervací spermií, je nutné k odebranému a zpracovávanému spermatu přidat takzvaná ředidla, která upravují koncentraci spermií v inseminační dávce, zvyšují objem inseminační dávky a tím pádem také efektivnější využití genetického materiálu samce (Mocé et al. 2020). Dále jsou dočasným zdrojem energie pro spermie (Dorado et al. 2007). Kryoprotektiva, obsažená v ředidlech, chrání spermie před chladovým šokem. Ten má za následek ztrátu selektivní permeability a integrity plazmatické membrány. Dochází při něm k uvolňování intracelulárních enzymů a lipidů. Dále má za příčinu trvalé změny v membránách akrozomů a mitochondriích (Bajuk et al. 2018). Nejčastěji používaná ředidla jsou na bázi tris, fruktózy, glukózy, sacharózy, rafinózy, kyseliny citronové, antibiotik, glycerolu nebo vaječného žloutku. Dále lze použít mléčná nebo laktózová ředidla. Mléko, jako ředidlo, se dá použít plnotučné, odstředěné nebo ve formě UHT mléka (Salamon & Maxwell 2000). V chovu koz se pro ředění kozlího spermatu často využívá odstředěné mléko. Inseminační dávky lze uchovávat při teplotách 2 až 15 °C, avšak při ředění odstředěným mlékem se doporučuje hodnota 4 °C (Iannuzzi et al. 2021). Glycerol se jako ochranná látka v ředidlech využívá nejčastěji a v případě ředění kozlího spermatu, se pravděpodobně jedná o jedinou látku, kterou lze použít. Hladina glycerolu, použitá při mražení dávek, je omezena jeho toxicitou. Ta je závislá na složení ředidla, jeho osmotickém tlaku a na chlazení a mražení dávek. Spermie kozlů vyžadují pro kryokonzervaci hyperosmotická média. Koncentrace glycerolu závisí také na způsobu, jakým se ke spermatu přidává. Nejlépe se jeví přidávat glycerol při 4–5 °C, a ne déle než 20 až 30 minut před zmrazením. Podle Leboeuf et al. (2000) nemá přidání glycerolu při teplotě 5 °C žádné výhody, oproti přidání při 30 °C. Vaječný žloutek je stejně jako glycerol hojně využíván v ředidlech. Jeho funkcí je ochrana před chladovým šokem a také před účinky mražení a rozmrazování inseminačních dávek. Působí zejména na plazmatickou membránu spermií. Bylo prokázáno, že vaječný žloutek působí lépe na býčí spermie než na spermie berana (Leboeuf et al. 2000; Salamon & Maxwell 2000). Byly však také zjištěny nežádoucí účinky vaječného žloutku na plodnost kryokonzervovaného spermatu. Žloutek může svou produkcí metabolitů a toxinů způsobovat snížení kvality spermatu a svou přítomností v ředidlech může způsobovat snížení motility a dýchání spermií. Lokální infekcí může nepřímo způsobit potrat (Ptáček et al. 2019).

Při ředění spermatu lze využít dvoustupňové nebo jednostupňové metody. V případě dvoustupňové metody se nejprve použije ředidel bez obsahu glycerolu. Následně je již zředěné sperma dále ředěno kryoprotektivy s obsahem glycerolu. U jednostupňové metody dojde přímo k rozředění spermatu ředidly obsahujícími glycerol. Ředění se provádí před ekvilibrací a za nízké teploty. Koncentrace glycerolu použitého u beraního spermatu je 4–6 %. U kozlího spermatu se pak uvádí 6–7 % (Lv et al. 2019). Glycerolovaná ředidla lze také přidávat ve třech krocích, a to v 10minutových intervalech (Leboeuf et al. 2000).

Největším problémem při uchovávání kozlího spermatu je škodlivé působení semenné plazmy na životaschopnost spermií (Colenbrander et al. 2003). V semenné plazmě je obsažen

speciální enzym, který způsobuje koagulaci vaječného žloutku. Fosfolipáza A, nazývaná také jako EYCE (egg yolk coagulating enzyme), je sekretem bulbouretrální žlázy a má za následek srážení vaječného žloutku, hydrolýzu lecitinu na mastné kyseliny a také na spermicidní lysolecithiny. Z bulbouretrální žlázy kozlů byla detekována další látka, která se označuje jako SBUIII. Jedná se o glykoproteinovou lipázu, která má za následek akrozomální reakci. Ta komplikuje přežití spermií v inseminačních dávkách s obsahem mléčných složek. Dále může SBUIII způsobovat poškození motility spermií a také plazmatické membrány (Lv et al. 2019). Je pravděpodobné, že EYCE a SBUIII jsou totožnou molekulou (Purdy 2006).

Způsob, kterým lze zabránit negativnímu účinku semenné plazmy při kryokonzervaci u kozlů, je úplné odstranění semenné plazmy. Tu lze odstranit odstředěním nebo promýváním spermií fyziologickým roztokem (např. Ringerovým roztokem) a následným odstředěním (Memon et al. 1985). Při odstředění se odstraní všechny složky semenné plazmy, a tedy i ty, které jsou přirozené a pro spermie důležité. Některé proteiny obsažené v semenné plazmě podporují metabolismus spermií a mají výživnou a ochrannou funkci pro spermie. Navíc pomáhají spermii přežít v prostředí ženského reprodukčního traktu (Lv et al. 2019; Juyena & Stelletta 2012). Tyto proteiny mají nepostradatelný účinek také pro kapacitaci a následné oplodnění oocytů. Byly však také vydány studie, které poukazují na nepatrnost vlivu semenné plazmy na spermie, a naopak na některé negativní účinky (Barrios et al. 2000). Dalším způsobem, kterým by se dalo zamezit negativnímu působení lipáz v semenné plazmě, je snížení koncentrace vaječného žloutku v ředidle nebo jeho úplné nahrazení např. sójou (Bajuk et al. 2018).

Vzorky spermatu se ředí buď konkrétním objemem ředidla, nebo se ředí na konkrétní koncentraci spermií. Lepším způsobem je ředění na konkrétní koncentraci spermií. Míra ředění je 1:1 – 1:23. Spolehlivých výsledků bylo dosaženo u dávek ředěných na koncentraci 80 až 500×10^6 spermií/ml (Purdy 2006).

3.3.5.2 Plnění do pejet/pelet

Po naředění a schlazení semene se inseminační dávky plní do pelet nebo pejet. Zmrazení dávek v podobě pelet je rychlé a levné, ale jednotlivé pelety se nedají nijak označit. Dávky o objemu 0,1 – 0,3 ml se dávkují do prohlubní v suchém ledu. Zmrazení dávek v plastových pejetách je pracnější a nákladnější. Jednotlivé dávky však mohou být označeny přímo na pejetách. Připravené inseminační dávky se dají do pejet plnit za pomoci pipetníku, při okolní pokojové teplotě (25 °C). Objem pejet je 0,25 – 0,5 ml (Purdy 2006). Pejety jsou uzavřeny pomocí plastových kuliček nebo těsnícího prášku, který při kontaktu s vodou utváří pevnou zátku (Savvulidi et al. 2021).

3.3.6 Konzervace semene

Inseminační dávky malých přežvýkavců se využívají buď čerstvé, nebo se uchovávají v chlazeném nebo zmrazeném stavu.

3.3.6.1 Chlazení

Chlazené inseminační dávky mají oproti těm mraženým řadu výhod. Nejpodstatnější výhodou je vyšší plodnost, dále také snadnější práce při umělé inseminaci a v neposlední řadě také snazší přeprava k chovateli. Naopak velkou nevýhodou chlazeného spermatu je jeho krátká použitelnost. Inseminace chlazeným spermatem vykazuje mnohem vyšší plodnost oproti použití zmrazených inseminačních dávek. Sperma se zchladzuje na teplotu 10–15 °C (Carneiro et al. 2019), dnes spíše na teplotu 4 až 5 °C. Podle Colenbrander et al. (2003) se skladováním spermatu při teplotě 5 °C docílí vyšší motility spermií než při 17 °C. Při této teplotě se dosahuje relativně vysoké plodnosti (54-65 %). Oproti tomu, zmrazené sperma vykazuje oplozeníschopnost pouhých 35–38 %. V obou případech však nedochází k takovému úspěchu, jakému je dosahováno při přirozené plemenitbě, kde je uváděna plodnost až 74 %. Ve Španělsku je umělá inseminace chlazeným spermatem využita asi v 85 % případů (Mocé et al. 2020).

Při chlazení spermatu se využívá ředících látek, které zabraňují poškození spermií. K těm dochází během chlazení, vlivem poklesu teploty. K těmto účelům se využívá např. žloutek nebo odstředěné mléko, ale také komerčně vyráběná ředidla. Při vysokých dávkách ředidel může být udržena plodnost spermatu po dobu 3-5 dnů, při teplotě 10-21 °C. Následně plodnost klesá o 3-6 % za den. K poklesu plodnosti dochází bez ohledu na to, zda je inseminační dávka skladována při 5 °C nebo při 15 °C. K zásadnímu poklesu dochází až při teplotách nad 25 °C (Yoshida M 2000). Pro udržení delší životaschopnosti spermií se k ředidlům přidávají antioxidanty. Při jejich použití dochází ke zlepšení motility a akrozomové integrity spermií. Pro tento účel se využívá kataláza, superoxiddismutáza, cytochrom c a glutathionperoxidáza (Maxwell & Stojanov 1996). Pozvolným chlazením dochází k zamezení poškození spermatu chladovým šokem. To může trvat klidně od 1,5 až do 4 hodin. V dřívějších studiích již bylo prokázáno, že při poklesu teploty rychlejší jak 0,55 °C/min, dochází ke zhoršení kvality kozlího spermatu. Inseminační dávky ve formě pejet lze chladit v programovatelné vodní lázni. Rychlost chlazení je -0,18 °C/min a dochází ke zchlazení spermatu z 20 °C na 4 °C. Při této teplotě, se inseminační dávky skladují až do použití při inseminaci (Mocé et al. 2020).

U chlazených inseminačních dávek je největším problémem doba, po kterou je dávka dostatečně oplozeníschopná. Zhruba po 12 hodinách dramaticky klesá plodnost u chlazených inseminačních dávek. Proto ve většině případů dochází k umělé inseminaci do 5–8 hodin od zpracování semene. To má však za následek problematickou distribuci inseminačních dávek k chovatelům. Zahraniční obchod s chlazenými inseminačními dávkami je takřka nemožný. Tím pádem dochází k omezení rozvoje šlechtitelských programů v chovu malých přežvýkavců. Možným řešením je chlazení inseminačních dávek až během jejich přepravy ke spotřebiteli. K postupnému chlazení dochází během distribuce. Tím dojde k prodloužení doby pro oplozeníschopnost, a proto lze dopravit inseminační dávky do vzdálenějších chovů (Iannuzzi et al. 2021). Chlazení během přepravy však může být komplikovanější a také nákladnější.

3.3.6.2 Mrazení

Takzvaná kryokonzervace semene je důležitou součástí pro zlepšení genetického potenciálu jednotlivých plemen malých přežvýkavců. Běžně se však v praxi využívá spíše chlazených nebo čerstvých inseminačních dávek. Hlavním důvodem je nízké zabřezávání samic po aplikaci mraženého spermatu. Úspěšnost zabřeznutí po aplikaci čerstvého spermatu je o 12,1 % vyšší, oproti mraženým a následně rozmraženým inseminačním dávkám (Konyali et al. 2013). Zmrazením spermatu dochází k ultrastrukturálnímu, biochemickému a také funkčnímu poškození spermií. Následkem je snížení motility, životaschopnosti a plodnosti spermií (Colenbrander et al. 2003).

Inseminační dávky se zamrazují buď v peletách nebo v pejetách. Ačkoli byly prokázány lepší výsledky životaschopnosti spermií a také plodnosti po rozmrazení dávek v peletách, je v praxi více využíváno inseminačních dávek v podobě pejet. A to i přes vyšší náročnost při jejich kryokonzervaci (Leboeuf et al. 2000). Dnes se ke skladování dávek využívá ve většině případů tekutého dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za pomoci takto extrémně nízké teploty lze docílit životaschopnosti spermií po neomezenou dobu. Salamon et al. (2004) uvádí, že i po 35 letech kryokonzervace spermatu berana, lze docílit oplodnění samice metodou intravaginální umělé inseminace. I tak však během zmrazení a rozmrazení dojde ke ztrátě plodnosti až u 50 % spermií (Lv et al. 2019). Nevýhodou tekutého dusíku je jeho relativně vysoká nákladnost a také nedostupnost v některých oblastech. Proto je v současné době snaha zlepšit techniku lyofilizace, při které není potřeba již hotové inseminační dávky dlouhodobě skladovat za pomoci tekutého dusíku. Zatím však nebyla potvrzena účinnost této alternativní metody na pokusech *in vivo*. Dalším způsobem, jak dlouhodobě uchovávat inseminační dávky, je mrazení a následné skladování v ultramrazírnách. Teplota se v těchto zařízeních pohybuje okolo $-157\text{ }^{\circ}\text{C}$. Předběžné studie, které zkoumaly účinky toho způsobu kryokonzervace, přinesly poměrně slibné výsledky. Kvalita semene se po 2 měsících skladování v ultramrazírnách nepříliš lišila od kvality inseminačních dávek skladovaných běžným způsobem, za pomoci tekutého dusíku. Plodnost inseminačních dávek byla navíc prokázána i 6 měsíců po skladování v ultramrazírnách. Zatím však nebyly provedeny pokusy, které by prokázaly schopnost oplodnění samic těmito dávkami (Batista et al. 2009).

Před samotným mrazením inseminačních dávek musí dojít k postupnému chlazení. K tomu dochází po naředění odebraného semene vhodným kryoprotektivem a po jeho naplnění do pejet. Následně dochází při stejné teplotě k ekvilibraci spermií, která by měla trvat zhruba 2–4 hodiny. Během ní dojde k přizpůsobení spermií sníženému metabolismu (Lv et al. 2019). Mrazení v peletách probíhá na suchém ledu, který má teplotu $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba potřebná k zmrazení pelet je 2–4 minuty. Následně jsou dávky ponořeny do tekutého dusíku, ve kterém jsou dlouhodobě konzervovány. Tato metoda je rychlá a jednoduchá. Rychlost chlazení lze regulovat objemem pelet (Leboeuf et al. 2000). Chlazené sperma v pejetách lze zmrazit za pomoci programovatelných mrazniček, s rychlostí mrazení $-8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Výhodou těchto zařízení je jednoduché ovlivnění rychlosti mrazení (Purdy 2006). K mrazení inseminačních dávek v pejetách se používá také chladicího stojanu. Pejety jsou nejprve předmrazeny v páře tekutého dusíku o teplotě mezi $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakonec jsou ponořeny přímo do tekutého

dusíku a v něm uchovávány při teplotě -197 °C (Lv et al. 2019). Rychlost chlazení lze regulovat vzdáleností pejet od hladiny tekutého dusíku nebo objemem pejet. Leboeuf et al. (2000) uvádí následující postup kryokonzervace pejet v tekutém dusíku. Pejety jsou v horizontální poloze zavěšeny nad tekutým dusíkem, kde jsou ve výšce 4–5 cm nad hladinou mraženy parami dusíku po dobu 4 až 5 minut. Následně jsou pejety ponořeny do tekutého dusíku. Savvulidi et al. (2021) ve své práci uvádí několik mrazících křivek, vhodných pro kryokonzervaci inseminačních dávek berana. K minimálnímu poškození akrozomů došlo při zmrazení spermatu následujícím způsobem. Pejety byly nejprve 15 cm nad povrchem tekutého dusíku po dobu 3 minut. Následně 9,5 cm nad tekutým dusíkem po dobu 2 minut. Poté 1 minutu ve výšce 5 cm nad hladinou tekutého dusíku a nakonec 2 minuty ve výšce 1,5 cm nad hladinou.

3.3.6.3 Budoucnost konzervace spermatu

3.3.6.3.1 Lyofilizace

Lyofilizace je proces, při kterém dochází k dehydrataci spermatu, za pomoci mrazu. Takto upravené inseminační dávky by se daly uchovávat při pokojové teplotě, nebo v chladničkách. Oproti kryokonzervaci je však lyofilizace komplikovanější proces. Zahrnuje primární a sekundární vysoušení. Nejprve dochází k přeměně kapalné fáze na ledové krystalky. Poté se zmrzlá voda odpaří v podobě vodní páry ve vakuovém prostředí. V takto vysušeném vzorku stále zbývá 8–10 % vlhkosti. Následuje tedy sekundární sušení, kdy je nezmražená vázaná voda zahřívána v nejnižším vakuu, což způsobí přeměnu vázané vody na vodní páru (Lv et al. 2019). Prvním úspěchem v lyofilizaci spermatu nastal v roce 1998, kdy byly získány zdravé myši po inseminaci lyofilizovanými spermii. Během lyofilizace a rehydratace spermií dochází ke ztrátě jejich pohyblivosti. Musí být, proto použita technologie ICSI (intracytoplasmic spermatozoa injection), pomocí které dochází k zavedení lyofilizovaných spermií do oocytů (Wakayama & Yanagimachi 1998). Podle Olaciregui et al. (2017) se dají lyofilizované ovčí spermie uchovávat při teplotě 4 °C a při pokojové teplotě, po dobu 12 měsíců. Proces lyofilizace poškozuje spermie víc, než je tomu při běžné kryokonzervaci. Dochází k degradaci DNA a ke strukturálním abnormalitám chromozomů. Existují však procesy, které pomáhají zmírnit negativní účinky lyofilizace (Lv et al. 2019). Je ještě hodně prostoru pro zdokonalování metody lyofilizace savčích spermií.

3.3.6.3.2 Vitřifikace

Během kryokonzervace dochází k tvorbě krystalů ledu, které strukturálně poškozují spermie. Možným řešením je vitřifikace. Ta představuje přímou přeměnu roztoků z kapalného stavu do sklovitého stavu, bez tvorby intracelulárního ledu. V případě vitřifikace se využívá vysokých koncentrací kryoprotektiv a ultrarychlého zmrazení přímým ponořením do tekutého dusíku. Při vitřifikaci není nutné využívat vaječného žloutku ani glycerolu. Nevýhodou vitřifikace je počáteční křehkost vzorku a také cytotoxicita vysokých dávek kryoprotektiv. Během vitřifikace navíc spermie přichází o pohyblivost, v důsledku citlivosti na osmotické a chemické změny. Řešením je technika ICSI. První vitřifikace byla provedena už v roce 1938 na spermiičích žáby. V tomto případě však byla prokázána téměř nulová přežitelnost spermií.

V roce 2008 se podařilo získat malé množství životaschopných lidských spermií po vitrifikaci, s 65% progresivní motilitou. V oblasti reprodukce malých přežvýkavců zatím neexistuje dostatek zdrojů, týkajících se procesu vitrifikace. Některé experimentální pokusy vitrifikace už se však dají dohledat i v tomto odvětví. Vitřifikace má do budoucna velký potenciál, i když během této metody dochází k většinové nebo úplné ztrátě životaschopnosti spermií. Takto poškozené spermie mohou být nadále injektovány do oocytů za pomoci techniky ICSI (Jiménez-Rabadán et al. 2015; Lv et al. 2019).

3.3.6.3.3 Reverzibilní inaktivace spermií

Při této metodě dochází k možnosti uchování inseminačních dávek při pokojové teplotě. První experimenty s inhibičním účinkem oxidu uhličitého na motilitu spermií byly provedeny už v roce 1924. IVT (Illini Variable Temperature) a CUE (Cornell University Extender) jsou ředidla používaná při konzervaci spermií nad bodem mrazu. (Salamon & Maxwell 2000). Smirnov & Postavnaja (1960) uvádějí, že při použití ředidla IVT byla po dobu 6-7 dnů zachována vysoká motilita a rezistence spermií, a to při teplotě 10 °C. K tomuto způsobu uchovávání spermatu chybí dostatek odborné literatury, a to zejména v oblasti chovu ovcí a koz. Nalezené záznamy jsou spíše staršího vydání. Z toho lze usuzovat, že tento způsob konzervace není v praxi příliš využíván.

3.3.7 Rozmrazení dávek před inseminací

Inseminační dávky ve formě pejet se rozmrazují ve vodní lázni o teplotě 35–40 °C. Pelety s inseminační dávkou, se obvykle rozmrazují suchou formou ve skleněných zkumavkách, při teplotě 37 °C (Lv et al. 2019; Leboeuf et al. 2000). Dorado et al. (2007) uvádí rozmrazování inseminačních dávek po dobu 30 sekund těsně před samotnou inseminací, za použití vodní lázně o teplotě 39 °C. Wakayama a Yanagimachi (1998) uvádí teplotu pro rozmrazení dávek v pejetách okolo 37 °C a dobu potřebnou pro rozmrazení v rozmezí 12–30 sekund. Bylo vyzkoušeno i více způsobů rozmrazování inseminačních dávek. Dříve bylo praktikováno také rozmrazování dávek při teplotě 5 °C po dobu 2 minut. To však nemělo takové parametry semene, jako dávky rozmrazené při teplotě 37 °C. Lepších výsledků, než při použití vodní lázně o teplotě 37 °C, bylo dosaženo rozmrazením dávek při teplotě 75 °C po dobu 10 s, respektive 70 °C po dobu 7 s. Dále lze použít teplotu vodní lázně 40 °C a dobu rozmrazení 20 s (Wakayama & Yanagimachi 1998). Avšak v praxi je ve většině případů používána metoda klasického rozmrazování inseminačních dávek ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 30 s. Důvodem je jednodušší a rychlejší práce s inseminační dávkou v terénu a také nemožnost přehřát dávku a zničit tak cenný genetický materiál (Leboeuf et al. 2000).

4 Závěr

V této práci byly sepsány nejnovější a dosavadní poznatky, týkající se problematiky využití umělé inseminace v chovu ovcí a koz. Informace byly čerpány především ze zahraničních zdrojů, kde se v této oblasti dosahuje značně lepších výsledků. Umělá reprodukce v chovu malých přežvýkavců má do budoucna široké uplatnění jak v malochovech, tak v intenzivních velkochovech. Do budoucna je možné široké využití inseminace také na našem území, díky stále rostoucímu zájmu o chov ovcí a koz.

Nejspolehlivější metodou inseminace mraženým spermatem je Intrauterinní laparoskopická inseminace, která dosahuje nejlepších výsledků. Tato metoda však vyžaduje odbornost technika a chovatel tedy není schopný bez předchozího školení tuto metodu inseminace praktikovat. Dalšími způsoby inseminace jsou intravaginální a transcervikální metody. U těch však není dosahováno takových výsledků a je zapotřebí použití čerstvého nebo chlazeného spermatu, které nelze dlouhodobě skladovat a přepravovat. Velký potenciál má také využití sexovaných inseminačních dávek. Ty se však komerčně využívají zatím pouze v chovu skotu.

K hodnocení spermatu před zmražením, ale také k hodnocení inseminačních dávek po rozmražení, je využíváno moderních počítačových metod, jako je CASA nebo průtoková cytometrie. Tyto metody poskytují kvalitní informace o vlastnostech spermií.

Použití tekutého dusíku k dlouhodobé konzervaci spermií, se jeví jako nejlepší a v dnešní době také nejvíce praktikovanou metodou skladování inseminačních dávek. I přes využití kryoprotektiv v ředidlech pro kozí a beraní sperma, dochází ke značnému poškození spermií při procesu zmrazování a rozmrazování dávek. Zde je tedy prostor pro další vývoj a zlepšení. Budoucnost konzervace inseminačních dávek však tkví v procesech lyofilizace a vitrifikace.

5 Seznam literatury

- Abdel-Mageed I. 2009. Body condition scoring of local Ossimi ewes at mating and its impact on fertility and prolificacy. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences* **4**: 37-44.
- Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Beracochea F, Damián JP, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. 2017. Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology* **98**: 82-87. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.006
- Anel-López L, Garcia-Álvarez O, Tarantini T, Del Olmo D, Ortiz JA, Ledda S, Martinez EA, Soler AJ, Roca J, Fernández Santos MR, Vázquez JM, Parrilla I, Garde JJ. 2018. Influence of insemination time on the fertility of sex sorted frozen-thawed Y-sperm in red deer. *Theriogenology* **113**: 171-175.
- Anzar M, Kroetsch T, Buhr MM. 2009. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *Journal of Andrology* **30**: 661-668. DOI: 10.2164 / jandrol.108.007500
- Bajuk BP, Pihlar T, Pogačnik N, Klinc P. 2018. Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk. *Animal reproduction science* **198**: 65-73. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.001
- Balaro MFA, de Mello SGV, da Silva Santos A, Cavalcanti LM, Almosny NRP, Fonseca JF, Brandão FZ. 2019. Reproductive seasonality in Saanen goats kept under tropical conditions. *Tropical animal health and production* **51**: 345-353. DOI: 10.1007/s11250-018-1696-2
- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of reproduction* **63**: 1531-1537. DOI: 10.1095/biolreprod63.5.1531
- Batista M, Nino T, Alamo D, Castro N, Santana M, Gonzalez F, Cabrera F, Gracia A. 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* **71**: 1307-1315. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.024
- Beránková J. 2007. Možnosti využití inseminace koz v ČR [Diplomová práce]. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, de Murga MN, Soler C. 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* **30**: 810-819.
- Brito LF, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love C, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**: 1507-1527.
- Calderón-Leyva G, Meza-Herrera CA, Rodríguez-Martínez R, Angel-García O, Rivas-Muñoz R, Delgado-Bermejo JV, Véliz-Deras FG. 2018. Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of

- anovulatory ewes. *Theriogenology* **106**: 79-86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.016
- Carneiro RP, Macedo GG, DeRossi R, Costa-e-Silva EV, Souza MIL. 2019. Welfare and pregnancy rate of ewes undergoing transcervical artificial insemination with ketamine subarachnoid anesthesia. *Tropical animal health and production* **51**: 1179-1186. DOI: 10.1007/s11250-019-01805-5
- Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology* **103**: 30-35. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.021
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Production In Domestic Animals* **38**: 305-311. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **74**: 424-435.
- Correia LFL, Espírito-Santo CG, Braga RF, Carvalho-de-Paula CJ, da Silva AA, Brandão FZ, Freitas VJ, Ungerfend R, Souza-Fabjan JM. 2021. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology* **98**: 194-200.
- Corteel JM, Mauleon P, Thimonier J, Ortavant R, Bussiere J, Lajous A, De Montigny G. 1967. ESSAIS D'OBTENTION DE GESTATIONS SYNCHRONES AVANT LE DÉBUT DE LA SAISON SEXUELLE DE LA CHÈVRE A L'AIDE DE 17 α ACÉTOXY, 9 α FLUORO, 11 β HYDROXY-PREGN 4 ÈNE 3, 20 DIONE ADMINISTRÉ PAR LA VOIE VAGINALE. In *Annales de Zootechnie* **16**: 343-350. DOI: 10.1051 / animres: 19670404.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal reproduction science* **130**: 187-192. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.014
- Cueto MI, Bruno-Galarraga MM, Fernandez J, Fierro S, Gibbons AE. 2020. Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Animal Reproduction Science* **221**: 106597. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106597
- Čunát L, Hegedušová Z, Vejnar J, Štolc L, Louda F, Vejčík A. 2013. Využití inseminace ovcí v chovatelské praxi. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal reproduction science* **161**: 75-81. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.006
- Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Hernández HF, Duarte G, Vielma J, Poindron P, Chemineau P, Malpoux B. 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *Journal of animal science* **80**: 2780-2786.
- Delgadillo JA, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Véliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernandez H, Malpoux B. 2004. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the

- subtropics. *Reproduction, Fertility and Development* **16**: 471-478. DOI: 10.1071/RD04030
- Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* **68**: 168-177. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.048
- Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal reproduction science* **112**: 150-157. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.005
- Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G. 1994. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* **36**: 211-225. DOI: 10.1016/0378-4320(94)90069-8
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. Butterworths, Sydney, Australia. ISBN: 0409491772
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. Frozen storage of semen. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Butterworths, Wellington, 122-141.
- Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica* **60**: 115-129. DOI: 10.1556/AVet.2012.010
- Ferreira-Silva JC, Chaves MS, Tenório Filho F, Mour MT, Neto LF, Caldas ELC, Oliveira MAL. 2016. Reproductive efficiency of non-cycling postpartum ewes submitted to the male effect under tropical semi humid conditions. *Livestock Res. Rural. Dev.* **28**: 171.
- Ferreira-Silva JC, Basto SRL, Tenório Filho F, Moura MT, Silva Filho ML, Oliveira MAL. 2017. Reproductive performance of postpartum ewes treated with insulin or progesterone hormones in association with ram effect. *Reproduction in Domestic Animals*, **52**: 610-616. DOI: 10.1111/rda.12956
- Filipčík R, Pešan V. 2019. *Intenzifikační metody reprodukce u ovcí*. Mendelova univerzita, Brno. Available from <https://www.ctpz.cz/vyzkum/intenzifikacni-metody-reprodukce-u-ovci-911> (accessed Duben 2021).
- Fonseca JF, Souza-Fabjan JM, Oliveira MEF, Cruz RC, Esteves LV, de Paiva MPSM, Mancio AB. 2017. Evaluation of cervical mucus and reproductive efficiency of seasonally anovular dairy goats after short-term progestagen-based estrous induction protocols with different gonadotropins. *Reproductive biology* **17**: 363-369. DOI: 10.1016/j.repbio.2017.10.002
- Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. 2019. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction* **34**: 1173-1185. DOI: 10.1093/humrep/dez056
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of andrology* **15**: 620-629.

- Garner D L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* **65(5)**:943-957.
- Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. 2017. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* **87**: 284-289. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.004
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, López-Sebastian A. 2012. Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **15**: 47-70.
- Heidari AH, Zamiri MJ, Nazem MN, Shirazi MRJ, Akhlaghi A, Pirsaraei ZA. 2021. Detrimental effects of long-term exposure to heavy metals on histology, size and trace elements of testes and sperm parameters in Kermani Sheep. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **207**: 111563.
- Chemineau P, Malpoux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, Brice G. 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *Productions animales* **9**: 45-60.
- Chemineau P, Malpoux B, Brillard J, Fostier A. 2007. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal* **1**: 419-432. DOI: 10.1017/S1751731107691873
- Iannuzzi A, Parma P, Iannuzzi L. 2021. Chromosome Abnormalities and Fertility in Domestic Bovids: A Review. *Animals* **11**: 802 DOI: 10.3390/ani11030802
- Inanc ME, Gungor S, Ozturk C, Korkmaz F, Bastan I, Cil B. 2019. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinárni medicína* **64**: 118-124.
- Jiménez-Rabadán P, García-Álvarez O, Vidal A, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Ramón M, del Olmo E, Fernández-Santos R, Garde JJ, Soler AJ. 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology* **71**: 85-90. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.05.004
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal reproduction science* **167**: 103-108. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.013
- Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of andrology* **33**: 536-551. DOI: 10.2164/jandrol.110.012583
- Kennedy D. 2008. Out-of-Season Breeding Alternatives for Sheep. Queen's printer for ontario. Available from <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/08-065.htm> (accessed Duben 2021).
- Kenyon PR, Morel PCH, Morris ST. 2004. The effect of individual liveweight and condition scores of ewes at mating on reproductive and scanning performance. *New Zealand Veterinary Journal* **52**: 230-235. DOI: 10.1080/00480169.2004.36433

- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzz, RJ. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* **64**: 1225-1235. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.017.
- Kleemann DO, Walker SK. 2005. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology* **63**: 2416-2433. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.052
- Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* **67**: 124-131. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.001
- Kos V, Andrlíková M, Ledabylová A, Marková B, Koudelová A, Novotný R, Vránová L, Čech S. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Kuchtík J. 2015. Plemenitba ovcí. Brno. Available from <http://www.chovzvirat.cz/clanek/727-plemenitba-ovci/> (accessed Duben 2021).
- Kulovaná E, Bařina V. 2002. Reprodukce ovcí. Profi Press, Praha. Available from <https://www.naschov.cz/reprodukce-ovci/> (accessed Duben 2021).
- Kulovaná E, Louda F, Jeřková A. 2002. Biotechnické metody v reprodukci ovcí a koz. Profi Press, Praha. Available from <https://www.naschov.cz/biotechnicke-metody-v-reprodukci-ovci-a-koz/> (accessed Duben 2021).
- Kulovaná E, Louda F, Stádník L, Jeřková A. 2002. Inseminace – nositelka šlechtitelského pokroku v chovu hospodářských zvířat. Profi Press, Praha. Available from <https://www.naschov.cz/inseminace-nositelka-slechtitelskeho-pokroku-v-chovu-hospodarskych-zvirat/> (accessed Duben 2021).
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science* **62**: 113-141. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00156-1
- Liu G, Pan B, Li S, Ren J, Wang B, Wang C, Su X, Dai Y. 2020. Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. *Cryobiology* **97**: 153-158.
- Louda F, Hegedušová Z. 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktory šlechtitelské práce. Agrovýzkum Rapotín s.r.o. ISBN 978-80-871 44-12
- Lurette A, Freret S, Chanvallon A, Experton C, Frappat B, Gatien J, Dartois S, Martineau C, Le Danvic C, Ribaud D, Fatet A, Pellicer-Rubio M. 2016. La gestion de la reproduction en élevages ovins et caprins, conventionnels et biologiques: état des lieux, intérêt et acceptabilité de nouveaux outils dans six bassins de production en France. *INRA Productions Animales* **29**: 163-184.
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. 2019. Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants. *Biopreservation and biobanking* **17**: 171-182. DOI: 10.1089/bio.2018.0113
- Macías A, Martín E, Laviña A, Ferrer LM, Lidón I, Rebollar R, Tejedor MT. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow

- device. *Animal Reproduction Science* **221**: 106551. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106551
- Malpaux B, Maurice-Mandon F, Daveau A, Chemineau, P. 1995. Utilisation de la lumière et de la mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. *Renc. Rech. Rum* **2**: 379-386.
- Maxwell WM, Stojanov T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development* **8**: 1013-1020.
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* **82**: 79-95.
- McCappin N, Murray RD. 2011. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. *Veterinary Record* **168**: 99-99.
- Mekuriaw Z. (2014). Conventional method of oestrus synchronization in sheep.
- Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *American journal of veterinary research* **46**: 473-475.
- Meza-Herrera CA, Cano-Villegas O, Flores-Hernandez A, Veliz-Deras FG, Calderon-Leyva G, Guillen-Muñoz JM, de la Peña CG, Rosales-Nieto CA, Macias-Cruz U, Avendaño-Reyes L. 2017. Reproductive outcomes of anestrus goats supplemented with spineless *Opuntia megacantha* Salm-Dyck protein-enriched cladodes and exposed to the male effect. *Tropical animal health and production* **49**: 1511-1516. DOI: 10.1007/s11250-017-1356-y
- Mocé E, Lozano-Palazón SA, del Mar Martínez-Granell M, Mocé ML, Gómez EA. 2020. Effect of the Refrigeration System on In Vitro Quality and In Vivo Fertility of Goat Buck Sperm. *Animals* **10**: 2399. DOI: 10.3390/ani10122399
- Monreal ACD, Carneiro LOHB, dos Santos Redondo MV. 2009. Efeito macho associado ao emprego de progesterona intravaginal em ovelhas, sob latitude 20° 52'sul. *Agrarian* **2**: 143-152.
- Moraes CR, Runcan EE, Blawut B, Coutinho da Silva MA. 2019. The use of iSperm technology for on-farm measurement of equine sperm motility and concentration. *Translational Animal Science* **3**: 1513-1520.
- Netto MM, Balara MFA, Cosentino IO, do Espírito Santo CG, de Oliveira RV, Souza-Fabjan JMG, Brandao FZ, Fonseca JF. 2020. Use of two cloprostenol administrations 11.5 days apart efficiently synchronizes oestrus in photostimulated multiparous dairy goats in the non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals* **55**: 965-973. DOI: 10.1111/rda.13736
- Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L. 2017. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific reports* **7**: 1096. DOI: 10.1038/s41598-017-00583-0
- Padilha-Nakaghi LC, Uscategui RA, Oliveira MEF, Nociti RP, Macente BI, Coutinho LN, Nakaghi EY, Motta GA, Santos VJ, Maciel GS, Mariano RS, Barros FF, Primo FL, Tedesco AC,

- Vicente WR. 2020. Local α 1-adrenergic blockers: An alternative for sheep cervix dilation?. *Animal Reproduction Science* **222**: 106609.
- Pellicer-Rubio MT, Boissard K, Grizelj J, Vince S, Fréret S, Fatet A, López-Sebastián A. 2019. Vers une maîtrise de la reproduction sans hormones chez les petits ruminants. *INRA Productions Animales* **32**: 51-66. DOI: 10.20870/productions-animales.2019.32.1.2436
- Pool KR, Rickard JP, de Graaf SP. 2020. Global Methylation and Protamine Deficiency in Ram Spermatozoa Correlate with Sperm Production and Quality but Are Not Influenced by Melatonin or Season. *Animals* **10**: 2302. DOI: 10.3390/ani10122302
- Ptáček M, Stádníková M, Savvulidi F, Stádník L. 2019. Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: Preliminary results. *Scientia agriculturae bohemica* **50**: 96-103.
- Purdy PH, Graham JK. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* **48**: 36-45.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* **63**: 215-225. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.02.015
- Purdy PH. 2006. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* **93**: 114-123.
- Qin Y, Yang S, Xu J, Xia C, Li X, An L, Tian J. 2018. Deep insemination with sex-sorted Cashmere goat sperm processed in the presence of antioxidants. *Reproduction in Domestic Animals* **53**: 11-19.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal reproduction science* **38**: 1-36. DOI: 10.1016/0378-4320(94)01328-J
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* **62**: 77-111. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X
- Salamon S, Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2004. Fertility of ram semen after 35 years of frozen storage. In *Proceedings of the International Congress of Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil*.
- Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* **71**: 1253-1260. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.019
- Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. 2015. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science* **182**: 125-128. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.11.005
- Sathe SR. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants – A Procedure Review. *Frontiers in veterinary science* **5**:266. DOI: 10.3389/fvets.2018.00266

- Savvulidi FG, Ptacek M, Malkova A, Beranek J, Stadnik L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science* **66**: 55-64.
- Shelton M. 1960. Influence of the presence of a male goat on the initiation of estrous cycling and ovulation of Angora does. *Journal of Animal Science* **19**: 368-375.
- Schoenian S. Sheep 201. 2019. Reproduktion in the ewe. Available from <http://www.sheep101.info/201/ewerepro.html> (accessed Duben 2021).
- SCHOK z.s. Svaz chovatelů ovcí a koz. Tábor. Available from <https://www.schok.cz/> (accessed Duben 2021).
- Smirnov IV, Postavnaja VI. 1960. The preservation of bull semen at temperatures above zero. *Teaduslike Toode Kogumik Eesti Loomakasvatuse Vet, Teadusliku Uurimise Inst.* **4**: 195-204.
- Štolc L, Nohejlová L, Štolcová J. 2007. *Základy chovu ovcí*, 3. vydání. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. 78 s.
- Tenório Filho F, Ferreira-Silva JC, Nascimento PS, de Freitas Neto LM, Moura MT, Irmão JMA, Oliveira MAL. 2016. Ação do efeito macho sobre a eficiência reprodutiva de ovelhas nulíparas das raças Santa Inês e Morada Nova criadas em diferentes regiões. *Acta Scientiae Veterinariae* **44**: 1353
- Turner RM. 2003. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?. *Journal of andrology* **24**: 790-803.
- Ungerfeld R, Abril-Sánchez S, Toledano-Díaz A, Beracochea F, Castaño C, Giriboni J, Santiago-Moreno J. 2016. Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Animal reproduction science* **173**: 13-17. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.002
- Ungerfeld R, Viera MN, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Casuriaga D, Silveira P. 2021. Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Animal Reproduction Science* **226**: 106719. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106719
- van der Horst G. 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal reproduction science* **220**: 106350. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106350
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature biotechnology* **16**: 639-641. DOI: 10.1038/nbt0798-639
- Weberová G. 2017. *Aspekty spermatologického vyšetření čerstvého ejakulátu beranů*. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně
- Yoshida M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* **60**: 349-355.
- Youngquist RS, Threlfall WR. 2006. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

- Zhu W, Cheng X, Ren C, Chen J, Zhang Y, Chen Y, Jia X, Wang S, Sun Z, Zhang R, Zhang Z. 2020. Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PloS one* **15** (e0228656) DOI: 10.1371/journal.pone.0228656
- Zhu W, Zhang Y, Ren CH, Cheng X, Chen JH, Ge ZY, Zun ZP, Zhuo X, Sun FF, Chen YI, Jia XJ, Zhang Z. 2020. Identification of proteomic markers for ram spermatozoa motility using a tandem mass tag (TMT) approach. *Journal of proteomics* **210**: 103438.
- ZOOTECHNIKA.CZ. 2009. Inseminace koz a ovcí. Available from <https://www.zootechnika.cz/clanky/chov-koz/reprodukce-koz/inseminace-koz-a-ovci.html> (accessed Duben 2021).