

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. Lenka Sobotková

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Chovu a šlechtění zvířat



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



Hodnocení přežitelnosti spermií ovčáckých plemen psů
Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Martin Hošek, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Lenka Sobotková

Brno 2016



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce: Bc. Lenka Sobotková

Studijní program: Zootechnika

Obor: Zootechnika

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

Název práce: **Hodnocení přežitelnosti spermií ovčáckých plemen psů**

Zásady pro vypracování:

1. Studentka se ve své DP zaměří na hodnocení kvality ejakulátu psů ze skupiny I. dle členění FCI
2. V práci se vedle stručného shrnutí základních metod hodnocení kvality ejakulátu zaměří na metody speciálního vyšetření ejakulátu, se zvláštním zřetelem na testy přežitelnosti spermií.
3. Studentka vyhodnotí přežitelnost psích spermií pro potřeby inseminace čerstvým semenem za použití různých druhů ředidel.
4. Studentka se bude aktivně účastnit získávání a vyhodnocování dat potřebných pro úspěšné vypracování DP.

Rozsah práce: 50-60 stran textu a přílohy

Literatura:

1. DOSTÁL, J. Genetika a šlechtění plemen psů. České Budějovice: Dona, 2007. 261 s. ISBN 978-80-7322-104-1.
2. DOSTÁL, J. Chov psů: Genetika v kynologické praxi. České Budějovice: DONA, 1995. 206 s. ISBN 80-85463-58-X.
3. SCHILLO, K K. Reproductive physiology of mammals : from farm to field and beyond. Clifton Park: Delmar/Cengage Learning, 2009. 462 s. ISBN 978-1-4180-3013-1.
4. Kliment, J. Reprodukcia hospodárskych zvierat, 1983, 396s.
5. Louda, F. Inseminace hospodárskych zvířat se základy biotechnických metod. ČZU Praha, 2001, 224s. ISBN 80-213-0702-1
6. Louda, F. Reprodukce hospodárskych zvířat, návody do cvičení, 1984, 270s.

Datum zadání: říjen 2014

Datum odevzdání: duben 2016

Bc. Lenka Sobotková

Autorka práce

Ing. Martin Hošek, Ph.D

Vedoucí práce .

prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.

Vedoucí ústavu
.

doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D

Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Hodnocení přežitelnosti spermií ovčáckých plemen psů vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Své rodině, jmenovitě mamince Marii Sobotkové a sestře Ivě Sobotkové za podporu a asistenci při získávání dat ke zpracování mé diplomové práce. Děkuji vedení policie Krajského Ředitelství Policie Jihomoravského kraje za možnost odběru určených služebních psů. Dále děkuji nrap. Bc. Ivanu Tomšíkovi ze skupiny speciálních kynologických činností, PČR JMK za poskytnutí svých služebních psů k výzkumu a zázemí pro zpracování vzorků v terénu. Děkuji Lence Brzobohaté za poskytnutí psů jak ze své chovatelské stanice, tak i psů ze záchranné stanice Tawy podporované nadací Tlapka a pomoc při odběru problematičtějších psů.

Děkuji Ing. Martinu Hoškovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady a připomínky během jejího zpracování, doc. Ing. Radkovi Filipčíkovi, Ph.D. za pomoc s matematicko – statistickým zpracováním výsledků a Ing. Marii Vágenknechtové, Ph.D. za cenné rady ohledně metodiky výzkumu. Děkuji Bc. Stanislavu Navrátilovi za pomoc při překladech odborné cizojazyčné literatury do českého jazyka a abstraktu do anglického jazyka.

Abstrakt

Tématem této diplomové práce bylo „Hodnocení přežitelnosti spermií ovčáckých plemen psů, kdy jsme se zaměřili na hodnocení kvality ejakulátu psů ze skupiny I. dle členění FCI. V práci byly vedle stručného shrnutí základních metod hodnocení kvality ejakulátu také zmíněny metody speciálního vyšetření ejakulátu, se zvláštním zřetelem na testy přežitelnosti spermií pro potřeby inseminace čerstvým semenem za použití různých druhů ředidel. Pro účely našeho výzkumu bylo vybráno 7 psů, 5 psů plemene československý vlčák jednoho majitele a 2 psi plemene německý ovčák druhého majitele pro co největší eliminaci podílu vlivu různých podmínek chovatelského prostředí na výsledky přežitelnosti spermií v použitých ředidlech u jednotlivých psů. Tito psi byli odebíráni metodou masturbace v „domácích podmínkách“. Jako ředidla jsme použili UHT mléko, sušené mléko, Androhep, Androstar, hřebčí ředidlo a destilovanou vodu. Pro vyhodnocení výzkumu jsme použili standardní matematicko-statistické metody.

Klíčová slova: pes, německý ovčák, československý vlčák, asistovaná reprodukce psů, psí ejakulát, inseminace psů, odběr psů, testy přežitelnosti spermií, krátkodobá konzervace psího ejakulátu

Abstract

Topic of this work was evaluation of spermatozoa of shepherd dog breeds, where we took a closer look on evaluation of dog ejaculate quality from FCI I. group. In this work the basic methods of ejaculate evaluation were mentioned as well as special evaluation methods, with focus on durability tests for needs of fresh semen insemination with use of special solutions. For our purposes were chosen 7 dogs, 5 of them were Czechoslovakian shepherd of one owner and 2 dogs were German shepherd breed of the second owner. For the best elimination of environmental influences on results these dogs were masturbated in „home environment“. As solutions we used UHT milk, dry milk, Androhep, Androstar, stallion solution and distilled water. We used standard mathematical-statistic methods for data evaluation.

Key words: Dog, German shepherd, Czechoslovakian shepherd, assisted reproduction of dogs, spermatozoa concentration, insemination dogs, collection dogs, sperm survival test, short-term preservation of canine semen

OBSAH

Obsah	6
1. Úvod.....	8
2. Cíl práce	9
3. Literární přehled.....	10
3.1. Charakteristika skupiny FCI 1 – plemena ovčácká, pastevecká	10
a honácká (s výjimkou švýcarských salašnických psů)	10
3.1.1. Společné vlastnosti	10
3.1.2. Rozdíly mezi plemeny pasteveckými, ovčáckými a honáckými	10
3.2. Anatomie a fyziologie reprodukční soustavy psů	12
3.3. Reprodukční aktivita psů.....	13
3.4. Asistovaná reprodukce u psů	14
3.4.1. Semenné banky	15
3.4.2. Legislativní ošetření.....	16
3.4.3. Výhody inseminace.....	16
3.4.4. Příprava k inseminaci chlazeným spermatem.....	17
3.4.5. Příprava k inseminaci mraženým spermatem	17
3.4.6. Metody inseminace	17
3.5. Přirozená plemenitba.....	20
3.5.1. Přirozená plemenitba psů.....	20
3.5.2. Přirozená plemenitba prasat.....	20
3.5.3. Přirozená plemenitba koní	20
3.6. Hodnocení spermatu.....	21
3.6.1. Ejakulát	21

3.7.	Hodnocení ejakulátu.....	30
3.7.1.	Metody vyšetření ejakulátu.....	30
3.8.	Konzervace semene.....	35
3.8.1.	Krátkodobá konzervace	35
3.8.2.	Dlouhodobá konzervace	36
4.	Materiál a metodika.....	37
4.1.	Odebírání psi	37
4.1.1.	Odběr psů.....	37
4.1.2.	Metoda odběru	37
4.1.3.	Četnost odběrů	37
4.1.4.	Místa odběru	38
4.2.	Vyšetření ejakulátu.....	38
5.	Výsledky a diskuse.....	39
5.1.	Porovnání jednotlivých použitých ředidel s dobou odběru a délkou přežitelnosti spermií v jednotlivých pozorováních hodiny po odběru.....	39
5.2.	Zhodnocení použitých ředidel v době odběru a délkou přežitelnosti spermií u jednotlivých plemen psů	40
5.3.	Zhodnocení aktivity spermií v různých časech po odběru s délkou přežitelnosti spermií u jednotlivých plemen psů v jednotlivých ředidlech	41
6.	Závěr	43
7.	Přehled literárních zdrojů.....	45
8.	Přílohy	49
	Seznam příloh	49

1. ÚVOD

Psi jsou pro lidi, kteří se ve společnosti označují jako kynologové, nedílnou součástí jejich životů. Pes je ten, který vždy naslouchá tomu, co má pán na srdci. Psi milují pánovu společnost a dělají, co mu na očích vidí. Jsou smutní, když je pán opouští a vždy se velmi radují, když se vrátí domů a je jedno, jestli o samotě strávili deset minut nebo deset hodin, přestože převážnou část doby prospí. Psi sdílejí s člověkem všechny radosti i starosti a mají v jeho smečce svou nezastupitelnou roli. Umějí vyvolat úsměv na tváři svými „psími kusy“. Při hlazení psů se nám zlepší nálada. V historii dokonce některé šlechtičny využívaly vyzařující teplo a energii svého malého psa, který jim ležel v klíně, pro zmírnění bolesti v podbřišku. Při procházkách a na psích akcích poznáváme nová místa a nové lidi. Psy potkáváme v různých službách nebo sportech. Také jsou někteří chováni z čistě společenských důvodů. Jedno z důležitých uplatnění pro společnost je speciální výcvik. Tímto způsobem získáváme z vhodných plemen psy služební, jako jsou obranáři, stopaři, záchranářští, tažní psi či lovečtí. Mimo tuto složku můžeme zařadit psy canisterapeutické, asistenční a vodící.

Člověk řídí reprodukci psů již řadu let. Chovatelé psů udržují na naší zemi rozmanitá plemena - čistokrevné psy s průkazem původu. Chov psů představuje spoustu práce a starostí. Je finančně i časově náročný, a pokud jsou chovatelé zodpovědní a chovají s rozvahou, rozhodně to není zisková záležitost. Nejdůležitější pro chov je produkce a reprodukce nejkvalitnějších jedinců. Kvalitní plemenici i plemenice musí odpovídat exteriérově i povahově, dostávat kvalitní péči i výživu. Plemenici musí produkovat kvalitní ejakulát.

Aby byla zajištěna produkce kvalitního ejakulátu, je potřeba pravidelně kontrolovat reprodukční schopnosti chovného psa. Jako přirozená kontrola může být bráno zabřezávání fen. Další možností vyšetření jsou laboratorní metody. K nim jsou potřeba pomůcky pro odběr ejakulátu, mikroskop se speciálními doplňky, speciální barviva a ředidla pro udržení co nejdelší přežitelnosti spermií. Vhodné je dělat toto vyšetření před uchováním ve spermabance a poté v případě potřeby. Reprodukce psa je podobná reprodukci kance i hřebce. Všechny tyto živočišné druhy mají podobnou přirozenou plemenitbu i metodiku odběru ejakulátu.

2. CÍL PRÁCE

Naše práce je zaměřena na hodnocení kvality ejakulátu psů ze skupiny I. dle členění FCI. Jsou v ní stručně popsány metody odběru ejakulátu, a to jak u psů, tak u hřebce a kance. Z literárních podkladů vyplynulo, že se metody odběru vzájemně podobají, a proto bylo použito několik ředidel vyrobených pro tyto živočišné druhy. V teoretické části jsou stručně shrnuty základní metody hodnocení kvality ejakulátu se zaměřením na metody speciálního vyšetření ejakulátu. Zvláštní zřetel je dán na testy přežitelnosti psích spermií pro potřeby inseminace čerstvým semenem za použití různých druhů ředidel. Také jsou zde popsány metody inseminace psů. Pro praktickou část byl nezbytný aktivní zisk ejakulátu, který musel pocházet od psů v co nejpodobnějších chovatelských podmínkách. Tento ejakulát byl odebrán a po jeho makroskopickém posouzení byla změřena jeho počáteční aktivita. Následně byl rozdělen do zkumavek s ředidly a uložen do lednice. Aktivita (přežitelnost) spermií byla pravidelně kontrolována. Získané výsledky byly vyhodnoceny matematicko-statistickými metodami.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Charakteristika skupiny FCI 1 – plemena ovčácká, pastevecká a honácká (s výjimkou švýcarských salašnických psů)

3.1.1. Společné vlastnosti

Předkové všech plemen zařazených v této skupině ještě před staletími doprovázeli pastevce skotu a ovcí. Většina těchto plemen byla později cvičena k dovednostem práce se stádem, k hlídání a ochraně stád před nebezpečím, popřípadě k oběma těmto úkolům současně (<http://www.cz-pes.cz/>). Ovčáčtí, pastevečtí a honáčtí psi mají několik vlastností, které tato plemena spojují, jako je například hluboký vztah ke zvířatům, která se shlukují do stáda. Hlídnají, aby stádo zůstávalo pohromadě, aby se pohybovalo určeným směrem, nebo členy stáda někdo jiný nelovil. Lovecký pud mají většinou potlačený v jeho konečné fázi. U některých plemen je potlačený méně, u jiných více. Psi mohou uplatnit svůj lovecký pud například při chytání potkanů a koček, případně při vyhledávání zatoulaných kusů. Nedovolí si však ublížit zvířeti ze stáda, které mají „na starosti“. Další společnou vlastností psů těchto plemen je, že při manipulaci s velkými stády zvířat nebo při jejich hlídání raději pracují ve smečce. (Loučka, 2008). Díky šlechtění mají příslušníci ovčáckých a pasteveckých plemen ideální soubor vlastností využitelných při výcviku služebních psů rozličného zaměření. V současnosti jsou právě psi z této skupiny plemen nejvíce využíváni v rámci ozbrojených sborů (<http://www.cz-pes.cz/>).

3.1.2. Rozdíly mezi plemeny pasteveckými, ovčáckými a honáckými

Hlavním rozdílem mezi plemeny pasteveckými, ovčáckými a honáckými je způsob práce a vztah k lidem. Ze způsobu práce, pro který byli psi v dávné minulosti využíváni, vyplývá stavba jejich těla a povaha. Ovčáčtí psi se více využívají k manipulaci se zvířaty, k jejich shánění do stáda a přihánění k ovčákovi. Pastevečtí psi slouží zejména ke hlídání a ochraně stád. Honáčtí psi se používají k nahánění či zahánění stáda. Ovčáčtí psi většinou pracují v těsném kontaktu a ve spolupráci s člověkem. Jedním okem ho stále pozorují a plní úkoly dle jeho pokynů, i když s určitým dílem samostatného myšlení. Těsným kontaktem není myšlena fyzická vzdálenost, ale duševní propojení. Ov-

čácký pes se snaží dělat to, co svému pánovi vidí na očích a bezmezně jej miluje. Pastervečtí psi pracují samostatněji. Jejich hlavním úkolem je držet stádo pohromadě a chránit ho. Svého pána miluje, ale spíše jako součást rodiny, kterou musí chránit. Jejich výcvik je složitější než u ovčáckých psů. Práce honáckých psů vyžaduje velkou samostatnost. Za stálého štěkání dohlíží honácký pes na to, aby se nějaký kus ze stáda neopozdil či neoddělil. Jakmile se tak stane, okamžitě a nekompromisně jej štípne pod hlezenní kloub zadní končetiny. Tito psi jsou nízcí, hbití a rychlí, takže se nestává, že by dobytek honáckého psa kopl. Ovčácký pes je většinou středního růstu. Je pohyblivý, snadno ovladatelný a většinou velmi inteligentní. Jeho barva je kontrastní od ovcí. Ocas mívají při práci svěšený, jen jeho bílý konec (pokud jej plemeno má) je mírně vztyčený. Při práci používá upřený pohled a přikrčený postoj. Společně s patrným pohybem dává najevo velké soustředění. Ovládá zvířata z velké vzdálenosti od stáda, která je i několik desítek metrů. Tuto vzdálenost instinktivně vytyčí. Ovčáčtí psi nezůstávají u stáda, ale přicházejí k němu a odcházejí od něj s ovčákem. Pastervecký pes je většinou mohutný až robustní, většinou bílého či šedého zbarvení. Má svěšené uši a dlouhou bohatou srst. Ocas má svěšený a vztyčí jej pouze při vzrušení. Pastervecký pes se může pohybovat i uvnitř stáda zvířat, aniž by je vyrušil. Se stádem bývá až 24 hodin denně. Honáčtí psi mají většinou silný a kompaktní trup, širokou hrud', krátký a silný krk. Jejich srst je tuhá a drsná. Jsou otužilí, bystří, neúnavní. Ocas mívají stočený na hřbetě. Za účelem hnaní stáda k němu vypuštění a po ukončení činnosti odchycení. Honáčtí psi bývají po skončení práce zavírání do kotečů, nebo žijí se svým pánem ve společné domácnosti (Loučka, 2008).

3.2. Anatomie a fyziologie reprodukční soustavy psů

Varlata psů jsou umístěna v šourku (skrotum). V jejich kanálcích vzniká velké množství spermií (Fogle, 2002) a samčího pohlavního hormonu testosteronu (<http://www.aces.edu/main/>). Jejich produkce začíná v období dospívání a trvá po celý život. Spermie se shromažďují v nadvarleti (na bázi varlat) a odtud putují dvěma chámovody do prostaty. Zde se mísí s transportní tekutinou, která má vysoký obsah cukrů. Ta zabezpečuje výživu a životaschopnost spermií. Prostata je umístěna kolem močové trubice. Zvětšení prostaty může ovlivnit výtok moče. Penisem probíhá kost (penisová kost), kterou prochází močová trubice. (Fogle, 2002). Bulbus Glandis se nachází na konci penisu a zduří, jakmile pes zasune penis do vagíny feny. Při zduření zajišťuje koitální svázání. Koitální svázání má za úkol udržet penis psa ve vagíně feny do chvíle, kdy pes odejakuluje. Toto svázání trvá od 5 do 60 minut (<http://www.aces.edu/main/>).

3.3. Reprodukční aktivita psů

Psi pohlavně dospívají později, než feny téhož plemene. Spermatogeneze nastupuje v 5-6. měsíci a zralé spermie lze prokázat od 9-10. měsíce stáří (Svoboda a kol., 2001).

Spermatogeneze je základní proces reprodukce samců, jejímž výsledkem jsou spermie. Probíhá v semenotvorných kanálcích varlat dospělých psů a zahrnují tři procesy: mitotická replikace spermatogonií, meióza a postmeiotická diferenciaci do spermií. Tyto procesy spermatogeneze se odrážejí ve funkční morfologii semenotvorných kanálků. V kanálcích jsou somatické Sertoliho buňky. Společně s bazální membránou tvoří semenotvorný epitel. Mají nepravidelně cylindrický tvar a velká, různě tvarovaná jádra, která jsou uložena co nejbližší bazální membrány. Zmnožují se během prenatálního a prepubertálního vývoje (Noakes, 2009).

Po narození se tyto buňky přemění ve spermatogonie typu A, které zůstávají mitoticky neaktivní až do doby před pubertou. V tomto čase se zvyšuje hladina gonadotropních hormonů, která vyvolá mitotické množení spermatogonií a jejich diferenciaci ve spermatogonie typu B (Náš chov, 2015). Ze spermatogonií se vyvíjejí spermiocyty I. řádu (Procházka, 2005), které se následně přeměňují ve spermatocyty I. řádu, které začnou růst a hromadit zásobní látky. Následně se zahájí první meiotické dělení. Při tomto procesu vznikají z každého spermatocytu I. řádu dva spermatocyty II. řádu s polovičním počtem chromozomů (Náš chov, 2015). Zároveň zde dochází ke konjugaci rodičovských chromozomů, významných pro přenášení genetické informace. Dalším vývoje-
vým stupněm jsou spermiocyty II. řádu, u nichž probíhá další dělení (do každého se dostává polovina otcovských a polovina mateřských chromozomů) (Procházka, 2005). Předposledním stadiem jsou spermatidy. Z každého chromozomu vznikají 2. Každá z nich má jen polovinu chromozomů a jeden pohlaví určující chromozom X nebo Y (Procházka, 2005). Spermatidy jsou již plně haploidní a dále se nedělí. Spermatidy prochází spermiogenezí Spermiogeneze je proces, kdy dochází ke kondenzaci jádra, vytvoření bičíku. Také dochází ke ztrátě většiny cytoplazmy a některých organel. Vytváří se i akrosomový váček, který obsahuje hydrolytické enzymy. Tyto enzymy usnadňují průnik spermie k vajíčku. Nezralé spermie jsou uvolněny do semenotvorných kanálků, odkud putují do nadvarlete, kde dozrávají. Zralé spermie jsou díky svému bičíku plně pohyblivé (<http://www.genetika-biologie.cz/gametogeneze>). Nepoužité spermie přetrváva-

jí ve varleti asi 40 dní, pak se rozpadají, vstřebávají a uvolňují místo pro nově vzniklé spermie. Proces tvorby spermií je u většiny domácích zvířat permanentní, u divoce žijících jen v období říje samic (Procházka, 2005).

Někteří psi mohou být plodní již ve věku 6. měsíců. Spermiogeneze od stadia primární spermiogonie do zralé spermie trvá 55-70 dní. Co se týče puberty, průměrný věk jejího dosažení je 9 měsíců. V pubertě nabývá pes schopnosti krytí, což znamená, že je (s dostatečným pohlavním pudem) v přítomnosti háravé feny schopen plnohodnotných pohlavních reflexů. Tyto reflexy jsou: vzeskok, imise, svázání, ejakulace. Nabytí této schopnosti je postupný proces. Mladí a pohlavně nezkušení psi mohou dočasně vykazovat abnormální intenzitu i sekvenci pohlavních reflexů. Jde o urychlenou a nadměrnou erekci zabraňující zavedení pyje do pohlavních orgánů feny. U psa se nemusí nutně dostavit maximální erekce, protože penisem prochází pyjová kost. Maximální erekce nastupuje až po ejakulaci při svázání. Projevy pohlavních reflexů, bez schopnosti tvorby semene, jsou zjevné již od 3-4. měsíce věku (vzeskok, pánevní pohyby). Realizace této aktivity v přítomnosti obzvláště vrstevníků je významná pro včasné dosažení puberty. Předčasná izolace štěněte oddaluje nástup puberty. Ve stáří 1 roku mají již psi plnohodnotný ejakulát. Kvalita ejakulátu se přirozeně snižuje od 8 - 9. roku věku. Libido sexualis přetrvává do pokročilého věku (Svoboda a kol., 2001).

3.4. Asistovaná reprodukce u psů

Psi byli vybráni jako první živočišný druh pro vyzkoušení inseminace (Dostál, 2007). Inseminace je alternativní způsob oplodnění, který se v chovech objevuje čím dál častěji, a to z důvodu ekonomického, technického, organizačního, případně zdravotního. U psů převažují zdravotní důvody (ortopedické poruchy), nezkušenost, předčasná erekce a ejakulace mladého psa, poranění nebo zánět genitálií, plachost, snížené libido (cizí prostředí, vyšší věk psa). Problém mohou představovat také feny, které se brání bolesti (převážně při prvním krytí), mají k danému psovi averzi, jsou agresivní, případně trpí abnormalitami reprodukčních orgánů, také bývá problém s různě velkými jedinci (Svoboda a kol., 2001). První asistovanou reprodukci (reprodukční biotechnologii) u psů provedl Ital Abbé Lazzaro Spallanzani v roce 1784, avšak 170 let čekala na uplatnění

také v chovu psů. První štěňata po inseminaci mrazeným semenem popsal až Seagler v roce 1969. Od této chvíle začal rychlý vývoj této metody u psů. Dnes zaznamenáváme mnoho metod od inseminace čerstvě odebraným semenem, chlazeným semenem pro krátkodobou konzervaci, až po inseminaci zmrazeným semenem pro dlouhodobou konzervaci. Počet nových poznatků v tomto oboru roste každým dnem. Biotechnologie rozmnožováním u psů nezaostala experimentálně ani in vitro dozrávání oocytů, in vitro fertilizace (oplození), přenosu embryí a klonování, i když tyto techniky jsou spíše na počátku výzkumu u psů, než využitelné pro praktické využití. Dnes jsou chovatelé z celého světa schopni využít tuto metodu k použití vynikajících psů pro své chovatelské záměry (Dostál, 2007). Inseminaci lze také provést jako prevenci přenosu nakažlivých onemocnění, především z feny na psa. Odebraný a konzervovaný ejakulát lze dopravovat na různě velké vzdálenosti, aniž by se musela transportovat fena (Svoboda a kol., 2001). Získávají semeno ze vzdálených zemí, konzervují semeno svého vynikajícího jedince po dobu i několika desítek let. V mnoha zemích právě chovatelské organizace mají pod kontrolou jak odběr a přenosnou identifikaci dávek semene, tak jejich využití (Dostál, 2007).

3.4.1. Semenné banky

Semenné banky slouží k ukládání inseminačních dávek vynikajících psů všech plemen ještě v období, kdy psi produkují nejkvalitnější ejakulát. Pokud se časem prokáže, že pes, jehož sperma bylo uloženo v semenné bance, nedal v budoucnosti vynikající potomstvo po přirozeném krytí, nebo měli jeho potomci vady vylučující z chovu, trpěli dědičnými chorobami či defekty, je jeho semeno odstraněno z banky. Semeno plemníků, kteří dali vynikající potomstvo bez dědičných chorob a defektů vyřazujících z chovu, je uchováno do chvíle, než chovatelský klub nebo majitel psa rozhodne o jeho využití (Dostál, 2007). Dále nabízí kompletní vyšetření semene psa a vystavení certifikátu o kvalitě, výrobu chlazených dávek čerstvého semene, kryokonzervaci (zmrazování) semene psa, odběr a konzervace nadvarletních spermií i po smrti zvířete a uskladnění zmrazeného semene (<http://www.frozendogs.com/>).

3.4.2. Legislativní ošetření

Chovatelský řád dává možnost nahradit přirozené krytí inseminací. Ta musí být provedena v souladu se Zákonem o veterinární péči a musí být jasně doloženo, že bylo použito sperma určeného psa. Náklady na inseminaci hradí majitel feny (Tichá, 2000). Náklady sestávají z několika položek; odběr spermatu, vyhotovení inseminační dávky (její součástí je mikroskopické vyšetření), transportní box, doprava transportního boxu (nejnákladnější a nejkomplicovanější položka), inseminace v místě určení (je důležitá výborná komunikace mezi majitelem feny a majitelem krycího psa). Kromě dopravy inseminačního boxu jsou ceny smluvní, záleží na dohodě mezi klientem a veterinárním lékařem (Svět psů, 2012). Chovatelský řád FCI požaduje, aby nemohl být k inseminaci použit pes, po kterém zatím není žádné potomstvo z přirozeného krytí (Tichá, 2000). Inseminaci může provádět pouze specializovaný veterinární lékař, který je oprávněn o tomto úkonu provádět záznam do krycího listu. Další výhodou je možnost použít semeno zahraničního chovného psa. Chovatel si však musí zajistit u příslušného chovatelského klubu podmínky, za jakých lze umělou inseminaci s importovaným semenem provádět (Procházka, 2005).

3.4.3. Výhody inseminace

Mezi výhody inseminace jistě patří makroskopické a mikroskopické vyšetření semene psa, čímž zhodnotíme jeho kvality (Svět psů, 2012). Z jednoho odběru semene lze získat více inseminačních dávek. Navíc se zmrazení inseminační dávky objevuje možnost uchovat fertilizační schopnost spermií po delší dobu. Zamrazené semeno lze skladovat neomezeně dlouho a použít i po smrti dárce. Při použití správné metody odběru ejakulátu lze získat sperma i z několika hodin mrtvého zvířete (<http://www.frozendogs.com/>). Při přirozeném krytí může nastat situace, kdy majitelé feny urazili dlouhou cestu, ale v době, kdy mělo dojít ke krytí, nebyla fena v optimální fázi hárání, a tudíž krytí neproběhlo. Pro tuto situaci je odběr krycího psa a transport jeho chlazeného ejakulátu pro inseminaci feny v místě bydliště možností s nižšími finančními náklady, než prodloužení pobytu v zahraničí. Další její výhodou je inseminace místo překrytí po 48 hodinách a tím ušetření času a financí z hlediska délky pobytu, případně cestou za psem a zpět (Svět psů, 2012). Inseminaci lze také provést jako prevenci přenosu nakažlivých one-

mocnění, především z feny na psa (Svoboda a kol., 2001). V mnoha zemích je pod kontrolou jak odběr a přenos dávek semene, tak jejich využití (Dostál, 2007).

3.4.4. Příprava k inseminaci chlazeným spermatem

1. Kontrolní odběr ejakulátu a jeho makroskopické a mikroskopické posouzení. Výsledek odběru vypovídá o postavení psa k odběru a o kvalitě ejakulátu. Provádí se asi měsíc před inseminací.
2. Ve chvíli, kdy je u feny zjištěn předpokládaný termín ovulace, dochází k odběru do sterilní nádoby. Poté se k němu přidá extendér, který prodlouží dobu životnosti spermií a dochází k postupnému zchlazování. Zchlazený ejakulát se uzavře do zkumavek a následně se označí a uloží do transportního boxu. Následuje odeslání expresní službou do místa určení. Transportní box udrží teplotu po dobu 48 hodin, pak musí být sperma bezpodmínečně uloženo v lednici.
3. U feny je hlídána hladina progesteronu. Tyto testy jsou doplněny o výtěr z pochvy pro účel určení termínu ovulace.
4. V době ovulace se zkumavky pomalu ohřívají na teplotu 37°C. Následně se zkontroluje životnost spermií a proběhne inseminace (Svět psů, 2012).

3.4.5. Příprava k inseminaci mraženým spermatem

Postup odběru je stejný jako při inseminaci chlazeným spermatem. Rozdíl je v tom, že se sperma uchovává v 0,5 ml pejetách. Pejety se uchovávají dlouhodobě v tekutém dusíku. Není možná vaginální inseminace, je nutné sperma deponovat přímo do dělohy pomocí endoskopu, případně laparoskopu a dělá se pod anestezií (Svět psů, 2012).

3.4.6. Metody inseminace

Veterinární lékaři nabízejí hned několik metod umělé inseminace. Chovatelé psů mají na výběr invazivní i neinvazivní techniky. Tyto inseminační postupy však s sebou nesou řadu nevýhod a rizik. Invazivní metody jsou příliš drahé a náročné, neinvazivní se potýkají s nízkou efektivitou. Účinností invazivních metod a jednoduchosti neinvazivních dosahují veterinární lékaři díky speciálnímu endoskopu, ale spodní hranicí této metody jsou 4-5 kilogramy živé váhy samice (<http://www.vfu.cz/>).

0.0.0.1. Neinvazivní metody

Při neinvazivních metodách inseminace do dělohy se zavádí katétr do dělohy přes pochvu. Na inseminaci do dělohy přes pochvu je možné použít speciální (skandinávský) inseminační katétr a ten zavést přes děložní krček při současné fixaci krčku přes stěnu břišní. Vlastní provedení je však obtížné především u citlivých, velkých a obézních fen a vyžaduje velkou zkušenost (<http://www.veterina-iris.cz/>). Po aplikaci inseminační dávky je nutné fenu čtvrt hodiny držet na místě s vyvýšenou zadí a poté dalších čtvrt hodiny se s ní procházet na vodítku a nedovolit jí vymočit se (<http://www.jicinvet.cz/>).

0.0.0.0.1. Do pochvy

Provedení se nejčastěji uskutečňuje tenkým plastovým katétrelem o délce 20 - 25 cm. K němu se flexibilní spojkou připojí injekční stříkačka se semenem. Semeno se deponuje co nejhlouběji do pochvy, co nejbližší k děložnímu krčku. V průběhu inseminace se zavádí do poševní předsíně 1 - 2 prsty podle velikosti feny na 10 - 20 minut a případně se dráždí klitoris. Imituje se tak svázání a stimuluje se kontrakční (nasávací) aktivita vývodných pohlavních orgánů. Po inseminaci je vhodné 10 - 15 minut fenu provádět a nenechat ji močit. Další 1 - 2 hodiny by měla být fena v klidu (<http://www.veterina-iris.cz/>).

0.0.0.0.2. Do dělohy

Při inseminaci mrazeným semenem je velmi vhodné až nutné deponovat semeno do dělohy. Vzhledem k typickému uložení a anatomickému utváření děložního krčku je deponování semene do dělohy přes krček technicky velmi náročné (přední část pochvy je velmi zúžená a v této části je na stropu pochvy podélná řasa dlouhá 1 - 2 cm, která pochvu zcela ucpává, přičemž vlastní krček je až za touto řasou. Krček ústí do pochvy šikmo shora dolů, což činí při zavádění katétru velké problémy (<http://www.veterina-iris.cz/>).

1. Srovnání úspěšnosti inseminaci do pochvy a do dělohy u feny

Druh semene	Březost (%)		Počet štěňat (ks)	
	Inseminace do pochvy	Inseminace do dělohy	Inseminace do pochvy	Inseminace do dělohy
Čerstvé	47,8	65,2	5,8 ± 2,8	6,5 ± 2,5
Chlazené	45,1	65,6	5,8 ± 3,0	6,4 ± 3,2
Mražené	34,6	52,0	4,7 ± 2,6	5,0 ± 3,2

(<http://www.veterina-iris.cz/>).

0.0.0.0.3. Pomocí speciálního endoskopu

Při této metodě se využívá speciálního endoskopu. Celý proces má veterinární lékař pod zrakovou kontrolou, takže může kontrolovat zavádění inseminačního katétru přímo do dělohy (<http://www.vfu.cz/>).

0.0.0.2. *Invazivní metody*

Tyto metody inseminace fen do dělohy jsou prováděny v celkové narkóze. Proniká se do dutiny břišní a to buď laparoskopicky nebo laparotomicky (vybavení dělohy do operační rány). Po vlastním nalezení dělohy se přes tupou jehlu deponuje semeno do děložních rohů. Nevýhodou je nutnost celkové anestézie a chirurgický zákrok, což snižuje možnost opakování (<http://www.veterina-iris.cz/>).

3.5. Přirozená plemenitba

3.5.1. Přirozená plemenitba psů

Pes dosahuje vniknutí energickým tlačáním zadku. Jakmile je dosaženo vniknutí, bulbus glandis oteče, zatímco poševní svaly feny se za ním stáhnou. Takto se vytvoří svázání.

Pes začne asi po 30 - 60 s vyměšovat první frakci ejakulátu, čirou bez spermií. Ta má objem až 5 ml. Za 50 - 90 s následuje 2. Frakce s obsahem 0,5 – 3,5 ml bílého hlenitého sekretu. V 1 ml je 125 milionů spermií (Truhlář, 2012). K zabřeznutí tedy může dojít, i když se kopulace nedostane do své 2. fáze, ale pes seskočí a zůstane spojen s fenou. Tato změna pozice způsobí, že se penis zkroutí od 180° a eferentní žíly penisu jsou tedy zaškrnceny. Penis zůstává v erekci. Funkce svázání může zabránit výtoku semene ven. Jedinci zůstávají svázání, dokud erekce neopadne (Noakes, 2009). 3. Frakce trvá 3 - 35 minut a její množství kolísá od 2 do 30 ml. Z hlediska kvality oplození je svázání žádoucím jevem, ale není podmínkou. Během něho dochází k nasávacím stahům dělohy (Truhlář, 2012).

3.5.2. Přirozená plemenitba prasat

Kopulace u prasat trvá od 5 do 15 minut. Jakmile je penis vsunut do vagíny, následuje série energických kopulačních pohybů. V této fázi kopulace probíhá první část ejakulace. Druhá část kopulace je klidnější a produkuje se v ní semenná frakce bohatá na spermie. Následuje poslední, třetí frakce, která je zakončena vytvořením hlenové zátky. Ta je nezbytná pro zabránění vytékání ejakulátu (Noakes, 2009).

3.5.3. Přirozená plemenitba koní

Vniknutí penisu do vagíny nastartuje sérii kopulačních pohybů pánví, které během minuty vyústí v ejakulaci. Během ejakulace mohou být vlny uretrální peristaltiky nahmatány na spodní části penisu. Ejakulaci doprovází typické „vlajkování“, pohyb ocasem ze strany na stranu. Poté hřebec seskočí. (Noakes, 2009).

3.6. Hodnocení spermatu

3.6.1. Ejakulát

Je sklovitě bělavá vazká tekutina. V 1 ml se nachází padesát až sto padesát milionů spermií, které jsou ředěny sekrety přídatných pohlavních žláz, semennou plazmou. Tyto sekrety oživují a transportují spermie na místo určení. Objem ejakulátu se pohybuje od 3 až do 20 ml podle velikosti psa (Procházka, 2005). Spermie se tvoří ve varlatech pleménika po dosažení pohlavní dospělosti. Vzájemný podíl spermií a semenné plazmy v ejakulátu je druhově rozdílný. Každý ejakulát představuje samostatnou biologickou jednotku s rozdílným podílem semenné plazmy a spermií, jejich aktivitou a oplozovací schopností. Ejakulát, který je určený pro účely inseminace, získáváme pouze od licencovaného pleménika. Kvalita ejakulátu používaného k inseminaci musí odpovídat požadavkům stanovených normou pro každý druh pleméniků (Louda, 2001).

Ejakulát obsahuje 100×10^6 až 5000×10^6 spermií. Množství záleží na velikosti psa. Procento abnormálních spermií by nemělo přesáhnout hodnotu 20-40% a minimální aktivita by neměla klesnout pod 70%. Kvalita ejakulátu je mezi plemeny psů variabilní. Kapacitace spermií trvá od 3 do 7h při přirozeném krytí. Doba kapacitace se mění v závislosti na použité metodě uchování. Při mražení se doba kapacitace zkracuje na 2 hodiny z původních 4hodin u čerstvého semene. Denní produkce spermatu je $12-17 \times 10^6$ spermií na gram parenchymu varlete. Velikost parenchymu varlat a množství spermií je v jasné korelaci s tělesnou hmotností (Elaine, 2012).

0.0.0.3. Odběr ejakulátu psa

U psa známe tři různé způsoby odběru semene - masturbací (masáž pyje), odběr na umělou pochvu a elektroejakulace. Odběr semene provádíme v klidném prostředí. Problém se vzrušením psa může nastat z důvodu blízkosti cizího člověka nebo špatné manipulace s pyjem. U takových psů je dobré, aby odběr semene zvládnul sám majitel psa (Svoboda a kol., 2001). Za přítomnosti (ideálně hárající) feny se semeno odebírá po vzeskoku psa nebo na psovi stojícím těsně za fenou. U psů, kteří jsou odebírání poprvé,

můžeme očekávat ztížený odběr semene. Kvalita semene se zhoršuje při nadměrné exploataci (Svoboda a kol., 2001). Při odběru používáme následující postup. Nejprve provedeme masáž penisu přes předkožku - stimulace erekce. Poté omytí penisu. Tlak prstů kolem penisu a masáží žaludu pomůžeme plné erekci a ejakulaci (<http://ksz.zf.jcu.cz/>).

0.0.0.0.4. Masturbace

Masturbace se využívá k odběru semene u malých plemen psů a u lehce vzrušivých psů (Elaine, 2012). Provádí se energickým přetahováním předkožky. Jakmile se dostaví erekce, předkožka je proximálně stažena za bulbus glandis. Kaudálně, těsně od bulbus glandis se nachází místo, které se musí tisknout prsty a stimulovat kontrakce svěrače a imitovat tím svázání (Chenoweth, 2014). Ejakulát se sbírá do široké skleněné nádoby s objemem nejméně 10 - 15 ml (např. Petriho miska) při pokojové teplotě. Není potřeba speciální ohřívání sběrače, protože spermie psa nejsou citlivé na chladový šok. Začátek ejakulace doprovázejí kopulační (pánevní) pohyby. Zde se produkuje první frakce – 0,5 – 7 ml čisté prostatické tekutiny. Následuje druhá frakce bohatá na spermie, která obvykle začíná zklidněním psa a trvá po několik (3 - 5) minut (Doležel a kol., 2001). Množství ejakulátu v této fázi se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 3 ml (Elaine, 2012). Včasné zakončení odběru na začátku třetí frakce je možné na základě průběžné adpekční kontroly odebíraného semene a zjištění přeměny hustého mléčného charakteru semene na řídký, vodnatý. Proto sběrače by měly být průhledné (Doležel a kol., 2001). Poslední frakce opět obsahuje prostatickou tekutinu a její množství u velkých plemen dosahuje hodnot 30 - 40ml (Elaine, 2012). Po odběru penis ochabne a předkožka jej opět obtáhne po celé délce. Pokud se tak nestane hned po odběru, je potřeba odvést psa z místa odběru, zchladit penis ručníkem namočeným ve studené vodě, případně rozptýlit psa žrádlem či pamlsky (Chenoweth, 2014).

0.0.0.0.5. Odběr na umělou pochvu

Umělá pochva se především používá k odběru semene psů středních a velkých plemen. V našich podmínkách je to dvoustěnná gumová trubice o průměru kolem 8 - 10 cm a délce 15 - 20 cm, ke které se na konci připevňuje skleněný sběrač nebo sáček z umělé hmoty s objemem alespoň 10 - 15 ml. Vnitřní stěnu umělé pochvy před použitím ohře-

jeme na teplotu 40 - 42 °C prostřednictvím teplé vody, která se napustí mezi stěny umělé pochvy. Vnitřní stěnu v přední části umělé pochvy vymažeme sterilní vazelínou. Pomocí nafukování vzduchu mezi stěny lze upravit průměr umělé pochvy dle potřeby psa. Umělá pochva se zavádí na pyj ve třech různých situacích: po erekci v přítomnosti hárající feny, při vzeskoku na fenu nebo po předchozí masturbaci. Po zavedení umělé pochvy je vhodné imitovat frikční pohyby až do nastoupení vlastních kopulačních pohybů psa. Odběr ukončíme při nástupu třetí semenné frakce (Doležel a kol., 2001).

4.4.6.1.6. Elektroejakulace

Elektroejakulace se u psů provádí zcela výjimečně. Funguje na principu pulzačního dráždění křížobederní oblasti přes rektum prostřednictvím elektrického proudu o napětí 5 - 10 V a 50 - 100 mA. Je nutné provádět ji v celkové anestézii (Doležel a kol., 2001). Zvířata jsou pod účinky sedativ. Tato metoda odběru ejakulátu se používá na velká a nebezpečná zvířata, která jsou sice chována, ale nemohou (z důvodu nemoci nebo úrazu) ejakulovat přirozeně. Když je příliš nebezpečné se k dotyčnému zvířeti přiblížit, padá volba právě na elektroejakulaci. Elektroejakulace se také používá u mužů, kteří utrpěli poranění míchy, nebo nemohou ejakulovat z jiných důvodů (Tree, 2014).

4.4.6.1.7. Neúspěšný odběr

Známe řadu příčin, které se podílejí na neúspěchu při odběru kvalitního vzorku ejakulátu. Mezi nejběžnější příčiny neúspěchu patří špatná technika odběru, získávání spermatu od nervózního a přecitlivělého samce a zasahování, případně nespolečné majitele v průběhu odběru. Mezi běžné chyby v technice odběru patří nedostatky v předčasném vybavení pyje z předkožky, nedostatečné přetažení předkožky až za bulbus glandis, abnormální stisk penisu, používání studených pomůcek a doteky na sliznici pyje. Těmito technickým problémům dá však většinou předejít. Dalším možným důvodem neúspěchu je odběr v neznámém prostředí zvláště, pokud odběr probíhá bez přítomnosti majitele, případně v přítomnosti agresivní feny (Doležel a kol., 2001).

4.4.6.1.8. Podmínky odběru

Odběr by se měl provádět v klidné světlé místnosti, na neklouzavé podlaze a za přítomnosti co nejmenšího počtu lidí. Někteří psi se dají odebrat pouze majitelem, jiní pouze doma a u dalších musí majitel opustit místnost (Doležel a kol., 2001).

4.4.6.4. Fáze ejakulace

Ejakulace u psů probíhá ve třech na sobě závislých a ne zcela zřetelně oddělených fázích.

1. prespermatická frakce představuje 0,2 - 3,0 ml nažloutlé tekutiny z prostaty, která se vylučuje v průběhu kopulačních pohybů psa po dobu 5 - 20 sekund. Tato frakce neobsahuje spermie nebo pouze ojediněle.
2. spermatická frakce představuje 0,5 - 12,0 ml bílé až mléčné tekutiny. K jejímu uvolňování dochází po ukončení kopulačních pohybů a po zklidnění psa, při maximálně zduřelém pyji a vylučování trvá 30 sekund - 4 minuty. Tato frakce obsahuje spermie.
3. postspermatická frakce představuje 2 -30 ml mírně zkalené tekutiny z prostaty. Vylučuje se v průběhu svázání 5 - 15 minut a tato frakce už většinou neobsahuje spermie.

U citlivých jedinců může výjimečně docházet, a to i při zachování všech pohlavních reflexů (erekce, pulzace uretry), k částečné nebo úplné retrográdní ejakulaci směrem k močovému měchýři (Doležel a kol., 2001).

4.4.6.5. Ošetření spermatu

Bezprostředně po odběru se semeno nasaje do jednorázové stříkačky a makroskopicky posoudí. Vhodné je semeno vyšetřit i orientačně mikroskopicky po odkápnutí na zahřáté podložní sklíčko. Semeno psa by mělo mít šedobílou až bílou barvu, nevýrazný nebo psí zápach, mléčnou až smetanovitou konzistenci (podle získaných frakcí) a nemělo by obsahovat žádné příměsi. Objem může být od 2 do 50 ml (Doležel a kol., 2001).

4.4.6.6. Frekvence získávání ejakulátu

Z výzkumu Doleželíka, Vágenknechtové, Hoška a Máchala (2010) bylo zjištěno, že při odběru ejakulátu každý den jsou výsledky kvality ejakulátu ve všech kvalitativních a kvantitativních ukazatelích horší než u skupiny odebírané s jednodenní přestávkou mezi odběry. Objem ejakulátu byl o 1,1 ml nižší. Sperma bylo nepatrně řidší a aktivita spermií byla o 7,7% nižší. Při opakovaném odběru spermatu od psů lze tedy doporučit odběr s jednodenní přestávkou mezi odběry. Tento postup lze doporučit i při použití plemeníka v přirozené plemenitbě. V případě nutnosti je možno získat semeno denně po 3 dny za sebou, potom má následovat nejméně 2 denní odpočinek. Je – li nutno odebírat ejakulát 2x denně, má následovat dvoudenní přestávka. Pokud pes delší dobu nekryl, dochází ke změnám spermií uložených v nadvarlatech a doporučuje se opakovaný odběr ejakulátu (<http://mujpes.cz>).

0.0.0.7. Kvalita ejakulátu

Prokázaná plodnost psa po přirozeném krytí není zárukou úspěšné konzervace semene mrazením. Existují však jedinci, jejichž spermie jsou po rozmrazení nepohyblivé. Nejsou to naštěstí časté případy. Nejvyšší kvalita spermií dává psi ve stáří přibližně 3-6 let. Jsou však také jedinci, kteří dávají kvalitní a mrazitelné semeno ve stáří 13 let. (Dostál, 2007). Z výzkumu Doleželíka, Vágenknechtové, Hoška a Máchala (2010), psi do dvou a půl let mají kvalitnější ejakulát než psi mezi třetím a pátým rokem. Psi do dvou a půl let mají průkazně lepší aktivitu spermií a to 74,6 %. Psi ve věku od 3 do 5 let mají aktivních pouze 65 % spermií v ejakulátu.

Také tělesná hmotnost psa je faktorem, který významně ovlivňuje kvalitativní a kvantitativní parametry psího ejakulátu. Tuto skutečnost potvrzují i výsledky studie Paldusové, Hoška, Filipčíka a Máchala (2013), kdy byla v případě aktivity spermií, životaschopnosti spermií, objemu ejakulátu a celkového počtu spermií pozorována statisticky vysoce průkazná závislost ($P < 0,001$). Další, statisticky významná průkaznost ($P < 0,01$), byla zjištěna v koncentraci 115 spermií a počtu morfologicky normálních spermií. Bylo také zjištěno, že nejmenší vliv ($P < 0,05$) má tělesná hmotnost na nezralé spermie a spermie s poškozeným bičkem. Na rozdíl od toho nebyla prokázána žádná závislosti ($P > 0,05$) v počtu spermií a degenerovaných spermií s poškozenými hlavičkami.

Nejvhodnější doba odběru je v přítomnosti háravé feny, kdy psi dávají semeno velmi husté, které je možné velmi dobře ředit, a které je zárukou úspěšného zmrazení. Obecně platí, že velcí psi dávají větší množství semene, které je možné naředit na větší počet inseminačních dávek. Psi malých plemen dávají menší množství semene, z něhož je vyroben menší počet inseminačních dávek (Dostál, 2007).

0.0.0.8. Odběr kance

Díky velkému rozšíření inseminace u prasat je velká část kanců trénována pro odběr semene za použití fantoma. Kanec je přiveden do odběrného kotce a je mu dovolen volný přístup k fantomovi. Na toho kanec během několika minut vzeskočí. Poté následují frikční pohyby. Pro udržení těchto pohybů je potřeba dobré neklouzavé podložky pod fantomem. Sperma se od kanců odebírá pomocí rukavice. Některé materiály jsou ovšem spermicidní, takže je třeba používat rukavice z materiálů, které na spermie nepůsobí spermicidně. Sběrač semene vstupuje do kotce se dvěma rukavicemi na ruce, kterou semeno bude odebírat. Zatímco kanec provádí své kopulační pohyby na fantomu, sběratel poklekne, rozevře ruku s rukavicí pod kance a začne masírovat umělou pochvu. Tato masáž napomůže v hygienickém odběru, protože napomáhá přehrnutí předkožky. Jakmile je penis vysunut, vnější rukavice se zahodí. Lahvička pro sběr semene se uchopí volnou rukou a ruka s rukavicí uzavře špičku penisu, uchopí a stlačí penis. Aplikací této techniky kanec plně vysune svůj penis a ustane v kopulačních pohybech. Poté započne ejakulaci frakce, která je bez spermií a neodebírá se. Poté následují na sperma bohatá a chudá frakce. Odebrány jsou obě. Gelová frakce, která pochází z bulbouretrální žlázy, je vypuzována spolu s na sperma bohatou frakcí. Tento gel má minimální cenu a je záměrně separován pomocí filtru nebo gázy přetáhnuté přes hrdlo odběrné lahvičky. Po dokončení ejakulace je penis vizuálně prohlédnut kvůli jakýmkoli abnormalitám. Čisté semeno je dopraveno do laboratoře. Je třeba se ujistit, že je chráněno od jakýchkoli chemických (voda, čisticí prostředky), teplotních (teplo, zima) a UV poškození. Přestože není normálně používána elektroejakulace, může být na kancích prováděná v případě, že výše uváděné techniky selhaly. Kanci, kteří jsou vybráni pro elektroejakulaci, musí být doprovázeni záznamy o libidu a pářící schopnosti. Zvířata jsou podrobena celkové anestezii a poté umístěna do polohy vleže na zádech. Za použití rukavice se

prozkoumá rektum a zavede se rektální sonda specifická pro kance. Penis je vysunut z předkožky za použití kleští. Jakmile je vysunut, okolo těla penisu se omotá gáza, aby se zabránilo zpětnému zasunutí do předkožky. Provede se vizuální prohlídka. Za použití elektroejakulátoru je skrz rektální sondu aplikován pulzující proud se zvyšující se rozkmitem a frekvencí až do ejakulace. Ejakulát je odebrán do sterilní předeštěté nádoby pro ochranu a transport do laboratoře kde se provede další vyšetření (Chenoweth, 2014). Odběry kanců se provádí pravidelně v cyklu pondělí-středa-pátek, distribuci inseminačních dávek zajišťují pracovníci inseminační stanice (rozvozy auty v klima boxu nebo dodání inseminačních dávek pomocí expresních zásilkových služeb...). Vzhledem k širokému plemennému zastoupení umožníme našim odběratelům vyzkoušet a najít optimální kombinaci, která bude jejich podmínkám nejlépe vyhovovat (<http://www.reprogen.cz/>).

0.0.0.9. Odběr hřebce

Při odběru semene od hřebce se běžně využívá fantom nebo klisna. Hřebci mohou být jednoduše vycvičeni, aby vzeskočili na fantoma. Výhodou hřebců, kteří jsou takto vycvičeni, je bezpečnější odběr. Fantom musí být konstruován tak, aby byl pro hřebce co nejpohodlnější. Měl by napodobovat stejné křivky, jako má klisna. Pokud je využívána klisna, měla by být ve správné fázi říje, měla by mít omotaný ocas a omytou poševní krajinu. Abychom předešli zranění hřebce nebo zaměstnanců, je dobré klisnu přivázat. Pro zhodnocení semene se používá umělá vagína. Na trhu je několik modelů (Colorado, Missouri a Japonský). Výběr umělé vagíny záleží hlavně na vedení a preferenci hřebce. Pro přípravu umělé vagíny ji naplníme vodou, abychom dosáhli správné teploty a tlaku. Teplota vody se běžně pohybuje 45-48°C. Měla by být ovšem řízena tak, aby byl odběr hřebce ideální dle jeho preferencí. Je nutné se vyhnout vyšším teplotám, abychom předešli poškození penisu a spermií. Některé modely používají pro dosažení správného tlaku kombinaci vody a vzduchu. Umělou vagínu lubrikujeme těsně před použitím nespemicidním a sterilním lubrikantem. Je nutné použít dostatek lubrikantu kvůli penetraci. Kvůli rozdílnosti hřebců se liší teplota vody, tlak a kluzkost, takže je důležité připravit umělou vagínu dle preferencí hřebce pro správný odběr. Odběrnou nádobku je nutné udržovat teplou pro zabránění poškození spermií. Před odběrem by měl být hřebec proveden kolem klisny. Po stimulaci se omyje penis hřebce čistou teplou vodou.

Nesmí se používat mýdlo nebo desinfekční prostředky. Místo odběru musí být dost velké, aby se předešlo zranění všech přítomných. Jakmile penis hřebce dosáhne plné erekce, nechá se vzeskočit na fantoma nebo klisnu. Penis hřebce by měl být navlečen na umělou vagínu, neměl by se chytat, protože to někteří hřebci nesnáší. Umělou vagínu je třeba držet pevně, aby mohl hřebec kopulovat a pod stejným úhlem, jako je vagina klisny. Při ejakulaci je třeba dát vagínu níže, aby sperma steklo do nádoby. Ejakulaci lze poznat dle vlnivého pohybu ocasu nebo pulzaci penisu. Po dokončení je třeba odsát vodu, aby zbylé semeno steklo do nádoby. Poté je semeno uloženo do inkubátoru, dokud není zhodnoceno (<http://articles.extension.org/>).

Spermicidní lubrikanty a spermicidní látky jako voda a světlo nepřicházejí do kontaktu s ejakulátem. Jakékoli vybavení nebo materiály, které přichází do kontaktu s ejakulátem je zahřáto na teplotu kolem 38°C. Po odběru se semeno dává do inkubátoru, kde je 38°C. Inseminace by měla následovat do hodiny, nebo co nejrychleji, protože čím déle je semeno skladováno, tím nižší je oplození schopnost. Nedávné změny v několika plemenných knihách některých plemen dovolily vyšší používání chlazeného a mraženého spermatu. Chlazené nebo mražené semeno dovoluje delší oplození schopnost. Díky tomu, že může být semeno dodáno ke klisnám, se snižují náklady a stres na přepravu klisen a hříbat. Čerstvě odebrané semeno může být zchlazeno na 40°F, přepravováno v kontejnerech, které jsou navrženy taky, aby udržely nízkou teplotu a inseminaci provádět do 24-48h po odběru. Úspěch použití zchlazeného semene záleží na tom, jak dobře reagují spermie jednotlivých hřebců na chlad, na synchronizaci říje klisny a čas inseminace a jak dobře je semeno odebráno a je s ním nakládáno při transportu. Přestože zmražené sperma se běžně užívá u ostatních hospodářských zvířat, u koní tato oblast zatím není tak dobře prozkoumána a mnohé plemenné knihy ji zakazují. Nicméně se tato metod pravděpodobně rozšíří díky nedávným změnám v plemenných knihách. Zmražené semeno se dodává v peletách, pejetách či skleněných ampulkách, které jsou uchovány v teplotě -196°C (<http://articles.extension.org/>).

Odběr nebo připarování jednou za týden snižuje objem spermatu v porovnání s odběry každý den/ každý druhý den. Objem semene za týden při odběru obden nebo každý den se nemění. Tedy pro maximální počet odběrů spermatu a minimální nároky na práci by měli být odebírání každý druhý den. Tento rozvrh odběrů je typický pro stáje využívají-

cí inseminaci. Chovatelé, kteří chovají za pomoci přirozené plemenitby, by měli takto činit častěji, než každý druhý den. Při individuálních odběrech zde bude méně spermií v ejakulátu, snížení oplození schopnosti tohoto spermatu je značně individuální. Sexuální pud hřebce a jeho schopnost produkovat spermie limitují frekvenci úspěšného krytí klisny. Libido je sledováno reakčním časem a počtem vzeskoků potřebných pro ejakulaci. Obvykle nebývá ovlivněno zvýšením využití hřebce frekvencí využití hřebce z využití obden na jednodenní, nicméně chovatelé musí zacházet s hřebci individuálně a vhodně regulovat intenzitu odběru. Přílišné využití může vést ke snížení libida, které se projevuje hřebcovým nezájmem o plemenitbu, delším časem vzeskoku před samotným připouštěním a absencí ejakulace (<http://articles.extension.org/>).

3.7. Hodnocení ejakulátu

Ejakulát se hodnotí před použitím k inseminaci několikrát. Ihned po odběru se dělá základní posouzení. Ejakulát se naplní do pejet a zamrazí se. Ze zamražených pejet se některé vyberou, rozmrazí a ejakulát v nich se posoudí. Dále se hodnotí před uložením do semenných bank a před jejich vyskladněním. Také se hodnotí při prodeji a transportu, při mezinárodní výměně a při preventivním vyšetření (Louda, 2001).

3.7.1. Metody vyšetření ejakulátu

Pro vyšetření spermií ve vzorku ejakulátu je nutné šetrné zacházení ihned po odběru, aby nedošlo ke zkreslování výsledků. Nešetrnou manipulací se zvyšuje procento mrtvých a morfologicky poškozených spermií, snižuje se jejich motilita a závěrečný výsledek vyšetření je pak nesprávný. Ejakulát by měl být vyšetřen bezprostředně po odběru, nemělo by při manipulaci docházet k výrazným teplotním výkyvům (Doležel a kol., 2001).

Při vyšetřování se musí dodržovat zásady přísné hygieny. Všechny pomůcky, které přicházejí do kontaktu se semenem, musí být důkladně omyté, opláchnuté destilovanou vodou a vysterilizované. Použitý laboratorní materiál by měl být zahřátý, čistý, sklíčka neznečištěná alkoholem či jinými desinfekčními ředidly (Doležel a kol., 2001).

Metody se dělí na makroskopické a mikroskopické.

4.4.6.10. Makroskopické hodnocení

Makroskopické hodnocení se provádí ihned po odběru. Hodnotí se hmotnost nebo objem, smyslové hodnocení zrnitosti – hustoty, barvy, pachu, čistoty, případně cizích přímísenin (Louda, 2001).

4.4.6.1.9. Objem

Objem ejakulátu může být od 2 do 50 ml. (Svoboda a kol., 2001). Zjišťuje se v kalibrovaném válci nebo na laboratorní automatické váze (Louda, 2001).

4.4.6.1.10. Konzistence

Zrnitost se posuzuje u každého ejakulátu ve sběrači v dopadajícím nebo procházejícím světle. Husté sperma dobré kvality je neprůhledná vazká tekutina, zpravidla smetanového, mírně zrnitého vzhledu, zrnité shluky spermatu se pomalu pohybují. Řídké sperma špatné jakosti je vodnaté, průsvitné, bez zrnitosti (Louda, 2001).

4.4.6.1.11. Barva

Barva se posuzuje proti světlu (Louda, 2001). Sperma má mléčnou barvu. Zakalení může být způsobeno mikroskopicky lipidovými kapénkami a absencí spermií. Průhledné semeno ukazuje na nedostatečný obsah spermií. Žlutavé zbarvení bývá obvykle způsobeno kontaminací močí či požitím některých vitaminů (Chenoweth, 2014), nebo flavinovými barvivy obsaženými v krmivu (Louda, 2001). Zelené zbarvení znamená hnísavý výtok z penisu, předkožky nebo prostaty. Hnědé zbarvení znamená krev. Ta se sem dostane díky traumatizaci penisu při odběru, případně signalizuje onemocnění prostaty (Chenoweth, 2014).

4.4.6.1.12. Pach

Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Dobré sperma má slabý specifický pach. Nazelenalé sperma páchne močí. Hnilobný zápach svědčí o přimísení hnisu (Louda, 2001).

4.4.6.1.13. Cizí přimíseniny

Mezi cizí přimíseniny patří chlupy, vazelína, nečistoty z předkožky. Při odběru ve venkovním prostředí to může být prach či písek. Hnis se zjišťuje při zánětech semenných váčků, pyje, varlat nebo předkožky. Dobré sperma je přimísenin prosté (Louda, 2001).

4.4.6.11. Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Mikroskopické hodnocení ejakulátu se provádí pomocí speciálních pomůcek a mikroskopu.

4.4.6.1.14. PH

Normální hodnota PH ejakulátu se pohybuje v rozmezí 6,4 – 6,8 (Chenoweth, 2014).

0.0.0.0.15. Pohyblivost

Progresivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou je jedním z nejvýznamnějších ukazatelů oplozovací – fertilizační schopností čerstvého ejakulátu. Hodnotí se charakter pohybu, určuje se směr a rozsah kmitů hlavičky spermie. Příímý progresivní pohyb spermií je znakem jejich funkční plnohodnotnosti a vyjadřuje se v procentech (Louda, 2001). Normální hodnota tohoto pohybu u spermií psa je 70% a více (Chenoweth, 2014).

S prodlužující se dobou po odběru dochází k tzv. vitální degeneraci spermií, při které se rychlost přímočarého pohybu zpomaluje a tento se mění na pohyb kruhový, postupně následuje pohyb přerušovaný a trhavý, později pohyb ustává. Vedle pohybu přímočarého vpřed za hlavičkou je třeba sledovat i ostatní druhy pohybu, které se hodnotí jako závadné. Jsou to kolébavý, kruhový, na místě, zpětný. Nežádoucí je i shlukování spermií, tzv. aglutinace (Louda, 2001).

0.0.0.0.16. Aktivita

Aktivita spermatu se hodnotí u každého ejakulátu. Ze sběrače se odebere kapka spermatu. Ta se promíchá v 1,5 ml citrátu sodného, zahřátého na teplotu $39^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, překryje tenkým krycím sklíčkem a pozoruje při 200 až 300 násobném zvětšení. Hodnotí se minimálně 3 zorná pole a odhadem se stanoví procentické zastoupení spermií pohybující se vpřed za hlavičkou. Mikroskop je opatřen fázovým kontrastem a mikroskopický stolek je vyhříván destičkou na $39^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Pomůcky: citrát sodný (pH = 7, teplota 25 – 30°C), zkumavka 2ml, jednorázové kapátko, podložní sklíčko bez důlku, tenké krycí sklíčko, mikroskop s fázovým kontrastem, vyhřívací destička (Louda, 2001).

0.0.0.0.17. Vířivost pohybu

Hodnocení vířivosti pohybu vyjadřuje společné hodnocení hustoty a pohyblivosti spermií. Hodnotí se nativní vzorek ejakulátu a to tak, že na vyhřáté podložní sklíčko s důlkem se dá kapka neředěného ejakulátu. Přikryje se krycím sklíčkem a položí na vyhřívanou destičku mikroskopu. Pozoruje se při 100 či 200x zvětšení. Pozoruje se pohyb

v rychle se střídajících vlnách (stupeň 3). V řídkém ejakulátu pozorujeme pomalý (stupeň 2) či nepatrný (stupeň 1) vířivý pohyb (Louda, 2001). Individuální pohyblivostí spermií by se měla posoudit co nejdříve po získání ejakulátu. Hodnotí se fyziologický pohyb jednotlivých spermií, který je nepřerušovaný, pravidelný a spermie se pohybuje dopředu za hlavičkou. Spermie s patologickým pohybem se točí do kruhu, kývají se ze strany na stranu, točí se okolo hlavičky, nepohybují se přímo dopředu za hlavičkou, mají trhavý pohyb. U hustých ejakulátů se může stát, že je vyhodnocení motility obtížné. V tomto případě ejakulát naředíme teplým (37 °C) citrátem sodným nebo fyziologickým roztokem v poměru 1 : 1. Motilita spermií může být snížena v případech, kdy ejakulát vystavíme extrémním teplotám, dostanou se do kontaktu s okyselujícími ředidly, s vodou, krví, močí nebo hnisem (Svoboda a kol., 2001).

U první ejakulace po dlouhodobém sexuální klidu psa se v ejakulátu bude vyskytovat větší procento starých a mrtvých spermií, které jsou uloženy v nadvarleti a proto tento ejakulát často vykazuje nižší motilitu. V tomto případě Svoboda doporučuje opakovaný odběr, ve kterém může být již motilita v normě. U vzorků s nízkou motilitou, s výskytem velkého procenta poškozených a mrtvých spermií je nezbytně nutné provést opakované odběry a vyloučit možný negativní vliv nesprávné techniky odběru a použití spermio toxických materiálů. Přetrvávající problémy s motilitou mohou svědčit o onemocnění varlat nebo nadvarlat (Svoboda a kol., 2001).

0.0.0.0.18. Hustota

Hustota neboli koncentrace je dána funkční aktivitou semenotvorného epitelu varlat, věkem, zdravotním stavem, připraveností a technikou odběru ejakulátu. Lze ji hodnotit několika způsoby, a to fotometricky, haematocytomericky, podle Carrase (Louda, 2001).

0.0.0.0.19. Fotometrické hodnocení

Fotometrické hodnocení je měření přístrojem. Přístroj zajišťuje objektivní přesnost, rychlost měření a malá spotřeba spermatu. Přesnost je závislá na správné funkčnosti přístroje a na přesně vypracované kalibrační křivce. V současné době se používá digitální fotometr. Existují však i modifikované fotokolorimetry pro různé druhy zvířat. Hustota se zjišťuje podle stupně zakalení standardního ředidla, ve kterém je rozptýleno

odměřené množství spermatu. Výchozí stupeň ředění je odvislý na typu fotometru. Údaje na stupnici se přepočítávají podle tabulky sestavené na každý fotometr na množství spermií v mm³ naředěného spermatu. Výsledky z fotometru se jednou za měsíc kontrolují porovnáním výsledků 3 ejakulátů o různé hustotě s hodnotami zjištěnými pomocí počítání v Bürkerově komůrce. Rozdíl nesmí být vyšší než 15%. Kontrola lze provést také pomocí tzv. standardů podle návodu ke kalibraci (Louda, 2001).

0.0.0.0.20. Haematocytometrické hodnocení

Haematocytometrické hodnocení je počítání jednotlivých spermií v různých částech Bürkerovy komůrky a následným provedením výpočtu. Nejprve se na hodinové sklíčko umístí kapka spermatu a na druhé zředovací roztok NaCl. Do melanžéru se nasaje sperma až ke značce 05 a po značku 101 se doplní 3% roztokem NaCl. Obsah melanžéru se 2 minuty promíchává. Nechají se odkápnout 3 kapky spermatu a 4. se aplikuje na počítací plochu komůrky s přisátým krycím sklíčkem tak, že přiložíme hrot melanžéru ke hraně sklíčka a necháme kapku vtéci do prostoru počítací komůrky. Krycí sklíčko komůrky se přichytí svorkami, které jsou našroubovány na bocích, a roztíracími pohyby palců provedeme mírné přetírání krycího sklíčka, až jsou patrné duhové skvrny. Jsou-li spermie rovnoměrně rozvrstveny po celé ploše všech čtverečků, je komůrka připravena k počítání. Komůrka se položí na stolek mikroskopu a zvětšené pro pozorování a počítání volíme takové, aby jeden čtvereček komůrky zaujímal celé zorné pole mikroskopu. Počítají se všechny spermie ležící uvnitř čtverečku a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají či leží na levé a horní straně čtverečku. Počítají se spermie v 10 1/16 mm³ čtverečcích. Následný výpočet se provádí sečtením spermií všech 10 čtverečků a následným vynásobením číslem 3200. Druhá možnost počítání je součet spermií v 1/25 mm³ čtverečcích ležící uvnitř čtverečku a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají či leží na levé a horní straně čtverečku. Z tohoto množství vypočítáme průměr a vynásobíme jej číslem 50 000. U obou metod výpočtu se provádí kontrola kapkou spermatu ze stejného melanžéru. Získané hodnoty jsou počty spermií v 1 mm³ (Louda, 2001).

0.0.0.0.21. Hodnocení metodou podle Karrassa

Hodnocení metodou podle Karrassa. Je to stanovení tzv. spermiodenzimetrem. Pro zjištění počtu potřebujeme Karrassův klín, tabulku k určení hustoty ejakulátu, 1% roztok

NaCl, pipetu dělenou po 0,1 ml. Do Karrasova klínu odpipetujeme 0,1 ml ejakulátu a objem doplníme 10 cm³ 1% ředidlem NaCl. Po opatrném promíchání obsahu odečteme na stupnici spermiodenzimetru hodnotu, která je ještě dobře viditelná. Podle tabulky vyhodnotíme počet spermií v cm³. Je vhodné získanou hodnotu porovnat s hodnotou vypočítanou při stanovení počtu v Bürkerově komůrce (Louda, 2001).

3.8. Konzervace semene

Ředidla ke krátkodobé nebo dlouhodobé konzervaci semene obsahují hlavně složky, které vykazují ochranný účinek na spermie, dodávají energii a udržují konstantní pH, osmotický tlak i koncentraci elektrolytů. Pro mražení jsou nezbytné látky s kryoprotektivním účinkem, které chrání spermie před poškozením zmrazováním nebo rozmrazováním. K ředění semene psa se používají nejčastěji žloutkocitrátová ředidla, případně s přísadkou bikarbonátu, glukózy nebo fruktózy (nebo laktózy především v případě mražení), dále TRIS ředidlo se žloutkem nebo pasterované mléko. Obsah žloutku v uvedených ředidlech se pohybuje kolem 20 %. Pro delší přechovávání se přidávají antibiotika k zabránění množení mikroflóry. Jako kryoprotektivum se používá glycerol v zastoupení 4 - 10 %.

Pro ředění semene psa je třeba používat pouze druhou semennou frakci bohatou na spermie. Přítomnost 1. a 3. frakce ve větším množství negativně ovlivňuje přežívání konzervovaných spermií. Semennou plazmu lze odstranit jako supernatant po odstředění. Ředění je třeba provádět pomalu vždy způsobem přidávání ředidla do semene. Míra ředění a počet naředěných dávek závisí na kvalitě ejakulátu. Z jednoho odběru je možné získat 1 - 20 inseminačních dávek. Pro krátkodobou konzervaci se většinou semeno ředí v poměru 1 : 5 až 1 : 10. Za minimální počet živých spermií v pohlavních cestách feny pro oplození se považuje 100 - 200 miliónů (Svoboda a kol., 2001).

3.8.1. Krátkodobá konzervace

Krátkodobá konzervace se provádí ředěním semena a snížením jeho teploty nejlépe ve skleněných nádobách. Většinou se ředí tak, aby jeden mililitr obsahoval 150-600 miliónů spermií s progresivním pohybem. Jako příklad složení ředidel lze uvést 3,025 g TRIS + 1,7 g kyselina citrónová + 1,25g fruktóza + destilovaná voda do 100 ml + 20 % žloutek + 1 mg/ml benzylpenicilin a 1 mg/ml dihydrostreptomycin sulfát nebo pasteri-

zované mléko s 0,1 % tuku + 20 % žloutek + 1 mg/ml benzylpenicilin a 1 mg/ml dihydrostreptomycin sulfát. Snížení teploty má být pozvolné v průběhu 30 - 60 minut. Teplota se obvykle snižuje na teplotu v chladničce (3-5 °C) nebo na konstantní teplotu mezi 5 – 15 °C. Takto lze semeno skladovat do pěti dnů. Při transportu by semeno mělo být v termoboxu s konstantní teplotou nepřevyšující 10 °C (Svoboda a kol., 2001).

3.8.2. Dlouhodobá konzervace

Pro dlouhodobou konzervaci se používají výše uvedená ředidla s přídavkem glycerolu (nejčastěji 6-8 %). Doba ekvibrace při teplotě 4 °C je 2 - 3 hodiny. Tradiční způsob představuje mražení na suchém ledě ve formě pelet. Nověji se mražení provádí v ampulích nebo 0,5 ml pejetách automaticky řízeným chlazením pomalou (0,5 °C/min. do - 20 °C a dále 2 °C/min. do -70 °C nebo 1-2 °C/min. do - 15 °C a dále 3-5 °C/min. do - 50 °C) nebo rychlou metodou (12 - 24 °C/min. do - 70 °C). Je možné rovněž po ekvibraci pejety umístit do kovového válce vychlazeného parami dusíku na - 80 °C až - 90 °C na 10 minut a poté přemístit pejety do tekutého dusíku. Při srovnávání různých rychlostí mražení vzhledem ke kvalitě semene po rozmražení byla za nejlepší označena rychlost 30 °C/min. Po zmražení je semeno uloženo do tekutého dusíku a zde skladováno do použití. Rozmražení insemináčnických dávek bezprostředně před inseminací se obvykle provádí při teplotě 55 °C po dobu 6 sekund, případně při 70 °C po dobu 5 sekund (Svoboda a kol., 2001).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Odebírání psi

Pro tuto diplomovou práci bylo vybráno 7 psů plemen zařazených do FCI I. – plemena ovčácká, pastevecká a honácká, konkrétně ovčáckých plemen. 5 psů plemene československý vlčák pocházelo ze smečky Lenky Brzobohaté – chovatelská a záchranná stanice Tawy, 2 služební psi plemene německý ovčák byli do výzkumu propůjčeni od psovoda KŘP JMK Bc. Ivana Tomšíka.

4.1.1. Odběr psů

Psi z chovatelské a záchranné stanice Tawy byli odebráni pro svou agresivitu jedním ze svých ošetřovatelů, a to někteří Lenkou Brzobohatou, jiní jejím partnerem Vojtěchem Kouřilem. Byli umístěni dle své povahy buď v kotci svém, nebo v kotci karanténním.

Odběr služebních psů proběhl pod vedením psovoda Bc. Ivana Tomšíka. Psi byli odebírání Bc. Lenkou Sobotkovou v areálu KŘP JMK v Brně - Medlánkách, výjezdním místě psovodů a to s ohledem na počasí - buď volně v areálu, nebo v později přiděleném kotci.

4.1.2. Metoda odběru

Odběr psů byl proveden metodou masturbace. Nejprve proběhla masáž pyje, kterou následovaly frikční pohyby spojené s uchopením pyje za bulbem a vyčkání na ukončení ejakulace.

4.1.3. Četnost odběrů

Odběry v chovatelské a záchranné stanici Tawy probíhaly v měsíčním odstupu od května 2015 do února 2016.

4.1.4. Místa odběru

Prvním místem byla chovatelská a záchranná stanice Tawy s adresou v Olomučanech, ale se sídlem v lese u potoka mezi Olomučany a Adamovem. Psi Bc. Ivana Tomšíka byli odebíráni ve výjezdním místě psovodů KŘP JMK v městské části Brno – Medlánky.

4.2. Vyšetření ejakulátu

Po odběru ejakulátu do kádinky bylo jeho množství změřeno prostřednictvím 25 ml injekční stříkačky bez jehly. Následně byla kapka umístěna na podložní sklíčka, překryta krycím sklíčkem a uložena pod mikroskop. Následně byla subjektivně zjištěna počáteční aktivita spermií. Zbývající ejakulát byl rozdělen v poměru 1 : 1 do 6 ředidel; hřebec, Androhep, Androstar, čerstvé mléko, sušené mléko a destilovaná voda a následně uloženo do lednice, transportováno v chladicím boxu a následně opět uloženo do lednice. Po 15 hodinách od odběru (subjektivně vydedukovaná hodina s ohledem na otevírací dobu veterinárních ordinací a možnosti odběru prvního dne a inseminace feny na druhý den, dále také s ohledem na dobu transportu z jedné veterinární ordinace do druhé), následně 24 hodin po odběru a poté každých 12 hodin, byla ředidla vyjmuta z lednice a po kapkách aplikována na podložní sklíčka umístěná na nahřívací desce a překryta krycími sklíčky. Zbytek ředidel byl bezprostředně poté umístěn zpět do lednice. U, na tělesnou teplotu, zahřátých preparátů byla při 200 x zvětšení subjektivně stanovena aktivita spermií a její % hodnota pečlivě zapsána. Pokud byla v některém z ředidel stanovena aktivita spermií, bylo toto ředidlo uchováváno v lednici až do 24 hodin po odběru a znovu stanovena aktivita stejným postupem jako u předchozího stanovení (po 15 hodinách od odběru). Po tomto stanovení byla ředidla zlikvidována, pomůcky očištěny a připraveny k dalšímu pozorování.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Porovnání jednotlivých použitých ředidel s dobou odběru a délkou přežitelnosti spermií v jednotlivých pozorováních hodiny po odběru

V tabulce 1 můžeme vidět porovnání ředidel z hlediska průměrné hodnoty zjištěné aktivity spermií. V ředidle hřebčího ředidla byla zaznamenána nejvyšší přežitelnost spermií v měsíci květnu ($19,4 \pm 35,16$ %). Naopak nejnižší aktivitu spermie vykazovaly v ředidle hřebčího ředidla v měsíci červnu ($4,14 \pm 17,34$ %). Nejvyšší aktivita v ředidle čerstvého UHT mléka byla zjištěna v měsíci říjnu ($29,43 \pm 31,73$ %), nejnižší v září ($14,43 \pm 28,41$ %). U ředidla Androhep bylo zjištěno, že je vhodné jej použít v měsíci lednu, kdy spermie v tomto ředidle průměrně dosahovaly $16,57 \pm 32,15$ % aktivity. Nejméně aktivní byly však spermie v tomto ředidle v průběhu měsíce srpna, kdy průměrné hodnoty dosahovaly $11,86 \pm 29,83$ %. Obdobně je na tom použití ředidla Androstar jehož nejvyšší využitelnost sahá do měsíce ledna s průměrnými hodnotami aktivity spermií $16,29 \pm 33,50$ %. Nejméně vhodné by bylo toto ředidlo použít v měsíci září, kdy průměrné hodnoty aktivity spermií v tomto ředidle dosahují $8,71 \pm 28,74$ %. Ředidlo ze sušeného mléka je také nejvhodnější použít v lednu, avšak průměrné hodnoty aktivních spermií jsou $27,83 \pm 38,23$ %. Slabé období tohoto ředidla je v měsíci srpnu, kde se hodnoty aktivních spermií drží na hranici $15,86 \pm 30,06$ %. Hodnoty destilované vody dosahují nejnižší hranice v měsíci září ($24,71 \pm 4,18$ %) a nejvyšší v květnu ($34,15 \pm 6,83$ %). Pokud se v tabulce 1 podíváme na hodnocení použitých ředidel s ohledem na čas od odběru, zjistíme, že nejlepší výsledky vykazuje ředidlo z UHT mléka, a to po dobu do 36 hodin po odběru. Z hlediska celkové přežitelnosti spermií v tomto ředidle byly zjištěny hodnoty $22,57 \pm 32,36$ %. Žádné z těchto tvrzení vycházejících z tabulky 1 však není statisticky průkazné.

5.2. Zhodnocení použitých ředidel v době odběru a délkou přežitelnosti spermií u jednotlivých plemen psů

Z tabulky 2 je patrné, že co se týká průměrné aktivity spermií v ejakulátu u československého vlčáka, nejhůře dopadlo hřebčí ředidlo. V lednu se hodnoty aktivních spermií pohybovaly na hranici $12,60 \pm 30,89$ %, v únoru byly $14,40 \pm 33,77$ %, červenci $11,20 \pm 27,62$ %, srpnu $13,00 \pm 30,86$ %, září $7,80 \pm 23,01$ %, říjnu $11,6 \pm 28,79$ %. Hodnoty aktivity spermií v těchto měsících byly shodné s hodnotami ředidla Androstar ve stejném období a byly zjištěny jako nejnižší oproti ostatním ředidlům použitým ve stejném období. Dalšího minima dosahovalo hřebčí ředidlo v prosinci $11,60 \pm 28,79$ %. V měsíci květnu bylo nejméně vhodné použití ředidla Androhep ($14,60 \pm 34,15$ %), v listopadu to byla destilovaná voda s hodnotami $9,67 \pm 26,55$ % a v prosinci opět destilovaná voda a hřebčí ředidlo se shodnými hodnotami $11,60 \pm 28,79$ %.

Jako nejvíce vhodné ředidlo se u československého vlčáka jevílo UHT mléko pro období říjen až únor a pro měsíce červenec a srpen, případně sušené mléko pro období měsíce května, června a září. Hodnoty UHT mléka dosahovaly v lednu $28,48 \pm 37,48$ %, v únoru $26 \pm 35,56$ %, v červenci $15,20 \pm 28,01$ %, v srpnu $16,20 \pm 31,03$ %, v říjnu $30,6 \pm 30,53$ %, v listopadu $25,07 \pm 31,62$ % a v prosinci $29,68 \pm 32,78$ %. Hodnoty sušeného mléka byly v květnu $20,8 \pm 37,18$ %, červnu $18,6 \pm 30,02$ % a září $10,20 \pm 25,19$ %.

U německých ovčáků se mezi nejlepší ředidla taktéž zařadilo UHT mléko a sušené mléko. V lednu bylo nejlepší sušené mléko s hodnotami $33,20 \pm 39,34$ % aktivních spermií, v únoru čerstvé mléko s $31,5 \pm 38,5$ % aktivitou, v červnu čerstvé mléko ($30,2 \pm 33,56$ %), v červenci sušené mléko ($33 \pm 31,99$ %), v srpnu čerstvé mléko ($20 \pm 32,32$ %). V období září až leden bylo pro udržení co nejdelší aktivity spermií nejvhodnější sušené mléko dosahující hodnot v září $31,5 \pm 35,52$ %, v říjnu $28 \pm 36,22$ %, v listopadu a prosinci $24,5 \pm 34,76$ %. Tyto výsledky však nebyly statisticky průkazné.

5.3. Zhodnocení aktivity spermií v různých časech po odběru s délkou přežitelnosti spermií u jednotlivých plemen psů v jednotlivých ředidlech

Určení počáteční aktivity spermií je nezbytnou součástí výzkumu přežitelnosti spermií v různých ředidlech. Na počáteční aktivitu má vliv mimo jiné i tělesná hmotnost psa, jak je možné dohledat ve výsledcích výzkumu Doleželíka (2011), který se zabýval ejakulátem u loveckých plemen psů a zjistil, že počáteční aktivita u velkých plemen psů, jako je německý krátkosrstý ohař, se pohybuje kolem $80\% \pm 7,5\%$ (případně i 30%) nebo $40 \pm 22,99\%$ (případně i 80%) u irského setra. Tímto vlivem se také ve svém výzkumu zabývala Paldusová (2013). Zjistila, že psi s hmotností vyšší než 25kg dávají ejakulát o počáteční aktivitě $73,21 \pm 10,97\%$. Co se týče konkrétních psů, u plemene německý ovčák bylo změřeno $78,33 \pm 7,64\%$, u plemene irský setr $56 \pm 5,47\%$ (případně také 90%). Hodnoty u belgických ovčáků se pohybovaly od $66,5 \pm 14,07\%$ u belgického ovčáka malinoise do $85 \pm 4,47\%$ u belgického ovčáka tervuerena. Z jiného výzkumu vyplývá, že je počáteční aktivita ovlivněna také upotřebením psa. Z výzkumu Vágenknechtové (2014) vyplývá, že nejvyšší počáteční aktivitu mají psi upotřebitelní jako sportovní. Hodnoty aktivity jejich spermií se pohybují $78,33 \pm 8\%$. Střední hodnoty aktivity spermií dosahují psi určení jako rodinní společníci. Tito psi mají aktivitu spermií v ejakulátu $73,44 \pm 9,23\%$. Nejhůře dopadli psi služební – policejní. Jejich aktivita spermií byla $54,14 \pm 29,94\%$. Tyto výsledky výzkumu byly statisticky průkazné. Z tabulky 3 je patrné, že průměrná počáteční aktivita u plemene československý vlčák je $60 \pm 37\%$ a u plemene německý ovčák $64,72 \pm 37\%$. Výsledky u plemene německý ovčák nám říkají, že tito psi opravdu patří do služebního poměru policie České republiky a kvalita jejich ejakulátu odpovídá jejich zařazení pro služební účely. U plemene československý vlčák byla naměřena nižší aktivita, než u rodinných psů ve výzkumu Vágenknechtové (2014), což může být zapříčiněno tím, že naši českoslovenští vlčáci pocházejí ze záchranné stanice, kde mají zcela jiné podmínky než psi sportovní, rodinní nebo služební.

V tabulce 3 můžeme vidět zhodnocení průměrné aktivity spermií v jednotlivých ředidlech v jednotlivých hodinách po odběru. Z výsledků je patrné, že ejakulát, který byl

naředěn těmito ředidly, si v některých z nich zachoval svou aktivitu po dobu 24 hodin. V pozdějších hodinách již nemusí být ejakulát díky nízké aktivitě spermií vhodný pro inseminaci. Při použití kteréhokoli ředidla u obou plemen psů se aktivita během 15 hodin po odběru snižuje. Stejně tak se aktivita snižuje během 24 hodin po odběru ve všech ředidlech. Tyto skutečnosti jsou statisticky vysoce průkazné. 15 hodin po odběru ejakulátu československých vlčáků si ejakulát zředěný čerstvým mlékem zachoval aktivitu spermií $22,09 \pm 30 \%$, v ředidle sušeného mléka to bylo $14,63 \pm 25,24 \%$. Ředidlo Androhep zachovalo po 15 hodinách od odběru aktivitu $9,54 \pm 21 \%$. Hřebčí ředidlo udrželo aktivních pouze $4,9 \pm 15 \%$ spermií, u Androstaru jsme zjistili $4,45 \pm 37\%$ aktivitu. Jako nejméně vhodné ředidlo se jevila destilovaná voda, u které zůstala zachovaná aktivita pouze $1,72 \pm 8,29 \%$. U německých ovčáků si největší aktivitu zachoval ejakulát ředěný sušeným mlékem, a to $36,11 \pm 34,66 \%$, a čerstvým mlékem ($12,77 \pm 28 \%$). Dále je u ejakulátu německých ovčáků použitelné hřebčí ředidlo, které zachovalo $12,77 \pm 28\%$ aktivitu. Androhep si po 15 hodinách zachoval aktivitu $7,5 \pm 20 \%$ a Androstar $7,22 \pm 18 \%$. Nejméně vhodná je destilovaná voda, která uchovala pouze $2,05 \pm 5,16\%$ aktivitu spermií. 24 hodin po odběru si u ejakulátu československých vlčáků zachovaly spermiie aktivitu v čerstvém mléce ($16,2 \pm 32 \%$) a sušeném mléce ($7,6 \pm 17,59 \%$). 36 hodin po odběru byly aktivní spermiie s hodnotou $5,66 \pm 12 \%$ pouze v čerstvém mléce. U německých ovčáků se aktivita po 24 hodinách od odběru zachovala pouze v čerstvém mléce ($16,94 \pm 21 \%$) a sušeném mléce ($19,16 \pm 23,59 \%$). Ještě po 36 hodinách od odběru byla v těchto ředidlech zachována aktivita, a to v čerstvém mléce $5,77 \pm 7 \%$ a $8,61 \pm 10,82 \%$ v mléce sušeném. V jiném výzkumu byl po 24 hodinách od odběru zaznamenán nejlepší výsledek u ředidla Androstar, dále se jevílo jako vhodnější ředidlo odstředěné mléko (Škarpa, 2011). Z výzkumu Vágenknechnové a Hoška (2012) vyplynulo, že lze pro krátkodobou konzervaci lze doporučit ředidla Androhep, Androstar, Hřebčí ředidlo a odstředěná mléka (jak sušená, tak pasterovaná).

6. ZÁVĚR

Naše práce byla zaměřena na hodnocení kvality ejakulátu psů ze skupiny I. dle členění FCI. Stručně jsme v ní popsali metody odběru ejakulátu, a to jak u psů, tak u hřebce a kance. Z literárních podkladů totiž vyplynulo, že se metody odběru vzájemně podobají, a proto bylo použito několik ředidel vyrobených pro tyto živočišné druhy. V teoretické části byly stručně shrnuty základní metody hodnocení kvality ejakulátu se zaměřením na metody speciálního vyšetření ejakulátu. Zvláštní zřetel byl dán na testy přežitelnosti psích spermií pro potřeby inseminace čerstvým semenem za použití ředidel: UHT mléko, sušené mléko, hřebčí ředidlo, Androhep, Androstar, destilovaná voda. Také jsou zde popsány metody inseminace psů. Pro praktickou část byl nezbytný aktivní zisk ejakulátu, který musel pocházet od psů v co nejpodobnějších chovatelských podmínkách. Výsledky byly zpracovány matematicko – statistickými metodami.

Celkem bylo odebráno 7 psů – 5 československých vlčáků a 2 němečtí ovčáci. Psi byli odebíráni 1x za 30 dní po dobu 10 měsíců metodou masturbace v jejich „domácím“ prostředí za asistence jejich majitelů. Možnou komplikací, která mohla zkreslit výsledky, bylo střídání podmínek v domácím prostředí záchranné stanice československých vlčáků novými přírůstky, odchodem některých svěřenců do nových domovů a dvouměsíčním působením štěňat a zvýšené návštěvnosti v chovatelské stanici v měsících listopad až leden.

Nejkvalitnější ejakulát (s průměrnou aktivitou 30,6 % a směrodatnou odchylkou 30,53 %) československých vlčáků byl v měsíci říjnu uchován v ředidle čerstvého mléka. Nejhorší kvalita ejakulátu byla objevena v měsíci červnu v hřebčím ředidle, a to s nulovou aktivitou. Nejkvalitnější ejakulát německých ovčáků byl objeven v měsíci lednu v ředidle sušeného mléka, s průměrnou aktivitou 33,20 % a směrodatnou odchylkou 39,34 %. Nejméně aktivní ejakulát byl objeven v měsíci srpnu v ředidlech Androhep, Androstar a destilované vodě o aktivitě 9 % a směrodatné odchylce 28,46 %.

U německých ovčáků si největší aktivitu zachoval ejakulát ředěný ředidlem sušeného mléka, a to 36,11 % a směrodatnou odchylkou 34,66 % a také ten, který byl ředěn čerstvým mlékem ($12,77 \pm 28$ %). Dále jsme zjistili, že je u ejakulátu německých ovčáků

použitelné hřebčí ředidlo, které si zachovalo 12,77 % (se směrodatnou odchylkou 28 %) aktivitu po dobu 15 hodin. Androhep zachoval po 15 hodinách aktivitu 7,5 % se směrodatnou odchylkou 20 % a Androstar 7,22 % se směrodatnou odchylkou 18 %. Nejméně vhodné je jako ředidlo destilovaná voda, která uchovala pouze 2,05 % se směrodatnou odchylkou 5,16 %. U německých ovčáků se aktivita po 24 hodinách od odběru zachovala pouze v čerstvém mléce ($16,94 \pm 21$ %) a sušeném mléce ($19,16 \pm 23,59$ %). Ještě po 36 hodinách od odběru byla v těchto ředidlech zachována aktivita, a to v čerstvém mléce 5,77 % se směrodatnou odchylkou 7 % a 8,61 % se směrodatnou odchylkou 10,82 % v mléce sušeném. 15 hodin po odběru ejakulátu československých vlčáků si ejakulát zředěný čerstvým mlékem zachoval aktivitu spermií $22,09 \pm 30$ %, v ředidle sušeného mléka to bylo 14,63 % (směrodatná odchylka 25,24 %). Ředidlo Androhep zachovalo po 15 hodinách od odběru aktivitu 9,54 (směrodatná odchylka 21 %). Hřebčí ředidlo udrželo aktivních pouze 4,9 % (směrodatná odchylka 15 %) spermií a Androstar 4,45 % (směrodatná odchylka 37 %) aktivity. Jako nejméně použitelné ředidlo se jevila destilovaná voda, u které zůstala zachovaná aktivita pouze 1,72 % směrodatná odchylka 8,29 %). 24 hodin po odběru si u ejakulátu československých vlčáků zachovaly spermie aktivitu v čerstvém mléce ($16,2 \pm 32$ %) a sušeném mléce ($7,6 \pm 17,59$ %). 36 hodin po odběru byly aktivní spermie s hodnotou $5,66 \pm 12$ % pouze v čerstvém mléce.

Z výsledků našeho výzkumu vyplývá, že nejkvalitnější ejakulát, co se týká aktivity spermií, mají němečtí ovčáci v lednu a českoslovenští vlčáci v říjnu. Nejméně aktivní ejakulát lze získat v červnu od československých vlčáků a v srpnu od německých ovčáků. Tyto hodnoty však nejsou průkazné, a proto by bylo vhodné ve výzkumu pokračovat. Jako vhodná ředidla pro ejakulát psů FCI I. skupiny pro potřeby krátkodobé konzervace je možné označit UHT mléko a ředidlo ze sušeného mléka.

7. PŘEHLED LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

Canine Breeding and Reproduction. *Aces.edu*. [online]. © 1997 – 2016 [cit. 2016-01-30]. Dostupné z:<http://www.aces.edu/pubs/docs/U/UNP-0052/UNP-0052.pdf>

DOLEŽELÍK, R.: *Hodnocení kvality ejakulátu loveckých plemen psů*. 2011. 72 stran. Diplomová práce. Brno: Mendelova univerzita v Brně.

DOSTÁL, Jaromír. *Genetika a šlechtění plemen psů*. České Budějovice: Dona, 2007, 262 stran. ISBN 978-80-7322-104-1

ELAINE, A Ostrander, Anatoly Ruvinsky. *The Genetics of the Dog, 2nd Edition*. : CAB International, 2012. 521 stran. ISBN 13:978 1 84593 940 3.

FALTA, FILIPČÍK, LICHOVNÍKOVÁ. *The effect of body weight on dog ejaculate quality parameters*. In *Animal Breeding 2014*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, s. 110-116. ISBN 978-80-7375-895-0.

FEEMAN, David. Horse Semen Collection. *Articles.extension*. [online]. 20. 11. 2014 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z:<http://articles.extension.org/pages/11213/horse-semen-collection>

FOGLE, Bruce. *Nová encyklopedie psů*. Praha: Fortuna Print, 2002, 1. vydání. 416 stran. ISBN 80-7321-037-1

HOŠEK, Martin, Vágenknechtová, Marie. *Možnosti krátkodobého uchování psího ejakulátu*. [CD-ROM]. In *Animal Breeding 2012*. s. 44-49. ISBN 978-80-7157-224-4.

CHENOWETH, Peter J., Steven P. Lorton. *Animal andrology: theories and applications*. Croydon: CPI Group, 2014. 584 stran. ISBN 13:987 1 78064 316 8.

ISK Radouňka. *Reprogen*. [online]. 16. 2. 2016 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.reprogen.cz/index.php/plemenenarske-sluzby/chov-prasat/inseminacni-stanice-kancu>

KOUŘILOVÁ, Jana. Veterinární medicína: Inseminace u psů. *Svět psů*. Minerva CZ s.r.o., 2012, (3), 28-29. ISSN 9771211297008-03.

LOUČKA, Radko. *Pasení se psem – metodická příručka výcviku*. Brno: Svaz chovatelů ovčí a koz v ČR, 2008. 81 stran. ISBN 978-80-904140-4-4.

LOUDA, F. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Praha: Česká zemědělská univerzita – AF, 2001, 225 stran. ISBN 9788021307025.

NOAKES, David E.. *Veterinary Reproduction & Obstetrics, 9th Edition*. : An Imprint of Elsevier Ltd., 2009. 960 stran. ISBN 978-0-7020-2887-8.

O nás. Frozen dogs. [online]. [cit. 2016-01-30]. Dostupné z: <http://www.frozendogs.com/>

PALDUSOVÁ, M. *Hodnocení kvality ejakulátu různých plemen psů*. 2013. 78 stran. Diplomová práce. Brno: Mendelova univerzita v Brně.

PROCHÁZKA, Zdeněk. *Chov psů*. Vyd. 3. Praha: Paseka, 2005, 314 stran. ISBN 80-7185-768-8

REDAKCE, mujpes.cz. Umělé oplodnění fen část I. – semeno psa. *Mujpes.cz*. [online]. 20. 8. 2008 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://mujpes.cz/clanek.php?id=215>

Speciální endoskop zvyšuje pravděpodobnost umělého oplodnění. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*. [online]. 20. 7. 2012 [cit. 2016-01-30]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/media-verejnost/informace-pro-media/tz/2012-07-20-specialni-endoskop.html>

SVOBODA M. Senior F. D., Doubek J, Klimeš J. a kol. *Nemoci psa a kočky: 2. díl*. Brno: Noviko, a.s., 2001, 1152 stran. ISBN 978-80-86542-18-8.

ŠÍPEK, Antonín. Gametogeneze. *Genetika – Biologie*. [online]. © 2010-2014 [cit. 2016-01-26]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/gametogeneze>

ŠTRACH, Filip. Literatura-kynologie. *Cz-pes.cz*. [online]. 15. 4. 2007 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.cz-pes.cz/literatura-kynologie-bs-1.php>

TICHÁ. *Malá škola pro chovatele psů*. České Budějovice: Dona, 2000, 228 stran. ISBN 80-86136-84-1.

TREE, Alex, Melissa Wiley. What Are the Different Methods of Collecting Semen?. *wiseGEEK*. [online]. 13. 1. 2016 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.wisegeek.com/what-are-the-different-methods-of-collecting-semen.htm>

TRUHLÁŘ, Pavel. *Psi*. Praha: Aventinum, 2012. 191 stran. ISBN 978-80-7151-204-2.

TŮMOVÁ Lenka, Ing., Eva Chmelíková, Doc., Markéta Sedmíková, prof.. Jak vzniká savčí spermie. *Náš chov*. [online]. 14. 3. 2015 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: <http://naschov.cz/jak-vznika-savci-spermie/>

Umělá inseminace. *Veterinární klinika v Jičíně a Nové Pace*. [online]. [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: <http://www.jicinvet.cz/sample-page/umela-inseminace>

VÁGENKNECHTOVÁ, Marie, Hošek Martin, Máchal Ladislav, Horský Roman. *Kvalita spermatu u loveckých plemen psů před konzervací*. In ŠKARPA, P., CERKAL, R., RYANT, P., KONEČNÁ, M., RŮŽIČKOVÁ, G., SLÁMA, P., VYSKOČIL, I., KOVÁRNÍK, J., MAREČEK, V. *MendelNet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. 1. vyd. Brno: Mendel University in Brno, 2011, s. 819 - 826. ISBN 978-80-7375-563-8. Dostupné z:

https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/mendelnet_2011_fulltext.pdf

VÁGENKNECHTOVÁ, M. *Hodnocení kvalitativních parametrů ejakulátu psů*. 2014. 117 stran. Doktorská disertační práce. Brno: Mendelova univerzita v Brně.

VÁGENKNECHTOVÁ, Marie, Máchal, Ladislav, Hošek, Martin, Filipčík, Radek. *Vliv frekvence odběru na kvalitu ejakulátu u psů*. In ŠKARPA, Cerkal, Ryant, Novotná, Růžičková, Sláma, Vyskočil, Kovárník, Hajzler, Mareček. *MendelNet 2010 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, s. 341-346. ISBN 978-80-7375-453-2.

VITÁSEK, Roman, MVDr., Ph.D.. *Metody umělé inseminace*. IRIS veterinární klinika. [online]. © 2009 [cit. 2016-01-30]. Dostupné z: http://www.veterina-iris.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=158

8. PŘÍLOHY

Seznam příloh

Tabulka 1 - Porovnání jednotlivých použitých ředidel s dobou odběru a délkou přežitelnosti spermií (%) v jednotlivých pozorováních hodiny po odběru

Tabulka 2 - Zhodnocení použitých ředidel v době odběru a délkou přežitelnosti spermií (%) u jednotlivých plemen psů

Tabulka 3 - Zhodnocení aktivity spermií v různých časech po odběru s délkou přežitelnosti spermií (%) u jednotlivých plemen psů v jednotlivých ředidlech

Tabulka 1

		Hřebec		Čerstvé mléko		Androhep		Androstar		Sušené mléko		Destilovaná voda	
		\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
Plemeno	Československý vlašák	11,73	28,38	21,38	31,74	14,04	29,83	13,16	29,40	17,02	30,70	29,02	1,82
	Německý ovčák	16,61	32,45	25,93	33,99	14,89	31,23	14,58	31,46	26,41	33,60	30,60	3,23
Měsíc	Leden	13,57	31,47	26,63	35,87	16,57	32,15	16,29	33,50	27,83	38,23	31,20	5,27
	Únor	15,43	34,50	27,57	35,90	15,86	34,35	15,77	34,38	16,00	34,40	34,82	5,89
	Květen	19,40	35,16	14,80	34,08	14,60	34,15	14,80	34,08	20,80	37,18	34,15	6,83
	Červen	4,14	17,34	21,20	29,84	12,43	28,35	12,57	28,29	21,14	29,88	28,35	4,79
	Červenec	12,71	29,56	19,77	31,16	12,71	29,56	12,71	29,56	19,91	30,53	29,51	4,99
	Srpen	14,29	31,18	17,29	30,97	11,86	29,83	11,86	29,83	15,86	30,06	29,78	5,03
	Září	12,29	27,37	14,43	28,41	12,29	27,40	8,71	24,74	16,29	29,61	24,71	4,18
	Říjen	14,71	30,70	29,43	31,73	15,43	29,98	13,00	29,46	21,86	30,29	28,65	4,84
	Listopad	13,88	29,21	24,43	32,17	15,13	29,38	14,38	28,49	16,75	29,08	27,02	4,27
Prosinec	11,29	28,65	27,63	33,19	15,71	30,51	15,43	30,03	19,00	30,46	28,65	4,84	
Čas po odběru (h)	0	56,99	39,29	61,25	36,86	61,25	36,86	61,25	36,86	61,25	36,86	36,86	4,47
	15	6,85	19,37	27,05	31,43	8,97	19,88	5,21	15,62	19,93	29,12	7,61	0,89
	24	1,47	6,97	16,40	22,39	1,47	6,11	1,79	8,58	10,66	19,85	5,03	0,61
	36	0,15	0,86	5,70	10,72	0,00	0,00	0,00	0,00	3,85	7,68	0,00	0,00
	48	0,00	0,00	2,20	6,88	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	4,14	0,00	0,00
Celkem		13,00	29,52	22,57	32,36	14,26	30,16	13,53	29,91	19,47	31,70	12,63	29,40

Tabulka 2

Plemeno	Ředidlo	Hřebec		Čerstvé mléko		Androhep		Androstar		Sušené mléko		Destilovaná voda	
	Měsíc	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
Československý vlačák	Leden	12,60	30,89	28,48	37,24	16,80	31,91	12,60	30,89	25,68	38,39	13,20	30,72
	Únor	14,40	33,77	26,00	35,56	14,40	33,77	14,40	33,77	15,20	33,65	19,20	34,60
	Květen	19,40	35,16	14,80	34,08	14,60	34,15	14,80	34,08	20,80	37,18	14,60	34,15
	Červen	0,00	0,00	17,60	28,14	11,60	27,79	11,80	27,72	18,60	30,02	11,60	27,79
	Červenec	11,20	27,62	15,20	28,01	11,20	27,62	11,20	27,62	14,68	28,93	11,40	27,56
	Srpen	13,00	30,86	16,20	31,03	13,00	30,86	13,00	30,86	15,20	30,43	13,20	30,78
	Září	7,80	23,01	9,40	23,82	7,80	23,01	7,80	23,01	10,20	25,19	8,00	22,96
	Říjen	11,60	28,79	30,60	30,53	16,80	30,68	14,00	29,86	19,40	28,04	11,60	28,79
	Listopad	15,00	29,42	25,07	31,62	16,33	29,71	15,00	28,56	14,17	27,10	9,67	26,55
	Prosinec	11,60	28,79	29,68	32,78	17,40	31,30	16,60	30,68	16,80	29,04	11,60	28,79
Německý ovčák	Leden	16,00	34,46	22,00	33,60	16,00	34,46	25,50	39,54	33,20	39,34	18,50	33,75
	Únor	18,00	38,02	31,50	38,37	19,50	37,38	19,20	37,52	18,00	38,02	19,70	37,26
	Červen	14,50	31,13	30,20	33,56	14,50	31,13	14,50	31,13	27,50	30,12	14,50	31,13
	Červenec	16,50	35,28	31,20	37,07	16,50	35,28	16,50	35,28	33,00	31,99	16,50	35,28
	Srpen	17,50	33,44	20,00	32,32	9,00	28,46	9,00	28,46	17,50	30,66	9,00	28,46
	Září	23,50	34,96	27,00	35,92	23,50	35,04	11,00	29,89	31,50	35,52	11,00	29,89
	Říjen	22,50	35,45	26,50	36,14	12,00	29,46	10,50	29,86	28,00	36,22	10,50	29,86
	Listopad	10,50	29,86	22,50	35,45	11,50	29,63	12,50	29,74	24,50	34,76	10,50	29,86
	Prosinec	10,50	29,86	22,50	35,45	11,50	29,63	12,50	29,74	24,50	34,76	10,50	29,86

Tabulka 3

Ředidlo	Hřebec		Čerstvé mléko		Androhep		Androstar		Sušené mléko		Destilovaná voda		
	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	
Československý víčák	0	54,2 ^{BCDEGHIJ}	40	60 ^{ABCDEHIJ}	37	60 ^{BCDEGHIJ}	37	60 ^{BCDEGHIJ}	37	60 ^{ABCDEHIJ}	37,02	60 ^{BCDEGHIJ}	37,02
	15	4,90 ^{AF}	15	22,09 ^{AEF}	30	9,54 ^{AF}	21	4,45 ^{AF}	14	14,63 ^{AF}	25,24	1,72 ^{AF}	8,29
	24	0,2 ^{AF}	1	16,2 ^{AF}	23	1,1 ^{AF}	4	2,2 ^{AF}	10	7,6 ^{Afg}	17,59	1,1 ^{AF}	5,83
	36	0 ^{AF}	0	5,66 ^{AFG}	12	0 ^{AF}	0	0 ^{AF}	0	2,06 ^{AFG}	5,22	0 ^{AF}	0,00
	48	0 ^{AF}	0	2,96 ^{ABFG}	8	0 ^{AF}	0	0 ^{AF}	0	1,05 ^{AFG}	2,68	0 ^{AF}	0,00
Německý ovčák	0	64,72 ^{BCDEGHIJ}	37	64,72 ^{BCDEFHIJ}	37	64,72 ^{BCDEGHIJ}	37	64,72 ^{BCDEGHIJ}	37	64,72 ^{BCDEgHIJ}	37,24	64,72 ^{BCDEGHIJ}	37,24
	15	12,77 ^{AF}	28	42,22 ^{DEIJ}	33	7,22 ^{AF}	18	7,5 ^{AF}	20	36,11 ^{cDEfIJ}	34,66	2,05 ^{AF}	5,16
	24	0,20 ^{AF}	13	16,94 ^{AF}	21	2,5 ^{AF}	9	0,66 ^{AF}	2	19,16 ^{AF}	23,59	0,27 ^{AF}	1,18
	36	0,55 ^{AF}	2	5,77 ^{AFG}	7	0 ^{AF}	0	0 ^{AF}	0	8,61 ^{Afg}	10,82	0 ^{AF}	0,00
	48	0 ^{AF}	0	0 ^{AFG}	0	0 ^{AF}	0	0 ^{AF}	0	3,44 ^{AFG}	6,60	0 ^{AF}	0,00

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J – mezi hodnotami se stejnými písmeny ve sloupci v jednotlivých oddílech byly prokázány statisticky vysoce průkazné rozdíly (P≤0,01)

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j – mezi hodnotami se stejnými písmeny ve sloupci v jednotlivých oddílech byly prokázány statisticky průkazné rozdíly (P≤0,05)