

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

Téma bakalářské práce

Faktory ovlivňující množství spermií v ejakulátu kanců

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Kateřina Volfová

Autor bakalářské práce:

Martin Štverák

České Budějovice, 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin ŠTVERÁK**
Osobní číslo: **Z13155**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Faktory ovlivňující množství spermií v ejakulátu kanců**
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

V reprodukci prasat dochází dlouhodobě k sezónním, ale i nárazovým poklesům v produkci selat. Tato skutečnost je v praxi dobře známá, ale jednoznačný důkaz na vliv konkrétních ovlivňujících faktorů neexistuje. V odborné literatuře i odborných chovatelských diskusích se uvádí jako příčina sezónní biologický charakter rozmnožovacího procesu prasat. To potvrzují poklesy říjivosti prasnic a prasniček i kvality spermií v ejakulátech kanců. Počet spermií hraje důležitou roli v oplodnění a je závislý na výchozí kvalitě spermatu kance. Nízké počty spermií v místě oplodnění snižují vzájemnou konkurenci, a tím se umožní, aby se méně schopné spermie účastnily oplodnění vajíček, avšak takovéto spermie již nejsou schopny zabezpečit normální embryonální vývoj.

Cílem práce bude vyhodnotit počty spermií u sledovaných kanců na základě všech ročních období.

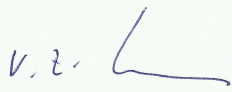
Výsledky počtu spermií z vybrané inseminační stanice rozdělíte dle ročních období a porovnáte vzhledem k požadovanému počtu, ale také navzájem a získané výsledky podložíte logickou úvahou a literárními fakty.

Rozsah grafických prací: 5 tabulek, 5 grafů
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:


Pulkrábek, J. a kol., 2005: Chov prasat, Profi Press, Praha
Jelínek, P., Koudela, K. a kol., 2003: Fyziologie hospodářských zvířat, 1. vydání,
Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
Články týkající se sledované problematiky v odborných a vědeckých časopisech
a internetových databázích (Náš Chov, Farmář, Agromagazín, Agroweb, Czech
Journal of Animal Science, Journal of Animal Science, Animal Reproduction
Science).

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Kateřina VOLFOVÁ
Katedra zootechnických věd

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2015
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2016


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 30. března 2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „**Faktory ovlivňující množství spermií v ejakulátu kanců**“ vypracoval samostatně, s použitím literatury a ostatních informačních zdrojů, které jsou v práci uvedeny.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách

Martin Štverák

V Českých Budějovicích dne 22. dubna 2016

Děkuji paní Ing. Kateřině Volfové, vedoucí bakalářské práce, za odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce. Rád bych poděkoval také dalším členům katedry speciální zootechniky za věcné připomínky a poskytnutí informací, kterými přispěli k vyhotovení této práce. Dále bych rád poděkoval panu Ing. Milanu Štverákovi a zaměstnancům ISKA, s.r.o. za jejich ochotu při poskytování dat nutných pro vypracování této diplomové práce.

Abstrakt

Faktory ovlivňující množství spermií v ejakulátu kanců

V reprodukci prasat již dlouhodobě zaznamenáváme sezónní i nárazové poklesy v produkci selat. Nejsou však zcela známé konkrétní ovlivňující faktory nebo míra jejich dopadu na plodnost prasnic a kanců. Existuje mnoho studií, zabývajících se příčinami poklesu říjivosti prasnic a snižováním kvality spermatu kanců, ale ani v naučné literatuře nebo v odborných chovatelských diskuzích není dostatek prostoru věnován snižování kvantity spermatu kanců. Právě počet spermií v ejakulátu hraje významnou roli v oplození a má také přímý dopad na plynulý chod inseminačních stanic kanců a tím pádem i jejich odběratelů.

Cílem práce bylo vyhodnotit počty spermií u sledovaných kanců na základě vlivu ročních období a porovnat je s ideální hodnotou. Veškeré údaje o množství spermií sledovaných kanců z let 2006 – 2010 byly rozděleny do skupin na základě data, kdy proběhl odběr ejakulátu. Tyto skupiny byly následně mezi sebou statisticky porovnány z hlediska průměrného celkového množství spermií v ejakulátu, průměrné koncentrace spermií a průměrného objemu ejakulátu.

Průměrný celkový počet spermií dosáhl nejvyšších hodnot v zimě, druhý nejlepší výsledek byl vyhodnocen na podzim, ten však nebyl příliš vzdálen od jarních výsledků, které také dosáhly uspokojivých hodnot. Nejnižší celkový počet spermií byl zaznamenán v létě, ale i tyto nízké hodnoty byly podle odborné literatury v normě. Průměrná koncentrace spermií dosáhla maxima opět v zimě, ale tentokrát s nevelkým náskokem před jarem, které také vykazovalo vynikající výsledky. Horších hodnot bylo dosaženo na podzim a nejnižší výsledky ze všech připadly znovu na léto. Některé zdroje dokonce uvádí, že výsledky pro podzim a léto jsou pod hranicí normy. U objemu ejakulátu byl překvapivě nejlépe vyhodnocen podzim, avšak s nevýrazným rozdílem bylo dosaženo druhých nejlepších hodnot v zimě. Oproti výsledkům z koncentrace spermií byly u objemu ejakulátu zaznamenány poměrně nízké hodnoty na jaře, ale nejhorší výsledky byly, dle očekávání, opět v létě.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že faktory související s probíhajícím ročním obdobím mají nezpochybnitelný vliv na produkci spermií plemenných kanců, přičemž tyto faktory poněkud odlišně působí na objem ejakulátu a na koncentraci

spermií. Podle všeho je nejvhodnějším obdobím k reprodukci zima a nejméně vhodným obdobím je léto.

Klíčová slova: plemenní kanci; plodnost; roční období; počet spermií

Summary

Factors influencing the amount of sperm in the ejaculate of boars

In the reproduction of pigs we have been seeing for long time seasonal and sudden declines in the production of piglets. But there are no completely known specific influencing factors or the extent of their impact on fertility of sows and boars. There are many studies dealing with the causes of decline of showing the estrus of sows and boars reducing sperm quality, but even in the educational literature or professional breeders discussions is not enough space dedicated to reducing the quantity of semen of boars. The number of sperm cells in the ejaculate plays an important role in fertilization and also has a direct impact on the smooth running of boar AI center and thus their clients.

The aim of the study was to evaluate sperm counts of observed boars under the influence of the seasons and compare them with the ideal values. All the data of the number of sperm of observed boars from the years 2006 – 2010 were divided into groups based on the date when sperm collection was conducted. These groups were then compared statistically among themselves in terms of the average total quantity of sperm cells in the ejaculate, average sperm concentration and average volume of ejaculate.

The average total number of sperm cells reached the highest values in winter, the second best results was evaluated in the fall, which was not too far from the spring results that have achieved satisfactory values. The lowest total sperm count was recorded in the summer but even these low values are according to professional literature in the standard. The average sperm concentration peaked again in the winter, but this time with a relatively small margin before spring, which also showed excellent results. Worse values were achieved in the fall and the lowest results from all fell back for the summer. Some sources even stated that the results for the fall and summer are below standard. For ejaculate volume was surprisingly best evaluated fall, but with only a slight difference the second best quality has been reached in winter. Compared to the results of the concentration of sperm cells in the ejaculate volume were recorded relatively low values in the spring, but the worst results were, as expected, again in the summer.

The results show that factors related to the ongoing season have undeniable impact on sperm production of breeding boars, these factors have somewhat different effect on semen volume and sperm concentration. By all accounts, the best time to reproduce is the winter and the least favourable time is summer.

Key words: boars; fertility; season; number of sperm cells

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Vývoj a popis reprodukčních orgánů kanců	2
2.1.1 Pohlavní orgány kance	2
2.1.2 Vznik pohlaví a vývoj pohlavního ústrojí	5
2.2 Anatomie a fyziologie spermíí	7
2.2.1 Spermatogeneze	7
2.2.2 Ejakulát kance	8
2.2.3 Spermie	9
2.2.4 Semenná plazma	10
2.2.5 Metabolismus spermíí	10
2.2.6 Faktory ovlivňující množství a kvalitu spermíí	11
2.3 Technika odběru ejakulátu a následné zpracování	12
2.3.1 Pohlavní dospívání kanců	12
2.3.2 Pohlavní reflexy – sexuální chování kanců	13
2.3.3 Fantóm	14
2.3.4 Nácvik kance ke skoku na fantóm	15
2.3.5 Odběr ejakulátu	15
2.3.6 Frekvence v odběrech kanců	17
2.3.7 Laboratorní hodnocení kančího spermatu	18
2.3.8 Ředění a konzervace spermatu	22
3 Cíl práce	25
4 Materiál a metodika	26
4.1 Charakteristika inseminační stanice kanců Albrechtice	26
4.2 Materiál	26
4.3 Metodika	27
5 Výsledky a diskuze	28
5.1 Celkový počet spermíí	28
5.2 Objem ejakulátu	28
5.3 Koncentrace spermíí	29
5.4 Doporučení pro praxi	30
6 Závěr	31
7 Seznam použité literatury	32
8 Přílohy	35

1.Úvod

Chov prasat patří nejen v České republice, ale i v celém světě k nejrozšířenějšímu a nejvýznamnějšímu odvětví živočišné výroby. V posledních letech však v ČR sledujeme významný pokles početních stavů prasat. Jedním z důvodů je nedostatečná konkurenceschopnost tuzemských chovatelů na evropském trhu. Ta je dílem způsobena nedosahováním dobrých výsledků v ukazatelých produkce a především reprodukce. Jedním z těchto ukazatelů je právě plodnost, ta je bezpochyby nejdůležitější vlastností v jakémkoliv chovu hospodářských zvířat, odvíjí se od ní další pokračování a i samotná existence provozu. Plodnost má však nízkou dědivost, a proto mají rozhodující vliv faktory vnějšího prostředí. Těchto faktorů je celá řada a působí jak na plodnost prasniček a prasnic, tak na plodnost plemenných kanců.

Tato bakalářská práce je zaměřena na vliv ročních období, tedy především teploty, na koncentraci spermií, objem ejakulátu a celkový počet spermií v ejakulátu plemenných kanců. Tyto údaje mají zásadní roli v procesu oplodnění, ale také do jisté míry ovlivňují samotný chod inseminačních stanic kanců a posléze jejich odběratelů.

Z praxe je dobře známo, že v průběhu roku dochází nárazově k sezóním poklesům v produkci selat, což je způsobeno nejen zhoršenou říjivostí prasnic, ale i sníženou kvalitou inseminačních dávek. Již proběhlo několik studií, které potvrdily výrazné zhoršení kvality spermií v důsledku zvýšené teploty stájového prostředí v letních měsících a zaznamenaly pravý opak v měsících zimních.

Hlavním úkolem této práce je však potvrdit nebo vyvrátit tyto vlivy ne na kvalitu, nýbrž na kvantitu spermií, což je téma, které je neprávem opomíjeno a mělo by být pečlivě prozkoumáno podrobnou analýzou. I přes nedostatek primárních i sekundárních zdrojů se ze svrchuřečených důvodů tato práce pokusí osvětlit nejasnosti ve zmíněné problematice.

2. Literární přehled

2.1. Vývoj a popis reprodukčních orgánů kanců

2.1.1. Pohlavní orgány kance

Pohlavní ústrojí samců a samic je v úzkém vztahu s močovým ústrojím, neboť obě vznikají ze stejného embryonálního základu a zachovávají si společné zakončení vývodných cest (Hovorka a kol., 1987). Pohlavní orgány kance slouží k tvorbě ejakulátu, pohlavních hormonů, k uskutečnění páření a oplození vajíček prasnice (oocytů) (Říha a kol., 2003).

2.1.1.1. Varlata

Varlata (*testes*) jsou párové orgány oválného vejcovitého tvaru. Jsou uložena ve vaku, který nazýváme šourek (*scrotum*). Šourek plní funkci ochranného pouzdra varlat (Říha a kol., 2003). Varle je místem produkce spermií a tvorby samčího pohlavního hormonu – testosteronu. Vazivový obal varlete tvoří přepážky, oddělující lalůčky varlete (*lobuli testis*), ve kterých se nachází stočené semenotvorné kanálky varlete (*lobuli seminiferi contortae*), v nichž probíhají jednotlivé fáze spermatogeneze (Jelínek a kol., 2003). Schopnost tvorby spermií je velká, neboť stočené kanálky představují nepřetržitě pracující „linku“ dlouhou 3-5 km (BAŽANT, 1988). Jeden gram varletní tkáně produkuje 20 až 30 milionů spermií za den (Pulkrábek a kol., 2005). Vedle zárodečného – spermatogenního epitelu jsou ve stěně kanálků podpůrné (Sertoliho) buňky, ve kterých probíhá poslední stadium spermatogeneze – metamorfóza spermatid ve spermie. Testikulární spermatozoa nejsou funkční, to jsou výhradně před dosažením ocasu nadvarlete, kde získají své fyziologické funkce (Guyonnet a kol., 2009). Ve vymezeném vazivu mezi stočenými semenotvornými kanálky jsou velké intersticiální (Leydigovy) buňky varlete s euchromatickým jádrem a výrazným jadérkem. Jsou bohaté na agranulární endoplazmatické retikulum, ve kterém je produkován samčí pohlavní hormon testosteron (Jelínek a kol., 2003).

2.1.1.2. Nadvarlata

Nadvarle (*epididymidis*) je orgánem, ve kterém se shromažďují spermie a

funkčně zde dozrávají. Vývodné kanálky varlete (*ductuli efferentes*) se postupně spojují v jednotný, klikatě probíhající vývod. Rozvinutý nadvarletní vývod měří u kance 50 m. Spermie vytvářené ve varleti přecházejí do hlavy nadvarlete, kde se zahušťují a jsou zde fagocytovány poškozené a přestárlé spermie (Jelínek a kol., 2003). Proximální část hlavy nadvarlete je významně aktivní jak sekreční, tak resorpční funkcí a zabezpečuje další postup spermií kinociliemi cylindrického epitelu bez dalších příměsí tekutin nebo buněčného dendritu. Spermie, které jsou uložené v ocasu nadvarlete, jsou ve stavu anabiózy, který brání metabolismu spermií a ztrátám jejich energie (Věžník a kol., 2004). Totéž uvádí i Bonet a kol. (2013). Doba průchodu spermií celým nadvarletem trvá 8-11 dní (Jelínek a kol., 2003).

2.1.1.3. Chámovody

Chámovod (*ductus deferens*) je silnostěnná trubice, která vystupuje z dutiny šourku a vstupuje do břišní dutiny. Z každého nadvarlete vede jeden chámovod a přes dutinu břišní a pánevní k močové rouře. Na jejím počátku chámovody ústí do močové roury a tak se močová roura stává močopohlavním kanálem. Délka chámovodu se pohybuje obvykle mezi 20 až 25 cm (Říha a kol., 2003). Jakmile chámovod opustí nadvarle a směřuje směrem do břišní dutiny, je spolu s tepnami, cévami, nervy, lymfatickými cévami a svalovinou obalen blankou, nazývanou seróza a tvoří semenný provazec (KOUDELKA, JÍLEK, 1996). U samců bez ampul chámovodů se spermie dostávají do močové roury při ejakulaci z ocasu nadvarlete kontrakčními vlnami celého chámovodu (Jelínek a kol., 2003).

2.1.1.4. Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*) se nacházejí na pánevní části močové trubice. Vyměšují sekret, který se při ejakulaci mísí se spermiemi a vytváří podstatnou část ejakulátu (semennou plazmu). Jejich sekrety představují vlastně přirozené ředidlo spermiím, pro něž upravují vhodné prostředí při jejich průchodu močovou trubicí a v pochvě (Jelínek a kol., 2003). Řízení sekrece je vázáno na hormonální aktivitu parenchymu varlat a produkci testosteronu, vyměšování pak na dobu ejakulace (Věžník a kol., 2004).

2.1.1.4.1. Semenné vacky

Semenné vacky (*vesiculae seminales*) jsou mohutnou párovou žlázou, která u starých kanců vazı přes 800 g a je dlouhá kolem 15 cm, produkuje až 500 ml sekretu při ejakulaci. V ejakulátu tvoří objemový podíl 20 až 25 %. Každa z obou zlazı ustı samostatným vývodem do mocopenhavnıho kanálu. Obě žlázy leží zčásti na horní ploše močového mechyre a castecne kolem močové roury (Říha a kol., 2003). Sekret semenných vacku obsahuje cukry sloužící spermíím jako zdroj energie, bílkoviny, volne aminokyseliny, kyselinu mléčnou a citrónovou, z enzymu predevsim alkalickou a kyselou fosfatázu a četné anorganické látky. Rozvoj a funkce semenných vacku, stejne jako i dalších přídatných pohlavních žláz jsou řízeny inkrecnı činnostı varlat, tj.í urovnı produkce testosteronu (Věžník a kol., 2004).

2.1.1.4.2. Predstojna žláza

Predstojna žláza (*prostata*) je u kanců poměrně malý nepárový orgán uložený na kreku močového mechyre a na začátku močové roury, do které ustıı četnými vývody. Sekret tvoří z objemu ejakulátu asi 5 % (Říha a kol., 2003). Obsahuje volne aminokyseliny, ne však cukry a relativně vysoký je obsah anorganických solí, které udrzıjı stejný osmotický tlak v ejakulátu (Jelínek a kol., 2003).

2.1.1.4.3. Bulbouretralnı (Cowperovy) žlázy

Bulbouretralnı žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou velký párový orgán o délce asi 15 cm a leží na močové rouře při jejím východu z pánve (Říha a kol., 2003). Sekret bulbouretrálních žláz je zásaditý, tvoří ochranu spermíím neutralizacı zbytků kyselé moči v uretře. Castecne se podílí i na lubrikaci (Věžník a kol., 2004). Sekret je převážně vylučován na konci ejakulace a vytvarı u kance huspeninovitou hmotu, tzv. vaginální zátku v deloznım kreku, která má zabranıt zpětnému výtoku semene (Jelínek a kol., 2003).

2.1.1.5. Pohlavnııı

Pyj (*penis*) je kopulačním orgánem, který umozņuje deponovat semeno do pohlavnıhoıstrojı samice při kopulaci a je souasne i odvodnou cestou moči mimo telo. Objemove nejvetsı část pyje tvoří toporıve teleso pyje obklopené fibrózním

obalem, od něhož pronikají do topořivého tělesa vazivové trámce. Mezi trámci jsou štěrbinovité prostory vystlané endotelem, do nichž vyúsťují větve tepen (*arterie profundae penis*). Snížením polštářkovitých návalků ve stěně tepen, které omezovaly tok krve, se při pohlavním vzrušení zvýší přítok krve a dochází ke ztopoření pyje – erekce. Močová trubice, nacházející se ve ventrální žlábků pyje, je obklopena houbovým tělesem pyje, které na konci penisu přechází v houbovité těleso žaludu (Jelínek a kol., 2003). Zakončení pyje u kance má tvar vývrtkovitě stočený doleva o délce asi 10 cm. Kořen pyje je zavěšen na spodině pánve dvěma závěsnými vazy, které při erekci a kopulaci uvolňují esovité zakřivení a vysunutí a po ejakulaci a opadu erekce zasunutí do předkožky (Říha a kol., 2003).

2.1.1.6. Předkožkový vak

Předkožku tvoří kanál, ve kterém je uložena koncová část pyje. Tento kanál je uvnitř vybaven četnými mazovými a tubulózními žlázkami. Produkty těchto žlázek spolu se zbytky moči, odloupanými buňkami výstelky, zbytky bílkovin s četnými mikroorganismy tvoří předkožkový maz, který se vyznačuje specifickým pachem. U kanců tvoří předkožka vychlípeninu do břišní dutiny (*diverticulum*), do které se dostávají zbytky moče a jiného organického znečištění, které jsou bohatou mikroflórou rozkládány při tvorbě páchnoucího obsahu, který někdy při páření a odběru semene tlakem na břišní krajinu nebo na fantomu při vzeskoku kance vytéká předkožkou ven. Specifický pach těchto produktů kance působí na prasnici v říji zesílením reakce na přítomnost kance, resp. Zvýšeným projevem reflexu nehybnosti. Při zánětu předkožky můžeme pozorovat vytvoření vychlípeniny předkožky směrem k zemi před jejím vyústěním na břišní krajině, kde se opět hromadí páchnoucí obsah (Říha a kol., 2003). U kance je předkožkový vak dlouhý asi 20 – 25 cm a v okolí ústí rostou dlouhé štětiny (JELÍNEK, JELÍNEK, 2006).

2.1.2. Vznik pohlaví a vývoj pohlavního ústrojí

Vývoj nového jedince začíná oplozením vajíčka. Konstelace sexchromozomů v době oplození určuje vznik pohlaví a vývoj pohlavního ústrojí. Vlastní zformování pohlavního ústrojí je složitý, stupňovitě probíhající proces, začínající v nejranějším stádiu vývoje nového jedince a končící až po narození a dosažení pohlavní dospělosti. Jednotlivými etapami na sebe postupně navazujícími je: a) vznik

chromozomálního pohlaví daný seskupením sexchromozomů při splynutí samčí a samičí pohlavní buňky a určující směr diferenciaci indiferentního základu, b) gonadální pohlaví vzniklé diferenciací indiferentního základu, c) somatické pohlaví vzniklé diferenciováním vývodných pohlavních cest, d) psychické pohlaví – je podmíněno dosažením pohlavní dospělosti, zformováním se pohlavního dimorfismu a specifických znaků pohlavního chování. Každá pohlavní buňka kromě polovičního počtu somatických chromozomů má jeden pohlavní chromozom (sexchromozom). Vajíčko savců má samičí sexchromozom X, zatím co polovina spermií má rovněž sexchromozom X, druhá polovina sexchromozom Y (Jelínek a kol., 2003). Spermie X a Y se rozlišují na základě obsahu DNA (HOFMO, 2006). Splynutím spermie s vajíčkem, tj. při oplození, jsou možné dvě kombinace (vznik konstelace) sexchromozomů. V případě oplození vajíčka spermií se sexchromozomem X vzniká jedinec s konstelací XX, tj. samičí pohlaví. V případě oplození vajíčka spermií s Y chromozomem vzniká konstelace XY, typická pro samčí pohlaví (Jelínek a kol., 2003).

Pohlavní orgány se z počátku vyvíjejí z indiferentního základu, majícího schopnost se diferencovat ve směr samčí nebo samičí (má bisexuální potenci) podle převahy v působení maskulinních nebo feminních faktorů určovaných gonadálním pohlavím. Indiferentní základ je tvořen dvěma nediferencovanými gonádami, dvěma páry Wolffových a Müllerových vývodů s urogenitálním sinem. Gonády vznikají z pohlavní řasy (*plica genitalis*) na obou stranách dorzální břišní stěny, kam migrovali velké primordiální zárodečné buňky z mezodermy. Zárodečný epitel pokrývající pohlavní řasy proliferuje, vychlípne se, a tak se vytvoří primární pohlavní pruhy (provazce). Posléze dochází k pohlavní diferenciaci, jejíž směr je určen genetickým pohlavím (Jelínek a kol., 2003). Již od 2. - 3. měsíce nitroděložního vývoje hospodářských zvířat začíná pohlavní diferenciaci (JELÍNEK, JELÍNEK, 2006). Vlastní diferenciacní změny jsou charakterizovány rozdílnou modifikací zárodečného epitelu, rozdíly v utváření pohlavních provazců a počtem pohlavních buněk. Diferenciaci vývodných pohlavních cest probíhá u samčích jedinců na základě aktivní sekrece testosteronu fetálními varlaty (aktivní diferenciaci) a poněkud dříve než u samičích jedinců. Produkce testosteronu způsobuje, že z Wolffových vývodů se vyvíjejí nadvarlata, chámovod a měchýřkovité žlázy a zanikají Müllerovy vývody (Jelínek a kol., 2003). Totéž uvádí i Reece (2010). Na přítomnosti nebo nepřítomnosti androgenní sekrece závisí i diferenciaci a vývoj vnějšího pohlaví ze

sinus urogenitalis. U samčího jedince se z něj vytváří prostata, bulbouretrální žlázy a samčí pohlavní orgán. Somatická diferenciacie je tedy ukončena ještě dlouho před narozením nového jedince (Jelínek a kol., 2003).

2.2. Anatomie a fyziologie spermíí

2.2.1. Spermatogeneze

Spermiogeneze je složitý proces, který začíná gonocyty a přes stádia vývoje končí spermíemi. Vývojový cyklus tvorby trvá asi 40 dnů (Říha a kol., 2003). Podle Jelínka a kol., 2003, pouze 35 dní. Poté spermie dozrávají v nadvarlatech. Získávají zde odolnost a plnou oplozovací schopnost po dobu asi 10 až 14 dnů, takže celý vývojový cyklus trvá asi 50 dnů (Říha a kol., 2003). Bažant J. (1988) uvádí, že celý proces spermiogeneze trvá 32 – 40 dnů. Hotové nepohyblivé spermie jsou připraveny k ejakulaci v ocasu nadvarlete. Denní produkce spermíí se pohybuje u dospělých kanců v rozmezí od 8 do 35 miliard. Je to individuální vlastnost (Říha a kol., 2003).

Spermie se vyvíjejí v točitých kanálcích varlete od období pohlavní dospělosti až do stáří 8 – 10 let (BAŽANT, 1988), podle Šmerhy a kol., 1964, do stáří 6 – 8 let.

Proces spermatogeneze s přihlédnutím na převažující charakter změn se dělí na: a) období rozmnožování (období mitotického dělení), b) období růstu, c) období zrání, meiozy (období zracích dělení), d) období metamorfózy (spermatohistogeneze, spermiogeneze) (Jelínek a kol., 2003).

Období rozmnožování je charakterizováno opakovaným mitotickým dělením původních kmenových buněk – A spermatogonií (primordiálních gonocytů). Každá mateřská buňka A – spermatogonie se rozdělí na dvě stejně velké dceřinné buňky. Jednu větší a podobnou mateřské buňce (A – spermatogonie), která zůstává po delší dobu v „latentním stadiu“ (interfáze) a druhou, menší intermediální buňku, která se opětovně několikrát dělí a výsledkem jsou buňky typu B (spermatogonie) (Jelínek a kol., 2003). Pokračováním buněčného dělení vznikají z B spermiogonií mladé primární spermioocyty (spermioocyty I. řádu). Primární spermioocyty po svém vzniku jsou lehce zaměnitelné se spermiogoniemi typu B jak velikostně, tak uložením (Věžník a kol., 2004). Na období množení navazuje období růstu, kdy spermatocyt I. řádu zvětší svůj objem. Období zrání (meiozy) je charakterizováno dvěma po sobě následujícími děleními a výsledkem je redukce počtu chromozomů na polovinu –

diploidní se mění na haploidní – a rekombinace genetických vloh. Vstupují do ní spermatocyty I. řádu a v prvním meiotickém dělení vznikají dva spermatocyty II. řádu. Druhým meiotickým dělením vznikají čtyři spermatidy (Jelínek a kol., 2003). Každý sekundární spermioct je již nositelem x nebo y chromozómu (Věžník a kol., 2004). Období metamorfózy (spermatohistogeneze) je poslední fází spermatogeneze, při níž se okrouhlá a nepohyblivá spermatida mění ve štíhlou, kopinatou a pohyblivou spermii. Probíhá ve výběžcích podpůrných buněk (Sertoliho buňky) a dílčí stadia metamorfózy jsou označována jako Golgiho stadium, stadium akrozomové čepičky, stadium kaudální manžety a stadium zrání. V podstatě dochází ke sledu následujících hlavních změn. Jádro spermatidy se prodlouží, oploští a posune k apikálnímu pólu buňky – formuje se hlavička spermie. Na předním pólu jádra se složitým procesem vytváří z Golgiho aparátu akrozom (čepička), který je nositelem specifických enzymů, rozpouštějících zónu pelucidu a cytoplazmatický obal vajíčka a tak umožňujících penetraci spermie do vajíčka a oplodnění. Oba buněčné centrioly se přesouvají k zadnímu pólu hlavičky a dávají vznik krčku a osovému vláknu bičíku spermie (vytváří je pohyblivý aparát spermie). Metamorfozované spermie se uvolňují z výběžků podpůrných buněk a dostávají se do lumen semenotvorných kanálků a do vývodných cest. Postup spermií do ocasu nadvarlete trvá v průměru 12 dní. Spermie se ukládají v ocasu nadvarlete a jsou nepohyblivé (Jelínek a kol., 2003). Životnost a oplozovací schopnost se udržuje po dobu 1 – 2 měsíců, což je umožněno dobrou výživou spermií, odvodem zplodin látkové výměny, nižší teplotou i změnou pH – spermie jsou ve stavu tzv. anabiózy (HAJÍČ, KOČVANEC, ČÍTEK, 1995).

2.2.2. Ejakulát kance

Ejakulátem u kanců označujeme celý produkt ejakulace. Po odnětí lepkavého želatinózního (rosolovitého) sekretu Cowperových žláz z ejakulátu filtrací získáme tekutou část ejakulátu, kterou označujeme jako sperma kance a tuto část zpracováváme pro inseminaci. Kančí ejakulát se skládá ze spermií (3 až 7 % z objemu) a sekretů přídatných pohlavních žláz, tj. z plazmy semenné (93 až 97 %). Semennou plazmu v ejakulátu tvoří asi 3 % sekretu nadvarlat, 20 % sekretu váček semenných, 15 % sekretu Cowperových žláz a 60 % sekretu prostaty a uretrálních žlázek. U kanců velký objem ejakulátu (plazmy) slouží jako médium pro dopravu spermií při páření. Hlavní složkou semenné plazmy je voda (97 až 99 %). Objem spermatu kanců (filtráru) se pohybuje v průměru na úrovni kolem 250 až 300 ml,

závisí to na věku kance. Koncentrace spermií v 1 mm³ je asi 300 až 400 tisíc a celkový počet spermií v ejakulátu kanců v inseminaci se pohybuje v rozpětí 50 až 90 miliard při pravidelné frekvenci odběrů, tj. Jeden odběr ejakulátu za 3 až 6 dnů (Říha a kol., 2003). Bažant J., 1988, uvádí, že koncentrace spermií v 1 mm³ je 250 až 300 tisíc.

2.2.3. Spermie

Spermie svou morfológickou stavbou představují buňky připravené k samostatnému životu a cílené funkci. Přenos genetické informace tvoří jádro, které se transformuje strukturálně i tvarově v průběhu spermatheliózy a svým konečným vzezřením udává v podstatě i tvar hlavičky spermie (Věžník a kol., 2004). Kančí spermie se podobá spermiím ostatních druhů hospodářských zvířat (BAŽANT, 1988). Skládá se z hlavičky, střední (spojovací) části bičíku a vlastního bičíku s terminálním úsekem (Říha a kol., 2003). Morfológicky je charakteristická větším akrozómem, zřetelným ekvatoriálním segmentem a delší spojovací částí bičíku, ve kterém je uložena rozhodující část enzymů pro metabolismus spermie a v omezené míře vlastní zásoby energetických látek (BAŽANT, 1988).

Kančí spermie se vyznačuje vysokou citlivostí na razantní změny (výkyvy) teploty, reaguje na to tzv. Chladovým (tepelným) šokem. Při mírném poklesu snižuje produkci energie a přestává se postupně pohybovat. Spermie postižené chladovým šokem nevratně (ireverzibilně) zastavují pohyb. Při mírném poklesu teploty pohyb ustává, až dochází při teplotě 15°C ke stavu anabiózy a při postupném zahřívání se pohyb obnovuje (reverzibilně) (Říha a kol., 2003).

Na spermii savců rozeznáváme obecně hlavičku, která je tvořena vejčitým jádrem a pokryta akrozómem (čepičkou) (BAŽANT, 1988). Hlavní obsah hlavičky tvoří jádro s obsahem dědičné hmoty (chromatinu) (Říha a kol., 2003). Akrozom je složen z mukopolysacharidů a obsahuje četné enzymy uplatňující se při pronikání spermie do vajíčka a jeho oplození. Krček spermie je krátký a spojuje hlavičku s bičíkem spermie. Obsahuje dva za sebou uložené centrioly (Jelínek a kol., 2003). Střední část bičíku (spojovací část) je u kančích spermií poměrně dlouhá. Uvádí se, že je zde uložena rozhodující část enzymů pro výměnu látkovou spermie. V bičíku jsou rovněž uloženy v omezené míře zásobní energetické látky. Za spojovací částí je bičík tvořen už jen axiálním vláknem a pochvou, která končí před koncem bičíku (BAŽANT, 1988). Koncový (terminální) oddíl bičíku je tvořen pouze osovým

vlákmem bez chord a fibrózní pochvy (Jelínek a kol., 2003).

Celá spermie (tj. hlavička a všechny oddíly bičíku) je pokryta nepřerušovanou dvouvrstevnou cytoplazmatickou membránou, která představuje základní ochranu spermie. Je acidorezistentní, vysoce permeabilní a citlivá na změny osmotického tlaku. Permeabilita membrány umožňuje látkovou výměnu spermií (Jelínek a kol., 2003).

2.2.4. Semenná plazma

Semenná plazma obsahuje převážně sekrety přídatných pohlavních žláz. Představuje přirozené prostředí pro spermie, umožňuje jejich výživu a transport v pohlavních orgánech samice. Má relativně stálý osmotický tlak a vyznačuje se velkými pufracími schopnostmi (Jelínek a kol., 2003). Kommisrud a kol. (2002) dodává, že semenná plazma je důležitá pro progresivní pohyb spermií. Charakteristickými znaky plazmy spermatu jsou neobvykle nízký obsah fruktózy, vysoký obsah ergothioneinu, inositolu a kyseliny citronové. Všechny tyto látky pocházejí prakticky ze sekretu váčků semenných. Fruktóza se využívá spermiemi k získávání pohybové energie, kyselina citronová způsobuje tuhnutí sekretu Cowperových žláz, ale také aktivizuje některé enzymy. Sekrece uvedených látek probíhá během ejakulace nepravidelně. Maximální množství se vyloučí asi v polovině ejakulace (BAŽANT, 1988). Ejakulát samců několika druhů zvířat obsahuje prostaglandiny, které působí jako uterotonikum a mohou pomoci spermiím dosáhnout vejcovodů. Kančí sperma však obsahuje minimální množství prostaglandinů (BIELAS, 2012).

2.2.5. Metabolismus spermií

Spermie jsou buněčný produkt organismu, jejichž jedinečnost spočívá ve schopnosti života mimo jeho entitu. Metabolická aktivita těchto buněk zajišťuje energii, která je využívána v mechanickém efektu – motilitě spermií. Převážná část energie je oxidací uvolňována v mitochondriích, v buňce je však spotřebována na různých funkčních místech, u spermií v dubletovém systému bičíku. Přenos energie se děje v buňce transportními látkami obsahujícími snadno štěpitelné chemické vazby s velkým obsahem energie – makroergické vazby. V buňce pro transport jsou nejdůležitější makroergické vazby kyseliny adenosintrifosforečné (ATP). Hlavní

funkci v syntéze kyseliny adenosintrifosforečné, která je přímým donorem energie, zastávají mitochondrie. Mitochondrie jsou připojeny na mikrotubuly cytoskeletu, což je fixuje na určitá místa vyžadující vysokou spotřebu ATP. ATP je mononukleotid složený z adeninu, ribózy a tří zbytků kyseliny fosforečné. Pro energetické přenosy v buňce je nejdůležitější reverzibilní hydroláza ATP na kyselinu adenosindifosforečnou (ADP). Tato reakce je katalizována enzymem adenosin trifosfatázou (ATPasa), kterou jsou vybavena raménka dubletových filament v bičíku spermie (Věžník a kol., 2004). Obecně mohou tedy spermie získávat energii trojím způsobem: 1. aerobním a anaerobním rozbouráváním některých hexóz (glykolýza), při kterém vzniká kyselina pyrohroznová nebo mléčná; 2. aerobní oxidací těchto produktů na CO₂ a vodu; 3. aerobní oxidací intracelulárních látek, zejména lipidů. Energie uvolňovaná postupně při rozbourávání fosforylovaných cukrů a jejich derivátů se obvykle akumuluje v makroenergetických vazbách ATP (Šmerha a kol., 1964). Teprve štěpením ATP se uvolní energie, kterou spermie použije k dalším transformacím v jiné formy energie. Předpokládá se, že při hydrolýze ATP je uvolněná energie transformována do bílkovin kontraktilních vláken bičíku (Věžník a kol., 2004).

2.2.6. Faktory ovlivňující množství a kvalitu spermií

Prasata patří mezi nejnáročnější hospodářská zvířata. Genetický potenciál mohou využít pouze ve zdravém prostředí. Reagují především na teplotu, vlhkost, ale i světlo, škodlivé plyny a prach (MATOUŠEK, 2013).

Ovlivnění objemu ejakulátů je navozeno řadou faktorů, zejména plemenem, genetickým základem, úrovní užitkovosti, intenzitou pohlavního využívání plemeníka, stupněm pohlavního vydráždění, technikou odběru semene, krmením, ošetřováním, ročním obdobím a významně se podílí i vyrovnanost organismu plemeníka v daném prostředí a jeho zdravotní stav (Věžník a kol., 2004).

V plodnosti plemeníků a jakosti jejich semena se projevuje zřetelně vliv klimatických činitelů, kteří se v průběhu roku uplatňují v různé intenzitě a tak podmiňují sezónní kolísání plodnosti. Tepelná složka klimatu působí především na spermatogenní činnost varlat, světlo pak přes zrak na gonadotropní aktivitu hypofýzy (Šmerda a kol., 1964). Almond a kol. (1994) také uvádí, že vliv ročního období na kvalitu semene je dobře známý, obě hraniční teploty a změna délky dne mohou působit na objem a počet spermií. Spermioogenezi negativně ovlivňuje vysoká teplota prostředí. Změny se projevují při krátkodobém působení teplot nad 30 °C nebo při

dlouhodobém působení teplot kolem 26 – 29 °C. Obecně lze konstatovat, že zvýšení teploty prostřední se průkazně projevuje v biochemickém složení plazmy spermatu, zhoršuje se kvalita spermatu a snižuje se oplozovací schopnost spermií (STUPKA, ŠPRYSL, ČÍTEK, 2009).

Změny plodnosti během ročního období jsou popsány u celé řady dalších ukazatelů, například byly stanoveny nižší hladiny testosteronu v krevní a semenné plazmě a nižší libido sexualis v létě. Sekrece měchýřkovitých a bulbouretrálních žláz vykazuje rovněž zřetelné kolísání během roku. Vyšší činnost těchto žláz byla zaznamenána na podzim a v zimě, nižší v letních měsících (SMITAL, 2002).

Teplota je předpokladem pro normální průběh všech funkcí organismu a má proto význam nejen pro udržení dobrého zdravotního stavu, ale i pro užitkovost. Odpovídající teplota prostředí je nutná pro zajištění normálního průběhu metabolických pochodů a pro zachování energetické rovnováhy. Teplotu prostředí je nutné posuzovat v souvislosti s relativní vlhkostí vzduchu, která se má pohybovat kolem 70 % (60 % - 80 %) (Hovorka a kol., 1987).

Objem spermatu byl největší od října do prosince a nejnižší v březnu a v dubnu. Koncentrace spermií byla nejvyšší v zimě a na začátku jara a nejnižší v pozdním létě a na začátku podzimu (WOLF, SMITAL, 2008).

2.3. Technika odběru ejakulátu a následné zpracování

2.3.1. Pohlavní dospívání kanců

Pohlavní dospívání je proces, jehož výsledkem je morfologická vyžralost a funkční schopnost organismu plnit úkoly spojené s reprodukcí. V průběhu pohlavního dospívání dochází pod vlivem gonadotropních hormonů k tvorbě specifických pohlavních hormonů. Jejich působením se začíná výrazněji formovat samčí typ, dochází k rozvoji spermiogeneze, k růstu přídatných pohlavních žláz atd. Rozvoj pohlavních orgánů, stejně jako jejich funkcí, je do určité míry podmíněn i způsobem odchovu. Individuální odchov bez kontaktu s ostatními zvířaty pohlavní dospívání zpomaluje (BAŽANT, 1988). I když příznaky sexuálního chování se začínají objevovat již po dosažení 3 měsíců věku, první ejakuláty od kanečků získáváme až v 5. nebo 6. měsíci věku. Sancho a Vilagran (2013) uvádí totéž. Z našich zkušeností dochází k radikálním změnám ve složení a v kvalitě ejakulátu od 5. měsíce. Roste zejména objem spermatu, koncentrace spermií, resp. počet spermií v

ejakulátu spolu s rostoucím objemem s každým měsícem věku spolu s poklesem morfologicky nedozrálých spermií. Ovšem k plemenitbě, ať již přirozené nebo k inseminaci, se nedoporučuje používat kance dříve než dosáhne 8 až 9 měsíců věku. Kanci zvyšují objem a počet spermií s věkem nejméně do dvou let dosaženého věku a sekrece feromonů („pachových“ látek tvořených ve varlatech), které silně vnímají prasničky a prasnice a které pozitivně ovlivňují jejich chování i fyziologické procesy s řídí spojené, se u kanců rozvíjí až po dosažení věku asi 10 měsíců. Z tohoto fyziologického hlediska je vlastně kancem plnohodnotným plemeníkem až po dosažení tohoto věku (Říha a kol., 2003).

Maximální objem, koncentrace a potencionální dávky byly od kanců starých 24 až 29 měsíců a nejmenší objem, koncentrace a potencionální dávky byly od kanců starých 8 měsíců nebo méně. Nicméně procento živých spermií a motility bylo nejvyšší u mladých kanců a postupně se s věkem snižovalo (KENNEDY, WILKINS, 1984).

Významným užitkovým znakem kance – plemeníka je tzv. libido sexualis (úroveň výrazu sexuálního chování), které je bohužel znakem s nízkou dědivostí, což pro šlechtitele je nepříjemná skutečnost (Říha a kol., 2003).

2.3.2. Pohlavní reflexy – sexální chování kanců

Pod vlivem gonadotropních (FSH a LH) a testikulárních hormonů (testosteron) začne u kanců vystupovat řada vrozených pohlavních reflexů, které na sebe navazují, čímž vytváří řetězec pohlavních projevů, které jsou nezbytné k uskutečnění pářícího aktu. Pohlavní reflexy jsou jednak nepodmíněné, tedy vrozené, které se realizují samostatně, nezávisle na vůli jedince, zpravidla jako důsledek podráždění vnímaný smyslovými orgány. Pohlavní reflexy vznikají na základě indiferentních podnětů, které vždy předcházejí sexuálnímu dráždění, vyvolávajícímu nástup nepodmíněných pohlavních reflexů. Mezi nepodmíněné pohlavní reflexy patří: a) distanční reflexy; b) kontaktní reflexy; c) kopulační reflexy (BAŽANT, 1988).

2.3.2.1. Distanční reflexy

Distanční reflexy, které se nazývají také sexuální předehrou. Slouží k vzájemné stimulaci a k určení svolnosti prasnice k páření. Reflex pohlavního sblížení kance s prasnicí se uskutečňuje na základě čichových, zrakových, sluchových,

případně dotkových vjemů. Projevuje-li prasnice příznaky svolnosti k páření, pokrývá ji kanec slinami, které obsahují feromony a tím více se zvýrazňují příznaky svolnosti k páření. Kanec během této doby může močit, občas zkouší reflex nehybnosti nadzvedáním prasnice hlavou. Reflex nehybnosti vyvolává u kance sexuální dráždění (BAŽANT, 1988). Tato milostná předehra je poměrně dlouhá (až 15 minut) a je třeba s tím počítat. Chrochtání kance, které svou intenzitou a zabarvením je pro tuto situaci typické, označujeme jako milostný zpěv (Říha a kol., 2001).

2.3.2.2. Kontaktní reflexy

Reflex vzeskoku se objevuje již u selat jako důsledek pohlavního dráždění. Příznaky erekce se však objevují až v pubertě tzn. asi od věku 140 dnů. Reflex vzeskoku a erekce je podmíněn i zkušeností kance (BAŽANT, 1988).

2.3.2.3. Kopulační reflexy

Kopulační reflexy jsou přirozeným dokončením reflexů. V jejich průběhu se uskutečňuje vlastní pohlavní akt a přenesení semene do pohlavních orgánů prasnice. Kopulační reflexy se skládají z reflexu vyhledávacího, reflexu zasunutí a reflexu frikčního. Po zasunutí spirálově stočeného hrotu pyje kance do krčku děložního frikční pohyby ustanou a dojde k reflexu ejakulačnímu (BAŽANT, 1988). Po vysemenění dochází obvykle bez zvláštního spěchu k seskoku kance, čemuž často napomůže i prasnice tím, že udělá několik kroků. Po seskoku kanec většinou o prasnici nejeví příliš intenzivní zájem, pokud se drží v její blízkosti, projevuje aktivitu spíše prasnice a kanec se od ní nechá očichávat a olizovat (Říha a kol., 2001).

2.3.3. Fantóm

Fantóm je konstruován tak, aby se jeho výška nad podlahou dala regulovat, aby byl pohodlný pro kance a byly na něm opěrky pro přední končetiny. Povrch by měl být elastický a omyvatelný. Přenosné fantómy pro nácvik kanců ke skoku by měly být kryty nejlépe kruponem. Podlaha pod fantómem nesmí být kluzká. Nejlepším řešením je podlaha z gumových dlaždic s hlubokým vzorkem zabraňujícím klouzání končetin kance při pokusech o skok a při seskoku po ejakulaci

(Říha a kol., 2001). Atrapy jsou většinou konstruovány z oceli a dřeva, s plátěným potahem (Almond et al., 1994).

2.3.4. Nácvi kance ke skoku na fantóm

Přijetí fantómu kancem jako atrapy je individuální. Nejlépe přijímají fantóm kanečci v prostředí, ve kterém jsou ustájeni, což je v karanténě prostor kotce (Říha a kol., 2003). Nejsilnější pozitivní reakce kanců ke skoku na atrapu bývají bezprostředně po jejich přesunu do karantény (tj. 2. až 3. den). Zvířata si zvykají na nové prostředí a vytváří si svůj „ohraničený“ životní prostor, ve kterém jsou spokojena a bezpečna. Právě v tomto „známém“ prostoru, je zvíře také nejochotnější přijímat případné další změny, kterými jsou nácviky ke skoku na atrapu (BAŽANT, 1988). Není vhodné, aby ošetřovatel byl při nácviku přítomen v kotci, neb jeho přítomnost působí rušivě. Kanec se nejprve seznamuje s fantómem kousáním, nadzdvihováním se zvukovým doprovodem, snaží se na atrapu vylézt. V této fázi chování dochází k sexuálnímu vzrušení a k pokusům o vzeskok na fantóm. Po několika pokusech, kdy se podaří kanci na fantómu zachytit, dochází ke spuštění erekčních a frikčních reflexů a teprve v této fázi se provede odběr. První odběry semene provádíme zásadně manuální metodou, kterou jsme schopni vyhovět individuálním požadavkům kance pro ejakulaci, a kterou používáme plošně na inseminačních stanicích v ČR (Říha a kol., 2003). Teprve po provedení cca 2 odběrů ejakulátu, kdy jsou fixovány podmíněné reflexy „na atrapu“ v kotci, je možné začít s vypracováním podmíněných reflexů „na místo“ (tzv. místnost na odběr spermatu) (BAŽANT, 1988). Úspěšnost pro kance mladší než 10 měsíců by měla být 90 %, a tito kanci mohou být většinou trénováni kolem 3-4 týdnů k tomu aby byli odebráni na atrapě. Úspěšnost u kanců starých mezi 10-18 měsíci je často menší než 70 % (Almond et al., 1994).

2.3.5. Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu od kanců v inseminačním provozu se provádí v připouštěcím boxu se zabudovaným nepřenositelným fantómem. Podmínkou pro ejakulaci po vzeskoku na fantóm je teplota a tlak na šroubovitě zakončení pyje. Při odběru ejakulátu na umělou vagínu se zajišťuje teplota ohřátou vodou na 39 až 42° C a tlak nahuštěním vzduchu mezi pevnou a elastickou (gumovou) vložku přehnutou oběma

konci přes okraj pevného zevního válce umělé vagíny. Dnes se u nás používá podstatně jednodušší způsob, tzv. metoda manuální, tj. způsob, při kterém uchopíme šroubovité zakončení pyje po erekci při vyhledávacích pohybech pyje rukou (zpravidla s navlečenou elastickou gumovou rukavicí) a tlak i teplota sevřené ruky splňuje podmínky pro ejakulaci (Říha a kol., 2003). Ruka napodobí děložní hrdlo prasnice a penis, který má podobu tuhé spirály, je do tohoto uzamčen. Jakmile je tohoto uzamčení dosaženo kanec se uklidní a začne ejakulovat. Někteří kanci jsou pomalejší v protlačování penisu a lze jim usnadnit proces masáží spodní strany břišní dokud se penis neobjeví (Almond et al., 1994). Sevření by v průběhu ejakulace nemělo ochabovat, jelikož snížení tlaku na penis vede k přerušení ejakulace a obnovení kančích přírazů (SMITAL, 2001). Výhodou tohoto jednoduchého způsobu je možnost měnit sevřenou rukou tlak na zakončení pyje podle fyziologických požadavků kance, možnost kontroly průběhu ejakulace a eliminace první frakce, odpadají ztráty spermií ulpěním uvnitř umělé vagíny, jednoduchost metody, nenáročnost na pomůcky, jejich mytí a sterilizaci (Říha a kol., 2003). Bažant (1988) také uvádí bezpečné oddělení obsahu diverticula. Analýza dat ukázala, že více spermií na ejakulaci bylo získáno metodou manuální (KING, MACPHERSON, 1973). Nevýhodou je asistence člověka po celou dobu ejakulace, což nevyžaduje odběr semene na umělou vagínu zachycenou na fantomu (Říha a kol., 2003). Semeno zpravidla již při ejakulaci zbavujeme želatinózního sekretu filtrací přes dvojitou sterilní gázu, přeloženou a uchycenou na hrdle sběrače. Nejlépe vyhovují jednorázové tenkostěnné sběrače – sáčky z nespermicidní fólie – vložené do pevné tepelně izolující formy. Před a při odběru spermatu klademe důraz na vhodné hygienické podmínky, aby se zabránilo zbytečnému mikrobiálnímu znečištění semene (BAŽANT, 1988). Po každém odběru se fantóm očistí a po skončení odběrů se okolí fantómu umyje, případně i dezinfikuje. Kance udržujeme v čistotě a před každým odběrem vyústění a okolí předkožky očistíme suchou nebo vlhkou utěrkou, případně i buničitou vatou (Říha a kol., 2003).

Ejakulace u kanců probíhá ve fázích a vlnách s několika přestávkami. Vylučování semene není nepřetržité, ale v periodických intervalech, proto je časově náročné. Trvá 5 až 7 minut a probíhá ve třech fázích (Říha a kol., 2003). Almond et al. (1994) uvádí 5 až 20 minut.

Prvá fáze je doprovázena ejakulací nažloutlé tekutiny, tzv. prespermiové frakce. Je to v podstatě vodnatě – lepkavá tekutina sekretu uretrálních žlázek s

obsahem ojedinělých zrněk sekretu bulbouretrálních žláz. Úloha této první frakce pravděpodobně spočívá v pročištění močové trubice kance, u přirozeného krytí pravděpodobně ještě ve funkci navlhčení vulvy a poševní předsíně. Objem této frakce činí 5 až 20 % z celkového objemu ejakulátu. Je to tekutina s vysokým obsahem mikroorganismů, která může zcela znehodnotit sperma pro inseminaci. Znečištěné sperma touto tekutinou poznáme podle „kančího zápachu“ odebraného spermatu (Říha a kol., 2003).

Druhou fází je ejakulace na spermie bohaté frakce, tzv. spermiové frakce, která probíhá v době 1 až 3 minut. Tato frakce obsahuje asi 80 % všech spermií z celého ejakulátu (Říha a kol., 2003). V praxi, nicméně, je často velmi obtížné rozlišit čistící frakci a frakci bohatou na spermie (Almond et al., 1994). Vizuálně ji poznáme podle hustoty a smetanově našedlého zbarvení. Tvoří 30 až 50 % objemu ejakulátu. Obsahuje mimo spermie sekret nadvarlat a malé množství sekretu prostaty a sekret semenných váčků s ojedinělými zrnky sekretu bulbouretrálních žláz (Říha a kol., 2003).

Třetí fáze je fází chudou na spermie, bohatou na sekret váčků semenných a hlavně na sekret bulbouretrálních žláz, který se v největším množství vylučuje právě na konci ejakulace. Tuto frakci nazýváme frakcí postspermiovou obvykle s charakteristikou největšího objemu z celkového objemu ejakulátu (40 až 60 %), se zbytkem spermií. Její ejakce trvá 1 až 5 minut (Říha a kol., 2003).

2.3.6. Frekvence v odběrech kanců

Po zařazení kance do inseminace je frekvence odběru semene ovlivňována kancem a jeho individuálními vlastnostmi. V zásadě by měla být volena frekvence odběru tak, aby nedocházelo ke snižování kvality ejakulátu, a by na druhé straně nedocházelo u kance při nízké frekvenci odběru semene k projevům onanie (BAŽANT, 1988). Dbáme na to, aby maximální pauza mezi skoky nepřekročila dobu 10 dnů, neb se po této době zhoršuje kvalita semene. Dlouhodobý pohlavní klid, delší než dva a půl měsíce, způsobuje degeneraci zárodečného epitelu a tím snížení produkce spermií s možností poruchy v plodnosti (Říha a kol., 2001). Nejdůležitější kritérium v tomto směru je věk kance. Ve věku kolem 12 měsíců je možné kance využívat jedenkrát týdně, ve věku 18 měsíců je možné provádět 5 – 6 odběrů měsíčně a ve věku 24 měsíců a později 8 – 9 odběrů měsíčně (BAŽANT, 1988). Pro návrat k původnímu stavu objemu postačí přestávka 3 až 4 dny, ale pro maximální

počet spermií 6 až 10 dnů (Říha a kol., 2003). Bažant (1988) však uvádí, že normální produkce spermií nastává po 5 – 6 denním klidovém intervalu. Chceme-li však dosáhnout maximální produkci spermií na časovou jednotku, pak snížíme pohlavní přestávku mezi odběry na 3 až 4 dny (Říha a kol., 2003). Swierstra (1973) toto tvrzení potvrzuje.

2.3.7. Laboratorní hodnocení kančího spermatu

Každý ejakulát kance v inseminačním provozu, dříve než je zpracován k inseminaci, je prověřován v laboratorních podmínkách. Když odpovídá kvalitou stanoveným parametrům, může se použít k inseminaci a naopak. Parametry spermatu pro kance v inseminaci jsou stanoveny přílohou sbírky zákonů č. 471/2000, částky 135, na str. 7381 (Říha a kol., 2003). Účelem laboratorního hodnocení semene je určit jeho kvalitu ve vztahu k dalšímu zpracování a použití pro inseminaci a stanovit nepřímo potenciální předpoklady oplozovací schopnosti spermií. Základními předpoklady pro oplozovací schopnost spermií se jeví přímočarý (progresivní) pohyb za hlavičkou (aktivita spermií) a normální morfologické utváření spermií s neporušeným akrozómem. Všechny odchylky od tohoto stavu mohou indikovat poruchy plodnosti pleménika. Progresivní pohyb spermií je předpokladem pro vyhledávání vajíčka a plní funkci dopravy genetického materiálu k ovulovanému vajíčku. Normálně utvářená akrozomová část s neporušeným enzymatickým systémem je podmínkou pro realizaci vlastního oplozovacího procesu, zejména pro proniknutí spermie do vajíčka. Normální genetické vybavení spermie dává předpoklad pro neporušený vývoj a přežití zárodků po oplození vajíčka (BAŽANT, 1988).

Tabulka 1: Požadavky na kvalitu spermatu a inseminační dávky

čerstvé sperma po odběru	a) mléčná až šedobílá barva a ostatní charakteristické vlastnosti spermatu (konzistence, bez zápachu), b) objem je nejméně 100 ml; u mladých kanců do věku 12 měsíců a u plemene duroc do 18 měsíců nejméně 80 ml, c) hustota je nejméně 150 000 spermií v mm ³ , d) obsahuje nejméně 70 % aktivních spermií, e) obsahuje nejméně 75 % morfologicky normálních spermií, f) neobsahuje patogenní mikroorganismy ani masivní nález nepatogenních mikroorganismů, g) neobsahuje cizí přímíseniny
krátkodobě konzervované sperma	a) obsahuje nejméně 1,5 x 10 ⁹ aktivních spermií v jedné inseminační dávce; b) objem jedné inseminační dávky je nejméně 80 ml, c) neobsahuje patogenní mikroorganismy,
dlouhodobě konzervované sperma	a) aktivita spermií po rozmrazení je nejméně 30 %, b) obsahuje po rozmrazení nejméně 2,5 x 10 ⁹ aktivních spermií v jedné inseminační dávce, c) neobsahuje patogenní mikroorganismy,

(Říha a kol., 2003)

2.3.7.1. Makroskopické posouzení spermatu

Ihned po dodání odebraného spermatu do laboratoře se sperma hodnotí makroskopicky (Říha a kol., 2003). Sperma nesmí obsahovat patogenní mikroorganismy, plísňe a cizí příměsy (krev, moč, hnis, obsah předkožkového váčku) a nesmí být znečištěno štětinami, stelivem nebo jinou nečistotou (BAŽANT, 1988).

Stanovení objemu ejakulátu je nejzákladnější a nejsnazší vyšetření ejakulátu. Objem ejakulátu se stanovuje okamžitě po jeho získání v odměrných nádobách nebo vážením (Věžník a kol., 2004). Většinou kanec poskytne 150 – 250 ml semena, ale objem může mít rozpětí i 50 – 500 ml (Almond et al., 1994). Bažant (1988) uvádí, že v průměru se získává 250 – 300 ml ejakulátu. Případně můžete ejakulát zvážit (1 g = přibližně 1 ml) než měřit objem přímo (Almond et al., 1994).

Barva má být mléčně bílá nebo šedobílá. Změny do žluta, zelena, růžova a hněda poukazují na znehodnocení ejakulátu močí, krví, hnisem nebo nečistotou. Málo krycí bílá barva svědčí o nízké koncentraci spermií v ejakulátu (BAŽANT, 1988).

Pach ejakulátu by měl být nevýrazný (po vaječném bílku) nebo slabě specifický (BAŽANT, 1988). Čistý ejakulát má nevýrazný pach. Ejakulát, který byl kontaminován tekutinou z předkožkového vaku má velmi výrazný pach (Almond et al., 1994).

2.3.7.2. Mikroskopické posouzení spermatu

Mikroskopické vyšetření se provádí ihned po jeho získání nejpozději za 15 minut. K tomuto vyšetření se bere průměrný vzorek ejakulátu skleněnými pomůckami, zahřátými na 30 – 35 °C. Před odběrem vzorku se musí ejakulát šetrně skleněnou tyčinkou promíchat z důvodu sedimentace spermií. Vzhledem k velké citlivosti spermií na změny teploty je třeba, aby veškeré pomůcky a nástroje, se kterými sperma při vyšetřování přichází do styku byly temperovány v rozpětí 30 – 35 °C, pokud se nedoporučují teploty jiné (38 – 40 °C) (BAŽANT, 1988).

Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu je jednou ze základních informací o jeho kvalitě a úrovni funkce spermiogenetického epitelu (Věžník a kol., 2004). Koncentrace spermií se vyjadřuje v tisících spermií v 1 mm³ spermatu. Spermie se počítají po příslušném naředění a znehybnění pod mikroskopem v počítací komůrce, také v Karrasově spermiodenzimetru, dnes většinou fotometricky (Říha a kol., 2003). Almond (1994) uvádí též hemocytometr, což je speciální podložní destička, která se využívá ke spočítání množství spermií v ejakulátu. Fotometrické stanovení koncentrace je orientační a provádí se především v rutinních provozních laboratořích. V podstatě jde o nefelometrické stanovení stupně zákalu, který vznikne po standardním naředění nativního semene s daným objemem ředidla (příprava suspenze se volí podle použitého spektrofotometru a kyvet). Nefelometry specificky kalibrované mají na stupnici místo hodnot extinkce přímo údaje o koncentraci spermií. Tento způsob stanovení koncentrace při zkontrolované kalibraci je provozně vhodný a za daných podmínek objektivní. Časově nenáročný postup spolu s nenáročnou přístrojovou vybaveností ho určuje k využití pro větší provozy inseminačních stanic. U kance se 250 µl semene přidá do zkumavky s 9 ml 1 N roztoku HCl. Po důkladné homogenizaci se provede měření (Věžník a kol., 2004). Potencionální problém s fotometrem je ten, že epitelové a jiné somatické buňky, stejně tak proteiny s velkou molekulovou hmotností, také blokují přenos světla skrze vzorek. Pokud je v dávce dostatek těchto nespermatických buněk, čtečka propustnosti může indikovat vysokou koncentraci spermií (Almond et al., 1994).

Aktivita spermií je důležitým selektivním kriteriem pro použití semene k inseminaci. Posuzuje se mikroskopicky, při 200 – 300 násobném zvětšení na podložním sklíčku zahřátém na 40 °C (BAŽANT, 1988). Kopřiva a kol. (1996) ještě dodávají, že mikroskop musí být opatřen fázovým kontrastem. Výpočet se vyjadřuje buďto v procentu pohyblivých spermií nebo metodou bodového odhadu, kdy jeden

bod reprezentuje 20 % pohyblivých spermií. Hodnocení pohyblivosti se provádí většinou v ejakulátu naředěném fyziologickým roztokem pufovaným fosfátovým puforem na pH 6,8. Stupeň ředění závisí na koncentraci ejakulátu, volí se proto takové ředění aby v 1 mm³ suspenze bylo cca 100 000 spermií (Věžník a kol., 2004). Kapka semene se přenesse pipetou, nebo skleněnou tyčinkou na podložní sklíčko a překryje se krycím sklíčkem. Aktivita se musí posuzovat bezprostředně po přiložení krycího sklíčka, protože spermie po zamezení přístupu kyslíku rychle ztrácejí pohyblivost (BAŽANT, 1988). Hodnotí se minimálně tři zorná pole. Při posuzování motility se hodnotí taktéž charakter pohybu, přičemž se určuje jeho směr a rozsah kmitu hlavičky spermie. Přímý progresivní pohyb je znakem funkční plnohodnotnosti a má jej vykazovat při dobrém ejakulátu 70 % spermií (Věžník a kol., 2004).

Morfologické odchylky spermií se hodnotí zpravidla při zvětšení 1500x , abychom mohli posoudit i drobné změny na spermiích mimo změn na prvý pohled registrovaných (Říha a kol., 2003). Pulkrábek a kol. (2005) uvádí zvětšení 1500 až 2000x. Výsledky morfologické analýzy jsou v úzkém vztahu se spermiogenetickými pochody. K poškození spermií však může dojít i v průběhu jejich pasáže přes vývodné pohlavní cesty, po styku s chorobně změněnou semennou plazmou, při nesprávné manipulaci v laboratoři, v důsledku nevhodného ředění a také v důsledku chyb při skladování semene (BAŽANT, 1988). Čerovský a kol. (2005) také uvádí, že změny ve tvarech spermií mohou být výsledkem patologických procesů, které mají vliv na varlata a nadvarlata. Zjištěné odchylky od normálního utváření spermie se počítají a vyjadřují se v procentech z počtu vyšetřených spermií. V praxi se považují spermie s jednou nebo více odchylkami jako spermie defektní (abnormální, patologické). Zpravidla se hodnotí 200 spermií a z nich se pak procenticky vyjádří procento abnormálních. Spermie pro toto hodnocení musíme obarvit. Používá se tzv. diferenciální barvení, jehož výsledkem je odlišné zbarvení částí spermie a zejména zbarvení akrozomu (Říha a kol., 2003). Věžník a kol. (2004) a Bažant (1988) uvádí barvení podle Hancocka, podle Farellyho a podle Papanicolaoua, nadále metodu Wels X a metodu dle Čerovského. I když se používá ještě v současné době dělení morfologických odchylek na primární, které údajně vznikají v průběhu spermiogeneze a na sekundární, které vznikají až po ukončené spermiogenezi, ukázalo se, že toto striktní dělení není absolutně přesné, protože u některých změn není doloženo, kde vznikly. Primární změny jsou považovány za závažnější. Za nadlimitní výskyt se považuje více než 25 % morfologicky změněných spermií.

Morfologické vyšetření spermií může provádět pracovník školený proto, aby poznal celou škálu morfologických odchylek a rozeznal skutečné morfologické změny od artefaktů, tj. sekundárních změn vzniklých manipulací se spermatem. Vyšetření se provádí nejméně 1 x měsíčně u všech kanců (Říha a kol., 2003).

Přežitelnost spermií se hodnotí v ředěném konzervovaném spermatu kontrolou aktivity spermií v průběhu celé doby použitelnosti k inseminaci (Říha a kol., 2003).

Mikrobiologické vyšetření spermatu se provádí jedenkrát za půl roku (BAŽANT, 1988). Říha a kol. (2003) uvádí totéž. U semene lze hovořit o mikrobielním znečištění, neboť primární obsah mikrobů přímo z varlete nebo nadvarlete by mohl přicházet v úvahu jen při zánětlivých změnách parenchymu varlat nebo vývodných cest. Většinou se dostávají do semene mikroorganismy z vnějšího prostředí a to z předkožkové vychlípeniny nebo při nehygienickém odběru, získávání spermatu do nesterilních pomůcek a podobně. Důležitost nízkého nebo nulového mikrobielního znečištění je značný, neboť škodlivý vliv mikroorganismu je buď přímý a nebo prostřednictvím mikrobielních toxinů, které mají silný spermicidní účinek. Stejně nepříznivý vliv má i obsah plísní (BAŽANT, 1988).

2.3.8. Ředění a konzervace spermatu

Semeno se ředí proto, aby se získal větší objem a tím i možnost rozdělení ejakulátu na více inseminačních dávek (BAŽANT, 1988). Semeno se ředí ze dvou důvodů: pro zvětšení objemu ejakulátu, aby mohlo být vytvořeno více inseminačních dávek, a k vytvoření optimálního prostředí pro spermie, ve kterém zůstanou naživu několik dní. Ředidla na semeno obsahují zarážedla a živiny pro spermie. Ředidla také obsahují antibiotika k potlačování růstu bakterií v ejakulátu během skladování (Almond et al., 1994). Při ředění spermatu postupujeme tak, že ředidlo o stejné teplotě jako je sperma postupně po skle přiléváme do semene a to nejprve ve stejném množství, jako je objem spermatu. Naředíme tak sperma v poměru 1 + 1. Provádíme tak nejprve tzv. předředění spermatu. Poté za 10 až 20 minut se provede doředění na předem určený objem. Stupeň ředění spermatu, resp. konečný objem naředěného spermatu, určuje zvolený počet aktivních spermií v jedné inseminační dávce a celkový počet aktivních spermií ve spermatu. Vydělením celkového počtu aktivních spermií stanoveným počtem spermií v jedné inseminační dávce získáme údaj, kolik inseminačních dávek můžeme naředěním daného spermatu získat. Znásobením počtu

inseminačních dávek objemem jedné dávky vypočteme celkový objem ředěného spermatu a odečteme-li od tohoto objemu objem neředěného spermatu, dostaneme údaj o tom, kolik ředidla musíme přidat ke spermatu. K inseminaci se používají inseminační dávky s obsahem 1,5 až 3 miliardy spermií, u zmrazeného spermatu 2,5 až 5 miliard a o objemu 80 až 100 ml (Říha a kol., 2003). Almond et al. (1994) uvádí: Směřovat minimálně k 2×10^9 a maximálně k $4,5 \times 10^9$ životaschopným spermiím v jedné inseminační dávce, která by měla mít minimálně 70 ml. Názory na podíl semenné plazmy v inseminační dávce a na její význam pro oplozovací proces se dosud neshodují (Říha a kol., 2003).

Princip konzervace spermatu je uvedení spermií do stavu dočasné anabiózy (polospánku), kdy metabolismus spermií je nejnižší. Tohoto stavu dosahujeme snížením teploty na $+16$ až $+18$ °C a složením ředidel. V průběhu konzervace nesmí dojít k poškození povrchových membrán akrozomu, aby nedošlo k poškození jejich oplozovací schopnosti. Ředidla používaná při konzervaci kančího spermatu proto obsahují ochranné a výživné látky. Jedná se především o glukozu, citronan sodný, uhličitan sodný, chelaton a aminokyseliny (Kopřiva a kol., 1996).

Dostupné jsou dva hlavní typy ředidel: Dlouhodobá ředidla: Tyto prodlužují životaschopnost spermií o 5 – 7 dní a měla by být použita když je semeno skladováno několik dní nebo je přepravováno na dlouhou vzdálenost. Krátkodobá ředidla: Tyto prodlužují životaschopnost spermií po dobu až 3 dnů a jsou široce využívána na celém světě pro rutinní práci (Almond et al., 1994). Víme, že krátkodobá ředidla jsou široce využívána, ale dlouhodobá ředidla jsou zajímavá tím, že musí uchovat nejen životaschopnost spermií, ale také jejich pohyblivost po požadovanou dobu (Frydrychová a kol., 2010).

Po naředění zkontrolujeme aktivitu spermií a naředěné sperma dávkujeme zpravidla do plastových jednorázových obalů – 1 obal = 1 inseminační dávka. Vyrobené inseminační dávky ukládáme do termoboxů a konstantní teplotou mezi 16 až 18 °C (Říha a kol., 2003). Bažant (1988) uvádí 15 – 18 °C. Rozkot (2013) uvádí 17 °C \pm 1 °C. Zde se postupně inseminát zchlazuje až na uvedenou teplotu. Pokles teploty naředěného spermatu by neměl být vyšší než 3 °C za 1 hodinu (Říha a kol., 2003). Což Bažant (1988) uvádí také. Uvedenou teplotu bychom měli zachovat i při transportu z centrálních inseminačních stanic a při skladování na místě použití, tj. v zemědělském podniku až do doby použití k inseminaci (Říha a kol., 2003).

Mimo krátkodobou a střednědobou konzervaci spermatu v tekutém stavu se

ve velmi omezeném měřítku sperma ředí speciálními postupy a ředidly pro dlouhodobou konzervaci hlubokým zamrazením na teplotu tekutého dusíku, tj. - 196 °C. Prakticky se zamrazují jen spermie bez semenné plazmy (po odstředění) v malém objemu speciálního ředidla s přípravkem glycerolu, který slouží jako ochrana proti zhroucení struktury spermie při zmrazování a rozmrazování (Říha a kol., 2003). Sperma se zmrazuje buď v peletách (kuličkách) od 0,16 ml až do 2 ml objemu nebo v pejetách o objemu 5 – 10 ml. Existuje ještě kombinovaná metoda spočívající v umístění pelet v pejetách (BAŽANT, 1988). Takto zmrazené spermie se uchovávají v tekutém dusíku ve speciálních nádobách (kontejnerech) neomezeně dlouhou dobu. Těsně před použitím k inseminaci se zmrazené semeno rozmrazuje a ředí některým ředidlem pro krátkodobou nebo střednědobou konzervaci až na objem inseminační dávky a okamžitě se použije k inseminaci (Říha a kol., 2003).

3. Cíl práce

V reprodukci prasat již dlouhodobě zaznamenáváme sezónní, ale i nárazové poklesy v produkci selat. Bohužel nejsou jednoznačně známé důsledky konkrétních ovlivňujících faktorů. V odborné literatuře i odborných chovatelských diskuzích se mimo jiné uvádí jako příčina sezónní biologický charakter rozmnožovacího procesu prasat, což potvrzují poklesy říjivosti prasnic a prasniček i kvality spermií v ejakulátech kanců. Také však počet spermií hraje významnou roli v oplodnění a je závislý na výchozí kvalitě spermatu. Nízké počty spermií v místě oplodnění sníží svoji vzájemnou konkurenci, a tím se umožní, aby se méně schopné spermie účastnili oplodnění vajíček, avšak tytéž spermie nejsou již schopné zajistit plnohodnotný embryonální vývoj.

Cílem práce bylo vyhodnotit počty spermií u sledovaných kanců na základě vlivu ročních období a porovnat je s ideální hodnotou. Veškeré údaje o množství spermií sledovaných kanců z let 2006 – 2010 byly rozděleny do skupin na základě data, kdy proběhl odběr ejakulátu.

4. Materiál a metodika

4.1. Charakteristika inseminační satnice kanců Albrechtice

Tato společnost vznikla v roce 1992 jako sdružení Štverák, Tramba. Sídlo sdružení bylo do roku 1997 v Čížové, ale od února téhož roku je sídlo v Albrechticích nad Vltavou. Od roku 2002 jde o společnost s ručením omezeným.

Největším výrobně – obchodním objemem společnosti ISKA s.r.o., je výroba a prodej inseminačních dávek z kanců genetiky PIC. Také nabízí služby v oblasti poradenství v chovu prasat a obchoduje s inseminačním materiálem.

Zdrojem zvířat jsou nukleové chovy Náhlov v České republice, Wulkov v Německu a Kanadský chov Aurora. ISKA má vždy ustájeno přibližně 100 kanců ze 4 linií. Z mateřských to jsou linie 02, vycházející z plemene Landrase a 03 z Bílého ušlechtilého. Z otcovských to jsou linie 408, původem z Pietrainy, a linie 337, jejíž původ je v současnosti utajován, ale vyšlechtěna byla v USA.

Firma ISKA vyprodukuje za týden přibližně 3000 až 4000 inseminačních dávek a zaměstnává 7 kmenových zaměstnanců. Odběry semene probíhají 6 dní v týdnu a inseminační dávky jsou dopravovány do chovů v České republice, ale i v Itálii, Polsku, Rusku, Chorvatsku, Rumunsku a Řecku.

Samotná stanice se nachází ve výšce 380 m. n. m. Průměrná roční teplota v době pokusu byla mezi 7 °C a 10 °C. Průměrný roční úhrn srážek se pohyboval mezi 500 mm až 600 mm.

Kanci v ISKA jsou ustájeni ve 3 halách v individuálních koticích o rozměru 6 m², v jedné z těchto hal je roštová podlaha, zatímco v ostatních je podlaha pevná a stele se zde slámou. Krmení probíhá ručně. Odkliz hnoje zajišťuje hydraulický dopravník a vynašeč.

4.2. Materiál

Pro tuto bakalářskou práci byla použita data z programu Kňur 309, vytvořeného Ing. Pavlem Soukupem přímo pro firmu ISKA. V tomto programu jsou zaznamenány informace o jednotlivých provedených odběrech a to zejména identifikační číslo kance, datum odběru, koncentrace spermií, objem ejakulátu, motilita spermií, přežitelnost spermií a počet vytvořených inseminačních dávek. Pro tuto práci byly použity záznamy o objemech ejakulátů, koncentracích spermií a datech jednotlivých odběrů. Svrchuřčené záznamy jsou z období od 2. 7. 2006 až do

20. 12. 2010. Dohromady byly zpracovány informace z 21 767 provedených odběrů. Do sledování nebyly zařazeny „kondiční skoky“ (tj. odběry semene, které se uskutečňují z důvodu předcházení dlouhodobé sexuální abstinence a nejsou používány v inseminaci), ale pouze odběry, které byly následně zpracovány do inseminačních dávek. Celkový počet kanců, kteří byli odebíráni během sledování je 336.

4.3. Metodika

Na základě informací o koncentraci spermií a objemu ejakulátu byl vypočítán celkový počet spermií z každého odběru. Tyto údaje byly následně rozděleny do 4 skupin podle toho, kdy daný odběr proběhl. Skupiny jsou následující: Jaro (1. 3. - 31. 5.), Léto (1. 6. - 31. 8.), Podzim (1. 9. - 30. 11.) a Zima (1. 12. - 28. 2.).

Veškerá data o celkovém počtu spermií, koncentraci spermií a objemu ejakulátu byla roztríděna v programu EXCEL, zde byly též vyhodnoceny průměrné, maximální a minimální hodnoty z uvedených skupin. Rozdíly mezi jednotlivými ročními obdobími byly vyhodnoceny programem STATISTIKA 12 pomocí ANOVY.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Celkový počet spermií

Průměrné celkové množství spermií získané od jednoho kance z jednoho odběru nekleslo pod 74 miliard a nepřesáhlo hodnotu 87 miliard, což je podle Říhy a kol. (2003) v normě, zvláště pokud jde o pravidelně odebíraného plemeníka. Nicméně je zde zřetelný rozdíl mezi hodnotami v létě, kdy vyšlo cca 74,5 mld. spermií a v zimě, kdy byl výsledek cca 86 mld. spermií (Příloha 1). Tyto výsledky se liší přibližně o 11 miliard spermií (Příloha 7), což už může v praxi znamenat vyrobít o 5 inseminačních dávek méně či více. Hodnoty pro jaro a podzim (Příloha 7) jsou srovnatelné a rozdíl mezi nimi nepřesahuje 2 miliardy spermií. Na jaře byla průměrná hodnota téměř 81 mld. spermií, což je v porovnání s létem dobrý výsledek. Průměrné hodnoty na podzim byly ještě příznivější a vychází přes 82 mld., čímž už se blíží k zimním hodnotám a jsou výrazně lepší než hodnoty letní (Příloha 1).

U testování ANOVOU, kde jsme porovnávali všechny roční období mezi sebou, byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Tyto výsledky jasně poukazují na vliv či vlivy faktorů, které mají spojitost s ročním obdobím, ať už se jedná o teplotu nebo délku fotoperiody jak uvádí Almond a kol. (1994). Stupka a kol. (2009) uvádí, že k negativnímu ovlivnění spermiogeneze může dojít dlouhodobým působením teplot kolem 26 – 29 °C, kterým mohli být plemeníci vystaveni obzvláště v měsíci červenci v letech 2006 – 2010 (Přílohy 2 až 6).

5.2. Objem ejakulátu

Hodnocení objemu ejakulátu ukázalo, že největší průměrný objem ejakulátu mají plemeníci na podzim, téměř 292 ml, což se shoduje s výsledky, kterých dosáhl Wolf a Smital (2008). Druhé nejvyšší průměrné hodnoty bylo dosaženo v zimě, více než 280 ml (Příloha 8), což je celkem zanedbatelná odchylka. V zimě byl také zaznamenán vzorek s největším objemem ejakulátu (Příloha 1).

Znatelně nižších hodnot bylo dosaženo na jaře a v létě, kdy se výsledky pohybovaly mezi 265 a 267 ml. Tento trend potvrzuje i Smital (2002), který uvádí, že důvodem je snížená činnost měchýřkovitých a bulbouretrálních žláz. Rozdíl mezi hodnotami v zimě a na jaře je cca 14 ml (Příloha 8). Podle Říhy a kol. (2003) jsou

všechny tyto výsledky v normě.

U testování ANOVOU, kde jsme porovnávali všechny roční období mezi sebou, byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Na těchto výsledcích je dobře patrné, že nejvyšší průměrné hodnoty na podzim mají v průběhu roku sestupnou tendenci až do léta, kdy je průměrná hodnota nejnižší (Příloha 8). Mezi těmito extrémy však není rozdíl větší než 30 ml, což svědčí o poměrně nevýrazné kolísavosti objemu ejakulátu v průběhu roku. Přesnějších výsledků by bylo nejspíše dosaženo, kdyby byl brán zřetel na věk odebíraných kanců, který má, jak potvrzuje Říha a kol. (2003), významný vliv na objem ejakulátu.

5.3. Koncentrace spermií

Při hodnocení koncentrace spermií bylo dosaženo nejlepších výsledků opět v zimě, více než 320 000 spermií na mm^3 , avšak druhé nejvyšší hodnoty, kolem 319 000 spermií na mm^3 , bylo dosaženo na jaře (Příloha 9). Wolf a Smital (2008) tyto závěry potvrzují, stejně tak jako nižší hodnoty, které byly zaznamenány v létě a na podzim, vždy přibližně 296 000 spermií na mm^3 (Příloha 1). Na rozdíl od hodnot z objemu ejakulátu, zde mělo výrazně lepší výsledky jaro než podzim, téměř o 20 000 spermií na mm^3 . Největší rozdíl, cca 25 000 spermií na mm^3 , je, dle očekávání, mezi zimou a létem. Hodnoty v zimě jsou od podzimních hodnot také poměrně výrazně vzdáleny (Příloha 9). Podle Bažanta (1988) jsou výsledky pro léto a podzim v normě, zatímco jaro a zima jsou dokonce značně nadprůměrné. Říha a kol. (2003) však vidí hodnoty na jaře a na podzim pod průměrem.

Vzorek s nejvyšší naměřenou koncentrací spermií byl získán na podzim, zatímco nejnižší koncentrace byla zaznamenána v létě (Příloha 1). Tyto hodnoty je však třeba brát s odstupem, zvláště jedná-li se o záznamy vzorků s nejnižší zjištěnou koncentrací spermií, neboť v takových případech je velmi pravděpodobné, že došlo k pochybení zootechnika při odběru, nebo že odběr nebyl patřičně dokončen, ale v laboratoři byl přesto zhodnocen.

U testování ANOVOU, kde jsme porovnávali všechny roční období mezi sebou, byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$).

Z těchto výsledků lze usoudit, že roční období, neboli teplota stájového prostředí a délka fotoperiody, má daleko výraznější vliv na koncentraci spermií než

na objem ejakulátu.

5.4. Doporučení pro praxi

Výše uvedené výsledky potvrzují, že roční období má nezanedbatelný vliv na reprodukční systém plemenných kanců, který se odráží v objemu ejakulátu, v koncentraci spermií a tedy i v celkovém počtu spermií v ejakulátu. S nejvyšší pravděpodobností je jedním z nejvýznamějších faktorů příliš vysoká teplota stájového prostředí v letních měsících, což potvrzují i výsledky Šmerdy a kol. (1964), ale také Stupky a kol. (2009).

Z těchto závěrů vyplývá, že v praxi bychom měli brát zvýšený ohled na udržení stálé nižší teploty ve stájovém prostředí, konkrétně alespoň pod 25 °C a to především v letních měsících. Toho lze docílit několika způsoby, například zajištěním cirkulace vzduchu pomocí výkonné ventilační soustavy nebo i samotným rozvržením budovy stáje. Prospěšné může být také pravidelné namáčení samotných kanců studenou vodou, které nejen že napomůže předejít přehřátí organismu a z něho plynoucích obtíží, ale také je pro kance v letním období velmi příjemné.

Investice do zařízení a metod napomáhajících stájové homeostáze může být nákladné, ale je třeba zvážit jejich kladný efekt na plemeníky i na chod podniku. Jde zde o zmenšení kolísavosti mezi výsledky z odběrů jednotlivých kanců avšak také o omezení významného stresového faktoru. Takové změny jsou jistě pozitivní pro fungování inseminačních stanic kanců stejně jako pro jejich zákazníky.

6. Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zpracovat data firmy ISKA s.r.o. uvádějící základní informace o provedených odběrech ejakulátu plemenných kanců z let 2006 až 2010 a porovnat je mezi sebou ve spojitosti s probíhajícím ročním obdobím. Na základě výše uvedených výsledků, můžeme konstatovat, že byl prokázán a potvrzen vliv ročního období na reprodukční schopnosti kanců.

Z výsledků vyplývá, že nejvíce spermií je produkováno v zimě, poté na podzim a na jaře, zatímco nejméně je produkováno v létě. V létě byly zaznamenány nejnižší hodnoty jak v koncentraci spermií, tak v objemu ejakulátu, což vedlo samozřejmě k nejhorsším výsledkům v celkovém počtu spermií v ejakulátu. Naopak v zimě byla jasně nejvyšší koncentrace spermií a objem ejakulátu dosáhl také vysokých hodnot. Nízká koncentrace spermií na podzim byla vyvážena velkým objemem ejakulátu a opačný efekt je zase patrný na jaře.

Tyto výsledky dokazují, že všeobecně jsou v zimě nejvhodnější podmínky pro odběr ejakulátu. Také je patrné, že vlivy, které jsou příznivé pro koncentraci spermií mají rozdílný dopad na objem ejakulátu. Tento závěr je poměrně překvapující a nebylo k němu nalezeno patřičné vysvětlení v primárních ani sekundárních zdrojích, což vytváří dostatečný prostor pro další výzkum. Ostatní výsledky se víceméně shodují s odbornou literaturou i s poznatky z praxe.

Prokázání vlivu ročního období na reprodukci prasat je prvním krokem k rozsáhlejšímu výzkumu. Je třeba pečlivě prozkoumat jednotlivé faktory, které mají s ročním obdobím spojitost. Tato práce vycházela především z faktoru vysoké teploty, který nepříznivě ovlivňuje varletní tkáň. Během práce však bylo nalezeno množství studií, které vidí hlavní určující faktor jinde. Bohužel se tyto studie jen málokdy shodují a potvrzují tím potřebu dalšího výzkumu. Významnou překážkou stále zůstává nedostatek reprezentativních informací, ze kterých by se dalo vycházet.

Jak již bylo v této práci zmíněno, faktorům ovlivňujícím kvalitu spermií je věnována poměrně velká pozornost, ale tato práce dokazuje, že kvantita spermií prokazuje také značnou kolísavost v průběhu roku, což má nepopiratelný ekonomický dopad na chod inseminačních stanic plemenných kanců a tedy i jejich odběratelů. Zavedením vhodných opatření, jenž mohou utlumit svrchuřečené vlivy na kolísavost množství spermií v ejakulátu kanců v průběhu roku, lze tedy zabránit i značným ekonomickým ztrátám.

7. Seznam použité literatury

Almond, G., Levis, D., Britt, J. et al.: The Swine AI Book, 2. vyd., Raleigh N.C., 1994

Bažant, J.: Inseminace prasat, Státní plemenářské podniky, Praha, 1988.

Bielas, W.: Význam PGF2 α při konzervaci kančího spermatu. *Náš Chov*, 10/2012, s 22-24

Bonet, S. a kol.: Reprodukční systém kanců. *Boar Reproduction*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, s 65-107

Čeřovský, J. a kol.: Změny kančího spermatu s vysokou a nízkou úrovní morfologicky abnormálních spermií. *Czech Journal of Animal Science*, 7/2005, s 289-299

Frydrychová, S. a kol.: Vlivy dlouhodobého komerčního ředidla a délky uskladnění na kvalitu membrány kančích spermií. *Czech Journal of Animal Science*, 4/2010, s 160-166

Guyonnet, B. a kol.: Varlata a transkriptomy epididymálních spermií dospělých kanců. *BMC Genomics*, 8/2009

Hajič, F., Košvanec, K., Čítek, J.: *Obecná zootechnika*. 1. vyd., JU ZF České Budějovice, 1995

Hofmo, P. O.: Třídění spermií a nižší dávky v inseminaci prasat. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 8/2006

Hovorka F., Sidor V., Smíšek V.: *Chov prasat*, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1987.

Jelínek, P. a kol.: *Fyziologie hospodářských zvířat*, MZLU v Brně, 2003.

Jelínek, F., Jelínek, K.: *Morfologie hospodářských zvířat*. 2. vyd., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská Fakulta, 2006

Kennedy, B. W., Wilkins, J. N.: Kanec, plemeno a environmentální faktory ovlivňující vlastnosti spermií kanců používaných v umělé inseminaci. *Canadian Journal of Animal Science*, 8/1984, s 833-843

King, G. J., Macpherson, J.: Srovnání dvou metod odběru kančího semene. *Journal of Animal Science*, 1973, s 563-565

Kommisrud, E. a kol.: Vliv kance a parametrů semene na motilitu a integritu akrosomu v tekutém kančím semenu uskladněným na pět dní. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 3/2002

Kopřiva, J., Pácová, J., Prášil, L.: Inseminace prasat v praxi, Plemenáři Brno, a.s., 1996

Koudelka, K., Jílek, F.: Biologické základy chovu zvířat. 1. vyd., Provozně ekonomická fakulta, ČZU v Praze, CREDIT Praha, 1996

Matoušek, V.: Chov hospodářských zvířat II. 1. vyd., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, 2013

Pulkrábek, J. a kol.: Chov prasat, 1. vyd., Nakladatelství Profi Press, s. r. o., Praha, 2005.

Reece, W. O.: Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. 2. vyd., Grada Publishing, 2010

Říha, J. a kol.: Plemenitba hospodářských zvířat, Rapotín, 2003.

Říha, J. a kol.: Reprodukce v procesu šlechtění prasat, Rapotín, 2001.

Rozkot, M.: Základní postupy v inseminaci prasat. *Náš Chov*, 9/2013, s 32-35

Sancho, S., Vilagran, I.: Ejakulát kance: funkce spermií a analýza semenné plazmy. *Boar Reproduction*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, s 471-516

Smital, J.: Chov a ošetřování pohlavně aktivních kanců. *Náš chov*, 6/2001

Smital, J.: Sezónnost a reprodukce domestikovaných prasat. *Náš chov*, 2/2002

Stupka, R., Šprysl, M., Čítek, J.: Základy chovu prasat, 1. vyd., Powerprint, Praha, 2009

Swierstra, E. E.: Vliv plemena, věku a frekvence ejakulace na složení kančího spermatu. Canadian Journal of Animal Science, 1/1973, s 43-53

Šmerha, J. a kol.: Biologie rozmnožování hospodářských zvířat, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1964.

Věžník, Z. a kol.: Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 2004.

Wolf, J., Smital, J.: Kvantifikace faktorů ovlivňující vlastnosti spermií v inseminaci kanců z analýzy živočišného vzorku. Journal of Animal Science, 12/2014, s 1620-1627

Internetové zdroje:

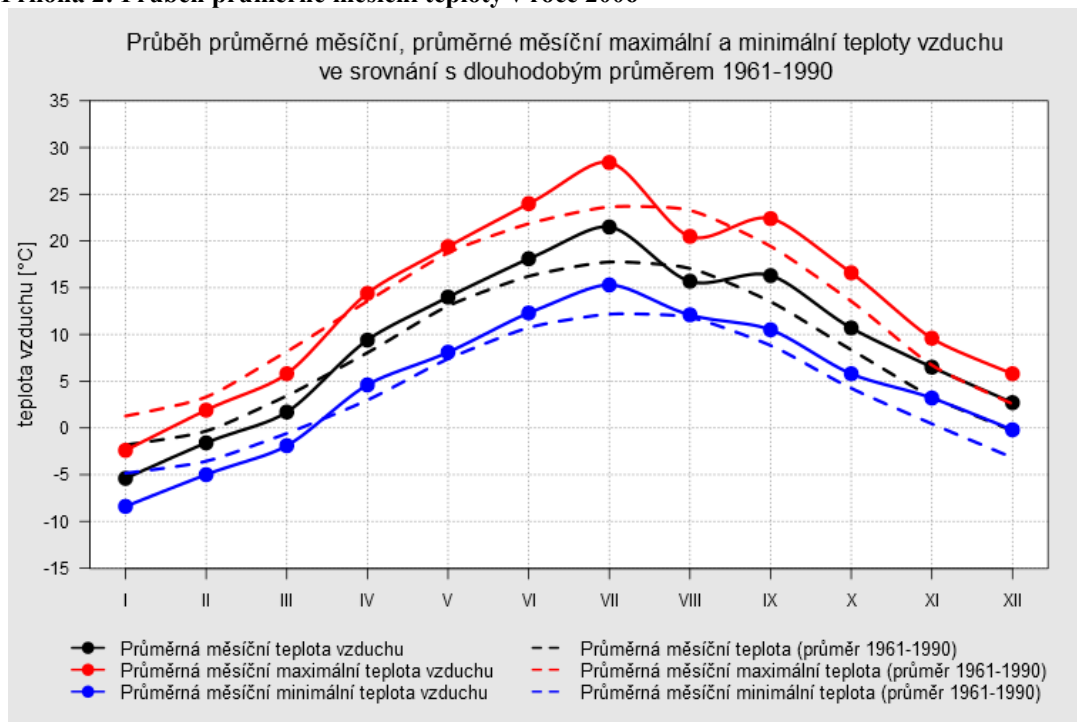
<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mesicni-data#>, 15.4. 2016

8. Přílohy

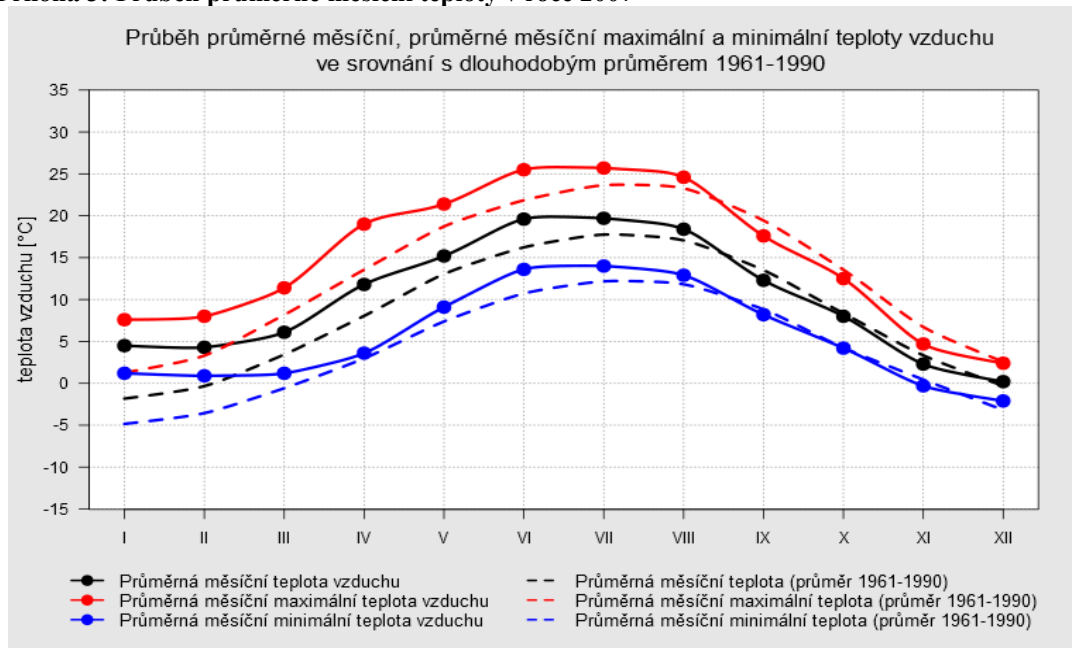
Příloha 1: Hodnoty zjištěné v EXCELU

Roční období	Celkový počet spermií (10⁶)	Objem ejakulátu (ml)	Koncentrace spermií (10³ / mm³)
Jaro - průměr	80832,56	266,1789	317,8351513
Jaro - maximum	177708	582	854
Jaro - minimum	183	45	45
Jaro - směrodatná odchylka	25255,93	85,06266	101,3019517
Léto - průměr	74494,43	265,16	295,5050268
Léto - maximum	250000	615	840
Léto - minimum	4000	30	28
Léto - směrodatná odchylka	25219,37	89,7051	102,777535
Podzim - průměr	82280,94	291,8534	297,922807
Podzim - maximum	197091	605	968
Podzim - minimum	65	25	45
Podzim - směrodatná odchylka	27072,16	101,3354	98,51966668
Zima - průměr	86161,96	280,6364	320,8450818
Zima - maximum	217147	653	919
Zima - minimum	2800	28	34
Zima - směrodatná odchylka	28693,35	95,22676	99,71339958

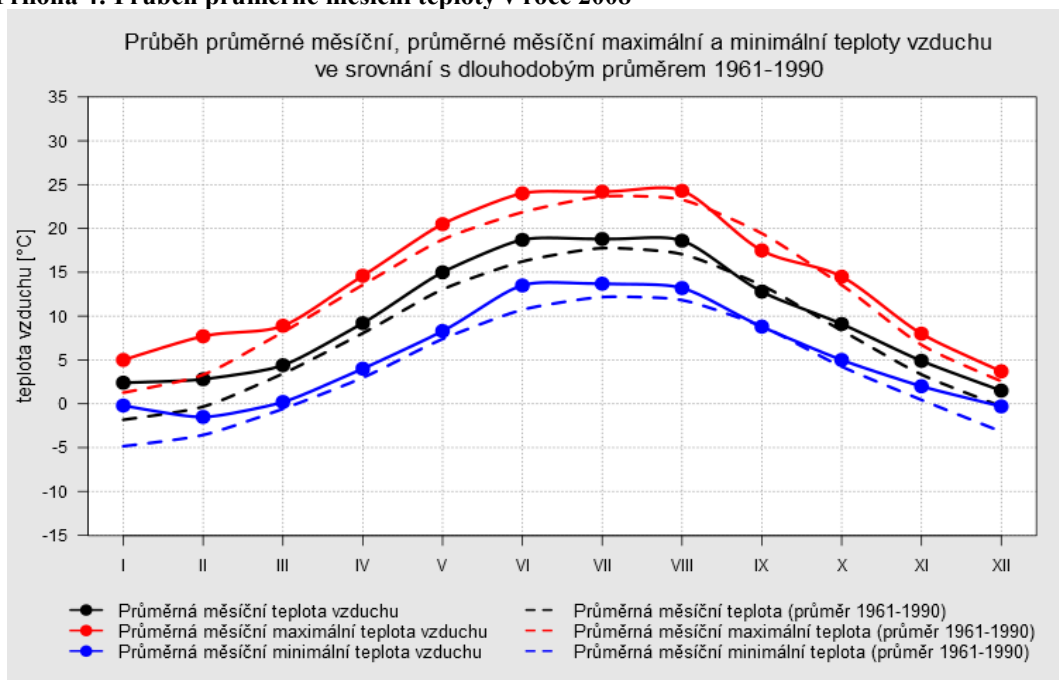
Příloha 2: Průběh průměrné měsíční teploty v roce 2006



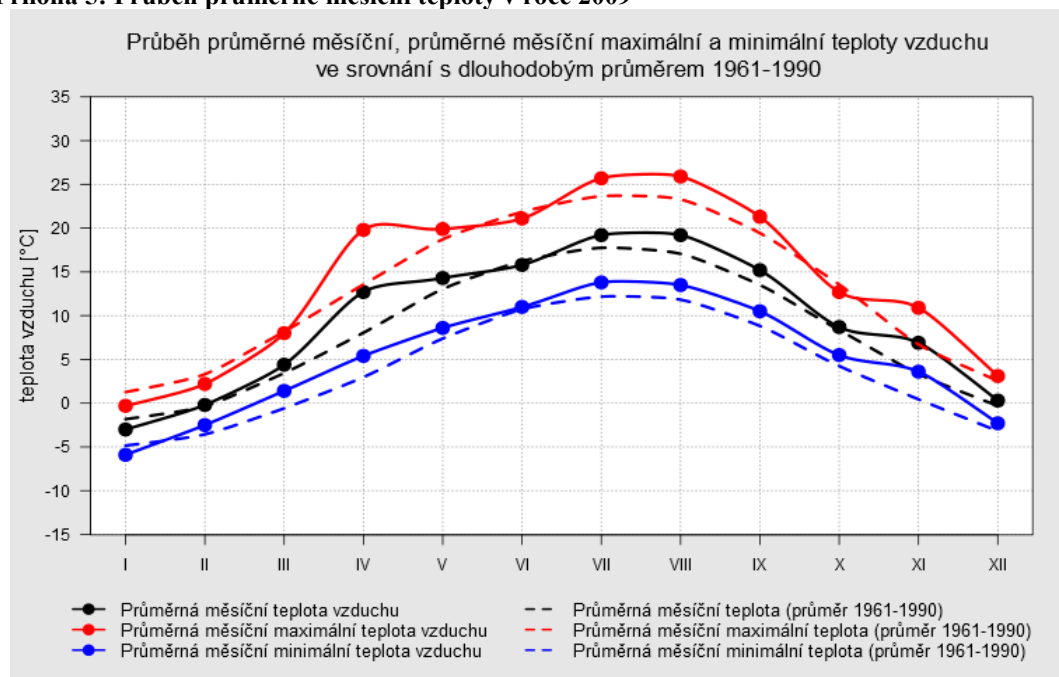
Příloha 3: Průběh průměrné měsíční teploty v roce 2007



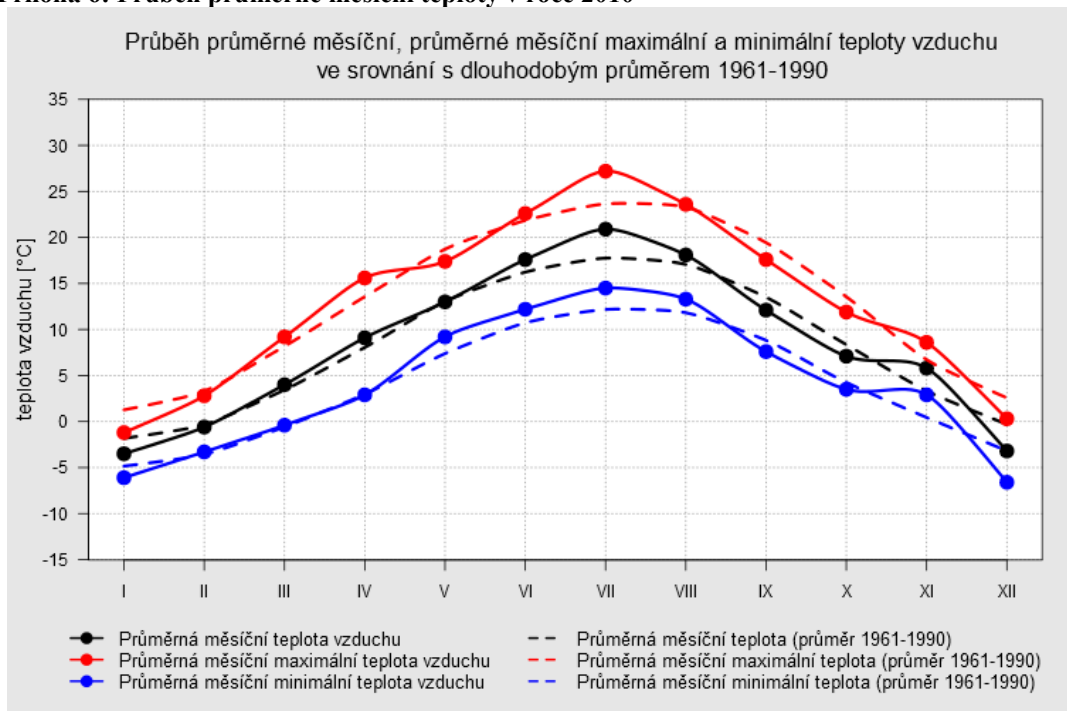
Příloha 4: Průběh průměrné měsíční teploty v roce 2008



Příloha 5: Průběh průměrné měsíční teploty v roce 2009



Příloha 6: Průběh průměrné měsíční teploty v roce 2010

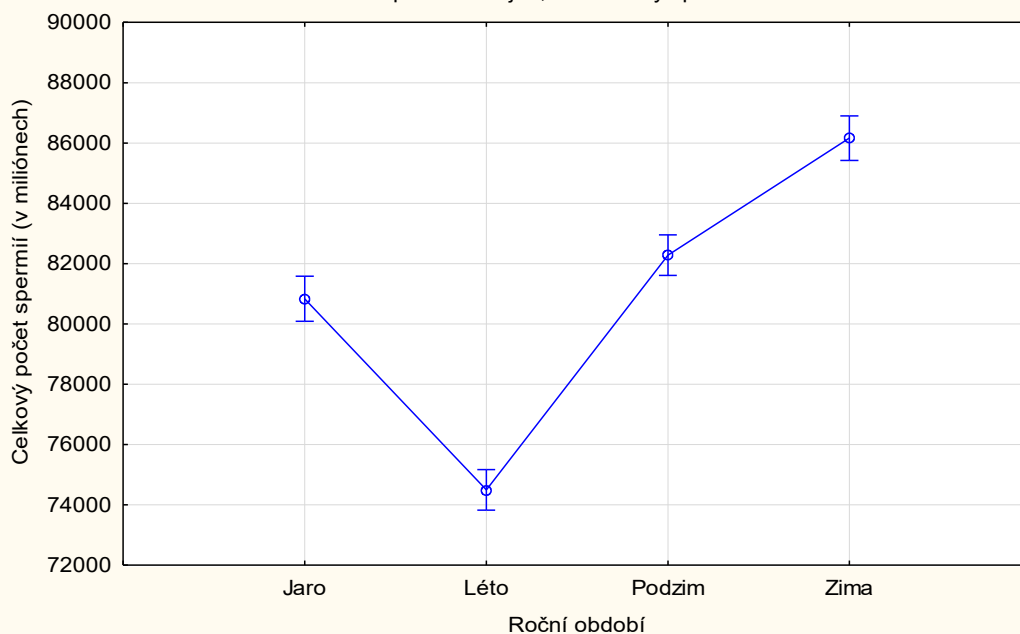


Příloha 7: Celkový počet spermií v jednotlivých ročních obdobích

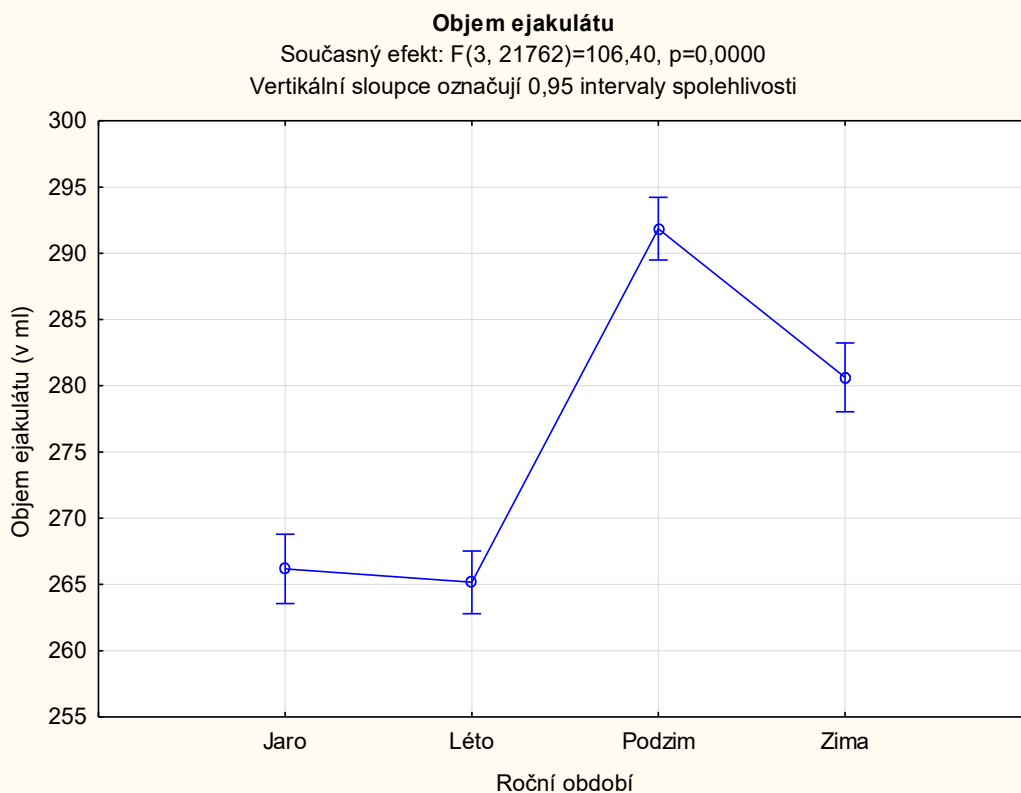
Celkový počet spermií

Současný efekt: $F(3, 21763)=185,44$, $p=0,0000$

Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



Příloha 8: Průměrný objem ejakulátu v jednotlivých ročních obdobích



Příloha 9: Průměrná koncentrace spermií v jednotlivých ročních obdobích

