

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Zootechnických věd

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Charakteristika reprodukčních vlastností hřebců
působících v inseminaci

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

Konzultant diplomové práce: Ing. Jana Křížková

Autor diplomové práce: Bc. Alena Kyryanová

České Budějovice, 2016

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu práce, doc. Ing. Miroslavu Maršálkovi, CSc. a Ing. Janě Křížkové za bezmeznou trpělivost, odborné vedení a užitečné rady při vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 1. 4. 2016

.....

Bc. Alena Kyryanová

ABSTRAKT

Jedním z předpokladů úspěšné inseminace v chovu koní je výběr kvalitních plemenných hřebců, kteří produkují ejakulát v dostatečném množství a v dobré kvalitě. Pro tento účel vznikly metody zabývající se hodnocením kvality ejakulátu. V této diplomové práci byl ejakulát hodnocen počítačovou objektivní metodou CASA, systémem SCA. Sledování kvality ejakulátu bylo provedeno na 11 plemenných hřebcích působících v inseminaci čerstvým spermatem v Zemském hřebčinci v Písku. Celkem bylo hodnoceno 53 vzorků ejakulátu, u kterých se sledoval objem, koncentrace spermií, celková a progresivní motilita a vitalita spermií. Objem ejakulátu u hřebců kolísal od 20 do 127,5 ml. Hodnoty koncentrace spermií se průměrně u jednotlivých hřebců pohybovaly od 104,18 do 384,4 M/ml. Průměrné hodnoty celkové motility se pohybovaly v rozmezí od 51,23 do 89,54 %. Progresivní motilita se u hřebců průměrně pohybovala od 12,99 do 47,12 %. U vitality spermií byly zjištěny průměrné výsledky od 35,16 do 71,21 %. Zjištěné hodnoty odpovídaly Vyhlášce Ministerstva zemědělství, která stanovuje minimální požadavky na kvalitativní ukazatele ejakulátu pro krátkodobou konzervaci. Dále byli hřebci rozděleni do dvou skupin podle věku. První skupina byla tvořena hřebci do 10 let věku, ve druhé skupině byli hřebci starší. U mladších hřebců do 10 let byl zjištěn větší objem ejakulátu a větší koncentrace spermií. Starší hřebci nad 10 let měli vyšší hodnoty celkové i progresivní motility a vitality spermií. Dále byla kvalita ejakulátu hodnocena podle intervalu mezi odběry. Pravidelné odebírání hřebců zlepšuje kvalitu ejakulátu, ale důležitý je interval mezi odběry. Nejlepší hodnoty byly zjištěny u těch vzorků, kde před jejich odebráním byl interval mezi odběry 4 a více dní. Kvalitní byl i ejakulát odebíraný po 3 dnech, nejhorší kvalita ejakulátu byla u vzorků, u kterých byl interval mezi odběry 1-2 dny.

Klíčová slova: hřelec, inseminace, kvalita ejakulátu, CASA, SCA

ABSTRACT

One of the requirements for a successful insemination in horse breeding is the selection of quality stallions which produced ejaculate in enough quantities and of good quality. For this purpose were discovered methods of dealing with the evaluation of semen quality. In this dissertation was ejaculate evaluated by using an objective computerized method CASA, system SCA. Monitoring the quality of sperm was performed on 11 breeding stallions involved in artificial insemination fresh sperm in ZH Písek. 53 samples of ejaculate were evaluated. Volume, sperm concentration, total and progressive motility and sperm vitality were monitored. Volume of ejaculate was from 20 to 127.5 ml. Average values of sperm concentration for individual stallions were from 104.18 to 384.4 M/ml. Average values of total motility were moving by interval from 51.23 to 89.54 %. Average progressive motility was move from 12.99 to 47.12 %. At sperm vitality were discovered average results from 35.16 to 71.21 %. The average value of individual stallions was identical to the Decree of the Ministry of Agriculture, which sets minimum requirements for quality indicators for short-term preservation of semen. Also the quality of the semen of stallions was compared by age. The first group was made by stallions to 10 years old and the second group were older stallions. It was found that the younger stallions to 10 years had higher semen volume and greater sperm concentration. Stallions older over 10 years had higher levels of total and progressive motility and sperm vitality. Next ejaculate quality was evaluate by the time interval between samples. Regular taken from stallions is doing better ejaculate quality but the time interval between samples is important. The best values were found in samples with interval between the sampling 4 or more days. The worst quality of sperm was in the samples with the interval between 1-2 days.

Key words: stallion; artificial insemination; ejaculate quality; CASA; SCA

Obsah

1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1 Pohlavní soustava hřebce	8
2.2 Ejakulát hřebce a jeho hodnocení	12
2.3 Odběr ejakulátu u hřebce	17
2.4 Ředění a konzervace ejakulátu hřebce	17
3. HYPOTÉZA.....	20
4. CÍL PRÁCE	21
5. MATERIÁL A METODIKA.....	22
5.1 Materiál	22
5.2 Metodika	23
6. VÝSLEDKY	25
6.1 Výsledky jednotlivých hřebců.....	25
6.2 Stanovení kvality ejakulátu v závislosti na věku hřebců	42
6.3 Stanovení kvality ejakulátu v závislosti na četnosti odběru.....	43
7. DISKUZE.....	45
8. ZÁVĚR	47
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
10. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ V TEXTU.....	52
11. PŘÍLOHY	53

1. ÚVOD

V posledních letech se výrazně zvýšily počty koní. Zvyšuje se nejen jejich počet, ale i plemenná hodnota chovaných koní. To je následkem výrazně zvýšeného dovozu kvalitních koní ze zahraničí. Importují se sportovní a plemenní koně a díky rozvoji inseminace i inseminační dávky těch nejlepších světových plemenů. Díky zavedení inseminace u koní došlo k rozvoji dalších biotechnologických metod, například krátkodobá konzervace spermatu, kryokonzervace spermatu hřebců, sexování spermií. Pomocí ultrasonografického vyšetření je u klisen detekován říjový cyklus a diagnostikována březost již v raném stádium. Rodičovské páry jsou chovateli pečlivě předem vybírány na základě odhadu plemenné hodnoty.

Hřebci využívaní v inseminaci musí mít výbornou reprodukční výkonnost. Tu ovlivňuje mnoho vnitřních i vnějších faktorů, jako například plemenná příslušnost, výživa, věk, zdravotní stav, ošetřování a u mladých hřebců ještě sportovní využití. Ejakulát získávaný od hřebců musí splňovat požadované parametry. Důležitý je jeho objem po odběru a bezprostřední sensorické posouzení. V průběhu celé připouštěcí sezóny jsou sledovány kvantitativní i kvalitativní ukazatele ejakulátu. Na kvalitním ejakulátu závisí úspěšnost inseminace a zabřeznutí klisny. Používání plemenici jsou evidovány v příslušném chovatelském sdružení, které také zaznamenává informace, kolik plemeník připustí klisen a zda zůstaly březí. Potom se hříbě hodnotí a to je zpětnou vazbou pro výpočet plemenné hodnoty. Kvalitu plemenů podtrhují výsledky potomstva. Tato diplomová práce byla zaměřena na hodnocení kvality ejakulátu hřebců pomocí objektivní počítačové metody CASA (computer-assisted semen motility analysis), systémem SCA (sperm class analyzer). Závěrem byly výsledky shrnuty a bylo navrženo opatření pro plemenářskou organizaci.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Pohlavní soustava hřebce

Funkcí pohlavní soustavy je vytvářet pohlavní buňky – gamety, které budou schopné oplodnit vajíčko.

Pohlavní orgány hřebce jsou tvořeny pohlavními žlázami (varlata), vývodními cestami (nadvarlata, chámovody), přídatnými pohlavními žlázami (měchýřkovité žlázy, bulbouretrální žlázy a prostata) a kopulačním orgánem, pyjem (**Jelínek, Koudela et al., 2003**).

Varle (*testis*)

Varle je párová samčí pohlavní žláza tuho-elastické konzistence, velmi citlivá na tlak. Tvoří se v ní pohlavní buňky - spermie a samčí pohlavní hormon - testosteron. Je vejčitého tvaru a jeho délka je 10-12 cm a hmotnost 400-600 g (**Marvan et al., 1998**). Obalem varlete je šourek. Šourek považujeme za vychlípeninu dutiny břišní, proto jsou srovnatelné vrstvy břišní stěny s vrstvami stěny šourku (**Komárek et al., 1999**). Na povrchu je kryto tenkou serózní blankou vnitřní pobřišnice, pod níž leží tuhá blána z fibrózního vaziva, která vysílá dovnitř varlete vazivové trámce, které rozdělují křehký parenchym na pyramidovité lalůčky (**Komárek et al., 1971**). V nich se nacházejí stočené semenotvorné kanálky varlete, v nichž probíhají jednotlivé fáze spermatogeneze. Vedle zárodečného epitelu jsou ve stěně kanálků podpůrné buňky, ve kterých probíhá poslední stadium spermatogeneze - metamorfóza spermatid ve spermie (**Jelínek, Koudela et al., 2003**). Varlata jsou u hřebce položena horizontálně, mají nadvarletní okraj obrácený dorzálně, hlavový pól směřuje kraníálně a ocasní kaudálně (**Marvan et al., 1998**).

Nadvarle (*epididymis*)

Je orgánem, ve kterém se shromažďují spermie a funkčně zde dozrávají (**Jelínek, Koudela et al., 2003**). Je to orgán kyjovitého tvaru připojený vazem k varleti. Spermie se v něm jednak shromažďují, jednak dozrávají a získávají schopnost aktivního pohybu

a oplozovací schopnost. Skládá se z hlavy, těla a ocasu (**Komárek et al., 1971**). Spermie vytvářené ve varleti přechází do hlavy nadvarlete, kde se zahušťují a jsou zde fagocytovány poškozené a přestálé spermie. V těle se spermie setkávají se sekrety bohatými na tuky a další látky, které zvyšují odolnost jejich povrchových membrán. Spermie v nadvarleti zůstávají nepohyblivé a jejich celková aktivita je nízká. Nachází se zde v klidovém stavu, který umožňuje prodloužení životnosti spermií. Doba průchodu spermií celým nadvarletem trvá 8-11 dní (**Jelínek, Koudela et al., 2003**).

Chámovod (*ductus deferens*)

Chámovod je silnostěnná párová trubička, spojující vývod nadvarlete s močovou trubicí. Začíná na ocasu nadvarlete a podél mediálního okraje nadvarlete směřuje k poševnímu kanálu. U hřebce se chámovod v pánevním úseku rozšiřuje ve vřetenovitou ampuli chámovodu (**Marvan et al., 1998**). Její žláznatá část vylučuje sekret stimulující metabolickou aktivitu spermií. Spermie se dostávají společně se sekretem měchýřkovitých žláz ejakulačním kanálkem do močové trubice na semenném hrbolku (**Jelínek, Koudela et al., 2003**).

U samců bez ampulí chámovodů se spermie dostávají do močové roury při ejakulaci z ocasu nadvarlete kontrakčními vlnami celého chámovodu (**Jelínek, Koudela et al., 2003**).

Přidatné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*)

Nacházejí se na pánevní části močové trubice. Vyměšují sekret, který se při ejakulaci mísí se spermiemi a vyváří podstatnou část ejakulátu (semennou plazmu) (**Jelínek, Koudela et al., 2003**). Jejich sekrety, vylučované do močové trubice, tvoří látky, které slouží k výživě spermií a konečně upravují spermiím prostředí během jejich průchodu močovou trubicí a v pohlavním ústrojí samice. Patří k nim měchýřkovitá žláza, předstojná žláza a bulbouretrální žláza (**Marvan et al., 1998**).

Měchýřkovitá žláza

Je u hřebce označovaná jako semenné váčky. Leží na dorzální ploše močového měchýře, laterálně po stranách od ampule chámovodů, s nimiž společně vyústují ejakulačním kanálkem na semenném hrbolku do močové trubice (**Jelínek, Koudela et**

al., 2003). Je to párový orgán. Má kompaktní lalůčkovitou stavbu s rozbrázděným povrchem. Strukturálně je to složitá tubulózní žláza a vylučuje bělavý slabě zásaditý sekret, který se hromadí v rozšířených nitrolalůčkových a mezilalůčkových vývodech. Při ejakulaci je tento sekret stahy hladké svaloviny vývodů vypuzován vyměšovacím kanálkem do močové trubice. U hřebce má charakter váčku s hladkým povrchem a zřasenou sliznicí, obsahující žlázy (**Marvan *et al.*, 1998**). Jejich sekret je vylučován ke konci ejakulace, tvoří 10-40 % objemu ejakulátu, má mírně kyselou reakci (pH kolem 6,08), obsahuje fruktózu, kyselinu askorbovou, citrónovou, flaviny a jiné látky. Cukry jsou hlavním energetickým zdrojem pro spermie (**Jelínek, Koudela *et al.*, 2003**).

Předstojná žláza

Je to nepárová žláza, leží na začátku močové trubice, kaudálně od vyústění chámovodů a měchýřkovitých žláz. Produkuje zásaditý řídký mlékovitý sekret, který má charakteristický pach a četnými drobnými vývody je odváděn do močové trubice. Prostatu tvoří dvě části - tělo a roztroušená část. Obě části jsou složeny ze sekrečních tubulů, navzájem spojených intersticiálním vazivem v slabě naznačené lalůčky. U hřebce chybí roztroušená část a tělo prostaty je rozděleno na dva laloky, spojené můstkem (**Marvan *et al.*, 1998**). Sekret prostaty je vylučován při ejakulaci těsně před spermii a současně s nimi. Obsahuje volné aminokyseliny, neobsahuje cukry a má relativně vysoký obsah anorganických solí, které v ejakulátu udržují stejný osmotický tlak (**Jelínek, Koudela *et al.*, 2003**).

Hodnota pH je druhově odlišná. U zvířat s malým objemem ejakulátu je mírně kyselá, zvířata s velkým objemem jí mají mírně alkalickou (**Jelínek, Koudela *et al.*, 2003**).

Bulbouretrální žláza

Leží na močové trubici před jejím výstupem z pánve. U hřebce mají bulbouretrální žlázy téměř kulovitý tvar, jsou 40 mm dlouhé a 50 mm široké a vysoké (**Jelínek, Koudela *et al.*, 2003**). Je to párová žláza. Výměšek žlázy se shromažďuje v rozšířených prostorech nitrolalůčkových a mezilalůčkových vývodů a nakonec je odváděn do močové trubice několika vývody (**Marvan *et al.*, 1998**).

Pyj (*penis*)

Pyj je pářící orgán, který při kopulaci slouží k přenosu ejakulátu do pohlavních cest samice a k tomuto účelu je také tvarově přizpůsoben (**Věžník *et al.*, 2004**). Rozeznáváme na něm tělo pohlavního údu, žalud a předkožku. Tělo má dvě houbovitá tělesa vytvářející dutiny. Při pohlavním podráždění se naplní krví a nastává zvětšení a ztvrdnutí pohlavního údu. Žalud má též houbovitá žaludová tělíska. Předkožka je ochranným kožním obalem, do kterého se pohlavní úd zatahuje. V předkožce se nachází mazové žlázy, které vylučují tmavý mazlavý sekret (**Flade, 1990**). Pyj hřebce je silný, při ztopoření dosahuje délky půl metru a je vpředu zakončen rozšířeným žaludem (**Komárek *et al.*, 1971**).

Řízení pohlavní činnosti

Další důležitou funkcí pohlavního ústrojí je syntéza a vyměšování pohlavních hormonů. Ty svým působením podmiňují nejen správný vývoj a normální funkci samotných pohlavních orgánů, ale i rozvinutí všech sekundárních pohlavních znaků zvířete, jeho růst, temperament, úroveň metabolických pochodů a v neposlední řadě i časové sladění pohlavních funkcí samců a samic (**Marvan *et al.*, 1998**). Řízení pohlavních orgánů podléhá extragenitálním strukturám - hypotalamo-hypofyzárnímu systému. Tato neuroendokrinní regulace probíhá v rámci geneticky fixovaného vnitřního řídicího systému, neustále ovlivňovaného faktory zevního prostředí. Jednotlivé složky, podílející se na regulaci pohlavní činnosti, jsou uspořádány hierarchickým způsobem. Kůra koncového mozku přijímá a zpracovává podněty z vnějšího a vnitřního prostředí, zpracovává je a dále předává do hypotalamu. V něm jsou umístěna přední a zadní sexuální centra.

Hypotalamus s četnými nervovými buňkami představuje vlastní centrum pro řízení pohlavní činnosti. V hypotalamu jsou dvě místa, která mají klíčový význam pro řízení pohlavní činnosti a jsou označovány jako přední a zadní sexuální centra. Zadní obsahuje četná jádra, ve kterých se na základě impulzů přicházejících z předního sexuálního centra vytvářejí neurosekrety, zvané též liberiny - gonadotropin releasing hormon (GnRH). Pod vlivem hypotalamických GnRH se ve specializovaných buňkách adenohipofýzy vytvářejí dva gonadotropní hormony - folikuly stimulující hormon

(FSH) a luteinizační hormon (LH). FSH u samců stimuluje růst semenotvorných kanálků, tvorbu spermií, činnost Sertoliho buněk a produkci hormonu inhibinu. LH (u samců také označovaný jako intersticiální buňky stimulující hormon - ICSH) působí na intersticiální buňky (Leydigovy) a stimuluje tvorbu pohlavního hormonu testosteronu. Testosteron spolu s dalšími androgeny řídí vznik pohlaví a sexuální diferenciaci, stimuluje tvorbu sekundárních pohlavních znaků, růst pohlavního údu, růst a sekreční funkci přídatných pohlavních žláz, formování pohlavního pudu a samčího pohlavního chování. Hormon inhibin, vytvářený v podpůrných buňkách semenotvorných kanálků varlete zpětně působí na hypofýzu a brzdí tvorbu FSH.

Účinek pohlavních hormonů na výše nadřazená centra (adenohypofýzu a hypotalamus) označujeme jako zpětnou vazbu a jejím principem je, že ovlivňuje pozitivně nebo negativně jejich činnost, stimuluje nebo brzdí produkci nadřazených hormonů. Mechanismus zpětných vazeb je podstatou autoregulace pohlavních funkcí (Jelínek, Koudela *et al.*, 2003).

Pohlavní reflexy

Páření je složitý reflexní děj, tvořený řadou nepodmíněných a podmíněných reflexů, při němž samec vyskočí na samici, zasune ztopořený pohlavní úd do pochvy a po druhově odlišné době frikce dojde k ejakulaci.

2. 2 Ejakulát hřebce a jeho hodnocení

Ejakulát je tekutina, která se skládá z buněčné části, tj. spermií, a z tekuté části čili semenné plazmy. Má druhově specifickou barvu, konzistenci a pach a jeho množství vyloučené při jedné ejakulaci druhově značně kolísá. Kolísání je podmíněno celou řadou vnitřních i vnějších faktorů, jako je roční období, světlo, teplo, věk, úroveň výživy a ustájení, zdravotní stav a využití samce (Marvan *et al.*, 1998). Reakce ejakulátu kolísá od mírně kyselé až po mírně zásaditou (pH 6,2-7,2). Největší jeho podíl tvoří voda, která představuje 90-98 % celkové váhy. Organické látky, v množství 1,2-8,7 %, jsou v ejakulátu zastoupeny bílkovinami - albuminy, globuliny (1,25-2,85 %), cukry - fruktóza (0,02-1 %) a lipoidy (0,18-0,2 %). Anorganické látky jsou v ejakulátu

zastoupeny v podobě sloučenin vápníku, fosforu, sodíku, draslíku, chlóru, síry a dalších (Komárek *et al.*, 1971).

Tabulka 1: Základní hodnoty ejakulátu hřebců (Věžník *et al.*, 2004)

Objem v ml	> 20
Koncentrace spermií v M/ml	> 50
pH	7,2
Procento pohyblivých spermií	> 60
Rychlost pohybu spermií v $\mu\text{m/s}$	50
Procento patologických spermií celkem	< 40
Procento primárních změn	> 15

Spermie

Spermie se vytváří po dosažení pohlavní dospělosti v semenotvorných kanálcích varlete a celý proces jejich tvorby je označován jako spermatogeneze. Délka jednoho spermatogenního cyklu je druhově rozdílná, u hřebce trvá 54 dní (Jelínek, Koudela *et al.*, 2003).

Nejpočetněji jsou v zárodečném epitelu varlete zastoupeny spermatogenní buňky a představují různá vývojová stádia spermií. První generací spermatogenních buněk jsou spermatogonie, uložené v kanálku při bazální membráně. Druhou generací spermatogenních buněk jsou spermatocyty I. a II. řádu, které zaujímají střední vrstvu zárodečného epitelu. Třetí generaci představují malé kulovité buňky spermatidy, uložené v několika vrstvách při samém lumenu stočeného semenotvorného kanálku. Později se zanořují do prohlubní cytoplazmatické membrány podpůrných buněk, kde prodělávají složitý proces metamorfózy v bičíkaté spermie. Čtvrtou generací jsou morfologicky hotové spermie, které se z podpůrných buněk uvolňují, přecházejí do lumenu kanálku a jím do vývodných cest. Celkové množství spermií, které se tímto způsobem ve varlatech vyvíjí, je obrovské a podle druhu může denně dosáhnout u hřebce počtu 5-15 miliard (Marvan *et al.*, 1998).

Semenná plazma

Obsahuje převážně sekrety přídatných pohlavních žláz. Je to tekutina druhově specifického množství, barvy a konzistence. Představuje přirozené prostředí pro spermie, umožňuje jejich výživu a transport v pohlavních orgánech samice. Obsahuje minerální látky, bílkoviny, cukry, kyselinu citronovou a askorbovou, četné enzymy a kromě dalších látek i biologicky aktivní složky jako jsou prostaglandiny, estrogeny a androgeny. Podíl v celkovém objemu ejakulátu je rozdílný, u hřebce 97-98 % (**Jelínek, Koudela *et al.*, 2003**).

U hřebce je v nadvarleti jedním z nejrozšířenějších vylučovaných proteinů laktoferin, ale jeho buněčná lokalizace a regulace zůstávají neznámé. Laktoferin se váže na spermie, což naznačuje biologickou roli pro ochranu a regulaci spermií. Kromě toho se zdá, že estrogen reguluje sekreci laktoferinu z nadvarlete u hřebců, kteří již prodělali pubertu (**Pearl *et al.*, 2014**).

Hodnocení ejakulátu

Zachycený ejakulát se laboratorně hodnotí. Hodnotí se především množství ejakulátu, jeho koncentrace a pohyblivost spermií, udaná procentickým vyjádřením množství spermií s progresivním pohybem vpřed (**Dušek, 2007**). Základní vyšetřovací metody ejakulátu tvoří metody nezbytně nutné pro vyhodnocení kvality ejakulátu pro jeho zmrazování a použití k inseminaci. Rozdělují se tedy na metody vyšetření čerstvého ejakulátu po jeho odběru a na metody vyšetření zmrazeného ejakulátu určeného pro použití k inseminaci (**Kliment *et al.*, 1989**).

Ejakulát by měl být podle **Sampera *et al.* (2007)** hodnocen v následujících situacích:

- před zařazením hřebce do chovu,
- před začátkem připouštěcí sezóny a alespoň jednou během sezóny,
- vždy po odběru a před expedicí,
- před konzervací ejakulátu posouzením vhodnosti ejakulátu pro chlazení či zmrazení,
- je-li podezření na problémy plodnosti hřebce nebo při nízkém procentu březosti klisen.

Nejpřesnější metodou objektivního hodnocení ejakulátu je automatická počítačová analýza CASA (Computer- Assisted Sperm Analysis) pro vyšetřování semene, kdy se k hodnocení kvalitativních parametrů spermií využívá kombinace mikroskopu, kamery a počítačového softwaru (**Love, 2012**).

Barva, konzistence, pach

Barva, konzistence a pach se posuzují smyslově, bezprostředně po odběru ejakulátu. Konzistence se posuzuje u každého ejakulátu ve sběrači v dopadajícím nebo procházejícím světle. Hustý ejakulát dobré jakosti je neprůhledná vazká tekutina, zpravidla smetanového mírně zrnitého vzhledu. Zrnité shluky ejakulátu se pomalu pohybují. Řídký ejakulát špatné jakosti je vodnatý, průsvitný a bez zrnitosti. Konzistence hřebčího ejakulátu je spíše vodnatá. Barva se posuzuje proti světlu. Dobrý ejakulát je u hřebce bílé až šedavě bílé barvy, záleží na koncentraci spermií v ejakulátu. Špatný ejakulát, nehodící se k inseminaci, bývá zabarven silně žlutozeleně nebo zeleně přimísením hnisu, moče nebo nežádoucími mikroorganismy. Špatný je i ejakulát s příměsí krve. Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Dobrý ejakulát má slabý specifický pach připomínající pach kravského mléka. Nazelenalý ejakulát páchne močí. Hnilobný zápach svědčí o přimísení hnisu. Dobrý ejakulát má být prostý cizích příměsí a částic (**Louda et al., 2001**).

Od hřebčího ejakulátu lze jedním odstředěním oddělit většinu bakterií, což by dle **Morrella et al. (2014)** mohlo být užitečnou alternativou přidávání antibiotik do ejakulátu pro kontrolu bakteriální kontaminace.

Objem ejakulátu

Objem ejakulátu nepatří mezi ukazatele kvality, ale je součástí vyšetření a je důležitý pro určení celkového počtu spermií v ejakulátu (**Root Kustritz, 2007**). Je variabilní a značně kolísá. Zjišťuje se měřením v kalibrovaném válci nebo vážením na laboratorní automatické váze (**Louda et al., 2001**). Podle **Loudy et al. (2001)** kolísá objem mezi 50-200 ml. Objem je závislý na hmotnosti a plemenné příslušnosti. Chladnokrevná plemena produkují 150 ml, teplokrevná 60 ml, lehká - arabský plnokrevník 45 ml.

Motilita spermií

Důležitým spermatologickým ukazatelem je motilita spermií, která je dána progresivním pohybem spermie vpřed za hlavičkou. Určuje se podle procenta pohyblivých spermií v nativním preparátu (**Mortimer, 1997**). Progresivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou je jedním z nejvýznamnějších ukazatelů oplozovací - fertilizační schopnosti čerstvého ejakulátu. Hodnotí se charakter pohybu, určuje se směr a rozsah kmitů hlavičky spermie. Vyjadřuje se v procentech. U ejakulátu určených k přímé inseminaci nebo ke konzervaci se požaduje minimální aktivita 70 % (**Louda et al., 2001**).

Koncentrace spermií

Je jedním z parametrů, které se hodnotí při vyšetření ejakulátu, nemá však vypovídající hodnotu o kvalitě získaných spermií (**Power, 1963**). Koncentrace násobená objemem dává celkový počet spermií v ejakulátu, což je jedním z nejdůležitějších ukazatelů kvality ejakulátu (**Martinez, 2004**). Koncentrace spermií v ejakulátu je dána funkční aktivitou semenotvorného epitelu varlat, věkem, zdravotním stavem pleménika, připraveností a technikou odběru ejakulátu daného pleménika. Plemeníci s opakovaně nízkou koncentrací spermií v ejakulátu, tzv. oligospermií, která je geneticky podmíněná, se vyřazují (**Louda et al., 2001**).

Stanovení vitality spermií

Zkouška je založena na rozdílné afinitě živých a mrtvých spermií k barvivům. Mrtvé nebo oslabené spermie přijímají barvivo, kdežto živé spermie nepropouštějí semipermeabilní membránou barvivo a hlavička zůstává bílá. Mrtvé spermie se barví bledě růžově až červeně (**Samper et al., 2007**).

pH ejakulátu

pH ejakulátu by mělo být v rozmezí 6,7-7,5. Pokud stoupne nad 7,8, je výrazně alkalické, znamená to, že nebyl získán celý ejakulát (**Louda et al., 2001**). **Contri et al. (2013)** uvádí, že pH 7 a 7,5 umožňuje maximální projev potenciální motility spermií. Dále tvrdí, že nižší pH (5,5) snižuje motilitu spermií a membránovou integritu, zatímco vyšší pH (8,5) vede ke znehybnění spermií, což je způsobeno významným poklesem

jejich mitochondriální aktivity. **Kliment et al. (1989)** dodává, že na průběh metabolických procesů spermií má vliv koncentrace vodíkových iontů, a to kolem 7, zatímco vyšší nebo nižší hodnoty mají za následek postupný útlum látkové přeměny ve spermiích.

2. 3 Odběr ejakulátu u hřebce

Odběr ejakulátu se provádí pomocí umělé vaginy a fantomu nebo říjící se klisny a poté se laboratorně hodnotí (**Misař a Jiskrová, 2005**).

Při ošetřování hřebců, odběru ejakulátu a jeho zpracování se dbá na vytvoření podmínek, aby v inseminační dávce byl co nejnižší počet nepatogenních zárodků. Penis hřebce je pravidelně ošetřován a dezinfikován. Dezinfikuje se i připouštěcí místnost po skončení odběru a zád' atrapy se desinfikuje před každým odběrem hřebce (**Louda et al., 2001**).

K odběru se používají vaginy různého typu a původu. Nejznámější jsou Colorado nebo Missouri, používají vnitřní vložku vaginy z polyetylenu, která neporušuje aktivitu získaných spermií (**Colbron et al. 1990 in Louda et al. 2001**). K odběru ejakulátu hřebce do umělé vaginy je třeba více pokusů - 2 až 3. Ejakulace následuje po několika frikčních pohybech a trvá 5-35 sekund. Teplota umělé vaginy je 40-42 °C (**Louda et al., 2001**).

2. 4 Ředění a konzervace ejakulátu hřebce

Cílem konzervace ejakulátu je uchovat dobrou oplozovací schopnost a zachovat životaschopnost spermií. Dále pak odpovídajícím ředěním vyrobit maximální počet inseminačních dávek, které odpovídají biologickým požadavkům pro zajištění úspěšného oplození (**Louda et al., 2001**).

Krátkodobá konzervace ejakulátu

Krátkodobě konzervovaný ejakulát je ředěný a zchlazený zpravidla na 4 °C (**Müller, 2006**). Ejakulát může při příliš rychlém zchlazení utrpět chladový šok, při

kterém dochází k nevratným změnám na membráně spermie a ztrátě progresivního pohybu. K inseminaci se využívá většinou 12-48 hodin po odběru, doba je závislá na zvoleném použití ředidla a technologii zpracování. Pro krátkodobé uchování ejakulátu in vitro se používají ředidla na mléčné a žloutkové bázi, která chrání především povrchové membrány spermií. Konzervaci se snižuje aktivita intracelulárního vápníku ve spermiích, tím dochází k porušení buněčné homeostáze (Louda *et al.*, 2001). Ředidla obsahují energetické a pufrovací látky (Müller, 2006).

Příklad složení ředidla pro krátkodobou konzervaci podle Müllera (2006):

Glukóza	30g
Laktóza	20 g
Vinan sodnodraselný	10 g
Redestilovaná voda	1000 ml
Vaječný žloutek	200 g
Kyselina paraamidobenzoová 10%	60 g

Ejakulát se ředí v poměru 1:1. Poměr ředění se volí tak, aby v 1 cm³ ředěného ejakulátu dosáhlo min. 20 miliónů spermií progresivního pohybu vpřed (Louda *et al.*, 2001).

Dlouhodobá konzervace ejakulátu

Dlouhodobě konzervovaný ejakulát je konzervovaný převážně zmrazením a uchovává se v tekutém dusíku. Ředidlo pro zmrazení ejakulátu je na rozdíl od ředidla pro krátkodobou konzervaci obohaceno o kryoprotektivní látky. Tyto látky chrání spermie v procesu zmrazení a rozmrazení. Jako kryoprotektivum je téměř výhradně při zmrazení využíván glycerin. Po ředění se ejakulát ochladí a poté se zmrazuje většinou v pejetách o obsahu 0,5 až 4 ml nebo v hliníkových tubách o obsahu 7-15 ml. Rychlost poklesu teploty při zmrazování hraje důležitou roli. Proto se využívá programovatelných automatických zmrazovačů. Po zmrazení se uchovává inseminační dávka ejakulátu v kontejnerech s kapalným dusíkem při teplotě -196 °C. Takto zakonzervovaný ejakulát si uchová svoji oplozovací schopnost po desítky let (Müller, 2006).

Podle Murphy *et al.* (2014) přidání cholesterolu do ejakulátu hřebců před

kryokonzervací zvyšuje po rozmrazení životaschopnost spermií a mají i lepší kvalitu z hlediska povrchu membrány.

Příklad ředidla pro dlouhodobé uchování ejakulátu podle **Müllera (2006)**:

A

Odstředěné čerstvé mléko

Glukóza	5 g
Citrát sodný	0,5 g
Laktóza	0,2 g
Rafinóza	0,3 g
Citrát draselný	0,082 g
Dionizovaná sterilovaná voda	100 cm ³

B

Sušené odstředěné mléko	9,46 g
Glukóza	0,5 g
Dionizovaná sterilovaná voda	100 cm ³

Obě části A a B se ředí s poměru 1:1, takto naředěné semeno se po ekvilibraci a zchlazení na 4 °C plní do pejet a v parách tekutého dusíku se mrazí (**Louda et al., 2001**).

Pro použití dlouhodobě zmrazeného ejakulátu musíme inseminační dávku nejprve připravit. Přípravou inseminační dávky rozumíme její rozmrazení a naplnění inseminační soupravy rozmrazeným ejakulátem. Základním principem všech metod je rychlé rozmrazení ejakulátu v inseminační dávce. Z tohoto důvodu je doporučováno použití vodní lázně o teplotě od 38 do 60 °C podle použité metody. Vyšší teploty jsou nebezpečné a zvláště u malých objemů ejakulátu v inseminační dávce může snadno dojít k jeho přehřátí a znehodnocení (**Stejskalová, 1996**).

3. HYPOTÉZA

Dobrá plodnost u hřebce zahrnuje dobrou kvalitu ejakulátu a dobrou pohlavní aktivitu. Pohlavní aktivita je ovlivňována ročním obdobím, ale chuť k páření přetrvává v průběhu celého roku. Na kvalitu ejakulátu působí mnoho vlivů. Ty nejdůležitější jako výživa, ošetřování, odběr a uchování ejakulátu ovlivňuje chovatel.

Pro zpracování výsledků byly formulovány následující hypotézy.

- 1) Starší hřebci mají horší plodnost. Tvorba ejakulátu se mění s věkem hřebce. Dá se tedy předpokládat závislost mezi věkem hřebce a kvalitou ejakulátu.
- 2) Produkce ejakulátu je závislá na ročním období, velikosti varlat či frekvenci odběru. Z toho se dá usuzovat rozdíl v kvalitě ejakulátu mezi více a méně využívanými plemeníky.

4. CÍL PRÁCE

Stavy koní v ČR neustále rostou, je ale evidován malý počet potomků od jednotlivých plemenů. Březost klisen při využití inseminace se pohybuje okolo 50 %. Jedním z možných důvodů je nízká kvalita ejakulátu či případná neplodnost hřebce.

Cílem práce bylo zpracovat přehled o kvalitě ejakulátu hřebců používaných v inseminaci Zemského hřebčince v Písku. Ejakulát byl odebírán a laboratorně prověřen v průběhu připouštěcí sezóny. Byl hodnocen jeho objem, koncentrace spermií, celková a progresivní motilita a vitalita spermií v ejakulátu a byly posouzeny rozdíly mezi jednotlivými hřebci, případně rozdíly v průběhu připouštěcího období. Závěrem byly shrnuty výsledky a byla vypracována vhodná doporučení pro chovatelskou praxi.

Dále byly stanoveny dílčí cíle diplomové práce:

- Porovnat množství a kvalitu ejakulátu v závislosti na věku hřebců.
- Porovnat množství a kvalitu ejakulátu v závislosti na délce intervalu mezi jednotlivými odběry ejakulátu

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 Materiál

Podkladová data byla získána ze Zemského hřebčince Písek, státní podnik a byla odebírána od 11 plemenných hřebců. Všichni hřebci byli využíváni v inseminaci čerstvým ejakulátem. Od hřebců byl odebírán ejakulát po dobu připouštěcí sezóny.

Plemenní hřebci byli ustájeni ve stejných podmínkách. Krmná dávka obsahovala 7 kg sena, 2 kg senáže, 1 kg slámy, 4 kg ovsa, 1 kg ječmene a minerální doplňky od Premin stable, Fitmin a Eko mil.

Seznam plemenných hřebců zařazených do pokusu:

2942 Almar

1583 Andiamo

1001 Cassini's Son - T

1558 Galandro ZH

1029 Generalissmus aversa XLIV

2049 Go-On T. S.

1345 Heartbreak ZH

1837 Neugot z Borčic

1154 Quick Lauro Z

6062 Scyris

1942 Warness

4.2 Metodika

Hodnocení ejakulátu hřebců probíhalo u 11 hřebců. Ejakulát byl získáván v připouštěcí sezóně 2015 v různých termínech odběru. Celkem bylo zpracováno 53 vzorků ejakulátu. U těchto vzorků byla podle metodiky stanovena celková a progresivní motilita spermií v %, změřen objem ejakulátu v ml, zjištěna vitalita spermií v % a stanovena koncentrace spermií v ejakulátu v miliónech/ml (M/ml). Ejakulát byl získáván během běžného provozu reprodukčního centra Zemského hřebčince Písek, kde bylo prioritou zajistit nejprve potřebné množství ejakulátu pro výrobu inseminačních dávek, dle poptávky chovatelů.

Odběry ejakulátu se uskutečňovaly v prostorách Zemského hřebčince Písek. Hřebci byli odebíráni na fantomu za použití umělé gumové vagíny. Pro odběr každého hřebce byla do vnitřního prostoru umělé vagíny použita jednorázová vložka z PVC, na jednom konci byla zatavena a sloužila jako sběrač ejakulátu. Umělá vagína se před odběrem ohřívala na teplotu v rozmezí 40 °C a 42 °C. Přirozenou kluzkost vnitřního prostoru vagíny zajišťovala bílá vazelína. Ke spuštění pohlavních reflexů vyžadovala většina hřebců přítomnost říjící se klisny.

Ohněd po odběru ejakulátu byl v laboratoři stanoven objem ejakulátu. Po odebrání všech hřebců byl ejakulát převezzen do laboratoře reprodukce Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Ejakulát byl hodnocen pomocí objektivní počítačové metody CASA, systémem SCA, který obsahuje jednotlivé moduly pro hodnocení ejakulátu. Prostřednictvím těchto modulů byla stanovena koncentrace, motilita a vitalita spermií.

Stanovení objemu ejakulátu

Objem ejakulátu byl změřen pomocí kalibrované kádinky, která byla ohřáta na tělesnou teplotu 37 °C.

Stanovení koncentrace a motility spermií

Ejakulát byl zahřátý na teplotu 37 °C. Do speciálního Leja sklíčka byly odpipetovány 3 μ l ejakulátu. Takto připravený vzorek byl pozorován pod světelným

mikroskopem s vyhřívanou destičkou (teplota 37 °C). Na mikroskopu byl nastaven objektiv 10x, negativní fázový kontrast a zelený filtr, určený pro hodnocení motility. V programu SCA byl zvolen modul pro motilitu a koncentraci a bylo hodnoceno 10 zorných polí.

Stanovení vitality spermií

Pro stanovení vitality spermií musí být vzorek ejakulátu nejdříve obarven fluorescenčním barvivem. Ze vzorku bylo do eppendorfký odebráno 10 µl ejakulátu, ke kterému byl přidán 1 µl modrého kitu. Vzorek se nechal 5 minut inkubovat ve tmě při 37 °C. Poté byl přidán 1 µl červeného kitu a opět se vzorek nechal 5 minut inkubovat. Následně byly 4 µl vzorku nanесeny na podložní sklíčko a přikryty krycím sklíčkem. Vzorek byl pozorován pod mikroskopem, na kterém byl nastaven negativní fázový kontrast, objektiv 20x a fluorescence. V programu SCA byl zvolen modul pro vitalitu, ve kterém bylo vyhodnoceno minimálně 200 spermií. Pomocí fluorescenčních kitů se mrtvé spermie barví červeně a živé modře.

Sledované faktory

Kvalita ejakulátu byla nejdříve hodnocena u jednotlivých hřebců. Následně byli hřebci hodnoceni ve skupinách podle věku a podle intervalu mezi odběry.

Hřebci byli rozděleni do dvou skupin podle věku. První skupina byla tvořena hřebci do 10 let věku, ve druhé skupině byli hřebci starší.

Dále byla kvalita ejakulátu hodnocena podle frekvence odběru hřebců. Podle tohoto kritéria byly vytvořeny tři skupiny:

1. interval mezi odběry 1-2 dny
2. interval mezi odběry 3 dny
3. interval mezi odběry 4 a více dní

Výsledky byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny pomocí počítačového programu Microsoft Excel, kde byl ze získaných hodnot vyhodnocen vývoj kvantitativních a kvalitativních ukazatelů v průběhu sledovaného období. Z jednotlivých sledovaných hodnot byl zjištěn a porovnán průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, minimum a maximum.

6. VÝSLEDKY

6. 1 Výsledky jednotlivých hřebců

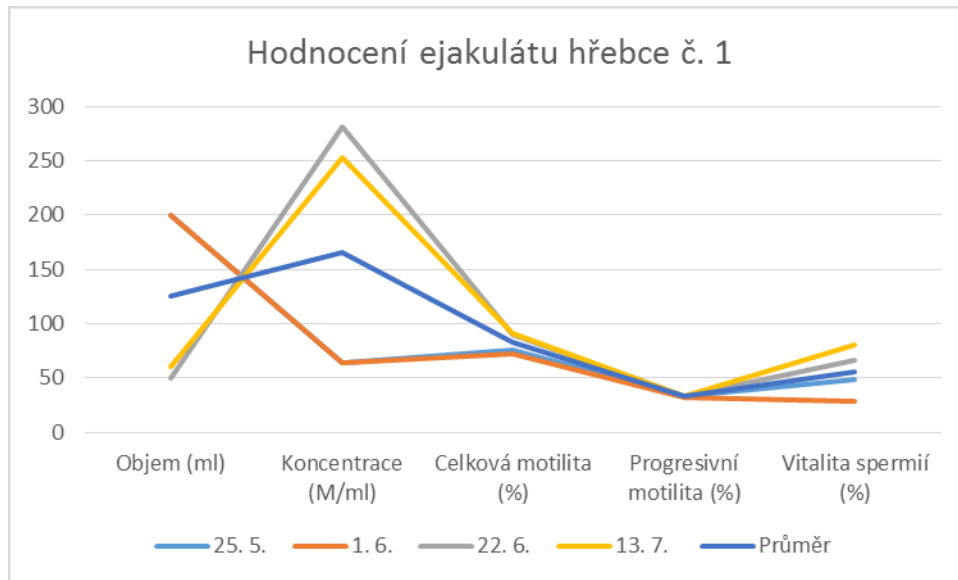
Výsledky hřebce č. 1

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 1 bylo prováděno celkem ve čtyřech odběrových dnech. Jednotlivé ukazatele jsou uvedeny v tabulce č. 2 a v grafu č. 1. Objem ejakulátu kolísal od 50 ml do 200 ml, průměrně 127,50 ml. S vyšším objemem klesala koncentrace spermií. Ta se pohybovala od 64 do 282 M/ml, průměrně 165,75 M/ml. Celková motilita spermií se pohybovala od 72,16 % do 91,61 %, průměrně 82,59 %. Progresivní motilita byla téměř stabilní, průměrně se pohybovala kolem 33 %. Procento vitálních spermií bylo od 28,77 % do 79,95 %, průměrně 55,78 %.

Tabulka 2: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 1

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
25. 5.	200	64	76,09	33,54	48,03
1. 6.	200	64	72,16	32,64	28,77
22. 6.	50	282	90,5	33,43	66,39
13. 7.	60	253	91,61	33,67	79,95
Průměr	127,50	165,75	82,59	33,32	55,79
Směrodatná odchylka	83,81	118,09	9,92	0,46	22,26
Variační koeficient	65,74	71,24	12,01	1,39	39,9

Graf 1: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 1



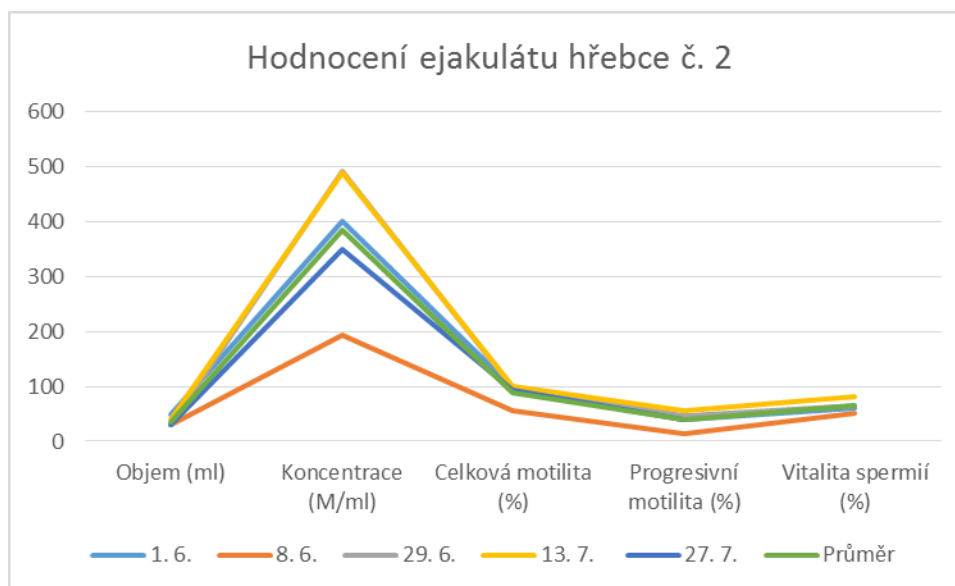
Výsledky hřebce č. 2

Hřebec č. 2 byl odebírán celkem 5x. Výsledky hodnocení ejakulátu jsou uvedeny v následující tabulce a grafu. Objem ejakulátu kolísal od 30 do 50 ml. Průměrná hodnota byla 36 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu byla od 193 do 491 M/ml, průměrně 384,40 M/ml. Celková motilita spermií byla průměrně 89,07 %. Rozpětí se pohybovalo od 55,64 do 99,85 %. Progresivní motilita byla od 14,8 do 55,99 %. Průměrná hodnota byla 39,42 %. Vitální spermie v ejakulátu tvořily rozpětí od 50,33 do 82,01 %. Jejich průměrná hodnota byla 64,45 %.

Tabulka 3: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 2

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1. 6.	50	400	98,8	40,25	61,2
8. 6.	30	193	55,64	14,8	50,33
29. 6.	30	491	97,95	47,55	64,25
13. 7.	40	488	99,85	55,99	82,01
27. 7.	30	350	93,12	38,53	
Průměr	36	384,40	89,07	39,42	64,45
Směrodatná odchylka	8,94	122,64	18,87	15,4	13,14
Variační koeficient	24,85	31,9	21,18	39,06	20,4

Graf 2: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 2



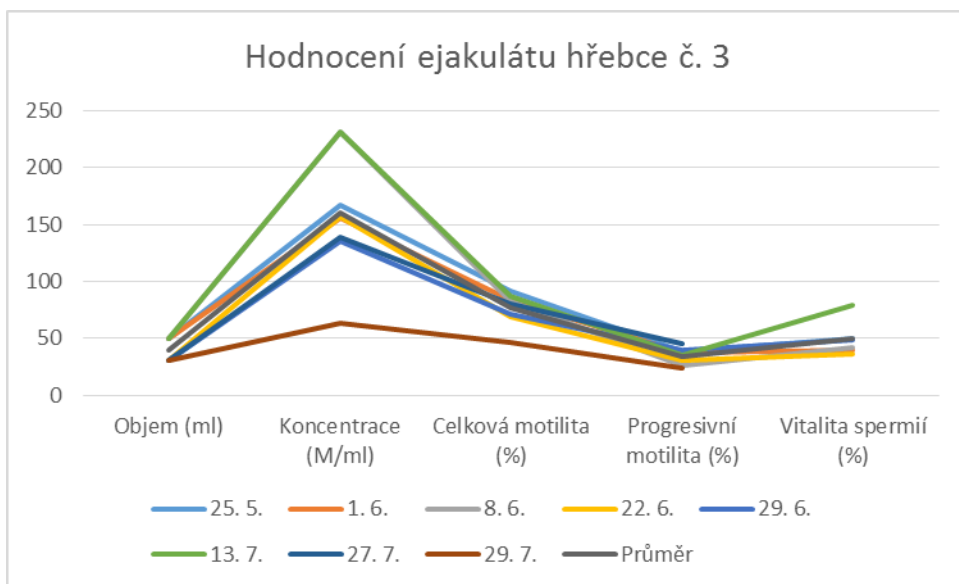
Výsledky hřebce č. 3

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 3 probíhalo celkem v 8 odběrových dnech. Množství objemu ejakulátu bylo v rozmezí od 30 do 50 ml. Průměrně 40 ml. Koncentrace ejakulátu byla od 63 do 231 M/ml, průměrně 159,88 M/ml. Celková motilita spermií byla od 45,95 do 91,69 %, průměrně 76,32 %. Progresivní motilita spermií se pohybovala v rozmezí od 24,2 do 44,82 %. Průměrná hodnota byla 34,40 %. Množství vitálních spermií se pohybovalo od 36,05 do 79,15 %. Průměrně 49,24 %. Hodnoty jednotlivých ukazatelů jsou uvedeny v tabulce č. 4 a grafu č. 3.

Tabulka 4: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 3

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
25. 5.	50	167	91,69	38,01	49,27
1. 6.	50	156	83,47	37,7	40,09
8. 6.	50	231	82,69	25,59	41,86
22. 6.	30	157	68,33	30,51	36,05
29. 6.	30	135	71,41	39,28	49,04
13. 7.	50	231	86,93	35,05	79,15
27. 7.	30	139	80,07	44,82	
29. 7.	30	63	45,95	24,2	
Průměr	40	159,88	76,32	34,40	49,24
Směrodatná odchylka	10,69	54,29	14,47	7,11	15,54
Variační koeficient	26,73	33,96	18,96	20,66	31,55

Graf 3: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 3



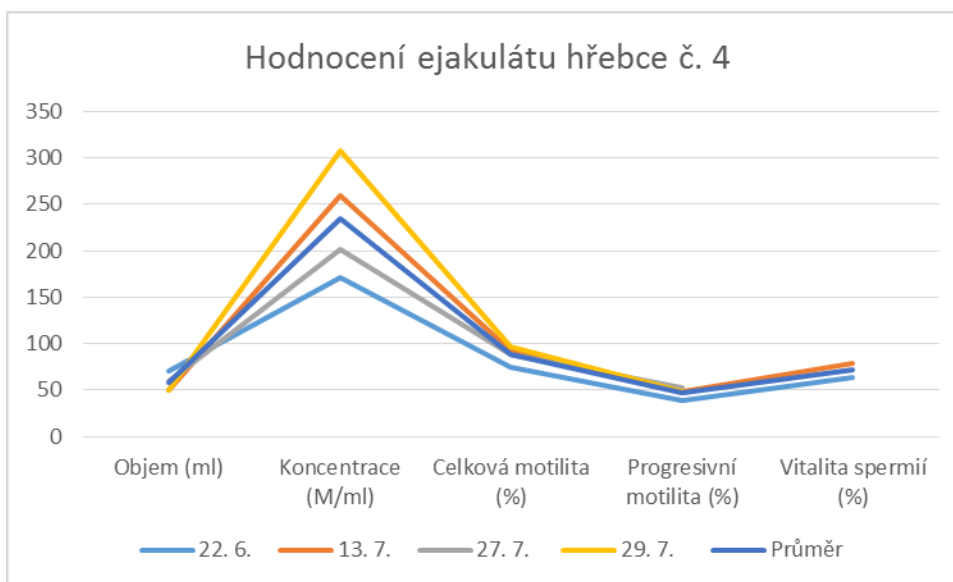
Výsledky hřebce č. 4

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 4 se uskutečnilo ve čtyřech odběrových dnech. Objem ejakulátu se pohyboval od 50 do 70 ml, průměrně 57,5 ml. Koncentrace spermií byla od 171 do 307 M/ml. Průměrná hodnota byla 234,75 M/ml. Celková motilita se pohybovala od 75,02 do 96,68 %, průměrně 87,93 %. Progresivní motilita dosahovala hodnot od 38,85 do 52,53 %. Průměrná hodnota byla 47,12 %. Množství vitálních spermií bylo od 63,27 do 79,15 %, průměrně 71,21 %.

Tabulka 5: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 4

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
22. 6.	70	171	75,02	38,85	63,27
13. 7.	50	260	91,87	48,47	79,15
27. 7.	60	201	88,16	52,53	
29. 7.	50	307	96,68	48,64	
Průměr	57,5	234,75	87,93	47,12	71,21
Směrodatná odchylka	9,57	60,72	9,29	5,83	11,23
Variační koeficient	16,65	25,87	10,56	12,36	15,77

Graf 4: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 4



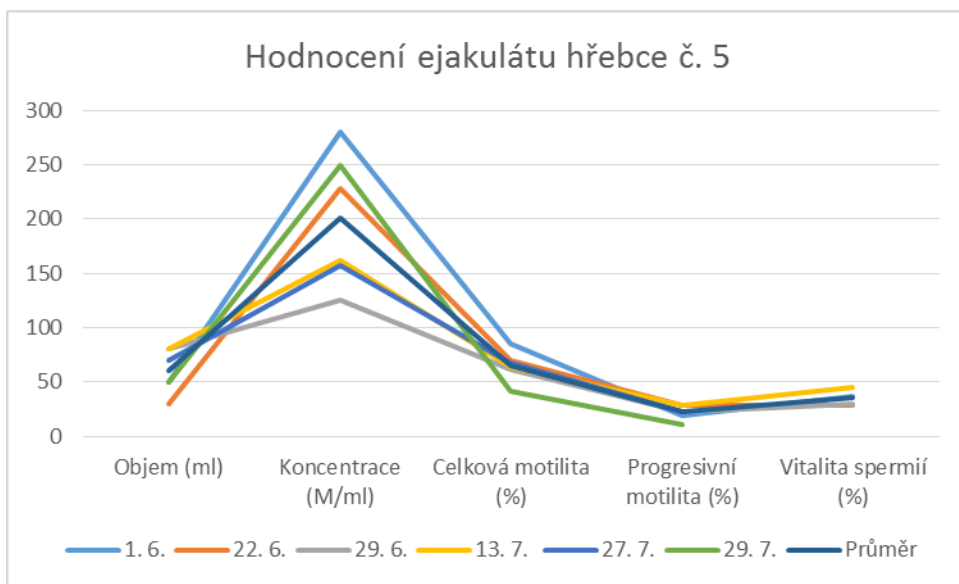
Výsledky hřebce č. 5

Hřelec č. 5 byl hodnocen v šesti odběrových dnech. Podrobné hodnoty jednotlivých ukazatelů jsou v tabulce č. 6 a grafu č. 5. Množství objemu ejakulátu dosahovalo hodnot od 30 do 80 ml. Průměrný objem byl 60 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu se pohybovala od 126 do 280 M/ml, průměrná hodnota byla 200,50 M/ml. Celková motilita spermií byla od 41,31 do 84,90 %. Průměrná hodnota byla 64,82 %. Procento progresivních spermií v ejakulátu se pohybovalo od 10,54 do 29,03 %, průměrně 22,06 %. Vitálních spermií bylo v ejakulátu od 28,62 do 45,12 %. Průměrná hodnota byla 35,16 %.

Tabulka 6: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 5

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1. 6.	50	280	84,9	19,43	37,31
22. 6.	30	228	70,19	28,75	28,62
29. 6.	80	126	61,6	22,25	29,58
13. 7.	80	162	63,38	29,03	45,14
27. 7.	70	157	67,55	22,37	
29. 7.	50	250	41,31	10,54	
Průměr	60	200,50	64,82	22,06	35,16
Směrodatná odchylka	20	60,75	14,18	6,83	7,71
Variační koeficient	33,33	30,3	21,87	30,95	21,91

Graf 5: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 5



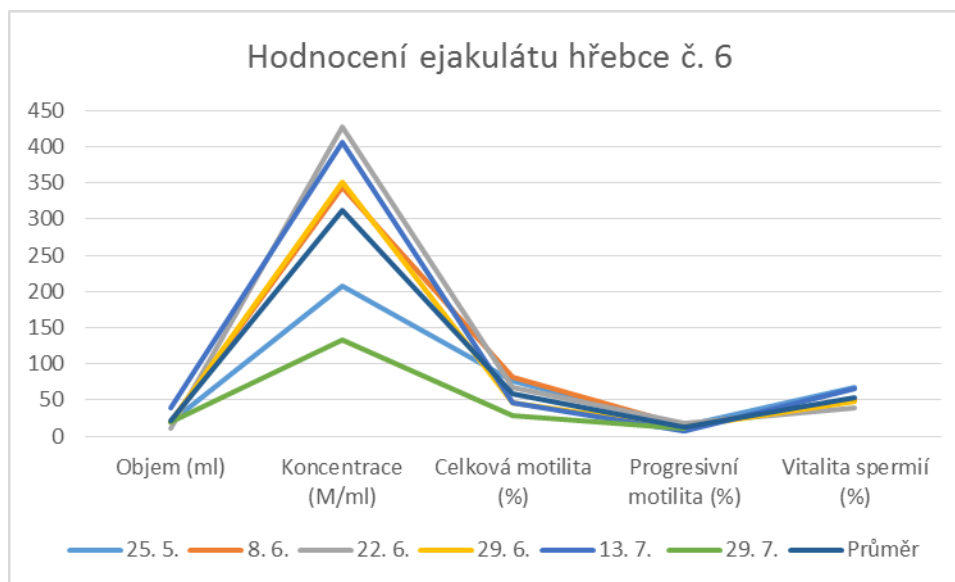
Výsledky hřebce č. 6

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 6 proběhlo v šesti odběrových dnech. Objem ejakulátu kolísal mezi 10 až 40 ml. Průměrná hodnota byla 21,66 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu se pohybovala od 133 do 428 M/ml, průměrně 311,83 M/ml. Celková motilita byla od 29,42 do 82,10 %. Průměrná hodnota byla 58,02 %. Progresivní motilita byla nižší, od 6,62 do 18,24 %. Průměrně 12,98 %. Celkové procento vitálních spermií se pohybovalo od 38,62 do 67,12 %, průměrně 53,76 %. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 7 a v grafu č. 6.

Tabulka 7: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 6

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
25. 5.	20	208	75,84	15,24	67,12
8. 6.	20	344	82,1	14,77	50,54
22. 6.	10	428	67,45	18,24	38,62
29. 6.	20	352	46,99	12,03	47,25
13. 7.	40	406	46,29	6,62	65,28
29. 7.	20	133	29,42	11,03	
Průměr	21,67	311,83	58,02	12,99	53,76
Směrodatná odchylka	9,83	116,42	20,32	4,03	12,18
Variační koeficient	45,38	37,34	35,02	31,01	22,65

Graf 6: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 6



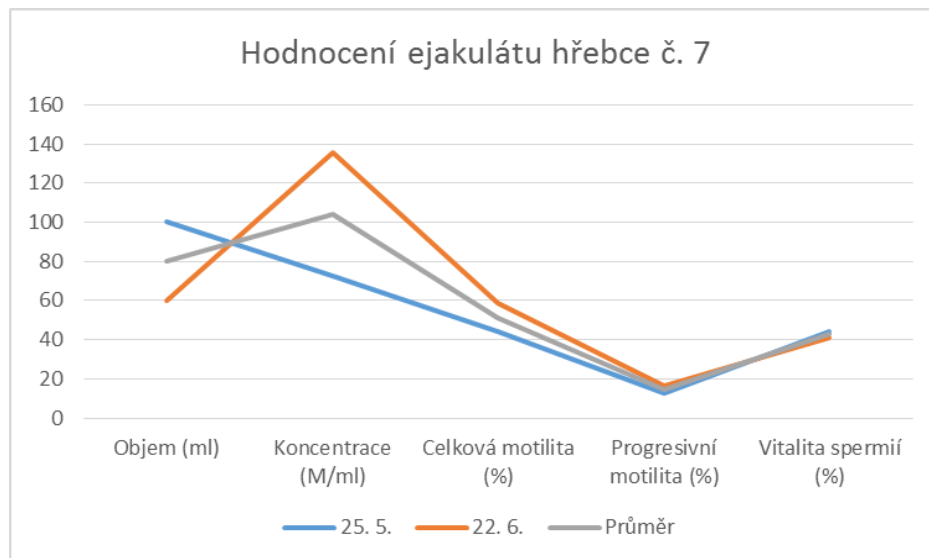
Výsledky hřebce č. 7

U hřebce č. 7 proběhlo hodnocení ejakulátu ve dvou odběrových dnech. Jednotlivé výsledky jsou v tabulce č. 8 a v grafu č. 7. Maximální výše objemu byla 100 ml, minimální 60 ml. Průměrně bylo 80 ml ejakulátu. Koncentrace spermií byla 72,6 a 135,75 M/ml. Průměrná hodnota je 104,18 M/ml. Celková motilita byla 44,02 % a 58,44 %, průměrně 51,23 %. Progresivní motilita byla 12,45 % a 16,25 %. Průměrná hodnota u progresivní motility byla 14,35 %. Podíl vitálních spermií byl 44,5 a 41,25 %, průměrně 24,88 %.

Tabulka 8: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 7

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
25. 5.	100	72,6	44,02	12,45	44,5
22. 6.	60	135,75	58,44	16,25	41,25
Průměr	80	104,18	51,23	14,35	42,88
Směrodatná odchylka	28,28	44,65	10,2	2,69	2,3
Variační koeficient	35,36	42,86	19,9	18,72	5,36

Graf 7: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 7



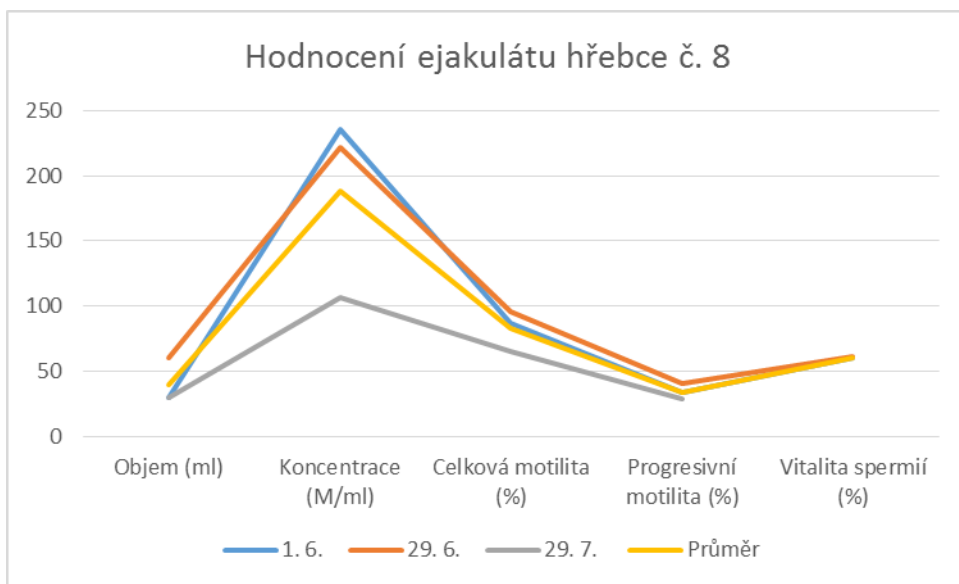
Výsledky hřebce č. 8

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 8 probíhalo ve třech odběrových dnech. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 9 a v grafu č. 8. Objem ejakulátu se pohyboval od 30 do 60 ml. Průměrně 40 ml. Koncentrace spermií byla od 106,19 do 235,93 M/ml, průměrně 188,07 M/ml. Celková motilita se pohybovala od 65,6 do 95,54 %. Průměrná hodnota byla 82,80 %. Progresivní motilita spermií dosahovala maximální hodnoty 40,48 % a minimální 28,24 %. Průměrně dosahovala 34,01 %. Vitálních spermií bylo zjištěno 60 a 61,21 %. Průměrná hodnota byla 60,61 %.

Tabulka 9: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 8

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1. 6.	30	235,93	87,25	33,31	60
29. 6.	60	222,09	95,54	40,48	61,21
29. 7.	30	106,19	65,6	28,24	
Průměr	40	188,07	82,80	34,01	60,61
Směrodatná odchylka	17,32	71,25	15,46	6,15	0,86
Variační koeficient	43,3	37,88	18,67	18,08	1,41

Graf 8: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 8



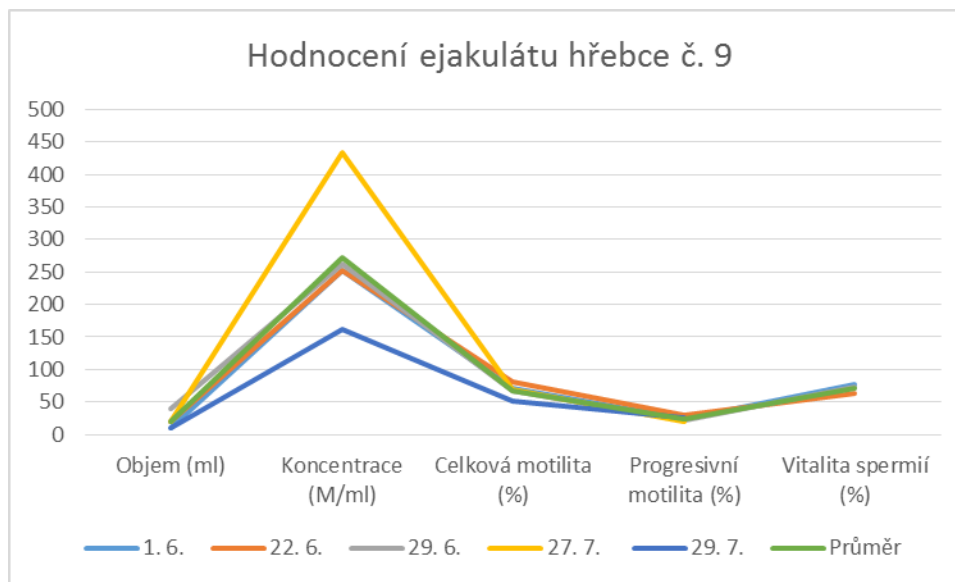
Výsledky hřebce č. 9

V následující tabulce č. 10 a grafu č. 9 jsou výsledky hodnocení ejakulátu hřebce č. 9. Ejakulát byl hodnocen v pěti odběrových dnech. Množství objemu ejakulátu bylo od 10 do 40 ml. Průměrná hodnota byla 20 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu se pohybovala od 162 do 434 M/ml, průměrně 272,8 M/ml. Celková motilita byla od 50,71 do 80,57 %. Průměrná hodnota byla 67,8 %. Progresivní motilita byla v rozmezí od 19,16 do 29,88 %. Průměrná hodnota progresivní motility byla 24,24 %. Procento vitálních spermií se pohybovalo od 62,37 do 76,53 %. Průměrná hodnota byla 70,49 %.

Tabulka 10: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 9

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitality spermií (%)
1. 6.	10	253	71,89	24,84	76,53
22. 6.	20	252	80,57	29,88	62,37
29. 6.	40	263	66,76	21,17	72,58
27. 7.	20	434	69,08	19,16	
29. 7.	10	162	50,71	26,14	
Průměr	20	272,8	67,8	24,24	70,49
Směrodatná odchylka	12,25	98,97	10,89	4,21	7,31
Variační koeficient	61,24	36,28	16,07	17,38	10,37

Graf 9: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 9



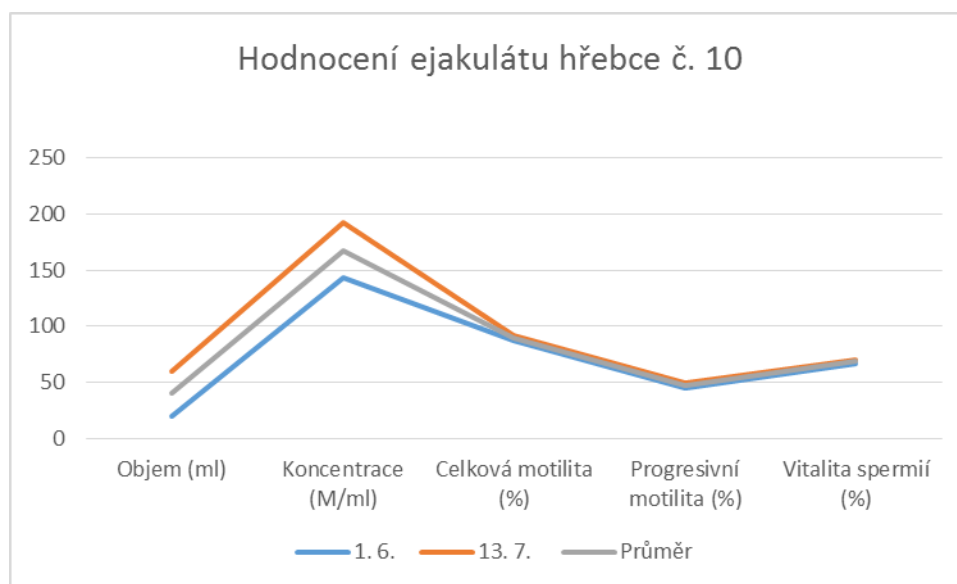
Výsledky hřebce č. 10

Hodnocení ejakulátu u hřebce č. 10 probíhalo ve dvou odběrových dnech. Zjištěné hodnoty objemu ejakulátu byly 20 a 60 ml, průměrná hodnota byla 40 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu byla 142,86 a 192,64 M/ml, průměrná hodnota byla 167,75 M/ml. Celková motilita byla 87,53 a 91,54 %. Průměrně 89,54 %. Progresivní motilita byla 44,97 a 48,97 %. Průměrná hodnota byla 46,97 %. Procento vitálních spermií bylo 66,81 a 70,45 %, průměrně 68,63 %.

Tabulka 11: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 10

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1. 6.	20	142,86	87,53	44,97	66,81
13. 7.	60	192,64	91,54	48,97	70,45
Průměr	40	167,75	89,54	46,97	68,63
Směrodatná odchylka	28,28	35,2	2,84	2,83	2,57
Variační koeficient	70,71	20,98	3,17	6,02	3,75

Graf 10: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 10



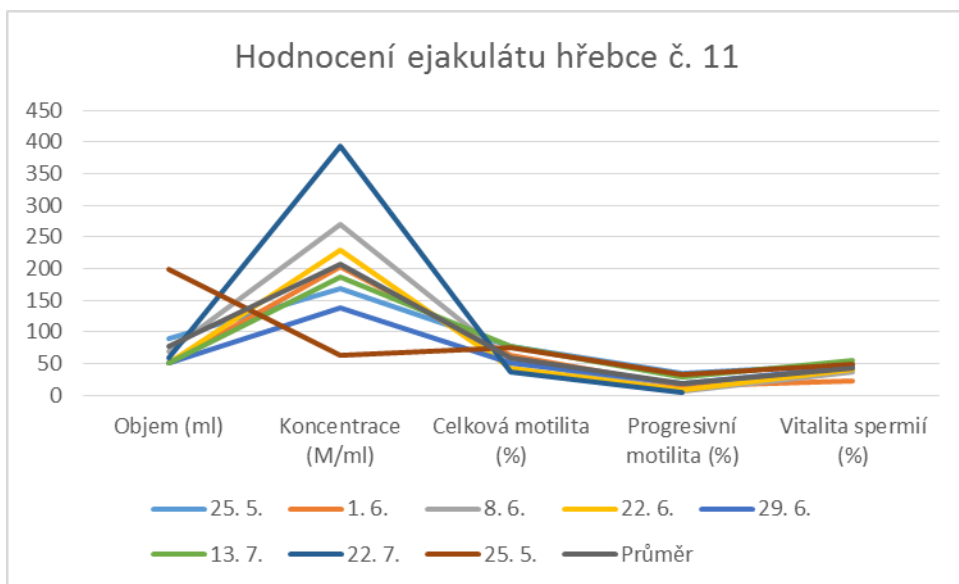
Výsledky hřebce č. 11

Hodnocení ejakulátu hřebce č. 11 probíhalo celkem v osmi odběrových dnech. Jednotlivé ukazatele a hodnoty jsou v tabulce č. 12 a v grafu č. 11. Objem ejakulátu kolísal od 20 do 90 ml. Jeho průměrná hodnota byla 77,55 ml. Koncentrace spermií se pohybovala v rozmezí od 138 do 452 M/ml, průměrně 206,63 M/ml. Celková motilita spermií se pohybovala od 37,43 do 78,04 %. Průměrná hodnota byla 59,94 %. Progresivní motilita byla od 3,39 do 33,92 %. Průměrně 18,24 %. Vitalita spermií se pohybovala v rozmezí od 22,5 do 54,87 %, průměrná hodnota byla 42,25 %.

Tabulka 12: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 11

Datum odběru	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
25. 5.	90	169	78,04	33,92	48,21
1. 6.	50	204	63,23	14,8	22,5
8. 6.	70	269	54,39	5,43	37,35
22. 6.	50	230	42,14	8,41	40,06
29. 6.	50	138	51,07	18,76	44,75
13. 7.	50	186	77,1	27,67	54,87
22. 7.	60	393	37,43	3,39	
29. 7.	20	452	56,63	14,69	
Průměr	77,5	206,63	59,94	18,24	42,25
Směrodatná odchylka	51,48	97,15	16,15	12,32	10,43
Variační koeficient	66,42	47,02	26,95	67,54	24,7

Graf 11: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 11



Souhrnné průměrné výsledky všech hřebců

Průměrný objem ejakulátu, uvedený v tabulce 13, dosahoval 54,57 ml. Směrodatná odchylka 31,29 ukazuje na širší rozptyl od aritmetického průměru. Variační koeficient 55,34 % ukazuje velkou variabilitu hodnot. Průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla 217,88 M/ml. Směrodatná odchylka 79,18 udává velmi široký rozptyl od průměrných hodnot. Variační koeficient 36,34 % znamená vyšší variabilitu hodnot. Průměrná celková motilita spermií se pohybovala na úrovni 73,64 %, směrodatná odchylka od průměru byla nízká (13,83) a variační koeficient 18,78 % představuje nižší variabilitu hodnot. Průměrná progresivní motilita spermií byla 29,74 %. Směrodatná odchylka 12,18 vykazovala nízký rozptyl hodnot od průměru. Variační koeficient ukazoval vyšší variabilitu hodnot (40,97 %). Vitalita spermií byla průměrně 55,86 %. Směrodatná odchylka 12,41 ukazovala na nižší rozptyl hodnot od průměru. Variační koeficient 22,21 % udává nižší variabilitu hodnot.

Tabulka 13: Celkové průměrné hodnoty jednotlivých hřebců

Hřebci	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1	127,5	165,75	82,59	33,32	55,79
2	36	384,4	89,07	39,42	64,45
3	40	159,88	76,32	34,4	49,24
4	57,5	234,75	87,93	47,12	71,21
5	60	200,5	64,82	22,06	35,16
6	21,67	311,83	58,02	12,99	53,76
7	80	104,18	51,23	14,35	42,88
8	40	188,07	82,8	34,01	60,61
9	20	272,8	67,8	24,24	70,49
10	40	167,75	89,54	46,97	68,63
11	77,55	206,63	59,94	18,24	42,25
Celkový průměr	54,57	217,88	73,64	29,74	55,86
Směrodatná odchylka	31,29	79,18	13,83	12,18	12,41
Variační koeficient	57,34	36,34	18,78	40,97	22,21
Minimum	20	104,18	51,23	12,99	35,16
Maximum	127,5	384,4	89,54	47,12	71,21

6. 2 Stanovení kvality ejakulátu v závislosti na věku hřebců

Hřebci byli podle věku rozděleni na dvě skupiny. První skupinu, do které byli zařazeni hřebci ve věku do 10 let včetně, tvořilo 5 hřebců. Hřebci starší 10 let tvořili skupinu druhou a v této skupině bylo zařazeno 6 hřebců.

Zjištěný průměrný objem ejakulátu, u hřebců do 10 let, byl průměrně 50,83 ml. Koncentrace spermií v ejakulátu byla průměrně 218,79 M/ml. Celková motilita spermií u mladších hřebců byla 67,5 %, z toho progresivní motilita byla průměrně 24,87 %. Vitalita spermií byla 53,95 %.

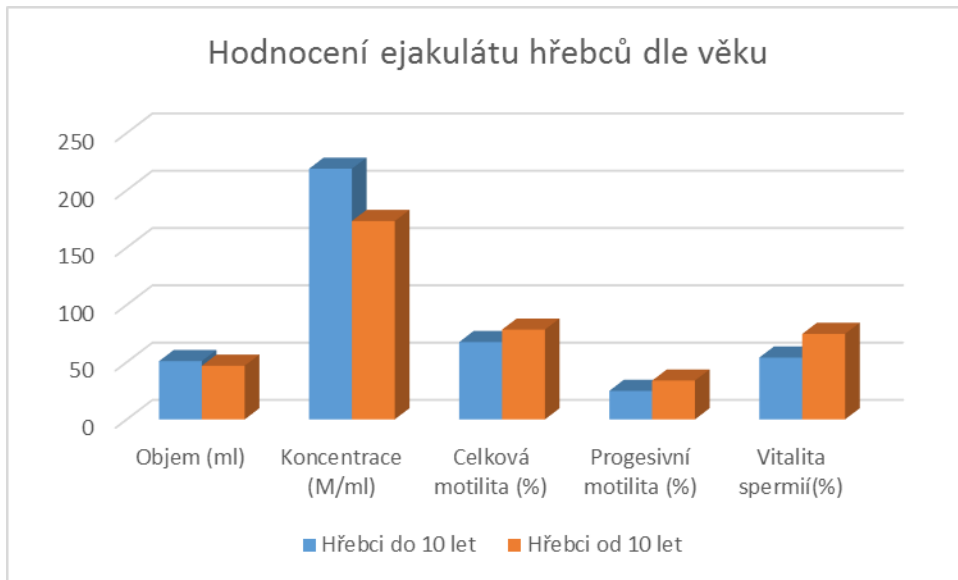
U skupiny starších hřebců byl zjištěn průměrný objem ejakulátu 46,83 ml. Koncentrace spermií byla 173,15 M/ml. Celková motilita byla průměrně 78,36 %. Progresivní motilita byla 33,9 %. Vitalita spermií byla 74,63 %.

Z tabulky 14 je patrné, že vyšší objem a koncentrace spermií byla zjištěna u mladých hřebců do 10 let. U starších hřebců nad 10 let byla pozorována lepší celková i progresivní motilita a vitalita spermií.

Tabulka 14: Hodnocení hřebců dle věku

	Počet sledování	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
Hřebci do 10 let	23	50,83	218,79	67,5	24,87	53,95
Hřebci nad 10 let	30	46,83	173,15	78,36	33,9	74,63

Graf 12: Hodnocení ejakulátu dle věku hřebců



6. 3 Stanovení kvality ejakulátu v závislosti na četnosti odběru

Jednotlivé hodnoty hřebců byly rozděleny do následujících tří skupin:

1. interval mezi odběry 1-2 dny
2. interval mezi odběry 3 dny
3. interval mezi odběry 4 a více dní

V tabulce 15 jsou uvedeny zjištěné průměrné hodnoty objemu ejakulátu, koncentrace spermií, motility (celkové a progresivní) a vitality spermií. Při intervalu mezi odběry 1-2 dny byl průměrný objem ejakulátu 56,43 ml. Průměrná koncentrace spermií byla 227,5 M/ml. Celková motilita spermií byla 66,75 %. Progresivní motilita spermií byla průměrně 29,2 %. Vitalita spermií byla průměrně 55,52 %.

Při intervalu mezi odběry 3 dny byla průměrná hodnota objemu ejakulátu 50 ml. Koncentrace spermií byla průměrně 238,35 M/ml. Celková motilita byla průměrně 71,57 %. Hodnota progresivní motility byla 25,75 %. Vitalita spermií byla 49,74 %.

Objem ejakulátu, při intervalu odběru 4 a více dnů, byl průměrně 60 ml.

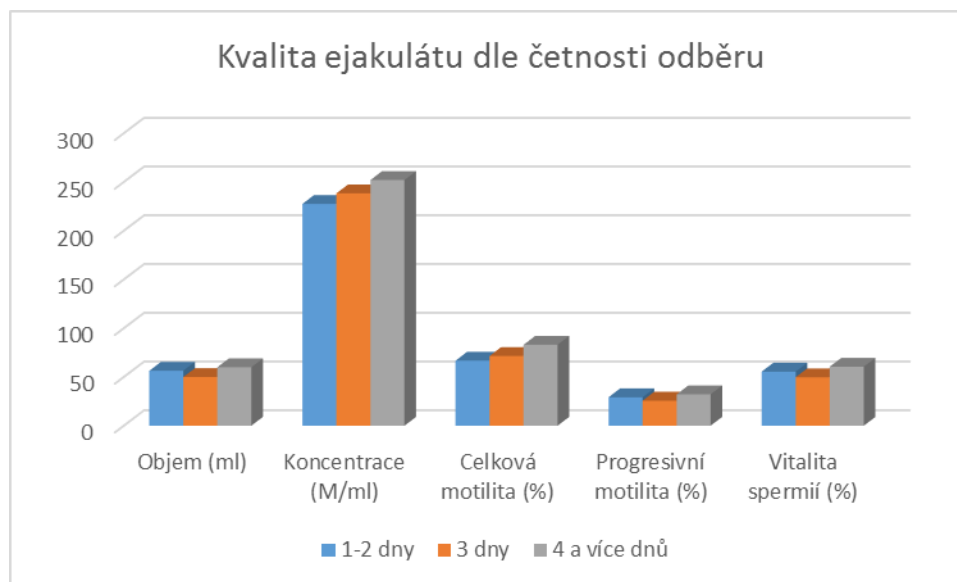
Koncentrace spermií byla průměrně 252 M/ml. Hodnota celkové motility byla průměrně 83,02 %. Progresivní motilita byla 32,2 %. Vitalita spermií byla průměrně 60,55 %.

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejlepší kvality ejakulátu bylo dosaženo při intervalu mezi odběry 4 a více dní. Naopak nejhorší kvalita ejakulátu byla pozorována s dobou sexuálního odpočinku 1-2 dny před odběrem.

Tabulka 15: Kvalita ejakulátu podle četnosti odběru

Interval mezi odběry	Počet sledování	Objem (ml)	Koncentrace (M/ml)	Celková motilita (%)	Progresivní motilita (%)	Vitalita spermií (%)
1-2 dny	14	56,43	227,5	66,75	29,2	55,52
3 dny	26	50	238,35	71,57	25,75	49,74
4 a více dnů	6	60	252	83,02	32,2	60,55

Graf 13: Hodnocení kvality ejakulátu dle četnosti odběru



7. DISKUZE

Průměrné hodnoty objemu ejakulátu se ve sledovaném období pohybovaly v rozmezí od 20 do 60 ml. Dle **Loudy et al. (2001)** kolísá objem ejakulátu hřebce od 50 do 200 ml. **Věžník et al. (2004)** uvádí minimální objem ejakulátu 20 ml. Dále uvádí, že objem ejakulátu je variabilní a značně kolísá, což je způsobeno řadou faktorů, zejména plemenem a hmotností hřebce, intenzitou odběrů, stupněm pohlavního vydráždění, technikou odběru ejakulátu, ročním obdobím apod. U hřebců byly naměřeny hodnoty od 10 ml do 200 ml. Podle **Vyhlášky Mze k zákonu č. 154/2000 Sb.**, o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (dále jen Vyhlášky) jsou stanoveny požadavky na hřebčí ejakulát pro krátkodobou konzervaci, kde požadavek na minimální objem ejakulátu je 10 ml. Všichni hřebci splnili podmínku pro následné použití u objemu ejakulátu. **Samper et al. (2007)** dodává, že hodnoty objemu ejakulátu v přípouštěcí sezóně a mimo sezónu mohou být rozdílné až o 50 %. V této práci je průměrná hodnota objemu ejakulátu 54,57 ml. Tato hodnota je vyšší než uvádí **Sieme et al., (2003)** 48,5 ml a téměř shodná s hodnotou, která je uvedena v práci **Quientero-Moreno et al., (2002)** 49,5 ml.

Koncentrace spermií v ejakulátu hřebců je variabilní a pohybuje se v rozmezí od 100 do 300 M/ml, frakce bohatá na spermie může dosáhnout koncentrace až 800 M/ml (**Louda et al., 2001**). Průměrné hodnoty koncentrace spermií ve sledovaném období se pohybovaly v rozmezí od 104,18 M/ml do 384,4 M/ml. Dle **Věžníka et al. (2004)** je minimální koncentrace spermií 50 M/ml. Podle Vyhlášky je požadována koncentrace spermií minimálně 100 M/ml. Všechny průměrné výsledky hřebců odpovídají zákonem stanovené normě a mohou se použít pro inseminaci.

Průměrné hodnoty celkové motility se pohybovaly v rozmezí od 51,23 do 89,54 %. Podle **Loudy et al. (2001)** se motilita spermií pohybuje od 60 do 80 %. Zároveň také uvádí, že při krátkodobé konzervaci by motilita spermií měla být alespoň 50 %. **Věžník et al. (2004)** uvádí jako dolní hraniční hodnotu požadovaného procenta

pohyblivých spermií 60 %. Podle **Severy et al. (2008)** je hodnocení motility spermií složité a je ovlivněno teplotou a schopnostmi hodnotitele, což vede k vysoké variabilitě ve výsledcích mezi jednotlivými laboratořemi a laboranty. Tyto faktory je však možné eliminovat využitím objektivních metod. Podle Vyhlášky jsou stanoveny požadavky na hřebčí ejakulát pro krátkodobou konzervaci, kde požadavek je nejméně 50 % aktivních spermií v ejakulátu. Průměrná hodnota všech hřebců se pohybovala nad hranicí 50 %. Metodě CASA se ve své práci věnovali **Quientero-Moreno et al. (2002)**. Průměrné hodnoty celkové motility spermií získané v jejich práci jsou výrazně vyšší (88,9 %), než průměrné hodnoty celkové motility spermií, které jsou uvedeny v této práci (71,6 %). Podle **Kubíčka (2010)** se hodnotí čtyři stupně motility - rychlá progresivní motilita, pomalá progresivní motilita, non-progresivní motilita, imotilní spermie.

Průměrná progresivní motilita se u sledovaných hřebců pohybuje od 12,99 do 47,12 %. Podle **Kozumplíka a Gamčíka et al. (1992)** je progresivní pohyb spermií znakem dobré plnohodnotnosti ejakulátu a mělo by jej vykazovat alespoň 70 % spermií.

Vitalita spermií má průměrné hodnoty od 35,16 do 71,21 %. **Kliment et al. (1989)** uvádí, že by sperma určené k tvorbě inseminačních dávek mělo obsahovat minimálně 70 % živých spermií.

Podle Vyhlášky má ejakulát pro krátkodobou konzervaci při posledním hodnocení dále obsahovat minimálně 60 % morfologicky normálních spermií. Frekvence výskytu patologických spermií nesmí překročit 30-35 %, z toho s primárními změnami (změny, vznikající v průběhu spermiogeneze) do 10 % (**Louda et al., 2001**).

8. ZÁVĚR

Chov koní má stále rozvíjející se tendenci. Důležitý je rozvoj plemenitby. Na zlepšení kvality chovaných koní se výrazně podílí možnost inseminace klisen kvalitními hřebci. Jejich ejakulát musí být produkován v dostatečném množství a odpovídající kvalitě. Cílem práce bylo zpracovat přehled o kvalitě ejakulátu hřebců používaných v inseminaci Zemského hřebčince v Písku. Dále byla kvalita ejakulátu hodnocena podle věku hřebců a podle intervalu mezi odběry. V této diplomové práci byl ejakulát hodnocen pomocí objektivní počítačové metody CASA, systémem SCA.

Při sledování kvality ejakulátu hřebců byly zjištěny následující výsledky:

- Objem ejakulátu u hřebců kolísal od 20 do 127,5 ml. Průměrná hodnota objemu ejakulátu za celé sledované období byla 54,57 ml.
- Hodnoty koncentrace spermií se průměrně u jednotlivých hřebců pohybovaly od 104,18 do 384,4 M/ml. Průměrná hodnota koncentrace spermií v ejakulátu za celé sledované období byla 217,88 M/ml.
- Průměrné hodnoty celkové motility se pohybovaly v rozmezí od 51,23 do 89,54 %. Celková průměrná hodnota za celé sledované období byla 73,64 %.
- Progresivní motilita se u hřebců průměrně pohybovala od 12,99 do 47,12 %. Celková průměrná hodnota za celé sledované období byla 29,74 %.
- U vitality spermií byly zjištěny průměrné výsledky od 35,16 do 71,21 %. Za celé sledované období byla zjištěna celková průměrná hodnota 55,86 %.
- U mladších hřebců do 10 let byl zjištěn větší objem ejakulátu a vyšší koncentrace spermií. Starší hřebci nad 10 let měli lepší hodnoty celkové i progresivní motility a vitality spermií.
- Pravidelné odebírání hřebců zlepšuje kvalitu spermatu, ale důležité je dodržovat interval mezi odběry. Nejlepší hodnoty kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu byly zjištěny při intervalu mezi odběry 4 a více dní. Kvalitní byl i ejakulát odebíraný po 3 dnech, nejhorší kvalita ejakulátu byla zjištěna u vzorků, kde před jejich odběrem byla pauza 1-2 dny.

Z jednotlivých zjištění, uvedených ve výsledcích a závěru práce, je možné doporučit pro další činnost reprodukčním organizacím a chovatelům ke zvážení následující opatření:

- U plemenných hřebců je třeba provádět základní hodnocení kvality ejakulátu periodicky v průběhu připouštěcí sezóny.
- V návaznosti na zjištěné hodnoty by z hlediska kvantitativních i kvalitativních ukazatelů spermatu měl být dodržován interval mezi odběry ejakulátu nejméně 4 dny.
- Hřebci se mohou k plemenitbě využívat do vyššího věku bez omezení. Důležitá je pravidelná kontrola kvality spermatu.

Každý podnik zaměřený na reprodukci hřebců by měl pravidelně kontrolovat kvalitu ejakulátu nejen před zařazením hřebce do chovu, ale i v průběhu celé připouštěcí sezóny. Hodnocení spermatu hřebců by se mělo sjednotit a výsledky by měly být průběžně zveřejňovány. Metoda CASA je nejlepším řešením pro hodnocení ejakulátu.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

CONTRI, A., Gloria, A., Robbe, D., Valorz, C., Wegher, L., Carluccio, A. (2013): Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim. Reprod. Sci.*, 136, 252-259

DUŠEK, J. *Chov koní*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Brázda, 2007, 400 s. , [15] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-209-0352-5.

FLADE, J. E. *Chov a športové využitie koní*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990. Živočíšna výroba. ISBN 80-07-00252-9.

GAMČÍK, P. a KOZUMPLÍK J. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. 3.vyd. /. Bratislava: Príroda, 1992. ISBN 80-07-00540-4.

Inseminace čerstvým spermatem. *Zemský hřebčinec Písek* [online]. Písek [cit. 2015-9-18]. Dostupné z: <http://www.zemskyhrebcecpisek.cz/plemenni-hrebci?oid=4095678&nid=13471&action=detail&id=2816>

JELÍNEK, P. a KOUDELA K. *Fyziologie hospodářských zvířat*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 409 s. ISBN 80-715-7644-1.

KLIMENT J. *et al.* (1989): Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda Bratislava, 2. vyd. ISBN 80-070-0027-5, 378 s.

Koldův atlas veterinární anatomie. Edited by V. Komárek - Pavel Dvorský - Viera Postníková. 1. vyd. Praha: Grada, 1999. 701 s. ISBN 80-7169-352-9.

KOMÁREK, V. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1971, 574 s.

KUBÍČEK V., Spermilogické vyšetření. In: *Česká společnost pro sexuální medicínu* [online]. Praha: 1. LF, UK, 2010 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.cssmweb.cz/news/spermilogicke-vysetreni/>

LOUDA F. *et al.* (2001): Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. ČZU v Praze. ISBN 80-213-0702-1, 225 s.

LOVE, C. C. (2012) Measurement of concentration and viability in stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 464-466

MARTINEZ, A. L. P. (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Sciences*, 82-83

MARVAN, F. *et al.* *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 2. Praha: Brázda, 1998. ISBN 80-209-0273-2.

MISAŘ, D. a JISKROVÁ I.: *Chov a šlechtění koní*. 2. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005, 170 s. ISBN 978-80-7157-510-8. 19.

MORRELL, J.M., C. KLEIN, N. LUNDEHEIM, E. EROL a M.H.T. TROEDSSON. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science* [online]. 2014, vol. 145, 1-2, s. 47-53 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.005.

MORTIMER, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3, 403-439

MÜLLER, Z.: Nové reprodukční hodnoty v plemenitbě koní. In: *Chov a šlechtění koní v současných ekonomických podmínkách*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2006, 147 s. ISBN 80-7375-006-6

MURPHY, C., A.M. ENGLISH, S.A. HOLDEN a S. FAIR. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Animal Reproduction Science* [online]. 2014, vol. 145, 3-4, s. 123-129 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.013

PEARL, Ch. A. a ROSER J. F. Lactoferrin expression and secretion in the stallion epididymis. *Reproductive Biology* [online]. 2014, vol. 14, issue 2, s. 148-154 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.repbio.2013.10.005.

POWER, J. H. (1963): A study of canine semen: physical factors which may effect the elektrolyte concentration in the ejaculate. Irish Veterinary Journal. 17, 226-231

QUIETERO-MORENO A., MIRÓ J., TERESA RIGAU A., RODRÍGUEZ-GIL J.E. (2002): Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. Biol Reprod 67 (2), 648-654.

ROOT KUSTRITZ, M. V. (2007): The value of canine semen evaluation for practitoners. Theriogenology, 68, 329 – 337

SAMPER, J. C., PYCOCK, J. F., MCKINNON, A. O. (2007). Current therapy in equine reproduction. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, ISBN 978-0-7216-0252-3. 492 s

SEVERA L., MÁCHAL L., KŘIVÁNEK I., MACHATKOVÁ M., MAMICA O. (2008): Characteristic of selected rheological parameters of stallion ejaculate. Archiv Tierzucht 51, 16–22.

SIEME H., KATILA T., KLUG E. (2003): Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. Repord Domest Anim. 38(4), 305-311

STEJSKALOVÁ, S., (1996): *Zkušenosti s inseminaci mraženým spermatem*. Jezdectví, č. 11, 19. s.

VĚŽNÍK Z. *et al.* (2004): *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatolýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně. ISBN 80-86895-01-7, 266 s.

Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). Příloha č.5, část II. Plemenitba koní, http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/ZAKONY/2000/471000/Sb_471000_-----_.php

10. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ V TEXTU

Tabulka 1: Základní hodnoty ejakulátu hřebců (Věžník et al., 2004).....	13
Tabulka 2: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 1.....	25
Tabulka 3: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 2.....	27
Tabulka 4: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 3.....	28
Tabulka 5: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 4.....	30
Tabulka 6: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 5.....	31
Tabulka 7: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 6.....	33
Tabulka 8: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 7.....	34
Tabulka 9: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 8.....	35
Tabulka 10: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 9.....	37
Tabulka 11: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 10.....	38
Tabulka 12: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 11.....	39
Tabulka 13: Celkové průměrné hodnoty jednotlivých hřebců.....	41
Tabulka 14: Hodnocení hřebců dle věku.....	42
Tabulka 15: Kvalita ejakulátu podle četnosti odběru.....	44
Graf 1: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 1.....	26
Graf 2: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 2.....	27
Graf 3: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 3.....	29
Graf 4: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 4.....	30
Graf 5: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 5.....	32
Graf 6: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 6.....	33
Graf 7: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 7.....	34
Graf 8: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 8.....	36
Graf 9: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 9.....	37
Graf 10: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 10.....	38
Graf 11: Hodnocení ejakulátu hřebce č. 11.....	40
Graf 12: Hodnocení ejakulátu dle věku hřebců.....	43
Graf 13: Hodnocení kvality ejakulátu dle četnosti odběru.....	44

11. PŘÍLOHY

Seznam hřebců Zemského hřebčince Písek

(zdroj: <http://www.zemskyhrebcecpisek.cz/plemenni-hrebci?oid=4095678&nid=13471&action=detail&id=2816>, 2015)

2942 Almar

2767 Alan	2695 Aldor	2428 Agur
		JM 2877 Šárka
55/716 Markýza	59/347 Erika	2451 Makon - 2
		JM 3138 Elza
55/716 Markýza	2474 Makon - 3	2168 Mabas
		JM 2382 Lucka A (Elza)
	JM 3990 Porta	2236 Pilov
		JM 3297 Astra

Českomoravský belgik, tmavý ryzák, narozen 2. 4. 2004

Tělesné míry hřebce: kohoutková výška pásková 180 cm, hůlková 163 cm, obvod hrudi 223 cm, obvod holeně 25,5 cm.



1583 Andiamo

Liz. Amadeus HBIA	Afgan II HBIA	Afgan Liz. HBIA
		Muschi /T W
	Akelei T	Wälder HBIA
		Anselma
Novelle A** SP	Winterstein HBIA	Wildmoos HBIA
		Alma
	Nina A** SP	Apikal HBIA
		Nelke SP

Hafling, ryzák, narozen 30. 4. 1997

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 157 cm, hůlková 146 cm, obvod hrudi 182 cm, obvod holeně 20,0 cm.



1001 Cassini's Son – T

Cassini I Holst	Capitol Holst	Capitano Folia
	Wisma Holst	Caletto II Prisma
	Lorenz Holst	Ladykiller Babusa
	Ultra II	Fernando I Larissa

Holštýn, bělouš, narozen 21. 4. 1997

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 184 cm, hůlková 174 cm, obvod hrudi 194 cm, obvod holeně 22,5 cm.



1558 Galandro ZH

1053 Guidam Sohn KWPN	Guidam KWPN	Quidam de Revel
	Fanakta KWPN	Fougere (Venutard)
21/417 Palomina Princess ČT	536 Lopez-17 ČT	Zeus
		Nokta (Akteur)
	21/189 Perlet' ČT	Lopez
		782 Angelique (Alme Z)
	299 Przedswit XVI-12	ZČ 675 Perla (Przedswit X)

Český teplokrevník, ryzák, narozen 1. 6. 2007

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 178 cm, hůlková 168 cm, obvod hrudi 200 cm, obvod holeně 22,0 cm.



1029 Generalissimus aversa XLIV

Generalissimus Area XXXI	980 Generalissimus XXIX	724 Favory IV - K
		817 Generalissimus XXIII
226 Aversa (F XI)	924 Area (S XXXV)	Sacramoso XXXV
		784 Legion
226 Aversa (F XI)	Favory XI - K	Favory IX CZ
		926 Generale XLIV
226 Aversa (F XI)	104 Agatha (Ru)	289 Rudolfo
		24 Alata (Gss XXVII)

Starokladrubský bělouš, bělouš, narozen 10. 2. 2001

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 181 cm, hůlková 171 cm, obvod hrudi 194 cm, obvod holeně 22,0 cm.



2049 Go-On T. S.

Corlensky G Westf.	Cornet Obolensky BWP	Clinton Holst.
		Rabanna van Costersveld BWP
	BA Pershing Westf.	Arpeggio Westf.
		Pershing Westf.
Corolla T.S. KWPN	Air Jordan Z Old.	Argentinus Hann.
		Mandoline Old.
	Worela T.S.	Lupicor KWPN
		Porella KWPN

Holandský teplokrevník, hnědák, narozen 25. 3. 2011

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 173 cm, hůlková 163 cm, obvod hrudi 190 cm, obvod holeně 21,5 cm.



1345 Heartbreak ZH

Heartbreaker - KWPN	Nimmerdor - KWPN	Farn 1467
		Ramona (Koridon)
	Bacarole - KWPN	Silvano
		Orchidee (Uppercut)
Wide Awake v.d. - Noordheuvel - BWP	Darco - BWP	Lugano van La Roche
		Ocoucha (Codex)
	Nibrahime - BWP	Hibrahim von Pferdheim
		Gerlinde (Askan de Lauzelle)

Belgický teplokrevník, hnědák, 26. 2. 2005

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 173 cm, hůlková 163 cm, obvod hrudi 188 cm, obvod holeně 21,0 cm.



1837 Neugot z Borčic

444 Neugot - 20	Neugot I	2009 Neugot - 2
		3450 KPKK Mery
	252 Hegar - 3 (Něha)	Hegar
		209 Hubír (Geza)
19/313 Denisa	245 Gosun	Godit
		SM 2300 Jasná
	69/ 722 Úroda	Gonet
		SM 2096 Igora 2/80

Slezský norický kůň, hnědák, narozen 3. 4. 2010

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 171 cm, hůlková 159 cm, obvod hrudi 189 cm, obvod holeně 25,0 cm.



1154 Quick Lauro Z

Quick Star	Galoubet A	Alme Z
		Viti
	Stella	Nithard x
		Flora
Laura	Lauriston	Latus I
		Gerlinde
	Wienerin	Raphael
		Winzerin

Zangersheide, hnědák, narozen 18. 4. 1994

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 172 cm, hůlková 162 cm, obvod hrudi 189 cm, obvod holeně 21,5 cm.



6062 Scyris

In Camera (IRE)	Sadler's Wells (POL)	Northern Dancer (CAN)
		Fairly Bridge (USA)
	Calandestina (USA)	Secretariat (USA)
		My Charmer (USA)
Scyntia (POL)	Euro Star (IRE)	Habitat (USA)
		Flying (GB)
	Secesja (POL)	Antiquarian (GB)
		Sigrynda (POL)

Anglický plnokrevník (POL), bělouš, narozen 3. 4. 2000

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 176 cm, hůlková 165 cm, obvod hrudi 190 cm, obvod holeně 21,0 cm.



1942 Warness

Warrant KWPN	Numero Uno KWPN	Libero H Holst.
		Jolanda KWPN (Lord Calando)
	Karanta KWPN	Nimmerdor KWPN
		Furanta KWPN (Purioso)
Bariness KWPN	Larino KWPN	Concorde KWPN
		Erina (Armstrong)
	Narzisse	Fedor KWPN
		Cirkeness (Ahorn Z)

Holandský teplokrevník, tmavý hnědák, narozen 10. 5. 2010

Tělesné rozměry: kohoutková výška pásková 178 cm, hůlková 166 cm, obvod hrudi 193 cm, obvod holeně 22,0 cm.



Protokol hřebce

Reference: 4
Date: 20. 1. 2016
Centre: IVF Laboratory

Code: 2049
Animal: Go-On T.S.

Collection date: 20. 1. 2016 8:15:11	Collection method: at laboratory
Volume (mL): 15,00	pH: 7,50
Temperature (°C): 37	Last collection: 3
Collection difficulties: No	Complete sample: Complete
Liquefaction: Complete	Aggregation: Normal
Viscosity: Normal	Agglutination: 1A
Appearance: Normal	Cellular elements: Normal
Treatment:	

Fresh (20. 1. 2016 15:06:20)

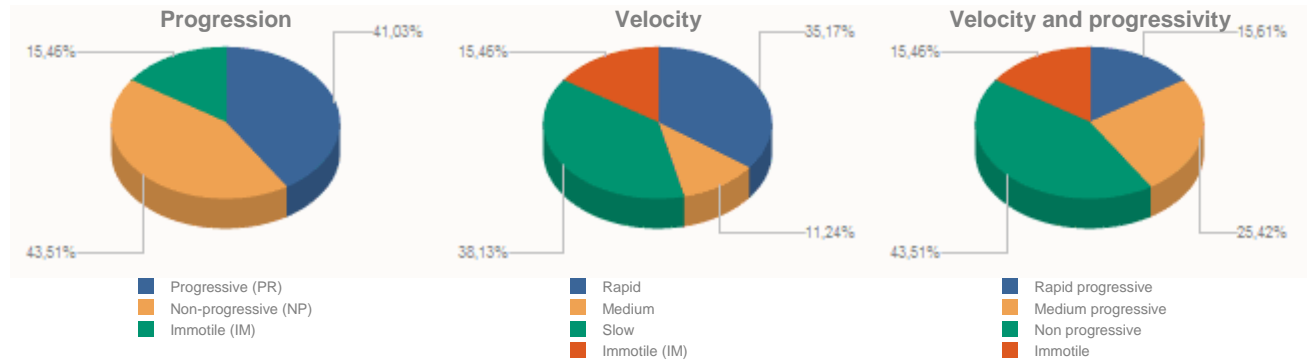
Concentration			
130,63 M/mL	1 959,38 M/Sample	Volume (mL): 15,00	

Progression	Total	%	Concentration	
			M/mL	M/Sample
Progressive (PR)	1343	41,03	53,60	803,99
Non-progressive (NP)	1 424	43,51	56,83	852,48
Immotile (IM)	506	15,46	20,19	302,92

	Total	%	Concentration	
			M/mL	M/Sample
Motile	2767	84,54	110,43	1 656,46

Velocity	Total	%	Concentration	
			M/mL	M/Sample
Rapid	1 151	35,17	45,94	689,05
Medium	368	11,24	14,69	220,30
Slow	1 248	38,13	49,81	747,11
Immotile (IM)	506	15,46	20,19	302,92

Velocity and progressivity	Total	%	Concentration	
			M/mL	M/Sample
Rapid progressive	511	15,61	20,39	305,91
Medium progressive	832	25,42	33,21	498,08
Non progressive	1 424	43,51	56,83	852,48
Immotile	506	15,46	20,19	302,92



	Average	Immotile (IM)	Slow	Medium	Rapid	Units
Head area	21,44	18,74	21,71	23,58	21,56	μm ²

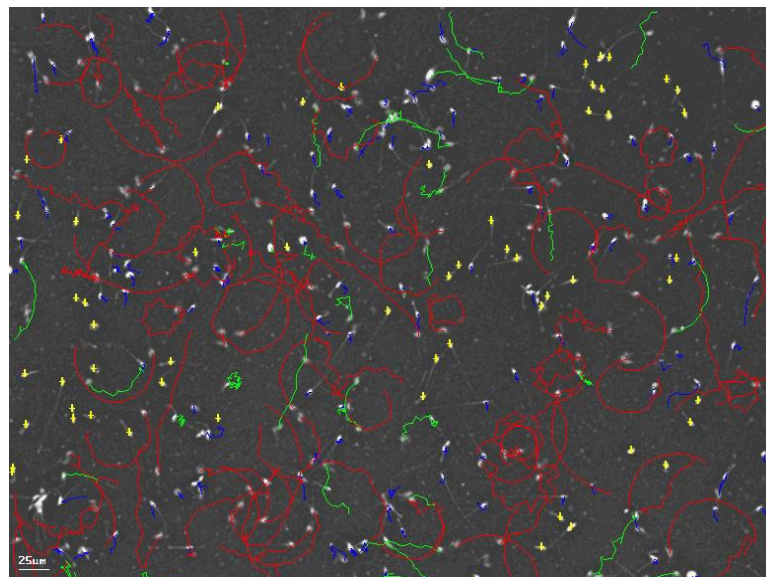
	Concentration	
Round cells	2,56	M/mL

	Total	%
Circular tracks	1 567	47,88 %

Avg. values of speed	Average	Slow	Medium	Rapid	Units
Curve speed - VCL	71,64	22,02	66,30	127,41	μm/s
Linear speed - VSL	37,64	8,05	38,19	69,90	μm/s
Avg. value - VAP	58,00	13,88	51,95	108,10	μm/s
Linearity index - LIN	52,54	36,57	57,60	54,86	%
Straightness index - STR	64,90	58,03	73,52	64,66	%
Oscillation index - WOB	80,96	63,02	78,35	84,84	%

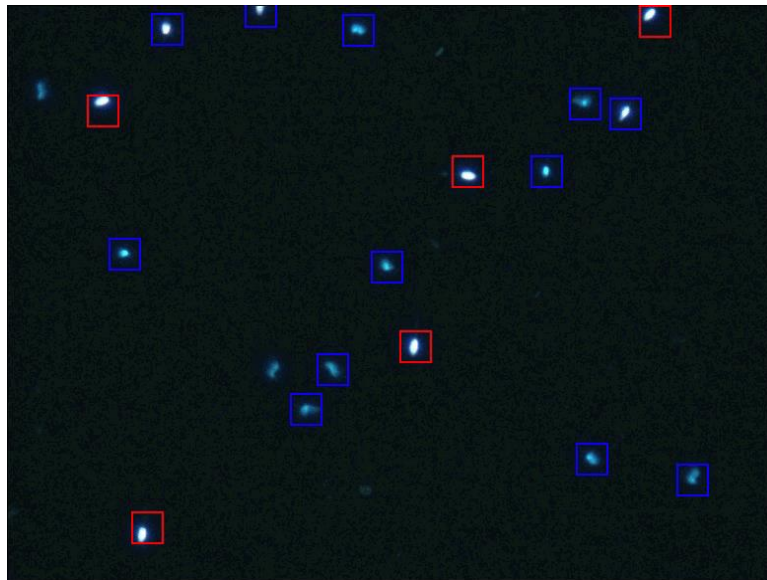
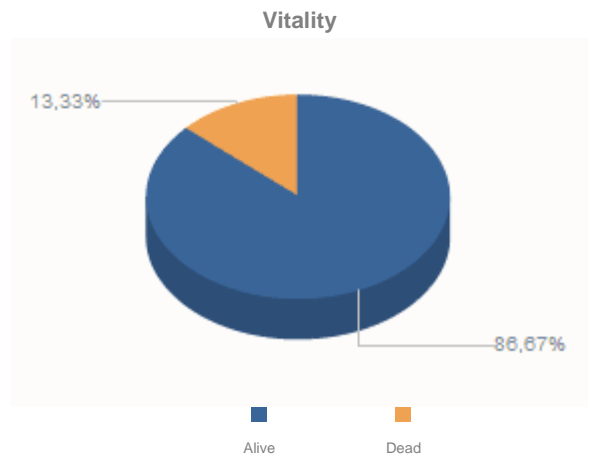
Avg. values of other parameters	Average	Medium	Rapid progressive	Units
Amplitude lateral head - ALH	2,70	2,06	2,94	μm
Beat frequency - BCF	6,97	6,13	7,22	Hz

	Total	%	M/mL	M/Sample
Hyperactive	200	6,11	7,98	119,73



(20. 1. 2016 15:16:55)

Vitality	Total	%
Alive	169	86,67
Dead	26	13,33



Comments:

Technician: Surname2, Name2