



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Autoreferát disertační práce

Ing. Bc. Alena Búdová

České Budějovice
2023

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Bc. Alena Búdová

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Speciální zootechnika

Název práce: Dynamika kvalitativních ukazatelů beranů

Školitel: doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

Oponenti: prof. Dr. Ing. Jan Kuchtík
Ing. Martin Ptáček, Ph.D.
doc. Ing. Mojmír Vacek, CSc.

Obhajoba disertační práce se koná dne 5. 12. 2024 od 10:00 v pavilonu ZB, 3. patro, zasedací místnost Katedry zootechnických věd na Fakultě zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

Abstrakt

Cílem této práce bylo vyhodnotit dynamiku kvalitativních ukazatelů spermatu beranů. Sperma se mění v průběhu roku, připouštěcího období, s věkem beranů nebo po dobu jeho skladování. V této práci byl hodnocen objem spermatu, koncentrace spermií, jejich motilita, kinematické parametry a morfometrické ukazatele. Sperma bylo odebíráno od 3 beranů plemene šumavská ovce a hodnoceno pomocí objektivní počítačové metody CASA. Berani byli odebíráni od září 2017 do února 2019. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že sperma beranů je po celý rok kvalitní, ale byly zjištěny rozdíly, kdy na podzim se zvětšuje objem spermatu ($p < 0,05$) a koncentrace spermií ($p < 0,01$), oproti tomu na jaře roste jeho celková motilita ($p < 0,001$) a její kinematické parametry (VCL, ALH $p < 0,001$; VAP $p < 0,01$). V průběhu připouštěcí sezóny beranů klesá progresivní motilita spermií, ale roste jejich koncentrace ($p < 0,01$). Čas odběru neměl na kvalitu spermatu prokazatelný vliv oproti věku beranů, kdy se kvalita 2 a 3letých beranů lišila. Ředidla významně ovlivňují kvalitu spermatu během doby skladování, přičemž byl prokázán vysoce významný vliv na parametry progresivní motility a VCL, VSL, VAP ($p < 0,001$). Sperma naředěné ředidlem AndroMed[®] mělo po celou dobu dobré výsledky a bylo by možné využít inseminační dávky i po 72 h. V ostatních ředidlech kvalita rychle klesala a jejich využití by bylo možné do 24 h, nejdéle do 36 hodin, kdy by byl výsledek již nejistý.

Klíčová slova: beran, CASA, sperma, hodnocení spermatu, motilita spermií, morfologie spermií, přežitelnost spermatu

Abstract

The aim of this work was to evaluate the dynamics of the qualitative indicators of ram semen. Semen changes over the course of the year, the breeding season, with the age of the rams or during its storage. In this work, sperm volume, sperm concentration, their motility, kinematic parameters and morphometric indicators were evaluated. Sperm was collected from 3 Šumava rams and evaluated using the CASA objective computer method. The rams were collected from September 2017 to February 2019. The results show that the sperm of the rams is of good quality throughout the year, but differences were found when the volume of sperm increases in autumn ($p < 0.05$) and the concentration of sperm ($p < 0.01$), on the other hand, its overall motility ($p < 0.001$) and its kinematic parameters (VCL, ALH $p < 0.001$; VAP $p < 0.01$) increase in spring. During the mating season of rams, the progressive motility of sperm decreases, but their concentration increases ($p < 0.01$). The collection time did not have a demonstrable effect on the sperm quality compared to the age of the rams, when the quality of 2- and 3-year-old rams differed. Diluents significantly affect the quality of sperm during the storage period, with a highly significant effect on the parameters of progressive motility and VCL, VSL, VAP ($p < 0.001$). Sperm diluted with AndroMed® diluent had good results all the time and it would be possible to use insemination doses even after 72 hours. In other diluents, the quality decreased rapidly and their use would be possible within 24 hours, at most within 36 hours, when the result would already be uncertain .

Keywords: ram, CASA, sperm, sperm evaluation, sperm motility, sperm morphology, sperm viability

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Cíl práce.....	7
3 Materiál a metodika.....	8
4 Výsledky a diskuze.....	12
4.1 Roční období.....	12
4.2 Kvalita spermatu v průběhu připouštěcí sezóny.....	18
4.3 Kvalita spermatu během dne.....	23
4.4 Věk berana.....	25
4.5 Ředidlo a přežitelnost spermií.....	29
5 Závěr.....	34
6 Seznam literatury.....	37
7 Seznam tabulek.....	42
8 Seznam grafů.....	42
9 Seznam použitých zkratk.....	43
10 Seznam publikovaných prací.....	44
11 Životopis.....	46

1 Úvod

Chov ovcí je pro lidskou společnost nepostradatelnou součástí zemědělské výroby. Ovce patří mezi nejstarší domestikovaná zvířata a jsou ceněné pro své maso, mléko a vlnu. Z ovcí se získávají i kůže, kožešiny a lanolin. Dále mají ovce také nepřímý užitek v produkci hnoje a udržování rázu krajiny. Používají se i pro lékařské a vědecké účely především pro pochopení endokrinologických a fyziologických mechanismů těla. Chov ovcí může být provozován snadno v ekologickém směru a běžně se tak děje. Bohužel skopové maso není na jídelníčku v našem státě často. Naopak bio sýry stále nacházejí více příznivců. Je to zřejmě dáno i touhou po kvalitě produktů a širokým sortimentem mléčných výrobků.

Umělá inseminace u hospodářských zvířat se nejvíce využívá u skotu, prasat nebo koní. U malých přežvýkavců se využívá minimálně z několika důvodů. Prvním důvodem je nevýrazná říje u samic, kterou chovatel musí vyhledávat pomocí prubíře nebo upravuje říji pomocí hormonálních preparátů. Dalšími důvody mohou být nižší ceny plemenných beranů, vyšší pracností pro chovatele, nerozvinutí sítě inseminačních stanic, které by mohly vznikat přidruženě s inseminačními stanicemi býků. Plodnost po umělé inseminaci čerstvým spermatem může být přes 60 %, při použití mrazeného spermatu je plodnost kolem 30 %. Záleží na použité metodě inseminace, technikovi a dalších faktorech.

Jsou ale i případy, kdy je umělá inseminace nevyhnutelná. Velký význam má umělá inseminace při obnově nebo zachování linií v rámci plemene. Plemenný beran je odebrán, sperma vyšetřeno a rozředěno, a inseminační dávky mohou být využity po celé střední Evropě. Pokud je k dispozici dlouhodobě zmrazené sperma, mohou být genové rezervy dlouhodobě uchovávány a používány. Další kladný význam umělé inseminace je v zamezení šíření pohlavně přenosných chorob. Najde své uplatnění i ve stádech, kde je cílem zvýšit frekvenci bahnění nebo pro chovatele není žádoucí držet berana.

Kvalita spermatu beranů je ovlivněna mnoha vlivy. Mezi vnitřní vlivy patří dědičnost, věk nebo stres. Z vnějších vlivů ovlivňuje kvalitu spermatu roční období, výživa a způsob chovu, příprava na připouštěcí sezónu, ale i prodělaná onemocnění nebo přítomnost střevních parazitů. Vnější vlivy je schopen chovatel ovlivnit a měl by berany kvalitně krmit, odčervovat a dopřát jim kvalitní pastvu, zejména před připouštěcím obdobím. Důležitá je i pravidelná kontrola paznehtů. Jedině tak chovatel dosáhne kvalitního dlouhověkého pleménika.

2 Cíl práce

Cílem řešení disertační práce je určit faktory, které ovlivňují kvalitu a přežitelnost spermatu malých přežvýkavců a získat ucelený přehled o kvalitě spermatu v rámci jednotlivých dílčích cílů práce. Ověří se, zda je fotoperiodismus opravdu důležitým faktorem ovlivňující plodnost. Dále jak dynamicky se v průběhu roku mění vyhodnocované ukazatele spermatu, tedy především koncentrace a motilita s jejími parametry pohybu. Denní doba odběru spermatu je často určována časem potřeby inseminace bahnice. Kvalita spermatu během dne by měla být konstantní a neměla by jí ovlivňovat zvýšená četnost odběru. Na kvalitu spermatu by mohl mít vliv věk berana. V řešení se disertační práce zaměří na otázku, jaký má vliv používané ředidlo na přežitelnost spermií. Kvalita spermatu beranů by se neměla zjišťovat pouze před připouštěcí sezónou, ale měla by být hodnocena i v jejím průběhu.

Byly stanoveny dílčí cíle práce:

- 1) Odebrané vzorky zhodnotit metodou CASA, porovnat je a zjistit, ve kterém ročním období je sperma nejkvalitnější.
- 2) Posoudit dynamiku změn motility a koncentrace spermatu v průběhu jedné připouštěcí sezóny.
- 3) Stanovit vliv četnosti odběru a denní doby odběru na koncentraci, motilitu i morfologii spermií.
- 4) Porovnat kvalitu spermatu 2 a 3letých beranů a vyhodnotit vliv věku berana na kvalitu spermatu ve všech jeho ukazatelích.
- 5) Určit, jak ovlivňuje použité ředidlo přežitelnost spermií a jak působí na vyhodnocované ukazatele kvality spermatu.

3 Materiál a metodika

Do pokusu byli zařazeni 3 zdraví berani plemene šumavská ovce narození v roce 2015. Berani byli ustájeni na Účelovém zařízení Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity Čtyři Dvory v Českých Budějovicích (48.9787925N, 14.4715064E). Ustájení byli v boxe o velikosti 20 m² s hlubokou podestýlkou a adlibitním přístupem k senu, vodě a minerálním doplňkům.

Berani byli odebíráni do umělé vaginy pro ovce a kozy od firmy Minitube většího typu (Romano a Christians, 2009). Bezprostředně po odběru byl v odběrové baňce stanoven objem ejakulátu a poté bylo sperma umístěno na zahřívací desku a udržováno při teplotě 37 °C. Po odebrání všech beranů (10 minut) bylo sperma přeneseno v polystyrenové krabici do laboratoře JU v Českých Budějovicích. Sperma je nejprve posouzeno makroskopicky. Před vlastní analýzou byly vzorky spermatu rozředěny předeřátým fyziologickým roztokem v poměru 1:100 a následně hodnoceny prostřednictvím objektivní počítačové metody CASA, jejím systémem Sperm Class Analyzer (SCA). Součástí tohoto systému je optický mikroskop s fázovým kontrastem a vyhřívaným stolcem (37 °C) s digitální kamerou, která je zabudovaná v mikroskopu pro zachycení obrazů a jejich přenosu do počítače. Z vyhodnocovaných parametrů byl sledován objem ejakulátu (ml), koncentrace spermií (10⁶/ml), motilita spermií s jednotlivými kinematickými parametry a morfometrické parametry spermií.

Sperma beranů bylo odebíráno od září 2017 do února 2019 a v průběhu tohoto období bylo sperma hodnoceno pro splnění jednotlivých cílů práce. Sezónní kvalita spermatu byla zjištěna v průběhu roku 2018. Bylo vyhodnoceno celkem 36 vzorků spermatu, kdy byly provedeny 3 odběry v každém ročním období.

Pro zjištění kvality spermatu v průběhu připouštěcí sezóny bylo použito 52 vzorků z připouštěcí sezóny 2017 (září až prosinec 2017). V průběhu této připouštěcí sezóny bylo pro vyhodnocení kvality spermatu během dne od beranů získáno celkem 48 vzorků spermatu ve čtyřech termínech odběru v listopadu 2017. Sperma bylo odebíráno 3x denně ve čtyřhodinových intervalech.

Berani byli v připouštěcí sezóně roku 2017 2 letí a v připouštěcí sezóně roku 2018 byli 3 letí. Bylo porovnáno celkem 60 vzorků spermatu v odběrech od září do listopadu v roce 2017 (30) a 2018 (30), aby bylo zjištěno, jestli je kvalita spermatu závislá na věku berana a mění se v období jeho života.

Přežitelnost spermatu beranů byla hodnocena v lednu a únoru 2019. Berani byli odebíráni po dobu 5 týdnů, kdy byl každý vzorek v laboratoři rozdělen na 4 alikvoty a každá rozředěna jedním ze 4 různých ředidel zahřátými na 37 °C v poměru 1:100. Prvním použitým ředidlem byl fyziologický roztok (David et al., 2015). Druhým bylo mléčné ředidlo, ve kterém bylo použito mléko o tučnosti 0,5 % (11 g UHT 0,5 % mléka, 100 ml destilované vody zahřáto na 95 °C po dobu 10 minut; Allai et al., 2017). Další ředidlo bylo na bázi mléka o 1,5 % tuku (11 g UHT 1,5 % mléka, 100 ml destilované vody zahřáto na 95 °C po dobu 10 minut; Allai et al., 2017). Posledním používaným ředidlem byl AndroMed®, komerční ředidlo od firmy Minitube (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Po ekvilibraci byly vzorky uchovávány v lednici o teplotě 5 °C. Celkem bylo připraveno 60 vzorků a byly pravidelně hodnoceny 0, 12, 24, 36, 48 a 72 hodin po odběru.

Makroskopické hodnocení

Barva, konzistence, pach a obsah cizích příměsí bylo zhodnoceno smyslovým posouzením.

Mikroskopické hodnocení

Stanovení objemu spermatu

Objem spermatu byl změřen pomocí kalibrované kádinky, s přesností na 0,1 ml, která se ohřeje na tělesnou teplotu 37 °C.

Stanovení koncentrace a motility spermií

Motilita spermií byla hodnocena pomocí modulu Sperm Class Analyzer® Motility and concentration, kde byla stanovena motilita spermií společně s koncentrací a jednotlivými kinematickými parametry. Vzorky byly zahřáty na teplotu 37 °C, z nichž byly odpipetovány 3 µl do předeřátého Leja sklíčka (4komorové, hloubka 20 mikronů). Použitý mikroskop byl s nastavením negativního fázového kontrastu (Ph-) s 10x objektivem (100x zvětšení) se zeleným filtrem. Vždy bylo hodnoceno alespoň 5 zorných polí, přičemž v každém poli bylo cca 200 spermií. Analyzátor z každého zorného pole pořídí 16 po sobě jdoucích fotografií s odstupem 0,64 s, rychlost snímání obrazu je jedné fotografie je 40 ms. Analyzátor rozliší podle křivočaré rychlosti pohybu (VCL) spermie na rychlé (>90 µm/s), středně rychlé (45–90 µm/s), pomalé (10–45 µm/s) a statické. Spermie byly považovány za progresivní při nejméně 75 % přímosti (STR). U vzorků spermatu byla měřena celková motilita (MOT, %), progresivní motilita (PMOT, %), průměrná rychlost (VAP, µm/s), křivočará rychlost (VCL, µm/s),

přímočará rychlost (VSL, $\mu\text{m/s}$). Dále koeficienty přímosti (STR, VSL/VAP, %), linearity (LIN, VSL/VCL, %) a kmitání (WOB, VAP/VCL, %). Nakonec byla hodnocena amplituda bočního posunu hlavičky (ALH, μm) a frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie (BCF, Hz).

Současně s hodnocením motility byla objektivně stanovena také koncentrace spermií v $10^6/\text{ml}$.

Stanovení morfometrických parametrů spermií

Morfometrické parametry spermií byly hodnoceny modulem Sperm Class Analyzer® Morphology. Pro hodnocení byl nastaven mikroskop na zvětšení 60x, s procházejícím světlem a modrým filtrem. K roztěru vzorku bylo použito 20 μl spermatu, které bylo po zaschnutí obarveno barvivem SpermBlue (Microptic SL). Obarvený vzorek byl zafixován Eukitt mounting media (Microptic SL) a překryt krycím sklíčkem. Pro mikroskopické hodnocení musel být použit imerzní olej a bylo hodnoceno 100 náhodně vybraných spermií z každého vzorku. Z morfometrických parametrů spermií byla sledována plocha hlavičky v μm^2 (head area), obvod hlavičky v μm (head perimeter), délka hlavičky v μm (head length), šířka hlavičky v μm (head width), zploštění hlavičky (head ellipticity), drsnost povrchu hlavičky (head rugosity), prodloužení hlavičky (head elongation) a pravidelnost hlavičky (head regularity). Dále byla sledována šířka středové části spermie (midpiece width, μm), plocha středové části (midpiece area, μm^2), úhel středové části (midpiece angle) a velikost akrozomu (acrosome).

Vyhodnocení sledovaných faktorů

Výsledky byly zpracovány pomocí programů MS Office, Statistica a RStudio (2021). Pro vyjádření základních statistických charakteristik byl použit výběrový průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota. Průkaznost byla vždy hodnocena * v případě p-hodnoty $<0,05$, ** pro p-hodnota $<0,01$ a *** $<0,001$ (pozorována tendence se lišit) a - v případě p-hodnoty $>0,05$. Grafy byly zpracovány pomocí programu Statistica a pomocí balíčku *corrplot* pro korelogramy (Wei a Simko, 2021) a balíčku *ggplot2* (Wickham, 2016) pro zbývající grafické výstupy.

Sperma v průběhu roku 2018 měnilo svou kvalitu, která byla statisticky vyhodnocena jednocestnou analýzou variace, přičemž jako náhodný faktor byl použit beran. Dále bylo provedeno mnohonásobné porovnání dat Tukey HSD testem.

Kvalita spermatu v průběhu připouštěcí sezóny byla testována pro normální rozdělení četnosti pomocí Kolmogorov-Smirnova testu. Rozdíly mezi zjištěnými hodnotami motility a koncentrace spermií byly hodnoceny pomocí ANOVY pro opakovaná měření. Pomocí korelační a regresní analýzy byla hodnocena závislost mezi koncentrací spermatu a délkou světelného dne. Dále také závislost mezi pohybovými charakteristikami spermií a délkou světelného dne.

Rozdíly mezi zjištěnými hodnotami denní doby a četností odběru spermatu byly hodnoceny pomocí ANOVY pro opakovaná měření a v případě rozdílu bylo následné porovnání provedeno pomocí Tukeyova HSD testu.

Pro porovnání kvality spermatu 2 a 3letých beranů byly rozdíly mezi zjištěnými hodnotami vyhodnoceny pomocí ANOVY s náhodným efektem.

Všechny párové kombinace parametrů motility a kinematických parametrů motility spermií byly vyhodnoceny pomocí Pearsonových korelačních koeficientů zvláště pro každé ředidlo. Dále byly jako proměnná použity vybrané parametry motility (MOT, PMOT) a kinematické parametry (VCL, VSL, VAP), které byly porovnány s dobou skladování, ředidlem a jejich vzájemnou interakcí. Tyto parametry byly zvoleny na základě jejich prediktivní schopnosti fertility po umělé inseminaci (Santolaria et al., 2015). Vztah pro VCL, VSL a VAP byl hodnocen pomocí Generalized Linear Mixed-Effect Models (GLMM) v balíčku *lme4* (Bates et al., 2015) s rozdělením chyb Gama, logaritmickou linkovou funkcí a významností testování pomocí chí-kvadrát testu. MOT a PMOT byly analyzovány také pomocí GLMM v balíčku *glmmTMB* (Brooks et al., 2017) umožňujícím použití beta rozdělení chyb s funkcí logit link proměnné odezvy, která je vhodná pro data omezená z obou konců (v našem případě procenta). Ve všech analýzách GLMM byla individualita berana použita jako náhodný faktor.

Závěrem práce budou výsledky stručně shrnuty a budou vypracována doporučení pro chovatelskou praxi.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Roční období

Kvalita spermatu berana, vzhledem k jejich sezónnosti, by se měla v průběhu roku měnit, přičemž nejkvalitnější sperma by mělo být v připouštěcí sezóně. Ze zjištěných výsledků odběrů v průběhu roku vyplývá, že největší objem spermatu je na podzim, průměrně 2,06 ml ($p < 0,01$). Na velmi vysoké hladině významnosti $p < 0,001$ byla zjištěna průkaznost u celkové motility, která byla nejvyšší na jaře 99,38 % a nejnižší na podzim 72,51 % a zároveň bylo v tomto období nejvíce imotilních spermií 27,49 %. Kinematické parametry byly nejprůkaznější u VCL, tedy křivočaré rychlosti, která byla nejvyšší na jaře 88,35 $\mu\text{m/s}$ a nejnižší na podzim 47,64 $\mu\text{m/s}$. Dále u koeficientů přímosti LIN a kmitání WOB, kde byly hodnoty nejvýraznější na podzim (52,53 a 60,95 %). Boční posun hlavičky ALH byl největší na jaře 3,94 μm a nejnižší na podzim 2,22 μm .

Z těchto výsledků lze usuzovat, že na podzim stoupá objem i koncentrace spermií ($p < 0,01$), naopak klesá jejich motilita. Dle Gundogan et al. (2010) by měla vyšší koncentrace spermií pozitivně ovlivňovat jejich motilitu, ale v práci Abadjieva et al. (2014) rostla v připouštěcí sezóně motilita spolu s koncentrací spermií ve spermatu. Kinematické parametry se na podzim zhoršují, ale jejich koeficienty jsou ve srovnání s ostatními ročními obdobími nejlepší. Na hladině významnosti $p < 0,01$ byla zjištěna průkaznost u průměrné rychlosti VAP, která byla nejvyšší na jaře 49,3 $\mu\text{m/s}$ a nejnižší na podzim 32,36 $\mu\text{m/s}$. Z toho se jeví, že jsou spermie na jaře nejrychlejší, ale je zde menší objem spermatu a jejich koncentrace je na jaře nižší než na podzim. Veškeré výsledky průměrných hodnot a jejich hladina významnosti za jednotlivá období jsou v tabulce 1 a jsou totožné s výsledky jiných autorů (Santolaria et al., 2015; Palacín et al. 2013). Roční období nemá prokazatelně vliv na progresivní motilitu, VSL a BCF.

Motilita i morfologie spermií je ovlivňována okolní teplotou působící na varlata, která se přibližuje v létě a v zimě k extrémům. Při výkyvech teplot se motilita spermií může zhoršit až o 20 % a spermie vykazují více defektů (Shahat et al., 2021). Karagiannidis et al. (2000) měli ve své práci nezávisle na plemeni beranů sperma nejkvalitnější na podzim. Ačkoli je podzim brán jako období pohlavní aktivity a sperma by mělo být nejkvalitnější, jeví se jako kvalitní i v průběhu celého roku. Dle Pool et al. (2020) nemají inseminační dávky vyrobené ze spermatu, které bylo odebírané mimo připouštěcí období, nižší kvalitu. Po celý rok jsou také zachovány veškeré sexuální

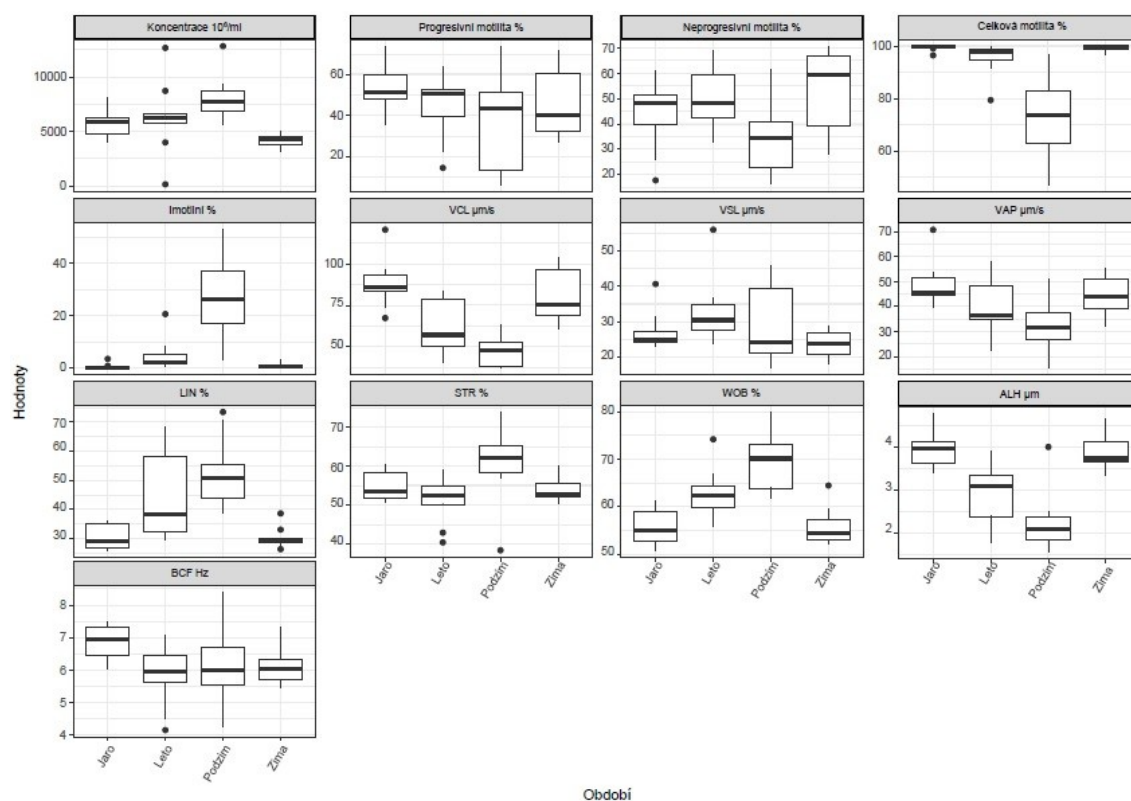
reflexy samců (Nikolov et al., 2005) a je možné ve stádech s intenzivním chovem ovcí provádět i inseminaci ovcí s dobrými výsledky (Abecia et al., 2016).

Tabulka 1 Motilita spermií během jednotlivých ročních období

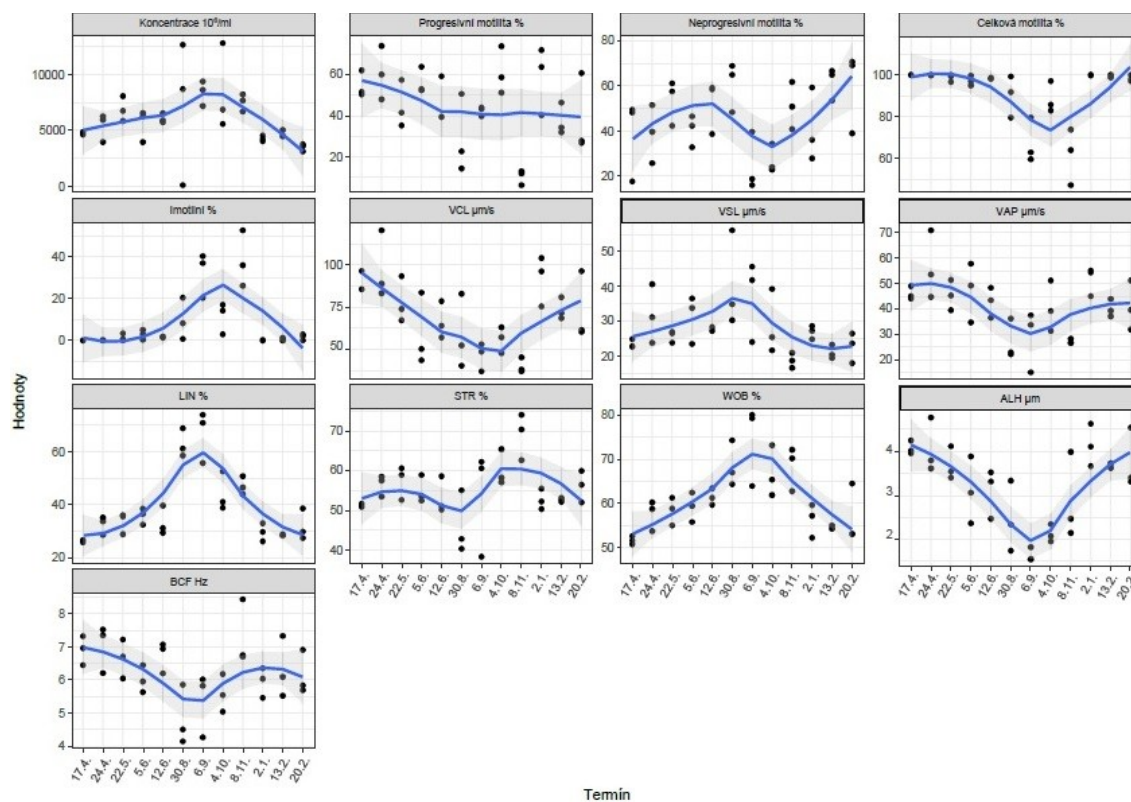
	Jaro	Léto	Podzim	Zima		
	Průměr ± SD	Průměr ± SD	Průměr ± SD	Průměr ± SD	p-hodnota	Průkaznost
Objem, ml	1,5 ± 0,47	1,61 ± 0,31	2,06 ± 0,28	1,5 ± 0,5	0,0289	*
Koncentrace, 10 ⁶ /ml	5699,8 ± 1198,17	6294,85 ± 3169,86	8142,29 ± 1970,66	4171,47 ± 551,72	0,0034	**
Celková motilita, %	99,38 ± 1,05	95,1 ± 6,01	72,51 ± 14,5	99,07 ± 1,05	1,85e-07	***
Progresivní motilita, %	53,43 ± 10,87	43,96 ± 15,57	38,08 ± 21,71	44,97 ± 15,78	0,346	-
Neprogresivní motilita, %	43,73 ± 13,37	51,14 ± 11,58	34,43 ± 14,47	54,1 ± 15	0,041	*
Imotilní spermie, %	0,62 ± 1,05	4,9 ± 6,01	27,49 ± 14,5	0,93 ± 1,05	1,85e-07	***
VCL, µm/s	88,35 ± 14,18	61,56 ± 15,72	47,64 ± 8,65	79,51 ± 15,08	3,68e-06	***
VSL, µm/s	27,16 ± 5,39	33,22 ± 8,99	28,36 ± 10,26	23,69 ± 3,45	0,1	-
VAP, µm/s	49,3 ± 8,54	39,15 ± 11,14	32,36 ± 9,39	44,25 ± 7,52	0,0081	**
LIN, %	30,86 ± 3,99	43,97 ± 13,73	52,53 ± 11,59	30,17 ± 3,45	7,24e-05	***
STR, %	55,02 ± 3,57	51,44 ± 5,98	60,95 ± 9,51	53,81 ± 2,77	0,0301	*
WOB, %	55,87 ± 3,72	63,03 ± 4,96	69,79 ± 6,44	55,93 ± 3,7	2,48e-06	***
ALH, µm	3,94 ± 0,39	2,9 ± 0,65	2,22 ± 0,69	3,86 ± 0,44	1,36e-06	***
BCF, Hz	6,85 ± 0,51	5,85 ± 0,93	6,07 ± 1,11	6,12 ± 0,59	0,113	-

V grafu 1 jsou znázorněny výsledky za jednotlivá roční období, kdy boxplot představuje rozložení hodnot a linie uprostřed naznačuje medián. Toto rozložení odpovídá výsledkům v tabulce 1. Graf 2 představuje rozložení hodnot v průběhu celého roku a je zde názorně vidět, jak jednotlivé hodnoty průběžně klesají a stoupají. Hodnotami je proložená čára, která kopíruje průměr hodnot. Na uvedených grafech je praktické znázornění dynamiky změn koncentrace, motility a kinematických parametrů v závislosti na ročních obdobích a v průběhu celého roku.

Graf 1 Motilita a kinematické parametry v jednotlivých ročních obdobích



Graf 2 Dynamika motility a kinematických parametrů v průběhu roku



Při hodnocení morfometrických parametrů nebyla zjištěná žádná vysoce průkazná hladina významnosti, viz tabulka 2. Na hladině významnosti $p < 0,01$ byla šířka i plocha hlavičky, jejichž hodnoty byly největší na jaře ($5,1 \mu\text{m}$, $37,28 \mu\text{m}^2$), naopak nejnižší na podzim ($4,24 \mu\text{m}$ a $34,46 \mu\text{m}^2$). Dále plocha střední části a úhel středové části, které byly největší na podzim ($36,65 \mu\text{m}^2$, $0,95$) a nejmenší v zimě ($9,05 \mu\text{m}^2$, $0,61$). Statisticky průkazná byla i velikost obvodu hlavičky (největší na jaře $24,08 \mu\text{m}$) a její prodloužení ($0,28$ v létě, na podzim i v zimě). Ostatní sledované parametry nebyly statisticky průkazné, ale nejdelší hlavička byla na jaře $8,91 \mu\text{m}$. Na podzim měla hlavička největší zploštění ($1,79$) a největší akrozom ($56,69$). Drsnost povrchu hlavičky byla nejvyšší v létě ($0,87$), v létě i v zimě byla větší pravidelnost hlavičky ($0,96$), také v letním období byla největší plocha středové části bičíku $0,62 \mu\text{m}^2$.

Morfologie spermií není příliš ovlivňována ročním obdobím. Dle Abadjieva et al. (2014) nebyl vliv připouštěcí sezóny na morfologii spermií zaznamenán, ale byla zaznamenána pozitivní korelace mezi procentem normálních spermií a jejich oplození schopností. Tvar hlavičky spermií je důležitý pro její fertilizační schopnost a je po celý rok konstantní. Maroto-Morales et al. (2015) vyhodnotili výrazné rozdíly ve fertilizační schopnosti jednotlivých beranů, přestože průměrné hodnoty velikosti hlaviček byly podobné, nakonec berani s kratší a zploštělou hlavičkou měli nejlepší ukazatele plodnosti. Dle Ahmad et al. (2018) roční období spíše výrazně ovlivňuje množství testosteronu, který je v nejvyšší koncentraci v létě a stoupá až do podzimu, kdy jeho množství v krvi začne opět klesat. S klesající hladinou testosteronu stoupá membránová integrita a zvyšuje se akrozomová reakce. Beracochea et al. (2020) dodávají, že právě testosteron hraje důležitou roli v sexuálním libidu, a jeho sekreci lze zvýšit například aplikací eCG (koňského sérového gonadotropinu), ale na kvalitě spermatu v průběhu roku se podílí minimálně.

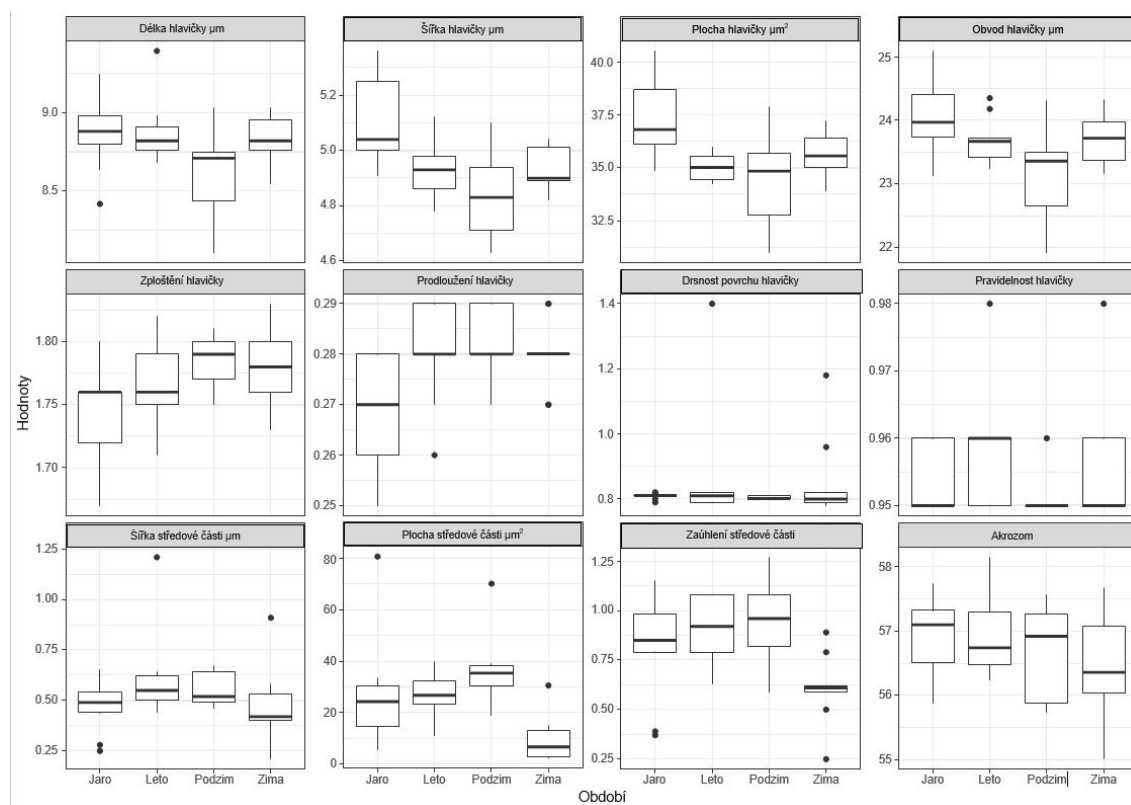
Na kvalitu spermií působí jako jeden z největších faktorů především zdravotní stav, kdy silné infekty ovlivňují celý organismus. Infekce a parazitární onemocnění beranů je výrazným problémem, protože zde klesá objem spermatu, jeho motilita a stoupá množství morfologických abnormalit. První známky se na spermiích projevují již dva měsíce po zavlečení nákazy, kdy dochází k abnormalitám na všech částí spermie. Problematické jsou například infekce parazity *Trypanosoma evansi* a dalšími zástupci rodu *Trypanosoma* (Ogundele et al., 2016).

Tabulka 2 Morfometrické parametry spermií v jednotlivých ročních obdobích

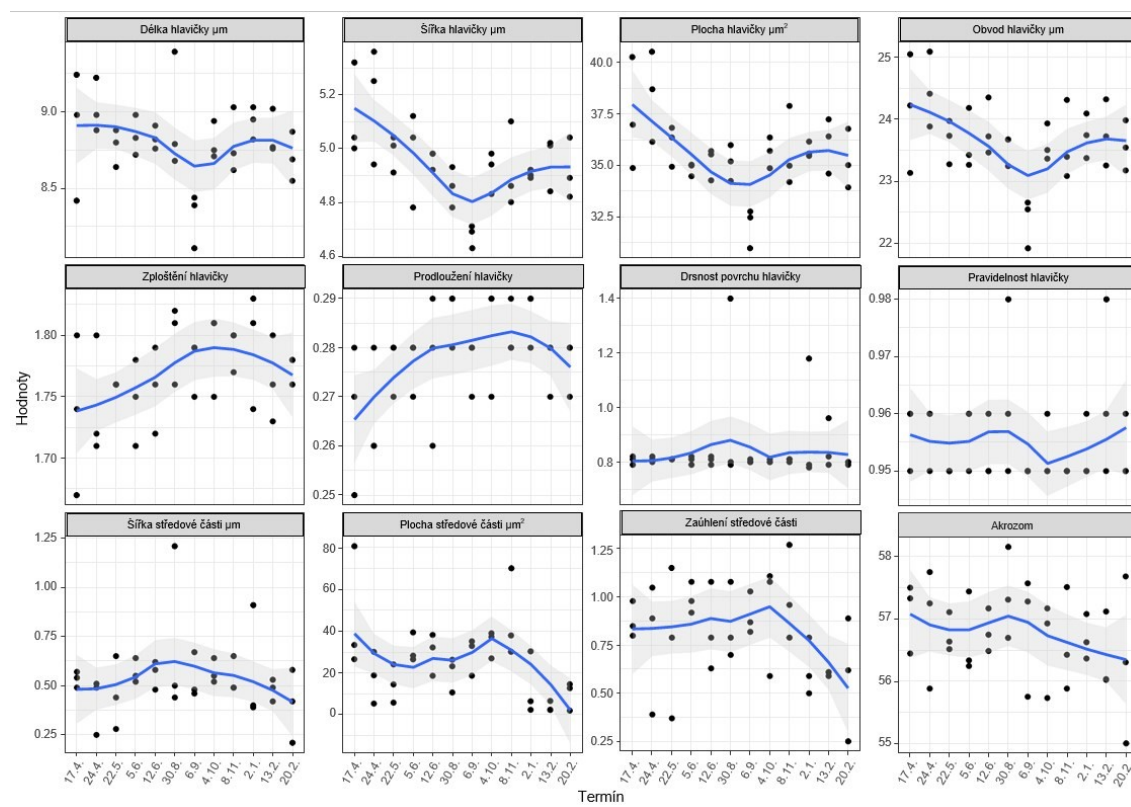
	Jaro	Léto	Podzim	Zima	p-hodnota	Průkaznost
	Průměr ± SD	Průměr ± SD	Průměr ± SD	Průměr ± SD		
Délka hlavičky, μm	8,89 ± 0,24	8,88 ± 0,2	8,64 ± 0,27	0,83 ± 0,15	0,106	-
Šířka hlavičky, μm	5,1 ± 0,16	4,93 ± 0,11	4,84 ± 0,14	4,93 ± 0,08	0,00292	**
Plocha hlavičky, μm^2	37,28 ± 1,98	35,03 ± 0,59	34,46 ± 2	35,67 ± 1	0,00688	**
Obvod hlavičky, μm	24,08 ± 0,65	23,66 ± 0,36	23,19 ± 0,69	23,69 ± 0,37	0,0265	*
Zploštění hlavičky	1,75 ± 0,04	1,77 ± 0,04	1,79 ± 0,02	1,78 ± 0,03	0,0584	-
Prodloužení hlavičky	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,0177	*
Drsnost povrchu hlavičky	0,81 ± 0,01	0,87 ± 0,19	0,8 ± 0,01	0,86 ± 0,13	0,562	-
Pravidelnost hlavičky	0,95 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,00	0,96 ± 0,01	0,182	-
Šířka středové části, μm	0,47 ± 0,12	0,62 ± 0,22	0,55 ± 0,08	0,48 ± 0,18	0,24	-
Plocha středové části, μm^2	26,78 ± 21,27	27,26 ± 8,57	36,65 ± 13,31	9,05 ± 8,79	0,00351	**
Zaúhlení středové části	0,81 ± 0,25	0,89 ± 0,16	0,95 ± 0,19	0,61 ± 0,17	0,00786	**
Akrozom	56,93 ± 0,56	56,95 ± 0,58	56,69 ± 0,71	56,47 ± 0,73	0,408	-

V grafu 3 je přehledně boxploty znázorněno rozložení hodnot v jednotlivých ročních obdobích a následně je v grafu 4 dynamika změn tvaru spermií v průběhu celého roku.

Graf 3 Grafické znázornění rozložení hodnot morfologie spermií v jednotlivých ročních obdobích



Graf 4 Rozložení hodnot morfologie spermií v průběhu roku



4.2 Kvalita spermatu v průběhu připouštěcí sezóny

Kvalita spermatu by se v průběhu připouštěcí sezóny měnit neměla a všechny dosažené hodnoty základních parametrů spermatu splňují požadavky dle Loudy et al. (2001) a jsou i v souladu s výsledky autorů Abadjieva et al. (2014), Valeanu et al. (2015), Palacín et al. (2013) nebo Ibanescu et al. (2016). Průměrné hodnoty, jejich směrodatná odchylka, minimum a maximum hodnocených charakteristik jsou uvedené v tabulce 3.

U získaných vzorků spermatu byly zjištěny následující průměrné hodnoty – objem ejakulátu 1,91 ml, koncentrace spermií $3589,12 \times 10^6/\text{ml}$, celková motilita spermií 96,94 %, progresivní motilita spermií 47,97 %, neprogresivní motilita spermií 48,97 % a 3,06 imotilních spermií. Je zde patrné, že bylo v průběhu celé připouštěcí vysoké procento motilních spermií. Motilita spermií byla charakterizována jednotlivými kinematickými parametry, jejichž průměrné hodnoty byly následující: křivočará rychlost (VCL) $80,26 \mu\text{m/s}$, přímočará rychlost (VSL) $25,80 \mu\text{m/s}$, průměrná rychlost (VAP) $46,42 \mu\text{m/s}$, linearita (LIN) 33,06 %, přímost (STR) 55,84 %, míra kmitání (WOB) 57,69 %, amplituda bočního posunu hlavičky (ALH) $3,98 \mu\text{m}$, frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (BCF) 5,79 Hz.

Tabulka 3 Popisné statistiky motility a jejích kinematických parametrů

	Průměr $\pm$ SD	Rozpětí (Min – Max)
Objem, ml	$1,91 \pm 0,33$	1,00 – 2,5
Koncentrace, $10^6/\text{ml}$	$3\,589,12 \pm 820,95$	1 931,9 – 4954,54
Celková motilita, %	$96,94 \pm 5,23$	79,97 – 100
Progresivní motilita, %	$47,97 \pm 24,11$	6,90 – 90,57
Neprogresivní motilita, %	$48,97 \pm 21,22$	9,06 – 80,26
Imotilní spermie, %	$3,06 \pm 5,28$	0,00 – 20,03
VCL, $\mu\text{m/s}$	$80,26 \pm 23,65$	36,57 – 121,68
VSL, $\mu\text{m/s}$	$25,80 \pm 6,16$	11,29 – 37,16
VAP, $\mu\text{m/s}$	$46,42 \pm 11,46$	20,92 – 66,76
LIN, %	$33,06 \pm 5,53$	25,03 – 51,65
STR, %	$55,84 \pm 4,24$	49,52 – 70,17
WOB, %	$57,69 \pm 8,97$	6,82 – 73,61
ALH, μm	$3,98 \pm 0,75$	2,45 – 5,49
BCF, Hz	$5,79 \pm 0,73$	3,82 – 7,11

Zjištěné hodnoty byly testovány v jejich závislosti na délce světelného dne. Se zkracováním světelného dne nastává u bahnic říje, přichází připouštěcí období a berani by měli mít sperma nejkvalitnější. Sarlós et al. (2013) tvrdí, že u plemene racka s délkou světelného dne pozitivně koreluje obvod šourku. V této práci byla zjištěna pozitivní korelace délky světelného dne s progresivní motilitou (PMOT 0,46), neprogresivní motilitou (NPMOT 0,46), VCL (0,39), VSL (0,33), VAP (0,34) a ALH (0,63). Negativní korelace byla zjištěna mezi délkou světla a koncentrací spermií v ejakulátu (-0,61) a BCF (-0,34). Zjištěné hodnoty jsou uvedené v tabulce 4 a na hladině významnosti $p < 0,05$.

Tabulka 4 Korelační koeficienty mezi délkou světelného dne a hodnotami motility spermií

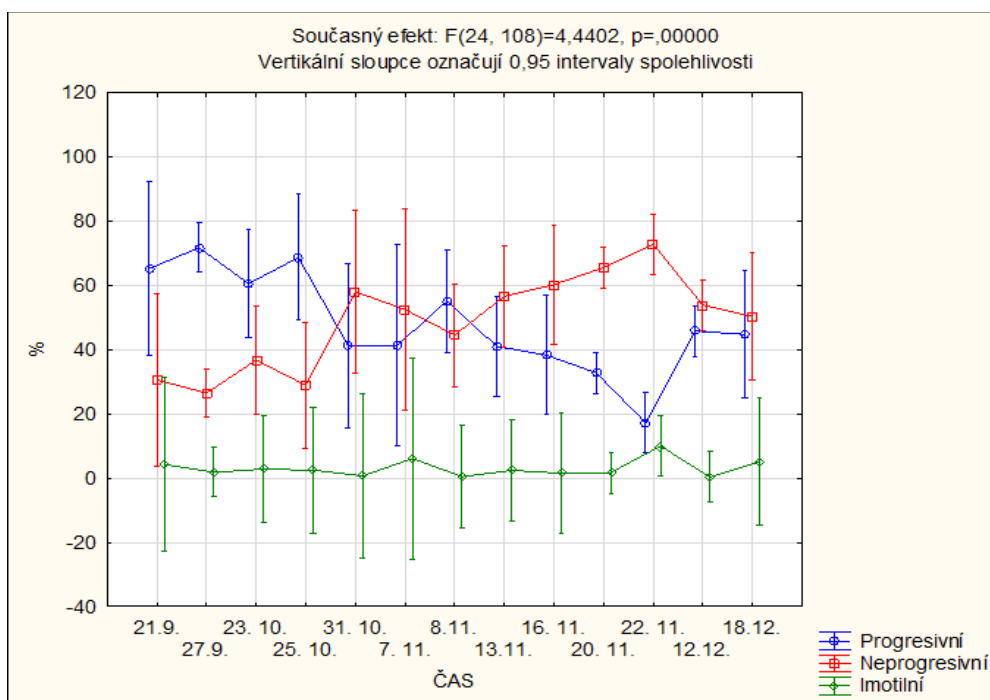
	Koncen.	PMOT	NPMOT	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
Délka dne	-0,61	0,46	0,46	0,39	0,33	0,34	0,63	-0,34

Dále byly porovnány parametry motility v závislosti s délkou světelného dne, které byly v grafu 5 testovány. Koncem října klesá délka denního světla pod 10 h, s čímž klesají i průměrné hodnoty progresivní motility. Zároveň s tím stoupají hodnoty neprogresivní motility. Hodnoty imotilních spermií jsou na stále stejné úrovni, takže celková motilita spermií se po celou dobu sledování nemění, vzniká rozdíl pouze mezi progresivní a neprogresivní motilitou. Tento jev byl statisticky vysoce průkazný ($p < 0,01$). Kafi et al. (2004) vyhodnotili nejlepší hodnoty motility u karakulské ovce v podzimním období. Dle Abadjieva et al. (2014) byla motilita spermií v připouštěcí sezóně výrazně vyšší než jeden měsíc před připouštěcí sezónou. V samotné připouštěcí sezóně se výrazně zlepšily jednotlivé kinematické parametry motility spermií. Sarlós et al. (2013) vyhodnotili nejvyšší hodnoty motility v létě, tedy v období nejdelších světelných dnů. Dále se vlivu ročního období na motilitu zabývali Mandiki et al. (1998), kteří mezi tím neshledali závislost. Benmoula et al. (2017) nezaznamenali u syntetického plemene INRA180 rozdíl v celkové motilitě, ale progresivní motilita byla vyšší v létě a v zimě. Toto vyšlechtěné plemeno produkuje sperma s vysokou kvalitou po celý rok.

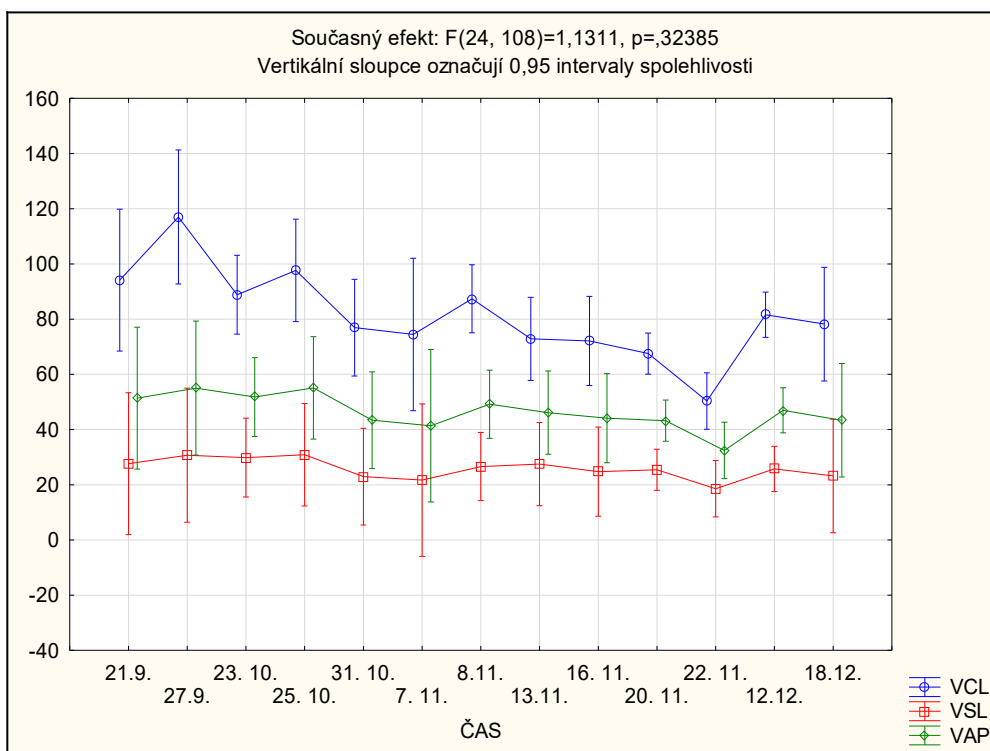
Jednotlivé kinematické parametry VCL, VSL a VAP se v průběhu připouštěcí sezóny nemění, pouze VCL klesá, ale změna není statisticky průkazná, viz graf 6.

Přestože progresivní motilita v průběhu připouštěcí sezóny klesá, pohyb spermií je stále stejný.

Graf 6 Průměrné hodnoty motility spermií v závislosti na délce světelného dne

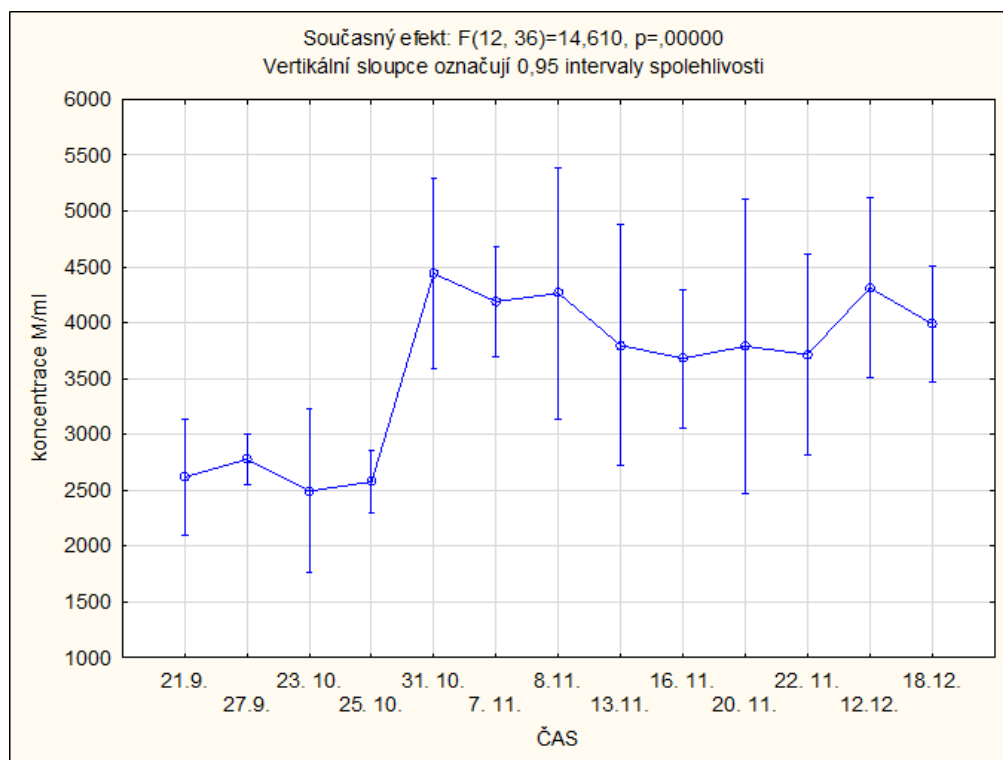


Graf 5 Kinematické parametry motility v připouštěcím období v závislosti na délce světelného dne



Délka světla má vliv i na koncentraci spermií ve spermatu, ačkoli se objem spermatu moc nemění. Ke zvýšení koncentrace dochází od konce října, kdy klesne doba světla za den pod 10 h. V grafu 7 je tedy vidět podobný jev, jako v grafu 5 s velmi vysoce průkazným statistickým rozdílem na hladině významnosti $p < 0,01$. Ve studii Abadjieva et al. (2014) byla koncentrace spermií měsíc před připouštěcí výrazně nižší než v připouštěcí sezóně a zároveň porovnávala kvalitu spermatu při využití metody dvou ejakulací po sobě, kdy byla sledována vyšší koncentrace spermií ve spermatu u druhého než u prvního odběru. Koncentraci spermií Kafí et al. (2004) zaznamenali nejvyšší v zimě, kdy byla $4\,778 \times 10^6/\text{ml}$ a v tomto období je podíl světla nejmenší. Na podzim byla koncentrace spermií $4\,570 \times 10^6/\text{ml}$. Sarlós et al. (2013) vyhodnotili největší objem ejakulátu na podzim současně s nejvyšší koncentrací spermií v létě, nejvyšší celkový počet spermií byl na podzim ($5\,220 \times 10^6/\text{ml}$). V porovnání s uvedenou literaturou se zjištěné hodnoty příliš neliší a je u nich také zaznamenána nejvyšší koncentrace na podzim a s koncem připouštěcí sezóny, kdy je délka světla kratší.

Graf 7 Koncentrace spermií ve spermatu v závislosti na délce světelného dne



Vzhledem k tomu, že spermie z morfologického hlediska téměř nereagují na změnu ročního období, není předpokládáno, že by reagovaly v rámci připouštěcí sezóny a zaznamenaly zkracování se světelného dne. V tabulce 5 jsou uvedené průměrné hodnoty morfometrických parametrů spermií za sledovanou připouštěcí sezónu.

Tabulka 5 Průměrné morfometrické parametry spermií v připouštěcí sezóně

	Průměr ± SD
Délka hlavičky, μm	$8,79 \pm 0,64$
Šířka hlavičky, μm	$4,92 \pm 0,37$
Plocha hlavičky, μm^2	$37,26 \pm 4,84$
Obvod hlavičky, μm	$22,61 \pm 2,6$
Zploštění hlavičky	$1,78 \pm 0,04$
Prodloužení hlavičky	$0,29 \pm 0,04$
Drsnost povrchu hlavičky	$0,95 \pm 0,24$
Pravidelnost hlavičky	$0,92 \pm 0,06$
Šířka středové části, μm	$0,7 \pm 0,21$
Plocha středové části, μm^2	$21,47 \pm 16,1$
Zaúhlení středové části	$1,31 \pm 0,53$
Akrozom	$56,49 \pm 0,53$

4.3 Kvalita spermatu během dne

Všechny parametry získaného ejakulátu měly fyziologické hodnoty kvalitního spermatu vhodné pro použití berana v plemenitbě, viz Louda et al. (2001). Motilita spermatu v této práci byla >93 %, objem spermatu byl >1,6 ml a koncentrace spermií byla >3 600x10⁶/ml. Vzhledem k využívání beranů k připouštění v průběhu celého dne a někdy vícekrát za den, byli odebíráni pravidelně 3x za den v 8, 12 a 16 hodin.

Z tabulky 6 je zřejmé, že v 8 h byly nejlepší hodnoty u motility spermií (96,08 %), objemu spermatu (1,81 ml). Koncentrace spermií v ejakulátu byla největší ve 12 h (3 796,96x10⁶/ml). V 16 h pak byly nejlepší hodnoty progresivní motility (32,57 %). Většina z kinematických parametrů motility spermatu měla nejlepší hodnoty v 8 h – VCL (65,72 μm/s), VSL (24,05 μm/s), VAP (41,48 μm/s), WOB (63,8 %), ALH (3,33 μm). V 16 h byly největší hodnoty LIN (37,5 %), STR (58,65 %), BCF (6,11 Hz). U žádné z těchto charakteristik spermatu nebyla zjištěna statisticky průkazná závislost s vícečetným odběrem během dne. Motilita v této práci byla vyšší než v práci Peker Akalin et al. (2016). Hodnoty motility spermií jsou v souladu dle Da Silva Maia et al. (2009), Allai et al. (2017) a Kasimanickam et al. (2011).

Tabulka 6 Průměrné hodnoty motility a kinematických parametrů spermií a jejich závislost na denní dobu odběru

Proměnná	8 hodin	12 hodin	16 hodin	p-hodnota	průkaznost
Objem, ml	1,81 ± 0,09	1,70 ± 0,08	1,64 ± 0,08	0,217	-
Koncentrace, 10 ⁶ /ml	3746,66 ± 142,92	3796,96 ± 180,88	3697,32 ± 184,29	0,825	-
Motilita, %	96,08 ± 1,43	95,16 ± 1,91	93,66 ± 2,35	0,525	-
Progresivní motilita, %	32,31 ± 4,15	31,75 ± 4,48	32,57 ± 4,73	0,988	-
VCL, μm/s	65,72 ± 4,44	64,29 ± 4,87	65,11 ± 5,35	0,968	-
VSL, μm/s	24,05 ± 1,33	23,76 ± 1,94	23,4 ± 1,19	0,955	-
VAP, μm/s	41,48 ± 2,38	40,52 ± 3,07	40,61 ± 2,71	0,954	-
LIN, %	37,27 ± 1,33	37,15 ± 1,25	37,5 ± 1,45	0,978	-
STR, %	58,19 ± 1,10	58,55 ± 1,10	58,65 ± 1,23	0,893	-
WOB, %	63,80 ± 1,06	63,20 ± 1,01	63,59 ± 1,19	0,897	-
ALH, μm	3,33 ± 0,11	3,32 ± 0,1	3,27 ± 0,16	0,874	-
BCF, Hz	5,88 ± 0,14	5,98 ± 0,16	6,11 ± 0,11	0,341	-

V případě morfologie spermií je statisticky průkazná závislost s dobou odběru a plochou středové části, která byla největší v 16 h ($14,84 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Ostatní hodnoty morfologických parametrů spermií byly statisticky neprůkazné. V 8 h byly největší hodnoty u obvodu hlavičky ($23,9 \mu\text{m}$), zploštění hlavičky (1,8), zaúhlení středové části (1,03) a velikost akrozomu (56,76). Ve 12 h byla největší délka hlavičky ($9,00 \mu\text{m}$), šířka hlavičky ($4,99 \mu\text{m}$), plocha hlavičky ($36,73 \mu\text{m}^2$), drsnost povrchu hlavičky (0,88), šířka středové části (0,68). V 16 h byla největší hodnota prodloužení hlavičky (0,29). Stále stejná hodnota byla v případě pravidelnosti hlavičky (0,95). Hodnoty morfologie spermií jsou shodné s Maroto-Morales et al. (2010) nebo Bravo et al. (2014).

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že na většinu ukazatelů kvality spermatu nemá doba odběru vliv. Statisticky průkazný rozdíl byl pouze u plochy středové části spermie, viz tabulka 7.

Tabulka 7 Průměrné hodnoty morfologie spermií a jejich závislost na denní dobu odběru

Proměnná	8 hodin	12 hodin	16 hodin	p-hodnota	průkaznost
Délka hlavičky, μm	$8,96 \pm 0,04$	$9,00 \pm 0,09$	$8,94 \pm 0,06$	0,691	-
Šířka hlavičky, μm	$4,98 \pm 0,02$	$4,99 \pm 0,03$	$4,96 \pm 0,03$	0,669	-
Plocha hlavičky, μm^2	$36,71 \pm 0,28$	$36,73 \pm 0,44$	$36,39 \pm 0,39$	0,682	-
Obvod hlavičky, μm	$23,9 \pm 0,1$	$23,89 \pm 0,15$	$23,83 \pm 0,14$	0,823	-
Zploštění hlavičky	$1,8 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,01$	0,379	-
Prodloužení hlavičky	$0,28 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,00$	0,271	-
Drsnost povrchu hlavičky	$0,83 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,03$	0,583	-
Pravidelnost hlavičky	$0,95 \pm 0,00$	$0,95 \pm 0,00$	$0,95 \pm 0,00$	0,435	-
Šířka středové části, μm	$0,62 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,04$	0,6	-
Plocha středové části, μm^2	$8,41 \pm 1,64$	$5,67 \pm 1,05$	$14,84 \pm 3,88$	0,018	*
Zaúhlení středové části	$1,03 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,05$	0,359	-
Akrozom	$56,76 \pm 0,12$	$56,61 \pm 0,12$	$56,33 \pm 0,14$	0,079	-

4.4 Věk berana

Průměrné hodnoty objemu, koncentrace, motility a jejích kinematických parametrů a morfologie spermií jsou zobrazené v tabulce 8. Objem spermatu v porovnání 2 a 3letých beranů byl vyšší u 2letých, $1,97 \pm 0,26$ vs. $1,9 \pm 0,3$. Koncentrace 2letých beranů byla $3\,405,38 \times 10^6/\text{ml} \pm 846,72$ oproti 3letým $11\,477,91 \times 10^6/\text{ml} \pm 6\,208,91$. Tato hodnota je statisticky velmi vysoce průkazná ($p < 0,001$).

V této práci byla celková motilita 2letých beranů $96,8 \% \pm 4,42$, u 3letých beranů $81,5 \% \pm 17,39$. Je zde statisticky velmi vysoká průkaznost, že mladší berani mají celkovou motilitu spermií lepší ($p < 0,001$). I progresivní motilita byla nepatrně vyšší u 2letých beranů, $46,18 \% \pm 22,92$ vs $41,62 \% \pm 26,12$ u 3letých, ale ta nebyla statisticky potvrzena ($p\,0,484$). Neprogresivní motilita 2letých byla $50,62 \% \pm 20,89$, u 3letých $39,88 \% \pm 17,11$ ($p < 0,05$).

Kinematické parametry motility spermií jsou u 2letých beranů vyšší u hodnot křivočará rychlost (VCL, $p < 0,05$), průměrná rychlost (VAP, statisticky neprůkazné), amplituda bočního posunu hlavičky (ALH, $p < 0,001$). U 3letých beranů jsou vyšší hodnoty v případě přímočaré rychlosti (VSL, statisticky neprůkazné), linearity (LIN, $p < 0,001$), přímosti (STR, $p < 0,001$), kmitání (WOB, $p < 0,001$) a frekvence oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (BCF, $p < 0,01$).

Hodnoty morfologicky normálních a abnormálních spermií jsou statisticky neprůkazné. Největší hodnoty morfologie spermií u 2letých beranů byla u těchto parametrů – délka hlavičky (statisticky neprůkazné), šířka hlavičky (statisticky neprůkazné), plocha hlavičky ($p < 0,01$), drsnost povrchu hlavičky ($p < 0,05$), šířka středové části ($p < 0,01$), úhel středové části ($p < 0,01$). U 3letých beranů byly nejlepší parametry u obvodu hlavičky ($p < 0,05$), pravidelnosti hlavičky ($p < 0,01$), plochy středové části ($p < 0,001$) a velikosti akrozomu ($p < 0,01$). Stejně hodnoty byly u 2 a 3letých beranů u parametrů zploštění a prodloužení hlavičky.

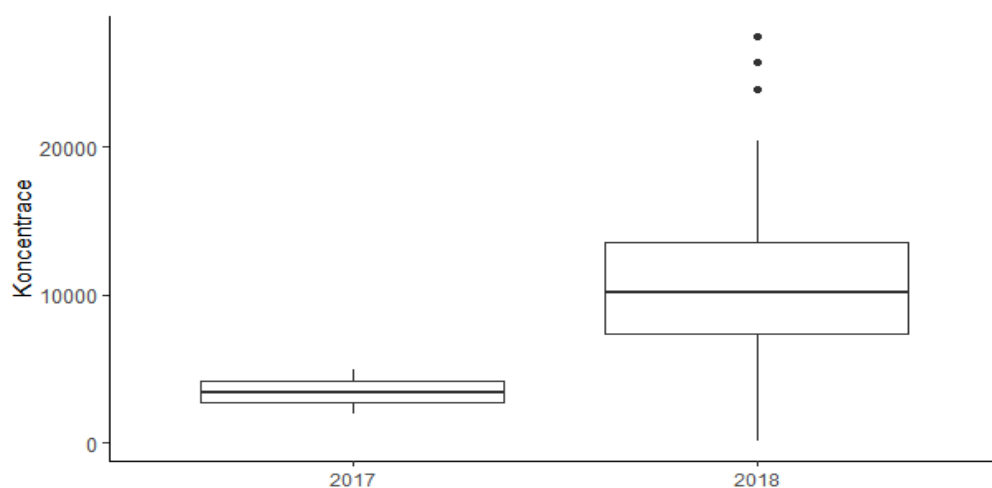
Dle Loudy et al. (2001) by mělo být ve spermatu minimálně 70 % aktivních spermií. Tyto předpoklady splňují i práce, ve kterých jsou hodnoceni berani ve věku 3-4 roky Shi et al. (2020), Flores-Gil et al. (2021) i 2-3 letí berani v práci Pool et al. (2020). Ve všech těchto pracích je motilita spermatu $\geq 80 \%$. Dle Martí et al. (2011) je morfologie spermií významným indikátorem plodnosti. V jejich studii měli starší berani vyšší koncentraci spermií v ml (roční berani $2\,477,50 \times 10^6/\text{ml} \pm 12,58$ a 4 $434,58 \times 10^6/\text{ml} \pm 724,1$ starší berani), ale morfometrické parametry hlaviček spermií byly menší. Motilitu spermií měli významně vyšší starší berani $72,08 \% \pm 4,59$ vs mladší

berani $62,08 \% \pm 2,09$. V grafech 8, 9 a 10 je znázorněno statistické porovnání koncentrace, motility a morfologie spermií, kdy je přehledně zobrazené rozložení hodnoty jednotlivými boxploty.

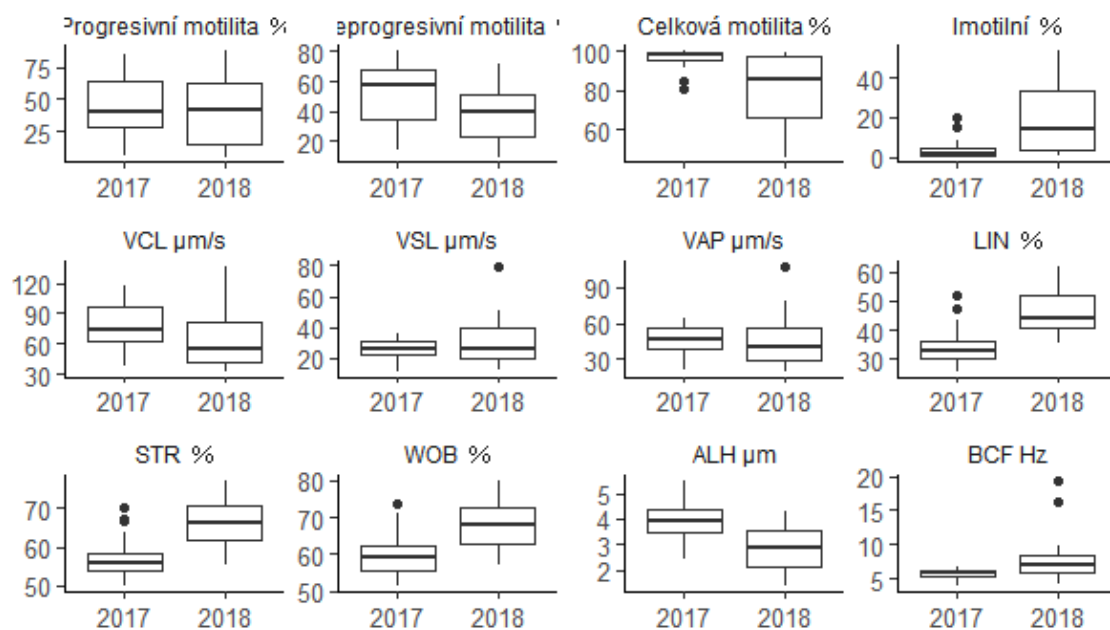
Tabulka 8 Porovnání vyhodnocení motility a morfologie v přípouštěcích sezónách 2017 a 2018

Proměnná	2017	2018	p-hodnota	průkaznost
Koncentrace, 10^6 spz/ml	$3\,405,38 \pm 846,72$	$11\,477,91 \pm 208,91$	$4,98 \cdot 10^{-9}$	***
Celková motilita, %	$96,8 \pm 4,42$	$81,5 \pm 17,39$	$2,81 \cdot 10^{-5}$	***
Neprogresivní motilita, %	$50,62 \pm 20,89$	$39,88 \pm 17,11$	0,371	*
Progresivní motilita, %	$46,18 \pm 22,92$	$41,62 \pm 26,12$	0,484	-
VCL, $\mu\text{m/s}$	$77,63 \pm 22,17$	$63,32 \pm 25,91$	0,0282	*
VSL, $\mu\text{m/s}$	$25,96 \pm 6,29$	$31,11 \pm 15,16$	0,0979	-
VAP, $\mu\text{m/s}$	$45,76 \pm 11,25$	$44,52 \pm 20,34$	0,775	-
LIN, %	$34,15 \pm 5,79$	$46,48 \pm 7,57$	$4,59 \cdot 10^{-9}$	***
STR, %	$56,87 \pm 4,59$	$66,01 \pm 5,74$	$1,3 \cdot 10^{-8}$	***
WOB, %	$59,68 \pm 5,3$	$68,09 \pm 6,66$	$2,07 \cdot 10^{-6}$	***
ALH, μm	$3,98 \pm 0,75$	$2,87 \pm 0,9$	$4,97 \cdot 10^{-6}$	***
BCF, Hz	$5,62 \pm 0,76$	$7,58 \pm 3,11$	0,00186	**
Normální spermie, %	$56,44 \pm 16,44$	$54,09 \pm 9,81$	0,515	-
Abnormální spermie, %	$43,56 \pm 16,44$	$45,91 \pm 9,81$	0,515	-
Délka hlavičky, μm	$8,93 \pm 0,25$	$8,83 \pm 0,3$	0,196	-
Šířka hlavičky, μm	$4,98 \pm 0,13$	$4,93 \pm 0,18$	0,311	-
Plocha hlavičky, μm^2	$38,34 \pm 3,68$	$35,82 \pm 2,32$	0,00298	**
Obvod hlavičky, μm	$22,83 \pm 1,71$	$23,63 \pm 0,74$	0,0251	*
Zploštění hlavičky	$1,78 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,03$	0,946	-
Prodloužení hlavičky	$0,28 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	0,426	-
Drsnost povrchu hlavičky	$0,97 \pm 0,24$	$0,84 \pm 0,13$	0,0112	*
Pravidelnost hlavičky	$0,92 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,01$	0,00218	**
Šířka středové části, μm	$0,74 \pm 0,23$	$0,59 \pm 0,16$	0,00641	**
Plocha středové části, μm^2	$15,83 \pm 11,37$	$33,63 \pm 13,61$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	***
Zaúhlení středové části	$1,33 \pm 0,58$	$1 \pm 0,2$	0,00492	**
Akrozom	$56,4 \pm 0,53$	$56,88 \pm 0,62$	0,00267	**

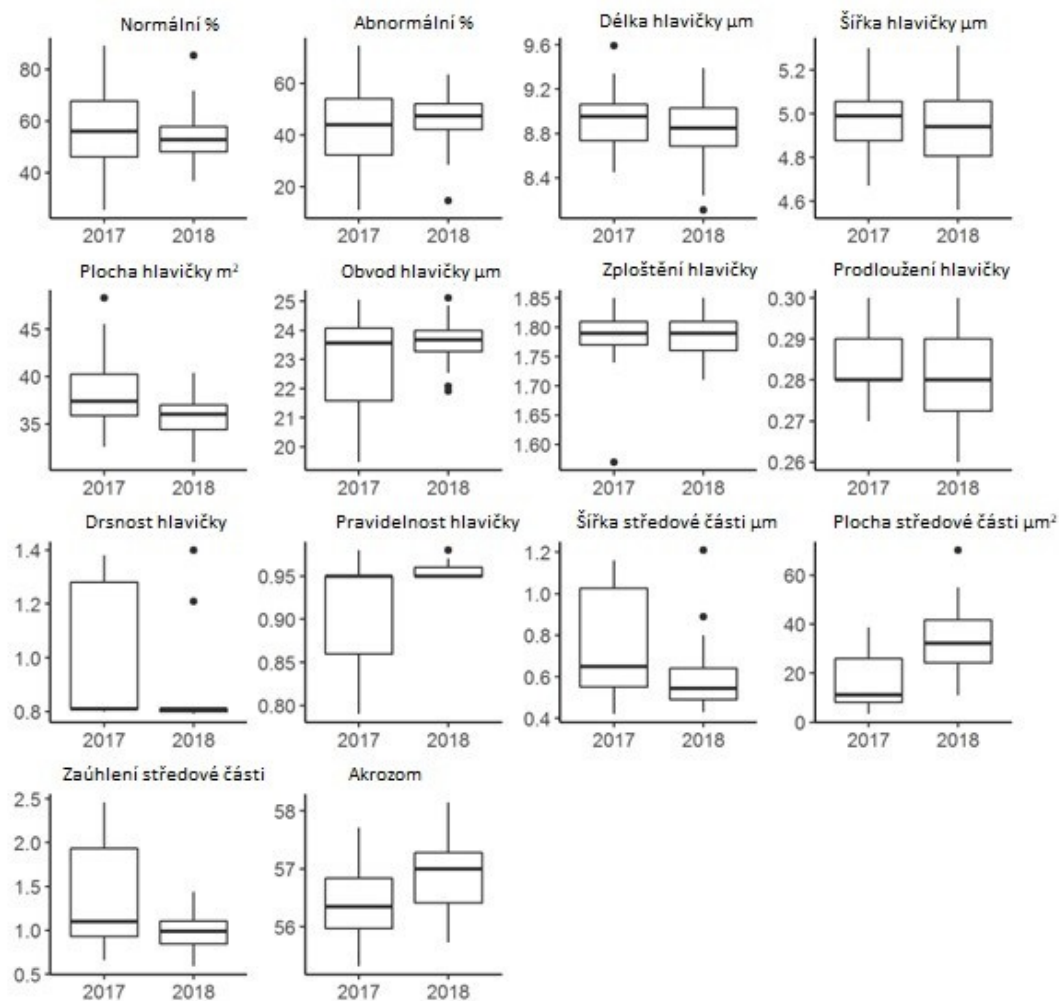
Graf 8 Porovnání koncentrace spermií ve spermatu mezi roky 2017 a 2018



Graf 9 Grafické porovnání motility a kinematických parametrů spermií mezi roky 2017 a 2018



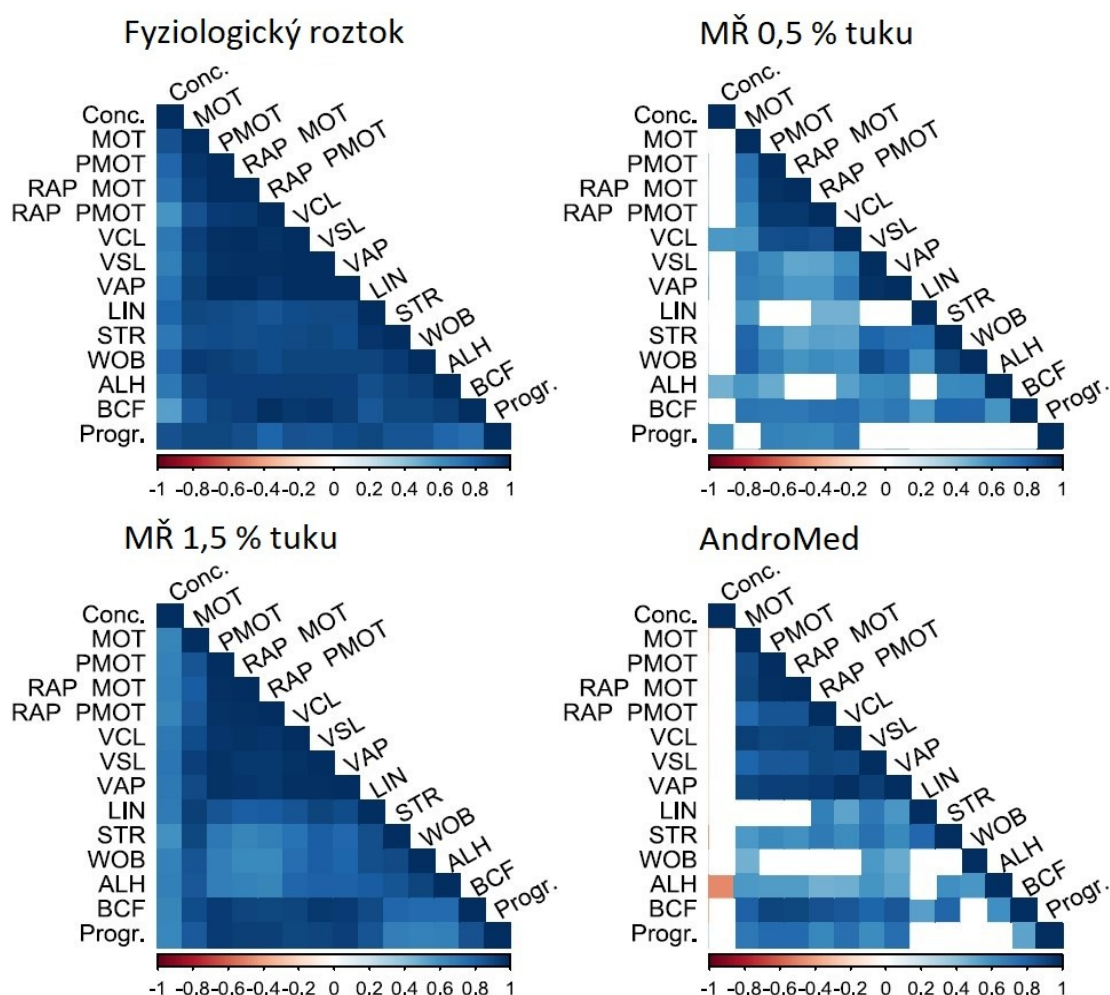
Graf 10 Grafické porovnání morfometrických parametrů spermií mezi roky 2017 a 2018



4.5 Ředidlo a přežitelnost spermií

Pro zjištění kvality ředidel a přežitelnosti spermatu v nich byla použita 4 ředidla – fyziologický roztok, mléčné ředidlo s 0,5 % tuku (Allai et al., 2017), mléčné ředidlo s 1,5 % tuku (Allai et al., 2017) a komerční ředidlo AndroMed®. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že fyziologický roztok má pozitivní korelaci se všemi parametry motility a jejími kinematickými parametry, podobně jako u ředidla s 1,5 % tuku, viz graf 11. Naopak mléčné ředidlo s 0,5 % tuku a AndroMed® špatně koreluje s koncentrací spermií ve spermatu, a dokonce mezi koncentrací a ALH v ředidle AndroMed® byla prokázána negativní korelace.

Graf 11 Korelogram vztahů mezi parametry motility spermatu a použitými ředidly



Vysvětlivky: MŘ = Mléčné ředidlo

Barva v jednotlivých polí v grafu odpovídá síle korelace vyjádřené významnými Pearsonovými korelačními koeficienty, zatímco bílé pole ukazuje nulový korelační koeficient a červené negativní korelaci.

Ředidlo ovlivňuje parametry motility spermatu pozitivně a jeho kvalita dokáže zajistit dobrou motilitu spermií i po 72 hodinách po odběru. Průměrné hodnoty a směrodatnou odchylku parametrů motility a kinematických parametrů po dobu skladování 0, 12, 24, 36, 48 a 72 hodin pro fyziologický roztok, 0,5 % tučné mléko, 1,5 % tučné mléko a AndroMed® jsou uvedeny v tabulce 9.

V tabulce 10 a grafu 12 je vyhodnocen vliv doby skladování a typu ředidla na vybrané parametry motility spermií – celková motilita (MOT), progresivní motilita (PMOT), křivočará rychlost (VCL), přímočará rychlost (VSL) a průměrná rychlost spermií (VAP). Statisticky vysoce průkazná interakce mezi dobou skladování a ředidlem u progresivní motility a všech spočítaných rychlostí spermií. Rychlost poklesu kvality spermatu se u jednotlivých ředidel liší. Především je překvapením kvalita spermatu po naředění fyziologickým roztokem, který měl kinematické parametry motility spermií nejlepší (Graf 12; c, d, e). Zároveň je fyziologický roztok vhodný pro použití k inseminaci do 24-36 h po odběru, protože po tuto dobu jsou kvalitativní parametry stále dobré. Dle očekávání byla kvalita spermatu s ředidlem AndroMed® postupně mírně klesající po celou dobu skladování. Motilita spermatu byla téměř 60 % i po 72 hodinách skladování, oproti ostatním ředidlům, kdy se jejich kvalita zhoršuje rychleji (Graf 12; a,b). Mléčná ředidla s 0,5 % tuku a 1,5 % tuku měly horší kinematické parametry spermií, celkově kvalita spermatu nebyla dle hodnocení dobrá.

Výsledné průměrné parametry koncentrace, motility a kinematických parametrů motility spermií byly srovnatelné s jinými pracemi (Zhao et al., 2017; Martí et al., 2011; Flores-Gil et al., 2021). Dle Allai et al. (2017) je jednoznačné, že výsledky dlouhodobého skladování spermií budou ukazovat na jejich zhoršující se kvalitu. Motilitu spermatu lze zvýšit použitím mléčných ředidel s vyšším obsahem tuku, např. Santolaria et al. (2015) použili mléčné ředidlo s 0,7 % tuku stejně jako Yániz et al. (2005) a jejich průměrné hodnoty motility jsou vyšší než v této práci. Zde měla mléčná ředidla nižší hodnoty motility a kinematických parametrů než fyziologický roztok a AndroMed®. V rámci porovnání mléčných ředidel, mělo ředidlo s 0,5 % tuku lepší motilitu než ředidlo s 1,5 % tuku. Vyšší pozitivní korelace parametrů motility u jednotlivých ředidel mělo ředidlo s 1,5 % tuku než s 0,5 % tuku. Dle Paulenz et al. (2003) mléčná ředidla vykazují o 10 % lepší oplozovací schopnost než ředidla na bázi vaječného žloutku, přestože v práci Paulenz et al. (2002) vykazují ředidla s vaječným žloutkem vyšší hodnoty motility po dobu skladování 30 hodin při 5 °C. Vyšší oplozovací schopnost mléčného ředidla by mohla znamenat, že sperma v mléčném

ředidle lépe snáší manipulaci s inseminační dávkou, ke které v průběhu inseminace dochází. Přestože bylo k výrobě ředidel použito UHT mléko, mají mít spermie dobrou oplozovací schopnost a i po 48 hodinách skladování dostatečnou kinetickou sílu, aby překonaly cervikální bariéru pro umělou inseminaci (Galarza et al., 2019). Ředidlo AndroMed® má v této práci nejlepší parametry motility a kinematických parametrů i po 72 hodinách. Kinematické parametry ihned po odběru měl nejvyšší fyziologický roztok, ale parametr VCL má omezenou predikovatelnost pro oplození schopnost (Santolaria et al., 2015). Celková fertilizační schopnost spermií je ovlivněna kombinací faktorů včetně motility a kinematických parametrů rychlosti (Martí et al., 2003). Kvalita spermatu skladovaného déle než 3 dny při 4 °C významně klesá (Gundogan et al., 2010; O'Hara et al., 2010; Falchi et al., 2018). To je způsobeno metabolickou aktivitou spermií, která mění pH spermatu, protože spermie se intoxikují a ztrácí membránovou integritu, čímž je snížena pohyblivost spermií a dochází až ke ztrátě fertility v důsledku reaktivních forem kyslíku během aerobní inkubace (Yániz et al., 2008). Do ředidel lze přidat různé podpůrné látky na zajištění delší doby přežití, např. nanočástice CeO₂ (Falchi et al., 2016), glutathion (Shi et al., 2020).

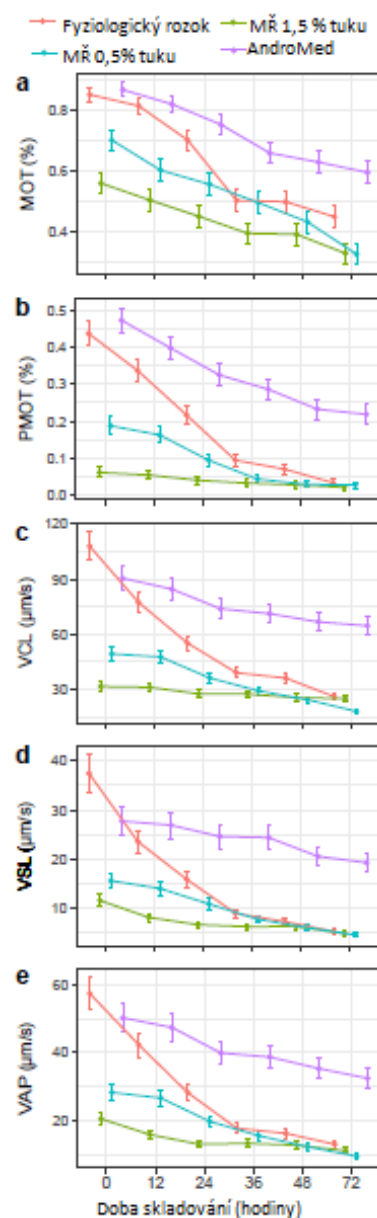
Tabulka 9 Hodnoty ukazatelů motility ($\pm$ SD) v jednotlivých ředidlech po celou dobu pozorování

Parametr	Fyziol. roztok	0 hodin			Fyziol. roztok	12 hodin		
		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed
MOT (%)	84.79 $\pm$ 7.46	55.99 $\pm$ 5.04	70.36 $\pm$ 4.57	87.45 $\pm$ 1.92	81.1 $\pm$ 8.28	50.32 $\pm$ 8.42	60.33 $\pm$ 1.8	82.63 $\pm$ 1.09
PMOT (%)	43.59 $\pm$ 5.76	6.43 $\pm$ 4.04	19.45 $\pm$ 8.09	47.14 $\pm$ 5.23	33.88 $\pm$ 10.74	5.4 $\pm$ 1.55	16.43 $\pm$ 5.3	36.64 $\pm$ 4.6
VCL (μ m/s)	108.15 $\pm$ 10.9	31.58 $\pm$ 6.41	49.14 $\pm$ 8.94	90.59 $\pm$ 6.42	77.66 $\pm$ 16.58	31.07 $\pm$ 0.97	47.59 $\pm$ 9.99	84.66 $\pm$ 5.06
VSL (μ m/s)	37.51 $\pm$ 3.55	11.48 $\pm$ 0.9	15.58 $\pm$ 3.18	27.78 $\pm$ 4.06	23.69 $\pm$ 5.25	8.01 $\pm$ 0.07	13.97 $\pm$ 2.42	29.8 $\pm$ 3.58
VAP (μ m/s)	57.47 $\pm$ 4.67	20.49 $\pm$ 1.27	28.27 $\pm$ 5.55	50.28 $\pm$ 4.94	42.47 $\pm$ 10.07	15.89 $\pm$ 0.63	26.64 $\pm$ 4.93	47.41 $\pm$ 4.34
Parametr	Fyziol. roztok	24 hodin			Fyziol. roztok	36 hodin		
		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed
MOT (%)	70.4 $\pm$ 5.1	45 $\pm$ 7.53	55.35 $\pm$ 11.83	75.54 $\pm$ 6.13	50.19 $\pm$ 9.98	39.22 $\pm$ 6.43	49.44 $\pm$ 6.64	65.77 $\pm$ 10.81
PMOT (%)	21.52 $\pm$ 3.64	3.71 $\pm$ 1.13	9.93 $\pm$ 5.67	32.38 $\pm$ 6.04	9.43 $\pm$ 4.02	2.98 $\pm$ 1.24	4.13 $\pm$ 0.8	28.55 $\pm$ 4.92
VCL (μ m/s)	55.19 $\pm$ 5.32	27.55 $\pm$ 3.28	36.25 $\pm$ 9.03	73.93 $\pm$ 10.83	39.1 $\pm$ 6.06	27.39 $\pm$ 1.54	29.1 $\pm$ 2.2	71.27 $\pm$ 10.98
VSL (μ m/s)	15.9 $\pm$ 3.27	6.56 $\pm$ 0.74	10.87 $\pm$ 2.85	24.49 $\pm$ 4.52	8.9 $\pm$ 2.26	6.14 $\pm$ 0.42	7.64 $\pm$ 0.93	24.33 $\pm$ 1.61
VAP (μ m/s)	28.29 $\pm$ 3.55	13.1 $\pm$ 1.64	19.84 $\pm$ 5.98	39.89 $\pm$ 7.62	17.8 $\pm$ 3.59	13.29 $\pm$ 1.29	15.52 $\pm$ 1.7	38.71 $\pm$ 6.98
Parametr	Fyziol. roztok	48 hodin			Fyziol. roztok	72 hodin		
		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed		MŘ 0.5 %	MŘ 1.5 %	AndroMed
MOT (%)	49.76 $\pm$ 5.17	38.78 $\pm$ 2.31	42.97 $\pm$ 1.37	62.64 $\pm$ 13.06	44.74 $\pm$ 4.43	32.57 $\pm$ 6.87	32.16 $\pm$ 3.83	59.36 $\pm$ 12.37
PMOT (%)	7.93 $\pm$ 6.21	2.45 $\pm$ 0.43	2.58 $\pm$ 0.11	23.55 $\pm$ 6.52	3.34 $\pm$ 2.07	2.05 $\pm$ 1.21	2.53 $\pm$ 1.29	21.96 $\pm$ 3.58
VCL (μ m/s)	36.13 $\pm$ 8.33	25.4 $\pm$ 1.34	24.3 $\pm$ 0.44	66.84 $\pm$ 11.83	26.04 $\pm$ 5.55	24.8 $\pm$ 4.4	17.94 $\pm$ 0.63	64.54 $\pm$ 9.7
VSL (μ m/s)	7.27 $\pm$ 3.79	6.16 $\pm$ 0.34	5.97 $\pm$ 0.2	20.46 $\pm$ 2.59	5.23 $\pm$ 1.73	4.69 $\pm$ 1.48	4.46 $\pm$ 0.83	19.14 $\pm$ 1.51
VAP (μ m/s)	16.3 $\pm$ 6.35	12.77 $\pm$ 0.9	12.27 $\pm$ 14.6	35.33 $\pm$ 7.21	13.1 $\pm$ 3.02	11.11 $\pm$ 2.04	9.52 $\pm$ 1.19	32.41 $\pm$ 4.03

Tabulka 10 Interakce mezi dobou skladování a ředidla a jejich vztah na motilitu spermatu

	Doba skladování		Ředidlo		Doba skladování * Ředidlo	
	X^2_5	P	X^2_3	P	X^2_{15}	P
MOT	42,65	<0,001	85,80	<0,001	27,64	0,024
PMOT	21,96	<0,001	119,90	<0,001	53,34	<0,001
VCL	21,70	<0,001	111,70	<0,001	78,41	<0,001
VSL	25,27	<0,001	105,07	<0,001	78,39	<0,001
VAP	27,09	<0,001	109,73	<0,001	62,29	<0,001

Graf 12 Vliv ředidel na motilitu spermatu a její kinematické parametry po 0, 12, 24, 36, 48, a 72 h skladování



Vysvětlivky: MŘ = Mléčné ředidlo

5 Závěr

Výsledky zjištěné v této disertační práci zaznamenaly dynamiku změn spermatu beranů v průběhu roku, připouštěcího období, dne, vliv věku beranů a přežitelnost spermatu ve čtyřech různých typech ředidel. U spermatu byl hodnocen objem, koncentrace, motilita spermií a její kinematické parametry a morfometrické parametry spermií. Sperma berana mění kvalitu v průběhu jeho života, roku i během připouštěcího období, ale vždycky by mělo být oplození schopné. Všechny získané vzorky splňovaly kritéria kvalitního spermatu využívaného pro výrobu inseminačních dávek.

V průběhu roku se sperma beranů mění, v závislosti na ročním období. Přímo je ovlivňuje teplota, vlhkost nebo množství světla. Berani šumavské ovce mají srovnatelné kvalitativní ukazatele spermatu s ostatními evropskými plemeny.

Během roku se mění objem spermatu, přičemž největší množství je na podzim (2,06 ml). Na podzim byla nejvyšší i koncentrace spermií ($8142,29 \times 10^6/\text{ml}$) a největší hodnoty kinematických parametrů LIN a WOB. V případě morfometrických parametrů byla na podzim největší plocha středové části a její zaúhlení.

Sperma bylo kvalitní i na jaře, kdy byla zjištěna nejvyšší celková motilita a kinematické parametry VCL, VAP a ALH. Dále byla zjištěna největší plocha, šířka a obvod hlavičky.

Progresivní motilitu, kinematické parametry VSL, BCF roční období, dle statistického vyhodnocení, neovlivňuje. Dále nebyla statisticky průkazná délka hlavičky, zploštění, drsnost povrchu, pravidelnost, plocha středové části a velikost akrozomu.

Odebíraným spermatem nebo přirozeně berany je možné připouštět po celý rok, protože sperma stále splňuje veškeré požadavky na jeho kvalitu. Nuance jeho změn v průběhu roku jsou statisticky detekovatelné, avšak na jeho oplozovací schopnost by neměly mít vliv.

Připouštěcí sezóna začíná v našich podmínkách koncem srpna a trvá až do prosince, kdy si každý chovatel termín připouštění stanoví dle požadované doby bahnění. Během připouštěcí sezóny byly zjištěny následující průměrné hodnoty – objem ejakulátu 1,91 ml, koncentrace spermií $3589,12 \times 10^6/\text{ml}$, celková motilita spermií 95,94 %, progresivní motilita spermií 47,97 %. U motility spermií byly zjištěny i jednotlivé kinematické parametry: VCL 80,26 $\mu\text{m/s}$, VSL 25,80 $\mu\text{m/s}$, VAP 46,42 $\mu\text{m/s}$, LIN 33,06 %, STR 55,84 %, WOB 57,69 %, ALH 3,98 μm , BCF 5,79 Hz. Zjišťovány byly i

průměrné morfometrické parametry, délka hlavičky spermie byla 8,79 μm , šířka 4,92 μm , plocha 37,26 μm^2 a obvod hlavičky 22,61 μm . Zploštění hlavičky bylo 1,78, prodloužení 0,29, drsnost povrchu hlavičky 0,95 a pravidelnost 0,92. Středová část měla šířku 0,7 μm , plochu 21,47 μm^2 a zaúhlení 1,31. Celková velikost akrozomu byla 56,49.

V průběhu sezóny se s klesáním světla pod 10 h začala snižovat progresivní motilita a začala se zvyšovat koncentrace spermií ve spermatu ($p < 0,01$). Byla prokázána pozitivní korelace PMOT (0,46), NPMOT (0,46), VCL (0,39), VSL (0,33), VAP (0,34) a ALH (0,63) a negativní korelace mezi délkou světla a koncentrací spermií (-0,61) a BCF (-0,34) ($p < 0,05$).

Sperma beranů může být odebíráno v průběhu celého dne, dokonce beraní v přirozené plemenitbě připouští vícekrát za den a kvalita spermatu by se neměla měnit. V práci byla vyhodnocena kvalita spermatu beranů při odběrech 3x denně v 8, 12 a 16 h po dobu 14 dnů s 3denní přestávkou mezi odběry. Z výsledků bylo zjištěno, že celková motilita spermatu byla $>93\%$, objem spermatu byl $>1,6\text{ ml}$ a koncentrace spermií byla $>3600 \times 10^6/\text{ml}$. U objemu, koncentrace spermií, motility a jejich kinematických parametrů nebyly zjištěny žádné statisticky průkazné rozdíly. V případě morfologie spermií je statisticky průkazná závislost v ploše středové části, která byla největší v 16 h (14,84 μm^2 , $p < 0,05$). Ostatní hodnoty morfologických parametrů spermií byly statisticky neprůkazné. Denní doba nebo častější odběr nemají na kvalitu spermatu vliv, lze tedy berany odebírat častěji a v různou denní dobu. Ovšem vše musí být v souladu s welfare berana.

Beraní mohou být v plemenitbě využívání dle jejich chovatelské kondice, která závisí na ranosti plemene. Porovnání výsledků beranů odbíraných v roce 2017, kdy byli 2letí a v roce 2018, kdy byli 3 letí, může ukázat měnící se kvalitu spermatu v závislosti k věku beranů. Zjištěné výsledky byly porovnatelné s literaturou a bylo zjištěno, že motilita spermatu byla $>96\%$, objem spermatu byl $>1,9\text{ ml}$ a koncentrace spermií byla $>3 \times 400 \times 10^6/\text{ml}$.

Statisticky průkazně vyšší hodnoty u 2letých beranů na hladině významnosti $p < 0,001$ měla celková motilita. Dále byly vyšší hodnoty u kinematických parametrů rychlosti spermií ALH. Morfometrické parametry hlaviček spermií měly větší hodnoty u plochy hlavičky ($p < 0,01$), dále u šířky středové části. Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla u 2letých beranů vyšší hodnota neprogresivní motility, VCL a drsnosti povrchu hlavičky v případě morfometrických parametrů.

U 3letých beranů byla statisticky průkazně vyšší koncentrace spermií ($p < 0,001$). Na stejné hladině významnosti byly vyšší kinematické parametry rychlosti spermií u koeficientů LIN, STR, WOB. Hodnota BCF byla prokazatelná na hladině významnosti $p < 0,01$. U morfometrických parametrů hlaviček byla větší plocha středové části ($p < 0,001$), dále na hladině významnosti $p < 0,01$, vyšší hodnota u pravidelnosti hlavičky, úhlu středové části a velikosti akrozomu. Morfometrické parametry na hladině významnosti $< 0,05$ byly vyšší u obvodu hlavičky.

Statisticky neprůkazné hodnoty byly u progresivní motility, u kinematických parametrů rychlosti VSL, VAP a u morfologických parametrů procenta normálních a abnormálních spermií, šířky a délky hlavičky, míry prodloužení a zploštění hlavičky.

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že na většinu ukazatelů kvality spermatu má vyšší hodnoty u 3letých beranů. Vzhledem k těmto zjištěním lze říct, že 3letí berani mají kvalitnější sperma než 2 letí berani.

Sperma bylo rozděleno na 4 stejné alikvoty, které byly rozředěny fyziologickým roztokem, ředidly s 0,5 % a 1,5 % mléčného tuku a komerčním ředidlem AndroMed®. Sperma bylo uchováváno v lednici při 5 °C a hodnoceno bezprostředně po odběru a dále ve 12, 24, 36, 48 a 72 hodin. Sperma korelovalo pozitivně ve všech parametrech motility a pohybu ve fyziologickém roztoku a mléčném ředidle s 1,5 % tuku. Horší korelaci mělo mléčné ředidlo s 0,5 % tuku a AndroMed®, které mělo dokonce negativní korelaci s koncentrací spermií a ALH.

Byl prokázán vysoce významný vliv ředidla a doby skladování na parametry progresivní motility a VCL, VSL, VAP ($p < 0,001$). U celkové motility byl prokázán vliv ředidla a doby skladování, ale nebyla prokázána jejich vzájemná interakce. Průměrné hodnoty ukazatelů celkové motility, progresivní motility, VCL, VSL a VAP postupně klesaly po celou dobu skladování. Sperma naředěné ředidlem AndroMed® mělo po celou dobu dobré výsledky a bylo by možné využít inseminační dávky i po 72 h. V ostatních ředidlech kvalita rychle klesala a jejich využití by bylo možné do 24 h, nejdéle do 36 hodin, kdy by byl výsledek již nejistý.

6 Seznam literatury

1. Abadjieva D., Chervenkov M., Stefanov R., Metodiev N., Kistaniva E., Kacheva D., Raycheva E. (2014). Effect of breeding season on the kinematic parameters and morphology of ram' sperm from synthetic population bulgarian milk sheep breed. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 20: 967-972
2. Abecia J. A., Arrébola F., Macías A., Laviña A., González-Casquet O., Benítez F., Palacios C. (2016). Temperature and rainfall are related to fertility rate after spring artificial insemination in small ruminants. *International Journal of Biometeorology*, 60(10), 1603-1609. ISSN 0020-7128.
3. Ahmad E., Naseer Z., Ucan U., Serin I., Ceylan A., Aksoy M. (2018). Seasonal variations in sperm acrosome reaction, osmotic tolerance and serum testosterone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science*. 198, 112-120. ISSN 03784320.
4. Allai L., Druart X., Louanjli N., Contell J., Nasser B., El Amiri B. (2017). Improvements of ram semen quality using cactus seed oil during liquid preservation in Tris egg yolk and skim milk based extenders. *Small Ruminant Research*. 151, 16-21
5. Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw*. 67(1): 1-48
6. Benmoula A., Badi A., El Fadili M., El Khalil K., Allai L., El Hilali A., El Amiri B. (2017). Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Animal Reproduction Science*, 180, 17-22
7. Beracochea F., Manes J., Viera M. N., Santiago-Moreno J., Ungerfeld R. (2020). Administration of equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) to rams to improve the reproductive performance during the non-breeding season. *Livestock Science*, 240. ISSN 18711413.
8. Bravo J.A., Montanero R., Calero, Roy T.J. (2014). Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Research*, 119(1-3), 114-119. ISSN 09214488.
9. Brooks M.E., Kristensen K., van Benthem K.J., Magnusson A., Berg C.W., Nielsen A., Skaug H.J., Maechler M., Bolker B.M. (2017). glmmTMB Balances

- Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R J* 9(2): 378-400
10. David I., Kohnke P., Lagriffoul G., Praud O., F. Plouarboué, Degond P., Druart X. (2015). Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. 161, 75-81. ISSN 03784320.
 11. Da Silva Maia M., Bicudo S. D., Azevedo H. C., Sicherle C. C., De Sousa D. B., Rodello L. (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with antioxidants. *Small Ruminant Research*. 85(2-3), 85-90
 12. Falchi L., Bogliolo L., Galleri G., Airu F., Zeda M.T., Pinna A., Malfatti L., Innocenzi P., Ledda S. (2016). Cerium dioxide nanoparticles did not alter the functional and morphologic characteristics of ram sperm during short-term exposure. *Theriogenology*. 85(7), 1274-1281.e3. ISSN 0093691X.
 13. Falchi L., Galleri G., Dore G.M., Zedda M.T., Pau S., Bogliolo L., Ariu F., Pinna A., Nieddu S., Innocenzi P., Ledda S. (2018). Effect of exposure to CeO₂ nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4 °C for 96 hours. *Reprod Biol Endocrin*. 16(1):19
 14. Flores-Gil V.N., Toledano-Díaz A., Velázquez R., Oteo M., López-Sebastián A., Santiago-Moreno J. (2021). Role of changes in plasma prolactin concentrations on ram and buck sperm cryoresistance. *Domestic Animal Endocrinology*. 76. ISSN 07397240.
 15. Galarza D.A., Ladrón D.E., Guevara M., Beltrán-Breña P., Sánchez-Calabuig M.J., Rizos D., López-Sebastián A., Santiago-Moreno J. (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology* 133: 29-37
 16. Gundogan M., Yeni D., Avdatek F., Fidan A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 122(3-4), 200-207. ISSN 03784320.
 17. Ibanescu I., Leiding C., Ciornei Ș. G., Rosca P., Sfartz I., Drugociu D. (2016). Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 166, 72-79

18. Kafi M., Safdarian M., Hashemi M. (2004). Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*. 53(1-2), 133-139
19. Kasimanickam R., Kasimanickam V., Tibary A., Pelzer K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research*. 99(2-3), 208-213
20. Karagiannidis A., Varsakeli S., Alexopoulos C., Amarantidis I. (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*. 37(1-2), 125-130. ISSN 09214488.
21. Louda F., et al. (2001). *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU v Praze. ISBN 80-213-0702-1, 225 s.
22. Mandiki S.N.M., Derycke G., Bister J.L., Paquay R. (1998). Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. *Small Ruminant Research*. 28(1), 67-79
23. Maroto-Morales A., Ramón M., García-Álvarez O., Soler A. J., Estes M.C., Martínez-Pastor F., Pérez-Guzmán M.D., Garde J.J. (2010). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*. 73(4), 437-448
24. Maroto-Morales A., Ramón M., García-Álvarez O., Montoro V., Soler A.J., Fernández-Santos M.R., Roldan E.R.S., Pérez-Guzmán M.D., Garde J.J. (2015). Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology*. 84(9), 1536-1541. ISSN 0093691X.
25. Martí J.I., Martí E., Cebrián-Pérez J.A., Muño-Blanco T. (2003). Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology*. 60(6), 1025-1037. ISSN 0093691X.
26. Martí J.I., Aparicio I.M., García-Herreros M. (2011). Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology*. 76(1), 97-109. ISSN 0093691X.
27. Nikolov I., Sabev M., Ivanova-Kicheva M., Chemshirova T., Baycheva E., Popova M. (2005). Stimulation of sexual reflexes of aboriginal ram breeds during the non-mating season. *Journal of Central European Agriculture*. 4(6), 515-520

28. Ogundele F.A., Okubanjo O.O., Ajanusi O.J., Fadason S.T. (2016). Semen characteristics and reaction time of Yankasa rams experimentally infected with *Trypanosoma evansi* infection. *Theriogenology*. 86(3)
29. Palacín I., Vicente-Fiel S., Santolaria P., Yániz J.L. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*. 112(1-3), 128-135
30. Paulenz H., Söderquist L., Pérez-Pé R., Berg K.A. (2002) Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57(2): 823-836
31. Paulenz H., Söderquist L., Ådnøy T., Fossen O.H., Berg K.A. (2003). Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology* 60(4): 759-766
32. Peker Akalin P., Bucak M. N., Güngör Ş., et al. (2016). Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5°C. *Small Ruminant Research*. 137, 117-123
33. Pool K.R., Rickard J.P., Tumeth E., De Graaf S.P. (2020). Treatment of rams with melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive motility and DNA integrity. *Animal Reproduction Science*. 2020, 221
34. Romano J.E., Christians C.J. (2009). Sperm loss using different artificial vaginas in rams. *Small Ruminant Research*. 83(1-3), 85-87
35. Santolaria P., Vicente-Field S., Palacín I., Fantova E., Blasco M.E., Silvestre M.A., Yániz J.L. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*. 163, 82-88
36. Sarlós P., Egerszegi I., Balogh O., Molnár A., Cseh S., Rátky J. (2013). Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*, 111(1-3), 90-95
37. Shahat A.M., Thundathil J.C., Kastelic J.P. (2021). Scrotal subcutaneous temperature is increased by scrotal insulation or whole-body heating, but not by scrotal neck insulation; however, all three heat-stress models decrease sperm quality in bulls and rams. *Journal of Thermal Biology*. 100

38. Shi L., Jin T., Hu Y., Ma Z., Niu H., Ren Y. (2020). Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5 °C. *Small Ruminant Research*. 189
39. Valeanu S., Johannisson A., Lundeheim N., Morrel J.M. (2015). Seasonal variation in sperm quality parameters in Swedish red dairy bulls used for artificial insemination. *Livestock Science*. 173, 111-118
40. Wei T, Simko V. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>
41. Wickham H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York
42. Yániz J.L., Martí J.I., Silvestre M.A., Folch J., Santolaria P., Alabart J.L., López-Gatius F. (2005). Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*. 64(8), 1844-1851
43. Yániz J.L., Santolaria P., Marco-Aguado M.A., López-Gatius F. (2008). Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*. 70(2): 192-198
44. Zhao J., Jin Y., Du M., Liu W., Ren Y., Zhang Ch., Zhang J. (2017). The effect of dietary grape pomace supplementation on epididymal sperm quality and testicular antioxidant ability in ram lambs. *Theriogenology*. 97: 50-56

7 Seznam tabulek

Tabulka 1 Motilita spermií během jednotlivých ročních období.....	13
Tabulka 2 Morfometrické parametry spermií v jednotlivých ročních období.....	16
Tabulka 3 Popisné statistiky motility a jejich kinematických parametrů.....	18
Tabulka 4 Korelační koeficienty mezi délkou světelného dne a hodnotami motility spermií.....	19
Tabulka 5 Průměrné morfometrické parametry spermií v připouštěcí sezóně.....	22
Tabulka 6 Průměrné hodnoty motility a kinematických parametrů spermií a jejich závislost na denní dobu odběru.....	23
Tabulka 7 Průměrné hodnoty morfologie spermií a jejich závislost na denní dobu odběru.....	24
Tabulka 8 Porovnání vyhodnocení motility a morfologie v připouštěcích sezónách 2017 a 2018.....	26
Tabulka 9 Hodnoty ukazatelů motility ($\pm$ SD) v jednotlivých ředidlech po celou dobu pozorování.....	32
Tabulka 10 Interakce mezi dobou skladování a ředidla a jejich vztah na motilitu spermatu.....	32

8 Seznam grafů

Graf 1 Motilita a kinematické parametry v jednotlivých ročních období.....	46
Graf 2 Dynamika motility a kinematických parametrů v průběhu roku.....	46
Graf 3 Grafické znázornění rozložení hodnot morfologie spermií v jednotlivých ročních období.....	49
Graf 4 Rozložení hodnot morfologie spermií v průběhu roku.....	49
Graf 5 Průměrné hodnoty motility spermií v závislosti na délce světelného dne.....	52
Graf 6 Kinematické parametry motility v připouštěcím období v závislosti na délce světelného dne.....	52
Graf 7 Koncentrace spermií ve spermatu v závislosti na délce světelného dne.....	53
Graf 8 Porovnání koncentrace spermií ve spermatu mezi roky 2017 a 2018.....	59
Graf 9 Grafické porovnání motility a kinematických parametrů spermií mezi roky 2017 a 2018.....	59
Graf 10 Grafické porovnání morfometrických parametrů spermií mezi roky 2017 a 2018	60

Graf 11 Korelogram vztahů mezi parametry motility spermatu a použitými ředidly.....	61
Graf 12 Vliv ředidel na motilitu spermatu a její kinematické parametry po 0, 12, 24, 36, 48, a 72 h skladování.....	64

9 Seznam použitých zkratk

SCHOK – Svaz chovatelů ovcí a koz

MOT – Celková motilita

PMOT – Progresivní motilita

VCL – Rychlost spermií na křivočaré dráze

VSL – Přímočará rychlost

VAP – Průměrná rychlost

LIN – Linearita

STR – Přímost

WOB – Míra kmitání skutečné dráhy kolem průměrné dráhy

ALH – Amplituda bočního posunu hlavičky po její průměrné dráze

BCF – Frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy

10 Seznam publikovaných prací

Impaktové publikace

Búdová, A., Lisner, A., Strnad, L., Vokrouhlíková, J., Kumble, K., Beran, J. Effect of the amount of fat content in milk extender on ram sperm motility parameters during the storage of 5 °C for 72 h and comparison with the others semen extenders. *Journal of Central European Agriculture*. 2024, In press

Vokrouhlíková, J., Čoudková, V., Šichtař, J., Vrbová, A., **Búdová, A.**, Maršálek, M., a Rutkayová, J. Chemically defined caseinate extenders and their effect on the cooled semen collected from stallions with long sexual rest. *Journal of Central European Agriculture*. 2021, **22**(2), 269-279. ISSN 1332-9049. Dostupné z: doi:10.5513/JCEA01/22.2.2904

Příspěvky ve sbornících

Kyryanová, A., Kumble, K., Křížková, J., Maršálek, M., Vejčík A. Hodnocení reprodukce ovcí a plodnosti beranů. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2017. ISBN 978-80-7394-641-8.

Kumble, K., **Kyryanová, A.**, Maršálek, M. Fyziologické dysfunkce koní. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2017. ISBN 978-80-7394-641-8.

Kyryanová, A., Strnad L., Čoudková V., Kumble, K., Křížková, J., Znoj Novotná B., Vazdová P., Maršálek, M., Vejčík A. Dynamika změn motility spermatu beranů v připouštěcí sezóně. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2018. ISBN 978-80-7394-641-8.

Znoj Novotná, B., Kouba, J., **Kyryanová, A.**, Lád, F. Extrudovaný len ve výživě plemenných býků. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2018. ISBN 978-80-7394-641-8.

Kumble, K., **Kyryanová, A.**, Maršálek, M. Srovnání vlivu pracovního zatížení na jezdecké a záprahové koně plemene lipický kůň v NŽ Topolčianky. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2018. ISBN 978-80-7394-641-8.

Strnad L., **Kyryanová, A.**, Čoudková V., Baštýřová Brutovská, A., Margetín, M., Maršálek, M., Vejčík A. Produkce a kvalita koziho mléka v České a Slovenské republice. In: *Zootechnika: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2018. ISBN 978-80-7394-641-8.

Búdová A., Strnad L., Křížková, J., Čoudková V., Kumble, K., Maršálek, M., Vejčík A. Vyhodnocení dynamiky kvality spermatu beranů během dne. *Zootechnika 2019: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2019. ISBN 978-80-7394-641-8.

Strnad L., **Búdová A.**, Čoudková V., Baštýřová Brutovská, A., Maršálek, M.

Vliv technologie chovu koz na kvalitu koziho mléka. *Zootechnika 2019: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2019. ISBN 978-80-7394-641-8.

11 Životopis

Vzdělání

2016 - dosud	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, obor Speciální zootechnika, doktorské studium
2015 - 2018	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta, obor Učitelství odborných předmětů, kombinované bakalářské studium
2014 - 2016	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, obor Zootechnika, magisterské studium
2011 - 2014	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, obor Zootechnika, bakalářské studium,
2007 - 2011	Vyšší odborná a Střední Zemědělská škola Tábor, obor Agropodnikání – Chov koní

Pracovní zkušenosti

2019 - dosud	Mateřská dovolená
2024	Základní škola Kamenný Újezd, Učitel 1. stupně
2022 - 2023	Abc Media network, s. r. o., Redaktor copywriter
2017 - 2019	Zemědělská společnost Dubné a. s., Zootechnik
2016 - 2017	Účelové zařízení Čtyři dvory, FZT
2014 - 2022	Zastupitelstvo obce Hodonice, člen a kulturní referent
2011 - 2016	Zemědělský podnikatel

Jazykové znalosti

Anglický jazyk

Ostatní dovednosti

Počítačové dovednosti – MS Office, Adobe, WordPress

Řidičský průkaz: B, T

Hra na basketbalu

Jezdecká licence

Osvědčení o absolvování odborné přípravy – hlavní vedoucí tábora

Kurz první pomoc dětem