
THE INFLUENCE OF THE CZECH FLECKVIEH BULL INDIVIDUALITY AND PREPARATION METHOD TO THE SPERM ACTIVITY

Hanuláková Š., Máchal L.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

Email: sarinkas@seznam.cz

ABSTRACT

The main objective of this study was the comparison of five bulls of Czech Fleckvieh. Insemination doses were prepared by 3 different methods. Thirty insemination doses were used from each bull. The first used method was the thawing of insemination doses in water bath and the subsequent 5 min exposure to 0 °C, the second method was the thawing of insemination dose in the warm palm and the third one was standard preparation of insemination doses. The sperm activity was evaluated in 4 times tages ($t = 0$, $t = 15$ min, $t = 30$ min, $t = 60$ min). The obvious differencies in sperm activity were observed for the tested bulls. Concluding differencies among tested methods were observed as well.

Key words: bull, Czech Fleckvieh, sperm activity, insemination dose

Acknowledgement: This project was supported by IGA TP8/2011

ÚVOD

Kvalitu plemenného býka nelze vidět jen v plemenné hodnotě, ale také v kvalitě reprodukčních funkcí, které limitují využitelnost i u plemenářsky špičkového samce. O genofond špičkových plemeníků je obrovský zájem a je tedy snahou, aby byli tito plemenci maximálně využíváni (VĚŽNÍK et al., 2004). Inseminace řídí reprodukční proces a je podmínkou pro masový rozvoj kontroly dědičnosti. Zpětně umožňuje maximální využití nejlépe prověřených plemenných býků v připarování. Při jejím rozšíření lze úspěšně realizovat ústřední plemenářské programy v chovu skotu a podstatně zkrátit cestu k chovnému cíli s možností akcelerace selekčního programu. K rozhodující kvalitativní změně ve využití inseminace došlo však teprve po úspěšném vývoji metod kryokonzervace a dlouhodobého uchování býčího spermatu v prostředí tekutého dusíku a jejím zavedení do široké praxe (PETELÍKOVÁ et al., 1998). VĚŽNÍK et al. (2004) k tomu dodává, že základem pro úspěšný chov skotu je bezproblémové zvládnutí reprodukce - zajištění obratu stáda z vlastního chovu. Trendem posledních doby je ustupování od zajištění inseminace dodavatelskou formou od plemenářských podniků. Jejich úlohu v zemědělském podniku přebírají chovatelé, zootechnici, přičemž k vykonávání dané činnosti musí mít příslušné osvědčení. Úspěšnost inseminace závisí na řadě faktorů, které přímo souvisí s odborností inseminačního technika: stanovení optimální doby pro inseminaci plemence, použití kvalitní inseminační dávky, správně provedený inseminační úkon a v neposlední řadě správná příprava inseminační dávky. KLIMENT et al. (1989) zdůrazňuje, že v provozu inseminačních stanic je nezbytné zajištění pravidelné kontroly kvality spermatu na vysoké odborné úrovni, protože na ní je velká závislost úspěchu inseminace a důvěry chovatelů k této biotechnické metodě v reprodukčním procesu u hospodářských zvířat. Základní vyšetření spermatu probíhá bezprostředně po jeho odběru a jedním z nejdůležitějších vyšetření je kontrola aktivity spermií, která se provádí před zamrazením ejakulátu i po jeho rozmrazení. Podle GARNERA (1991) je schopnost pohybu spermií jednou z jejich nejunikátnějších vlastností. VĚŽNÍK et al. (2004) doplňuje, že většina autorů považuje progresivní pohyb spermií za významný ukazatel pro odhad fertilizační schopnosti semene. Z hlediska funkčního je pohyb spermií nutnou podmínkou jejich průniku do vaječné buňky. Proto je připravenost energie (ATP) výměnou látkovou základní potřebou buněčné vybavenosti každé spermie. Všechny faktory ovlivňující motilitu spermií, ovlivňují i výměnu látkovou a naopak. Důležitost progresivního pohybu spermie zdůrazňuje ve své publikaci i LOUDA et al. (2001), který uvádí, že přímý progresivní pohyb vpřed za hlavičkou je jedním z nejvýznamnějších ukazatelů oplozovací schopnosti ejakulátu a je znakem funkční plnohodnotnosti spermií.

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv individuality býka zařazeného do testace na aktivitu spermií po rozmrazení inseminační dávky za použití různých metod její přípravy a zjistit možný negativní dopad některých nestandardních metod přípravy inseminačních dávek běžně používaných v praxi.

MATERIÁL A METODIKA

K analýze byly použity inseminační dávky pěti býků českého strakatého skotu. Jednalo se o neproověřené plemníky, kteří byli zařazeni do testačního programu v roce 2006. Býci byli umístěni na jedné inseminační stanici. Plemenná hodnota aktualizovaná v lednu 2011 býků je uvedena v tabulce 1. Od každého býka bylo hodnoceno 30 hluboce zmrazených inseminačních dávek o objemu 0,25 cm³. Pro experiment byly zvoleny 3 způsoby přípravy inseminační dávky. První byla zvolena metoda standardního rozmražení inseminační dávky ve vodní lázni o teplotě 38 °C. Doba rozmražení byla podle technologického návodu stanovena na 20 sekund, i když někteří autoři uvádí ve svých publikacích širší časové rozpětí. Např. LOUDA et al. (2001) uvádí dobu rozmražení mezi 12 – 25 vteřinami. Tato metoda byla považována za výchozí způsob pro srovnání s výsledky dalších nestandardních postupů přípravy inseminačních dávek. Po vyjmutí z lázně byla pejeta osušena buničitou vatou, byl odstřížen zatavený konec a dávka byla vložena do katetru. Následně byla překryta plastovou krytkou, což byla finální úprava dávky před jejím následným hodnocením. Tato metoda byla následně porovnána s metodami, které jsou využívány v praxi některými inseminačními technikami. Jedná se především o způsob rozmražení inseminační dávky v sevřené dlani. Na základě zkušebního testu byla stanovena doba k rozmražení dávky na 15 sekund. Po rozmražení se odstříhl zatavený konec a stejně jako u předchozí metody byla pejeta vložena do kovového katetru a překryta plastovou krytkou. U třetího způsobu bylo použito standardního způsobu rozmražení pejetý ve vodní lázni o teplotě 38 °C. Následně byla inseminační dávka vložena na do chladničky, kde ležela 5 minut při teplotě 0 °C. Tímto způsobem byla simulována situace, kdy je technikem v zimě rozmrazeno více inseminačních dávek současně, a než proběhne vlastní inseminace, dojde k ochlazení rozmražené pejetý.

Tab. 1: Dílčí selekční index pro reprodukci a plemenná hodnota býků (leden, 2011)

plemenná příslušnost	DSI-REP	RPH - vlastní plodnost býka	RPH - plodnost dcer
BÝK A C81A19	108	113	107
BÝK B C87A13	89	89	105
BÝK C C78A22	102	105	107
BÝK D C85A15	110	111	110
BÝK E C100	96	99	105

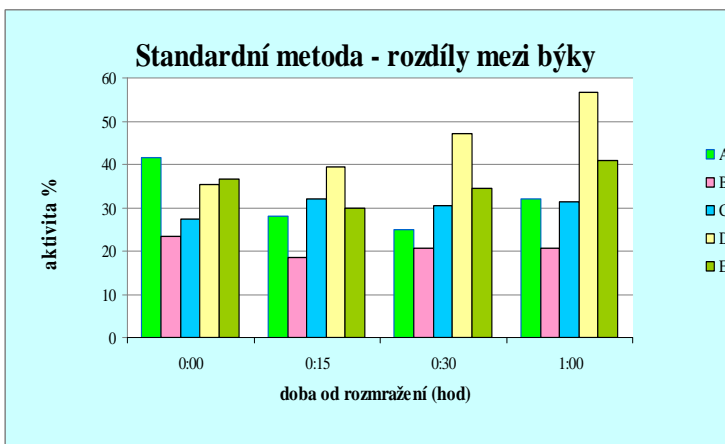
Aktivita spermií byla posuzována mikroskopicky při 200 – 300 násobném zvětšení s využitím výhledné destičky (teplota 39 °C ± 1 °C). Motilita byla hodnocena vždy ze 3 zorných polí a odhadem se stanovilo procentické zastoupení spermií pohybujících se přímočarým pohybem vpřed za hlavičkou. Posouzení bylo provedeno ve všech případech stejným pracovníkem. Aktivita byla hodnocena ve čtyřech časech, aby bylo zjištěno, jak dlouho po rozmražení bude zachována předepsaná minimální 30% aktivita spermií po rozmražení. První hodnocení proběhlo ihned po rozmražení dávky a zasunutí do katetru (čas t₀). Druhé hodnocení proběhlo po 15 minutách (čas

t_{15}). Třetí hodnocení proběhlo v čase 30 minut od rozmražení (čas t_{30}) a poslední hodnocení ejakulátu proběhlo po jedné hodině od rozmražení (čas t_{60}). Po dobu čekání na další hodnocení byly katetry s insemináčními dávkami odloženy v laboratoři při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přestože tato teplota neodpovídá standardnímu testování aktivity spermií, byla touto teplotou simulována situace, kdy technik ponechá ležet zavaděč s rozmraženou insemináční dávkou delší dobu ve stáji, kde se teplota prostředí pohybuje okolo $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dávky jednotlivých býků byly otestovány zvolenými způsoby přípravy insemináční dávky a jejich individuální výsledky vzájemně porovnány.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického balíku STATISTICA 9.0. s využitím jednofaktorové anovy. K určení průkazností mezi metodami byl použit Scheffeho test.

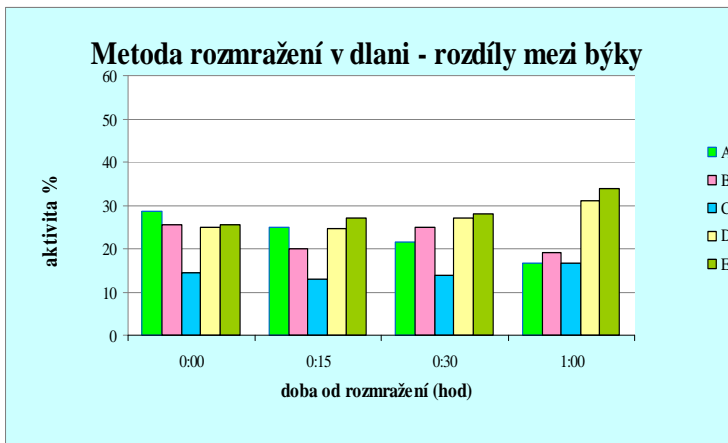
VÝSLEDKY A DISKUZE

Při použití standardní metody rozmražení pejetý byla v čase $t = 0$ zaznamenána nejvyšší aktivita u býka A $41,5\% \pm 13,8\%$. Nejnižší hodnotu vykazoval býk B $23,5\% \pm 6,3\%$. Po 15 min byla naměřena nejvyšší aktivita u býka D a to $39,5\% \pm 10,4\%$. Nejnižší aktivitu vykazovaly vzorky od býka B, a to v průměru $18,5\% \pm 5,8\%$. Stejně jako u předchozího měření byla i v čase $t = 30$ zaznamenána nejvyšší aktivita u býka D $47,0\% \pm 5,4\%$ a nejnižší u býka B $20,5\% \pm 7,2\%$. Po 1 hodině od rozmražení vzorků vykazoval nejvyšší motilitu opět býk D a to dokonce v průměru $56,5\% \pm 3,4\%$. Nejnižší hodnota byla naměřena u býka B $20,5\% \pm 6,4\%$. Z výsledků je patrné, že nejvyšší aktivitu u této metody přípravy insemináční dávky vykazoval býk D, a to ve všech měřených časech, nejnižší aktivita byla vyhodnocena u býka B. Změny aktivit u jednotlivých býků při použití standardní metody je graficky vyjádřeno v grafu 1.



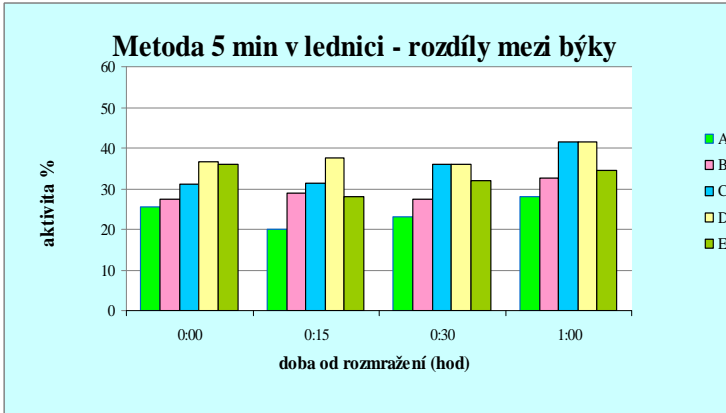
Graf.1: Rozdíly aktivit mezi jednotlivými býky u standardní metody rozmražení

Metoda rozmražení v dlani vykazala v čase $t = 0$ nejvyšší procento motilních spermií u býka A $28,5 \% \pm 11,3 \%$ a nejnižší hodnotu u býka C $14,5 \% \pm 4,4 \%$. Po 15 minutách se jako nejlepší ukázal vzorek spermatu od býka E $27,0 \% \pm 6,3 \%$. Nejhorší aktivita byla zaznamenána u býka C $13,0 \% \pm 4,2 \%$. V čase $t = 30$ min byl nejlepším býkem vyhodnocen býk E s průměrnou aktivitou $28,0 \% \pm 8,6 \%$. Nejhorší průměrné aktivity v čase $t = 30$ dosáhl býk C $14,0 \% \pm 4,6 \%$. Po hodinovém měření vykazoval nejlepší motilitu spermií býk E $34,0 \% \pm 6,1 \%$. Nejhorší pak byli býci C a A, kteří měli shodně v průměru $16,5 \% \pm 6,7 \%$. Z grafického vyjádření výsledků (Graf. 2) vyplývá, že nejhorší aktivitu spermií při metodě rozmražení v dlani vykazoval býk C, a to ve všech měřených časech. Nejlepšího výsledku u tohoto způsobu přípravy inseminační dávky dosáhl býk E.



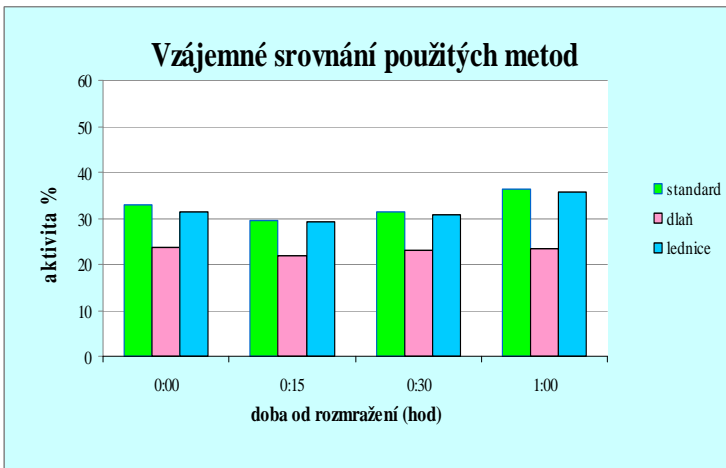
Graf. 2: Rozdíly aktivit mezi jednotlivými býky při použití metody rozmražení v dlani

Třetí metoda, která spočívala v uložení standardně rozmražené dávky na 5 min do chladničky o teplotě 0°C , zaznamenala nejlepší výsledky u býka D, který vykazal ve všech měřených časech nejvyšší průměrnou aktivitu, a to v čase $t = 0$ $36,5 \% \pm 4,1 \%$, v čase $t = 15$ min $37,5 \% \pm 5,9 \%$, v čase $t = 30$ min $36,0 \% \pm 5,2 \%$ a v čase $t = 60$ min průměrnou hodnotu $41,5 \% \pm 10,3 \%$. Naopak nejnižší motilitu vykazovaly ve všech měřeních vzorky býka A, a to v čase $t = 0$ $25,5 \% \pm 5,5 \%$, v čase $t = 15$ min $20,0 \% \pm 5,8 \%$, v čase $t = 30$ min hodnotu $23,0 \% \pm 6,7 \%$ a v čase $t = 60$ min průměrnou hodnotu $28,0 \% \pm 7,1 \%$. Grafické vyjádření výsledků je zaznamenáno v grafu 3.



Graf. 3: Rozdíly aktivit mezi jednotlivými býky při použití 5 min ponechání při 0 °C

Graf 4 znázorňuje rozdíly mezi všemi použitými metodami. Nejvíce chybnou metodou přípravy inseminační dávky se ukázala být metoda rozmražení pejetý teplem působícím v sevřené dlani, kde aktivita spermií po rozmražení nedosahovala ani požadované hranice 30 %. Výsledky standardního způsobu rozmražení inseminační dávky a výsledky metody 5 min uložení dávky do lednice jsou srovnatelné, avšak standardní metoda ji ve všech měřených časech mírně převyšuje.



Graf. 4: Srovnání rozdílných aktivit v závislosti na použité metodě

Výrazně rozdílných výsledků dosáhl MUIÑO et al. (2009), který ve svém experimentu použil sperma Asturiana de los Valles býků, které pak bylo inkubováno při teplotě 37 °C. Tyto vzorky následně analyzoval, v čase 0h a 2h, pomocí systému CASA. Zatímco u čerstvého ejakulátu dosahovala motilita v průměru 95 % ± 4,4 %, u rozmraženého poklesla na 78,8 % ± 16,7 % a po 2 hod inkubace se ještě dále snížila na 76,9 % ± 16,7 %. BALLESTER et al. (2007) se rovněž zabýval aktivitou spermií po rozmražení. Ve své práci používal sperma býků Swedish red. Pejety byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 35 °C po dobu 12 s. Sperma bylo analyzováno ihned po rozmražení a následně po 30 minutové inkubaci při 38 °C. BALLESTER et al. (2007) zjistil v čase $t = 0$ min hodnotu motilních spermií po rozmražení 49,5 % ± 13,9 %. Po 30 minutové inkubaci zaznamenali nárůst aktivních spermií na hodnotu 60,2 % ± 14,9 %. Experiment založený na různých způsobech rozmražení inseminační dávky provedl také CONTRI et al. (2010). Inseminační dávky býků Swiss Brown rozmrazoval standardní metodou rozmražení používanou v Itálii (10 min při 37 °C), dále použil k rozmražení dávky teplotu 37 °C po dobu 1 min, a jako třetí způsob rozmrazoval 5 sekund při teplotě 70 °C. Při standardní metodě rozmražení naměřil průměrnou hodnotu spermií s progresivním pohybem 48,1 % ± 7,6 %. U druhé metody zaznamenal hodnotu progresivního pohybu 45,0 % ± 5,0 %. U třetí metody zaznamenal hodnotu 45,5 % ± 8,1 %.

ZÁVĚR

Cílem tohoto experimentu bylo nejen porovnat motilitu ejakulátu po různých způsobech rozmražení, ale také vzájemně porovnat použité metody přípravy inseminační dávky a určit jejich použitelnost v praxi. Při srovnávání jednotlivých býků, kde byla zohledněna individualita zvířete vykázal nejlepší výsledky býk D, který se ukázal jako nejlepší ve 2 ze třech metod. Tento býk má také nejvyšší dílčí selekční index DSI-REP 110. U standardní metody byla zaznamenána nejnižší aktivita ve všech měřených časech u býka B, který v kontrole dědičnosti získal ze všech použitých býků nejnižší dílčí selekční index DSI-REP 89. Při použití rozmražení pejety v dlani byly nejlepší výsledky zaznamenány u býka E, který získal v kontrole dědičnosti DSI-REP 96. Velmi nízká aktivita byla zaznamenána u býka C, který získal DSI-REP 102. U metody 5 min ponechání pejet v lednici vykázal nejlepší výsledky opět býk D. Nejnižší aktivita byla zaznamenána u býka A, který získal v kontrole dědičnosti DSI-REP 108. Výsledky prokázaly vysoce statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými býky. Zjištěné výsledky také prokázaly vysoce statisticky průkazný rozdíl mezi metodou rozmražení v dlani a zbývajícími použitými metodami. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že k rozmrazování inseminačních dávek je vhodné použít pouze standardní předepsanou metodu přípravy inseminační dávky ve vodní lázni o teplotě 38 °C. Vzhledem k tomu, že 5 min ponechání dávek v chladu výrazně neovlivnilo aktivitu ve srovnání se standardní metodou a nebyl mezi výsledky těchto dvou metod prokázán statisticky průkazný rozdíl, je pravděpodobné, že by se dala pejeta použít po delší době od rozmražení i při nepříznivých klimatických podmínkách, se kterými se inseminátor může často setkat.

LITERATURA

BALLASTER, J. – JOHANNISSON, A. – SARAVIA, F. – HAARD, M. – GUSTAFSSON, H. – BAJRAMOVIC, D. – RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H, 2007: Post-thaw viability of bull AI –doses with low-sperm numbers. *Theriogenology* 68, 934 – 943.

CONTRI, A. – VALORZ, C. – FAUSTINI, M. – WEGHER, L. – CARLUCCIO, A, 2010: Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424 – 435.

GARNER, D.L, 1991: Artificial Insemination, s. 251-256, In: CUPPS, P.T. (ed.): *Reproduction in domestic animals*. Academia press, California, 669 s.

KLIMENT, J. – HINTNAUS, J. – NOVÁK, M. – ROB, O. – ŠŤASTNÝ, P, 1989: *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Príroda n.p. Bratislava, 2 vyd., 372 s.

LOUDA, F. – ČEŘOVSKÝ, J. – JEŽKOVÁ, A. – STÁDNÍK, L, 2001: *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Česká zemědělská univerzita, Praha, 1 vyd., 225 s.

MUIÑO, R. - PEÑA, A. – RODRÍGEUZ, A. – TAMARGO, C. – HIDALGO, C, 2009: Effect of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Austrian de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860 – 868.

PETELÍKOVÁ, J, 1998: Historický vývoj, současný stav a výsledky inseminace skotu v České republice, s.12-18. In: *50 let inseminace v ČR*, Českomoravská společnost chovatelů s.r.o, 94 s.

VĚŽNÍK, Z. – ŠVECOVÁ, D. – ZAJÍCOVÁ, A. – PŘINOSILOVÁ, P, 2004: *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 258 s.