

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra speciální zootechniky

Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného
ředidla ejakulátu

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři:

Ing. Jan Beran, Ph.D.
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová
Ing. Renata Toušová, CSc.

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení „S“ grantu
MŠMT a grantového úkolu MZe ČR, NAZV č. QJ1210109.

2014

Autorský kolektiv:
Ing. Jan Beran, Ph.D.
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová
Ing. Renata Toušová, CSc.

ČZU v Praze, FAPPZ, Katedra speciální zootechniky, Kamýcká 129, 165 21,
Praha 6 - Suchdol

Dedikace výsledků typu „N“ - Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za podpory „S“ grantu MŠMT a MZe ČR, NAZV č. QJ1210109.

Určení publikace:

Publikace je určena pracovníkům v oblasti chovu skotu. Mezi cílové skupiny lze zařadit chovatele, chovatelské svazy dojených plemen, řídicí pracovníky a poradce v oblasti chovu a šlechtění skotu.

Uplatněná certifikovaná metodika byla Ministerstvem zemědělství schválena dne 30.12.2014, pod č. 17210/2014-7.

Oponenti:

prof. Ing. Gustav Chládek, CSc.

Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Ing. Pavel Hakl

MZe, odbor živočišných komodit – 17210, Těšnov 17, 117 05 Praha 1

ISBN 978-80-213-2537-1

Obsah

I. CÍL METODIKY	4
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
1 ÚVOD	5
2 ZPRACOVÁNÍ SPERMATU	5
2.1 Ředění spermatu	6
2.1.1 Složení ředidel	6
2.1.2 Žloutková ředidla	10
2.1.3 Bezžloutková ředidla	10
2.1.4 Příklady komerčně dostupných ředidel	10
2.1.5 Porovnání kvality žloutkových a bezžloutkových ředidel	11
3 HODNOCENÍ EJAKULÁTU	13
3.1 Testy přežitelnosti spermatu	13
4 VLASTNÍ VÝSLEDKY	14
4.1 Metodické postupy	14
4.1.1 Odběr a zpracování spermatu	14
4.1.2 Hodnocení rozmrazeného spermatu	15
4.1.3 Statistické zpracování výsledků	15
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	17
5.1 Vliv býka na sledované ukazatele kvality	17
5.2 Vliv použitého ředidla na sledované ukazatele kvality	18
6 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI	19
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	20
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	20
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	21
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	28
VIII. DEDIKACE	29

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je podat systémově utříděný a ověřený přehled informací o používaných ředidlech spermatu býků. Metodika má přispět ke zlepšení kvality inseminačních dávek býků cestou optimalizace postupů zpracování ejakulátu býků, zejména výběrem vhodného ředidla.

Inseminace otevřela cestu k realizaci zásadních změn šlechtitelských postupů a iniciovala rozvoj dalších biotechnologických metod, jako například systémy řízení říjového cyklu (Stádník *et al.*, 2008), nové postupy mrazení ejakulátu (Arav *et al.*, 2002), sexaci spermií (DeJarnette, 2010), odběr, mrazení, kultivaci a přenos embryí (Říha *et al.*, 1998) nebo klonování (Liu *et al.*, 2010).

Inseminace je atraktivní odvětví zemědělství, ve kterém panuje značná konkurence. Fungují zde základní principy trhu, kdy je při velké nabídce zvyšován tlak na snižování cen. Pro producenty to znamená především hledání cest, jak snížit výrobní náklady. Mezi významné aspekty výroby patří „úspěšnost mrazení“. Na tu má vliv složení ředidel. Producent inseminačních dávek by měl vybrat takové ředidlo, ve kterém je vysoká úspěšnost mrazitelnosti a které je cenově dostupné. V současnosti využívají výrobci komerční ředidla, jejichž výhodou je zejména jednoduchost přípravy, stabilní složení, či nižší rizika bakteriální kontaminace. V souvislosti s tlakem na snižování rizik přenosu infekcí se také odstupuje od využívání živočišných produktů (vaječný žloutek, mléko) při přípravě ředidel. Ty jsou v moderních typech ředidel nahrazovány sójovým lecitinem.

V řadě vědeckých prací se setkáváme s rozdílnými výsledky úspěšnosti kryokonzervace při využití různých ředidel. Toto je způsobeno zejména individuálním složením semenné plasmy býků. Pro producenty je tedy důležité vědět jak rychle, levně a nenáročně vybrat vhodné ředidlo pro daného býka, jehož sperma vykazuje horší mrazitelnost v běžně využívaném ředidle.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 ÚVOD

Cesta od odebraného spermatu k inseminační dávce je dlouhá, přičemž každý úsek této cesty je velice důležitý a ovlivňuje kvalitu a přežitelnost spermií v dávce. Zájmem inseminační stanice je stále udržovat tu nejvyšší kvalitu spermatu.

Velmi záleží na samotném odchovu a chovu plemeníka, na technice krmení a krmné dávce. Kvalita spermatu může být ohrožena některými předkládanými krmivy, zvláště fermentovanými.

Další potencionální riziko představuje odběr spermatu a jeho následné zpracování. Nesmí dojít k chladovému šoku, musí se postupovat velmi rychle, zato pečlivě a přesně. Po makroskopickém a mikroskopickém zhodnocení odebraného ejakulátu následuje jeho dlouhodobá konzervace – ředění a zmrazování. A právě tyto dvě poslední fáze výroby inseminační dávky mají rozhodující vliv na oplozovací schopnost a přežitelnost spermií v dávce. Nezvládnutí těchto procesů má fatální následky. U nově nakoupených licencovaných býků zařazených do inseminace je nutné před zahájením výroby inseminačních dávek odzkoušet a vybrat nejvhodnější ředidlo pro daného býka.

2 ZPRACOVÁNÍ SPERMATU

Úspěšnost kryokonzervace závisí na udržení oplozovací schopnosti spermií, které si musí zachovat celistvost a funkčnost mnoha buněčných struktur. V průběhu zpracování spermatu jsou spermie vystaveny mnoha nefyziologickým změnám: v teplotě, hodnotách pH, parciálním tlaku kyslíku a oxidu uhličitého, světla a pravděpodobně i záření v neviditelném spektru, a samozřejmě i absenci samičích genitálních sekretů, se kterými se sperma mísí po ejakulaci (Mann and Lutwak-Mann, 1981). Úspěšnost kryokonzervace spermatu závisí na mnoha faktorech, včetně interakcí mezi kryoprotektivy, typu ředidla, rychlosti mrazení, rychlosti rozmrazení, balení a individualitě dárce (Cooter *et al.*, 2005; Andrabi, 2007; Clulow *et al.*, 2008).

Během zpracování spermatu může nastat několik škodlivých momentů: změny teploty, osmotický a toxický stres vyvolaný kryoprotektanty, tvorba a rozpouštění ledových krystalů. Překážkou v kryokonzervaci spermatu je výskyt letálních a subletálních poškození struktur

spermii, což způsobuje špatnou plodnost. Biochemické a anatomické vlastnosti spermii můžou být během zmrazování pozměněny. V důsledku toho se neustále zkoumá nejvhodnější použití ředidla, které ochrání spermie *in vivo*. Aby byla kryokonzervace úspěšná, musí se pomocí ředidla vytvořit optimální podmínky pro zmrazení spermii a zároveň díky vhodnému mediu se tak zvýší i objem odebraného ejakulátu, množství inseminačních dávek a ekonomika podniku (Louda *et al.*, 2001).

2.1 Ředění spermatu

Ředění ejakulátu je proces vedoucí ke zvýšení jeho objemu. Ředěním se vytváří podmínky pro přežívání spermii mimo organismus. Životními projevy – dýcháním spermii – vznikají v ejakulátu produkty látkové výměny, kyselina mléčná. Ta postupně okyseluje prostředí, zpomaluje pohyb spermii, navozuje anabiózu a jejich odumření (Mutalík *et al.*, 2014).

Proces ředění musí být zahájen do 15 minut po odběru. Ředění předchází makroskopické a mikroskopické zhodnocení ejakulátu. Teplota ředidla i ředěného ejakulátu musí být stejná ($\pm 1^\circ\text{C}$), aby se zabránilo chladovému šoku. Ředidlo se vždy přidává do ejakulátu určeného k ředění postupně, za neustálého míchání. Používané ředidlo musí být sterilní a předeštěté (Ball and Peters, 2004).

2.1.1 Složení ředidel

Správné ředidlo má mít tyto vlastnosti: musí být zdrojem energie pro spermie, musí mít dobrou pufrovací schopnost, musí obsahovat malé množství elektrolytu, musí zajistit požadovaný osmotický tlak, musí udržovat stálou hladinu pH odpovídající požadavkům býčího ejakulátu, nesmí být toxické pro spermie, musí být sterilní a musí být ekonomicky dostupné (Louda *et al.*, 2001).

Složení ředidel významně ovlivňuje životaschopnost a oplozovací schopnost spermii v inseminační dávce (Siddique *et al.*, 2006). Mezi základní stavební kameny správného ředidla patří:

Bi-destilovaná voda

V ředidle plní funkci nosiče ostatních látek v něm obsažených.

Kryoprotektiva

V ředidle chrání buňky před jejich prasknutím a zabitím ledovými krystaly, vznikajícími během procesu zmrazování a též chrání buňky před chladovým šokem, zvyšují jejich odolnost (Ball and Peters, 2004). Kryoprotektivní látky můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky penetrující do spermie skrz cytoplasmatickou membránu, tedy působící intracelulárně i extracelulárně. Penetrující látky mohou mít toxický vliv na spermie, a to destabilizací membrán a denaturací proteinů a enzymů. Tyto negativní vlivy přímo souvisí s jejich koncentrací a dobou expozice (Swain and Smith, 2010, Rosato and Iafaldano, 2013). Druhou skupinou jsou látky nepenetrující do spermie, které působí pouze extracelulárně. Jde zejména o bílkoviny, aminokyseliny a cukry, které se chovají jako osmoprotektanty a které mohou mírnit poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty. Tyto substance jsou méně toxické než penetrující kryoprotektanty, inhibují růst ledu a pomáhají spermii stabilizovat vnitřní prostředí při osmotickém stresu, čímž redukuje množství potřebných penetrujících kryoprotektantů (Swain and Smith, 2010).

Penetrující kryoprotektanty zvyšují tekutost membrán pomocí přeuspořádání membránových lipidů a bílkovin, které se projevuje větší dehydratací při nižších teplotách a sníženou formací ledu uvnitř buněk (Holt, 2000). Mezi nejpoužívanější penetrující kryoprotektanty při konzervaci spermatu býků patří glycerol a vaječný žloutek (Ball and Peters, 2004).

Glycerol chrání spermie před mechanickým poškozením během mrazení (De Leeuw *et al.*, 1993) a snižuje bod mrznutí intracelulární i extracelulární tekutiny na hodnoty pod bodem mrazu vody a omezuje tak vliv nízké teploty na koncentraci roztoků a rozdíly osmotických tlaků (Amann *et Picket*, 1987). Optimální koncentrace glycerolu je ovlivněna ostatními komponenty ředidla (Woelders *et al.*, 1997). Pokud je použit ve vysokých koncentracích, tak může způsobovat závažná osmotická poškození, protože překonává membrány spermii mnohem pomaleji, než jiné kryoprotektanty (Guthrie, 2002).

Vaječný žloutek zlepšuje funkce spermii a udržuje jejich oplozovací schopnost (Barak *et al.*, 1992). Aktivními frakcemi vaječného žloutku, které poskytují spermii ochranu při chlazení a mrazení jsou fosfolipidy a low-density lipoprotein (LDL), které se během chlazení spermatu dostávají do membrán (Medeiros, 2002). Naopak high-density-lipoprotein (HDL), obsažený ve žloutku, způsobuje vyloučení cholesterolu z plazmatických membrán spermie, což má za následek změnu tekutosti membrán, díky které se zvyšuje citlivost k chladovému

šoku (Amirat *et al.*, 2005) a urychluje se kapacitace spermií a zároveň spouští akrozomová reakce (Anton *et al.*, 2003). Má tedy opačné účinky než LDL (Bergeron *et al.*, 2004).

Nepenetrující kryoprotektanty (osmoprotektanty) se vyznačují nižší molekulární hmotností, hydrofilií a nulovou toxicitou. Pomáhají buňkám stabilizovat koncentraci vnitřních roztoků při osmotickém stresu (Cleland *et al.*, 2004). Díky své neschopnosti překonat plasmatickou membránu vytvářejí osmotický tlak, který snižuje bod mrazu média a tím i tvorbu extracelulárního ledu (Aisen *et al.*, 2002), čímž poskytují buňkám ochranu. Do této skupiny řadíme zejména bovinní sérový albumin (BSA), trehalózu a sacharózu (De Leeuw *et al.*, 1993).

Pufry

Kyselina mléčná je konečným produktem metabolismu spermií. Může způsobit snížení hladiny pH. Pufry, přidané do ředidla, jako například citrát sodný, fosfát a TRIS mají za cíl udržovat hladinu pH v rozmezí 6,4 – 6,8 a zabránit aglutinaci spermií (Ball and Peters, 2004). Vlivem pufrů na mrazitelnost spermií se zabývali např. Siddique *et al.* (2006). K ředění ejakulátu použili ředidla o různé koncentraci TRIS, citrátu sodného, kyseliny citrónové, fruktosy, glukosy, laktosy, vaječného žloutku, glycerolu a antibiotik (penicilinu a dihydroxystreptomycinu). Došli k závěru, že nejvhodnějším ředidlem ke kryokonzervaci bylo takové, které obsahovalo TRIS a citrát sodný v poměru 1 : 1.

Jednoduché cukry

Spermatické buňky potřebují energii, pokud mají přežít v *in vitro* podmínkách. Za tímto účelem se do ředidel přidávají jednoduché cukry, jako například fruktosa, laktosa nebo kyselina citrónová (Amirat *et al.*, 2005). Přítomnost cukrů pravděpodobně také zvyšuje odolnost membrán k rychlým fyzikálním a morfologickým změnám, které nastávají při rychlém vyloučení vody ze spermií. Má se za to, že je to dáno vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami cukrů a polárními konci fosfolipidů, takže nahrazují molekuly vody při dehydrataci spermií. Cukry rovněž mohou pomáhat při prevenci poškození spermií zachytáváním solí do viskózních a až téměř sklovitých fází (Woelders *et al.*, 1997).

Akhter *et al.* (2014) zjišťovali vliv přídavku fruktosy do ředidel na zabřezávání. Byla použita ředidla na bázi sušeného mléka s přídavkem fruktosy a bez přídavku. Podíl zabřezlých krav po inseminaci byl vyšší u dávek s přídavkem fruktosy.

Antibiotika

Přidání antibiotik do ředidel má za cíl chránit ejakulát před bakteriálními nebo virovými infekcemi. Například virus způsobující Bluetongue může být přenášen semenem během inseminace (Ball and Peters, 2004). Každé ředidlo má odlišný obsah antibiotik v různém poměru. AndroMed[®] a Triladyl[®] např. obsahují Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin a Lincomycin (Bousseau *et al.*, 1998). Antibiotika obsažená v ředidle nemají vliv na aktivitu spermií po rozmrazení (Ennem, 1976).

Na druhou stranu, některé studie prokázaly, že je možné odstranit bakterie ze semene fyzicky, bez nutnosti přidání antibiotik (Morrell *et al.*, 2014) metodou SLC (Single Layer Centrifugation) pomocí druhově specifického koloidu (Morrell and Wallgren, 2011). Bylo prokázáno zlepšení kvality spermií touto metodou u různých druhů zvířat, např. u hřebců, kanců, býků, psů... (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2009).

Aminokyseliny

Aminokyseliny hrají při kryokonzervaci důležitou roli díky svým antioxidačním vlastnostem. Literatura uvádí, že přídavek cysteinu do ředidel zlepšil motilitu a životaschopnost rozmrazených spermií (Sariozkan *et al.*, 2009; Tuncer *et al.*, 2010). Glutamin může vyvolat expresi HSP proteinů v *in vivo* i v *in vitro* prostředí. Přídavek glutaminu do ředidel můžeme využít jako kryoprotektiva pro zlepšení kvality rozmrazených spermií (Yamada *et al.*, 2011). Studie prokázaly, že přídavek glutaminu do ředidla před mrazením měl za následek vysokou kvalitu spermií po mrazení (Bucak *et al.*, 2009; Tuncer *et al.*, 2011). Studie Topraggaleh *et al.* (2014) prokázala, že přídavek 7,5 mmol cysteinu a 15 mmol glutaminu výrazně zvýšil motilitu spermií a integritu membrán po rozmrazení spermií.

Mastné kyseliny

Vzhledem k tomu, že kryokonzervace spermatu snižuje množství lipidů a fosfolipidů v ejakulátu, lze předpokládat, že přídavek mastných kyselin může zlepšit kvalitu ejakulátu po rozmrazení. Ejaz *et al.* (2014) zkoumali vliv přídavku kyseliny arachidonové do ředidla. V experimentu byly porovnávány dvě skupiny ředidel: s obsahem vaječného žloutku (5, 10 a 20 ng/ml) a s obsahem kyseliny arachidonové (5, 10 a 20 ng/ml). Vzorky s přídavkem kyseliny arachidonové vykazovaly po rozmrazení lepší motilitu, integritu akrozómu i větší podíl živých spermií. Závěrem konstatovali, že nejlepší výsledky byly pozorovány při přidání kyseliny arachidonové v množství 5 a 20 ng/ml.

2.1.2 Žloutková ředidla

Vaječný žloutek je základní komponentou ředidel spermatu býků od roku 1939, kdy byly objeveny jeho příznivé účinky na ochranu semene vůči chladovému šoku a na ochranu membrán během mrazení a rozmrazení (Amirat *et al.*, 2004). Literatura uvádí, že pro kryokonzervaci býčího ejakulátu se doporučuje koncentrace vaječného žloutku do 20% (Sansone *et al.*, 2000), ve větších koncentracích se potom stává pro spermie toxickým (Vishvanath and Shannon, 2000). Další nevýhodou žloutku je jeho nekonzistentní složení a granulata, která ztěžují stanovení aktivity spermií (Ansari *et al.*, 2010). V některých zemích je ovšem jeho použití úplně zakázáno. Hledají se proto nové vhodné látky, které by ho mohly nahradit, například lecitin, obsažený v sójovém extraktu (Bousseau *et al.*, 1998).

2.1.3 Bezžloutková ředidla

Bezžloutková ředidla na bázi kombinace lecitinu a glycerolu neobsahují živočišné proteiny. Jejich použitím se snižuje riziko přenosu patogenů a virů při udržení stejné oplozovací schopnosti spermií (Bosseau *et al.*, 1998; Thun *et al.*, 2002). Nehring *et al.* (2005) zjistili, že bezžloutková ředidla Bioxcell[®] a AndroMed[®] mohou být vhodnou náhradou za běžná media na bázi žloutku, jako je např. Triladyl[®].

2.1.4 Příklady komerčně dostupných ředidel

1) ředidla s přídavkem čerstvého žloutku:

Triladyl[®], Biladyl[®] (Minitübe, Tiefenbach, Německo),

BullXcell[®] (IMV Technologies, L'Eigle, Francie),

BoviPRO[®] (Minitube of America),

2) ředidla s obsahem komerčně přidaného (ionizovaného) žloutku:

Steridyl[®] (Minitübe, Tiefenbach, Německo),

Optidyl[®] (Biovet, Fleurance, Francie),

3) bezžloutková ředidla:

(a) na bázi sójového lecitinu:

AndroMed[®] (Minitübe, Tiefenbach, Německo),

BioXcell[®] (IMV Technologies, L'Eigle, Francie),

b) na bázi liposomu:

OptiXcell[®] (IMV Technologies, L'Eigle, Francie).

2.1.5 Porovnání kvality žloutkových a bezžloutkových ředidel

Bylo publikováno mnoho různých studií, které se zabývaly porovnáním různých typů ředidel. Níže uvádíme jejich stručný přehled.

Jannet *et al.* (2005) srovnávali tři různá komerčně vyráběná ředidla (AndroMed[®], Bioxcell[®] a Triladyl[®]) a sledovali jejich vliv na kvalitu mrazeného býčího spermatu. Dosáhli následujících výsledků: pohyblivost zmrazených a rozmrazených spermií byla v AndroMedu[®] ($67,7 \pm 1,9\%$) signifikantně ($p < 0,05$) vyšší, než v Bioxcellu[®] ($60,9 \pm 1,9\%$) a Triladylu[®] ($52,4 \pm 1,9\%$). Na základě těchto výsledků dospěli k závěru, že AndroMed[®] je nejvhodnější ke kryokonzervaci býčího spermatu.

Cílem studie, kterou publikovali Amirat *et al.* (2004), bylo zhodnotit vliv LDL na konzervaci býčího spermatu. Aktivita spermií, konzervovaná v LDL, byla srovnávána s ejakulátem konzervovaným v Optidylu[®], komerčně vyráběném ředidle. Aktivita spermií po rozmrazení byla dvakrát vyšší u LDL než v Optidylu[®]: 54,4 % oproti 30,2% ($p < 0,05$). Dospěli tedy k závěru, že LDL konzervuje býčí semeno kvalitně, vyrobené inseminační dávky mají dobrou oplozovací schopnost a spermie mají lepší aktivitu po rozmrazení.

V roce 2005, Amirat *et al.* (2005) opět porovnávali LDL, tentokrát s jinými ředidly: s Triladylem[®] a Biociphosem-Plus[®]. Aktivita spermií po rozmrazení byla dvakrát vyšší ($P < 0,05$) v Biociphosu-Plus[®] (64%) a LDL (61%) než v Triladylu[®] (32%). Na základě všech dosažených výsledků opět konstatovali, že ředidlo na bázi LDL nejlépe chrání dlouhodobě konzervované, zmrazené spermie.

Muino *et al.* (2007) zjišťovali vhodnost použití dvou bezžloutkových komerčních ředidel (AndroMed[®] a Biociphos-Plus[®]) ve srovnání se žloutkovým ředidlem (Biladyl[®]). Dále byl sledován vliv ředidla, býka, opakování a interakce mezi nimi na životaschopnost spermií a neporušenost akrozómu. Semeno ředěné Biladylem[®] vykazovalo lepší ($P < 0,001$) přežitelnost spermií (47,9%) než semeno mrazené AndroMedem[®] (38,5%) nebo Biociphosem-Plus[®]

(34,9 %). Vliv býka a opakování měly významný vliv na životaschopnost spermií a neporušenost akrozómu, ale interakce mezi býkem a ředidlem a opakováním a ředidlem nebyly významné.

Stradaioli *et al.* (2007) porovnávali žloutkové, tris-citrátové a komerční, bezžloutkové ředidlo (Bioxcell®). Hodnotili pohyblivost, schopnost kapacitace a schopnost prodělat akrozomální reakci spermií býka po mrazení a rozmrazení. Bioxcell® dosáhl ve všech sledovaných ukazatelích signifikantně ($P < 0,05$) lepších výsledků. Bioxcell® použili ve svém pokusu také Celeghini *et al.* (2008). Srovnávali jej s ředidlem Botu-Bov®. Studovali vliv kryokonzervace na pohyblivost spermií a mitochondriální funkce, na integritu plasmatické membrány a chromatinu. Pohyblivost byla hodnocena subjektivně a zároveň spermo-analyzátozem. Dospěli k závěru, že kryokonzervace snižuje pohyblivost, poškozuje plasmatickou membránu a akrozóm, stejně tak snižuje funkci mitochondrií. Ředidlo Botu-Bov® bylo efektivnější v zachování pohyblivosti spermií a integrity membrán než Bioxcell®. Nepotvrdili se tak závěry Stradaioli *et al.* (2007).

Hinsch *et al.* (1997) studovali vliv dvou různých kryoprotektantů na funkce spermií. Ejakuláty byly mrazeny za přítomnosti buď ředidla na bázi sójového extraktu (Biociphos-Plus®) a nebo kryoprotektantu obsahujícího vaječný žloutek (Triladyl®). Byla sledována integrita akrozómu, životaschopnost buněk a pohyblivost spermií po rozmrazení. Výsledky mezi těmito dvěma ředidly se statisticky nelišily. Stejná kryoprotektiva použili ve svém pokusu také Gil *et al.* (2000). Porovnávali oplozovací schopnost a životaschopnost spermií býků po naředění ejakulátů opět Triladylem® a Biociphosem-Plus®. V oplozovací schopnosti nebyl mezi oběma ředidly nalezen statisticky významný rozdíl ($69,1 \pm 0,8$ versus $69,2 \pm 0,8$). Pohyblivost spermií po rozmrazení byla vyšší při použití Biociphosu-Plus®. Z výsledků plyne, že v Biociphosu-Plus® si spermie lépe zachovají pohyblivost než v Triladylu®.

Bousseau *et al.* (1998) také srovnávali Biociphos-Plus® s jiným komerčním ředidlem, tentokrát na bázi vaječného žloutku a mléka, (Laiciphos®). Ředidla byla porovnávána na základě výsledků *in vitro* a *in vivo* oplození spermatem býka, naředěným výše zmíněnými ředidly. Nebyly mezi nimi nalezeny statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$). Biociphos-Plus® použili také Thun *et al.* (2002). Srovnávali jej s blíže nespecifikovaným TRIS-žloutko-citrátovým ředidlem. Opět mezi oběma ředidly nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. Podobný pokus provedli také van Wagendonk-De Leeuw *et al.* (2000). Hodnotili oplozovací schopnost býčího spermatu konzervovaného třemi různými ředidly: 1) TRIS-Standard, připraven v laboratoři, obsahující 20 % pasterovaného vaječného žloutku, 2) TRIS-Koncentrát,

obsahující 20 % vaječného žloutku a v poměru 1 : 5 nepyrogenickou vodu a 3) Biociphos-Plus[®] obsahující sójový extrakt. Byly shledány nesignifikantní rozdíly mezi TRIS-Standard a TRIS-Koncentrát (P=0,54) zatímco u Biociphosu-Plus[®] byl test nepřeběhlých signifikantně nižší než u obou porovnávaných ředidel (P < 0,05).

3 HODNOCENÍ EJAKULÁTU

Konvenční postup hodnocení ejakulátu, prováděný před a po kryokonzervaci, zahrnuje stanovení koncentrace spermií, pohyblivosti a morfologie. Tyto parametry většinou odhalí zřejmé případy snížené plodnosti nebo neplodnosti býků (Rodriguez-Martinez, 1998).

Z biologického hlediska, pouze plně životaschopná spermie je potencionálně schopná oplození, proto většina doposud užívaných metod byla založena na posuzování životaschopnosti spermií (Věžník *et al.*, 2004).

3.1 Testy přežitelnosti spermatu

Nejvhodnější ředidlo lze vybrat na základě výsledků biologických zkoušek ejakulátu. Mezi výsledky těchto testů a skutečnou plodností byly zjištěny vysoké korelace (Louda *et al.*, 2001).

Řadíme mezi ně zejména – dlouhodobý chladový a krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií, test na odolnost vůči chladovému šoku a stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením a HOS (Hypo Osmotic Swelling) test (Věžník *et al.*, 2004; Hoflack *et al.*, 2006; Gillan *et al.*, 2008; Sutkeviciene *et al.*, 2009).

4 VLASTNÍ VÝSLEDKY

4.1 Metodické postupy

4.1.1 Odběr a zpracování spermatu

Do pokusu byla vybrána skupina 4 býků holštýnského plemene s rozdílnou plemennou hodnotou pro plodnost, chovaných na 1 inseminační stanici se stejnou frekvencí odběru jednou týdně. Býkům byla podávána stejná krmná dávka: seno (10 kg), sláma (5 kg), sójový šrot (0,5 kg), směs obilných šrotů: 1/3 ovesného, 1/3 pšeničného a 1/3 ječného šrotu, v celkové dávce 3 kg a směs minerálií Premin 22 Natural od firmy VVS Verměřovice s. r. o. Tento minerální doplněk obsahuje: 25% žitných otrub, 25 % KH_2PO_4 , 19% CaCO_3 , 13% NaCl , 9% MgO , 4% řepné melasy a ostatní minerály (obsah na 1 kilogram krmné směsi): Ca (11,4%), P (6%), Na (5%), Mg (5,2%), Vitamín A (1250000 i.u.), Vitamín D3 (250000 i.u.), Vitamín E (5000 mg), Vitamín B1 (61 mg), FeCO_3 (8200 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (600 mg), MnO (3000 mg), ZnO (5500 mg), $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ (45 mg), $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (45 mg), Na_2SeO_3 (36,5 mg), Niacin (825 mg), Beta karoten (800 mg).

Od každého býka bylo získáno 20 ejakulátů, splňujících vstupní požadavky k následné konzervaci, standardním postupem do umělé vagíny (Louda *et al.*, 2007) v období od října do dubna následujícího roku. Vstupní hodnocení bylo prováděno školeným personálem laboratoře inseminační stanice dle standardní metodiky (Věžník *et al.*, 2004): ejakulát byl nejprve zhodnocen senzoricky na přítomnost nežádoucích přímísenin a zápachů. Dále byla na fotometru (Genesys 10vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, USA) změřena hustota ejakulátu, zvážením na digitální automatické váze (Scout Pro, OHAUS[®], Parsippany, NJ, USA) bylo stanoveno jeho množství a aktivita byla hodnocena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon[®] Eclipse E200, Tokio, Japonsko) subjektivní metodou. K dalšímu zpracování bylo použito pouze sperma o hustotě minimálně $0,7 \times 10^6$ v mm^3 , s minimální aktivitou 70% (přímočarý pohyb za hlavičkou, odpovídající rychlosti).

Pozitivně hodnocené ejakuláty byly rozděleny na čtyři rovnoměrné díly pomocí sterilní pipety do sterilních na 38°C předehřátých zkumavek. Každý díl byl naředěn jedním z ředidel připravených dle návodu výrobce a předehřátých na 38°C . Byla porovnávána komerční a běžně dostupná ředidla – AndroMed[®], Bioxcell[®], Optidyl[®] a Triladyl[®]. Dané

množství ředidla bylo aplikováno sterilní injekční stříkačkou přímo do zkumavky se vzorkem. Poté byly zkumavky uzavřeny sterilní zátkou.

Následovala standardní výroba: naředěný ejakulát byl po 10 minutovém promíchání naplněn do pejet o objemu 0,25 ml; zchlazen na teplotu 4 °C a ekvilibrován po dobu 90 minut před mrazením. Poté byl zamrazen metodou postupného zmrazování na teplotu -105 °C v automatickém mrazícím boxu od firmy IMV Technologies, L'Eigle, Francie; a uložen v tekutém dusíku při -196 °C.

4.1.2 Hodnocení rozmrazeného spermatu

In vitro parametry ejakulátu byly hodnoceny po rozmrazení 2 inseminačních dávek z každé varianty. Celkem bylo hodnoceno 640 dávek (4 býci, 20 vzorků ejakulátů od každého býka, 4 ředidla), tedy 160 dávek od každého býka a ředidla.

Inseminační dávky byly hodnoceny pomocí krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií. Touto jednoduchou, běžně využívanou metodou se hodnotí pokles aktivity spermií v čase. Pejety byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 45 sec. a vloženy do sterilních zkumavek s fyziologickým roztokem (0,9% NaCl, pH 6,7 – 6,85) předeřhřátým na 38 ± 1 °C. Motilita spermií byla hodnocena subjektivně pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 10x v 30 minutových intervalech, počínaje časem 0 a konče časem dvě hodiny. Byl hodnocen rychlý, přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou.

4.1.3 Statistické zpracování výsledků

Veškeré údaje byly zaznamenávány do programu Excel. Takto byly připraveny pro statistické hodnocení. Vyhodnocení probíhalo v programu SAS[®] (Verze 9.1; SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA), kde bylo použito obecného lineárního modelu a metody nejmenších čtverců. Byla použita následující modelová rovnice:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk} naměřená hodnota závisle proměnné (aktivita spermií v čase 0, 30, 60, 90 a 120 min. v procentech),

μ obecný průměr znaku,

A_i vliv fixního efektu i-tého plemenného býka (i = býk 1, n = 160; býk 2, n = 160; býk 3, n = 160; býk 4, n = 160),

B_j vliv fixního efektu j-tého ředidla (j = 1 – AndroMed[®], n = 160; 2 – Bioxcell[®], n = 160; 3 – Triladyl[®], n = 160; 4 – Optidyl[®], n = 160),

e_{ijk} residuální chyba.

Rozdíly ve sledovaných ukazatelích v závislosti na zvolených faktorech byly hodnoceny na hladině statistické průkaznosti:

$P < 0,05$ * statisticky významný rozdíl – 95 %

$P < 0,01$ ** statisticky středně významný rozdíl – 99 %

$P < 0,001$ *** statisticky vysoce významný rozdíl – 99,9 %

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Vztahy mezi sledovanými faktory (býk, ředidlo) a jednotlivými ukazateli (výsledky krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií) byly determinovány dle výše uvedené modelové rovnice. V Tabulce 1 jsou uvedeny průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů modelu na sledované ukazatele. Z této tabulky vyplývá, že vliv býka na sledované ukazatele kvality byl vysoce statisticky významný ($P < 0,001$). Vliv použitého ředidla byl statisticky středně významný ($P < 0,01$) na aktivitu spermií po rozmrazení (AKT 0) a po 30 minutách trvání termodynamického testu přežitelnosti spermií a statisticky významný ($P < 0,05$) na aktivitu spermií po rozmrazení po 60 min. testu (AKT 60). V ostatních ukazatelích byl vliv ředidla neprůkazný.

Tabulka 1 – Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu

ZNAK	MODEL		BÝK		ŘEDIDLO	
	r^2	P	F-test	P	F-test	P
AKT 0	0,09	< 0,001	6,76	0,0002	5,14	0,002
AKT 30	0,10	< 0,001	8,56	< 0,001	5,26	0,001
AKT 60	0,11	< 0,001	14,33	< 0,001	2,79	0,040
AKT 90	0,13	< 0,001	22,03	< 0,001	1,27	0,285
AKT 120	0,14	< 0,001	24,84	< 0,001	1,15	0,329

Vysvětlivky: Býk = vliv plemenného býka; Ředidlo = vliv použitého ředidla; AKT0 = aktivita spermií po rozmrazení; AKT30–120 = aktivita spermií po 30, 60, 90, a 120 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

5.1 Vliv býka na sledované ukazatele kvality

V Tabulce 2 jsou uvedeny výsledky termodynamického testu přežitelnosti spermií podle jednotlivých býků, v čase 0, 30 min., 60 min., 90 min. a 120 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

Výchozí aktivita na počátku testu (AKT 0) byla nejvyšší u býka č.1 (54,45%). Nejnižší hodnota byla naměřena u býka č. 4 (45,22%). S rostoucím časem (AKT 0 – 120) klesaly pro jednotlivé býky hodnoty aktivity spermií. Mezi býkem č. 1 a býky č. 2 a č. 3 byl zjištěn statisticky středně významný rozdíl ($P < 0,01$) ve všech časech (AKT 0 – 120). Průkazně ($P < 0,01$) nejhorší hodnoty přežitelnosti spermií přitom vykazoval býk č. 3 a to ve všech časech (41,11%, 34,15%, 25,29%, 18,65%; AKT 30 – 120).

Tabulka 2 – Vliv býka na sledované ukazatele kvality

BÝK	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
1	54,45 ± 1,91 ^{A,a}	50,83 ± 1,88 ^{A,a}	46,44 ± 1,83 ^A	39,94 ± 1,77 ^A	34,44 ± 1,81 ^A
2	47,09 ± 1,79 ^B	42,77 ± 1,775 ^B	36,69 ± 1,72 ^B	27,82 ± 1,65 ^B	20,76 ± 1,70 ^B
3	45,99 ± 1,80 ^B	41,11 ± 1,77 ^B	34,15 ± 1,72 ^B	25,29 ± 1,65 ^B	18,65 ± 1,70 ^B
4	45,22 ± 2,00 ^b	42,29 ± 1,97 ^b	34,86 ± 1,92 ^B	28,14 ± 1,84 ^B	21,27 ± 1,90 ^B

Vysvětlivky: Býk = vliv plemenného býka (1 – 4); AKT0 = aktivita spermií po rozmrazení v procentech; AKT30–120 = aktivita spermií po 30, 60, 90, a 120 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v procentech.

5.2 Vliv použitého ředidla na sledované ukazatele kvality

Vliv použitého ředidla na přežitelnost spermií po rozmrazení je uveden v Tabulce 3. Aktivita spermií na začátku termodynamického testu přežitelnosti (AKT 0) byla průkazně nejvyšší u Optidyly[®] (51,68%; $P < 0,01$) a nejnižší v Bioxcellu[®] (44,0%; $P < 0,01$). Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) na počátku testu (AKT 0) byl dále prokázán mezi Andromedem[®] (49,23%) a Bioxcellem[®] (44,0%).

V dalším průběhu krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií docházelo k poklesu aktivity. Po 30 min. testu (AKT 30) byl rozdíl mezi Bioxcellem[®] (39,92%) a Optidyly[®] (46,91%), resp. Andromedem[®] stále průkazný ($P < 0,01$).

Po 60 min. testu přežitelnosti (AKT 60) byl nalezen průkazný rozdíl ($P < 0,01$) mezi Bioxcellem[®] (35,14%) a Andromedem[®] (40,12%).

V dalším průběhu krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií (AKT 90 a AKT 120) byly již rozdíly mezi jednotlivými ředidly neprůkazné ($P > 0,05$).

Ve všech sledovaných časech termodynamického testu bylo dosaženo nejnižších výsledků u bezžloutkového ředidla Bioxcell[®] ($P < 0,05 - 0,01$). Bioxcell[®] použili ve svém pokusu např. Celeghini *et al.* (2008). Došli ke stejným závěrům. Srovnávaná ředidla byla také lepší než Bioxcell[®]. Naopak, nepotvrdily se závěry Stradaioli *et al.* (2007). V jejich pokusu dosáhlo ředilo Bioxcell[®] ve všech sledovaných ukazatelích signifikantně ($P < 0,05$) lepších výsledků.

Z tabulky 3 dále vyplývá, že aktivita spermií byla nejlepší za použití Optidyly[®], který je na bázi vaječného žloutku. Potvrdily se tak závěry studie Polge and Rowson (1952) nebo Muino *et al.* (2007) kteří uvádí, že ředidla na bázi vaječného žloutku mají příznivé kryoprotektivní účinky, chrání spermatické buňky a jsou lepší než ředidla bezžloutková.

Tabulka 3: Vliv použitého ředidla na aktivitu spermií po rozmrazení

ŘEDIDLO	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
AndroMed®	49,23 ± 1,50 ^a	46,41 ± 1,48 ^A	40,12 ± 1,44 ^a	31,85 ± 1,38	25,29 ± 1,43
Bioxcell®	44,00 ± 1,50 ^{A,b}	39,92 ± 1,48 ^{B,C}	35,14 ± 1,44 ^b	28,41 ± 1,38	21,92 ± 1,43
Triladyl®	47,84 ± 1,50	43,76 ± 1,48	37,35 ± 1,44	30,00 ± 1,38	23,48 ± 1,43
Optidyl®	51,68 ± 1,50 ^B	46,91 ± 1,48 ^D	39,54 ± 1,44	30,94 ± 1,38	24,42 ± 1,43

Vysvětlivky: AKT0 = aktivita spermií po rozmrazení v procentech; AKT30–120 = aktivita spermií po 30, 60, 90, a 120 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v procentech.

6 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Vliv býka byl vysoce statisticky významný ($P < 0,001$). Přežitelnost spermií po rozmrazení byla nejvyšší u býka 1 – ve všech sledovaných časech dosáhl nejlepších výsledků oproti ostatním sledovaným býkům ($P < 0,01$). Výsledky potvrzují rozdíly v kvalitě ejakulátu mezi jednotlivými býky a naznačují potřebu individuálního přístupu k jeho hodnocení a zpracování při výrobě inseminačních dávek.

Vliv použitého ředidla na přežitelnost spermií v inseminační dávce byl statisticky středně významný ($P < 0,01$). Rozdíl mezi nejlepším Optidylem® a nejhorším Bioxcellem® byl statisticky středně významný ($P < 0,01$), po 90 a 120 minutách testu byly již rozdíly mezi ředidly neprůkazné ($P > 0,05$).

Lze tedy konstatovat, že vliv použitého ředidla na kvalitu inseminačních dávek býků není zanedbatelný. Výběru vhodného ředidla je třeba věnovat patřičnou pozornost. Nejvhodnější ředidlo lze vybrat provedením krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií po rozmrazení inseminační dávky a v ideálním případě ředidlo vybírat individuálně pro konkrétního býka. Tato skutečnost může vyvolávat nutnost úpravy odběrového plánu a managementu provozu inseminační stanice. Nicméně individuální přístup k výrobě inseminačních dávek může vést k efektivnějšímu využívání potenciálu čerstvého ejakulátu konkrétního býka.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V metodice jsou uvedeny metody, vlastními výsledky výzkumně ověřené metodické postupy konzervace ejakulátu býků. Uváděné informace jsou výsledkem výzkumné činnosti autorů a výsledkem systematického studia vědecké literatury v oblasti metod v reprodukci hospodářských zvířat.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika bude vhodnou pomůckou pro podnikatele v zemědělství, ve šlechtění v chovu skotu při realizaci zvyšování konkurenceschopnosti zemědělství – chovu skotu (osa I PRV, priorita 1.1. Modernizace, inovace a kvalita, 1.2. Přenos znalostí) uplatněním progresivních technologických postupů v reprodukci skotu.

Předložená publikace poskytne informace pracovníkům šlechtitelských organizací, poradcům, chovatelům, pracovníkům v živočišné výrobě. Výsledky jsou využitelné v procesu průběžného vzdělávání a v pedagogické činnosti.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při výrobě inseminačních dávek je na prvním místě, stejně jako v každém jiném odvětví národního hospodářství, ekonomika. V zájmu každého producenta je minimalizace nákladů na výrobu, která umožní snížení ceny a tak i zvýšení konkurenceschopnosti podniku a dosažení co nejvyššího zisku. Úspěšnost producentů inseminačních dávek stojí a padá s kvalitou nakoupených býků a s kvalitou a množstvím od nich vyrobených inseminačních dávek. Hlavním cílem je vyrobit dávky v požadované kvalitě, především s vysokou oplozovací schopností.

Ideální situace by nastala v případě, že se bez ztrát zpracuje veškeré odebrané sperma a všechny vyrobené inseminační dávky se prodají. Toto je ovšem situace pouze teoretická. V praxi není možné zpracovat veškeré odebrané sperma, neboť toto musí splňovat jisté vstupní normy. Dále často dochází k situaci, kdy se musí bez užítku zlikvidovat všechny vyrobené dávky z odebraného ejakulátu z důvodu ztráty životaschopnosti a aktivity spermií po zmrazení. A často to není zanedbatelné množství – u mladých býků kolem jednoho roku věku se z jednoho skoku v průměru vyrobí 100 až 200 dávek, starší býk vyprodukuje v průměru na jeden skok 200 až 400 inseminačních dávek, od těch nejlepších býků se jich dá v extrému vyrobit i přes 1000 kusů. Množství dávek, získaných z jednoho skoku, od jednoho býka ovlivňuje zejména jeho individualita, věk, frekvence odběru ejakulátu a roční období. Mrazitelnost spermií je mimo kvality vlastního spermatu ovlivněna především správným technologickým postupem při zpracování, délkou ekvilibrace a samozřejmě i složením ředidla.

Vezme-li v úvahu všechny vynaložené náklady na výrobu (cenu ředidla, tekutého dusíku, pejet, energií, mezd zaměstnanců a samozřejmě i fixních nákladů) a ušlý zisk z prodeje, dojdeme k nemalé částce. Nejedná se zdaleka jen o ztrátu finanční, ale také o ztrátu cenného plemenného materiálu. Je to ztráta především chovatelská, zvláště jde-li o býka s dobrým genotypem, o býka zlepšovatele, o býka, o jehož semeno je mezi chovateli zájem. Čím lepší býk, tím větší ztráta.

Zajištění vyšší aktivity spermií pouze vlivem použitého ředidla znamená, při shodné úrovni ostatních ukazatelů ejakulátu, potenciálně o 4,4-7,7% více vyrobených inseminačních dávek. Cena inseminačních dávek se pohybuje od cca. 70,- Kč u testantů až po cca. 900,- Kč u kvalitních prověřených býků zlepšovatelů. Při průměrné výrobě 300 ks dávek z jednoho skoku to znamená o 13-23 dávek více, které mohou, v návaznosti na ceny inseminačních dávek, představovat zvýšení tržeb producenta v rozmezí +910 až teoreticky +20700,- Kč na jeden skok plemenného býka.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57(7):1801-1808.
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Qayyum M, Ullah N. 2014. Effect of fructose in extender on fertility of buffalo semen. *Pakistan Journal of Zoology* 46(1):279-281.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 7(3):145-173.
- Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129(4):535-543.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl (R), a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61(5):895-907.
- Andrabi SMH. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. *International Journal of Agriculture and Biology* 9:367-369.
- Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Akhter S. 2010. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive Biology* 10(3):235-240.
- Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beauréal V, David-Briand E, Rabesona H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* 83(2):175-183.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187(1-2):77-81.
- Ball PJH, Peters AR. 2004. *Reproduction in cattle*. 3 ed. Great Britain: Blackwell Publishing.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*

70(3):708-717.

- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50(5):699-706.
- Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science* 104(2-4):119-131.
- Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 58(1):31-38.
- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 108(3-4):298-308.
- Cotter PZ, Goolsby HA, Prien SD. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 40(2):98-99.
- DeJarnette JM. 2010. The evolution of sex-sorted semen in the US dairy industry. *Journal of Dairy Science* 93:783-783.
- Deleeuw FE, Deleeuw AM, Dendaas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30(1):32-44.
- Ejaz R, Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Husna AU, Iqbal R, Akhter S. 2014. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. *Reproduction in Domestic Animals* 49(1):122-125.
- Ennen BD, Berndtson WE, Mortimer RG, Pickett BW. 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ml straws. *Journal of Animal Science* 43(3):651-656.
- Gil J, Januskauskas A, Haard MC, Haard MGM, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in biociphos-Plus (R) and Triladyl (R). *Reproduction in Domestic Animals* 35(2):69-77.

- Gillan L, Kroetsch T, Maxwell WMC, Evans G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* 103(3-4):201-214.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoal. *Biology of Reproduction* 67(6):1811-1816.
- Herold FC, Gerber D, Aurich JE. 2003. Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl (TM) or AndroMed (R). *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90(3):58-61.
- Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, MuellerSchloesser F. 1997. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reproduction in Domestic Animals* 32(3):143-149.
- Hoflack G, Opsomer G, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, Duchateau L. 2006. Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology* 66(8):1834-1846.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3):3-22.
- Janett F, Keo S, Bollwein H, Hässig M, Thun R. 2005. Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch. Tierheilk*, 147: 62 (Abstract, Poster).
- Liu J, Westhusin M, Long C, Johnson G, Burghardt R, Kraemer D. 2010. Embryo production and possible species preservation by nuclear transfer of somatic cells isolated from bovine semen. *Theriogenology* 74(9):1629-1635.
- Louda F, Bjelka M, Ježková A, Pozdíšek J, Stádník L, Bezdíček J. 2007. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby*. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín, Česká republika. 43 s. ISBN: 9788087144015.
- Louda F, Čerovský J, Ježková A, Stádník L. 2001. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*, ČZU v Praze, Praha, Česká republika. 225 s. ISBN: 8021307021.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. *Biochemistry of spermatozoa: chemical and functional correlations in ejaculated semen, Andrological aspect, Male reproductive function and semen*, Springer London. ISBN: 9781447113027.

- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57(1):327-344.
- Morrell JM, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT. 2014. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science* 145(1-2):47-53.
- Morrell JM, Wallgren M. 2011. Colloid Centrifugation of Boar Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 46:18-22.
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal*, 1, 1–9.
- Muino R, Fernandez M, Pena AI. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals* 42(3):305-311.
- Mutalik S, Salian SR, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde AR, Kumar P, Kalthur G, Adiga SK. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 60(3):183-188.
- Nehring H, Rothe L, Reguszynski K, Schumann-Zuhlke D. 2005. Developments in quality estimation and cropreservation of bull semen. *Zuchtungskunde* 77(2-3):93-109.
- Polge C, Rowson LEA. 1952. Results with bull semen stored at -79 °C. *Veterinary Record* 64: 851-854.
- Riha J, Frelich J, Golda J, Vanek D. 1998. Alternative methods utilizing embryotransfer (ET) for the formation of beef cattle herds. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding* 41(4):345-357.
- Rodriguez-Martinez H. 1998. Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reproduction in Domestic Animals* 33(3-4):233-237.
- Rosato MP, Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79(3):508-516.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3):55-76.

- Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A. 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58(2):134-138.
- Siddique M, Ali R, Raza A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture and Social Sciences* 2(2):117-119.
- Stádník L, Ježková A, Vacek M. 2008. Factors affecting sperm survival in cervical mucus and pregnancy rates of OVSYNCH-treated Holstein cows. *Scientia Agriculturae Bohemica* 39(1):24-30.
- Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* 67(7):1249-1255.
- Sutkeviciene N, Riskeviciene V, Januskauskas A, Zilinskas H, Andersson M. 2009. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* 51.
- Swain JE, Smith GD. 2010. *Cryoprotectants*. In: Chian RC, Quinn P (ed.). *Fertility cryopreservation*. New York: Cambridge University Press; 24–38.
- Thun R, Hurtado M, Janett F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus (R) and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57(3):1087-1094.
- Topraggaleh TR, Shahverdi A, Rastegarnia A, Ebrahimi B, Shafiepour V, Sharbatoghli M, Esmaili V, Janzamin E. 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia* 46(7):777-783.
- Tuncer PB, Sariozkan S, Bucak MN, Ulutas PA, Akalin PP, Buyukleblebici S, Canturk F. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* 75(8):1459-1465.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen L, den Daas JHG. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54(1):57-67.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno. 258 s. ISBN 8086895017.

- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62(1-3):23-53.
- Woelders H, Matthijs A, Engel B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35(2):93-105.
- Yamada C, Feitosa WB, Simoes R, Nicacio AC, Mendes CM, Assumpcao M, Visintin JA. 2011. Vitrification with Glutamine Improves Maturation Rate of Vitrified/Warmed Immature Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 46(1):173-176.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Doležalová M, Stádník L, Vodička J. 2014a. Příklad kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků. *Náš chov* 45(7):24-25.
- Doležalová M, Stádník L, Vodička J. 2014b. Chlazení a ekvibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov* 45(6):22-23.
- Beran J, Ducháček J, Ptáček M, Stádník L. 2014. Comparison of bull' sperm extenders and their effect on sperm motility after thawing. In: *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 18th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 11.09.2014, Helsinki, Finland*. Helsinki, Finland: Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, 2014. s. 58-58.
- Makarevich A, Špaleková E, Stádník L, Kubovičová E, Louda F. 2014. Impact of BCS of breeding bulls on motility and viability of frozen-thawed sperm. In: *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 18th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 11.09.2014, Helsinki, Finland*. Helsinki, Finland: Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, 2014. s. 80-81.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Okrouhlá M, Doležalová J, Kadlecová V, Ptáček M. 2013a. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 142(1-2):28-34.
- Beran J, Šimoník O, Stádník L, Rajmon R, Ducháček J, Krejčířková A, Doležalová M, Šichtař J. 2013b. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis* 61(6):1575-1581.
- Doležalová M, Stádník L, Beran J. 2013. Inseminace – intenzifikační faktor reprodukce. *Náš chov* 73(10):56-57.
- Beran J, Stádník L, Bezdíček J, Louda F, Čítek J, Ducháček J. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding* 55(3):207-218.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J. 2011. Vliv ředidla na aktivitu spermií. *Náš chov* 71(1):58-59.

- Beran J, Louda F, Stádník L. 2010a. The effect of egg yolk on the survival of sperm from an ai dose after thawing. In: *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 14th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 15 – 18. 09. 2010, Eger, Hungary*. Eger, Hungary: Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, 2010. s. 78-78.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Louda F. 2010b. Porovnání různých typů ředidel spermatu býků a jejich vliv na úspěšnost mrazení. In: *Zborník príspevkov „V. Vedecké konferencie doktorandov s medzinárodnou účasťou“*, 26. 11. 2010. Nitra, Slovensko: SPU v Nitre, s. 48-50. ISBN 978-80-552-0471-0.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Louda F. 2010c. Comparison of four diluents for cryoconservation of bull semen and their effect on sperm survival. In: *Proceedings of International Ph.D. Students Conference*, 24. 11. 2010, Brno, Czech Republic. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, CD, s. 204-210. ISBN: 978-80-7375-453-2.

VIII. DEDIKACE

Zpracováno v rámci řešení „S“ grantu MŠMT a výzkumného projektu NAZV QJ1210109.

Vydal: Česká zemědělská univerzita v Praze,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Katedra speciální zootechniky

Název publikace: Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla
ejakulátu

Autoři: Ing. Jan Beran, Ph.D.
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová
Ing. Renata Toušová, CSc.

Tisk: Copy Centrum Powerprint
Kamýcká 1219
165 21 Praha 6 - Suchdol

Náklad: 50 ks
Počet stran: 30
Vydání: první
Rok vydání: 2014

Vydáno bez jazykových úprav.

Publikace je neprodejná.

Metodika vznikla v rámci řešení: - „S“ grantu MŠMT
- grantového úkolu NAZV č. QJ1210109.

ISBN 978-80-213-2537-1