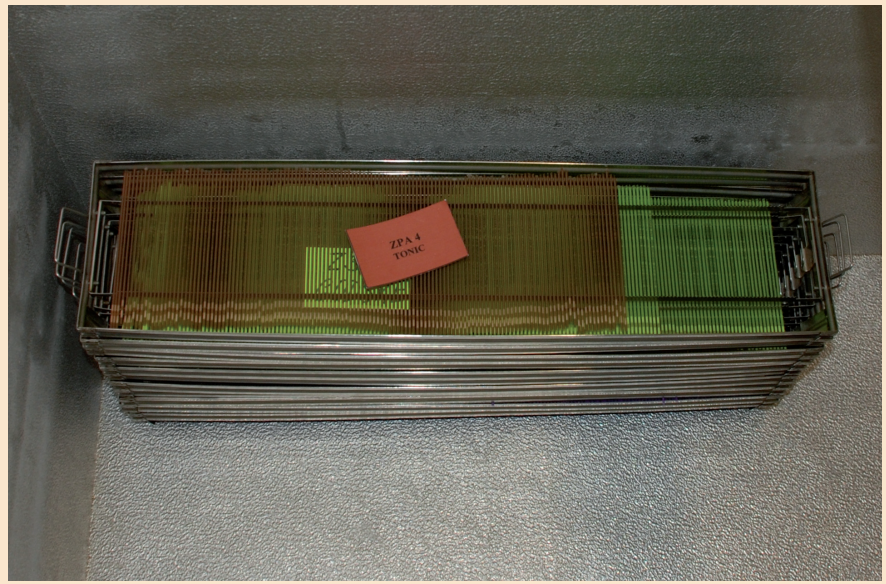
ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra speciální zootechniky
Kamýcká 129, Praha 6 - Suchdol, ČR
tel.: +420 224 383 057
e-mail: stadnik@af.czu.cz
www.czu.cz

ZDARMA - neprodejné
ISBN 978-80-213-2710-8

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

L. STÁDNÍK a kol.

VLIV DÉLKY EKVILIBRACE NA KVALITATIVNÍ UKAZATELE INSEMINAČNÍ DÁVKY



METODIKA

2016

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

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

Vliv délky ekvilibrace na kvalitativní ukazatele inseminační dávky

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři:
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová, Ph.D.
Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

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

2016

Autorský kolektiv:
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová, Ph.D.
Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

ČZU v Praze, FAPPZ, Katedra speciální zootechniky, Kamýcká 129, 165 00,
Praha – Suchdol

Dedikace výsledků typu „N“ – Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení grantového úkolu MZe NAZV č. QJ1210109 a „S“ grantu MŠMT.

Určení publikace:

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

Uplatněná certifikovaná metodika byla Ministerstvem zemědělství schválena dne 21.12.2016, pod č. 17210/2016-6.

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

Obsah

I. CÍL METODIKY ……. 4

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY …… 5

1. Úvod ……...5

1.1. Hodnocení ejakulátu..……..…….. 5

1.2. Ekvilibrace…….……..... 5

1.3. Kryokonzervace……..……... 6

2. Metodika a výsledky ……7

2.1. Metodické postupy …… 7

2.1.1. Býci……. ……. 7

2.1.2. Odběr ejakulátu ……. 7

2.1.3. Ředění a zpracování ejakulátu…….……. 8

2.1.3.1 Ekvilibrace……..…... 8

2.1.3.2 Mrazení…..……..…...8

2.1.4. Hodnocení inseminačních dávek……9

2.1.5. Statistické zpracování výsledků …….…. 10

2.2. Výsledky sledování …….…..12

2.2.1 Vliv býka …….. 12

2.2.2 Vliv délky ekvilibrace…….. 13

2.2.3 Vliv mrazící křivky…….....… 14

2.2.4 Vliv interakce délky ekvilibrace a mrazící křivky ……15

3. Závěr a doporučení pro praxi ……17

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 18

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY 18

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY 18

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... 19

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 23

VIII. DEDIKACE 24

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je shrnout dosavadní poznatky v oblasti zpracování ejakulátu, zejména z hlediska vlivu délky ekvilibrace a typu mrazící křivky při výrobě inseminačních dávek. Metodika přispívá ke zlepšení kvantitativních a kvalitativních parametrů inseminačních dávek, tím potenciálně i k podpoře zabřezávání krav a ke zlepšení ekonomické situace v chovu.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

V posledních letech byl zaznamenán rostoucí zájem o zvyšování kvality zmrazených inseminačních dávek, a to v souvislosti s klesající plodností dojnic (Beran *et al*., 2013a; Stádník *et al*., 2015a) a s celosvětovým rozšířením inseminace skotu (Shahverdi *et al*., 2014). Z tohoto důvodu je nutné zajistit optimální genetickou selekci býků (Zhang *et al*., 2015), stejně jako zpracování býčího ejakulátu, a to zejména jeho odběr (Dzyuba *et al*., 2015), ředění (Meamar *et al*., 2016), pomalé chlazení na 4-6 °C (Kristan *et al*., 2014), ekvilibraci a mrazení (Beran *et al*., 2013b), jakož i zachování jeho oplozovací schopnosti po dlouhou dobu (Andrabi, 2007), kterou lze objektivně posoudit (Šimoník *et al*., 2015).

1.1. Hodnocení ejakulátu

Po odběru ejakulátu od býka se v běžné laboratorní praxi využívá vizuálního odhadu procenta pohyblivých spermií ve vzorku spermatu, aby se zamezilo určité variabilitě dat (subjektivní chybě), využívá se také hodnocení pohyblivosti spermií buď fotografickou analýzou, nebo počítačem řízenou analýzou spermatu CASA (Graham a Mocé, 2008). Po odběru se také hodnotí životaschopnost spermií pomocí hypoosmotického testu (HOS – hypoosmotic swelling test) a v neposlední řadě také podíl živých spermií a % zastoupení apoptotických spermií (Saragusty *et al*., 2007).

Proces výroby ID snižuje motilitu spermií, tudíž počáteční kvalita ejakulátu je rozhodující pro výslednou kvalitu ejakulátu po rozmrazení (Beran *et al*., 2011).

1.2. Ekvilibrace

Součástí technologického procesu výroby inseminačních dávek je ekvilibrace. Ekvilibrace je proces, který následuje po zchlazení naředěných inseminačních dávek před samotným mrazením (Dhami *et al*., 1992). Délkou ekvilibrace se pak označuje čas, kdy spermie zůstává v kontaktu s kryoprotektantem před samotným mrazením (Leite *et al*., 2010). Kryoprotektanty jsou základní složkou ředidel spermatu, chrání integritu membrány spermie během chlazení a mrazení (Linhartová *et al*., 2014), chrání struktury buňky před jejich roztrháním a zničením ledovými krystaly, vznikajícími během mrazení, zvyšují jejich odolnost a chrání je před chladovým šokem (Beran *et al*., 2014) a pomáhají udržet motilitu spermií po následném rozmrazení (Muchlisin *et al*., 2015). Přesto nejvhodnější interakce

použitého ředidla a délky ekvilibrace ještě nejsou dostatečně stanoveny (Shahverdi *et al.*, 2014).

Délka ekvilibrace je variabilní. Dhami *et al*. (1992) doporučuje délku ekvilibrace od 30 minut do 24 hodin před mrazením. Talevi *et al*. (1994) shledal jako nejvhodnější dobu trvání ekvilibrace 1 hodinu. Awad (2011) nebo Dhami *et al*. (1996) ve své práci využívali dobu trvání ekvilibrace 2 hodiny při 5 °C. Muiño *et al*. (2007) určili optimální délku ekvilibrace od 4 do 18 hodin. Některé studie dokazují, že doba ekvilibrace 18 hodin nebo dokonce přes noc, jsou nejvhodnější z hlediska zvýšení kvality vyrobených inseminačních dávek (Shahverdi *et al.*, 2014). Výsledky práce Arav *et al*. (2000) také naznačují, že prodloužení doby ekvilibrace zvyšuje oplozovací schopnost spermií. Avšak z pohledu producentů inseminačních dávek je snaha ekvilibraci zkrátit, nebo ji úplně eliminovat a tak urychlit proces zpracování spermatu a kryokonzervaci, což je rozhodně žádoucí. To je však v rozporu s faktem, že ekvilibrace je nezbytná pro zachování oplozovací schopnosti spermií po následném rozmrazení (Gao *et al.*, 1997). Bois *et al*. (2012) porovnávali vliv 30 minutové a 60 minutové ekvilibrace na následnou motilitu a membránovou integritu spermií. Dospěli k závěru, že krátký čas ekvilibrace (30 minut) negativně ovlivnil integritu membrány spermií, avšak rozdíly mezi výsledky motility nebyly statisticky významné.

1.3. Kryokonzervace

Úspěch kryokonzervace závisí zejména na průběhu chlazení a mrazení (Clulow *et al.*, 2008). Interakce mezi teplotou a typem použitého ředidla následně ovlivňuje odolnost spermií vůči chladovému šoku (Stádník *et al.*, 2015b). Rozsah poškození spermií způsobených chladovým šokem závisí nejen na teplotě, ale i na rychlosti poklesu teploty. Čím vyšší je rychlost zchlazení, tím větší je poškození spermií (Lemma, 2011), které určuje následnou motilitu spermií po rozmrazení (Andrabi, 2007). Úspěšnost kryokonzervace spermií je tedy ovlivněna typem a průběhem mrazící křivky (Doležalová *et al.*, 2015).

Délka ekvilibrace, jakož i typ mrazící křivky jsou odpovědné za mnoho důležitých fyzikálně-chemických změn, které vedou k různým stupňům poškození spermií (Forero-Gonzales *et al*., 2012), které zhoršují jejich vlastnosti po rozmrazení (Špaleková *et al.*, 2014). Dle výše uvedených skutečností nejsou uvedené interakce dosud dostatečně prozkoumány. Proto bylo cílem této metodiky vyhodnotit vliv různých délek ekvilibrace, typů mrazících křivek a jejich interakce na motilitu spermií a podíl živých spermií po rozmrazení inseminační dávky.

2. Metodika a výsledky

2.1. Metodické postupy

2.1.1 Býci

Do pokusu byla vybrána skupina plemenných býků (n = 6) chovaných na inseminační stanici a pravidelně využívaných k produkci inseminačních dávek. Býci byli přibližně stejného věku, plemene český strakatý skot a byli využíváni stejnou frekvencí odběru ejakulátu. Býci byli chováni ve stejných chovných podmínkách (stelivové ustájení, systém krmení 2x denně a stejný způsob ošetřování). V letním období býci měli přístup na pastvu v areálu inseminační stanice. Byla jim podávána stejná denní krmná dávka: luční seno (10 kg), ječná 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 minerální krmná přísada Premin 22 Natural ve formě lizu 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 5 % ostatních minerálů (obsah na 1 kg minerální krmné přísady): Ca (11,4 %), P (6 %), Na (5 %), Mg (5,2 %), vitamín A (1 250 000 i.u.), vitamín D3 (250 000 i.u.), vitamín E (5 000 mg), vitamín B1 (61 mg), $FeCO_3$ (8 200 mg), $CuSO_4 . 5H_2O$ (600 mg), MnO (3 000 mg), ZnO (5 500 mg), $Ca(IO_3)_2$ (45 mg), $Co(CH_3COO)_2$ (45 mg), Na_2SeO_3 (36,5 mg), niacin (825 mg), beta karoten (800 mg).

2.1.2 Odběr ejakulátu

Ejakulát byl odebírán standardním postupem do umělé vagíny (Louda *et al*., 2007) v období od dubna 2014 do února 2015. Vstupní hodnocení bylo prováděno v laboratoři inseminační stanice jedním školeným laboratorním technikem dle metodiky (Věžník *et al*., 2004): ejakulát byl nejprve zhodnocen senzoricky na přítomnost nežádoucích přimísenin a zápachů. Dále byla na fotometru (Genesys 10vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, USA) změřena koncentrace spermií v ejakulátu (n x 10^6 mm^{-3}), zvážením na digitální automatické váze (Scout Pro, OHAUS®, Parsippany, NJ, USA) byla stanovena jeho hmotnost (g). Motilita spermií byla hodnocena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon® Eclipse E200, Tokio, Japonsko) subjektivní metodou. K dalšímu zpracování byl použit pouze ejakulát o koncentraci spermií minimálně 0,7 x 10^6 mm^{-3}, s minimální aktivitou 70 % (přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou, odpovídající rychlosti).

2.1.3 Ředění a zpracování ejakulátu

Ejakulát byl nejprve naředěn ihned po odběru běžně používaným komerčním ředidlem na bázi rostlinných fosfolipidů AndroMed®(Minitübe, Tiefenbach, Německo) na koncentraci 10 x 10^6 aktivních spermií po rozmrazení v jedné inseminační dávce o objemu 0,25 ml. Dané množství ředidla bylo aplikováno sterilní injekční stříkačkou přímo do sběrače s odebraným ejakulátem. Po zatavení sběrače byl naředěný ejakulát po 10 minutovém promíchání naplněn v automatické plničce (IMV, L'Aigle, Francie) do různobarevných pejet o objemu 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francie).

2.1.3.1 Ekvilibrace

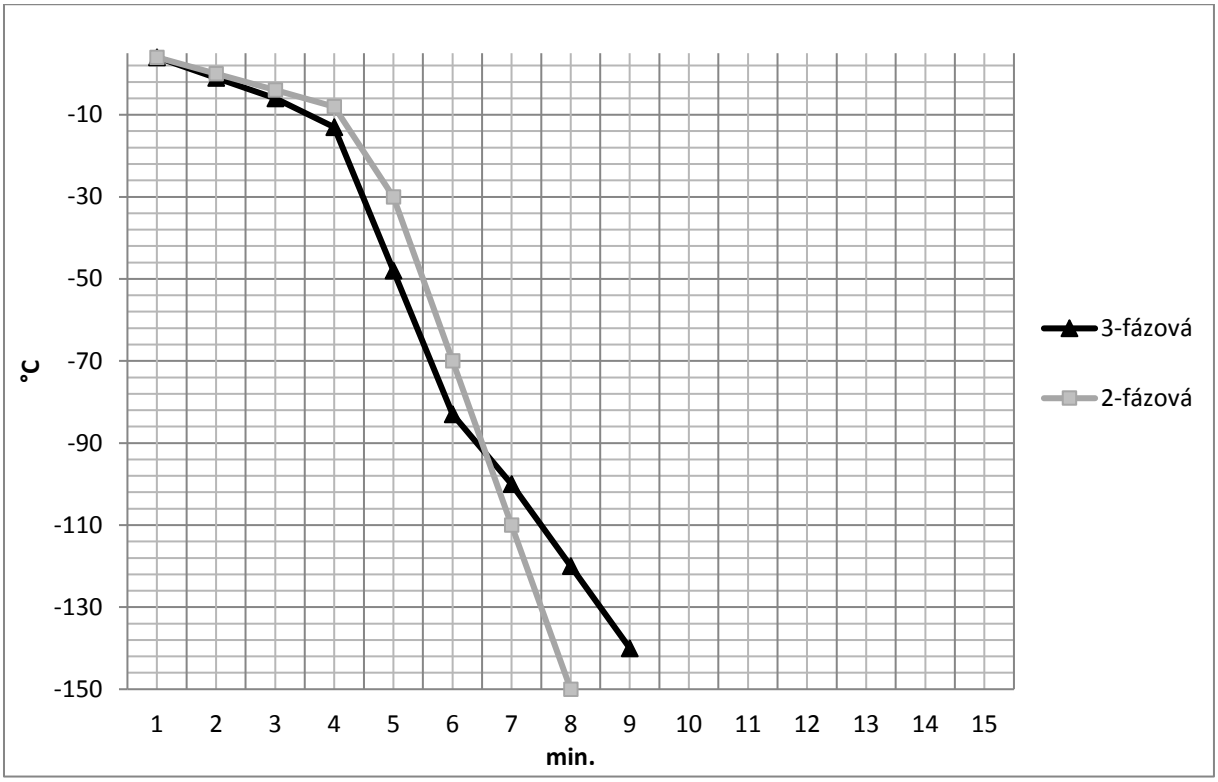
Vyrobené pejety od každého býka byly rozděleny na početně vyrovnané 3 skupiny odlišené barvou pejet (n = 20 ID/býk). Pejety byly následně vloženy do chladicího boxu a zchlazovány rychlostí 0,2 °C x $min.^{-1}$ na teplotu 4 – 5 °C a ekvilibrovány různě dlouhou dobu. V pokusu byly testovány 3 délky ekvilibrace: 30 min. (Leite *et al*., 2010), 120 min. (Shahverdi *et al*., 2014) a 240 min. (Januskauskas *et al*., 1999).

2.1.3.2. Mrazení

Ekvilibrované inseminační dávky byly v každé variantě ekvilibrace následně rozděleny na 2 skupiny (n = 10 ID/býk/délka ekvilibrace) a zmrazeny na základě 2 různých mrazících křivek, které byly ve studii Doležalová *et al*. (2015) vyhodnoceny jako nejvhodnější vzhledem k následné kvalitě vyrobených ID. Mrazení probíhalo v automatickém mrazicím boxu DigitCool s počítačově řízeným poklesem teplot v komoře (Digitcool®; IMV CryoBio-System, L'Aigle, Francie) metodou postupného zmrazování z teploty +4 °C na teplotu -140 až -150 °C.

Graf 1 popisuje průběh vybraných mrazících křivek. Jako první byla použita standardní, komerčně doporučovaná třífázová křivka, určená pro zmrazování býčího ejakulátu (Muiño *et al*., 2007). Druhá byla dvoufázová mrazící křivka podle metodiky Januskauskas *et al*. (1999) a Gil *et al*. (2000). Zmrazené inseminační dávky byly následně uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem a uchovávány při teplotě -196 °C.

Graf 1 – Průběh použitých mrazících křivek



2.1.4 Hodnocení inseminačních dávek

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 sekund podle standardní metodiky (Rubio-Guillen *et al.*, 2007). Procento progresivně se pohybujících spermií vpřed za hlavičkou (MOT) bylo hodnoceno a zaznamenáváno za použití systému CASA (SCA® Production v. 5.3., MICROPTIC, Španělsko) s mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon® Eclipse E200, Tokio, Japonsko) při 200 – 300 násobném zvětšení. Z každé pejety bylo hodnoceno minimálně 5 zorných polí (Tuncer *et al.*, 2011). Hodnoty MOT byly zjišťovány ihned po rozmrazení (M0) a během krátkodobého termodynamického testu přežitelnosti spermií (TDT; Beran *et al.*, 2012). Hodnoty motility spermií v průběhu testu byly determinovány v časech 30, 60, 90 a 120 minut po rozmrazení (M30, M60, M90, a M120). Ejakulát byl po celou dobu testu inkubován v suchém termostatu (Thermo-block, Falc®, Treviglio, Itálie) při teplotě 38 ± 1 °C.

Dále byl hodnocen podíl živých spermií po rozmrazení (Ž0) a po 120 minutách na konci TDT (Ž120). Na předehřátém hodinovém sklíčku (37 ± 1 °C) bylo smícháno 20 µl vzorku a 20 µl Eosinu krouživým pohybem po dobu 30 sekund. Poté bylo přidáno 40 µl Nigrosinu. Následně bylo napipetováno 20 µl vzniklé suspenze na předehřáté podložní

sklíčko a byl vytvořen roztěr. Zbylé množství rozmrazené inseminační dávky bylo inkubováno po dobu 120 minut při 38 ± 1 °C. Po uplynutí této doby byl výše zmíněným postupem proveden druhý roztěr. Po zaschnutí byly roztěry vyhodnoceny jedním hodnotitelem pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon® Eclipse E200, Tokio, Japonsko) při 1 000 násobném zvětšení. Bylo hodnoceno minimálně 100 spermií z každého roztěru, spermie byly klasifikovány buď jako mrtvé (s červenými hlavičkami) anebo živé (s bílými hlavičkami), následně byl vyjádřen podíl živých spermií ze vzorku (Beran *et al.*, 2012).

2.1.5 Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu SAS (Verze 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) procedurami UNIVARIATE a GLM. Na základě Akaikova informačního kritéria byly průměrné hodnoty motility spermií (M0, M30, M60, M90 a M120) a podílu živých spermií (ŽS) opraveny o vliv těchto fixních efektů: plemeník, délka ekvilibrace, mrazící křivka a interakce délka ekvilibrace-mrazící křivka. Současně byl hodnocen pokles motility spermií (PMS) a pokles podílu živých spermií (PŽS) v jednotlivých fázích termodynamického testu stejným modelem bez efektu doby testu. Detailní vyhodnocení rozdílu mezi jednotlivými proměnnými bylo provedeno pomocí Tukey – Kramerova testu. Byla použita následující modelová rovnice:

$\mathbf{Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + e_{ijkl}}$ kde:

$\mathbf{Y_{ijkl}}$ **=** naměřená hodnota závisle proměnné (motilita spermií v časech 0, 30, 60, 90 a 120 min. TDT, průměrná motilita spermií, podíl živých spermií a pokles motility spermií, resp. podílu živých spermií během TDT),

μ = obecný průměr znaku,

$\mathbf{A_i}$ = vliv fixního efektu i-tého plemenného býka (i = 1, n = 36; 2, n = 36; 3, n = 36; 4, n = 36; 5, n = 36; 6, n = 36),

$\mathbf{B_j}$ = vliv fixního efektu j-té délky ekvilibrace (j = 30 min., n = 72; 120 min., n = 72; 240 min., n = 72),

$\mathbf{C_k}$ = vliv fixního efektu k-té mrazící křivky (k = 1, n = 108; 2, n = 108),

$\mathbf{BC_{jk}}$ = interakce mezi fixním efektem j-té délky ekvilibrace a k-té mrazící křivky (jk = 6 skupin),

$\mathbf{e_{ijkl}}$ = residuální chyba.

V rámci hodnocení průměrné motility spermií během TDT byla modelová rovnice doplněna o fixní efekt:

$\mathbf{D_l}$ = vliv fixního efektu l-tého času TDT (l = 0 min., n = 216; 30 min., n = 216; 60 min., n = 216; 90 min., n = 216; 120 min., n = 216).

Rozdíly ve sledovaných ukazatelích v závislosti na zvolených faktorech byly hodnoceny na hladinách statistické průkaznosti $P < 0,05$ a $P < 0,01$.

2.2. Výsledky sledování

2.2.1 Vliv býka

V Tabulce 1 jsou uvedeny výsledky vlivu býka na průměrnou motilitu a podíl živých spermií, resp. jejich pokles během TDT. Průkazně nejvyšší průměrná motilita spermií, resp. podíl živých spermií během TDT byly detekovány u býka V (46,33 %, resp. 37,18 %) v porovnání s ostatními býky (-3,33 až -17,00 %; P < 0,05-0,01). Naproti tomu, průkazně nejnižší hodnota byla dosažena u býka II (29,33 %) oproti býkům I, V a VI (+12,5 až +17,00 %; P < 0,01). Motilita spermií během testu klesala, mezi jednotlivými býky byly detekovány průkazné rozdíly (P < 0,05-0,01).

Tabulka 1 dokumentuje další průkazné rozdíly mezi jednotlivými býky. Rozdíly v poklesu podílu živých spermií byly neprůkazné (P > 0,05).

Tabulka 1 – Vliv býka na pokles a průměrnou motilitu spermií a podíl živých spermií během termodynamického testu

Býk	**motilita spermií (%)**		**podíl živých spermií (%)**	
	PMS	**MS**	**PŽS**	**ŽS**
	LSM ± SE	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**
I	17,50 ± 0,938^{A}	41,83 ± 0,776^{A}	33,02 ± 7,332	33,46 ± 3,838^{A}
II	5,69 ± 0,938^{A}	29,33 ± 0,776^{A,B}	11,37 ± 7,332	14,37 ± 3,838^{A,B}
III	9,31 ± 0,938^{A,a}	31,72 ± 3,839^{A,C}	19,39 ± 7,332	13,38 ± 3,838^{A,C}
IV	4,93 ± 0,938^{A,a}	32,17 ± 0,776^{A,D}	27,97 ± 7332	34,84 ± 3,838^{B,C}
V	7,36 ± 0,938^{A}	46,33 ± 0,776^{A,B,C,D,a}	22,68 ± 7,332	37,18 ± 3,838^{B,C}
VI	6,32 ± 0,938^{A}	43,00 ± 0,776^{B,C,D,a}	35,68 ± 7,332	25,14 ± 3,838

Pozn.: Stejná písmena v horním indexu dokumentují statistickou významnost rozdílu – A, B, C, D (P < 0,01), a (P < 0,05); PMS – pokles motility spermií; MS – průměrná motilita spermií; PŽS – pokles % živých spermií; ŽS – průměrný podíl živých spermií během termodynamického testu; LSM – průměr nejmenších čtverců; SE – střední chyba průměru

2.2.2 Vliv délky ekvilibrace

Výsledky vlivu délky ekvilibrace, bez ohledu na použitou mrazící křivku, jsou uvedeny v Tabulce 2 a Grafu 2. Nejvyšší hodnoty motility spermií ve všech etapách TDT byly dosaženy po 240 minutové ekvilibraci (Graf 2). Toto tvrzení je v souladu s výsledky prezentovanými v Tabulce 2, kdy nejvyšší hodnoty průměrné motility spermií během TDT (39,83 %) se v porovnání s 30, resp. 120 minutovou délkou ekvilibrace průkazně lišily (+4,58 %, resp. +2,72 %; $P < 0,05$-$0,01$). Motilita spermií po rozmrazení statisticky průkazně klesala během všech fází TDT, největší pokles motility spermií byl detekován po 30 minutové ekvilibraci (-10,45 %; $P < 0,01$), zatímco nejnižšího poklesu motility spermií bylo dosaženo po 120 minutové ekvilibraci (-5,52 %; $P < 0,01$).

Z Tabulky 2 dále vyplývá, že nejvyššího podílu živých spermií bylo dosaženo u inseminačních dávek ekvilibrovaných po dobu 120 minut (31,58 %), třebaže rozdíly oproti ostatním sledovaným délkám ekvilibrace (+6,87 až +8,68 %) byly statisticky neprůkazné ($P > 0,05$).

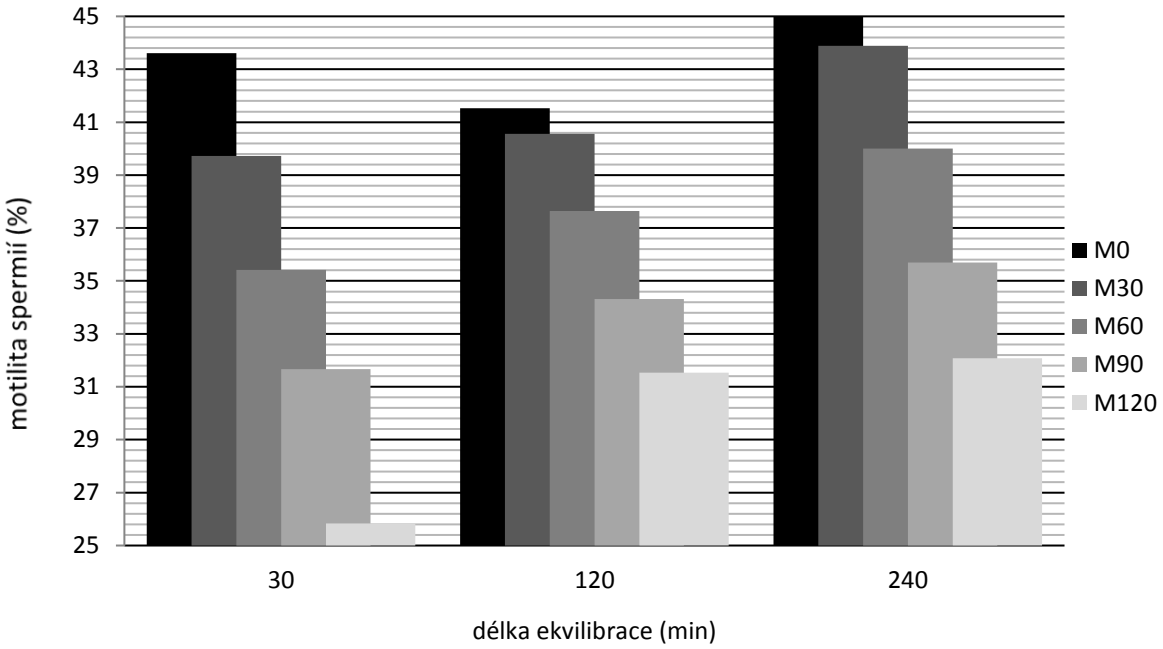
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že použití 30 min. délky ekvilibrace je z důvodu nejnižších zaznamenaných hodnot parametrů spermií v průběhu testu nejméně vhodné.

Tabulka 2 – Vliv délky ekvilibrace na pokles a průměrnou motilitu spermií a podíl živých spermií během termodynamického testu

Délka ekvilibrace (min.)	**motilita spermií (%)**		**podíl živých spermií (%)**	
	PMS	**MS**	**PŽS**	**ŽS**
	LSM ± SE	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**
30	$10,45 \pm 0,663^{A}$	$35,25 \pm 0,548^{A,a}$	22,44 ± 5,184	22,90 ± 2,715
120	$5,52 \pm 0,663^{A,B}$	$37,11 \pm 0,548^{B,a}$	29,68 ± 5,184	31,58 ± 2,715
240	$9,58 \pm 0,663^{B}$	$39,83 \pm 0,548^{A,B}$	22,93 ± 5,184	24,71 ± 2,715

Pozn.: Stejná písmena v horním indexu dokumentují statistickou významnost rozdílu – A, B, ($P < 0,01$), a ($P < 0,05$); PMS – pokles motility spermií; MS – průměrná motilita spermií; PŽS – pokles % živých spermií; ŽS – průměrný podíl živých spermií během termodynamického testu; LSM – průměr nejmenších čtverců; SE – střední chyba průměru

Graf 2 – Vliv délky ekvilibrace na motilitu spermií v jednotlivých fázích (0-120 minut) termodynamického testu; M0, M30, M60, M90, M120 – procentická motilita spermií po rozmrazení, resp. 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu



2.2.3 Vliv mrazící křivky

Výsledky vlivu mrazící křivky na parametry spermií po rozmrazení jsou uvedeny v Tabulce 3. Nejvyšší průměrná motilita spermií (+2,02 %; $P < 0,01$), stejně tak podíl živých spermií (+11,77 %; $P < 0,01$) byly detekovány u 2-fázové mrazicí křivky. Nicméně, rozdíly v poklesu motility spermií, resp. podílu živých spermií během testu byly opět statisticky neprůkazné ($P > 0,05$).

Tabulka 3 – Vliv mrazící křivky na pokles a průměrnou motilitu spermií a podíl živých spermií během termodynamického testu

Mrazící křivka	**motilita spermií (%)**		**podíl živých spermií (%)**	
	PMS	**MS**	**PŽS**	**ŽS**
	LSM ± SE	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**	**LSM ± SE**
3-fázová	8,80 ± 0,542	36,39 ± 0,448^{A}	21,37 ± 4,233	20,51 ± 2,217^{A}
2-fázová	8,24 ± 0,542	38,41 ± 0,448^{A}	28,67 ± 4,233	32,28 ± 2,217^{A}

Pozn.: Stejná písmena v horním indexu dokumentují statistickou významnost rozdílu – A ($P < 0,01$); PMS – pokles motility spermií; MS – průměrná motilita spermií; PŽS – pokles % živých spermií; ŽS – průměrný podíl živých spermií během termodynamického testu; LSM – průměr nejmenších čtverců; SE – střední chyba průměru

2.2.4 Vliv interakce délky ekvilibrace a mrazicí křivky

V Tabulce 4 a Grafu 3 jsou uvedeny výsledky vlivu interakce délky ekvilibrace a mrazicí křivky. Z výsledků uvedených v Tabulce 4 je patrné, že délka ekvilibrace 30 minut v kombinaci s 3-fázovou, i 2-fázovou mrazicí křivkou prezentuje nejnižší hodnoty motility spermií v porovnání se 120 (-2,55 % a -1,17 %), i 240 minutovou (-6,78 % a -2,39 %) délkou ekvilibrace.

Průměrný podíl živých spermií byl v průběhu celého testu průkazně nejvyšší ($P < 0,05$) u interakce délky ekvilibrace 120 minut a 2-fázové mrazicí křivky, oproti nejnižším hodnotám u interakce 30, resp. 240 minutové ekvilibrace a 3-fázové mrazicí křivky. Největší pokles podílu živých spermií během testu byl detekován u dávek ekvilibrovaných 120 minut a mrazených 2-fázovou mrazicí křivkou (40,04 %), naproti tomu nejnižší pokles byl detekován u dávek ekvilibrovaných 120 minut a mrazených 3-fázovou mrazicí křivkou (19,31 %).

Graf 3 zobrazuje průběh motility spermií v jednotlivých etapách TDT v závislosti na interakci mrazící křivka-délka ekvilibrace. Vyšších hodnot motility bylo dosaženo za použití 2-fázové mrazicí křivky v porovnání s 3-fázovou křivkou bez ohledu na délku ekvilibrace, kromě motility po rozmrazení při 240 minutové ekvilibraci (-1,12 %).

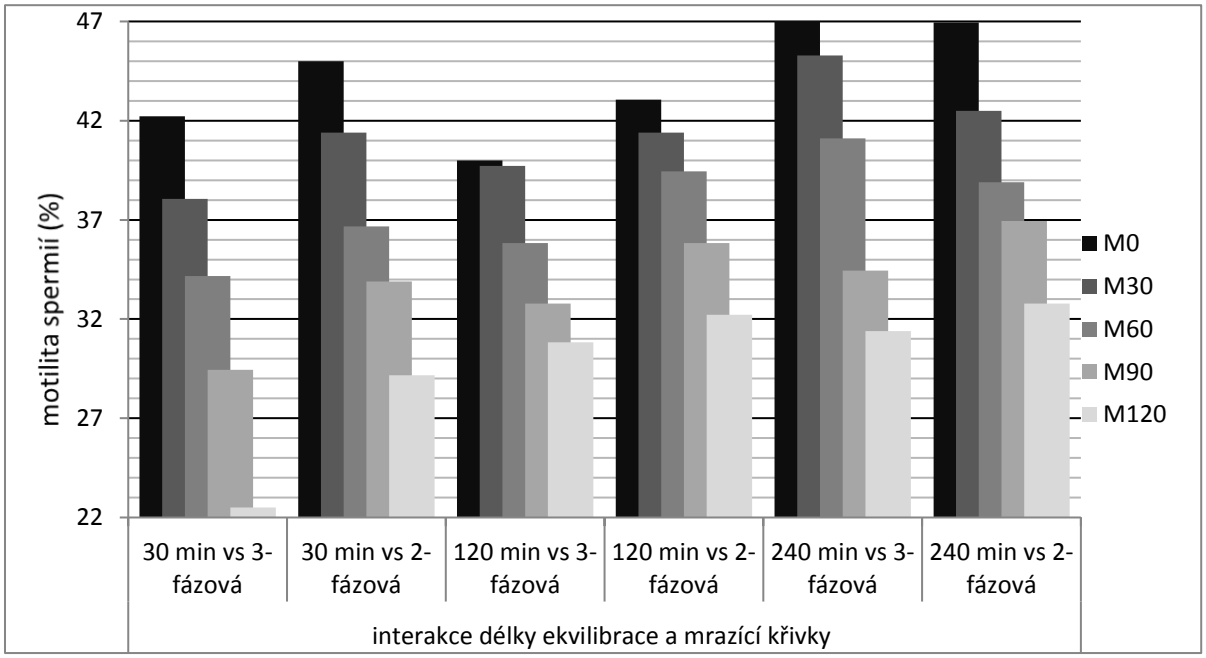
Z grafu je dále patrné, že čím je delší délka ekvilibrace, tím vyšší jsou hodnoty motility spermií. Nicméně, u kombinace 30 minutové délky ekvilibrace s 2-fázovou mrazicí křivkou bylo dosaženo vyšších hodnot motility spermií v porovnání se standardní variantou (120 min. ekvilibrace a 3-fázové mrazicí křivka). Tato fakta jsou podpořena výsledky průměrné motility spermií prezentovanými v Tabulce 4. Použití 2-fázové mrazicí křivky vedlo ke zvýšení motility spermií bez ohledu na délku ekvilibrace v porovnání se standardní kombinací 120 minutové ekvilibrace a 3-fázové mrazicí křivky. Nicméně, vyšší hodnoty motility spermií (40,06 %) byly determinovány za použití interakce délky ekvilibrace 240 minut a 3-fázové mrazicí křivky v porovnání s 30 (-6,78 %) a 120 minutovou ekvilibrací (-4,23 %). Podobných výsledků motility spermií bylo dosaženo při použití 2-fázové mrazící křivky. Nebyl zaznamenán žádný trend v poklesu motility spermií během TDT.

Tabulka 4 – Vliv interakce délka ekvilibrace-mrazicí křivka na pokles a průměrnou motilitu spermií a podíl živých spermií během termodynamického testu

Ekvilibrace x mrazící křivka	motilita spermií (%)		podíl živých spermií (%)	
	PMS	MS	PŽS	ŽS
	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
30 min. vs. 3-fázová	11,18 ± 1,133^{A,a}	33,28 ± 1,018^{A}	20,62 ± 7,306	19,18 ± 4,389^{a}
120 min. vs. 3-fázová	5,21 ± 1,133^{A,b}	35,83 ± 1,018^{a}	19,31 ± 7,306	22,87 ± 4,389
240 min. vs. 3-fázová	10,00 ± 1,133^{b}	40,06 ± 1,018^{A,a}	24,17 ± 7,306	19,50 ± 4,389^{b}
30 min. vs. 2-fázová	9,72 ± 1,133	37,22 ± 1,018	24,27 ± 7,306	26,62 ± 4,389
120 min. vs. 2-fázová	5,83 ± 1,133^{a}	38,39 ± 1,018^{A}	40,04 ± 7,306	40,29 ± 4,389^{a,b}
240 min. vs. 2-fázová	9,17 ± 1,133	39,61 ± 1,018^{A}	21,69 ± 7,306	29,91 ± 4,389

Pozn.: Stejná písmena v horním indexu dokumentují statistickou významnost rozdílu – A ($P < 0,01$), a, b ($P < 0,05$); PMS – pokles motility spermií; MS – průměrná motilita spermií; PŽS – pokles % živých spermií; ŽS – průměrný podíl živých spermií během termodynamického testu; LSM – průměr nejmenších čtverců; SE – střední chyba průměru

Graf 3 – Vliv interakce délka ekvilibrace-mrazící křivka na průměrnou motilitu spermií během termodynamického testu; M0, M30, M60, M90, M120 – procentická motilita spermií po rozmrazení, resp. 30, 60, 90 a 120 min. termodynamického testu



3. Závěr a doporučení pro praxi

Na základě námi dosažených výsledků lze konstatovat, že čím je doba ekvilibrace delší, tím je vyšší motilita spermií během termodynamického testu trvajícím 120 minut po rozmrazení. Inseminační dávky mrazené pomocí 2-fázové mrazicí křivky prokázaly vyšší hodnoty motility spermií i podílu živých spermií po rozmrazení v porovnání s 3-fázovou mrazicí křivkou. V rámci hodnocení vlivu interakce délka ekvilibrace-mrazicí křivka, byly detekovány podobné trendy. Současně byl potvrzen vliv individuality plemenného býka jako významný.

Zjištění naznačují nutnost detekovat a následně aplikovat optimální kombinaci délky ekvilibrace a mrazicí křivky pro jednotlivého plemenného býka, která potenciálně umožní zajištění vyšší efektivity výroby zvýšením počtu produkovaných inseminačních dávek a udržení vyšší oplozovací schopnosti rozmrazené inseminační dávky podporující zájem chovatelů o jejich aplikaci při zajištění reprodukce stáda.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V metodice jsou uvedeny metody a vlastními výsledky výzkumně ověřené metodické postupy kryokonzervace ejakulátu býků. Uváděné informace o vlivu délky ekvilibrace a typu mrazící křivky na oplozovací schopnost inseminačních dávek jsou výsledkem výzkumné činnosti autorů a výsledkem systematického studia vědecké literatury v oblasti metod používaných 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

V zájmu každého producenta inseminačních dávek je minimalizace nákladů na výrobu umožňující zvýšení konkurenceschopnosti podniku a dosažení co nejvyššího zisku. Kromě genetické kvality plemenných býků rozhoduje o úspěchu producentů inseminačních dávek také kvalita a množství vyrobených inseminačních dávek. Hlavním cílem je vyrobit dávky v požadované kvalitě, tedy s vysokou oplozovací schopností. Nedostatečná úroveň reprodukce dojnic je jedním z hlavních ekonomických problémů současného chovu nejen u nás, ale i ve světě.

Ekonomický přínos potenciálně umožněný realizací navrhovaných doporučení lze spatřovat v optimálním využití ejakulátu býků, které povede ke zvýšení kvality inseminačních dávek býků. Navrhovaná doporučení mohou vést dále ke zvýšení počtu vyrobených inseminačních dávek z jednoho odběru býka. Cena inseminačních dávek se pohybuje od cca 70,- Kč u býků v procesu testačního připařování až po cca 900,- Kč u kvalitních prověřených býků zlepšovatelů. Udržení, resp. zvýšení oplozovací schopnosti inseminačních dávek potenciálně může představovat významný ekonomický přínos pro chovatele dojnic. Zabřezávání dojnic dlouhodobě klesá a aktuálně se dostalo již na hranici 40 %. Jalová

plemenice ve stádě představuje finanční ztrátu, protože dochází k oddálení její budoucí užitkovosti při současném poklesu užitkovosti současné. Prodlužování mezidobí přináší zvyšování individuálních nákladů doprovázené snižováním tržeb. Podle posledních ekonomických analýz se jedná o částku ztráty v rozpětí 60-70 Kč za každý den prodlouženého mezidobí. Další přínos lze spatřovat v intenzivnějším přenosu genetické informace do chovů, což ve svém důsledku vede k celkovému zlepšení populace daných plemen.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Andrabi S.M.H. (2007): Fundamental principles of cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 367-369.

Arav A., Zeron Y., Ocheretny A. (2000): A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53, 248-249.

Awad M.M. (2011): Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123, 157-162.

Beran J., Stádník L., Ducháček J., Toušová R., Louda F., Štolc L. (2011): Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59, 37-44.

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 Tierzucht-Archives Animal Breeding*, 55, 207-218.

Beran J., Stádník L., Ducháček J., Okrouhlá M., Doležalová M., 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, 28-34.

Beran J., Šimoník O., Stádník L., Rajmon R., Ducháček J., Krejcárková 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 Mendelianae Brunensis*, 61, 1575-1581.

Beran J., Stádník L., Doležalová M., Toušová R. (2014): *Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu*. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, ČR, 1. vydání, 30 s. ISBN: 978-80-213-2537-1.

Bois S., Len J.A., Parlevliet J.M., Eilts B.E. (2012): Effects of cooling time on membrane integrity and motility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk-based extenders at two different cooldown equilibration times. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 278-280.

Clulow J.R., Mansfield L.J., Morris L.H.A., Evans G., Maxwell W.M.C. (2008): A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 108, 298-308.

Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. (1992): Effect of various cooling rates (from 30 deg to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos taurus and Bos bubalis semen. *Theriogenology*, 38, 565-574.

Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G., Jani V.R. (1996): Effects of different variables on the freezability, post-thawed longevity and fertility in buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, 46, 109-120.

Doležalová M., Stádník L., Biniová Z., Ducháček J., Beran J. (2015): The effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84, 383-391.

Dzyuba V., Cosson J., Dzyuba B., Rodina M. (2015): Oxidative stress and motility in tench Tinca tinca spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 250-255.

Forero-Gonzales R.A., Celeghini E.C.C., Raphael C.F., Andrade A.F.C., Bressan F.F., Arruda R.P. (2012): Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44, 154-159.

Gao D., Mazur P., Critser J.K. (1997): Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A.M., Critser J.K. (eds.) (1997): *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press San Diego, USA.

Gil J., Januskauskas A., Haard M., Johannisson A., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H. (2000): Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reproduction in Domestic Animals*, 35, 69-77.

Graham J.K, Mocé E. (2008): In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 105, 104-118.

Januskauskas A., Gil J., Soderquist L., Haard M.G.M., Haard M.C., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (1999): Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52, 641-658.

Kristan J., Hatef A., Alavi S.M.H., Policar T. (2014): Sperm morphology, ultrastructure, and motility in pikeperch Sander lucioperca (Percidae, Teleostei) associated with various activation media. *Czech Journal of Animal Science*, 59, 1-10.

Leite T.G., de Vale Filho V.R., de Arruda R.P., de Andrade A.F.C., Emerick L.L., Zaffalon F.G., Martins J.A.M., Andrade V.J. (2010): Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120, 31-38.

Lemma A. (2011): Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: Manafi (eds.) (2011): *Artificial insemination in farm animals, InTech, Chapters published*. Vienna, Austria.

Linhartová Z., Rodina M., Guralp H., Gazo I., Saito T., Pšenička M. (2014): Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (Tinca tinca). *Czech Journal of Animal Science*, 59, 381-390.

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, ČR.

Meamar M., Shahneh A.Z., Zamiri M.J., Zeinoaldini S., Kohram H., Hashemi M.R., Asghari S. (2016): Preservation effects of melatonin on the quality and fertility of native Fars rooster semen during liquid storage. *Czech Journal of Animal Science*, 61, 42-48.

Muchlisin Z.A., Nadiah W.N., Nadiya N., Fadli N., Hendri A., Khalil M., Siti-Azizah (2015): Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, Clarias gariepinus, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 10-15.

Muiño R., Fernándéz M., Peña A.I. (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, 305-311.

Rubio-Guillen J., Gonzalez D., Garde J.J., Esteso M.C., Fernandez-Santos M.R., Rodriguez-Gil J.E., Madrid-Bury N., Quintero-Moreno A. (2007): Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 354-357.

Saragusty J., Gacitua, H., Petit M.T., Arav A. (2007): Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 610-615.

Shahverdi A., Rastegarnia A., Topraggaleh T.R. (2014): Effect of Extender and Equilibration Time on Post Thaw Motility and Chromatin Structure of Buffalo Bull (Bubalus Bubalis) Spermatozoa. *Cell journal*, 16, 279-288.

Šimoník O., Šichtař J., Krejcárková A., Rajmon R., Stádník L., Beran J., Doležalová M., Biniová Z. (2015): Computer Assisted Sperm Analysis – the relationship to bull field

fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 85, 3-11.

Špaleková E., Makarevich A., Stádník L., Kubovičová E. (2014): Motility and viability of bull sperm in relation to incidence of malformed sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 95-96.

Stádník L., Ducháček J., Beran J., Toušová R., Ptáček M. (2015a): Relationships between milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows. *Animal Reproduction Science*, 155, 75-79.

Stádník L., Rajmon R., Beran J., Šimoník O., Doležalová M., Šichtař J., Stupka R., Folková P. (2015b): Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 84, 125-131.

Talevi R., Pelosi S., Sansone G., Graso F., Matasino D. (1994): Effect of different prefreezing rates on buffalo sperm motility and ultrastructure preservation. In: Vale W.G., Barnabe V.H., de Mattos J.C.A. *Proceedings of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo, Brazil*. International Buffalo Federation, Roma, Italy, 537-539.

Tuncer P.B., Sariozkan S., Bucak M.N., Ulutas P.A., Akalin P.P., Buyukleblebici S., Canturk F. (2011): Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, 75, 1459-1465.

Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová, P. (2004): *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno.

Zhang X.G., Hong J.Y., Yan G.J., Wang Y.F., Li Q.W., Hu J.H. (2015): Association of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 256-262.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Doležalová M., Stádník L., Biniová Z., Ducháček J., Stupka R. (2016): Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61, 2016 (11): 515–525. doi: 10.17221/23/2016-CJAS

Doležalová M., Stádník L., Biniová Z., Ducháček J., Beran J. (2015): Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno* 84(4):383-391. doi: 10.2754/avb201584040383.

Stádník L., Doležalová M., Ducháček J. (2015): Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky. *Uplatněná certifikovaná metodika*, certifikace 21.12.2015, č.j. 17210/2015-5, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, ČR, 1. vydání, 27 s. ISBN: 978-80-213-2615-6.

Stádník L., Rajmon R., Beran J., Šimoník O., Doležalová M., Šichtař J., Stupka R., Folková P. (2015): Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno* 84(2):125-131.

Doležalová M., Stádník L., Vodička J. (2014a): Přídavek kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků. *Náš chov* 45(7):24-25.

Doležalová M., Stádník L., Vodička J. (2014b): Chlazení a ekvilibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov* 45(6):22-23.

Beran J., Stádník L., Doležalová M., Toušová R. (2014): Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. *Uplatněná certifikovaná metodika*, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, ČR, 1. vydání, 30 s. ISBN: 978-80-213-2537-1.

Stádník L., Beran J., Doležalová M., Ducháček J., Toušová R. (2014): Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků. *Uplatněná certifikovaná metodika*, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-8, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, ČR, 1. vydání, 35 s. ISBN: 978-80-213-2536-4.

Doležalová M., Stádník L., Beran J. (2013): Inseminace – intenzifikační faktor reprodukce. *Náš chov* 73(10):56-57.

VIII. DEDIKACE

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení výzkumného projektu MZe NAZV QJ1210109 a „S“ grantu MŠMT.

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

Název publikace: **Vliv délky ekvilibrace na kvalitativní ukazatele inseminační dávky**

Autoři: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Ing. Martina Doležalová, Ph.D.
Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

Tisk: Copy Centrum Powerprint
Kamýcká 129
165 00 Praha - Suchdol

Náklad: 30 ks

Počet stran: 26

Vydání: první
Rok vydání: 2016

Vydáno bez jazykových úprav.

Publikace je neprodejná.

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

ISBN 978-80-213-2710-8