

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

Katedra speciální zootechniky



**Vliv metabolické aktivity dojnice na kvalitu říjového hlenu
a přežitelnost spermií**

Disertační práce

Autor: Ing. Jan Beran

Školitel: prof. Ing. Ladislav Štolc, CSc.

Konzultant: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „**Vliv metabolické aktivity dojnice na kvalitu říjového hlenu a přežitelnost spermií**“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne:

Podpis autora

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval mému školiteli prof. Ing. Ladislavu Štolcovi, CSc. a mému konzultantovi doc. Ing. Lud'ku Stádníkovi, Ph.D. za odborné vedení v průběhu doktorského studia a za cenné rady a připomínky během zpracování disertační práce. Rovněž bych rád poděkoval všem spolupracovníkům z Katedry speciální zootechniky, zejména Ing. Monice Okrouhlé, Ph.D., Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ing. Veronice Kadlecové, Ing. Michaele Nejdlové a Ing. Martině Doležalové za jejich pomoc při realizaci experimentů. V neposlední řadě bych velice rád poděkoval všem svým přátelům a své rodině za nekonečnou podporu a trpělivost při mém studiu.

Obsah

1 ÚVOD	6
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
2.1 Činitelé ovlivňující plodnost dojnic	6
2.1.1 Tělesná kondice	7
2.1.2 Močovina v mléce	8
2.1.3 Aceton v mléce	9
2.1.4 Cervikální hlen	10
2.1.4.1 Arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu.....	10
2.1.4.2 Složení cervikálního hlenu	14
2.1.4.3 Test přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.....	15
2.2 Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu.....	16
2.2.1 Kompenzovatelné a nekompenzovatelné vady spermií	17
2.2.2 Kvalitativní a kvantitativní ukazatelé ejakulátu býka	17
2.2.2.1 Makroskopické posouzení.....	18
2.2.2.2 Mikroskopické posouzení	18
2.2.2.2.1 Koncentrace spermií	18
2.2.2.2.2 Motilita spermií	19
2.2.2.2.3 Stanovení živých a mrtvých spermií	19
2.2.2.2.4 Morfologie spermií	20
2.2.3 Stanovení živých a mrtvých spermií	19
2.2.2.4 Morfologie spermií	20
2.3 Biotechnologické metody v chovu skotu	21
2.3.1 Inseminace	21
2.3.2 Konzervace ejakulátu	22
2.3.2.1 Odběr semene.....	22
2.3.2.2 Ředění	23
2.3.2.3 Ekvilibrace a zchlazování	24
2.3.2.4 Mrazení a uchovávání spermatu.....	25
2.3.2.5 Hodnocení zmrazeného spermatu	26
2.3.3 Sexované sperma býků	26
3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	28
4 MATERIÁL A METODY	29
4.1 Zvířata.....	29
4.2 Odběr vzorků	29
4.3 Hodnocení kvality cervikálního hlenu	29
4.4 Odběr, hodnocení a konzervace ejakulátu	31
4.5 Hodnocení přežitelnosti spermií	32

4.6	Statistické zhodnocení výsledků	33
4.6.1	Vyhodnocení vlivu pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu.....	33
4.6.2	Vyhodnocení vztahů mezi ukazateli metabolismu dojnic a kvalitou jejich cervikálního hlenu	34
4.6.3	Vyhodnocení vlivu kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií	35
4.6.4	Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků	35
5	VÝSLEDKY.....	37
5.1	Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru dojnic	37
5.2	Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru býků	39
5.3	Vliv pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu	42
5.3.1	Vliv pořadí laktace	43
5.3.2	Vliv úrovně užitkovosti	44
5.3.3	Vliv změny BCS jeden měsíc před inseminací	45
5.3.4	Vliv změny BCS od otelení do inseminace.....	47
5.3.5	Korelační analýza	48
5.4	Vliv úrovně metabolismu dojnic na kvalitu cervikálního hlenu	51
5.4.1	Vliv obsahu močoviny v mléce.....	51
5.4.2	Vliv obsahu acetonu v mléce	52
5.4.3	Korelační analýza	53
5.5	Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií.....	54
5.5.1	Vliv krystalizace cervikálního hlenu.....	54
5.5.2	Vliv obsahu močoviny v cervikálním hlenu.....	55
5.5.3	Vliv obsahu acetonu v cervikálním hlenu	56
5.5.4	Korelační analýza	57
5.6	Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků.....	58
5.6.1	Vliv plemene	59
5.6.2	Vliv věku plemenků.....	61
5.6.3	Vliv BCS plemenků.....	62
5.6.4	Korelační analýza	63
6	DISKUSE.....	66
6.1	Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru dojnic a býků.....	66
6.2	Vliv pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu	69
6.3	Vliv úrovně metabolismu na kvalitu cervikálního hlenu dojnic	69
6.4	Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií.....	71
6.5	Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků.....	72
7	ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ PRO VYUŽITÍ POZNATKŮ V PRAXI	74
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77

1 ÚVOD

Plodnost dojnic se za posledních 5 desetiletí velmi snížila (Walsh *et al.*, 2011; Flint, 2006). Tento pokles má několik důvodů: selekci zaměřenou na zvýšení produkce mléka (Hanuš *et al.*, 2010), chyby v řízení stáda dojnic (Vacek *et al.*, 2007), zejména nevhodnou výživu zvířat (LeBlanc, 2010) a nedostatečnou detekci říje (Ježková *et al.*, 2008). Klesající reprodukční schopnost dojnic je patrná ve všech chovatelsky vyspělých zemích (Lucy, 2001; Roche *et al.*, 2000; Royal *et al.*, 2000; Macmillan *et al.*, 1996). Podobný trend dokumentují výsledky kontroly užitekosti (KU) v České republice: průměrná úroveň plodnosti dojnic je nedostatečná, kdy zabřezávání krav po 1. inseminaci bylo v roce 2011 na hodnotě pouze 40,3% a u jalovic 60,0% přičemž u krav byl pokles zabřezávání za posledních 5 let o 1,5% a u jalovic o 2,0%. Současně se v ČR v letech 2007–2011 snížil podíl poprvé inseminovaných dojnic v populaci z 94,0% na 89,1%, resp. podíl zabřezlých plemenic z 87,4% na 82,0%. (Kvapilík *et al.*, 2012). Aktuálně je tedy populace dojnic ve stavu zmenšování podílu inseminovaných krav při současném snižování úrovně jejich zabřezávání. Vzhledem k ekonomickému významu plodnosti je tato situace dlouhodobě neudržitelná a také hrozí riziko neschopnosti zabezpečit prostou reprodukci populace, tedy udržení počtu chovaných dojnic. V současné době se hledají cesty, jak tento nepříznivý trend zvrátit.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Činitelé ovlivňující plodnost dojnic

Mezi významné vlivy, které negativně ovlivňují plodnost dojnic, patří negativní energetická bilance (NEB) v první fázi laktace (Walsh *et al.*, 2011). NEB je v praxi nejčastěji hodnocena pomocí sledování aktuální tělesné kondice (BCS) dojnic (Aktas *et al.*, 2011) a jejich změn (Ducháček *et al.*, 2012). Úroveň metabolismu dojnic můžeme také sledovat obsahem pevných složek v mléce, zejména tuku a bílkovin a jejich poměrem (Hanuš *et al.*, 2011a), obsahem acetonu (Clark *et al.*, 2006), močoviny (Řehák *et al.*, 2009) anebo kyseliny citronové (Kubešová *et al.*, 2009) v mléce. Dále můžeme využít jako indikátoru potenciální plodnosti skotu složení cervikálního hlenu dojnic (Zaaijer *et al.*, 1993).

2.1.1 Tělesná kondice

Průběh NEB můžeme sledovat změnami v hodnotách BCS dojníc (Ducháček *et al.*, 2012). Hodnocení BCS je jednoduchá metoda vhodná ke kontrole energetických zásob nejen jednotlivých dojníc, ale i celého stáda. Je založena na subjektivním hodnocení metabolisovatelných energetických zásob v tukové tkáni (Aktas *et al.*, 2011). BCS byla přijata jako nejpraktičtější metoda pro hodnocení změn v energetických zásobách u mnoha druhů hospodářských zvířat, včetně dojeného skotu (Bewley a Schutz, 2008).

Je doporučováno zajistit hodnocení krav ve skupině a celého stáda jednou za měsíc. Jestliže tato frekvence není možná, pak by se hodnocení mělo provádět alespoň v 6 základních obdobích laktačního a reprodukčního cyklu. Mezi těchto 6 základních termínů patří: hodnocení za období stání na sucho, při otelení a přibližně ve 45., 90., 180. a 270. dnu laktace (Pavlata *et al.*, 2009). Takto podrobné a pečlivé sledování BCS přináší chovateli cenné informace o energetických rezervách a je v úzkém vztahu k produkci, reprodukci a zdraví dojníc (Loker *et al.*, 2012).

Použití 5 bodové stupnice s odchylkou 0,25 bodu je vhodným nástrojem k detekci problémů ve výživě dojníc (Roche *et al.*, 2009). U krav s extrémními hodnotami BCS (<1,5 a >4) dochází podle Pryce *et al.* (2000) ke zhoršování reprodukčních ukazatelů. Podle tohoto autora jsou ale mnohem důležitější změny BCS v průběhu laktace než její aktuální stav. Maršálek *et al.* (2008) zjistili pokles kondice během prvních šesti měsíců laktace z 3,59 na 2,43 bodu a úroveň méně než 2,5 bodu při zabřeznutí. Dále zjistili, že k nejvýznamnějšímu poklesu kondice dochází do třetího měsíce po otelení a že v průběhu laktace kondice poklesla o 1,16 bodu. Podle Amer (2008) je pro udržení produkce důležité minimalizovat ztráty BCS v průběhu prvních týdnů laktace. Vztahem mezi BCS a mléčnou produkcí se zabývali např. Berry *et al.* (2007). Nejvyšší mléčnou užitkovost za laktaci měly krávy s hodnotou BCS 4,25. Nicméně krávy otelené při hodnotě BCS 3,5 vyprodukovaly pouze o 68 kg mléka za laktaci méně než krávy otelené při hodnotě BCS 4,25. Krávy, které při otelení měly hodnotu BCS 3,25 nebo 3,0, nadojily ještě o 50 až 114 kg mléka za laktaci méně. Garnsworthy (2006) předpokládá, že krávy s vyšší úrovní tělesné kondice mají při otelení tendenci ztratit více tělesného tuku než hubenější krávy. Podle Bastin *et al.* (2010) mají krávy s nízkou kondicí na počátku laktace problémy se zabřeznutím na první inseminaci.

2.1.2 Močovina v mléce

Močovina v tělních tekutinách je velmi vhodným metabolickým parametrem, neboť se jedná o ukazatel využití jak sacharidů, tak dusíkatých látek, které se na ovlivnění reprodukce z pohledu výživy značně podílí (Kubešová *et al.*, 2009). Močovina je považována za konečný produkt přeměny dusíkatých látek (Řehák *et al.*, 2009). Jednotlivé dusíkaté látky podléhající v předžaludcích mikrobiální fermentaci se postupně štěpí za vzniku amoniaku, který může být opětovně využíván bachorovou mikroflórou. Přebytek amoniaku se rychle vstřebává přes stěnu předžaludků a odchází portálním krevním oběhem do jater, kde je syntetizován na močovinu (Sova *et al.*, 1990). Ureogeneze představuje pro organismus značnou zátěž, neboť odebírá jaterním buňkám potřebnou energii ve formě ATP a také asparágovou aminokyselinu (Guo *et al.*, 2004).

Močovina syntetizovaná v játrech se dostává do krve, odkud přechází do ledvin, kde se z velké části vyloučí močí. Močovina také přechází do ostatních tělních tekutin (mléko, sliny) a reprodukčních orgánů. Podstatná je difuze z krve do předžaludků prostřednictvím bachorové stěny nebo slinných žláz, kde se močovina znovu štěpí bakteriální ureázou na amoniak, který buď opětovně difunduje, nebo slouží jako zdroj dusíku pro mikrobiální proteosyntézu. Z důvodu této neustálé cirkulace močoviny mluvíme o „hepatoruminálním oběhu dusíku“, který je však závislý na koncentraci amoniaku v krevní plazmě, úrovni degradovatelného dusíku a pH bachoru, které je značně ovlivňováno přítomností amoniaku. Uvolněním většího množství amoniaku se alkalizuje bachorové prostředí, stoupá pH a v důsledku toho převládá ze dvou obvykle přítomných forem amoniaku forma NH_3 , která je snadno dostupná a podněcuje vznik intoxikace. Zároveň klesá podíl ionizované formy NH_4 , která je prakticky buněčnými stěnami nepropustná (Sova *et al.*, 1990).

Koncentrace močoviny v mléce je ve velmi úzké korelaci s koncentrací močoviny v krvi, proto jsou fyziologické hodnoty v obou těchto biologických tekutinách shodné a pohybují se v rozmezí 2,5–5 mmol/l (145,2 až 290,4 mg/l) (Pechová, 2009). Nízká úroveň močoviny v mléce indikuje buď nedostatek proteinu v krmné dávce, nebo jeho nedostatečné využití (Guo *et al.*, 2004). Zvýšené koncentrace močoviny v krvi a v mléce mají vliv na snížení reprodukčních schopností a zdravotního stavu laktujících krav (Chaveiro *et al.*, 2011; Miglior *et al.*, 2006). Jankowska *et al.* (2010) udávají optimální

koncentraci močoviny v mléce, umožňující úspěšné zabřeznutí krávy, v rozmezí 150 – 300 mg/l.

Výkyvy v koncentraci močoviny v plazmě nebo mléce korelují s poklesem fertility u krav. Vysoká úroveň močoviny v plazmě je zároveň spojena s vytvořením suboptimálních podmínek pro proces oplození a vývoj embrya. Zároveň náročná syntéza močoviny vede k prohloubení energetického deficitu. Kontrolou hladiny močoviny v mléce a produkcí složek je možné zachytit určité metabolické zatížení dojnic a jednotlivými korekcemi upravit krmnou dávku tak, aby zabezpečovala požadovanou úroveň produkce a reprodukce (Hanuš *et al.*, 2004).

Stanovení obsahu močoviny v mléce je analýza standardně dostupná v KU České republiky, resp. v případě zájmu chovatele i mimo systém KU. Z důvodu snadné dostupnosti vzorků mléka se hodnocení úrovně metabolismu dojnic pomocí sledování obsahu mléčné močoviny zdá být velmi výhodné a lze jej doporučit chovatelům.

2.1.3 Aceton v mléce

Obsah mléčného acetonu může být vhodným nástrojem k monitorování NEB u dojnic, zejména během kritického období na počátku laktace (Heuer *et al.*, 2001). Koncentrace acetonu v mléce souvisí s výskytem subklinických a klinických ketóz, mléčnou užitkovostí a reprodukční výkonností krav (Gustafsson a Emanuelson, 1996).

Ketózy jsou charakteristické odbouráváním tělesných energetických (především tukových) rezerv. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater, ale průběžně také ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách. Některé ketony mohou být dále metabolizovány, jiné (např. aceton) odcházejí z organismu zpravidla močí, dechem, potem a mlékem. Ketóza vzniká především u dojnic s vysokou dojivostí a vykazuje plíživý charakter nástupu a setrvačnost průběhu. V průběhu ketóz je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav. Kvalita mléka od dojnic s mastitidními problémy je zhoršena. Protože v subklinických případech takové mléko nelze ve stáji z dodávky rutinně vyřazovat na rozdíl od klinických mastitid, dostává se do mlékárny. Zde může ohrožovat kvalitu průběhu mlékárenských technologií. Sledování obsahu acetonu v mléce může pozitivně přispět k řešení metabolických problémů ve vysokoužitkových stádech dojnic, k jejich zdravotnímu stavu a k omezení ztrát z nemoci (Hanuš *et al.*, 2004).

Podle Pechové (2009) by koncentrace acetonu v mléce neměla překročit 0,4 – 1,0 mmol/l (23,2–58,08 mg/l) a za výrazné zvýšení je považován vzestup nad 2 mmol/l (116,16 mg/l). Podle Hanuše *et al.* (1999) lze při vyšších hladinách acetonu v mléce pozorovat horšící se reprodukci dojnic. Podle Gustafssona a Emanuelsona (1996) klesá denní dojivost u dojnic s obsahem acetonu v rozmezí 0,7 až 1,4 mmol/l, u krav s obsahem acetonu >1,4 mmol/l se denní dojivost průkazně snižuje. Zároveň byla u těchto krav narušena reprodukční výkonnost. Dojnice s koncentrací acetonu v mléce >1,4 mmol/l měly o 4,9 dní delší inseminační interval a 5 až 7 krát větší riziko výskytu ovariálních cyst v porovnání s dojnicemi, které měly obsah acetonu <0,7. Jejich výsledky naznačují, že koncentrace 1,4 mmol/l acetonu v mléce může být použita jako kritická hodnota – vyšší koncentrace snižují mléčnou produkci.

2.1.4 Cervikální hlen

V době říje je vlivem estrogenů sekrečním epitelem děložního krčku produkováno zvýšené množství hlenu. Spermie úspěšně překonají tuto bariéru jen při vhodných podmínkách (Tsiligianni *et al.*, 2001a). Během říjového cyklu se mění jeho fyzikální vlastnosti. Na počátku říje je čirý, vodnatý a volně odtéká. Uprostřed říje se zahušťuje, je vazký, bez výraznějšího zákalu a vytváří provazec visící ven z pochvy. Ke konci říje hlenu podstatně ubývá a po jejím vyvrcholení se v něm někdy objevuje krev (Sova *et al.*, 1990)

2.1.4.1 Arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu

Cervikální hlen (CH), jakož i některé další tělní tekutiny (např. sliny), vytváří specifické krystalické formy. Krystalizaci CH lze pozorovat 3–4 dny před nástupem říje, intenzivněji pak v době říje, zaniká v době působení progesteronu (Ahmadi *et al.*, 2005).

Posouzením krystalizace CH je možno usuzovat na:

- přítomnost estrogenů v krevní plazmě (Guida *et al.*, 1999);
- fázi říjového cyklu (Hegedušová *et al.*, 2010);
- výskyt funkčních folikulárních cyst na vaječnicích (Hafez a Hafez, 2000);
- úroveň výživy, případně metabolickou poruchu (Na, K) (Ježková *et al.*, 2008);
- přítomnost zánětlivých procesů v pohlavních orgánech (Doležel *et al.*, 2009).

Průběh krystalizace lze podle stádia říje rozdělit následovně:

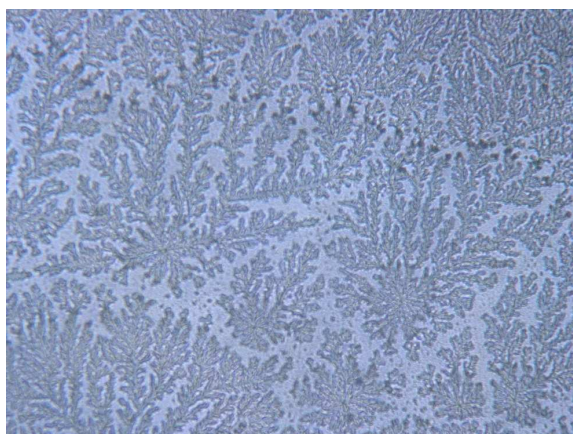
- *období před říjí* – jemné větvičkovité struktury (obrázek 1);
- *období těsně před říjí* – zřetelné holé stromkovité větvičky;
- *začátek říje* – plavuně řídké, později zhuštěné, postupně se větvcí (obrázek 2);
- *polovina říje* – forma plavuňovito-kaprad'ovitá (obrázek 3);
- *druhá polovina říje* – kaprad'ovitá krystalizace, která se až do ovulace zhušťuje a členitě se větvcí (obrázek 4);
- *po skončení říje* – objevují se krystaly, které bobtnají a rozpadají se (obrázek 5);
- *ve fázi žlutého tělíska* – krystaly se netvoří, u nezabřezlé plemenice se objevují až po 17. – 18. dni cyklu (Rob a Stehlík, 1983).

K abnormálním formám krystalizace dochází při zánětlivých onemocněních pohlavního ústrojí. V chovech s neadekvátní výživou, kde dochází ke zkrmování nekvalitních siláží, při nedostatku sušiny a hrubé vlákniny, při poruchách metabolismu bílkovin, glycidů nebo minerálního metabolismu, při intoxikacích apod. dochází k porušení hormonální rovnováhy organismu, ke snížení nebo naopak zvýšení hladiny estrogenů a k biochemickým změnám ve složení cervikálního a děložního sekretu, k poruchám sekrece epitelu děložního krčku. Pro tyto metabolické poruchy jsou charakteristické krystaly ve tvaru nepravidelných hvězdic, mečovité struktury a jinak nepravidelné krystaly nebo amorfní útvary (obrázek 6 a 7). Má-li kráva funkční folikulární cysty a poruchy spojené s nadprodukcí estrogenů, lze pozorovat typické kaprad'ovité krystalizace i mimo období říje (Rob a Stehlík, 1983).

Kvalitativní změny hlenu v období říje, projevující se například změnou hodnoty pH a elektrické vodivosti hlenu, umožňují klinickou diagnostiku nejvhodnějšího období říje pro provedení inseminace (Sova *et al.*, 1990).

Na obrázcích 1 – 7 je znázorněn mikroskopický obraz CH v různém období říje.

Obrázek 1: Větvičkovitá krystalizace cervikálního hlenu krávy v období proestru



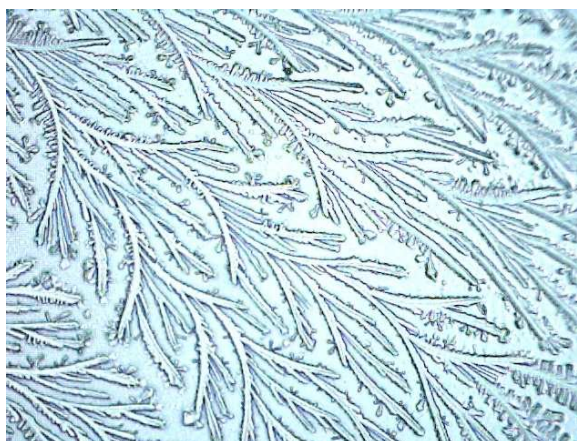
(Foto: Jan Beran)

Obrázek 2: Větvičkovito-plavuňovitá krystalizace cervikálního hlenu krávy na počátku říje



(Foto: Jan Beran)

Obrázek 3: Plavuňovitá krystalizace cervikálního hlenu krávy na počátku říje



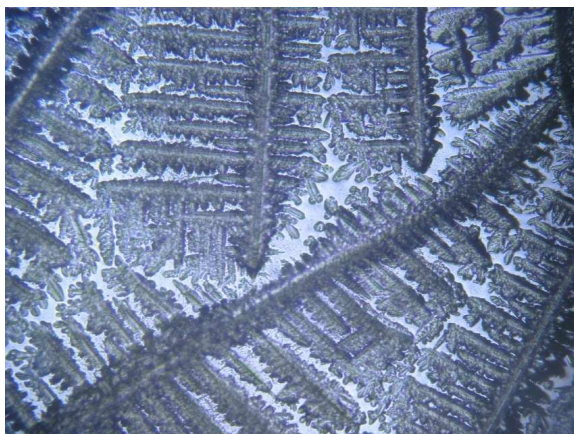
(Foto: Jan Beran)

Obrázek 4: Kaprad'ovitá krystalizace cervikálního hlenu krávy v optimální době pro inseminaci



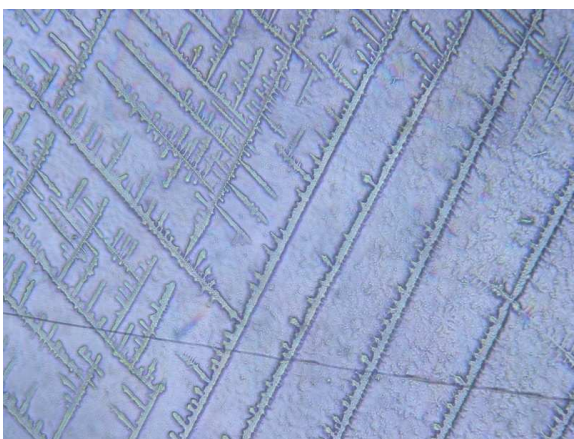
(Foto: Jan Beran)

Obrázek 5: Zbobotnalá krystalizace cervikálního hlenu krávy po skončení říje



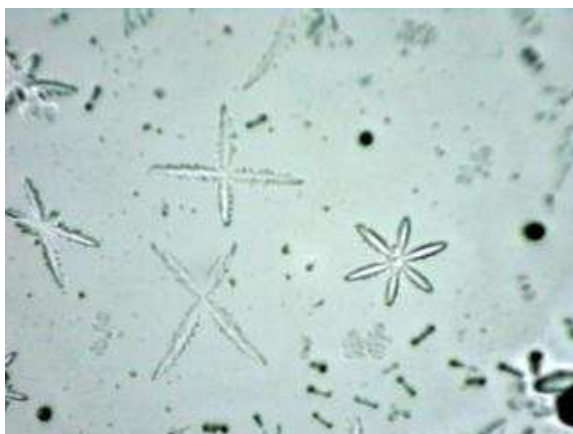
(Foto: Jan Beran)

Obrázek 6: Atypická krystalizace cervikálního hlenu krávy při metabolických poruchách



(Foto: Jan Beran)

Obrázek 7: Celularizace cervikálního hlenu krávy při zánětech



(Foto: Jan Beran)

2.1.4.2 Složení cervikálního hlenu

CH obsahuje 92–95% vody. Dalšími komponentami CH, kromě buněčných struktur, jsou polotuhé gelové složky a tekutina zvaná cervikální plasma. V cervikální plasmě jsou pak rozpuštěny látky s nízkou molekulární hmotností, jako např. elektrolyty, karbohydráty (glukóza a fruktóza), aminokyseliny, lipidy a rozpustné makromolekulární sloučeniny, jako např. proteiny a polysacharidy (Tsiligianni *et al.*, 2001b). Podle Hegedüšové *et al.* (2009) se mohou v CH hromadit některé toxické metabolity, jako např. močovina a aceton.

Močovina je tvořena poměrně malou molekulou, která je schopna procházet buněčnými membránami do ostatních orgánů. Výsledkem této difuze je její distribuce v organismu a možné zatížení jednotlivých orgánů, včetně reprodukčních (Hanuš *et al.*, 2004).

Obsah acetonu a močoviny v tělních tekutinách (mléce, krevním séru a CH) sledovali např. Hegedüšová *et al.* (2009). Zjistili, že obsah močoviny v CH byl signifikantně ($P < 0,001$) vyšší ($123,84 \pm 167,28$ mg/l) než v krevním séru ($32,10 \pm 9,89$ mg/l) a v mléce ($31,36$ mg/l $\pm 21,10$). Obsah močoviny v mléce a krevním séru se signifikantně nelišil ($P = 0,061$). Obsah acetonu v CH byl $5,46 \pm 8,63$ mg/l, v mléce $2,48 \pm 11,81$ mg/l a v krevním séru $3,08 \pm 8,55$ mg/l. Tyto dosažené hodnoty se mezi sebou signifikantně lišily ($P < 0,01$). Na základě těchto dosažených výsledků dospěli autoři k závěru, že toxické metabolity (aceton, močovina) se hromadí převážně v pohlavních orgánech krav. Vyslovili hypotézu, že tyto toxické komponenty mají vliv na skutečnou oplozovací schopnost spermií a úroveň reprodukce u vysokoprodukčních a metabolicky

stresovaných zvířat. Vyšší koncentrace acetonu a močoviny v CH než v mléce byla detekována také v práci Beran *et al.* (2012a). Vyššímu zastoupení močoviny v mléce odpovídal vyšší obsah močoviny, resp. acetonu v CH, který může omezovat schopnost dojnice zabřeznout, přičemž jako hraniční hodnotu obsahu močoviny v mléce stanovili 250 mg/l.

2.1.4.3 Test přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu

Spermie v pohlavních orgánech samic musí překonat značné vzdálenosti, aby se dostaly k místu oplození. Během této cesty musí úspěšně projít přes několik bariér. Do děložního krčku proniká pouze malé množství spermií, více než 95% spermií zůstává v pochvě, kde během několika hodin odumírají. V kanálku děložního rohu jsou životní podmínky pro spermie mnohem příznivější. Hlen děložního krčku působí jako filtr zadržující neživé spermie a různé mikroorganismy. Mírně kyselá reakce zde způsobuje útlum aktivity spermií, a tím i prodloužení jejich životnosti. Kanálek děložního krčku je tedy jakýmsi rezervoárem spermií, z něhož jsou postupně uvolňovány do dělohy. Další bariérou je pak ústí vejcovodů do děložních rohů (*isthmus*), který reguluje další postup spermií do vejcovodů (Sova *et al.*, 1990). Jednou z příčin zhoršené plodnosti plemenic je tedy nevhodné prostředí pro spermie v samičích pohlavních orgánech, zejména v děložním krčku. V takovém případě je velmi vhodné ověřit toxicitu CH pomocí testu přežitelnosti spermií v hlenu.

Tento test se provádí v případech poklesu plodnosti plemenic. Indikací těchto vyšetření je nízká březost po 1. i všech inseminacích, přebíhání plemenic a metabolické poruchy. Pokud dojde k zastavení pohybu spermií v CH do 30 min., jedná se o hlen s velmi silnou toxicitou. Pokud je zachován aktivní pohyb alespoň ojedinělých spermií po 5 hodinách, CH je bez spermiotoxického účinku (Rob a Stehlík, 1983).

Ježková *et al.* (2007) hodnotili výsledky reprodukce a zdravotní stav u 391 holštýnských krav a determinovali vztahy mezi těmito výsledky a testem přežitelnosti spermií během 30, 60 a 90 minut v CH. Vysoké procento zabřezávání bylo zjištěno u krav s kaprad'ovitou krystalizací CH ($P < 0,01$). Výsledky testu krystalizace CH ovlivnily výsledky testu přežitelnosti spermií. Nejvyšší pohyblivost spermií po 30, 60 a 90 minutách testu byla zjištěna v případech plavuňovité a kaprad'ovité krystalizace CH ($P < 0,05$). Nejnižší motilita spermií ve všech časech byla dosažena v hlenech s žádnou

nebo atypickou krystalizací ($P < 0,005$ resp. $P < 0,01$). Tyto výsledky byly potvrzeny o rok později (Ježková *et al.*, 2008). Nejlepších výsledků ($P < 0,01$) v zabřezávání (62,74%) dosahovaly dojnice, u nichž byly zjištěny v testu arborizace CH kaprad'ovité struktury (tzn. optimální doba pro inseminaci). Nejvyšší aktivita spermií ($P < 0,05$) byla detekována v případech plavuňovito–kaprad'ovité a kaprad'ovité krystalizace CH v čase 60 (14,8 a 13,82%) a 90 (7,96 a 8,47%) minut.

Matoušek *et al.* (1989) zkoumali prostupnost býčího spermatu cervikálním hlenem a dalšími tělními tekutinami (krevním sérem, ovariální tekutinou a semennou plazmou). Dospěli k závěru, že typ krystalizace a složení proteinů CH má signifikantní vliv na rychlost průniku spermií a na jejich pohyblivost. Vztahem mezi pohyblivostí spermií a ultrastrukturou cervikálního hlenu se zabývali také Rutlant *et al.* (2005). Taş *et al.* (2007) studovali vztah mezi fertilitou býků a přežitelností spermií v CH. Faktory ovlivňující přežitelnost spermií v CH studovali také Stádník *et al.* (2008).

2.2 Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu

Problematika plodnosti skotu v posledních letech byla a kontinuálně je intenzivně studována na straně plemenic a vlivů, které na jejich reprodukční výsledky působí (Piccand *et al.*, 2011; Roche *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2011; LeBlanc, 2010; Bezdíček a Louda, 2009; Stádník *et al.*, 2008; Garnsworthy *et al.*, 2008a; Garnsworthy *et al.*, 2008b; Vacek *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2006; Flint, 2006). Výsledek reprodukce dojnic nicméně ovlivňuje i tzv. samčí komponenta, která je reprezentována oplozovací schopností ejakulátu býka.

Kvalita ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory: vnitřními, jako je např. plemeno, individualita a věk plemeníka (Balic *et al.*, 2012; Beran *et al.*, 2011a; Hanuš *et al.*, 2011b; Bezdíček *et al.*, 2010; Strapák *et al.*, 2010; Štolc *et al.*, 2009a; Štolc *et al.*, 2009b; Bezdíček *et al.*, 2007) a vnějšími, ke kterým patří složení krmné dávky, obsah specializovaných krmných doplňků (Čeřovský *et al.*, 2009; Jacyno *et al.*, 2009), podmínky prostředí, četnost odběru ejakulátu (Karoui *et al.*, 2011; Wolf a Smital, 2009; Nichi *et al.*, 2006) a roční období (Hajirezaee *et al.*, 2010) nebo kalendářní měsíc u živočichů se sezónní sexuální aktivitou (Alavi *et al.*, 2010; Król *et al.*, 2011).

2.2.1 Kompenzovatelné a nekompenzovatelné vady spermií

Vztah mezi kvalitou ejakulátu a plodností můžeme sledovat pomocí komplexu kompenzovatelných a nekompenzovatelných vad spermií a jejich interakcí s množstvím spermií nutných k úspěšnému zabřeznutí plemence (Saacke *et al.*, 2008; Saacke *et al.*, 2000).

Jednotliví býci se mezi sebou odlišují v počtu spermií, který je nutný pro dosažení jejich maximální oplozovací schopnosti. Býci, kteří vyžadují větší množství spermií pro zajištění dobré oplozovací schopnosti, pravděpodobně mají větší procento takzvaných kompenzovatelných vad spermií. Jedná se o problémy spojené s pohyblivostí, integritou akrozómu a schopností spermie proniknout přes membrány oocyty. Přidáním většího množství takto poškozených spermií do inseminační dávky zajistíme ještě dobrou oplozovací schopnost (DeJarnette a Amann, 2010).

Nekompenzovatelné vady jsou takové, kdy ani přidání většího množství spermií nezajistí dobrou oplozovací schopnost inseminační dávky. Patří sem vady spojené s morfologií spermií a integritou DNA (Saacke *et al.*, 2008). Nekompenzovatelné vady vznikají zejména během spermatogeneze ve varlatech, mohou se zhoršovat vlivem letních vysokých teplot nebo zdravotních problémů býka (DeJarnette a Amann, 2010).

2.2.2 Kvalitativní a kvantitativní ukazatelé ejakulátu býka

Požadavky na kvalitu ejakulátu býka použitelného v inseminační praxi jsou uvedeny ve Vyhlášce MZe ČR č. 471/2000 Sb., v příloze č. 5, části I. B, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) ve znění pozdějších předpisů a novelizací. Tato vyhláška nahradila normu ČSN 467111 – Sperma býka.

Ejakulát se pravidelně kontroluje s cílem posoudit vhodnost ke zpracování na inseminační dávky. Hodnotí se též po mrazení, před uložením do banky semene a před vyskladněním z banky semene. Součástí těchto vyšetření jsou i metodické postupy zaměřené na kontrolu spermiogeneze býků zařazených v inseminačním provozu (Vinkler, 2009).

2.2.2.1 Makroskopické posouzení

Mezi základní metody vyšetření ejakulátu patří na prvním místě makroskopické (smyslové) posouzení. Hodnotí se objem, barva, konzistence, pach a cizí přímíseniny (Louda *et al.*, 2007).

Průměrné množství ejakulátu býka je kolem 6 g, Množství ejakulátu závisí na plemenné příslušnosti, individualitě a stáří býka, intenzitě využívání, způsobu odběru, krmení, ošetřování a dalších faktorech prostředí (Karoui *et al.*, 2011; Věžník *et al.*, 2004).

Barva ejakulátu býka je bílá nebo šedobílá, případně mírně nažloutlá vlivem β -karotenu z krmiva. Konzistence ejakulátu býka je smetanová až zrnitá, vodnatá nebo hlenovitá konzistence je nepřijatelná. Pach kvalitního ejakulátu býka připomíná pach čerstvě nadojeného mléka nebo je nevýrazný. Jakékoliv cizí přímíseniny v ejakulátu jsou nepřijatelné (Vinkler, 2009).

2.2.2.2 Mikroskopické posouzení

Mikroskopické vyšetření ejakulátu býka zahrnuje stanovení koncentrace, motility a rychlosti pohybu spermií, stanovení živých a mrtvých spermií a posouzení morfologie spermií (Karoui *et al.*, 2011; Bhoite *et al.*, 2008). Tyto parametry většinou ukazují na nedostatečnou reprodukční schopnost nebo neplodnost u býků (Rodriguez-Martinez, 1998).

2.2.2.2.1 Koncentrace spermií

Objektivní stanovení koncentrace (hustoty) spermií v ejakulátu se provádí hematocytometricky v Bürkerově komůrce (Bozkurt *et al.*, 2011). Tento postup je základním metodickým přístupem pro stanovení koncentrace spermií. Jedná se ovšem o postup velmi časově náročný a nedá se použít v případě, kdy potřebujeme rychle posoudit koncentraci spermií v ejakulátu během zpracování na inseminační dávky. Proto byly vyvinuty přístrojové metody měření koncentrace spermií (Rakitin *et al.*, 1999). Minimální koncentrace spermií v ejakulátu býka použitelného v inseminaci je 700 000 spermií v 1 mm³ (Louda *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Motilita spermií

Motilita spermií, její posuzování a kvalitativní hodnocení, patří mezi nejdůležitější metody vyšetření ejakulátu. Důležitá je i rychlost pohybu spermií. Proto se tyto dvě veličiny většinou hodnotí současně (Věžník *et al.*, 2004). Říha *et al.* (2004) doplňuje, že s prodlužující se dobou po odběru dochází u ejakulátu k tzv. vitální degeneraci spermií, při které se rychlost přímočarého pohybu zpomaluje a ten se mění na pohyb kruhový, postupně následuje pohyb přerušovaný a trhavý, později pohyb ustává.

Většina autorů považuje progresivní pohyb spermií za významný ukazatel pro odhad fertilizační schopnosti semene (Gillan *et al.*, 2008; Mocé a Graham, 2008). Hodnotí se charakter pohybu, určuje se směr a rozsah kmitů hlavičky spermie (Filipčík a Hanuláková, 2011). Z hlediska funkčního je pohyb spermií nutnou podmínkou jejich průniku do vaječné buňky. Proto je připravenost energie (ATP – adenosin trifosfát) výměnou látkovou základní potřebou buněčné vybavenosti každé spermie. Všechny faktory ovlivňující motilitu spermií, ovlivňují i výměnu látkovou a naopak (Věžník *et al.*, 2004).

Byl stanoven soubor faktorů ovlivňujících endogenně a exogenně motilitu spermií. Z endogenních se uvádí na prvním místě věk plemeníka, doba pobytu spermií v nadvarletí, doba mezi a po ejakulaci, zrání spermií – morfologické, fyziologické a biochemické, energetická zásoba ATP, membránový transport, pohyb bičíku, vazebné proteiny, aglutinační faktory, protilátky, detergenty, membránová integrita a úroveň aktivity receptorů. Z exogenních faktorů jsou to biofyzikální a fyziologické faktory jako: hydrodynamika, viskozita, osmolarita, pH prostředí, teplota, iontové složení resuspendačních tekutin, jako například epidydymální likvory, semenná plazma, vaginální prostředí, cervikální hlen, uterinní prostředí stejně jako i prostředí oviduktu. Na stimulaci i inhibici motility spermií se mohou podílet anorganické ionty (Cu, Zn, Cd, Mn, Hg), exkreční produkty, hormony, cyklické nukleotidy, kininy, vnější prostředí a imunochemické faktory (Hafez a Hafez, 2000).

2.2.2.3 Stanovení živých a mrtvých spermií

K prověření vitality spermií a funkčnosti jejich povrchových membrán můžeme využít stanovení živých a mrtvých spermií barvením. Jedná se o velmi jednoduchou

metodu, která je založena na faktu, kdy u mrtvých buněk prostupuje barvivo buněčnou membránou, zatímco živé spermie zůstávají neobarvené (Hoflack *et al.*, 2006). V ejakulátu býka smí být maximálně 30% mrtvých spermií (Louda *et al.*, 2007).

2.2.2.2.4 Morfologie spermií

Spermie se skládá z hlavičky a bičíku. Hlavička spermie připomíná tvarem tenisovou raketu. Délka hlavičky spermie je přibližně 10 μm a šířka 5 μm . Poměr délky a šířky hlavičky spermie je tedy 2 : 1. Základem hlavičky je kondenzovaná nukleoplazma krytá jadernou membránou. Na apikální konec hlavičky nasedá akrozom, který pokrývá přibližně polovinu hlavičky spermie. Obsahuje enzymy (hyaluronidázu a akroziny), které napomáhají průniku spermie přes obaly vajíčka. Pod akrozomem se nachází ekvatoriální segment, který má u býka srpkovitý tvar. Bazální část hlavičky má vykrojení, označované jako implantační jamka. Do ní zapadá rozšířená část bičíku, krček, označovaný jako implantační talíř, tvořený segmentovanými chordami. Další část bičíku tvoří spojovací část (též mitochondriální oddíl) – hlavní a terminální část. Středem bičíku probíhají dvě dutá vlákna – mikrotubuly. Kolem nich se nachází prstenec 9 dvojic vláken (tzv. dublety) – jedno je plné, druhé duté (mikrotubula). Z plného vlákna vystupují 2 výběžky tvořené bílkovinou dyneinem, směřující k druhému vláknu druhé dvojice – předpokládá se, že jsou nezbytné pro pohyb spermií. Soubor 2 centrálních osových vláken a 9 dvojitých vláken se označuje jako axonema. Na ni nasedá vnější prstenec 9 plných vláken (hladké chordy), které se ztenčují a postupně vytrácejí. V celém svém průběhu s výjimkou terminální části je komplex vláken držen pohromadě fibrózní keratinoidní pochvou. Mitochondriální oddíl bičíku spermie býka je 15 μm (v poměru k délce hlavičky 1,5 : 1). Vyznačuje se přítomností 90 mitochondrií, které vytvářejí spirálu asi o 70 závitěch, které nasedají na komplex vláken bičíku. Jsou v nich uloženy enzymy (reduktázy), které se podílejí na zajištění kontrakcí bičíku dodáváním energie přes ATP. Terminální oddíl bičíku (4 μm) je tvořen uvolněnými mikrotubuly, takže v mikroskopu vypadá jako štětka. Celý povrch spermie pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která je tvořena převážně fosfolipidy (Vinkler, 2009).

Podle výskytu změn na spermiích lze zpětně posuzovat tvorbu spermií (spermatogenezi) a jejich dozrání i kvalitu prostředí, ve kterém se spermie nacházejí.

Primární vývojové změny vznikají v průběhu spermiogeneze až po pasáž spermií do ocasu nadvarlete. Mezi primární změny se řadí např. změny tvaru hlavičky, její báze, změny v nukleoplazmě spermií a vývojové anomálie bičíku (Chemes a Sedo, 2012).

Sekundární (získané) změny vznikají při delším pobytu spermií v ocasu nadvarlete a po styku spermií se změněnými sekrety přídatných pohlavních žláz. Sekundární změny na spermiích vznikají též při nesprávné manipulaci s ejakulátem, použitím nevhodných ředidel, v důsledku chladového šoku a během konzervace. Řadíme mezi ně zejména změny na akrozomu a torze bičíku (Vinkler, 2009).

V ejakulátu býka, který má být použit na zpracování na inseminační dávky, může být do 20% morfologicky změněných spermií, z toho primárních změn smí být celkově do 10%, nezralých spermií s protoplazmatickou kapkou do 2% a změn na akrozomu do 10%. Pokud se změny vyskytují ve větším množství, mohou vyvolávat poruchy plodnosti (Louda *et al.*, 2007).

2.3 Biotechnologické metody v chovu skotu

2.3.1 Inseminace

Inseminace krav je plošně nejrozšířenější biotechnologickou metodou (Foote *et al.*, 2002). Stala se nejen celosvětově, ale i u nás v neobyčejně krátké době nástrojem intenzity a stabilizace reprodukčního procesu skotu (Říha *et al.*, 2004). Přispívá ke zlepšení reprodukčních vlastností a genetického zisku, je důležitým nástrojem pro selekci a plemenitbu skotu (Gravance *et al.*, 2009).

Z počátku bylo býčí sperma před použitím ředěno a konzervováno jen krátkodobě, po dobu maximálně 96 hod. (Verberckmoes *et al.*, 2005). Byly prokázány negativní změny v buněčných membránách spermií v závislosti na délce uložení a na použitém ředidle (např. Frydrychová *et al.*, 2010). K rozhodující kvalitativní změně ve využití inseminace došlo však teprve po úspěšném vývoji metod kryokonzervace a dlouhodobého uchovávání býčího spermatu v tekutém dusíku a jejím zavedením do široké praxe. Soustavné zvyšování intenzity zapouštění a výsledků březosti jak u krav, tak zejména u jalovic, vedlo k trvalému vzestupu počtu narozených telat a k celkovému zintenzivnění efektu reprodukce. Inseminace v tomto směru sehrála nezastupitelnou roli při stupňování produkce

a ekonomiky chovu (Louda *et al.*, 2008). 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.*, 2002a), sexaci spermií (DeJarnette, 2010), odběr, mrazení, kultivaci a přenos embryí (Říha *et al.*, 1998) nebo klonování (Liu *et al.*, 2010).

2.3.2 Konzervace ejakulátu

V současné době jsou v inseminační praxi používány různé metodické postupy konzervace býčího spermatu. Výběr vhodného postupu je velmi důležitý. Každá etapa zpracování ejakulátu od jeho odběru až po produkci inseminačních dávek (ředění, plnění do pejet, zchlazování, ekvibrace, mrazení, uložení a manipulace s dávkami) je velmi důležitá a ovlivňuje výslednou oplozovací schopnost spermií v inseminační dávce (Siddique *et al.*, 2006).

2.3.2.1 Odběr semene

Pro volbu metody odběru ejakulátu je rozhodující, za jakým účelem se ejakulát získává. Ejakulát může být získáván pro potřeby umělé inseminace, za účelem prevence poruch plodnosti nebo pro vědecko-výzkumná sledování (Vinkler, 2009).

Základním metodickým přístupem k získání ejakulátu od býka pro účely inseminace je odběr do umělé pochvy. V případě nezdaru odběru do umělé pochvy je možné k získání ejakulátu využít masáže ampulí chámovodu a měchýřkovitých žláz nebo elektroejakulace (Hafez a Hafez, 2000).

Vlastní odběr na umělou pochvu se provádí na živou atrapu (jiný klidný býk) nebo fantom (pevně zabudovaný nebo mobilní). K vlastnímu odběru se využívá zkrácená pochva s jednorázovým sběračem, která musí mít v době odběru teplotu 39–42°C, kluzkost a odpovídající tlak (530 kPa), aby došlo k podráždění receptorů na hrotu pyje a k vyvolání reflexu ejakulace. Po vzeskoku býka provede pracovník odebírající ejakulát vychýlení pyje v místě předkožky (nesmí uchopit pyj za sliznici) a nastaví připravenou pochvu před hrot pyje. Po kontaktu pyje se správně připravenou umělou pochvou dojde k zasunutí pyje do pochvy spojené s dorazem a nástupem reflexu ejakulace, která trvá necelou vteřinu (Louda *et al.*, 2007).

2.3.2.2 Ředění

Složení ředidel významně ovlivňuje životaschopnost a oplozovací schopnost spermií v inseminační dávce (Siddique *et al.*, 2006). Jednu skupinu tvoří ředidla žloutková, jejichž základní komponentou je již od roku 1939 vaječný žloutek. Je stále populární, ačkoliv přidáním čerstvého žloutku se složení ředidla stává velmi variabilním (Amirat *et al.*, 2004). Jejich použití je doporučováno, protože výborně chrání spermatické buňky (Beran *et al.*, 2011b; Celeghini *et al.*, 2008). Nicméně od používání vaječného žloutku jako kryoprotektiva se v poslední době upouští, protože představuje velké hygienické riziko (Thun *et al.*, 2002). Kromě toho, některé studie (např. Amirat *et al.*, 2005) prokázaly, že ředidla na bázi vaječného žloutku mohou mít negativní vliv na respiraci a pohyblivost spermií. Proto byla snaha odebrat celý vaječný žloutek z ředidel spermatu býků (Pace a Graham, 1974). Tito autoři čistili vaječný žloutek ultracentrifugací a objevili, že frakce žloutku známá jako LDL (low-density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou) má kryoprotektivní účinky. Je tedy výhodné do ředidla dodat pouze kryoprotektant vyextrahovaný z vaječného žloutku než celý vaječný žloutek (Moussa *et al.*, 2002). K purifikaci vaječného žloutku se standardně využívá hustotní gradientová centrifugace (Pace a Graham, 1974). Tato technika izolace poskytuje dokonale čistý LDL. Nicméně celý postup je velmi časově náročný a množství vyextrahovaného LDL je velmi malé, což brání komerčnímu využití této metody (Moussa *et al.*, 2002). V mnoha studiích bylo prokázáno, že LDL frakce má příznivý vliv na pohyblivost spermií, celistvost plazmatické membrány spermie, na morfologii spermií (Bencharif *et al.*, 2010) a kvalitně konzervuje býčí sperma a uchovává jeho oplozovací schopnost během mrazení/rozmrazení (Bencharif *et al.*, 2008).

Druhou skupinu pak tvoří ředidla bezžloutková, která neobsahují přísady živočišného původu. Jedná se o ředidla na bázi glycerolu, obsahující lecitin, bílkovinu získanou ze sójových bobů, jako náhradu za vaječný žloutek nebo žloutek a mléko (Thun *et al.*, 2002; Nehring *et al.*, 2005). Saragusty *et al.* (2009a) navrhli využít ke konzervaci býčího ejakulátu přísadek do ředidla OptiPrepTM, který obsahuje 60% iodoxanol. Tento preparát v různých koncentracích iodoxanolu přimíchali do běžně používaného bezžloutkového ředidla spermatu býků, obsahujícího sojový lecitin, do AndroMedu®. Dospěli k závěru, že iodoxanol má kryoprotektivní vlastnosti – napomáhá spermiím

v zachování jejich motility, integrity membrán, vytváří lepší prostředí pro spermie a brání vzniku ledových krystalů během mrazení a rozmrazení.

Bylo publikováno mnoho různých studií, které se zabývaly porovnáním různých typů ředidel spermatu býků a jejich vlivem na kvalitu inseminačních dávek a oplozovací schopnost spermií v nich obsažených (např. Celeghini *et al.*, 2008; Muino *et al.*, 2007; Stradaoli *et al.*, 2007; Herold *et al.*, 2003; Thun *et al.*, 2002). Této problematice jsme se věnovali také ve vlastním výzkumu (Beran *et al.*, 2012b). Byla porovnávána čtyři komerčně vyráběná ředidla: dvě bezžloutková – AndroMed® (Minitüb, GmbH, Tiefenbach, Německo) a Bioxcell® (IMV, L'Aigle, Francie) a dvě žloutková – Triladyl® (Minitüb, GmbH, Tiefenbach, Německo) a Optidyl® (Biovet, Fleurance, Francie). Pořadí ředidel podle přežitelnosti spermií bylo následující: 1. Optidyl®, 2. Triladyl®, 3. AndroMed®, 4. Bioxcell®, což poukazuje na vyšší kvalitu ejakulátu ředěného vaječným žloutkem. Rozdíly v pohyblivosti spermií byly statisticky významné ($P < 0,05 - 0,01$) v průběhu celého krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

2.3.2.3 Ekvilibrace a zchlazování

Další úpravou technologického procesu je způsob ekvilibrace a zchlazení inseminačních dávek. Během ekvilibrace je ejakulát zchlazen na teplotu 4–5°C. Toto zchlazení spermatu musí být provedeno za optimálních podmínek, protože savčí spermie jsou citlivé na rychlé zchlazení (Watson, 2000). Původně se mělo za to, že toto stadium je důležité pouze pro dostatečnou penetraci glycerolu do buněk spermií. Glycerol ovšem proniká do buněk velmi rychle, tudíž dostatečně dlouhé ekvilibrační období je nutné spíše pro adaptaci membrán spermií na nízké teploty během mrazení než pro prostup glycerolu do buněk (Vishwanath a Shannon, 2000). Běžná délka ekvilibrace při výrobě inseminačních dávek spermatu býků se pohybuje v rozmezí 3 až 4 hod., takže semeno se mrazí ještě v ten samý den odběru (Muino *et al.*, 2007). Nicméně tito autoři prokázali, že prodloužením ekvilibrace na 18 hod. (mrazení druhý den po odběru ráno) se zvýší oplozovací schopnost spermií. Dospěli k závěru, že takto prodloužená doba ekvilibrace je výhodná pro inseminační stanice, kde se odebírá najednou větší množství býků. Je proto praktičtější mrazit až druhý den ráno. Porovnáním různých délek ekvilibračního období se zabývali také Leite *et al.* (2010). Dospěli k závěru, že nejvyšší přežitelnost měly spermie ekvilibrované 4 hodiny.

2.3.2.4 Mrazení a uchovávání spermatu

Během zmrazování dochází ke složitým procesům přeměny skupenství vody a koncentrace roztoků v buňce i mimo ni a tím i k zatížení buněčné membrány, ke ztrátě její permeability (Kuisma *et al.*, 2006) a k poškození cytoskeletu, jádérka a pohybového aparátu spermie (Thun *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že kryokonzervace má nepříznivý vliv na oplozovací schopnost spermatu – během zmrazení a rozmrazení dojde k usmrcení až 50% spermií (Gravance *et al.*, 1998).

Při pomalém zchlazování nastávají tzv. „solution effects“, naopak velmi rychlé zchlazování spermií vede k tvorbě nitrobuněčného ledu – krystalů. Obecně je voda obsažená v ředidle i ve spermiích, mění se při mrazení v led, považována za letální – smrtící faktor (Curry, 2000). „Solution effect“ začíná v průběhu mrazení spermatu, při kterém dochází k vytlačování vody ze spermie, ve které se zvyšuje koncentrace solí, postupně dochází k dehydrataci spermie. Pokud je průběh mrazení příliš rychlý, voda nestačí spermii opustit. Voda, která zůstane v buňce, tvoří ledové krystaly. Schopnost buněčné membrány propouštět vodu je velmi důležitá. Rychlost mrazení -10°C až -20°C za minutu z 0°C na -50°C se jeví jako optimální. Glycerol tvoří přirozenou ochranu proti „solution effect“, redukuje jej, ale nevylučuje. Glycerol přítomný v buňce na sebe váže vodu při stejné teplotě a snižuje koncentraci solí. Poškození buňky nastává při mrazení i rozmrazování spermií a je závislé na délce doby strávené v tzv. „intermediální zóně“ při teplotě od -10°C do -50°C . (Louda *et al.*, 2008).

Vysoká koncentrace solí uvnitř spermie poškozuje její membránu. Dehydratace spermie při mrazení se projevuje zmenšováním objemu. K poškození spermie dojde, když se buňka zmenší pod hranici únosnosti a dojde k porušení její vnitřní struktury (Vishwanath a Shannon, 2000).

K plnění, mrazení a uchovávání semene se standardně využívají pejety o objemu 0,25 nebo 0,5 cm³. Nicméně kryokonzervace většího množství pejet je velmi zdoluhavá, finančně náročná, vyžaduje velké skladovací kapacity a značné množství tekutého dusíku. Alternativním postupem, který by snížil výše zmíněné náklady, může být mrazení veškerého ejakulátu v jedné tubě (12 cm³). Pokud býk bude zlepšovatelem a bude-li mezi chovateli zájem o jeho inseminační dávky, se tuby rozmrazí a semeno se znovu zamrazí v obvyklých pejetách (Arav *et al.*, 2002b). Mrazení velkého objemu semene je možné

prostřednictvím usměrněné technologie mrazení, která využívá multi-teplotního gradientu (MTG®; IMT Ltd., Ness Ziona, Israel). Semeno v tubě projde konstantní rychlostí skrz lineární teplotní gradient, takže rychlost zmrazování a tvorbu ledových krystalů lze během celého procesu dobře kontrolovat (Saragusty *et al.*, 2009b). Naproti tomu, během mrazení konvenční metodou (v párách tekutého dusíku) ledové krystaly nekontrolovaně rostou a mohou zničit buňky ve vzorku semene (Watson, 2000). Metoda dvojitého mrazení byla úspěšně vyzkoušena u různých druhů hospodářských zvířat, např. u jelenů (Gacitua a Arav, 2005), gazel (Saragusty *et al.*, 2006), delfínů (O' Brien a Robeck, 2006), králíků (Si *et al.*, 2006), koní (Saragusty *et al.*, 2007), nosorožců bílých (Reid *et al.*, 2009) a makaků (Si *et al.*, 2010). Saragusty *et al.* (2009b) aplikoval tuto metodu mrazení také u ejakulátu býků ředěného jedním z běžně používaných bezžloutkových komerčních ředidel, Andromedem®. Výsledkem byla stejná kvalitativní úroveň dávek vyrobených metodou dvojitého mrazení ve srovnání s klasickou technologií jednorázového mrazení pejet v párách tekutého dusíku dokumentovaná laboratorními testy *in vitro* ($P < 0,001$). Metodou dvojitého mrazení bylo také dosaženo uspokojivé úrovně zabřezávání krav a jalovic. Dospěli k závěru, že technologie dvojitého mrazení může být úspěšně využita při dlouhodobém uchovávání ejakulátu, sexování spermatu a uchovávání genových rezerv.

2.3.2.5 Hodnocení zmrazeného spermatu

Z biologického hlediska, pouze plně životaschopná spermie je potenciálně oplození schopná, proto jsou tyto metody založeny na hodnocení životaschopnosti spermií. Řadíme mezi ně zejména biologické zkoušky ejakulátu – dlouhodobý chladový a krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií, test na odolnost vůči chladovému šoku a stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením (Sutkeviciene *et al.*, 2009; Gillan *et al.*, 2008; Hoflack *et al.*, 2006; Věžník *et al.*, 2004).

2.3.3 Sexované sperma býků

V posledních dvou letech některé šlechtitelské firmy uvedly na trh sexované sperma. Je to výsledek letitého výzkumu. Myšlenka změny poměru pohlaví narozeného potomstva zaměstnávala vědecké pracovníky již od 70. let 20. století. Změna poměru pohlaví může mít významný dopad na ekonomiku produkce živočišné výroby a samozřejmě na genetický pokrok (Louda *et al.*, 2008).

Metoda je založena na rozdílu v množství DNA ve spermích. U skotu spermie s XX kombinací chromozómů mají o 3,8% více DNA a jsou těžší než spermie s XY kombinací chromozómů. Tento rozdíl způsobí, že jsou o trochu těžší a díky fluorescenčnímu barvivu, které se váže na DNA, jsou po ozáření laserem jasnější. Následně se spermii přidělí kladný náboj pro samičí pohlaví a záporný náboj pro samčí pohlaví. Podle náboje jsou na konci kapiláry spermie rozděleny. Metoda není stoprocentní, chyby se pohybují na úrovni cca 10 až 15% (Garner a Seidel, 2008).

Sexované semeno nemá žádný negativní dopad na narozená telata. Oproti běžnému semeni má jistou nevýhodu. Kvůli zdoluhavým výrobním postupům trvá delší dobu, než je sperma zmrazeno. Motilita a oplozovací schopnost spermíí klesá a následně se snižuje i míra zabřezávání o 15 až 20%. Vyrobí se také podstatně méně inseminačních dávek z jednoho odebraného ejakulátu býka (Louda *et al.*, 2008).

U sexovaných dávek je garantováno po rozmrazení pouze 1,6 – 2,1 milionu živých spermíí, kdežto konvenční inseminační dávky obsahují cca 15–20 milionů živých spermíí po rozmrazení (Frijters *et al.*, 2009).

3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Na základě detailního studia výše citované literatury předpokládáme, že úroveň metabolismu dojnice významně ovlivňuje kvalitu cervikálního hlenu. Existuje předpoklad, že kvalita cervikálního hlenu dojnice, jako ukazatel jejího metabolického stavu, ovlivňuje přežitelnost spermií býků se známou plodností. Současně lze předpokládat, že vysoká úroveň přežitelnosti je nezbytná pro úspěšné zabřeznutí dojnice.

Ze stanovených hypotéz vyplývají následující cíle práce:

- 1) Definovat vztahy mezi BCS dojnic a ukazateli metabolismu (močovina a aceton v mléce),
- 2) Vyhodnotit interakce mezi ukazateli metabolismu (močovina a aceton v mléce) a kvalitou cervikálního hlenu dojnic (arborizace, pH, aceton, močovina),
- 3) Určit vliv kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií býků se známou plodností,
- 4) Determinovat faktory, které ovlivňují kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Zvířata

Celkem bylo do sledování zařazeno 382 dojnic holštýnského plemene s ohledem na fázi reprodukčního cyklu, chovaných na farmě Ruda náležící k ŠZP Lány. 171 krav bylo hodnoceno v průběhu 1. laktace, 109 krav v průběhu 2. laktace a 102 krav v průběhu 3. a další laktace. Jejich průměrný denní nádoj byl v rozmezí 10,1 až 53,6 kg a mléčná užitkovost byla od 4 643 do 14 683 kg mléka za laktaci. Dojnice byly ustájeny ve volném boxovém stelivovém ustájení. Výživa byla zvířatům podávána ve formě směsné krmné dávky (TMR), která obsahovala kukuřičnou siláž, vojtěškovou senáž, slámu, luční a vojtěškové seno, pivovarské mláto, odpad z pekáren, melasu, komerčně vyráběné koncentráty a minerální doplňky. Zastoupení jednotlivých komponent v krmné dávce odpovídalo úrovni denního nádoje.

4.2 Odběr vzorků

Od výše zmíněné skupiny sledovaných dojnic byly v den jejich inseminace odebírány vzorky cervikálního hlenu a mléka. Z faremní evidence byla převzata data o výsledku sledované inseminace, o mléčné užitkovosti za sledovanou laktaci a v den, kdy byly dojnice inseminovány. Dále byla z faremní evidence převzata data z hodnocení BCS dojnic pro zjištění průběhu energetické bilance. BCS dojnic byla hodnocena zootechnikem farmy podle metodických pokynů pro holštýnský skot při zasušení (BCSzas), otelení (BCS0), v následných 6 měsících laktace (BCS1 – 6) a v den inseminace (BCSins) pomocí 5 bodové stupnice s odchylkou na 0,25 bodu (Parker, 1989).

4.3 Hodnocení kvality cervikálního hlenu

Vzorky cervikálního hlenu byly odebírány sterilní pipetou, rekto-vaginální metodou (Dabas a Maurya, 1988). Odebrané vzorky byly následně transportovány při 4°C do laboratoře katedry speciální zootechniky k jejich subjektivnímu a objektivnímu hodnocení. Subjektivně byl sledován jejich charakter a vzhled. Objektivně byla hodnocena jejich hmotnost, pH, obsah acetonu, močoviny, arborizace (krystalizace) a přežitelnost spermií v CH (spermioxicita CH).

Charakter a vzhled vzorků cervikálních hlenů byl posuzován podle předepsané metodiky (Rob a Stehlík, 1983).

Hmotnost byla zjišťována vážením na automatické váze TB – 224A od firmy Denver Instrument®.

Ke zjištění pH byl použit pH metr 330i od firmy WTW®.

Aceton byl stanovován na plynovém chromatografu (GLC) Master GC od firmy Dani® (DANI Instruments S.p.A.; Itálie) hade-space metodou: vzorky hlenu nebo mléka byly odměřeny do 20 ml hade-space vialek a do každé vialky bylo přidáno 10 ml nasyceného roztoku NaCl. Vialky byly následně ponořeny do vodní lázně, vytemperované na 70°C na dobu 1 hodiny. Po této době byly vialky vyjmuty a odpipetovalo se 5 µl plynu z horní části každé vialky, pomocí gas mikropipety do injektoru s teplotním režimem 50 °C (1 minuta), po 10 °C/1 minutu až do 55 °C s výdrží 1 minuty. Byla použita kolona typu FAMEVAX o délce 30 m. Pro detekci vzorku byl použit detektor FID. Výsledná koncentrace acetonu ve vzorku byla vyhodnocena v závislosti na kalibrační acetonové řadě programem Clarity.

Obsah močoviny byl stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 528 nm na spektrofotometru GENESYS 10vis od firmy Thermo Fischer Scientific® podle upravené metodiky pro stanovení močoviny ve vodě ve spolupráci s Katedrou chemie, ČZU v Praze: vzorky mléka nebo hlenů byly naváženy do kádinek a naředěny podle potřeby destilovanou vodou (5 ml). Následně byly vzorky homogenizovány pomocí přístroje Silent Crusher M od firmy Heidolph Instruments®. Do odměrných baněk bylo následně odpipetováno 0,5 ml zhomogenizovaných vzorků a doplněno destilovanou vodou na objem 5 ml. Poté byla připravena série kalibračních vzorků a slepý pokus podle návodu. Do všech baněk, včetně kalibračních vzorků a slepého pokusu, bylo přidáno 15 ml předem připraveného činidla podle návodu. Poté byly baňky vloženy do sušárny, vyhřáté na 120°C, na dobu 40 min. Po této době byly baňky vyjmuty, ochladily se na 20°C a doplnily destilovanou vodou po rysku (na celkový objem 25 ml). Obsah baněk byl následně promíchán a změřen na spektrofotometru v 1 cm kyvetě při vlnové délce 528 nm. Poté byla sestrojena kalibrační křivka, ze které byly odečteny hodnoty obsahu močoviny ve vzorku, které byly následně přepočteny na mg/l.

Test arborizace (krystalizace cervikálního hlenu) byl proveden podle standardní metodiky (Hegedušová *et al.*, 2010): ze vzorků cervikálních hlenů byly provedeny roztěry na podložní mikroskopická sklíčka. Po zaschnutí byly roztěry posouzeny mikroskopicky (Nikon® Eclipse E200) při 200 násobném zvětšení a byl vyhodnocen typ jejich krystalizace podle standardní metodiky (Hegedušová *et al.*, 2010; Burdych *et al.*, 2004): 1. větvičkovitá – (V); 2. plavuňovitá – (P); 3. kaprad'ovitá – (K); 4. plavuňovito-kaprad'ovitá – (P + K); 5. zbobtnalá – (Z); 6. atypická – (A); 7. celularizace – (C); 8. bez krystalizace – (B).

Dále byl proveden krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií (spermiotoxicity) v cervikálním hlenu (Ježková *et al.*, 2008; Stádník *et al.*, 2008). Motilita spermií byla hodnocena mikroskopicky. Procento progresivně se pohybujících spermií bylo odečteno na mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon® Eclipse E200). Motilita spermií byla sledována na počátku a dále pak po 30, 60 a 90 minutách trvání testu v suchém termostatu (Thermo-block, FALC®) při teplotě 38 ± 1 °C.

4.4 Odběr, hodnocení a konzervace ejakulátu

Byla vybrána skupina 16 býků holštýnského a 15 býků českého strakatého plemene s rozdílnou plemennou hodnotou pro plodnost, chovaných na 1 inseminační stanici. Vybraní býci byli ve věku 1 až 7 let, se stejnou frekvencí odběru jednou týdně. Býkům byla podávána stejná krmná dávka: seno (10 kg), sláma (5 kg), sojový 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 minerálů 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 byl odebrán vzorek ejakulátu standardním postupem do umělé vagíny (Louda *et al.*, 2007) v září 2009 a květnu 2010. Zároveň byla u býků v den jejich odběru hodnocena tělesná kondice pomocí 5 bodové stupnice s odchylkou na 0,25 bodu podle metodiky pro holštýnský nebo český strakatý skot.

Odebrané ejakuláty byly hodnoceny ihned po odběru školeným personálem inseminační stanice dle standardní metodiky (Věžník *et al.*, 2004): množství (na automatické váze Scout Pro, OHAUS®), koncentrace spermií v ejakulátu (spektrofotometricky, spektrofotometr SPEKOL II), aktivita spermií (subjektivně, za pomoci mikroskopu s fázovým kontrastem MEOPTA®), přítomnost cizích přímísenin, barva a pach. Mimo to bylo provedeno stanovení procenta živých/mrtvých spermií barvením podle standardní metodiky (Hoflack *et al.*, 2006): na předehřáté podložní sklíčko se kápala kapka spermatu a eosínu, obě kapky se smíchaly a ze směsi byly provedeny roztěry, které po zaschnutí byly hodnoceny mikroskopicky na mikroskopu Nikon® Eclipse E200 v laboratoři Katedry speciální zootechniky při 1 000 násobném zvětšení za použití olejové imerze. Posuzovalo se 200–400 spermií na 4 místech podložního sklíčka. Živé spermie byly nezbarvené na černém pozadí. Růžově zbarvené spermie byly mrtvé. Spermie zbarvené jen na hlavičce nebo mající zbarvenou jen polovinu hlavičky byly odumírající a byly zařazeny mezi mrtvé. Dále bylo provedeno morfologické vyšetření spermatu metodou Wels II. (Věžník *et al.*, 2004): z každého vzorku ejakulátu byly ihned po odběru provedeny roztěry, které byly po zaschnutí obarveny postupně v roztoku konžské červeně, bromthymolové modři a Janusové zeleně. Morfologické vady spermií byly hodnoceny mikroskopicky na mikroskopu Nikon® Eclipse E200 v laboratoři Katedry speciální zootechniky při 1 000 násobném zvětšení za použití olejové imerze. Bylo hodnoceno 200 spermií z každého roztěru.

Ejakuláty byly použity k výrobě inseminačních dávek standardním postupem: ejakuláty byly naředěny AndroMedem® (Minitüb, GmbH, Tiefenbach, Německo), komerčně vyráběným ředidlem na bázi sojového lecitinu a glycerolu. Naředěný ejakulát byl 10 min. promícháván, následně naplněn do pejet o objemu 0,25 cm³ (IMV, L'Aigle, Francie), zchlazen na 4 °C, 90 min. ekvilibrován a následně mrazen metodou postupného zmrazování na teplotu -105°C v automatickém zmrazovači (IMV-Digitcool, L'Aigle, Francie) a uložen do kontejneru s tekutým dusíkem.

4.5 Hodnocení přežitelnosti spermií

Přežitelnost spermií byla hodnocena pomocí rozdílné motility spermií, která byla posuzována subjektivně za použití mikroskopu s fázovým kontrastem Eclipse E200, od firmy Nikon® při 200 násobném zvětšení ihned po odběru (AKT), po naředění

(RED) a po zmrazení/rozmrazení ejakulátu (MRA). U všech tří typů hodnocení následoval krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií, kdy jejich motilita byla odečtena na počátku testu a následně po 30, 60 a 90 min. trvání testu v suchém termostatu (Thermo-block, FALC®) při teplotě 38 ± 1 °C.

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 39 ± 1 °C a vloženy do předehřáté zkumavky s citrátem sodným. Mrazené sperma bylo použito také pro hodnocení přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

4.6 Statistické zhodnocení výsledků

Ze získaných údajů postupně vznikala v programu MS Excel rozsáhlá databáze dat. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu SAS (SAS/STAT® 9.1., 2009), kde bylo použito obecného lineárního modelu a metody nejmenších čtverců. Statistická průkaznost byla hodnocena následovně:

- * statisticky nízce významný rozdíl – 95%, ($P < 0,05$);
- ** statisticky středně významný rozdíl – 99%, ($P < 0,01$);
- *** statisticky vysoce významný rozdíl – 99,9%, ($P < 0,001$);
- bez významnosti.

4.6.1 Vyhodnocení vlivu pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu

Do tohoto vyhodnocení byl zařazen celý soubor plemenic (382 krav) a pro potřeby statistického vyhodnocení byl rozdělen na 3 skupiny podle pořadí laktace, úrovně mléčné užitkovosti za sledovanou laktaci a podle změn tělesné kondice jeden měsíc před inseminací nebo od otelení do inseminace. Pro statistické zhodnocení byla potom použita následující modelová rovnice (1):

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + e_{ijkl};$$

Y_{ijkl} = hodnota závisle proměnné (užitkovost za laktaci v kg mléka, procento tuku v mléce za laktaci, množství tuku v mléce za laktaci v kg, procento bílkovin v mléce za laktaci, množství bílkovin v mléce za laktaci v kg, nádoj v den inseminace v kg, obsah močoviny v mléce v den inseminace v mg/l, obsah acetonu v mléce v den inseminace v mg/l);

μ = průměrná hodnota závisle proměnné;

A_i = fixní efekt i – té skupiny podle pořadí laktace (i = 1. laktace, n = 171; 2. laktace, n = 109; 3. a další laktace, n = 102);

B_j = fixní efekt j – té skupiny podle úrovně mléčné užitkovosti za sledovanou laktaci (j = do 7 790, 99 kg, n = 95; od 7 791,00 do 10 716, 99 kg, n = 181; od 10 717,00 kg, n = 106);

C_k = fixní efekt k – té změny tělesné kondice jeden měsíc před inseminací (i = do -0,25, n = 75; beze změny, n = 203; nad 0,25, n = 104) nebo změny tělesné kondice od otelení do inseminace (j = do -0,50, n = 171; -0,25, n = 101; nad 0, n = 110);

e_{ijkl} = zbytková chyba.

4.6.2 Vyhodnocení vztahů mezi ukazateli metabolismu dojníc a kvalitou jejich cervikálního hlenu

Do tohoto vyhodnocení byl zařazen soubor pouze 62 ks. plemenic, vybraných z celkového souboru 382 ks. sledovaných dojníc, u kterých byl hodnocen obsah acetonu a močoviny v mléce v den inseminace. Jedná se o skupinu plemenic sledovanou v rámci řešení projektu SGS FAPPZ 21320/1312/3183: „Porovnání obsahu acetonu a močoviny v mléce a cervikálního hlenu dojníc a jejich vliv na zabřezávání“. Výsledky tohoto projektu byly zařazeny do předkládané doktorské disertační práce. Pro potřeby statistického vyhodnocení byl tento soubor plemenic rozdělen na 3 skupiny podle obsahu acetonu nebo močoviny v mléce. Ke statistickému vyhodnocení byla využita následující modelová rovnice (2):

$$Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij};$$

Y_{ij} = hodnota závisle proměnné (pH, obsah močoviny v CH v mg/l, obsah acetonu v CH v mg/l);

μ = průměrná hodnota závisle proměnné;

D_i = fixní efekt i – tého obsahu močoviny v mléce (i = do 200 mg/l, n = 20; od 200,1 do 249,9 mg/l, n = 21; od 250 mg/l, n = 21) nebo obsahu acetonu v mléce (i = do 1,64 mg/l, n = 20; od 1,65 do 2,33 mg/l, n = 21; od 2,34 mg/l, n = 21);

e_{ij} = zbytková chyba.

4.6.3 Vyhodnocení vlivu kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií

Do tohoto vyhodnocení byla zařazena skupina 159 ks. plemenic, vybraných z celkového souboru 382 ks. plemenic, u kterých byla hodnocena přežitelnost spermií v cervikálním hlenu. Pro potřeby statistického vyhodnocení byl tento soubor plemenic rozdělen na 8 skupin podle krystalizace cervikálního hlenu a na 3 skupiny podle obsahu acetonu nebo močoviny v hlenu. Pro vyhodnocení byla použita následující modelová rovnice (3):

$$Y_{ij} = \mu + E_i + e_{ij};$$

Y_{ij} = hodnota závisle proměnné (motilita spermií na počátku, po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu);

μ = průměrná hodnota závisle proměnné;

E_i = fixní efekt i – té skupiny podle krystalizace CH (i = sk. 1 – větvičkovitá krystalizace, $n = 1$; sk. 2 – plavuňovitá krystalizace, $n = 1$; sk. 3 – kaprad'ovitá krystalizace, $n = 52$; sk. 4 – plavuňovito-kaprad'ovitá krystalizace, $n = 23$; sk. 5 – zbobtnalá krystalizace, $n = 31$; sk. 6 – atypická krystalizace, $n = 31$; sk. 7 – celularizace, $n = 14$; sk. 8 – bez krystalizace, $n = 6$) nebo obsahu acetonu v CH (i = do 5,25 mg/l, $n = 48$; od 5,26 do 14,51 mg/l, $n = 59$; od 14,52 mg/l, $n = 52$) nebo obsahu močoviny v hlenu (i = do 260,40 mg/l, $n = 47$; od 260,41 do 524,92 mg/l, $n = 47$; od 524,93 mg/l, $n = 65$);

e_{ij} = zbytková chyba.

4.6.4 Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků

Do tohoto vyhodnocení byla zařazena skupina 31 býků, od kterých byly získány vzorky ejakulátu, jak je popsáno v metodice. Pro potřeby statistického vyhodnocení byl tento soubor býků rozdělen na 2 skupiny podle plemene nebo věku plemeníka a na 3 skupiny podle jejich BCS. Pro vyhodnocení byla použita následující modelová rovnice (4):

$$Y_{ijkl} = \mu + F_i + G_j + H_k + e_{ijkl};$$

Y_{ijkl} = hodnota závisle proměnné (objem ejakulátu v g, koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$, procento živých a patologických spermií v ejakulátu, motilita spermií odečtená ihned po odběru, po naředění a po zmrazení/rozmrazení inseminační dávky a v časech 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu);

μ = obecná hodnota závisle proměnné;

F_i = fixní efekt i – té skupiny podle plemene (i = holštýnské plemeno, $n = 16$; české strakaté plemeno, $n = 15$);

G_j = fixní efekt j – té skupiny podle věku býků (j = do 3 let věku včetně, $n = 14$; ve stáří 4 a více let, $n = 17$);

H_k = fixní efekt k – té skupiny podle BCS sledovaných býků (k = do 2 bodů, $n = 8$; od 2,25 do 2,5 bodu, $n = 15$; od 2,75 bodu, $n = 8$);

e_{ijkl} = zbytková chyba.

5 VÝSLEDKY

5.1 Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru dojnic

Základní statistické charakteristiky sledovaných ukazatelů u dojnic jsou uvedeny v Tabulce 1. Průměrná užitkovost sledované skupiny dojnic činila 9 230,1 kg mléka s rozpětím od 4 643 do 14 683 kg mléka za sledovanou laktaci.

Množství nadojeného mléka v den inseminace dojnic se pohybovalo v rozmezí 10,1 až 53,6 kg mléka, průměrný nádoj v den inseminace potom činil 29,2 kg mléka.

Obsah tuku v mléce se pohyboval od 2,71 do 5,22% resp. od 230 do 500 kg tuku za sledovanou laktaci, průměrný obsah mléčného tuku potom činil 3,84% resp. 351,1 kg.

Obsah bílkovin v mléce dojnic byl v intervalu 2,72 až 4,59% resp. 174 až 430 kg, průměrný obsah bílkovin v mléce za sledovanou laktaci potom činil 3,22% resp. 296 kg.

Močovina a aceton v mléce v den inseminace byly sledovány pouze u skupiny 62 ks plemenic (viz výše). Průměrný obsah močoviny v mléce byl 225,29 mg/l s rozpětím od 77,50 do 362,95 mg/l. Průměrný obsah acetonu v mléce byl 6,18 mg/l s rozpětím od 0,39 do 237,63 mg/l.

Ukazatele kvality CH (pH, obsah močoviny a acetonu) nebyly hodnoceny u všech odebraných vzorků vlivem různého a mnohdy nedostatečného množství hlenů ve vzorku, který neumožňoval provést všechny laboratorní analýzy.

pH bylo sledováno u 323 vzorků CH. Průměrné pH u hodnocených vzorků činilo 8,62 s rozpětím od 7,31 do 9,69.

Obsah močoviny byl hodnocen u 511 vzorků hlenů, jeho průměrný obsah byl 597,74 mg/l s rozpětím od 12,72 do 4 863,19 mg/l.

Obsah acetonu byl hodnocen u 461 vzorků hlenů, jeho průměrný obsah byl 26,22 mg/l s rozpětím od 0,10 do 966,11 mg/l.

Krystalizace CH byla hodnocena u všech 595 hodnocených vzorků hlenů. Hodnota aritmetického průměru (\bar{x}) u jednotlivých typů krystalizace udává jejich procentické zastoupení ve sledovaném souboru. Větvičkovitá krystalizace se vyskytovala v 0,67% případech, plavuňovitá krystalizace v 5,04% případech, kaprad'ovitá krystalizace

měla zastoupení z 34,96% hodnocených vzorků, plavuňovito-kaprad'ovitý typ krystalizace byl detekován u 13,61% vzorků, zbobtnalá krystalizace se vyskytovala u 24,71% vzorků, atypická krystalizace byla nalezena u 14,62% hodnocených vzorků a celularizace a hleny bez krystalizace se vyskytovaly shodně z 3,19%.

Přežitelnost spermií byla hodnocena u 174 vzorků hlenů. Průměrná motilita spermií na počátku testu přežitelnosti byla 53,28%, po 30 min. 46,35%, po 60 min. 36,29% a po 90 min. 26,15%.

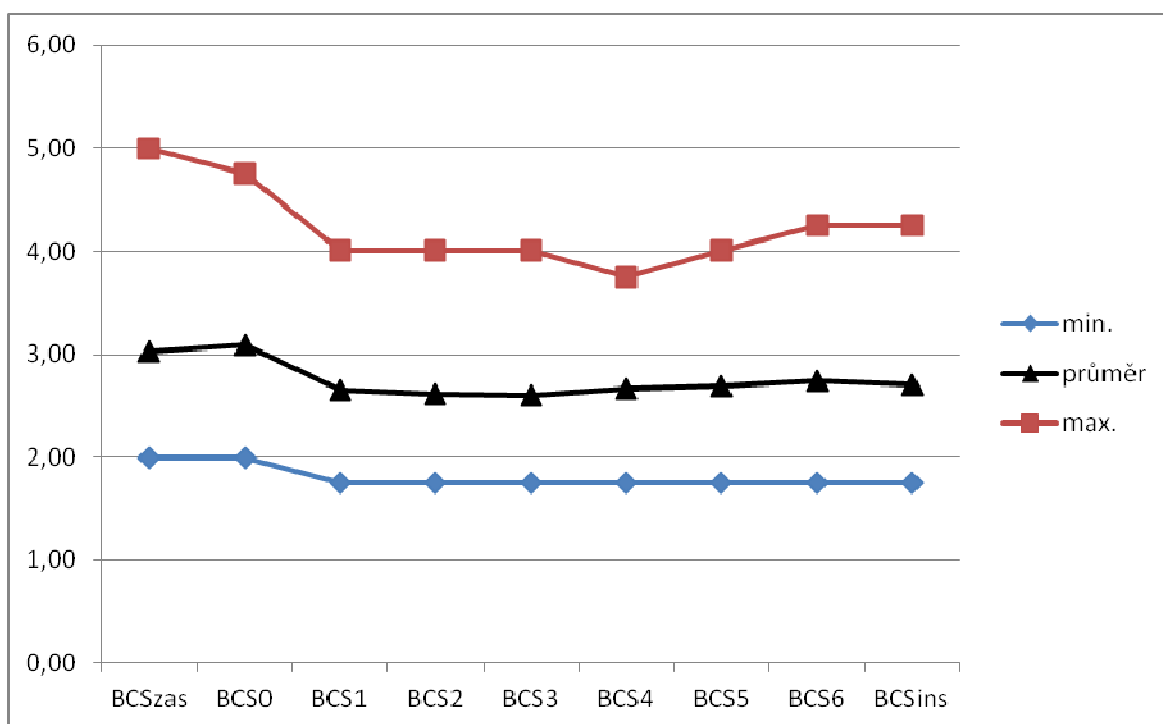
Tabulka 1 – Základní statistické charakteristiky sledovaných ukazatelů u dojnic

Ukazatel	n	min.	max.	\bar{x}	s	V (%)
MILak (kg)	382	4 643	14 683	9 230,1	1451,50	15,73
MIIns (kg)	382	10,1	53,6	29,2	6,7	22,82
T (%)	382	2,71	5,22	3,84	0,39	10,27
T (kg)	382	230	500	351,1	50,62	14,42
B (%)	382	2,72	4,59	3,22	0,19	5,78
B (kg)	382	174	430	296,0	42,55	14,38
MocMI (mg/l)	62	77,50	362,95	225,29	62,13	27,58
AcetMI (mg/l)	62	0,39	237,63	6,18	29,94	484,67
pH	323	7,31	9,69	8,62	0,36	4,15
MocHlen (mg/l)	511	12,72	4 863,19	597,74	612,38	102,45
AcetHlen (mg/l)	461	0,10	966,11	26,22	88,08	503,82
Sk. kr. 1 - (V)	595	0	100	0,67	8,18	1216,55
Sk. kr. 2 - (P)	595	0	100	5,04	21,90	434,34
Sk. kr. 3 - (K)	595	0	100	34,96	47,72	136,52
Sk. kr. 4 - (P + K)	595	0	100	13,61	34,32	252,12
Sk. kr. 5 - (Z)	595	0	100	24,71	43,17	174,72
Sk. kr. 6 - (A)	595	0	100	14,62	35,36	241,85
Sk. kr. 7 - (C)	595	0	100	3,19	17,60	551,06
Sk. kr. 8 - (B)	595	0	100	3,19	17,60	551,06
AKT0 (%)	174	30,00	80,00	53,28	12,22	22,94
AKT30 (%)	174	0	80,00	46,35	14,83	32,00
AKT60 (%)	174	0	70,00	36,29	15,76	43,43
AKT90 (%)	174	0	60,00	26,15	16,13	61,69

Vysvětlivky: MILak = množství nadojeného mléka za sledovanou laktaci; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; T = obsah tuku v mléce za sledovanou laktaci; B = obsah bílkovin v mléce za sledovanou laktaci; MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; Sk. kr. 1 - (V) = větvičkovitá krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 2 - (P) = plavuňovitá krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 3 - (K) = kaprad'ovitá krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 4 - (P + K) = plavuňovito-kaprad'ovitá krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 5 - (Z) = zbobtnalá krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 6 - (A) = atypická krystalizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 7 - (C) = celularizace cervikálního hlenu; Sk. kr. 8 - (B) = vzorky cervikálního hlenu bez krystalizace; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

Tělesná kondice byla hodnocena u celé skupiny 382 ks. plemenic. Výsledky sledování jsou uvedeny v Grafu 1. BCS při zasušení (BCSzas) se pohybovala v rozmezí 2,00 až 5,00 bodů (průměr 3,03 bodu). Průměrná BCS při otelení (BCS0) potom činila 3,09 bodů (2,00–4,75). Minimální BCS od 1. do 6. měsíce laktace (BCS1–6) a při inseminaci (BCSins) činila 1,75 bodu, maximální BCS 1., 2., 3. a 5. měsíc laktace činila 4,00 body, 4. měsíc laktace 3,75 bodů, 6. měsíc a při inseminaci 4,25 bodu. Z grafu je patrný nárůst BCS od zasušení do otelení (z 3,03 na 3,09 bodu). Po otelení BCS klesala až do 3. měsíce laktace (z 3,09 na 2,66 bodu). Od 3. až do 6. měsíce laktace BCS opět stoupala (z 2,66 na 2,74 bodu). Průměrná BCS při inseminaci potom činila 2,71 bodu.

Graf 1 – Vývoj BCS sledovaných dojníc v průběhu laktace



5.2 Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru býků

V Tabulce 2 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky hodnocení odebraných ejakulátů od sledovaných býků. Průměrné množství odebraných ejakulátů bylo u obou plemen 11,0 g v rozpětí od 2,8 do 20 g u holštýnských býků, resp. od 2,9 do 21,5 g u českých strakatých býků.

Průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla u obou sledovaných plemen $0,98 \times 10^6/\text{mm}^3$ v rozpětí od 0,40 do $1,60 \times 10^6/\text{mm}^3$ u obou skupin plemen.

Průměrná aktivita spermií bezprostředně po odběru byla 77,50% u holštýnských býků a 81,67% u býků českých strakatých v rozpětí hodnot od 30,00 do 90% u holštýnských býků, resp. od 50,00 do 90,00% u českých strakatých býků.

Průměrné procento patologických spermií bylo 15,22% u holštýnských býků a 14,90% u býků českých strakatých v rozpětí od 3,00 do 33,00% u holštýnských býků resp. od 4,00 do 30,00% u býků českých strakatých.

Průměrné procento živých spermií bylo detekováno 76,66% u holštýnských býků a 73,50% u býků českých strakatých v rozpětí od 30,00 do 94,00% u holštýnských býků resp. od 0,00 do 90,00% u býků českých strakatých.

Motilita spermií ihned po odběru (AKT0) se u obou plemen pohybovala v rozmezí 50,00 až 95,00%, po 30 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií ležela v intervalu 0,00 až 90,00%, po 60 min. testu v intervalu 0,00 až 80,00% u holštýnských býků, resp. 0,00 až 85,00% u českých strakatých býků, po 90 min. testu se potom motilita spermií pohybovala v rozpětí 0,00 až 80,00% u obou plemen.

Motilita spermií po naředění (RED0) a po 30 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií (RED30) ležela v intervalu 60,00 až 90,00% u holštýnských býků resp. 70,00 až 90,00% u českých strakatých býků, po 60 min. testu se potom motilita spermií pohybovala v rozpětí 30,00 až 90,00% u holštýnských býků, resp. 50,00 až 90,00% u českých strakatých býků a po 90 min. testu v rozpětí 0,00 až 90,00% u obou plemen.

Motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminační dávky (MRA0) se u obou plemen pohybovala v rozmezí 30,00 až 80,00%, po 30 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií (MRA30) ležela v intervalu 10,00 až 80,00% u holštýnských býků resp. 20,00 až 80,00% u býků českých strakatých. Po 60 a 90 min. testu se motilita spermií u holštýnských býků pohybovala v intervalu 0,00 až 70,00% a 20,00 až 80,00% u býků českých strakatých.

Tabulka 2 – Základní statistické charakteristiky z hodnocení získaných ejakulátů od sledovaných holštýnských (H, n = 16) a českých strakatých (C, n = 15) býků

Prom.	Jednotka	Plemeno	min.	max.	\bar{x}	s	V (%)
M	(g)	H	2,8	20,0	11,0	4,83	44,11
		C	2,9	21,5	11,0	5,38	49,03
K	$(10^6/\text{mm}^3)$	H	0,40	1,60	0,98	0,35	36,12
		C	0,40	1,60	0,98	0,40	41,22
A	(%)	H	30,00	90,00	77,50	14,26	18,40
		C	50,00	90,00	81,67	9,76	11,95
PAT	(%)	H	3,00	33,00	15,22	7,97	52,36
		C	4,00	30,00	14,90	8,08	54,26
Ž	(%)	H	30,00	94,00	76,66	18,41	24,02
		C	0,00	90,00	73,50	23,37	31,80
AKT0	(%)	H	50,00	95,00	77,19	13,54	17,54
		C	50,00	95,00	80,33	14,07	17,52
AKT30	(%)	H	0,00	90,00	66,88	23,51	35,16
		C	0,00	90,00	70,33	23,26	33,07
AKT60	(%)	H	0,00	80,00	61,25	22,70	37,05
		C	0,00	85,00	57,67	25,97	45,04
AKT90	(%)	H	0,00	80,00	41,25	25,53	61,89
		C	0,00	80,00	46,00	24,14	52,48
RED0	(%)	H	60,00	90,00	83,44	8,31	9,96
		C	70,00	90,00	85,67	6,23	7,27
RED30	(%)	H	60,00	90,00	79,06	10,20	12,90
		C	70,00	90,00	82,67	7,29	8,81
RED60	(%)	H	30,00	90,00	71,56	17,49	24,43
		C	50,00	90,00	74,67	10,43	13,97
RED90	(%)	H	0,00	90,00	62,81	26,33	41,92
		C	0,00	90,00	64,00	20,63	32,24
MRA0	(%)	H	30,00	80,00	62,50	13,90	22,25
		C	30,00	80,00	58,67	16,42	27,93
MRA30	(%)	H	10,00	80,00	57,19	16,73	29,25
		C	20,00	80,00	52,67	17,51	33,25
MRA60	(%)	H	0,00	70,00	47,50	16,93	35,64
		C	20,00	80,00	49,33	17,10	34,66
MRA90	(%)	H	0,00	70,00	40,63	18,43	45,36
		C	10,00	80,00	40,67	17,92	44,05

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu; K = koncentrace spermií v ejakulátu; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií; AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po mrazení/rozmrázení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a RED30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií; H = holštýnské plemeno; C = české strakaté plemeno.

5.3 Vliv pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu

Vztahy mezi pořadím laktace, úrovní mléčné užitkovosti za laktaci, BCS dojnic a ukazateli intenzity metabolismu (kg mléka za laktaci, procento tuku v mléce, kg tuku v mléce, procento bílkovin v mléce, kg bílkovin v mléce, kg mléka při inseminaci, obsah močoviny a acetonu v mléce při inseminaci) byly determinovány pomocí modelové rovnice (1). Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v Tabulce 3. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí $r^2 = 0,10$ až $0,77$.

Z této tabulky vyplývá, že vliv pořadí laktace byl vysoce statisticky významný ($P < 0,001$) na sledované ukazatele mléčné užitkovosti. Na obsah močoviny a acetonu v mléce v den inseminace byl vliv pořadí laktace statisticky nevýznamný ($P > 0,05$).

Vliv úrovně mléčné užitkovosti na obsah močoviny a acetonu v mléce v den inseminace byl neprůkazný ($P > 0,05$).

Vliv změny tělesné kondice jeden měsíc před inseminací byl statisticky nízce významný ($P < 0,05$) na množství nadojeného mléka za laktaci, množství bílkovin v mléce za laktaci a obsah močoviny v mléce v den inseminace, na ostatní sledované ukazatele byl vliv změny BCS jeden měsíc před inseminací statisticky nevýznamný ($P > 0,05$).

Vliv změny BCS dojnic od otelení do inseminace byl statisticky středně významný ($P < 0,01$) na množství nadojeného mléka v den inseminace a procento tuku v mléce za sledovanou laktaci, dále pak statisticky nízce významný ($P < 0,05$) na množství tuku v mléce za laktaci. Na ostatní sledované ukazatele byl vliv změny BCS od otelení do inseminace statisticky nevýznamný ($P > 0,05$).

Tabulka 3 – Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu (1)

ZNAK	MODEL		PorLak		MILak		Zm1		Zm2	
	r ²	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
MILak (kg)	0,77	< 0,001	43,38	< 0,001	0,00	0,00	2,61	< 0,05	1,23	0,293
MIIns (kg)	0,35	< 0,001	24,56	< 0,001	0,00	0,00	2,06	0,128	5,89	< 0,01
T (%)	0,19	< 0,001	16,31	< 0,001	0,00	0,00	0,09	0,911	5,13	< 0,01
T (kg)	0,45	< 0,001	12,46	< 0,001	0,00	0,00	1,56	0,211	2,53	< 0,05
B (%)	0,19	< 0,001	9,20	< 0,001	0,00	0,00	0,71	0,493	2,21	0,110
B (kg)	0,66	< 0,001	22,36	< 0,001	0,00	0,00	2,87	< 0,05	0,13	0,879
MocMI (mg/l)	0,15	0,361	0,86	0,429	0,07	0,929	3,75	< 0,05	1,45	0,245
AcetMI (mg/l)	0,10	0,648	1,02	0,368	0,11	0,897	1,04	0,360	1,41	0,252

Vysvětlivky: PorLak = pořadí laktace; MILak = množství nadojeného mléka za sledovanou laktaci; Zm1 = rozdíl v BCS dojníc jeden měsíc před inseminací; Zm2 = rozdíl v BCS dojníc od otelení do inseminace; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; T = obsah tuku v mléce za sledovanou laktaci; B = obsah bílkovin v mléce za sledovanou laktaci; MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace.

5.3.1 Vliv pořadí laktace

Výsledky vlivu pořadí laktace na ukazatele intenzity metabolismu dojníc jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5. Mléčná užitkovost za sledovanou laktaci byla nejvyšší ($P < 0,01 - 0,001$) u krav na 3. a další laktaci (9 636,2 kg) a nejnižší ($P < 0,001$) u prvotelek (8 950,5 kg). Mléčná užitkovost v den provedené inseminace byla také nejvyšší ($P < 0,05$) u krav na 3. a další laktaci (30,3 kg) a nejnižší ($P < 0,01$) u prvotelek (29,3 kg).

Procento tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo mírně vyšší (+0,07%) u prvotelek, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$). Množství tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo nejvyšší u krav na 3. a další laktaci (362,6 kg) a nejnižší u prvotelek (342,2 kg). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky průkazné ($P < 0,05 - 0,001$).

Procento bílkovin v mléce za sledovanou laktaci bylo nejvyšší ($P < 0,001$) u krav na 2. laktaci (3,27%) a nejnižší ($P < 0,01 - 0,001$) u krav na 3. a další laktaci (3,19%). Množství bílkovin v mléce za laktaci bylo nejnižší ($P < 0,001$) u prvotelek (289,5 kg) oproti kravám na 2. resp. 3. a další laktaci (304,24 resp. 304,88 kg).

Obsah močoviny v mléce v den inseminace byl nejvyšší u krav na 3. a další laktaci (228,20 mg/l) a nejnižší u krav na 1. laktaci (203,00 mg/l). Obsah acetonu v mléce v den inseminace byl nejvyšší u krav na 1. laktaci (7,09 mg/l) a nejnižší u krav na 2. laktaci (3,26 mg/l). Rozdíly v obsahu močoviny a acetonu v mléce v den inseminace byly mezi jednotlivými skupinami statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Tabulka 4 – Vliv pořadí laktace na ukazatele intenzity metabolismu dojnic

Skupina	L.	MILak (kg)		MIIns (kg)		T (%)		T (kg)		B (%)		B (kg)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=171)	1.	8 950,5	54,8	29,3	0,4	3,88	0,03	342,2	2,9	3,25	0,01	289,5	1,9
2 (n=109)	2.	9 434,5	61,6	29,5	0,5	3,81	0,03	352,8	3,3	3,27	0,01	304,2	2,2
3 (n=102)	≥3.	9 636,2	62,9	30,3	0,5	3,81	0,03	362,6	3,4	3,19	0,01	304,9	2,2
P		** 2-3 *** 1-2,3		* 1-3;		-		* 2-3 ** 1-2 *** 1-3		** 1-3 *** 2-3		*** 1-2,3	

Vysvětlivky: L. = pořadí laktace u jednotlivých skupin; MILak = množství nadojeného mléka za laktaci; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; T = obsah tuku v mléce za sledovanou laktaci; B = obsah bílkovin v mléce za sledovanou laktaci; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; - bez významnosti.

Tabulka 5 – Vliv pořadí laktace na obsah močoviny a acetonu v mléce

Skupina	Laktace	MocMI (mg/l)		AcetMI (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE
1 (n=171)	1.	214,47	21,81	7,09	8,21
2 (n=109)	2.	203,00	20,12	3,26	9,94
3 (n=102)	≥3.	228,20	16,63	6,53	10,78
P		-		-	

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; P - bez významnosti.

5.3.2 Vliv úrovně užitkovosti

Výsledky vlivu úrovně užitkovosti za laktaci na ukazatele intenzity metabolismu dojnic jsou uvedeny v Tabulce 6.

Obsah močoviny a acetonu v mléce v den inseminace byl nejvyšší u krav ve skupině 1 (222,62 resp. 10,79 mg/l) a nejnižší u krav ve skupině 2 (209,40 resp. 3,57 mg/l). Rozdíly v obsahu močoviny a acetonu v mléce byly mezi jednotlivými skupinami statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Tabulka 6 – Vliv úrovně mléčné užitkovosti na obsah močoviny a acetonu v mléce

Skupina	Užitkovost (kg)	MocMI (mg/l)		AcetMI (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE
1 (n=95)	< 7 790	222,62	37,11	10,79	0,08
2 (n=181)	7 791 – 10 716	209,40	10,91	3,57	0,71
3 (n=106)	> 10 717	213,66	21,01	3,86	0,55
P		-		-	

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; P - bez významnosti.

Pro hodnocení vlivu BCS byl soubor sledovaných plemenic rozdělen na 3 skupiny podle změn BCS jeden měsíc před inseminací (Tabulka 7 a 8) a od otelení do inseminace (Tabulka 9 a 10).

5.3.3 Vliv změny BCS jeden měsíc před inseminací

Výsledky vlivu změny BCS dojníc jeden měsíc před inseminací na ukazatele intenzity metabolismu jsou uvedeny v Tabulkách 7 a 8. Z těchto tabulek jsou patrné následující skutečnosti:

Mléčná užitkovost za sledovanou laktaci byla průkazně ($P < 0,05$) nejvyšší u krav ve skupině 1 (9 412,1 kg) a nejnižší u krav ve skupině 2 (9 250,1 kg).

Mléčná užitkovost v den, kdy byly dojnice inseminovány, byla nejnižší (28,3 kg) u krav ve skupině 2 v porovnání s kravami ve skupině 3 (30,1 kg) a 1 (30,3 kg). Rozdíly mezi skupinami v tomto znaku nebyly statisticky průkazné ($P > 0,05$).

Procento tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo nejnižší u krav ve skupině 3 (3,82%) a nejvyšší u krav ve skupině 1 (3,84%). Rozdíly mezi skupinami v tomto znaku nebyly statisticky průkazné ($P > 0,05$).

Množství tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo nejvyšší u krav ve skupině 1 (357,1 kg) a nejnižší u krav ve skupině 2 (349,5 kg). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly v tomto znaku opět statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Procento bílkovin v mléce za sledovanou laktaci bylo nejnižší u krav ve skupině 2 a 3 (3,23%) a nejvyšší u krav ve skupině 1 (3,25%). Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné ($P > 0,05$).

Množství bílkovin v mléce za sledovanou laktaci bylo nejnižší u krav ve skupině 2 (296,6 kg) a nejvyšší u krav skupiny 1 (303,3 kg). Rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami byl vysoce statisticky nízce významný ($P < 0,05$).

Obsah močoviny v mléce v den inseminace byl nejvyšší (235,21 mg/l) u krav ve skupině 1, tedy u krav s největší ztrátou BCS a statisticky nízce významně ($P < 0,05$) se lišil s 3. skupinou, tedy skupinou dojnic se zvyšující se BCS (176, 85 mg/l). Statisticky středně významný rozdíl ($P < 0,01$) byl v tomto znaku nalezen také mezi skupinou 2 (233,21 mg/l) a 3 (176,85 mg/l).

Obsah acetonu v mléce v den inseminace byl nejnižší (3,57 mg/l) u krav ve skupině 1 a nejvyšší u krav ve skupině 2 (10,79 mg/l). Rozdíly mezi skupinami byly v tomto znaku statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Tabulka 7 – Vliv změny BCS dojnic 1 měsíc před inseminací na ukazatele metabolismu

Skupina	Změna BCS	MILak (kg)		MIIns (kg)		T (%)		T (kg)		B (%)		B (kg)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=75)	do -0,25	9 412,1	72,8	30,2	0,6	3,84	0,04	357,1	3,9	3,25	0,02	303,3	2,6
2 (n=203)	0	9 250,1	48,3	29,1	0,4	3,83	0,02	349,5	2,6	3,23	0,01	296,6	1,7
3 (n=104)	od +0,25	9 359,0	60,9	29,9	0,5	3,82	0,03	351,1	3,2	3,23	0,01	298,6	2,1
P		* 1–2		-		-		-		-		* 1–2	

Vysvětlivky: MILak = množství nadojeného mléka za laktaci; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; T = obsah tuku v mléce; B = obsah bílkovin v mléce; * $P < 0,05$; - bez významnosti.

Tabulka 8 – Vliv změny BCS dojnic 1 měsíc před inseminací na obsah močoviny a acetonu v mléce

Skupina	Změna BCS	MocMI (mg/l)		AcetMI (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE
1 (n=75)	do -0,25	235,21	12,79	3,57	0,71
2 (n=203)	0	233,21	11,97	10,79	0,08
3 (n=104)	od +0,25	176,85	19,63	3,86	0,55
P		* 1–3; ** 2–3		-	

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; - bez významnosti.

5.3.4 Vliv změny BCS od otelení do inseminace

Výsledky hodnocení vlivu změny BCS dojníc od otelení do inseminace na ukazatele metabolismu jsou uvedeny v Tabulkách 9 a 10.

Mléčná užitkovost za sledovanou laktaci byla vyšší u krav ve skupině 1 (9 397,6 kg) než u krav ve skupinách 2 a 3 (9 350,4 resp. 9 273,0 kg). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Mléčná užitkovost v den, kdy byly dojnice inseminovány, byla nejvyšší u krav ve skupině 2 (30,6 kg) a nejnižší u krav ve skupině 1 (28,7 kg). Mezi těmito dvěma skupinami byl detekován statisticky vysoce významný ($P < 0,001$) rozdíl. Statisticky nízce významný rozdíl ($P < 0,05$) byl detekován mezi skupinami 1 (28,7 kg) a 3 (29,8 kg).

Procento tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo také průkazně ($P < 0,001$) nejvyšší u krav ve skupině 1 (3,89%), následovala skupina 3 (3,83%) a 2 (3,77%).

Množství tuku v mléce za sledovanou laktaci bylo průkazně ($P < 0,05$) nejvyšší u krav ve skupině 1 (357,4 kg) a nejnižší u krav ve skupině 2 (349,0 kg).

Procento bílkovin v mléce bylo průkazně vyšší u krav ve skupině 3 (3,25%) oproti skupinám 1 (3,24%) a 2 (3,22%). Mezi skupinami 2 a 3 byl detekován statisticky nízce významný ($P < 0,05$) rozdíl.

Množství bílkovin v mléce bylo vyšší u krav ve skupině 1 (300,2 kg) než u skupin 2 a 3 (299,0 resp. 299,4 kg). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Obsah močoviny a acetonu v mléce v den inseminace byl nejvyšší u krav ve skupině 1 (234,96 resp. 11,60 mg/l), následovala skupina 3 (206,78 resp. 2,45 mg/l) a skupina 2 (203,53 resp. 2,21 mg/l). Rozdíly mezi skupinami byly opět statisticky neprůkazné ($P > 0,05$).

Tabulka 9 – Vliv změny BCS dojnic mezi otelením a inseminací na ukazatele intenzity metabolismu

Skupina	Změna BCS	MILak (kg)		MIIns (kg)		T (%)		T (kg)		B (%)		B (kg)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=171)	do -0,50	9 397,6	64,9	28,7	0,4	3,89	0,03	357,4	2,7	3,24	0,01	300,2	1,8
2 (n=101)	-0,25	9 350,4	50,5	30,6	0,5	3,77	0,03	349,0	3,5	3,22	0,02	299,0	2,3
3 (n=110)	od 0	9 273,0	62,0	29,8	0,5	3,83	0,03	351,2	3,3	3,25	0,01	299,4	2,2
P		-		* 1-3 *** 1-2		*** 1-2		* 1-2		* 2-3		-	

Vysvětlivky: MILak = množství nadojeného mléka za sledovanou laktaci; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; T = obsah tuku v mléce za sledovanou laktaci; B = obsah bílkovin v mléce za sledovanou laktaci; * P < 0,05; *** P < 0,001; - bez významnosti.

Tabulka 10 – Vliv změny BCS dojnic mezi otelením a inseminací na obsah močoviny a acetonu v mléce

Skupina	Změna BCS	MocMI (mg/l)		AcetMI (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE
1 (n=171)	do -0,50	234,96	12,47	11,60	6,21
2 (n=101)	-0,25	203,53	16,25	2,21	8,09
3 (n=110)	od 0	206,78	14,77	2,45	7,35
P		-		-	

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; P - bez významnosti.

5.3.5 Korelační analýza

V Tabulce 11 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi BCS dojnic a ukazateli mléčné užitkovosti a úrovně metabolismu.

Vysoce statisticky průkazné korelační koeficienty ($P < 0,001$) byly detekovány mezi mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci a BCS při zasušení, při inseminaci, v 1. – 6. měsíci laktace, při změně BCS od otelení do inseminace a pořadím laktace; dále pak mezi procentem tuku za laktaci a BCS v 1., 2., 4. a 5. měsíci, pořadím laktace a mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci; mezi množstvím tuku za laktaci a BCS při zasušení, v 3. – 5. měsíci laktace, při změně BCS od otelení do inseminace, pořadím laktace a mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci; mezi procentem bílkovin za laktaci a BCS v 1. – 6. měsíci laktace, při inseminaci, při změně BCS od otelení do inseminace, pořadím laktace a mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci; mezi množstvím bílkovin za laktaci a BCS při zasušení, při inseminaci, v 2. – 6. měsíci laktace, při změně BCS

od otelení do inseminace, pořadím laktace a mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci; mezi nádojem v den inseminace a pořadím laktace a mléčnou užitkovostí za sledovanou laktaci.

Středně statisticky významné závislosti ($P < 0,01$) byly detekovány mezi procentem tuku za laktaci a BCS při otelení a v 6. měsíci laktace; dále pak mezi množstvím tuku za laktaci a BCS v 2. měsíci laktace a při změně BCS jeden měsíc před inseminací; mezi množstvím bílkovin za laktaci a BCS v 1. měsíci laktace.

Statisticky níže významné závislosti ($P < 0,05$) pak byly detekovány mezi procentem tuku za laktaci a BCS v 3. měsíci laktace a při inseminaci; dále pak mezi množstvím tuku za laktaci a BCS v 1. měsíci laktace; mezi množstvím bílkovin za laktaci a změnou BCS jeden měsíc před inseminací a mezi obsahem močoviny v mléce a BCS v 4. – 6. měsíci.

Tabulka 11 – Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi BCS a ukazateli mléčné užitkovosti a úrovně metabolismu dojnic

	MILak (kg)	T (%)	T (kg)	B (%)	B (kg)	MIIns (kg)	MocMI (mg/l)	AcetMI (mg/l)
BCSzas	0,204	-0,020	0,224	-0,095	0,202	0,078	-0,075	0,255
	< 0,001	0,726	< 0,001	0,086	< 0,001	0,159	0,693	0,174
BCS0	-0,013	0,105	0,070	0,052	0,017	-0,016	-0,137	0,024
	0,748	0,010	0,087	0,203	0,678	0,699	0,287	0,852
BCS1	-0,191	0,161	-0,087	0,207	-0,123	-0,071	-0,234	0,070
	< 0,001	< 0,001	0,034	< 0,001	0,003	0,083	0,067	0,589
BCS2	-0,230	0,183	-0,107	0,276	-0,135	-0,041	-0,238	0,067
	< 0,001	< 0,001	0,009	< 0,001	0,001	0,317	0,062	0,607
BCS3	-0,273	0,100	-0,217	0,224	-0,23	-0,064	-0,242	0,087
	< 0,001	0,015	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,117	0,058	0,501
BCS4	-0,299	0,146	-0,212	0,263	-0,217	-0,051	-0,304	-0,007
	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,218	0,016	0,958
BCS5	-0,317	0,139	-0,231	0,277	-0,222	-0,079	-0,288	-0,015
	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,054	0,023	0,909
BCS6	-0,266	0,113	-0,197	0,266	-0,170	-0,022	-0,326	0,035
	< 0,001	0,006	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,600	0,015	0,800
BCSins	-0,282	0,092	-0,235	0,234	-0,208	-0,042	-0,197	-0,028
	< 0,001	0,025	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,306	0,126	0,827
Zm1	-0,071	-0,036	-0,109	-0,017	-0,087	-0,042	0,149	-0,023
	0,083	0,379	0,008	0,673	0,034	0,305	0,248	0,857
Zm2	-0,217	-0,020	-0,254	0,143	-0,184	-0,020	-0,067	-0,048
	< 0,001	0,631	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,629	0,607	0,714
PorLak	0,447	-0,185	0,355	-0,237	0,389	0,238	0,007	-0,101
	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,960	0,433
MILak	1	-0,457	0,779	-0,429	0,939	0,654	0,135	-0,033
		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,296	0,800

Vysvětlivky: MILak = množství nadojeného mléka za sledovanou laktaci; T = množství tuku v mléce za sledovanou laktaci; B = množství bílkovin v mléce za sledovanou laktaci; MIIns = množství nadojeného mléka v den inseminace; MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; BCSzas = BCS dojnic při zasušení; BCS0 = BCS dojnic při otelení; BCS1–6 = BCS dojnic v 1.–6. měsíci laktace; BCSins = BCS dojnic při inseminaci; Zm1 = rozdíl mezi BCS dojnic jeden měsíc před inseminací; Zm2 = rozdíl v BCS dojnic od otelení do inseminace; PorLak = pořadí laktace.

5.4 Vliv úrovně metabolismu dojnic na kvalitu cervikálního hlenu

Vztahy mezi úrovní metabolismu dojnic, vyjádřenou obsahem močoviny a acetonu v mléce v den inseminace a kvalitou jejich CH (pH, obsah močoviny a acetonu v CH) byly determinovány pomocí modelové rovnice (2). Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v Tabulce 12. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí $r^2 = 0,07$ až $0,18$.

Z této tabulky vyplývá, že vliv obsahu močoviny v mléce byl průkazný ($P < 0,05$) pouze na obsah močoviny v CH, na ostatní sledované ukazatele byl vliv obsahu močoviny v mléce statisticky nevýznamný ($P > 0,05$). Vliv obsahu acetonu v mléce byl na všechny sledované ukazatele statisticky nevýznamný ($P > 0,05$).

Tabulka 12 – Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu (2)

ZNAK	MODEL		MocMI (mg/l)		AcetMI (mg/l)	
	r^2	P	F-test	P	F-test	P
pH	0,07	0,439	1,54	0,224	0,26	0,771
MocHlen (mg/l)	0,13	0,108	3,88	< 0,05	0,61	0,546
AcetHlen (mg/l)	0,18	0,308	2,40	0,113	0,00	0,998

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu.

5.4.1 Vliv obsahu močoviny v mléce

V Tabulce 13 jsou uvedeny výsledky statistického vyhodnocení vlivu obsahu močoviny v mléce v den inseminace na sledované ukazatele kvality CH. V rámci tohoto vyhodnocení byl sledovaný soubor plemenic rozdělen na 3 skupiny právě podle obsahu močoviny v mléce.

Zjištěné pH bylo nejnižší (8,60) u skupiny 1, následovala skupina 2 (8,62) a nejvyšší pH bylo u krav ve skupině 3 (8,78). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Obsah močoviny v CH byl nejnižší (445,13 mg/l) u krav ve skupině 1 a nejvyšší (1006,98 mg/l) u skupiny 2. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami byl statisticky středně významný ($P < 0,01$).

Obsah acetonu v CH byl nejnižší (3,03 mg/l) u krav ve skupině 1 a nejvyšší (6,67 mg/l) u krav ve skupině 3. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami byl statisticky nízce významný ($P < 0,05$).

Tabulka 13 – Vliv obsahu močoviny v mléce na kvalitu cervikálního hlenu

Skupina	MocMI (mg/l)	pH		MocHlen (mg/l)		AcetHlen (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=20)	do 200	8,60	0,08	445,13	143,90	3,03	1,09
2 (n=21)	200,1 – 249,9	8,62	0,08	811,67	142,25	4,71	0,99
3 (n=21)	od 250	8,78	0,08	1006,98	140,84	6,67	1,24
P		-		** 1–3		* 1–3	

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; - bez významnosti.

5.4.2 Vliv obsahu acetonu v mléce

Pro další vyhodnocení byl soubor plemenic rozdělen na 3 skupiny podle obsahu acetonu v mléce v den inseminace. Výsledky tohoto sledování jsou uvedeny v Tabulce 14.

pH bylo nejnižší u krav ve skupině 3 (8,61), následovala skupina 1 (8,68) a nejvyšší pH bylo naměřeno u skupiny 2 (8,69). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

Obsah močoviny v CH byl nejvyšší (827,63 mg/l) u krav skupiny 3, následovala skupina 2 (811,13 mg/l) a nejnižší obsah močoviny v CH (625,01 mg/l) byl detekován u krav skupiny 1. Rozdíly mezi skupinami byly v tomto znaku opět neprůkazné ($P > 0,05$).

Obsah acetonu v analyzovaných vzorcích CH byl nejvyšší u krav skupiny 3 (4,84 mg/l), následovala skupina 2 (4,82 mg/l) a nejnižší obsah byl detekován u krav ve skupině 1 (4,74 mg/l). Rozdíly mezi skupinami byly opět neprůkazné ($P > 0,05$).

Tabulka 14 – Vliv obsahu acetonu v mléce na kvalitu cervikálního hlenu

Skupina	AcetMI (mg/l)	pH		MocHlen (mg/l)		AcetHlen (mg/l)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=20)	do 1,64	8,68	0,08	625,01	141,22	4,74	1,10
2 (n=21)	1,65 – 2,33	8,69	0,08	811,13	142,24	4,82	0,98
3 (n=21)	od 2,34	8,61	0,08	827,63	143,51	4,84	1,24
P		-		-		-	

Vysvětlivky: AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; P - bez významnosti.

5.4.3 Korelační analýza

V Tabulce 15 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi ukazateli úrovně metabolismu dojnic a kvality CH. Vysoce statisticky významné závislosti ($P < 0,001$) byly detekovány mezi obsahem močoviny v CH, krystalizací a pH hlenu. Statisticky středně významná závislost ($P < 0,01$) byla detekována mezi obsahem acetonu v CH a krystalizací CH. Statisticky níže průkazná závislost ($P < 0,05$) byla potom detekována mezi obsahem acetonu v CH a obsahem močoviny v mléce v den inseminace.

Tabulka 15 – Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi ukazateli úrovně metabolismu dojnic a kvality cervikálního hlenu

	MocMI (mg/l)	Krystalizace	pH	MocHlen (mg/l)	AcetHlen (mg/l)
AcetMI (mg/l)	0,019	0,117	0,077	-0,114	-0,140
	0,883	0,367	0,565	0,395	0,477
MocMI (mg/l)	1	0,059	0,203	0,167	0,448
		0,649	0,123	0,211	0,017
Krystalizace		1	0,102	0,399	-0,122
			0,068	< 0,001	0,009
pH			1	0,250	0,004
				< 0,001	0,954
MocHlen (mg/l)				1	-0,038
					0,430

Vysvětlivky: MocMI = obsah močoviny v mléce v den inseminace; AcetMI = obsah acetonu v mléce v den inseminace; MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu.

5.5 Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií

Vztahy mezi kvalitou CH dojnic, vyjádřenou jejich krystalizací a obsahem močoviny a acetonu a přežitelností spermií byly determinovány pomocí modelové rovnice (3). Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v Tabulce 16. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí $r^2 = 0,23$ až $0,36$.

Z této tabulky vyplývá, že vliv krystalizace byl vysoce statisticky významný ($P < 0,001$) na motilitu spermií na počátku a po 30 a 60 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH, na motilitu spermií po 90 min. testu byl vliv krystalizace statisticky středně významný ($P < 0,01$).

Vliv obsahu močoviny v CH byl statisticky níže významný ($P < 0,05$) na motilitu spermií po 30 min. testu, statisticky středně významný ($P < 0,01$) na motilitu spermií na počátku testu přežitelnosti a statisticky nevýznamný ($P > 0,05$) na motilitu spermií po 60 a 90 minutách testu.

Vliv obsahu acetonu v CH byl statisticky středně významný ($P < 0,01$) na motilitu spermií po 90 min. a statisticky vysoce významný ($P < 0,001$) na motilitu spermií na počátku testu a po 30 a 60 minutách jeho trvání.

Tabulka 16 – Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu (3)

ZNAK	MODEL		Krystalizace		MochHlen (mg/l)		AcetHlen (mg/l)	
	r^2	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
AKT0	0,32	< 0,001	3,82	< 0,001	6,24	< 0,01	24,52	< 0,001
AKT30	0,36	< 0,001	7,69	< 0,001	3,90	< 0,05	16,06	< 0,001
AKT60	0,31	< 0,001	5,30	< 0,001	0,95	0,3874	12,45	< 0,001
AKT90	0,23	< 0,001	3,47	< 0,01	0,30	0,7421	5,79	< 0,01

Vysvětlivky: MochHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

5.5.1 Vliv krystalizace cervikálního hlenu

Výsledky vyhodnocení vlivu krystalizace CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v Tabulce 17. Z této tabulky vyplývá, že motilita spermií byla na počátku a po 30 a 60 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií nejvyšší u krav s plavuňovitou krystalizací (68,75%; 70,02%; 47,02%), s kaprad'ovitou krystalizací

(59,60%; 55,32%; 44,10%), s plavuňovito-kaprad'ovitou krystalizací (56,56%; 52,34%; 42,70%) a zbobtnalou krystalizací (54,87%; 49,05%; 37,64).

Po 90 minutách trvání testu byly nejvyšší hodnoty motility spermií nalezeny u krav s kaprad'ovitou (33,06%), plavuňovito-kaprad'ovitou (30,36%) a zbobtnalou krystalizací (26,59%). Nejnižší hodnoty motility spermií byly na počátku a v průběhu celého testu detekovány u krav bez krystalizace CH (36,13%; 12,26%; 4,70%; 2,96%), s atypickou krystalizací (45,15%; 37,23%; 30,68%; 22,52%), s větvičkovitou krystalizací (46,49%; 44,18%; 24,22%; 3,67%) a celularizací (46,68%; 32,93%; 25,04%; 12,98%). Rozdíly mezi nejnižšími a nejvyššími hodnotami motility spermií byly v průběhu celého testu průkazné na hladinách významnosti ($P < 0,05 - 0,001$).

Tabulka 17 – Vliv krystalizace cervikálního hlenu na přežitelnost spermií

Skupina	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=1)	46,49	10,69	44,18	12,74	24,42	14,22	3,67	15,36
2 (n=1)	68,75	10,69	70,02	12,75	47,02	14,22	23,95	15,36
3 (n=52)	59,60	1,99	55,32	2,37	44,10	2,65	33,06	2,86
4 (n=23)	56,56	2,28	52,34	2,72	42,70	3,03	30,63	3,28
5 (n=31)	54,87	1,66	49,05	1,98	37,64	2,21	26,59	2,38
6 (n=31)	45,15	2,66	37,23	3,17	30,68	3,53	22,52	3,82
7 (n=14)	46,68	3,39	32,93	4,05	25,04	4,51	12,98	4,88
8 (n=6)	36,13	4,71	12,26	5,62	4,70	6,27	2,96	6,77
P	* 8-6,7; 7-2,4,5; 6-2; 5-3 ** 8-2; 7-3; 6-4,5 *** 8-3,4,5		* 8-1;5-3 ** 7-2; 6-2,5 *** 8-2,3,4,5,6,7; 7-3,4,5; 6-3,4		* 5-3,7 ** 8-2,7; 7-4; 6-3,4 *** 8-3,4,5,6; 7-3		* 7-3,6; 6-5 ** 8-3,6; 7-4 *** 8-4,5; 7-5	

Vysvětlivky: AKT0-90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; - bez významnosti.

5.5.2 Vliv obsahu močoviny v cervikálním hlenu

Výsledky vlivu obsahu močoviny v CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v Tabulce 18. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly v průběhu celého krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH detekovány u krav ve skupině 1 (58,56%; 50,38%; 35,43%; 21,28%). Nejnižší hodnota motility spermií byla na počátku a na konci testu detekována u krav ve skupině 3 (48,27% resp. 17,91%), po 30 a 60 min. trvání testu

byly potom nejnižší hodnoty motility detekovány u krav ve skupině 2 (40,22% a 29,79%). Rozdíly mezi nejvyššími a nejnižšími hodnotami motility spermií byly na počátku testu vysoce statisticky průkazné ($P < 0,001$). Po 30 min. jeho trvání byl rozdíl mezi skupinami 1 a 3 pouze statisticky nízce významný ($P < 0,05$) a mezi skupinami 1 a 2 středně významný ($P < 0,01$). Po 60 a 90 min. byly rozdíly mezi skupinami neprůkazné ($P > 0,05$).

Tabulka 18 – Vliv obsahu močoviny v cervikálním hlenu na přežitelnost spermií

Skupina	MocHlen (mg/l)	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=47)	do 260,40	58,56	2,62	50,38	3,12	35,43	3,48	21,28	3,76
2 (n=47)	260,41–524,92	48,50	2,61	40,22	3,11	29,79	3,47	19,46	3,74
3 (n=65)	od 524,93	48,27	2,66	41,89	3,17	30,90	3,54	17,91	3,82
P		*** 1–2,3		* 1–3; ** 1–2		-		-	

Vysvětlivky: MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; - bez významnosti.

5.5.3 Vliv obsahu acetonu v cervikálním hlenu

Výsledky vlivu obsahu acetonu v CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v Tabulce 19. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly ve všech sledovaných časech trvání testu přežitelnosti spermií detekovány u krav ve skupině 1 (60,24%; 52,15%; 40,09% a 25,44%) a nejnižší hodnoty motility spermií byly opět ve všech sledovaných časech detekovány u krav ve skupině 3 (46,31%; 38,09%; 27,26% a 15,69%). Rozdíly mezi uvedenými skupinami byly v čase 0 až 60 min. vysoce statisticky významné ($P < 0,001$) a po 90 min. statisticky středně významné ($P < 0,01$).

Tabulka 19 – Vliv obsahu acetonu v cervikálním hlenu na přežitelnost spermií

Skupina	AcetHlen (mg/l)	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1 (n=48)	do 5,25	60,24	2,43	52,15	2,89	40,09	3,23	25,44	3,50
2 (n=59)	5,26 – 14,51	48,79	2,30	42,26	2,74	28,76	3,06	17,51	3,30
3 (n=52)	od 14,52	46,31	2,41	38,09	2,87	27,26	3,20	15,69	3,46
P		*** 1–2,3		*** 1–2,3		*** 1–2,3		** 1–2,3	

Vysvětlivky: AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.5.4 Korelační analýza

V Tabulce 20 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi hodnocenými ukazateli kvality CH a přežitelností spermií. Vysoce statisticky průkazné závislosti ($P < 0,001$) byly detekovány mezi obsahem močoviny v CH a krystalizací a mezi obsahem acetonu v CH a motilitou spermií v čase 0, 30 a 60 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

Středně statisticky významné závislosti ($P < 0,01$) byly detekovány mezi krystalizací CH a obsahem acetonu v CH a motilitou spermií v čase 30 a 60 min. trvání testu; mezi obsahem močoviny v CH a motilitou spermií po 60 a 90 min. trvání testu a mezi obsahem acetonu v CH a motilitou spermií po 90 min. testu.

Statisticky níže významné korelace ($P < 0,05$) byly potom detekovány mezi krystalizací CH a motilitou spermií po 90 min. testu a mezi obsahem močoviny v CH a motilitou spermií po 30 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

Tabulka 20 – Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi ukazateli kvality cervikálního hlenu a přežitelností spermií

	MocHlen (mg/l)	AcetHlen (mg/l)	AKT0 (%)	AKT30 (%)	AKT60 (%)	AKT90 (%)
Krystalizace	0,399	-0,122	-0,008	-0,227	-0,202	-0,183
	< 0,001	0,009	0,918	0,003	0,007	0,016
MocHlen (mg/l)	1	-0,038	-0,007	-0,173	-0,205	-0,214
		0,430	0,925	0,023	0,007	0,006
AcetHlen (mg/l)		1	0,368	0,353	0,316	0,214
			< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007
AKT0 (%)			1	0,780	0,662	0,472
				< 0,001	< 0,001	< 0,001
AKT30 (%)				1	0,837	0,567
					< 0,001	< 0,001
AKT60 (%)					1	0,739
						< 0,001

Vysvětlivky: MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

5.6 Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků

V rámci tohoto hodnocení byly pomocí modelové rovnice (4) determinovány vlivy plemene, věku a BCS býků na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu (množství ejakulátu, koncentrace spermií v ejakulátu, aktivita spermií v ejakulátu, procento patologických a živých spermií v ejakulátu, motilita spermií odečtená po odběru, po naředění a po zmrazení/rozmrazení inseminační dávky a v čase 0, 30, 60 a 90 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií).

Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v Tabulce 21. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí $r^2 = 0,03$ až $0,22$. Z této tabulky vyplývá, že vliv plemene byl průkazný ($P < 0,05$) na aktivitu spermií ihned po odběru a procento patologických spermií.

Vliv věku plemenků byl průkazný ($P < 0,05$) na množství a koncentraci spermií v ejakulátu.

Vliv BCS byl statisticky nízce významný ($P < 0,05$) na koncentraci a aktivitu spermií v ejakulátu ihned po odběru a vysoce statisticky významný ($P < 0,001$) na procento patologických spermií.

Tabulka 21 – Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu (4)

ZNAK	MODEL		Plemeno		Věk		BCS	
	r ²	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
M	0,15	0,211	0,05	0,8184	4,56	< 0,05	0,24	0,6249
K	0,29	0,023	2,54	0,1229	5,22	< 0,05	6,13	< 0,05
A	0,16	0,177	4,13	< 0,05	0,31	0,583	4,05	< 0,05
PAT	0,36	< 0,01	6,31	< 0,05	0,24	0,626	14,95	< 0,001
Ž	0,03	0,853	0,00	0,979	0,26	0,6114	0,34	0,5621
AKT0	0,04	0,872	0,25	0,623	0,74	0,399	0,04	0,958
AKT30	0,08	0,682	0,09	0,762	1,33	0,259	0,29	0,748
AKT60	0,13	0,423	1,78	0,194	0,73	0,399	1,49	0,244
AKT90	0,08	0,702	0,17	0,683	0,01	0,912	0,94	0,404
RED0	0,10	0,565	2,09	0,160	0,05	0,819	1,16	0,329
RED30	0,17	0,289	1,87	0,183	0,29	0,592	1,61	0,2194
RED60	0,22	0,152	1,81	0,190	1,57	0,221	2,10	0,143
RED90	0,22	0,148	0,31	0,582	3,35	0,079	1,44	0,255
MRA0	0,03	0,930	0,49	0,490	0,15	0,702	0,13	0,877
MRA30	0,08	0,680	0,51	0,482	0,02	0,878	0,90	0,419
MRA60	0,09	0,594	0,03	0,866	0,12	0,734	1,35	0,278
MRA90	0,05	0,846	0,10	0,751	0,08	0,776	0,66	0,523

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu v g; K = koncentrace spermií v ejakulátu v $10^6/\text{mm}^3$; A = aktivita spermií odečtená ihned po odběru v %; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií; AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a MRA30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

5.6.1 Vliv plemene

Výsledky tohoto vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulce 22. V rámci tohoto vyhodnocení nebyly detekovány průkazné rozdíly ($P > 0,05$) mezi oběma sledovanými plemeny.

Množství odebraných ejakulátů bylo u obou sledovaných plemen 10,8 g. Koncentrace spermií v ejakulátu byla vyšší u českých strakatých býků ($1,07 \times 10^6/\text{mm}^3$) v porovnání s holštýnskými býky ($0,87 \times 10^6/\text{mm}^3$). Aktivita spermií hodnocená bezprostředně po odběru ejakulátu proškoleným personálem laboratoře inseminační stanice byla vyšší u českých strakatých býků (83,51%) oproti býkům holštýnským (75,44%). Vyšší procento patologických spermií (17,34%) bylo detekováno u holštýnských býků. Výsledky

stanovení procenta živých spermií barvením byly u obou plemen téměř shodné (76,40% u českých strakatých, 75,59% u býků holštýnských).

V této tabulce jsou dále uvedeny výsledky krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií provedeného ihned po odběru, po naředění a po zmrazení/rozmrazení ejakulátu. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly detekovány po naředění spermatu u obou plemen (87,58 u českých strakatých býků a 82,55% u býků holštýnských).

Motilita spermií ihned po odběru a po naředění byla vyšší (+3,33 resp. +5,03%) u českých strakatých býků, zatímco po zmrazení/rozmrazení byla vyšší u býků holštýnských (+5,19%). Po 90 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií po odběru (AKT90) byl u holštýnských býků zjištěn pokles aktivity (-4,75%) oproti českým strakatým býkům.

Motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek (MRA0 a MRA30) byla vyšší u holštýnských býků (+5,19 resp. +5,82%) v porovnání s českými strakatými býky. Z výsledků je dále patrné, že aktivita spermií má ve všech provedených testech přežitelnosti u obou plemen klesající charakter.

Tabulka 22 – Vliv plemene na kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků

Proměnná	Jednotka	H (n = 16)		C (n = 15)		P
		LSM	SE	LSM	SE	
M	[g]	10,8	1,28	10,8	1,34	-
K	[10 ⁶ /mm ³]	0,87	0,11	1,07	0,11	-
A	[%]	75,44	3,64	83,51	3,92	-
PAT	[%]	17,34	2,30	13,48	2,46	-
Ž	[%]	75,59	6,33	76,40	6,78	-
AKT0	[%]	77,20	4,16	80,53	4,46	-
AKT30	[%]	70,75	6,89	67,35	7,38	-
AKT60	[%]	68,00	6,96	53,09	7,45	-
AKT90	[%]	46,37	7,36	41,49	7,87	-
RED0	[%]	82,55	2,17	87,58	2,32	-
RED30	[%]	78,87	2,55	84,47	2,72	-
RED60	[%]	70,07	3,95	78,61	4,23	-
RED90	[%]	61,95	6,42	67,70	6,88	-
MRA0	[%]	63,63	4,62	58,44	4,94	-
MRA30	[%]	59,07	5,07	53,25	5,43	-
MRA60	[%]	50,46	4,96	49,10	5,31	-
MRA90	[%]	43,07	5,43	40,27	5,82	-

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu; K = koncentrace spermií v ejakulátu; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií; AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a RED30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií; H = holštýnské plemeno; C = české strakaté plemeno; P - bez významnosti.

5.6.2 Vliv věku plemeníků

Výsledky tohoto vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulce 23. Množství odebraného ejakulátu bylo průkazně vyšší ($P < 0,01$) u býků ve stáří 4 let a více (13,6 g). Koncentrace spermií v ejakulátu byla vyšší u býků ve stáří 4 let a více ($1,07 \times 10^6/\text{mm}^3$) v porovnání s mladšími býky ($0,87 \times 10^6/\text{mm}^3$). Aktivita spermií po odběru ejakulátu byla také vyšší u býků ve věku 4 a více let (81,15%) oproti býkům mladším (77,80%). Vyšší procento patologických spermií (16,99%) bylo zjištěno u býků do 3 let věku včetně, v porovnání s 13,83% u starších býků. Procento živých spermií bylo u obou věkových kategorií téměř shodné (76,04 u býků do 3 let věku včetně, 75,95% u býků ve stáří 4 a více let).

V Tabulce 23 jsou dále uvedeny výsledky krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií provedeného ihned po odběru, po naředění a po zmrazení/rozmrazení ejakulátu. Motilita spermií ihned po odběru a v průběhu celého testu byla vyšší u býků ve stáří do 3 let včetně (+1,06 až 10,2%). Motilita spermií po naředění byla téměř shodná na počátku a po 30 min. testu, zatímco po 60 a 90 min. jeho trvání byla průkazně ($P < 0,05$) vyšší u býků ve věku 4 a více let. Motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek byla vyšší u býků do 3 let věku včetně v průběhu celého testu (+1 až 2,29%).

Tabulka 23 – Vliv věku plemeníků na kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků

Proměnná	Jednotka	≤ 3 roky (n = 14)		≥ 4 roky (n = 17)		P
		LSM	SE	LSM	SE	
M	[g]	8,0	1,25	13,6	1,09	**
K	[$10^6/\text{mm}^3$]	0,87	0,10	1,07	0,09	-
A	[%]	77,80	3,58	81,15	3,12	-
PAT	[%]	16,99	2,24	13,83	1,96	-
Ž	[%]	76,04	6,19	75,95	5,38	-
AKT0	[%]	81,15	4,07	76,57	3,53	-
AKT30	[%]	74,15	6,74	63,95	5,86	-
AKT60	[%]	64,36	6,80	56,72	5,92	-
AKT90	[%]	44,46	7,19	43,40	6,25	-
RED0	[%]	85,38	2,12	84,74	1,84	-
RED30	[%]	80,78	2,49	82,55	2,16	-
RED60	[%]	71,16	3,86	77,52	3,36	-
RED90	[%]	57,28	6,28	72,36	5,46	*
MRA0	[%]	62,18	4,51	59,89	3,92	-
MRA30	[%]	56,66	4,96	55,66	4,31	-
MRA60	[%]	50,88	4,85	48,69	4,22	-
MRA90	[%]	42,67	5,31	40,67	4,62	-

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu; K = koncentrace spermií v ejakulátu; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií; AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po mrazení/rozmrazení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a RED30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; - bez významnosti.

5.6.3 Vliv BCS plemeníků

Výsledky hodnocení odebraných ejakulátů býků v závislosti na jejich BCS jsou uvedeny v Tabulce 24. Množství odebraného ejakulátu bylo nejvyšší u býků s nejvyšší BCS (12,2 g). Se snižující se BCS býků množství odebraného ejakulátu klesalo (-2,2 g). Opačný trend byl zaznamenán u koncentrace spermií v ejakulátu: se zvyšující se BCS plemeníků klesala koncentrace spermií v ejakulátu ($-0,39 \times 10^6/\text{mm}^3$). Nejvyšší procento patologických spermií (19,51%) bylo detekováno u plemeníků s nejvyšší BCS ($\geq 2,75$). Procento živých spermií bylo nejvyšší (81,68%) u býků s nejnižší BCS (≤ 2).

V Tabulce 24 jsou dále uvedeny výsledky krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií provedeného ihned po odběru ejakulátu, po jeho naředění a po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek. Motilita spermií, zjištěná na počátku a po 30 min. testu přežitelnosti zjištěná bezprostředně po odběru ejakulátu, byla u všech skupin býků podle BCS přibližně shodná. Po 60 a 90 min. testu byla však motilita spermií vyšší (+23,64, resp. +21,51%) u býků s nejvyšší BCS ($\geq 2,75$).

Motilita spermií po naředění ejakulátu byla v průběhu celého testu přežitelnosti vyšší u býků s nejnižší BCS (≤ 2), zvláště po 60 min. testu, kdy byl detekován statisticky nízce významný rozdíl ($P < 0,05$) se skupinou 2 (BCS 2,25-2,5).

Naproti tomu vyšší motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek byla na počátku a v průběhu celého krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií detekována u plemeníků s vyšší BCS ($\geq 2,75$).

Tabulka 24 – Vliv BCS plemeníků na kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků

Proměnná	Jednotka	1 – BCS (≤ 2) (n = 8)		2 – BCS (2,25-2,5) (n = 15)		3 – BCS ($\geq 2,75$) (n = 8)		P
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	
M	[g]	10,0	1,90	10,3	1,14	12,2	1,74	-
K	[$10^6/\text{mm}^3$]	1,15	0,16	0,99	0,09	0,76	0,14	-
A	[%]	83,20	5,45	79,51	3,27	75,72	4,98	-
PAT	[%]	12,42	3,42	14,29	2,05	19,51	3,13	-
Ž	[%]	81,68	9,42	72,24	5,65	74,07	8,61	-
AKT0	[%]	79,69	6,19	79,40	3,71	77,50	5,66	-
AKT30	[%]	63,35	10,25	68,77	6,15	75,02	9,36	-
AKT60	[%]	50,70	10,35	56,58	6,21	74,34	9,46	-
AKT90	[%]	34,07	10,94	42,13	6,56	55,58	10,00	-
RED0	[%]	88,92	3,22	83,14	1,93	83,11	2,95	-
RED30	[%]	84,86	3,78	77,87	2,27	82,28	3,46	-
RED60	[%]	81,43	5,87	67,93	3,53	73,67	5,37	* 1–2
RED90	[%]	70,35	9,55	55,64	5,73	68,47	8,73	-
MRA0	[%]	60,47	6,86	59,43	4,12	63,20	6,27	-
MRA30	[%]	56,72	7,54	50,83	4,53	60,93	6,89	-
MRA60	[%]	48,62	7,38	43,97	4,43	56,76	6,74	-
MRA90	[%]	40,35	8,08	37,36	4,85	47,30	7,38	-

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu; K = koncentrace spermií v ejakulátu; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií; AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po mrazení/rozmrazení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a RED30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií; H = holštýnské plemeno; C = české strakaté plemeno; * $P < 0,05$; - bez významnosti.

5.6.4 Korelační analýza

V Tabulce 25 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi hodnocenými základními ukazateli kvality ejakulátu býků. Vysoce statisticky průkazné závislosti ($P < 0,001$) byly detekovány mezi plemenem a BCS býků.

Středně statisticky významné závislosti ($P < 0,01$) byly detekovány mezi množstvím ejakulátu a věkem plemeníka; mezi koncentrací spermií v ejakulátu a procentem patologických spermií a mezi aktivitou spermií ihned po odběru a procentem patologických spermií.

Statisticky níže průkazné korelace ($P < 0,05$) byly potom detekovány mezi aktivitou spermií bezprostředně po odběru a koncentrací spermií v ejakulátu, resp. procentem živých spermií.

V Tabulce 26 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi motilitou spermií po odběru, po naředění, po zmrazení/rozmrazení a během krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií. Vysoce statisticky průkazné závislosti ($P < 0,001$)

byly detekovány mezi motilitou spermií po 60 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií provedeného po odběru ejakulátu a motilitou spermií po 30 a 90min a mezi motilitou na počátku a po 30min. testu přežitelnosti spermií po odběru; mezi motilitou spermií po 30 min. testu přežitelnosti po naředění a motilitou spermií v čase 0 a 60 min. testu; a mezi motilitou spermií ve všech časech (0, 30, 60, 90 min.) testu přežitelnosti spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek.

Středně statisticky významné závislosti ($P < 0,01$) byly detekovány mezi motilitou spermií po 30 a 90 min. trvání testu přežitelnosti spermií po naředění; mezi motilitou spermií po 60 min. testu po naředění a motilitou spermií po 60 a 90 min. testu po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek.

Statisticky níže významné korelace ($P < 0,05$) byly potom detekovány mezi motilitou spermií v čase 0 a 60 min. testu a mezi motilitou spermií po 30 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií po odběru; mezi motilitou spermií po 60 min. testu po naředění a na počátku testu po naředění, resp. po 30 min. testu po zmrazení/rozmrazení; dále pak mezi motilitou spermií po 90 min. testu po naředění a 60, resp. 90 min. testu po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek.

Tabulka 25 – Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi základními ukazateli ejakulátu býků

	Věk	BCS	M [g]	K [$10^6/\text{mm}^3$]	A [%]	PAT [%]	Ž [%]
Plemeno	-0,152	0,649	0,002	-0,002	0,173	-0,021	-0,077
	0,416	< 0,001	0,990	0,993	0,354	0,913	0,678
Věk	1	-0,145	0,521	0,232	0,149	-0,059	-0,140
		0,435	0,003	0,209	0,424	0,755	0,454
BCS		1	0,138	-0,329	-0,737	0,247	-0,110
			0,458	0,071	0,693	0,181	0,551
M [g]			1	-0,056	0,144	-0,016	-0,110
				0,767	0,438	0,931	0,555
K [$10^6/\text{mm}^3$]				1	0,359	-0,524	0,283
					0,047	0,003	0,123
A [%]					1	-0,499	0,360
						0,004	0,047
PAT [%]						1	-0,089
							0,635

Vysvětlivky: M = množství ejakulátu; K = koncentrace spermií v ejakulátu; A = aktivita spermií ihned po odběru; PAT = procento patologických spermií; Ž = procento živých spermií.

Tabulka 26 – Pearsonovy korelační koeficienty r a související statistické významnosti P mezi motilitou spermií po odběru, po naředění a po zmrazení/rozmrazení

[%]	AKT30	AKT60	AKT90	RED0	RED30	RED60	RED90	MRA0	MRA30	MRA60	MRA90
AKT0	0,600	0,397	0,059	0,168	0,247	0,170	0,124	0,118	0,058	0,078	0,065
	< 0,001	0,027	0,753	0,366	0,180	0,362	0,507	0,528	0,759	0,677	0,729
AKT30	1	0,780	0,421	0,035	0,244	0,142	0,091	0,094	0,092	0,153	0,099
		< 0,001	0,018	0,851	0,186	0,445	0,625	0,615	0,625	0,410	0,595
AKT60		1	0,583	-0,068	0,087	-0,059	-0,068	-0,055	-0,014	0,002	0,008
			< 0,001	0,718	0,641	0,755	0,715	0,770	0,939	0,991	0,997
AKT90			1	-0,138	-0,013	-0,141	-0,048	-0,214	-0,180	-0,123	-0,089
				0,459	0,943	0,451	0,799	0,248	0,333	0,509	0,635
RED0				1	0,817	0,434	0,248	0,109	0,160	0,143	0,155
					< 0,001	0,015	0,179	0,561	0,389	0,445	0,406
RED30					1	0,590	0,489	0,120	0,137	0,198	0,215
						< 0,001	0,005	0,521	0,462	0,286	0,245
RED60						1	0,907	0,284	0,393	0,513	0,486
							< 0,001	0,122	0,029	0,003	0,006
RED90							1	0,155	0,254	0,395	0,426
								0,406	0,168	0,029	0,017
MRA0								1	0,914	0,825	0,705
									< 0,001	< 0,001	< 0,001
MRA30									1	0,926	0,846
										< 0,001	< 0,001
MRA60										1	0,916
											< 0,001

Vysvětlivky: AKT0 = motilita spermií ihned po odběru; RED0 = motilita spermií po naředění; MRA0 = motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek; AKT30–90, RED30–90 a MRA30–90 = motilita spermií po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

6 DISKUSE

6.1 Základní statistické charakteristiky hodnoceného souboru dojnic a býků

Průměrná užitkovost holštýnských dojnic v KU za laktaci byla v kontrolním roce 2010 – 2011 podle Kvapilíka *et al.* (2012) 8 808 kg. Mléčná užitkovost námi sledovaných dojnic je tedy o 422,1 kg mléka za laktaci více, než je celostátní průměr.

Obsah tuku v mléce holštýnských dojnic činil v kontrolním roce 2010/2011 3,79%, resp. 333 kg (Kvapilík *et al.*, 2012). Mléko námi sledovaných dojnic obsahovalo o 0,05% a 18,1 kg více tuku než je celostátní průměr.

Obsah bílkovin v mléce námi sledovaných dojnic byl také mírně zvýšený (+0,08% resp. +5,0 kg) oproti celostátnímu průměru za kontrolní rok 2010/11 (3,30%, 291 kg), který udává Kvapilík *et al.* (2012).

Stanovení obsahu močoviny je analýza standardně dostupná v rámci KU v ČR. Její průměrný obsah zjištěný v roce 2011 (25,46 mg/100 ml) signalizuje vyšší metabolickou zátěž organismu zvířat (Kvapilík *et al.*, (2012). Obsah močoviny v mléce u námi sledovaných zvířat (22,529 mg/100 ml) je tedy o 2,931 mg/100 ml nižší než celostátní průměr. Uvedené hodnoty močoviny jsou v souladu s prací od Jankowska *et al.* (2010). Spolu s klesajícím obsahem močoviny v mléce docházelo k nárůstu denního nádoje. Tento negativní vztah mezi obsahem močoviny v mléce a mléčnou užitkovostí je v souladu s pracemi Trevaskis a Fulkerson (1999) a Diab *et al.* (1996). Naproti tomu Jílek *et al.*, (2006) a Godden *et al.* (2001) zjistili pozitivní vztah mezi obsahem močoviny v mléce a mléčnou užitkovostí, se vzrůstající koncentrací močoviny v mléce rostla také mléčná užitkovost.

Průměrný obsah acetonu v mléce u námi sledovaných zvířat byl 6,18 mg/l. Toto je v souladu s tvrzením od Pechové (2009), že koncentrace acetonu v mléce by neměla překročit 23,2 – 58,08 mg/l. U krav s největším obsahem acetonu v mléce byl detekován nejnižší denní nádoj. Potvrdilo se tak tvrzení Gustafssona a Emanuelsona (1996), že s rostoucím obsahem acetonu v mléce klesá denní dojivost.

Podle Zaaijer *et al.* (1993) můžeme využít jako indikátoru plodnosti dojnic složení jejich cervikálního hlenu. Důležitou fyzikální vlastností CH je jeho pH (Tsiligiani *et al.*, 2001a). Podle studie Schilling a Zust (1968) se průměrné hodnoty pH hlenu děložního krčku naměřené *in vivo* během říjového cyklu dojnic pohybují v rozmezí 7,1 až 7,5. Po vyjmutí hlenu z děložního krčku jsou potom hodnoty pH naměřené *in vitro* o 0,6 až 0,88 vyšší než hodnoty naměřené *in vivo* v děložním krčku. Eggertkruse *et al.* (1993) uvádějí pH cervikálního hlenu u žen v rozmezí 5,4–8,2. Podle Gatti *et al.* (1993) je optimální pH pro motilitu spermií u ovcí v rozmezí 7 až 8. Námi naměřené průměrné pH vzorků CH (8,62) je tedy na horní hranici výše citovaných rozpětí hodnot pH. Podle Schilling a Zust (1968) ke zvýšení pH v děložním krčku dochází během diestru a proestru. Námi zjištěné mírně zvýšené hodnoty pH hlenu děložního krčku tedy naznačují, že plemence nebyly v optimální době pro inseminaci. Je ovšem nutno podotknout, že pH bylo změřeno pouze u 54% hodnocených vzorků CH.

Podle Hegedüšové *et al.* (2009) se mohou v CH hromadit některé toxické metabolity, jako např. močovina a aceton. Vyšší hodnoty koncentrace močoviny (+372,45 mg/l) a acetonu (+20,04 mg/l) byly detekovány v CH než v mléce. Toto zjištění je v souladu s pracemi Beran *et al.* (2012a), Beran *et al.* (2012c), Beran *et al.* (2012d) a Hegedüšové *et al.* (2009).

Posouzením krystalických struktur CH můžeme usuzovat mimo jiné na fázi říjového cyklu (Ahmadi *et al.*, 2005). Největší zastoupení (34,96%) z námi hodnocených vzorků CH měla kapradovitá krystalizace. Podle Hafez a Hafez (2000) tento typ krystalizace ukazuje na plemence v říji, v nevhodnější době pro inseminaci. Tento fakt potvrzuje také Hegedüšová *et al.* (2010). Zjistili, že nejvyšší úspěšnost inseminace (75%) měly plemence s kapradovitou krystalizací CH. Správné načasování inseminace je pro úspěšné zabřeznutí plemenic klíčové (Říha *et al.*, 2004). Neefektivní detekce říje je jednou z hlavních příčin zhoršené plodnosti skotu (Walsh *et al.*, 2011). Posouzení krystalizace CH je tedy velmi vhodnou pomůckou jak inseminaci správně načasovat. Další možností jak eliminovat chyby při detekci říje je použití tzv. metody Ovsynch (Louda *et al.*, 2008), která chovateli umožní pomocí hormonálního ošetření vyvolat ovulaci a načasovat tak inseminaci u celé skupiny zvířat do určitého dne v týdnu (Pursley *et al.*, 1995). Existuje více doporučovaných postupů a medikačních schémat, např. Ovsynch®

a CO-Synch protokol (Alkar *et al.*, 2011), Doublesynch protokol (Ozturk *et al.*, 2010), Presynch-Ovsynch program (Kasimanickam *et al.*, 2006), avšak stále není nad optimalizaci životních podmínek zvířat, precizní vyhledávání říjí a správné načasování inseminace (Rajmon a Jílek, 2006). Druhou nejpočetnější skupinou (24,71%) byla krystalizace zbobtnalá. Tento výsledek je překvapivý, neboť tento typ krystalizace CH ukazuje na krávy po skončení říje, u nichž je inseminace nevhodná (Burdych *et al.*, 2004). Na tento fakt ukazovalo také zvýšené pH hodnocených vzorků CH (viz výše). Dalšími početněji zastoupenými skupinami byla krystalizace atypická (14,62%), která ukazuje na metabolickou poruchu a plavuň-kaprad'ovitá krystalizace (13,61%), ukazující na krávy v první polovině říje (Burdych *et al.*, 2004). Inseminace v tomto období je podle tohoto autora vhodná. Shodně z 3,19% byly zastoupeny krávy bez krystalizace a s celularizací. Podle Roba a Stehlíka (1983) žádné krystalické struktury nelze pozorovat u krav zabřezlých. Cellularizace CH potom ukazuje na krávy v zánětlivém procesu.

Testem přežitelnosti spermií v CH můžeme posoudit jeho toxicitu pro spermie (Kumar a Devanathan, 1996). Motilita spermií měla v průběhu celého testu přežitelnosti klesající charakter (z 53,28 do 26,15%).

Sledování BCS dojnic a jejich změn v průběhu laktace přináší chovateli cenné informace o stavu energetických zásob nejen jednotlivých dojnic, ale i celého stáda (Ducháček *et al.*, 2012). Tělesná kondice u námi sledované skupiny dojnic měla klesající tendenci až do 3. měsíce laktace, od 4. měsíce začala BCS dojnic opět stoupat. Toto je v souladu s prací od Maršálka *et al.* (2008), kteří zjistili nejvýznamnější pokles kondice dojnic do třetího měsíce po otelení. Také podle Parker (2009) může BCS u krav klesnout až na hodnotu 2,5 bodů, při ztrátě 1,5 kg tukové tkáně za den. K poklesu tělesné kondice ale může podle tohoto autora docházet až do 4. měsíce laktace.

Louda *et al.* (2007) uvádí následující ukazatele kvality ejakulátů býků chovaných na inseminační stanici: množství – 3 až 12 g; hustota – 0,8 až 2,0 x 10⁶/mm³; aktivita – 45 až 75%; patologické spermie – 5 až 20%. Lze konstatovat, že naše výsledky odpovídají těmto požadavkům. Výše zmíněné indikátory patří k základní charakteristice odebraných ejakulátů a rozhodují o kvalitě vyrobených inseminačních dávek (Rodriguez-Martinez, 1998).

6.2 Vliv pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu

Vyšší hodnoty obsahu acetonu v mléce v den inseminace byly zjištěny u prvotetek (7,09 mg/l). Toto může být způsobeno vyšším metabolickým stresem krav na první laktaci, který je vyšší než u starších krav. Jejich organismus je na počátku laktace extrémně namáhán v důsledku začínající produkce mléka a přetrvávajícího růstu krav v poporodním období (De Vries a Veerkamp, 2000). Jejich příjem krmiva nestačí uspokojit jejich požadavky na záchovu, mléčnou produkci a na zajištění nebo udržení březosti (Reist *et al.*, 2000). Podle Gustafssona a Emanuelsona (1996) tyto výsledky také naznačují vysoké riziko ketózy. Nicméně, opačný trend byl detekován u obsahu močoviny v mléce. Vyšší obsah močoviny v mléce v den inseminace byl detekován u krav na 3. a další laktaci (228,20 mg/l). Tento výsledek může souviset s vyšší mléčnou užitkovostí této skupiny dojnic. Mléčná užitkovost za sledovanou laktaci i průměrný denní nádoj v den inseminace byly vyšší (+685,7 resp. + 1,07 kg) ($P < 0,05 - 0,001$) u této skupiny dojnic než u prvotetek. Potvrdili se tak závěry studie Beran *et al.* (2012c). Tato zjištění také odpovídají výsledkům publikovaným v práci Hanuš *et al.* (2004), kteří zjistili, že mléko od krav na 1. laktaci má nižší obsah močoviny v mléce.

Podle Pryce *et al.* (2000) jsou mnohem důležitější změny BCS v průběhu laktace než její aktuální stav. Proto pro vyhodnocení vlivu BCS na ukazatele metabolismu dojnic byl sledovaný soubor plemenic rozdělen podle změny BCS jeden měsíc před inseminací nebo od otelení do inseminace. Nejvyšší koncentrace acetonu a močoviny v mléce byly detekovány u krav s nejvyšším poklesem BCS jak jeden měsíc před inseminací tak od otelení do inseminace. Jedná se o dojnice nejvíce metabolicky vystresované. U této skupiny dojnic lze podle Říhy a Hanuše (1999) a Jankowska *et al.* (2010) očekávat problémy s reprodukcí a zdravotní komplikace.

6.3 Vliv úrovně metabolismu na kvalitu cervikálního hlenu dojnic

Úroveň intenzity metabolismu dojnic můžeme sledovat pomocí obsahu močoviny a acetonu v mléce (Hanuš *et al.*, 2004). Proto byla pro další vyhodnocení zvířata rozdělena do tří skupin podle obsahu močoviny a acetonu v mléce, ve snaze detekovat vztahy k obsahu sledovaných ukazatelů kvality CH (pH, obsah močoviny a acetonu) a kumulaci

toxických metabolitů v CH dojnic. Hraniční hodnoty obsahu močoviny a acetonu v mléce jednotlivých skupin byly stanoveny tak, aby počet zvířat ve skupinách byl přibližně stejný. Skupina 1 měla průměrný obsah močoviny v mléce 154,09 mg/l a acetonu 1,04 mg/l, skupina 2 pak měla obsah močoviny v mléce 228,36 mg/l a acetonu 2,02 mg/l a skupina 3 měla obsah močoviny v mléce na hodnotě 290,03 mg/l a acetonu na hodnotě 15,22 mg/l. Pechová (2009) udává rozpětí hodnot močoviny v mléce 145,2 až 290,4 mg/l a acetonu v mléce 23,2 až 58,08 mg/l. Průměrné hodnoty obsahu obou metabolitů v jednotlivých skupinách odpovídají těmto rozpětím. Z výsledků je patrný trend zvyšujícího se pH a obsahu močoviny, resp. acetonu v CH v závislosti na vyšším obsahu močoviny, resp. acetonu v mléce ($P < 0,05 - 0,01$). Vyšší hladina močoviny v mléce naznačuje výraznější zatížení metabolismu dojnice nedostatkem energie či špatně vybalancovanou krmnou dávkou (Guo *et al.*, 2004). Podle Hanuše (2004) mají výkyvy v koncentraci močoviny v mléce vztah ke zhoršené reprodukci dojnic, protože přebytek močoviny v krvi přechází do reprodukčních orgánů, zejména do cervikálního hleny (Sova *et al.*, 1990). Tuto skutečnost lze očekávat především u dojnic skupiny 3 s průkazně vyšší hladinou močoviny ($P < 0,01$) a acetonu ($P < 0,05$).

Říha a Hanuš (1999) zjistili, že se vzrůstající hladinou acetonu v mléce dochází ke zhoršení reprodukce vlivem negativní energetické bilance. Bylo zjištěno vyšší pH a obsah močoviny, resp. acetonu u krav s vyšším zastoupením acetonu v mléce, které vychází z energetického zatížení organismu. Již nefyziologická hodnota obsahu acetonu v hleny byla zjištěna v návaznosti na nejvyšší zastoupení močoviny a acetonu v mléce. Hegedüšová *et al.* (2009) dospěli k závěru, že obsah acetonu a močoviny v tělních tekutinách má vliv na skutečnou oplozovací schopnost spermií a úroveň reprodukce u vysokoprodukčních a metabolicky stresovaných zvířat. Proto lze předpokládat, že zvýšená koncentrace močoviny, resp. acetonu v cervikálním hleny, které souvisí s ještě fyziologickým, avšak zvýšeným obsahem močoviny v mléce (> 250 mg/l), budou omezovat přežitelnost spermií a tím snižovat individuální schopnost krav zabřeznout. Těmito dosaženými výsledky na větším počtu hodnocených vzorků a sledovaných zvířat se potvrdily závěry práce Beran *et al.* (2012a).

6.4 Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií

Testem přežitelnosti spermií v CH můžeme posoudit jeho toxicitu pro spermie (Kumar a Devanathan, 1996). Průkazně ($P < 0,05 - 0,001$) nejvyšší hodnoty motility spermií byly v průběhu celého testu přežitelnosti spermií v CH detekovány u krav s plavuňovitou, plavuň-kaprad'ovitou a kaprad'ovitou krystalizací, tedy u krav ve vhodné době pro inseminaci (viz výše). Průkazně ($P < 0,05 - 0,001$) nejnižší hodnoty motility spermií byly detekovány u krav s žádnou, atypickou krystalizací a celularizací, tedy u krav v nevhodné době pro inseminaci (viz výše). Dalším důvodem, proč byla u těchto krav detekována nejnižší motilita spermií, je fakt, že CH od těchto krav představoval nevhodné prostředí pro přežití spermií. Byly tak potvrzeny výsledky dříve publikovaných studií (Beran *et al.*, 2012c; Beran *et al.*, 2011c; Stádník *et al.*, 2011; Ježková *et al.*, 2008; Stádník *et al.*, 2008; Ježková *et al.*, 2007).

Pro další vyhodnocení vlivu kvality CH na přežitelnost spermií byl soubor plemenic rozdělen na 3 skupiny podle obsahu močoviny a acetonu v hlenu. Hraniční hodnoty obsahu močoviny a acetonu v hlenu jednotlivých skupin byly stanoveny tak, aby počet zvířat ve skupinách byl přibližně stejný. Skupina 1 měla průměrný obsah močoviny v hlenu 191,17 mg/l a acetonu 3,34 mg/l, skupina 2 měla průměrný obsah močoviny na hodnotě 347,11 mg/l a acetonu 8,95 mg/l a skupina 3 pak měla průměrný obsah močoviny v hlenu na hodnotě 1263,64 mg/l a acetonu 67,74 mg/l. Z výsledků je patrný trend klesající úrovně motility spermií v závislosti na zvyšujícím se obsahu močoviny, resp. acetonu ve vzorcích CH ve všech časech krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH ($P < 0,05 - 0,001$). Intenzita poklesu motility spermií byla u acetonu vyšší (-12,5%) než u močoviny (-6,67%). Tyto výsledky naznačují, že aceton je pro spermie více toxický než močovina. Nejnižší hodnoty motility spermií byly ve všech časech trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH detekovány u krav s nejvyšším obsahem obou toxických metabolitů ve vzorcích CH, v některých případech (motilita spermií na počátku testu přežitelnosti u vlivu obsahu močoviny a v časech 0, 30 a 60 min. testu přežitelnosti spermií u vlivu obsahu acetonu) dokonce vysoce statisticky průkazně ($P < 0,001$). Tyto výsledky lze vysvětlit tím, že vyšší hladiny močoviny a acetonu zlomí rezistenci spermií vůči metabolitům a vedou k významnému snížení přežitelnosti spermií. Tato zjištění odpovídají tvrzením Sova *et al.* (1990), který publikoval, že jednou z příčin

snížené reprodukční schopnosti dojnic je nevhodné prostředí v samičích pohlavních orgánech, zejména v děložním krčku. Potvrdily se tak předpoklady vyslovené v pracích Beran *et al.* (2011c), Beran *et al.* (2011d) a Beran *et al.* (2012a), že zvýšená koncentrace močoviny, resp. acetonu v CH bude omezovat přežitelnost spermií a tím snižovat individuální schopnost krav zabřeznout.

6.5 Vyhodnocení vlivů působících na ukazatele ejakulátu býků

Pouze plně životaschopná spermie je potenciálně oplozeníschopná. Proto bylo další hodnocení zaměřeno na vyhodnocení přežitelnosti spermií. Nejvyšší úroveň motility spermií byla zjištěna po naředění u obou hodnocených plemen. Tento fakt dokumentuje vhodně zvolenou technologii ředění spermatu a přípravy inseminačních dávek pro zajištění nejvyšší možné kvality ejakulátu pro následné zmrazení. Zejména výběru vhodného ředidla je třeba věnovat dostatečnou pozornost (Beran *et al.*, 2011b). Zmrazení inseminačních dávek, jejich skladování po dlouhou dobu a následné rozmrazení jsou velmi náročné procesy pro buněčné membrány spermií a velmi ovlivňují jejich životaschopnost (Frydrychová *et al.*, 2010). Naše výsledky dokumentují uvedené tvrzení podle významného poklesu motility spermií po rozmrazení inseminačních dávek. Z dosažených výsledků jsou dále patrné individuální rozdíly v motilitě spermií ihned po odběru, po naředění i po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek. Tyto výsledky naznačují možné odlišné požadavky na řízení chovu plemenů a postup výroby inseminačních dávek v závislosti na plemeni, resp. produkčním typu plemenů.

Dále byl sledován vliv věku plemenů na kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu. U starších býků bylo zjištěno větší množství ejakulátu, koncentrace spermií v ejakulátu, aktivita spermií ihned po odběru a nižší procento patologických spermií v ejakulátu. Tyto výsledky jsou v souladu s prací Balic *et al.* (2012), kteří zjistili lepší kvantitativní a kvalitativní vlastnosti ejakulátu u starších býků. Naproti tomu u mladších býků byl detekován statisticky významný pokles motility spermií po 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií po naředění. Tato skutečnost by mohla souviset s větší intenzitou metabolismu u mladších býků. Motilita spermií po zmrazení/rozmrazení inseminačních dávek byla vyšší u býků mladších 3 let v průběhu celého testu. Tyto výsledky jsou v souladu s pracemi Štolc *et al.* (2009a) a Štolc *et al.* (2009b) a potvrzují význam věku stejně jako zpracování ejakulátu – procesy ředění

a zmrazení/rozmrazení významně snižují motilitu spermií, zvláště po 60 a 90 min. testu. Producenti inseminačních dávek by mohli využít tyto výsledky u mladých býků pro zajištění vyšší kvality jejich dávek nižší úrovní ředění jejich ejakulátu. Nicméně toto odporuje ekonomice výroby inseminačních dávek – v zájmu producenta inseminačních dávek je z každého odebraného ejakulátu vyrobit inseminačních dávek co možná nejvíce.

Dalším sledovaným efektem byla BCS plemeníků. Naše výsledky naznačují lepší kvalitativní i kvantitativní ukazatele ejakulátu u býků s vyšší kondicí ($\geq 2,75$). Potvrdily se tak závěry práce Beran *et al.* (2011a). Na základě těchto výsledků lze pro chovatele býků na inseminační stanici i v přirozené plemenitbě doporučit býky s BCS 2,75 a vyšší. Nicméně je třeba dalšího výzkumu na stanovení horní hranice BCS. Chovatelé plemenných býků mohou využít těchto výsledků ke změně v řízení chovu plemeníků.

7 ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ PRO VYUŽITÍ POZNATKŮ V PRAXI

Cílem předkládané disertační práce bylo definovat vztahy mezi BCS dojnic a ukazateli úrovně jejich metabolismu (ukazatele mléčné užitkovosti, především obsah močoviny a acetonu v mléce); dále pak vyhodnotit interakce mezi obsahem močoviny a acetonu v mléce a kvalitou jejich cervikálního hlenu, vyjádřenou jeho pH a obsahem močoviny a acetonu v tomto hlenu; určit vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií býků se známou plodností a determinovat faktory, které ovlivňují kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků.

1) Základní statistické charakteristiky

Ukazatele mléčné užitkovosti sledované skupiny dojnic byly mírně vyšší než celostátní průměr. Obsahy močoviny a acetonu v mléce byly v rámci fyziologických rozpětí hodnot. Naměřené hodnoty pH byly na horní hranici fyziologických rozpětí hodnot. Byl detekován vyšší obsah močoviny (+372,45 mg/l) a acetonu (+20,04 mg/l) v hlenu než v mléce. Největší zastoupení (34,96%) z hodnocených vzorků hlenů měla kaprad'ovitá krystalizace, tedy plemenice v optimální době pro inseminaci. Motilita spermií měla v průběhu celého testu přežitelnosti spermií klesající charakter (z 53,28 na 26,15%). Tělesná kondice u námi sledované skupiny dojnic měla klesající tendenci až do 3. měsíce laktace, od 4. měsíce začala BCS opět stoupat. Kvalitativní a kvantitativní parametry odebraných ejakulátů odpovídaly požadavkům na kvalitu ejakulátu býků chovaných na inseminační stanici.

2) Vliv pořadí laktace, úrovně užitkovosti a BCS dojnic na ukazatele metabolismu

V rámci tohoto sledování byly hodnoceny vztahy mezi pořadím laktace, úrovní užitkovosti, BCS dojnic a ukazateli mléčné užitkovosti. Vlivy pořadí laktace a obou změn BCS dojnic byly průkazné pouze na vybrané ukazatele mléčné užitkovosti. Vliv úrovně užitkovosti na obsah močoviny a acetonu v mléce byl neprůkazný ($P > 0,05$). Vyšší hodnoty acetonu v mléce v den inseminace byly zjištěny u prvotetek (7,09 mg/l), naopak

nejvyšší hodnoty močoviny v mléce byly zjištěny u krav na 3. a další laktaci (228,20 mg/l). U této skupiny dojnic byla zároveň zjištěna i nejvyšší úroveň mléčné užitkovosti. Nejvyšší koncentrace acetonu a močoviny v mléce byly detekovány u krav s nejvyšším poklesem BCS.

3) Vliv úrovně metabolismu na kvalitu cervikálního hlenu

Kvalita cervikálního hlenu byla sledována pomocí jeho pH a obsahu močoviny a acetonu v hlenu. Vliv obsahu močoviny v mléce byl statisticky významný ($P < 0,05$) pouze na obsah močoviny v hlenu, vliv acetonu v mléce byl neprůkazný ($P > 0,05$). Z výsledků je patrný trend zvyšujícího se pH a obsahu močoviny, resp. acetonu v hlenu v závislosti na vyšším obsahu močoviny, resp. acetonu v mléce ($P < 0,05 - 0,01$).

4) Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií

Kvalita cervikálního hlenu byla v tomto hodnocení vyjádřena jeho krystalizací a obsahem močoviny a acetonu, přežitelnost spermií byla hodnocena pomocí motility spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v hlenu. Průkazně ($P < 0,05 - 0,01$) nejvyšší hodnoty motility spermií byly v průběhu celého testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu detekovány u krav s plavuňovitou, plavuňovito-kaprad'ovitou a kaprad'ovitou krystalizací, tedy u krav v optimální době pro inseminaci. Z výsledků je dále patrný trend klesající úrovně motility spermií v závislosti na zvyšujícím se obsahu močoviny, resp. acetonu ve vzorcích cervikálního hlenu ($P < 0,05 - 0,001$). Vyšší intenzita poklesu motility spermií byla zjištěna u acetonu (-12,5%) než u močoviny (-6,67%).

5) Vlivy působící na kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu býků

Byl hodnocen vliv plemene, věku a BCS plemeníků na sledované ukazatele. Vliv plemene byl průkazný ($P < 0,05$) na aktivitu spermií ihned po odběru a procento patologických spermií. Z výsledků jsou patrné individuální rozdíly v motilitě spermií ihned po odběru, po naředění i po zmrazení/rozmrazení ejakulátu u obou hodnocených plemen. Vliv věku plemeníků byl průkazný ($P < 0,05$) na množství a koncentraci spermií v ejakulátu. Byly zjištěny lepší kvalitativní i kvantitativní vlastnosti ejakulátu u starších býků. Vliv BCS byl statisticky nízce významný ($P < 0,05$) na koncentraci a aktivitu spermií

v ejakulátu ihned po odběru a vysoce statisticky významný ($P < 0,001$) na procento patologických spermií. Výsledky naznačují lepší kvalitativní i kvantitativní vlastnosti ejakulátu u býků s vyšší kondicí ($\geq 2,75$).

První stanovená hypotéza, že úroveň metabolismu dojnic významně ovlivňuje kvalitu cervikálního hlenu, byla potvrzena. U krav s vyšším zastoupením acetonu a močoviny v mléce bylo detekováno vyšší ($P < 0,05 - 0,01$) pH a obsah toxických metabolitů (acetonu a močoviny) v cervikálním hlenu.

Také druhá vědecká hypotéza, že kvalita cervikálního hlenu ovlivňuje přežitelnost spermií býků se známou plodností, byla potvrzena. Motilita spermií se vzrůstající hladinou acetonu a močoviny v cervikálním hlenu průkazně ($P < 0,05 - 0,001$) klesala.

Na základě dosažených výsledků lze chovatelům skotu doporučit sledovat úroveň metabolismu chovaných dojnic pravidelným monitoringem jejich tělesné kondice a pomocí obsahu močoviny v mléce. Vzorky mléka jsou od dojnic snadno získatelné a analýza obsahu močoviny v mléce je chovatelům standardně dostupná v rámci KU.

Pro stanovení nejvhodnější doby pro inseminaci a pro rozhodnutí, zda dané zvíře vůbec inseminovat, lze chovatelům doporučit posouzení cervikálního hlenu dojnic. Test arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu je velmi jednoduchý na provedení a vyhodnocení. Přesné stanovení optimální doby pro inseminaci má společně s metabolickou kvalitou cervikálního hlenu zásadní význam pro individuální schopnost dojnice zabřeznout.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmadi, M. R., Kafi, M., Ghodrat, M. 2005. Crystallization and the number of neutrophils increase in the cervical mucus as parturition approaches in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology*. 14. 72–75.
- Aktas, M. S., Ozkanlar, S., Ucar, O., Ozkanlar, Y., Kaynar, O., Aytekin, I. 2011. Relationships between Body Condition Score and some metabolic blood parameters in early lactating dairy cows. *Revue De Medecine Veterinaire*. 162 (12). 586–592.
- Alavi, S. M. H., Rodina, M., Hatf, A., Stejskal, V., Policar, T., Hamackova, J., Linhart, O. 2010. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). *Czech Journal of Animal Science*. 55 (4). 174–182.
- Alkar, A., Tibary, A., Wenz, J. R., Nebel, R. L., Kasimanickam, R. 2011. Presynchronization with GnRH 7 days prior to resynchronization with CO-Synch did not improve pregnancy rate in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 76 (6). 1036–1041.
- Amer, H. A. 2008. Effect of body condition score and lactation number on selected reproductive parameters in lactating dairy cows. *Global Veterinaria*. 2 (3). 130–137.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L. 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, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61 (5). 895–907.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002a. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187 (1–2). 77–81.

- Arav, A., Zeron, Y., Shturman, H., Gacitua, H. 2002b. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reproduction Nutrition Development*. 42 (6). 583–586.
- Awad, M. M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 123. 157–162.
- Balic, I. M., Milinkovic-Tur, S., Samardzija, M., Vince, S. 2012. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*. 78 (2). 423–431.
- Bastin, C., Loker, S., Gengler, N., Sewalem, A., Miglior, F. 2010. Short communication: Genetic relationship between calving traits and body condition score before and after calving in Canadian Ayrshire second-parity cows. *Journal of Dairy Science*. 93 (9). 4398–4403.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barriere, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*. 119 (3–4). 305–313.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barriere, P., Larrat, M., Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70 (9). 1478–1488.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012a. Porovnání obsahu močoviny a acetonu v mléce a cervikálním hlenu dojnic. *Náš chov*. 72 (2). 14–16.
- Beran, J., Stádník, L., Bezdíček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J. 2012b. 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 für Tierzucht*. 55 (3). 207–218.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012c. Relationships between changes in Holstein cow's body condition, acetone and urea content in milk and cervical

- mucus and sperm survival. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. V tisku – 5/2012: potvrzeno redakcí.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012d. Acetone and Urea content in cow's milk and cervical mucus and their impact on sperm survival. In: *Book of abstracts of the 63rd Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Bratislava, Slovakia: Wageningen Academic Publishers. V tisku.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Toušová, R., Louda, F. 2011a. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 59 (6). 37–44.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J. 2011b. Vliv ředidla na aktivitu spermií. *Náš chov*. 71 (1). 58–59.
- Beran, J., Ducháček, J., Stádník, L., Okrouhlá, M., Čítek, J. 2011c. Relationships among crystallization, acetone and urea content in dairy cows cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3). 89–89.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Štolc, L. 2011d. Vliv tělesné kondice dojnic na kvalitu jejich cervikálního hlenu. In: *Zborník príspevkov „VI. Vedecké konferencie doktorandov s medzinárodnou účasťou“, 24. 11. 2011*. Nitra, Slovensko: SPU v Nitre, s. 88–90. ISBN: 9788055206936.
- Berry, D. R., Buckley, F., Dillon, R. 2007. Body condition score and live-weight effects on milk production in Irish Holstein-Friesian dairy cows. *Animal*. 1 (9). 1351–1359.
- Bewley, J. M., Schutz, M. M. 2008. Review: An interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle. *The Professional Animal Scientist*. 24. 507–529.
- Bezdíček, J., Říha, J., Kučera, J., Dufek, A., Bjelka, M., Šubrt, J. 2010. Relationships of sire breeding values and cutting parts of progeny in Czech Fleckvieh bulls. *Archiv für Tierzucht*. 53 (4). 415–425.
- Bezdíček, J., Louda, F. 2009. Analysis of pregnancy length in multiple births in Czech Fleckvieh and Holstein cattle. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 57 (5). 27–32.

- Bezdiček, J., Šubrt, J., Filipčík, R., Bjelka, M., Dufek, A. 2007. The effects of inbreeding on service period and pregnancy length in Holsteins and Czech Fleckviehs after the first calving. *Archiv für Tierzucht*. 50 (5). 455–463.
- Bhoite, U. Y., Sutar, D. A., Ulmek, E. R. 2008. Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*. 85 (4). 53–55.
- Bozkurt, Y., Öğretmen, F., Kökçü, Ö., Erçin, U. 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*. 56 (8). 355–364.
- Burdych, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. *Reprodukce ve stádech skotu*. Chovservis a. s. Hradec Králové. říjen 2004. 72 s.
- Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104 (2–4). 119–131.
- Chaveiro, A., Andrade, M., Borba, A. E. S., Silva, F. M. 2011. Association between Plasma and Milk Urea on the Insemination Day and Pregnancy Rate in Early Lactation Dairy Cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 1 (4). 221–225.
- Chemes, H. E., Sedo, C. A. 2012. Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology*. 14 (1). 14–23.
- Clark, C. E. F., Fulkerson, W. J., Nandra, K. S., Smith, H., Macmillan, K. L. 2006. Pattern of change in the concentration of milk acetone and its association with ovarian activity for pasture-based cows in early lactation. *Livestock Science*. 105 (1–3). 144–150.
- Curry, M. R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5. 46–52.

- Čeřovský, J., Frydrychová, S., Lustyková, A., Lipenský, J., Rozkot, M. 2009. Semen characteristics of boars receiving control diet and control diet supplemented with L-carnitine. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (9). 417–425.
- Česko. Vyhláška MZe ČR, č. 471/2000 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) ve znění pozdějších předpisů. In: Sbíрка zákonů České republiky. 2000. částka 135. Dostupné také z http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/ZAKONY/2000/471000/Sb_471000_-----_.php >
- Dabas, V. P. S., Maurya, S. N. 1988. A field method of collection of bovine cervical mucus for microbiological studies. *Indian Journal of Animal Reproduction*. 9. 138–139.
- DeJarnette, J. M., Amann, R. P. 2010. Understanding estimates of AI sire fertility: from A to Z. *Proceedings of the 23rd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 2010*.
- DeJarnette, J. M. 2010. The evolution of sex-sorted semen in the US dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 93. 783–783.
- De Vries, M. J. and Veerkamp, R. F. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *Journal of Dairy Science*. 83 (1). 62–69.
- Diab, I. A. K., Hillers, J. K. 1996. Effect of selection for milk yield and dietary energy on yield traits, bovine somatotropin, and plasma urea nitrogen in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 79 (4). 682–688.
- Doležel, R. 2009. Záněty pohlavních orgánů. In: Hofírek, B, Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 502–510. ISBN: 9788086542195.
- Ducháček, J., Vacek, M., Stádník, L., Beran, J., Okrouhlá, M. 2012. Changes in milk fatty acid composition in relation to indicators of energy balance in holstein cows. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 60 (1). 29–37.
- Eggertkruse, W., Kohler, A., Rohr, G., Runnebaum, B. 1993. The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*. 59 (3). 617–628.

- Filipčík, R., Hanuláková, Š. 2011. Vliv způsobu rozmrazení inseminační dávky skotu na aktivitu spermií. *Výzkum v chovu skotu*. 53 (3). 12–16.
- Flint, A. P. F. 2006. Dairy cow fertility: An inherited disease. *Cattle Practice*. 14. 29–32.
- Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80 (Suppl. 2). 1–10.
- Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelof, R. M. G., van Hoorne, R. P., Moreno, J. F., Moreno, O., Merton, J. S. 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*. 71(1). 64–67.
- Frydrychová, S., Čerovský, J., Lustyková, A., Rozkot, M. 2010. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*. 55 (4). 160–166.
- Gacitua, H., Arav, A. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*. 63 (3). 931–938.
- Garner, D. L., Seidel, G. E. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*. 69 (7). 886–895.
- Garnsworthy, P. C., Fouladi-Nashta, A. A., Mann, G. E., Sinclair, K. D., Armstrong, D. G., Gong, J. G., Gutierrez, C. G., Webb, R. 2008a. How does nutrition interact with fertility in dairy cows? *Cattle Practice*. 16. 20–23.
- Garnsworthy, P. C., Lock, A., Mann, G. E., Sinclair, K. D., Webb, R. 2008b. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. *Journal of Dairy Science*. 91 (10). 3814–3823.
- Garnsworthy, P. C., Masson, L. L., Lock, A. L., Mottram, T. T. 2006. Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89 (5). 1604–1612.
- Gatti, J. L., Chevrier, C., Paquignon, M., Dacheux, J. L. 1993. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98 (2). 439–449.

- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2008. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*. 103 (3–4). 201–214.
- Godden, S. M., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., Lumsden, J. H. 2001. Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84 (1). 107–114.
- Gravance, C. G., Casey, M. E., Casey, P. J. 2009. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Animal Reproduction Science*. 114 (1–3). 81–88.
- Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L., Casey, P. J. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*. 19 (6). 704–709.
- Guida, M., Tommaselli, G. A., Palomba, S., Pellicano, M., Moccia, G., Di Carlo, C., Nappi, C. 1999. Efficacy of methods for determining ovulation in a natural family planning program. *Fertility and Sterility*. 72 (5). 900–904.
- Guo, K., Russek-Cohen, E., Varner, M. A., Kohn, R. A. 2004. Effects of milk urea nitrogen and other factors on probability of conception of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87 (6). 1878–1885.
- Gustafsson, A. H., Emanuelson, U. 1996. Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: The critical value revised. *Animal Science*. 63. 183–188.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 509.
- Hajirezaee, S., Amiri, B. M., Mirvaghefi, A., Ahmadi, A. S. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech Journal of Animal Science*. 55 (10). 445–455.
- Hanuš, O., Roubal, P., Vyletělová, M., Yong, T., Bjelka, M., Dufek, A. 2011a. The relations of some milk indicators of energy metabolism in cow, goat and sheep milk. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 42 (3). 102–112.

- Hanuš, O., Kučera, J., Yong, T., Chládek, G., Holásek, R., Třináctý, J., Genčurová, V., Sojková, K. 2011b. Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. *Archiv für Tierzucht*. 54 (1). 36–50.
- Hanuš, O., Frelich, J., Tomáška, M., Vyletělová, M., Genčurová, V., Kučera, J., Třináctý, J. 2010. The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech Journal of Animal Science*. 55 (1). 11–29.
- Hanuš, O., Frelich, J., Kron, V., Říha, J., Pozdíšek, J. 2004. *Kontrola tělesné kondice, zdravotního stavu a výživy dojníc a zlepšování jejich produkce*. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha. 72 s. ISBN: 8072711466.
- Hanuš, O., Skyva, J., Ficnar, J., Jílek, M., Ticháček, A., Jedelská, R., Dolínková, A. 1999. Poznámky k interpretačním postupům hodnocení výsledků obsahů ketonů a acetonu (Ketotest) v individuálních vzorcích mléka. *Výzkum v chovu skotu*. 41 (4). 17–34.
- Hegedušová, Z., Louda, F., Říha, J., Kubica, J. 2010. *Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce*. Agrovýzkum Rapotín, s. r. o. 38 s. ISBN: 9788087144213.
- Hegedušová, Z., Slezáková, M., Bjelka, M., Říha, J. 2009. Content of Acetone and Urea in Cervical Mucus in Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (3). 107–107.
- Herold, F. C., Gerber, D., Aurich, J. E. 2003. Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl® or AndroMed®. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*. 90 (3). 58–61.
- 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. 1834–1846.
- Jacyno, E., Kołodziej, A., Kawęcka, M., Pietruzka, A., Matysiak, B., Kamyczek, M. 2009. The relationship between blood serum and seminal plasma cholesterol content in young boars and their semen qualitative traits and testes size. *Archiv für Tierzucht*. 52. 161–168.

- Jankowska, M., Sawa, A., Neja, W. 2010. Effect of milk urea and protein levels on fertility indices in cows. *Journal of Central European Agriculture*. 11 (4). 475–480.
- Ježková, A., Stádník, L., Vacek, M., Louda, F. 2008. Factors affecting the cervical mucus crystallization, the sperm survival in cervical mucus, and pregnancy rates of Holstein cows. *Journal of Central European Agriculture*. 9 (2). 377–384.
- Ježková, A., Stádník, L., Louda, F. 2007. Study of cervical mucus crystallization, sperm survival in cervical mucus and reproductive results of Holstein cows. *Book of abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, No. 13*. Dublin, Ireland. 26–29 August 2007. 235–235. ISBN: 9789086860456.
- Jílek, F., Řehák, D., Volek, J., Štípková, M., Němcová, E., Fiedlerová, M., Rajmon, R., Švestková, D. 2006. Effect of herd, parity, stage of lactation and milk yield on urea concentration in milk. *Czech Journal of Animal Science*. 51 (12). 510–517.
- Kasimanickam, R., Cornwell, J. M., Nebel, R. L. 2006. Effect of presence of clinical and subclinical endometritis at the initiation of Presynch-Ovsynch program on the first service pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 95 (3–4). 214–223.
- Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I., Carabaño, M. J. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science*. 124 (1–2). 28–38.
- Krol, J., Kowalski, R., Demska-Zakęś, K., Hliwa, P., Glogowski, J. 2011. Proteolytic and anti-proteolytic activity in the seminal plasma of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) during the spawning period. *Czech Journal of Animal Science*. 56 (9). 390–397.
- Kubešová, M., Fajmon, T., Frelich, J., Trávníček, J., Maršálek, M. 2009. Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. *Výzkum v chovu skotu*. 51 (1). 2–13.

- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E., Katila, T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 48 (1). 14.
- Kumar, R. A., Devanathan, T. G. 1996. Effect of spermatozoal quality on sperm progression speed in cervical mucus. *Indian Veterinary Journal*. 73 (6). 645–648.
- Kvapilík, J., Růžička, Z., Bucek, P. 2012. *Ročenka – Chov skotu v České Republice – Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2011*. Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Praha; Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha-Uhřetěves; Svaz chovatelů českého strakatého skotu; Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o. s., Český svaz chovatelů masného skotu. 92 s. ISBN: 9788087633021.
- LeBlanc, S. 2010. Assessing the Association of the Level of Milk Production with Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 56, S1–S7.
- Leite, T. G., do Vale, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., de 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 (1–4). 31–38.
- 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.
- Loker, S., Bastin, C., Miglior, F., Sewalem, A., Schaeffer, L. R., Jamrozik, J., Ali, A., Osborne, V. 2012. Genetic and environmental relationships between body condition score and milk production traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 95 (1). 410–419.
- Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic*. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín, Česká republika. 56 s. ISBN: 9788087144053.

- 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.
- Lucy, M. C. 2001. ADSA Foundation Scholar Award – Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*. 84 (6). 1277–1293.
- MacMillan, K. L., Lean, I. L., Westwood, C. T. 1996. The effects of lactation on the fertility of dairy cows. *Australian Veterinary Journal*. 73 (4). 141–147.
- Maršálek, M., Zedníková, J., Pešta, V., Kubešová, M. 2008. Holstein cattle reproduction in relation on milk yield and body condition score. *Journal of Central European Agriculture*. 9 (4). 621–628.
- Matoušek, J., Říha, J., Sršeň, V., Veselský, L., Louda, F. 1989. Penetration of cervical-mucus and other body-fluids by bull sperm in capillary tubes. *Animal Reproduction Science*. 18 (1-3). 161–166.
- Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Lefebvre, D. M., Moore, R. K. 2006. Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89 (12). 4886–4894.
- Mocé, E., Graham, J. K. 2008. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 105 (1–2). 104–118.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57 (6). 1695–1706.
- Muino, R., Fernandez, M., Pena, 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 (3). 305–311.
- Nehring, H., Rothe, L., Reguszynski, K., Schumann-Zuhlke, D. 2005. Developments in quality estimation and cryopreservation of bull semen. *Zuchtungskunde*. 77 (2–3). 93–109.

- Nichi, M., Bols, P. E. J., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., Cortada, C. N. M. 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*. 66 (4). 822–828.
- O'Brien, J. K., Robeck, T. R. 2006. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reproduction, Fertility and Development*. 18 (3). 319–329.
- Ozturk, O. A., Cirit, U., Baran, A., Ak, K.. 2010. Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 73 (5). 568–576.
- Pace, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 39 (6). 1144–1149.
- Parker, R. 1989. Using body condition scoring in dairy herd management [online]. Ministry of Agriculture, Food & Rural Affairs Ontario, dostupné z <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/94-053.htm#top>> [2012-06-12] – poslední aktualizace – 09/96.
- Pavlata, L., Pechová, A., Hofírek, B. 2009. Hodnocení tělesné kondice (Body condition scoring) adspekcí a palpací. In: Hofírek, B, Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 1026–1028. ISBN: 9788086542195.
- Pechová, A. 2009. Kontrola produkce a složení mléka. In: Hofírek, B, Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 1035–1039. ISBN: 9788086542195.
- Piccand, V., Meier, S., Cutullic, E., Weilenmann, S., Thomet, P., Schori, F., Burke, C. R., Weiss, D., Roche, J. R., Kunz, P. L. 2011. Ovarian activity in Fleckvieh, Brown Swiss and two strains of Holstein-Friesian cows in pasture-based, seasonal calving dairy systems. *Journal of Dairy Research*. 78 (4). 464–470.
- Pryce, J. E., Coffey, M. P., Brotherstone, S. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in registered Holsteins. *Journal o Dairy Science*. 83 (11). 2664–2671.

- Pursley, J. R., Mee, M. O., Wiltbank, M. C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*. 44. 915–923.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M., Trippel, E. A. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture*. 170 (3-4). 349–358.
- Reid, C. E., Hermes, R., Blottner, S., Goeritz, F., Wibbelt, G., Walzer, C., Bryant, B. R., Portas, T. J., Streich, W. J., Hildebrandt, T. B. 2009. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum* and *Ceratotherium simum cottoni*). *Theriogenology*. 71 (2). 275–291.
- Reist, M., Koller, A., Busato, A., Kúpfér, U., Blum, J. W. 2000. First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology*. 54 (5). 685–701.
- Rajmon, R., Jílek, F. 2006. Reprodukce skotu. In: Bouška, J. (ed.). *Chov dojeného skotu*. Profi Press, s. r. o., Praha. s. 71 – 84. ISBN: 8086726169.
- Rob, O., Stehlík, I. 1983. *Cvičení z reprodukce hospodářských zvířat II*. VŠZ v Praze. Praha. 122 s.
- Roche, J. R., Burke, C. R., Meier, S., Walker, C. G. 2011. Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? *Animal Production Science*. 51 (12).1045–1066.
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., Berry, D. P. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare. *Journal of Dairy Science*. 92 (12). 5769–5801.
- Roche, J. F., Mackey, D., Diskin, M. D. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*. 60. 703–712.
- Rodriguez-Martinez, H. 1998. Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 33 (3–4). 233–237.

- Royal, M. D., Darwash, A. O., Flint, A. P. E., Webb, R., Woolliams, J. A., Lamming, G. E. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science*. 70. 487–501.
- Rutllant, J., Lopez-Bejar, M., Lopez-Gatius, F. 2005. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals*. 40 (2). 79–86.
- Řehák, D., Rajmon, R., Kubešová, M., Štípková, M., Volek, J., Jílek, F. 2009. Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (5). 193–200.
- Říha, J., Jakubec, V., Jílek, F., Illek, J., Kvapilík, J., Hanuš, O., Čermák, V. 2004. *Reprodukce v procesu šlechtění skotu*. Asociace chovatelů masných plemen Rapotín. 144 s. ISBN: 809031435X.
- Říha, J., Hanuš, O. 1999. Vztahy mezi individuálními ukazateli reprodukce a složením mléka krav v prvních 120 dnech laktace. *Výzkum v chovu skotu*. 41 (4). 3–17.
- Říha, J., Frelich, J., Golda, J., Vaněk, D. 1998. Alternative methods utilizing embryo transfer (ET) for the formation of beef cattle herds. *Archiv für Tierzucht*. 41 (4). 345–357.
- Saacke, R. G. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable trans in semen. *Theriogenology*. 70 (3). 473–478.
- Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L., Bame, J. H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*. 61. 663–667.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Rozenboim, I., Arav, A. 2009a. Protective effects of iodoxanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology*. 71 (9). 1425–1432.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Zeron, Y., Rozenboim, I., Arav, A. 2009b. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 115 (1–4). 10–17.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M. T., Arav, A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42 (6). 610–615.

- Saragusty, J., Gacitua, H., King, R., Arav, A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species - (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*. 66 (4). 775–784.
- SAS. 2009. SAS/STAT® 9.1. User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5121 pp.
- Schilling, E., Zust, J. 1968. Diagnosis of oestrus and ovulation in cows by pH-measurements *intra vaginam* and by apparent viscosity of vaginal mucus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 15. 307–311.
- Si, W., Lu, Y. Q., He, X. C., Ji, S. H., Niu, Y. Y., Tan, T., Ji, W. Z. 2010. Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. *Theriogenology*. 74 (8). 1431–1438.
- Si, W., Hildebrandt, T. B., Reid, C., Krieg, R., Ji, W. Z., Fassbender, M., Hermes, R. 2006. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology*. 65. 788–798.
- Siddique, M., Ali, R., Raza, A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 2. 117–119.
- Sova, Z. (ed.). 1990. *Fyziologie hospodářských zvířat*. 2. přeprac. vydání. SZN Praha. 472 s. ISBN: 8020900926.
- Stádník, L., Beran, J., Ducháček, J., Čítek, J. 2011. Relationships between crystallization of cervical mucus, sperm survival in this mucus and selected reproduction results in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3). 151–151.
- 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.

- Strapák, P., Juhás, P., Strapáková, E., Halo, M. 2010. Relation of the length of productive life and the body conformation traits in Slovak Simmental breed. *Archiv für Tierzucht*. 53. 393–402.
- 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.
- Štolc, L., Stádník, L., Ježková, A., Louda, F. 2009a. Relationships among herd, ram breeds, age of rams, sperm density before diluting and sperm motility during thermal survival test. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 57 (4). 109–116.
- Štolc, L., Ježková, A., Stádník, L., Louda, F. 2009b. Effect of rams' breeds and ages on quantitative and qualitative traits of their sperm. *Výzkum v chovu skotu*. 51 (1). 14–21.
- Taş, M., Bacinoglu, S., Cirit, Ü., Özdaş, Ö. B., Ak, K. 2007. Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. *Animal Reproduction Science*. 101 (1–2). 18–27.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus[®] and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57 (3). 1087–1094.
- Trevaskis, L. M., Fulkerson, W. J. 1999. The relationship between various animal and management factors and milk urea, and its association with reproductive performance of dairy cows grazing pasture. *Livestock Production Science*. 57 (3). 255–265.
- Tsiligiani, T., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P. 2001a. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone/PGF2alfa) estrus. *Theriogenology*. 55 (2). 629–640.
- Tsiligiani, T., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P. 2001b. Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF2alfa. *Theriogenology*. 56 (1). 41–50.

- Vacek, M., Stádník, L., Štípková, M. 2007. Relationships between the incidence of health disorders and the reproduction traits of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 52 (8). 227–235.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., de Kruif, A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*. 63 (3). 912–922.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno. 258 s. ISBN 8086895017.
- Vinkler, A. 2009. Metody diagnostiky pohlavní aktivity a poruch plodnosti. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 513–524. ISBN: 9788086542195.
- Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62. 23–53.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., Evans, A. C. O. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123 (3–4). 127–138.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60. 481–492.
- Wolf, J., Smital, J. 2009. Effects in genetic evaluation for semen traits in Czech Large White and Czech Landrace boars. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (8). 349–358.
- Zaaijer, D., Counotte, G. H. M., Sol, J., Smidt, W. J., Broadbent, P. J. 1993. Changes in the composition of cervical mucus of the cow during the estrous-cycle as parameters for predicting potential fertility. *Theriogenology*. 39 (3). 569–580.