

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra zootechnických věd

**Faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků
a reprodukci dojnic**

Habilitační práce

Ing. Jan Beran, Ph.D.

2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem habilitační práci na téma „**Faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků a reprodukci dojnic**“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích, 21. 10. 2019

Ing. Jan Beran, Ph.D.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem spolupracovníkům a spoluautorům publikací, které jsou základem této habilitační práce. Bez jejich přispění a spolupráce by tato habilitační práce nemohla vzniknout. Rovněž bych rád poděkoval své rodině, přátelům a blízkým za podporu v osobním životě.

Obsah

1 ÚVOD.....	6
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1 Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků	8
2.1.1 Vliv býka	9
2.1.2 Vliv zpracování ejakulátu	9
2.1.2.1 Složení ředidel	10
2.1.2.2 Délka ekvibrace	11
2.1.2.3 Mrazení	12
2.2 Činitelé ovlivňující plodnost dojnic	13
2.2.1 Tělesná kondice	14
2.2.2 Obsah močoviny	14
2.2.3 Obsah acetonu	15
2.2.4 Kvalita cervikálního hlenu	15
3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY	17
3.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci	17
3.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic.....	18
4 CÍLE PRÁCE	19
4.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci	19
4.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic.....	20
5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE	21
5.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci	21
5.1.1 Vliv býka a použitého ředidla	21
5.1.2 Vliv použité mrazicí křivky	23
5.1.3 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací	24
5.1.4 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci	25

5.2	Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic.....	27
5.2.1	Vliv kvality cervikálního hlenu.....	27
5.2.2	Vliv obsahu mastných kyselin v mléce	28
6	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	29
6.1	Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci	29
6.1.1	Vliv býka a použitého ředidla.....	29
6.1.2	Vliv použité mrazicí křivky	29
6.1.3	Vliv přídatku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací.....	30
6.1.4	Vliv přídatku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci	31
6.2	Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic.....	32
6.2.1	Vliv kvality cervikálního hlenu.....	32
6.2.2	Vliv obsahu mastných kyselin v mléce	33
7	ZÁVĚR.....	34
7.1	Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci	34
7.1.1	Vliv býka a použitého ředidla.....	34
7.1.2	Vliv použité mrazicí křivky	34
7.1.3	Vliv přídatku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací.....	35
7.1.4	Vliv přídatku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci	35
7.2	Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic.....	36
7.2.1	Vliv kvality cervikálního hlenu.....	36
7.2.2	Vliv obsahu mastných kyselin v mléce	36
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

1 ÚVOD

Inseminace skotu je první biotechnologickou metodou zavedenou do praxe, která je celosvětově využívána ke zlepšení reprodukce a zvýšení genetického zisku ve šlechtění a chovech skotu (Gravance *et al.*, 2009). U skotu se nejvíce využívají kryokonzervované inseminační dávky (Zhang *et al.*, 2015), ačkoliv jsou známy negativní účinky kryokonzervace na membrány spermií a fyziologické funkce spermií (Tapia *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2015). Jejich kvalita hraje významnou roli v úspěšnosti zabřezávání dojnic (Beran *et al.*, 2013a) a je ovlivněna zejména jednotlivými fázemi procesu výroby inseminační dávky (ID) – od odběru ejakulátu až po jeho ředění a mrazení (Siddique *et al.*, 2006; Stádník *et al.*, 2015a). Pozornost je třeba věnovat zejména složení použitého ředidla (Beran *et al.*, 2012a; Špaleková *et al.*, 2014; Šimoník *et al.*, 2016, 2019) a výběru vhodné mrazicí křivky (Kumar *et al.*, 2003; Doležalová *et al.*, 2015).

Pokles plodnosti dojnic během posledních pěti desetiletí má několik důvodů: jednostrannou selekci zaměřenou na zvýšení produkce mléka (Flint, 2006; Hanuš *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2011), chyby v řízení stáda a výživy dojnic v tranzitním období (Vacek *et al.*, 2007; LeBlanc, 2010) a nedostatečnou detekci říje (Ježková *et al.*, 2008; Alkar *et al.*, 2011). Nízká 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 i výsledky v České republice, kde bylo zabřezávání po 1. inseminaci v roce 2018 u krav na úrovni 41,0 % a u jalovic 60,9 % (Kvapilík *et al.*, 2019). Dochází k poklesu podílu inseminovaných krav při současném snižování zabřezávání. Vzhledem k ekonomickému významu plodnosti je potřebné hodnotit veškeré vlivy působící na plodnost a výsledky výzkumu využít při řízení stáda dojnic. Mezi významné vlivy, které negativně ovlivňují plodnost dojnic, patří negativní energetická bilance (NEB) v první fázi laktace (Rossi *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2011). Úroveň metabolismu dojnic můžeme také sledovat pomocí obsahu pevných složek v mléce, zejména tuku a bílkovin a jejich poměru (Hanus *et al.*, 2011), obsahem acetonu (Clark *et al.*, 2006), močoviny (Řehák *et al.*, 2009) anebo kyseliny citronové (Kubešová *et al.*, 2009) v mléce. Rovněž můžeme využít složení cervikálního hlenu dojnic (Zaaijer *et al.*,

1993; Tsiligiani *et al.*, 2001a, 2001b; Rutlant *et al.*, 2005; Beran *et al.*, 2013a) a obsah mastných kyselin v mléce (Berry *et al.*, 2006; Soyeurt *et al.*, 2006; Bastin *et al.*, 2011; Ducháček *et al.*, 2015; Stádník *et al.*, 2015b).

Předkládaná habilitační práce proto shrnuje dosažené výsledky hodnocení vlivů působících na reprodukci skotu komplexně – z pohledu býků (vlivy na oplozovací schopnost ejakulátu), i dojnic (vlivy na reprodukční výkonnost dojnic).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků

Kvalita ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory: vnitřními, jako je např. plemeno, genotyp, individualita a věk plemeníka (Thara *et al.*, 2007; Beran *et al.*, 2012a; Härtlová *et al.*, 2013; Stádník *et al.*, 2014), a vnějšími, ke kterým patří zejména klimatické podmínky, podnebí, podmínky prostředí (Mathevon *et al.*, 1998; Nichi *et al.*, 2006; Karoui *et al.*, 2011), četnost odběru ejakulátu (Kommisurd *et al.*, 1996), technologie ustájení, management chovu (Stádník *et al.*, 2014) a výživa plemeníků (Kelso *et al.*, 1997; Louda *et al.*, 2007).

Odběr ejakulátu a jeho následné zpracování na ID představují další potenciální rizika. Nesmí dojít k chladovému šoku, musí se postupovat velmi rychle a současně šetrně a přesně, proto je snaha nalézt postup hodnocení spermatu, který by byl rychlý, citlivý ke spermiiám a jednoduchý na provedení (Januskauskas *et al.*, 2000). Konvenční postup hodnocení ejakulátu, prováděný před a po kryokonzervaci, zahrnuje stanovení množství a hustoty ejakulátu, koncentrace spermií a jejich pohyblivosti či morfologie (Bhoite *et al.*, 2008; Karoui *et al.*, 2011). Tyto parametry většinou odhalí zřejmé případy snížené plodnosti nebo neplodnosti býků (Rodríguez-Martínez, 1998). Z biologického hlediska je potencionálně schopná oplodnit vajíčko pouze plně životaschopná spermie, proto většina doposud užívaných metod byla založena na sledování a hodnocení životaschopnosti spermií (Januskauskas *et al.*, 2000), jako například: krátkodobý termodynamický test přežitelnosti spermií (TDT; Maurya *et al.*, 2003; Beran *et al.*, 2012a), test na odolnost spermií vůči chladovému šoku (Stádník *et al.*, 2015a), hypo-osmotický test (HOS test; Přinosilová *et al.*, 2014) a zjištění podílu živých a mrtvých spermií barvením (Gillan *et al.*, 2008; Hoflack *et al.*, 2006; Beran *et al.*, 2012a).

Po makroskopickém a mikroskopickém posouzení kvality ejakulátu následuje jeho ředění, plnění do pejet, zchlazení a zmrazení. Tyto čtyři poslední fáze výroby ID mají zásadní vliv na přežitelnost spermií v dávce, zejména se pak projevuje vliv složení použitého ředidla (Siddique *et al.*, 2006).

2.1.1 Vliv býka

Kvalita ejakulátu, reprodukční schopnost a plodnost jednotlivých býků je velmi rozdílná, vyplývá z individuálních vlastností plemeníka, které jsou dány jeho temperamentem. Pro plemenitbu jsou nejvhodnější býci silného vyrovnaného temperamentu (Hofírek *et al.*, 2009)

Vliv plemene na pohlavní aktivitu a plodnost je méně významný z důvodu nízké heritability znaků pro jednotlivé reprodukční funkce (Louda *et al.*, 2007). Samci plemen mléčného skotu jsou obecně aktivnější než býci plemen masných. Na druhé straně jsou býci méně prošlechtěných plemen odolnější k vlivům vnějšího prostředí (Stádník *et al.*, 2014).

Dále je pro vlastnosti ejakulátu důležitý věk plemenných býků. Obecně platí, že produkce a kvalita spermatu se s věkem zvyšuje, a to až do sedmi let věku (Brito *et al.*, 2002). K poklesu aktivity a množství ejakulátu dochází po 10. roku věku (Mathevon *et al.*, 1998).

2.1.2 Vliv zpracování ejakulátu

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 ID a na použitém ředidle (Tapia *et al.*, 2012). K rozhodující kvalitativní změně ve využití inseminace došlo teprve po úspěšném vývoji metod kryokonzervace a dlouhodobého uchovávání ID býků v tekutém dusíku (-196 °C) 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 reprodukce skotu. Inseminace v tomto směru sehrála nezastupitelnou roli při stupňování produkce a ekonomiky chovu skotu (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; Nowicki *et al.*, 2017), nové postupy mrazení ejakulátu (Arav *et al.*, 2002a), sexaci spermií (DeJarnette, 2010), odběr, mrazení, kultivaci a přenos embryí (Říha *et al.*, 1998; Machatý *et al.*, 2012) nebo klonování (Liu *et al.*, 2010).

Životaschopnost a oplozovací schopnost spermií v ID býků ovlivňuje zejména složení ředidla (Siddique *et al.*, 2006), včetně interakcí mezi kryoprotektivy, délkou ekvilibrace a rychlosti mrazení a rozmrazení (Cotter *et al.*, 2005; Clulow *et al.*, 2008; Beran *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Složení ředidel

Jednu skupinu ředidel spermatu býků tvoří ředidla žloutková, jejichž základní komponentou je od roku 1939 vaječný žloutek. Jejich použití je doporučováno, protože výborně chrání spermatické buňky (Celeghini *et al.*, 2008; Beran *et al.*, 2012a). Doporučená koncentrace vaječného žloutku v ředidlech je do 20 % (Sansone *et al.*, 2000), ve větších koncentracích se pak stává pro spermie toxickým (Vishvanath *et Shannon*, 2000).

Od používání vaječného žloutku jako kryoprotektiva se v poslední době upouští, protože představuje velké hygienické riziko (Thun *et al.*, 2002), má nekonzistentní složení (Amirat *et al.*, 2004) a žloutková granula ztěžují hodnocení aktivity spermií (Ansari *et al.*, 2010). Kromě toho, některé studie prokázaly, že ředidla na bázi vaječného žloutku mohou mít i negativní vliv na respiraci a pohyblivost spermií (např. Amirat *et al.*, 2005). Proto byla snaha nahradit vaječný žloutek v ředidle pouze komponentou zodpovědnou za jeho kryoprotektivní účinnost.

V roce 1974 bylo objeveno, že kryoprotektivní účinky má frakce vaječného žloutku známá jako LDL cholesterol, zkráceně LDL (low-density lipoprotein = lipoprotein s nízkou hustotou; Pace *et Graham*, 1974). V mnoha studiích bylo prokázáno, že náhrada vaječného žloutku LDL frakcí má příznivý vliv na kvalitativní ukazatele ejakulátu (Moussa *et al.*, 2002; Vera-Munoz *et al.*, 2009; Amirat-Briand *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010, 2011).

Nicméně postup přípravy LDL je velmi časově náročný a množství vyextrahovaného LDL malé, což brání komerčnímu využití těchto ředidel (Moussa *et al.*, 2002).

Druhou skupinu pak tvoří ředidla bezžloutková, která neobsahují přísady živočišného původu. Nejvíce využívanou náhradou za vaječný žloutek v ředidlech spermatu býků je v současné době sójový lecitin, fosfolipid získaný ze sójových bobů (Layek *et al.*, 2016). Neexistuje ovšem jasná shoda o jeho kryoprotektivní účinnosti a vhodnosti v porovnání s vaječným žloutkem (Gil *et al.*, 2000; van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000; Thun *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2003; Crespilho *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2017). Proto jsme se této problematice věnovali také ve vlastním výzkumu.

Další alternativou k vaječnému žloutku jsou například laboratorně připravené liposomy v komerčně dostupném ředidle Optixcell® (Murphy *et al.*, 2017) nebo iodoxanol obsažený v ředidle Optiprep® (Saragusty *et al.*, 2009a).

2.1.2.2 Délka ekvilibrace

Další úpravou technologického procesu je délka ekvilibrace a rychlost zchlazení ID. Během ekvilibrace je ejakulát zchlazen na teplotu 4 až 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. Glycerol ovšem proniká do buněk velmi rychle, tudíž dostatečně dlouhé ekvilibrační období je nutné spíše pro adaptaci membrán spermií na nízké teploty během mrazení (Vishwanath *et Shannon*, 2000).

Běžná délka ekvilibrace při výrobě ID býků se pohybuje v rozmezí 3 až 4 hod., takže se semeno mrazí ještě v den odběru (Muiño *et al.*, 2007). Nicméně tyto 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), kteří vyhodnotili nejvyšší přežitelnost u spermií ekvilibrovaných 4 hodiny.

2.1.2.3 Mrazení

Během zmrazování spermatu 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), k poškození cytoskeletu, jádérka a pohybového aparátu spermie (Thun *et al.*, 2002). Může dojít také k poškození mitochondrií, integrity akrozomu a plasmatické membrány (Januskauskas *et al.*, 2003; Meyers, 2005). Bylo prokázáno, že během kryokonzervace dojde k usmrcení až 50 % spermií (Gravance *et al.*, 1998; Celeghini *et al.*, 2008).

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 – faktor (Curry, 2000). „Solution effect“ začíná v průběhu mrazení spermatu, při kterém dochází k vytlačování vody ze spermie, ve které se zvyšuje koncentrace solí a postupně dochází k její dehydrataci. Pokud je průběh mrazení příliš rychlý, voda nestačí spermii opustit a vytvoří v buňkách ledové krystaly. Schopnost buněčné membrány propouštět vodu je velmi důležitá. Rychlost mrazení $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu z $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se jeví jako optimální (Louda *et al.*, 2008).

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 zdlouhavá, 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 ID, tuby se rozmrazí a semeno 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, Izrael). 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). Metody řízeného postupu mrazení mají signifikantně lepší výsledky než metody konvenční (Saragusty *et al.*, 2007).

Lze také předpokládat, že průběh mrazicí křivky různým způsobem ovlivní motilitu spermií po rozmrazení inseminační dávky jednotlivých býků (Stádník *et al.*, 2015c).

2.2 Činitelé ovlivňující plodnost dojnic

Reprodukční schopnost a zabřezávání dojnic jsou ovlivněny mnoha faktory, mezi které patří zejména genetika, pořadí laktace, NEB a kombinace různých faktorů fyziologických a vnějšího prostředí (Ducháček *et al.*, 2015). Dle studie Rossi *et al.* (2008) je délka NEB hlavním nutričním faktorem ovlivňujícím pokles reprodukčních funkcí u vysokoprodukčních dojnic. Negativní vliv NEB na reprodukční funkce dokumentují četné literární prameny, zejména u holštýnského skotu (např. Wathes *et al.*, 2007; Tamadon *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2014).

Využití energetických rezerv se odráží v obsahu tuku v mléce (Bauman *et al.*, 2006), resp. v obsahu a složení mastných kyselin (Ducháček *et al.*, 2014). Mastné kyseliny (MK) jsou pak prekurzory hormonů důležitých pro řízení metabolických a reprodukčních funkcí (Gulliver *et al.*, 2012), zejména prostaglandinů (Petit *et al.*, 2001). Byly nalezeny také korelační závislosti mezi obsahem MK v mléce a délkou mezidobí (Bastin *et al.*, 2011, 2012). Proto jsme se v našem dalším výzkumu zaměřili na prozkoumání závislosti mezi obsahem a složením MK v mléce a reprodukčními ukazateli jak u holštýnského (publikace 7, Ducháček *et al.*, 2015), tak u českého strakatého plemene (publikace 8, Stádník *et al.*, 2015b).

Dále můžeme NEB hodnotit pomocí sledování aktuální tělesné kondice (BCS = body condition score) dojnic (Aktas *et al.*, 2011) a jejich změn (Ducháček *et al.*, 2012) nebo např. sledováním hladiny metabolitů (např. močoviny, acetonu, kyseliny citronové) v mléce nebo cervikálním hlenu dojnic (publikace 6, Beran *et al.*, 2013a).

2.2.1 Tělesná kondice

Hodnocení BCS je jednoduchá metoda vhodná ke kontrole energetických zásob nejen jednotlivých dojnic, ale i celého stáda. Je založena na subjektivním hodnocení metabolizovatelných energetických zásob v tukové tkáni (Aktas *et al.*, 2011). Hodnocení BCS bylo přijato jako nejpraktičtější metoda pro hodnocení změn v energetických zásobách u mnoha druhů hospodářských zvířat, včetně dojeného skotu (Bewley *et Schutz*, 2008).

Použití 5 bodové stupnice s odchylkou 0,25 bodu je vhodným nástrojem k detekci problémů ve výživě dojnic (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 těchto autorů jsou ale mnohem důležitější změny BCS v průběhu laktace než jeho 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.

2.2.2 Obsah močoviny

Stanovení hladiny močoviny 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 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).

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) (Hofírek *et al.*, 2004). 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 koncentrace 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 (Hanuš *et al.*, 2004).

2.2.3 Obsah acetonu

Obsah mléčného acetonu může být vhodným nástrojem k monitorování NEB u dojnic, zejména během kritického období na počátku laktace (Hanuš *et al.*, 1999). Koncentrace acetonu v mléce souvisí s výskytem subklinických a klinických ketóz, mléčnou užitkovostí a reprodukční výkonností krav (Gustafsson *et Emanuelson*, 1996).

Podle Hofírka *et al.* (2004) 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 *et 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.

2.2.4 Kvalita cervikálního hlenu

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 hlen čirý, vodnatý a volně odtéká. Uprostřed říje se zahušťuje, stává se vazkým, 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 (Hegedüšová *et al.*, 2010).

Cervikální hlen (CH), jakož i některé další tělní tekutiny (např. sliny), vytvářejí specifické krystalické formy, které lze pozorovat od třetího až čtvrtého dne před nástupem říje, intenzivněji pak v době říje a zanikají v době působení progesteronu (Ahmadi *et al.*, 2005). Posouzením krystalizace CH je možno usuzovat zejména na přítomnost estrogenů v krevní plazmě (Guida *et al.*, 1999), fázi říjového cyklu (Hegedüšová *et al.*, 2010), výskyt funkčních folikulárních cyst na vaječnicích (Hafez *et Hafez*, 2000) a úroveň výživy, případně poruchu metabolismu vápníku či draslíku (Ježková *et al.*, 2008).

Obsah acetonu a močoviny v tělních tekutinách (mléce, krevním séru a CH) sledovali např. Hegedüšová *et al.* (2009). Dospěli 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.

Dále byly sledovány vztahy mezi ultrastrukturou CH a pohyblivostí spermií, např. v pracích Matoušek *et al.* (1989), Rutlant *et al.* (2005), Taş *et al.* (2007). Dle těchto autorů je rychlost průniku spermií a jejich pohyblivost typem krystalizace a složení CH ovlivněna.

3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY

Na základě detailního studia výše citované literatury byly definovány následující vědecké hypotézy, které odpovídají jednotlivým publikacím zahrnutým do předkládané habilitační práce.

3.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci

- 1) Individualita býka a postup zpracování ejakulátu po odběru (před mrazením) ovlivní kvalitu inseminačních dávek po rozmrazení.
- 2) Úspěšnost kryokonzervace spermatu býků je ovlivněna rychlostí zmrazení (použitou mrazicí křivkou).
- 3) Hlavní komponentou vaječného žloutku zodpovědnou za jeho kryoprotektivní účinnost je LDL cholesterol. Modifikace receptury vybraných ředidel pomocí adice LDL bude mít pozitivní vliv na rezistenci býčích spermií vůči chladovému šoku.
- 4 a 5) Ředidla na bázi sójového lecitinu jsou alternativou k ředidlům obsahujícím vaječný žloutek, který představuje mikrobiální riziko. Je ovšem diskutována kryoprotektivní účinnost těchto ředidel a otázkou zůstává, zda může být zvýšena přidavkem LDL cholesterolu.

3.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic

- 6) Předpokládáme, že úroveň energetického metabolismu dojnice významně ovlivňuje kvalitu cervikálního hlenu. Kvalita cervikálního hlenu je dána zejména stádiem říje a obsahem močoviny, resp. acetonu. Dále předpokládáme, že kvalita cervikálního hlenu dojnice, jako ukazatel jejího metabolického stavu, následně ovlivní přežitelnost spermií býků.
- 7) Intenzita energetického metabolismu dojnic se mění zejména na počátku laktace. Jedním z indikátorů tohoto metabolického stavu je pak obsah mastných kyselin v mléce. Předpokládáme, že existují vztahy mezi obsahem mastných kyselin v mléce a reprodukční výkonností holštýnských dojnic.
- 8) Předpokládáme, že zvýšení dojivosti po otelení vede ke změně složení mastných kyselin v mléce a je doprovázeno snížením reprodukční schopnosti dojnic českého strakatého skotu.

4 CÍLE PRÁCE

Ze stanovených hypotéz vyplývají následující cíle jednotlivých publikací.

4.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci

- 1) Determinovat, resp. vyhodnotit vliv býka a použitého ředidla spermatu býků na motilitu spermií před mrazením, po rozmrazení a během termodynamického testu přežitelnosti spermií.
- 2) Určit vliv vybraných mrazících křivek na přežitelnost spermií po rozmrazení inseminačních dávek.
- 3) Vyhodnotit vybrané efekty (býka, ředidla a přídatku LDL do ředidel) na odolnost býčích spermií vůči chladovému šoku.
- 4) Určit vliv přídatku LDL do ředidel na bázi sójového lecitinu na jejich kryoprotektivní účinky.
- 5) Dalšími analýzami a metodami ověřit hypotézu, že přídatek LDL do ředidel na bázi sójového lecitinu zlepší jejich kryoprotektivní účinnost.

4.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic

- 6) Vyhodnotit vztahy mezi obsahem močoviny a acetonu v cervikálním hlenu, typem krystalizace cervikálního hlenu a přežitelností spermií býků se známou plodností.
- 7) Definovat vztahy mezi obsahem mastných kyselin v mléce holštýnských dojnic (v prvních 120 dnech laktace) a jejich následnou reprodukční výkonností.
- 8) Vyhodnotit interakce mezi obsahem mastných kyselin v mléce dojnic plemene český strakatý skot (v prvních 5 týdnech laktace) a jejich následnou reprodukční výkonností.

5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE

5.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci

5.1.1 Vliv býka a použitého ředidla

Zavedením kryokonzervace spermatu býků se od základů změnily postupy šlechtění skotu a inseminace se stala celosvětově rozšířeným nástrojem intenzifikace reprodukčního procesu ve stádech skotu (Gravance *et al.*, 2009). Jednou z klíčových fází výroby ID je ředění semene (Siddique *et al.*, 2006). Základní komponentou ředidel spermatu býků je vaječný žloutek (Amirat *et al.*, 2004), nicméně od jeho používání se upouští, jelikož představuje zejména hygienické riziko (Bousseau *et al.*, 1998). Na trhu je již dostupná řada bezžloutkových ředidel, jako např. AndroMed® a Bioxcell®. Cílem práce bylo posoudit vliv složení použitého ředidla na mrazitelnost a následnou přežitelnost spermií v inseminační dávce.

Od vybrané skupiny čtyř býků stejného věku, plemene a shodné frekvence odběru, chovaných na jedné inseminační stanici, bylo získáno celkem 80 vzorků ejakulátu standardní metodou – odběrem do umělé vagíny. Každý ze vzorků byl rozdělen na čtyři rovnoměrné díly a naředěn jiným ředidlem. V pokusu byla porovnávána běžně dostupná komerční ředidla: dvě bezžloutková (AndroMed® a Bioxcell®, obě na bázi sójového lecitinu) a dvě žloutková (Triladyl®, obsahující čerstvý vaječný žloutek a Optidyl®, obsahující ionizovaný vaječný žloutek). Motilita spermií byla hodnocena před ředěním, po naředění a po rozmrazení ID během TDT přežitelnosti spermií. Současně bylo provedeno také supra vitální barvení eozin–nigrozinem.

Výsledky prokázaly průkazné rozdíly ($P < 0,05$ – $0,01$) mezi jednotlivými býky v motilitě spermií, stejně tak v podílu živých/mrtvých spermií barvením po odběru, po rozmrazení, i v poklesu motility spermií během TDT.

Vliv použitého ředidla byl statisticky významný ($P < 0,01$), lepších výsledků v přežitelnosti spermií bylo dosaženo u žloutkových ředidel Optidyl® a Triladyl® ($P < 0,05-0,01$).

Publikace 1:

Beran, J., Stádník, L., Bezdíček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J. 2012a. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and AI doses after thawing. *Archiv Tierzucht.* 55. 207–218. <https://doi.org/10.5194/aab-55-207-2012>.

5.1.2 Vliv použité mrazicí křivky

Efektivita kryokonzervace se neustále zvyšuje (Layek *et al.*, 2016), přesto v jejím průběhu dochází k poškození až 50 % buněk. Úspěšnost kryokonzervace je závislá také na rychlosti zmrazení a rozmrazení (Clulow *et al.*, 2008). Cílem práce bylo porovnat různé mrazicí křivky a definovat jejich vliv na přežitelnost spermií.

Od vybrané skupiny 9 býků stejného věku, plemene a shodné frekvence odběru, chovaných na jedné inseminační stanici, byly získány vzorky ejakulátu. Každý ze vzorků byl naředěn stejným ředidlem, naplněn do pejet a ekvilibrován 120 min. Pejety byly následně rovnoměrně rozděleny do čtyřech skupin, z nichž každá byla zmrazena jiným typem mrazicí křivky.

Jako první byla použita standardní, komerčně doporučená třífázová křivka, určená pro zmrazování býčího spermatu (Muiño *et al.*, 2007). Druhá byla dvoufázová mrazicí křivka podle metodiky Januskauskas *et al.* (1999) a Gil *et al.* (2000). Dále bylo použito pomalejší třífázové (Stradaioli *et al.*, 2007) a rychlejší třífázové (Saragusty *et al.*, 2007) mrazicí křivky. Takto vyrobené ID byly následně přesunuty a uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem a uchovávány při teplotě -196 °C. Úspěšnost kryokonzervace byla ověřena za využití hodnocení motility spermií ihned po rozmrazení a následně v časech 30, 60, 90 a 120 min. TDT přežitelnosti spermií.

Nejvyšší hodnoty průměrné motility spermií (+2,97 % do +10,37 %; $P < 0,05 - 0,01$) po rozmrazení a v průběhu TDT byly detekovány u standardně používané dvoufázové mrazicí křivky. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly za použití této mrazicí křivky detekovány u osmi býků z devíti. Rozdíly mezi jednotlivými býky byly statisticky průkazné ($P < 0,01$).

Publikace 2:

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., **Beran, J.** 2015. The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno.* 84. 383–391. <https://doi.org/10.2754/avb201584040383>.

5.1.3 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací

K negativní zátěži buněk spermií dochází již v průběhu procesu zchlazování a ekvibrace (Barbas *et Mascarenhas*, 2009). Mění se zejména lipidová struktura plazmatické membrány, což vede k jejím nevratným změnám (Salmon *et al.*, 2016). Ve stabilitě plazmatické membrány hraje klíčovou roli cholesterol (Moce *et al.*, 2010), zejména jeho LDL frakce. Mechanismus účinku nebyl ještě kompletně popsán, nicméně pozitivní efekt LDL uvádí např. studie Bergeron *et Manjunath* (2006). Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že přídavek LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků bude mít pozitivní dopad na rezistenci spermií vůči chladovému šoku.

Byl porovnáván 4–8 % přídavek LDL do ředidel AndroMed® a Bioxcell® a 6–10 % přídavek LDL do ředidla Triladyl®. Vliv LDL byl hodnocen na základě rezistence spermií vůči chladovému šoku v průběhu TDT supra vitálním barvením pomocí eozin–nigrozinu.

Větší přežitelnost spermií byla detekována u variant naředěných AndroMedem® a Bioxcellem®. U variant obohacených o LDL cholesterol byl detekován nižší pokles podílu živých spermií ($P < 0,05$). Bylo tedy prokázáno, že LDL cholesterol vykazuje pozitivní vliv již před kryokonzervací býčích spermií.

Publikace 3:

Stádník, L., Rajmon, R., **Beran, J.**, Šimoník, O., Doležalová, M., Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015a. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno.* 84. 125–131. <https://doi.org/10.2754/avb201584020125>.

5.1.4 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci

Výsledky předchozí studie (publikace 3; Stádník *et al.*, 2015a) vedly k pokračování výzkumu s cílem ověřit vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel na funkční parametry spermií býků také po zmrazení a následném rozmrazení ID. Výzkum byl zaměřen na bezžloutková ředidla na bázi sójového lecitinu, u kterých nebyla prozatím jednoznačně prokázána srovnatelná kryoprotektivní účinnost v porovnání s ředidly žloutkovými (Crespilho *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2017). Jelikož vaječný žloutek ve své struktuře již cholesterol nese, existuje předpoklad, že LDL by mohl přispět ke zvýšení kryoprotektivních vlastností bezžloutkových ředidel.

V prvotní studii (publikace 4; Šimoník *et al.*, 2016) byla testována širší škála ředidel a koncentrací LDL. Vliv LDL na funkční parametry spermií po kryokonzervaci byl hodnocen na základě průměrných hodnot kinematických parametrů motility a viability spermií. Výsledky prokázaly pozitivní efekt 6 % přídavku LDL do ředidla Bioxcell® ($P < 0,05$), u AndroMedu® byly výsledky nekonzistentní.

V navazující studii (publikace 5; Šimoník *et al.*, 2019) byl zkoumán již jen 6 % přídavek LDL cholesterolu. Kromě motility a viability spermií byla hodnocena také integrita plazmatické membrány, akrozomu a mitochondrií po kryokonzervaci za použití metody CASA, průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. K vyhodnocení výsledků byla použita také clusterová analýza, která umožňuje hodnocení jednotlivých subpopulací spermií ve vzorku (Holt *et al.*, 2007). Pozitivní vliv LDL na distribuci jednotlivých subpopulací spermií byl zřetelný u obou vybraných ředidel ($P < 0,05$). Podobně jako u motility se projevil pozitivní vliv LDL i na integritu akrozomu spermií ($P < 0,05$), průkazný se ukázal v případě přídavku LDL do ředidla Bioxcell®. Zajímavé je, že při hodnocení funkčního stavu mitochondrií se efekt LDL projevil jako významný ($P < 0,05$), naopak u ředidla AndroMed® nebylo procento živých spermií po rozmrazení s intaktní plazmatickou membránou překvapivě přítomností LDL podpořeno. Lze předpokládat, že rozdíly ve vlivu LDL mohou souviset s odlišným složením samotných ředidel, především co se týče procentuálního zastoupení jednotlivých komponent.

Publikace 4:

Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., Šichtař, J., **Beran, J.**, Ducháček, J., Hodek, P., Trefil, P. 2016. Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results. *Czech Journal of Animal Science*. 61. 560–567. <https://doi.org/10.17221/27/2016-CJAS>.

Publikace 5:

Šimoník, O., Šichtař, J., **Beran, J.**, Maňásková-Postlerová, P., Tůmová, L., Doležalová, M., Folková, P., Stádník, L., Rajmon, R. 2019. Low Density Lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction*. 16. 267–276. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0107>.

5.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic

5.2.1 Vliv kvality cervikálního hlenu

Jednou z příčin snížené reprodukční výkonnosti dojnic jsou chyby v detekci říje (Palmer *et al.*, 2010). Předejít těmto chybám je možné použitím některé z metod synchronizace říje (Amer, 2008), např. Ovsynch® protokolu (Alkar *et al.*, 2011). Reakce organismu dojnice na hormonální ošetření je ovšem ovlivněna intenzitou jejího metabolismu, kterou je možné sledovat například vyšetřením cervikálního hlenu (Zaaijer *et al.*, 1993). Cílem příspěvku bylo vyhodnotit vztahy mezi kvalitou cervikálního hlenu a schopností krav zabřeznout.

Od 192 holštýnských dojnic zapojených do Ovsynch® protokolu byly získány vzorky CH, u kterých byl hodnocen obsah močoviny a acetonu (indikátor metabolického stavu dojnice), typ krystalizace (indikátor správného načasování inseminace) a test přežitelnosti spermií ve vzorku CH (indikátor schopnosti dojnice zabřeznout).

Výsledky prokázaly individuální rozdíly v reakci jednotlivých plemenic na Ovsynch® protokol (55 % plemenic bylo inseminováno v nevhodnou dobu pro inseminaci). Se zvyšujícím se obsahem acetonu a močoviny ve vzorku CH se zvyšoval podíl krav inseminovaných v nevhodnou dobu. Vyšší koncentrace močoviny (>260 mg/l) a acetonu (>5 mg/l) negativně ovlivnily přežitelnost spermií v CH ($P < 0,05-0,01$).

Z výsledků je patrné, že přesnost načasování inseminace je ovlivněna intenzitou metabolismu dojnic a kvalita cervikálního hlenu ovlivní následnou přežitelnost spermií v něm.

Publikace 6:

Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Doležalová, J., Kadlecová, V., Ptáček, M. 2013a. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 142. 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.005>.

5.2.2 Vliv obsahu mastných kyselin v mléce

Intenzita metabolismu dojnic se mění zejména v první fázi laktace (Ducháček *et al.*, 2012), dochází ke ztrátám energie a k rozvoji NEB (Walsh *et al.*, 2011). Zvyšující se doживost dojnic po otelení také vede ke změnám obsahu MK v mléce a zhoršení reprodukční výkonnosti dojnic (Reist *et al.*, 2000). Další výzkum byl proto zaměřen na vyhodnocení vztahů mezi obsahem mastných kyselin v mléce na počátku laktace a ukazateli reprodukce dojnic holštýnského (publikace 7, Ducháček *et al.*, 2015) a českého strakatého skotu (publikace 8, Stádník *et al.*, 2015).

U obou sledovaných plemen byly prokázány závislosti mezi obsahem nasycených MK (SFA = saturated fatty acids), resp. mono-nenasycených MK (MUFA = monounsaturated fatty acids) v mléce v první fázi laktace a ukazateli reprodukce. Průkazné ($P < 0,05-0,01$) zvýšení inseminačního indexu (+0,15 až +0,29 ID) a servis periody (+8,16 až +15,44 dní) bylo detekováno u českých strakatých krav s nejnižším obsahem SFA. Naproti tomu, u krav s nejvyšším obsahem MUFA byly nalezeny průkazně ($P < 0,05-0,01$) vyšší hodnoty inseminačního indexu (+0,13 až +0,30), i servis periody (+7,26 až +15,35). Podobné trendy byly detekovány i u holštýnských plemenic.

Obsah mastných kyselin v mléce je možné využít jako pre-selekční kritérium pro vyhledání krav s potenciálními reprodukčními problémy.

Publikace 7:

Ducháček, J., **Beran, J.**, Ptáček, M., Stádník, L., Okrouhlá, M., Toušová, R., Doležalová, J. 2015. Relationships of fatty acid group contents in milk and reproductive performance in Holstein cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*. 39. 357–363. <https://doi.org/10.3906/vet-1411-43>.

Publikace 8:

Stádník, L., Ducháček, J., **Beran, J.**, Toušová, R., Ptáček, M. 2015b. Relationships among milk fatty acid composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows. *Animal Reproduction Science*. 155. 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.02.002>.

6 SOUHRNNÁ DISKUZE

6.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci

6.1.1 Vliv býka a použitého ředidla

Výsledky prokázaly průkazné rozdíly ($P < 0,05-0,01$) mezi jednotlivými býky v motilitě spermií, stejně tak v podílu živých/mrtvých spermií barvením po odběru, po rozmrazení, i v poklesu motility spermií během TDT. Výsledky jsou v souladu s prací Ježková *et al.* (2008), kteří popisují významný efekt individuality plemenných býků a dojených krav na reprodukční výkonnost.

Vliv použitého ředidla byl statisticky významný ($P < 0,01$), lepších výsledků v přežitelnosti spermií bylo dosaženo u žloutkových ředidel Optidyl® a Triladyl® ($P < 0,05-0,01$). Potvrdily se tak závěry studie Celeghini *et al.* (2008), kteří dospěli ke stejnému závěru, že ostatní porovnávaná ředidla byla lepší než Bioxcell®. Naproti tomu výsledky Stradaioli *et al.* (2007) prokázaly, že ID nařazené bezžloutkovým ředidlem Bioxcell® dosáhly průkazně lepších výsledků. Nepotvrdily se tak závěry prací Herold *et al.* (2003) a Janett *et al.* (2005), že bezžloutkové ředidlo AndroMed® je vhodnějším ředidlem ke kryokonzervaci býčího spermatu. Naše výsledky opakovaně prokázaly lepší kvalitu ID konzervovaných žloutkovými ředidly. Potvrdily se tak závěry studie Muiño *et al.* (2007), že žloutková ředidla mají pozitivní vliv na kryokonzervaci spermií.

Výsledky jsou detailněji popsány a diskutovány v publikaci 1 (Beran *et al.*, 2012a).

6.1.2 Vliv použité mrazící křivky

Nejvyšší hodnoty průměrné motility spermií (+2,97 % do +10,37 %; $P < 0,05-0,01$) po rozmrazení a v průběhu TDT byly detekovány u dvoufázové mrazící křivky se střední rychlostí mrazení (viz graf 1, publikace 2 – Doležalová *et al.*, 2015), která je ale odlišná od standardně používané mrazící křivky pro býčí ejakulát. Potvrdily se tak závěry práce

Watson (2000), že střední rychlost mrazení umožňuje optimální dehydrataci spermií během mrazení a minimalizuje negativní efekt na spermie, zejména brání tvorbě ledových krystalů. Výsledky se také shodují se závěry studie Januskauskas *et al.* (2005), že mrazení způsobuje pokles celkové motility spermií, stejně jako progresivní motility spermií v před za hlavičkou.

Nejvyšší hodnoty motility spermií byly při použití dvou fázové mrazící křivky detekovány u osmi býků z devíti. Rozdíly mezi býky byly statisticky průkazné ($P < 0,01$). To je v souladu se závěry práce Amann *et Katz* (2004), že odolnost spermií vůči nízkým teplotám se průkazně liší nejen mezi jednotlivými plemeníky, ale i mezi jednotlivými ejakuláty od jednoho pleménika. Také Defoin *et al.* (2007) prokázali rozdílné efekty mrazení na následnou motilitu spermií po rozmrazení ID.

Výsledky jsou detailněji popsány a diskutovány v publikaci 2 (Doležalová *et al.*, 2015).

6.1.3 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací

Test na odolnost spermií vůči chladovému šoku patří mezi hlavní metody pro hodnocení kvality spermatu (Benson *et al.*, 1967). Lepší přežitelnost spermií byla detekována u variant naředěných AndroMedem® a Bioxcellem®, což je v souladu s výsledky Stradaioli *et al.* (2007).

Dále byl testován vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel. U variant obohacených o LDL cholesterol byl detekován nižší pokles podílu živých spermií ($P < 0,05$). Bylo tedy prokázáno, že LDL cholesterol vykazuje pozitivní vliv na spermie již před kryokonzervací. Pozitivní vliv LDL byl detekován také např. v pracích Hu *et al.* (2010) a Vera-Munoz *et al.* (2011). Výsledky jsou detailněji popsány a diskutovány v publikaci 3 (Stádník *et al.*, 2015a).

Na základě výsledků této studie bylo pokračováno ve výzkumu s cílem ověřit, zda LDL cholesterol v ředidle spermatu býků ovlivňuje kvalitu inseminačních dávek i po jejich mrazení a rozmrazení.

6.1.4 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci

Použití kompletního vaječného žloutku v ředidlech spermatu býků obnáší riziko výskytu specifických problémů (Wall *et Foote*, 1999). Snahou mnoha vědeckých týmů bylo ověřit možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech LDL cholesterolem. Naše výsledky (publikace 4; Šimoník *et al.*, 2016) prokázaly pozitivní efekt přídavku LDL do ředidla Bioxcell® ($P < 0,05$) na většinu kinematických parametrů spermií v obou sledovaných časech inkubace, u AndroMedu® byly výsledky nekonzistentní.

Ve světle skutečností, že existují nekonzistentní výsledky o kryoprotektivní účinnosti ředidel na bázi sójového lecitinu (Muiño *et al.*, 2008), že LDL cholesterol je kryoprotektivní složkou vaječného žloutku (Moussa *et al.*, 2002) a hlavní metodou, jak zvýšit kryoprotektivní vlastnosti spermií, je modifikování složení použitého ředidla (Holt, 2000), byl v navazující studii (publikace 5; Šimoník *et al.*, 2019) zkoumán vliv přídavku LDL cholesterolu pouze do ředidel spermatu býků na bázi sójového lecitinu. Kromě motility a životaschopnosti spermií byla hodnocena také integrita plazmatické membrány, akrozomu a mitochondrií po kryokonzervaci za použití metody CASA, průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. K vyhodnocení výsledků byla použita také clusterová analýza, která umožňuje hodnocení jednotlivých subpopulací spermií ve vzorku (Holt *et al.*, 2007).

Největší podíl spermií byl detekován v subpopulaci rychlých spermií, projevil se tak pozitivní vliv adice LDL, a to u obou sledovaných ředidel ($P < 0,05$). Ferraz *et al.* (2014) potvrdili, že podíl spermií v subpopulaci rychlých spermií koreluje s následnou oplozovací schopností.

Podobně jako u motility, se projevil pozitivní vliv LDL i na integritu akrozomu spermií. Jako průkazný ($P < 0,05$) se ukázal v případě přídavku LDL do ředidla Bioxcell®. Zajímavé je, že při hodnocení funkčního stavu mitochondrií se efekt LDL projevil jako významný ($P < 0,05$) naopak u ředidla AndroMed®, což pravděpodobně souvisí s odlišným složením obou ředidel. Potvrdily se závěry prací Hu *et al.* (2011) a Perumal *et al.* (2016).

Procento živých spermií po rozmrazení s intaktní plazmatickou membránou nebylo překvapivě přítomností LDL v žádném z ředidel zvýšeno. Lze předpokládat, že rozdíly ve vlivu LDL mohou souviset s odlišným složením samotných ředidel, především pokud jde o zastoupení sójového lecitinu v nich. Výsledky jsou detailněji popsány a diskutovány v publikaci 5 (Šimoník *et al.*, 2019).

6.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic

6.2.1 Vliv kvality cervikálního hlenu

Fáze říje krav může být detekována analýzou krystalických struktur cervikálního hlenu (Ahmadi *et al.*, 2005). Z výsledků publikace 6 (Beran *et al.*, 2013a) vyplývá, že u největšího podílu vzorků (30,7 %) byla v nevhodnější době pro inseminaci detekována kaprad'ovitá krystalizace, což bylo potvrzeno také v práci Hegedüšová *et al.* (2010). Výsledky dále prokázaly individuální rozdíly v reakci jednotlivých plemenic na Ovsynch® protokol (55 % plemenic bylo inseminováno v nevhodnou dobu pro inseminaci). Toto je v souladu s výsledky práce Alkar *et al.* (2011), že pre-synchronizace říje použitím GnRH 7 dní před začátkem Ovsynch® protokolu nevede ve všech případech ke zlepšení reprodukční schopnosti dojnic.

Dále bylo prokázáno, že se zvyšujícím se obsahem acetonu a močoviny v CH se zvyšoval podíl krav inseminovaných v nevhodnou dobu, tedy, které po inseminaci nezabřezly. Vyšší koncentrace močoviny (> 260 mg/l) a acetonu (> 5 mg/l) negativně ovlivnily také přežitelnost spermií v hlenu ($P < 0,05-0,01$). Výsledky prokázaly, že úspěšnost inseminace je ovlivněna intenzitou metabolismu dojnic a kvalita CH ovlivní následnou přežitelnost spermií v něm. Výsledky této studie blíže specifikovaly a lépe

popsaly (podrobněji a v širších souvislostech) předchozí publikované průběžné výsledky výzkumného týmu (Ježková *et al.*, 2007, 2008; Stádník *et al.*, 2008, 2011; Beran *et al.*, 2011b, 2011c, 2012b).

6.2.2 Vliv obsahu mastných kyselin v mléce

Intenzita energetického metabolismu dojnic se mění zejména v první fázi laktace (Ducháček *et al.*, 2012), dochází ke ztrátám energie a k rozvoji NEB (Walsh *et al.*, 2011). Zvyšující se dojivost dojnic po otelení také vede ke změnám obsahu MK v mléce a zhoršení reprodukční výkonnosti dojnic (Reist *et al.*, 2000). Další výzkum byl proto zaměřen na vyhodnocení vztahů mezi obsahem MK v mléce na počátku laktace a ukazateli reprodukce (inseminačním intervalem, servis periodou a inseminačním indexem) dojnic holštýnského (publikace 7, Ducháček *et al.*, 2015) a českého strakatého skotu (publikace 8, Stádník *et al.*, 2015b).

Výsledky vyhodnocení obsahu hlavních mléčných složek (tuk, bílkoviny) byly u holštýnského skotu v souladu s dříve publikovanými výsledky Buttchereit *et al.* (2012), u českého strakatého skotu v souladu s pracemi Komprda *et al.* (2005) a Řehák *et al.* (2012). Výsledky vyhodnocení změn tělesné kondice holštýnských dojnic byly pak v souladu s prací Maršálek *et al.* (2008).

U obou sledovaných plemen byly prokázány závislosti mezi obsahem SFA, resp. MUFA v mléce v první fázi laktace a sledovanými ukazateli reprodukce. Průkazné zvýšení inseminačního indexu (+0,15 až +0,29 inseminační dávky) a servis periody (+8,16 až +15,44 dní) bylo detekováno u českých strakatých krav s nejnižším obsahem SFA ($P < 0,05-0,01$), což je v souladu s výsledky Bastin *et al.* (2011) a Komprda *et al.* (2005). Naproti tomu, u krav s nejvyšším obsahem MUFA byly nalezeny průkazně vyšší hodnoty inseminačního indexu (+0,13 až +0,30), i servis periody (+7,26 až +15,35) ($P < 0,05-0,01$). Podobné trendy byly detekovány i u holštýnských plemenic. Obsah mastných kyselin v mléce je možné využít jako pomocné kritérium pro vyhledání krav s potenciálními reprodukčními problémy (Stádník *et al.*, 2015b).

7 ZÁVĚR

Cílem předkládané habilitační práce bylo determinovat a vyhodnotit vybrané vlivy na oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci a vlivy některých faktorů ovlivňujících reprodukční výkonnost dojnic.

7.1 Vybrané faktory ovlivňující oplozovací schopnost ejakulátu býků před a po kryokonzervaci

7.1.1 Vliv býka a použitého ředidla

Zhoršená kvalita inseminačních dávek býků je jedním z faktorů souvisejících s poklesem zabřezávání krav a jalovic.

Výsledky publikace 1 (Beran *et al.*, 2012a) potvrdily průkazný vliv býka na motilitu spermií před, i po rozmrazení inseminační dávky ($P < 0,01$).

Složení použitého ředidla mělo průkazný vliv na podíl živých a mrtvých spermií barvením po odběru ($P < 0,05$), po rozmrazení ($P < 0,05$), i na pokles motility spermií během TDT v citrátu sodném ($P < 0,01$).

Pořadí vhodnosti ředidel na základě hodnocení motility spermií ve všech sledovaných časech TDT bylo následující: Optidyl®, Triladyl®, AndroMed®, Bioxcell®. Tato zjištění potvrzují vyšší kvalitu inseminačních dávek vyrobených za použití ředidel na bázi vaječného žloutku.

7.1.2 Vliv použité mrazicí křivky

Kvalita kryokonzervovaných inseminačních dávek je ovlivněna také průběhem, resp. rychlostí mrazení. Výsledky publikace 2 (Doležalová *et al.*, 2015) prokázaly,

že dvoufázová mrazící křivka byla detekována jako nejvhodnější ve vztahu k pohyblivosti spermií po rozmrazení.

Výsledky naznačují vhodnost individuální kryokonzervace každého ejakulátu za účelem zvýšení jeho oplozovacích schopností po rozmrazení.

7.1.3 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků před kryokonzervací

Výsledky publikace 3 (Stádník *et al.*, 2015a) potvrdily pozitivní vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků na rezistenci spermií vůči chladovému šoku, zejména díky nižšímu poklesu podílu živých spermií během 120 min. testu ($P < 0,05$).

Další výzkum je nutný pro vyhodnocení účinku adice LDL během, resp. po ekvilibraci a také pro vyhodnocení optimální koncentrace LDL v různých typech ředidel spermatu býků.

7.1.4 Vliv přídavku LDL cholesterolu do ředidel spermatu býků po kryokonzervaci

Výsledky první série testů publikované v práci Šimoník *et al.* (2016) prokázaly, že kryoprotektivní účinek bezžloutkových ředidel spermatu býků lze zlepšit přidáním LDL cholesterolu.

Výsledky navazující studie (publikace 5, Šimoník *et al.*, 2019) dále potvrdily, že LDL cholesterol pozitivně reaguje se sójovým lecitinem obsaženým v obou testovaných ředidlech a zlepšuje funkční parametry býčích spermií po rozmrazení ID. Záleží však na typu použitého ředidla.

7.2 Vybrané faktory ovlivňující reprodukční výkonnost dojnic

7.2.1 Vliv kvality cervikálního hlenu

Největší zastoupení (30,7 %) z hodnocených vzorků cervikálních hlenů měla kaprad'ovitá krystalizace, která se vyskytuje u plemenic v optimální době pro inseminaci. Tento podíl je ale velmi nízký vzhledem k faktu, že se jedná o dojnice s hormonálně načasovanou inseminací.

Dále byly zjištěny významné závislosti sledovaných ukazatelů kvality cervikálního hlenu na přežitelnost býčích spermií. Průkazně nejvyšší hodnoty motility spermií v průběhu celého testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu byly detekovány u krav inseminovaných v optimální fázi estru (podle typu krystalizace, $P < 0,05-0,01$).

Z výsledků publikace 6 (Beran *et al.*, 2013a) je dále patrný trend klesající úrovně motility spermií v závislosti na zvyšujícím se obsahu močoviny, resp. acetonu ve vzorcích cervikálního hlenu ($P < 0,05-0,01$) – obsah močoviny v cervikálním hlenu nad 260 mg/l a obsah acetonu nad 5 mg/l negativně ovlivnil přežitelnost spermií ($P < 0,05-0,01$).

7.2.2 Vliv obsahu mastných kyselin v mléce

Na základě sledování u holštýnských dojnic (publikace 7, Ducháček *et al.*, 2015) lze konstatovat, že k projevu NEB dochází nejvýrazněji v prvních osmi týdnech laktace. Mléčná užitkovost se zvyšovala do 8. týdne, zatímco BCS klesala až do třetího měsíce laktace. Obsahy SFA a MUFA signifikantně korelovaly se všemi hodnocenými ukazateli reprodukční výkonnosti dojnic (inseminační interval, servis perioda, inseminační index; $P < 0,05-0,01$).

Výsledky zjištěné u dojnic českého strakatého skotu (publikace 8, Stádník *et al.*, 2015b) naznačují těsné vztahy mezi obsahem SFA, resp. MUFA v mléce v prvních pěti týdnech laktace s hodnocenými reprodukčními ukazateli (inseminační interval, inseminační index, servis perioda). Sledované reprodukční parametry byly lepší u krav s vyšším

obsahem SFA v mléce (s méně hlubokou NEB). Naopak méně příznivé hodnoty sledovaných reprodukčních ukazatelů byly zjištěny u krav s vyšším obsahem MUFA (s vysokou NEB).

Vyhodnocení profilu mastných kyselin v mléce během prvních týdnů laktace může být použito jako pomocné kritérium pro určení krav s větším rizikem reprodukčních problémů u obou sledovaných plemen, tj. holštýnského i českého strakatého skotu.

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.
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., Hinsch, E. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60. 269–279.
- 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. 586–592.
- 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. 1036–41.
- Amann, R. P., Katz, D. F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 25. 317–325.
- Amer, H. A. 2008. Effect of body condition score and lactation number on selected reproductive parameters in lactating dairy cows. *Global Veterinaria*. 2. 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. 535–543.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., *et al.* 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61. 895–907.

- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., *et al.* 2010. *In vivo* fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*. 122. 282–287.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002a. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187. 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. 583–586.
- Barbas, J. P., Mascarenhas, R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10. 49–62.
- Bastin, C., Berry, D. P., Soyeurt, H., Gengler, N. 2012. Genetic correlations of days open with production traits and contents in milk of major fatty acids predicted by mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*. 95. 6113–21.
- Bastin, C., Gengler, N., Soyeurt, H. 2011. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid content across days in milk for Walloon Holstein first-parity cows. *Journal of Dairy Science*. 94. 4152–163.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., Lock, A. L. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*. 89. 1235–43.
- Benson, R. W., Pickett, B. W., Komarek, R. J., Lucas, J. J. 1967. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *Journal of Animal Science*. 26. 1078-&.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Doležalová, J., Kadlecová, V., Ptáček, M. 2013a. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 142. 28–34.
- Beran, J., Stádník, L., Bezdíček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J. 2012a. 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. 207–218.

- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012b. 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*. 60. 39–48.
- 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. 37–44.
- Beran, J., Ducháček, J., Stádník, L., Okrouhlá, M., Čítek, J. 2011b. Relationships among crystallization, acetone and urea content in dairy cows cervical mucus. In: *Proceedings of the 15th European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Antalya, Turkey, 15-17 September. Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3). 89–89.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Štolc, L. 2011c. Vliv tělesné kondice dojnic na kvalitu jejich cervikálního hlenu. In: *Zborník príspevkov „VI. Vedecké konferencie doktorandov s medzinárodnou účasťou“, 24. 11. 2011. SPU v Nitre*, s. 88–90. ISBN: 80-552-0693-6.
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*. 73. 1338–44.
- Berry, D. P., Veerkamp, R. F., Dillon, P. 2006. Phenotypic profiles for body weight, body condition score, energy intake, and energy balance across different parities and concentrate feeding levels. *Livestock Science*. 104. 1–12.
- 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.
- Bhoite, U. Y., Sutar, D. A., Ulmek, E. R. 2008. Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*. 85. 53–55.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and

the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50. 699–706.

Brito, L. F. C., Silva, A., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A. G., Kastelic, J. P. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*. 58. 1175–86.

Buttchereit, N., Stamer, E., Junge, W., Thaller, G. 2012. Genetic parameters for energy balance, fat/protein ratio, body condition score and disease traits in German Holstein cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 129. 280–288.

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. 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. 221–225.

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. 144–150.

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

Cotter, P. Z., Goolsby, H. A., Prien, S. D. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 40. 98–99.

Crespilho, A. M., Sa Filho, M. F., Dell’Aqua, J. A. Jr., Nichi, M., Monteiro, G. A., *et al.* 2012. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*. 149. 1–6.

- Curry, M. R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5. 46–52.
- DeJarnette, J. M. 2010. The evolution of sex-sorted semen in the US dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 93. 783–783.
- Defoin, L., Granados, A., Donnay, I. 2007. Can one predict the resistance of bull sperm to cryopreservation by analyzing motility parameters before freezing? *Reproduction Fertility and Development*. 19. 123–123.
- Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*. 84. 383–391.
- Ducháček, J., Beran, J., Ptáček, M., Stádník, L., Okrouhlá, M., Toušová, R., Doležalová, J. 2015. Relationships of fatty acid group contents in milk and reproductive performance in Holstein cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*. 39. 357–363.
- Ducháček, J., Stádník, L., Ptáček, M., Beran, J., Okrouhlá, M., Čítek, J., Stupka, R. 2014. Effect of cow energy status on the hypercholesterolaemic fatty acid proportion in raw milk. *Czech Journal of Food Sciences*. 32. 273–279.
- Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., Chapwanya, A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 144. 60–71.
- Ferraz, M. A. M. M., Morato, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A. I., *et al.* 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*. 81. 1067–72.
- Flint, A. P. F. 2006. Dairy cow fertility: An inherited disease. *Cattle Practice*. 14. 29–32.
- Gil, J., Januskauskas, A., Haard, M., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reproduction in Domestic Animals*. 35. 69–77.

- 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. 201–214.
- 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. 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. 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. 900–904.
- Gulliver, C. E., Friend, M. A., King, B. J., Clayton, E. H. 2012. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Animal Reproduction Science*. 131. 9–22.
- 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. 1878–85.
- 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.
- Hanuš, O., Kučera, J., Yong, T., Chládek, G., Holásek, R., Třináctý, J., Genčurová, V., Sojková, K. 2011. Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. *Archiv für Tierzucht*. 54. 36–50.
- Hanuš, O., Frelich, J., Tomáška, M., Vyletělová, M., Genčurová, V., *et al.* 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. 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: 80-7271-146-6.
- 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. 17–34.
- Härtlová, H., Rajmon, R., Krontorádová, I., Mamica, J., Zita, L., *et al.* 2013. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Veterinaria Brno*. 82. 31–35.
- Hegedušová, Z., Louda, F., Říha, J., Kubica, J. 2010. *Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce*. Rapotín: Agrovýzkum Rapotín, s. r. o. 38 s. ISBN: 80-87144-21-3.
- Hegedušová, Z., Slezáková, M., Bjelka, M., Říha, J. 2009. Content of Acetone and Urea in Cervical Mucus in Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44. 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. 58–61.
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). 2004. *Nemoci skotu*. Brno: Noviko a. s. ISBN: 80-86542-19-5.
- 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. 1834–46.
- Holt, W. V., O'Brien, J., Abaigar, T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction Fertility and Development*. 19. 709–718.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62. 13–22.

- Hu, J. H., Jiang, Z. L., Lv, R. K., Li, Q. W., Zhang, S. S., Zan, L. S., *et al.* 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62. 83–87.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., Jia, Y. H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*. 117. 11–17.
- Janett, F., Keo, S., Bollwein, H., Hässig, M., Thun, R. 2005. Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extenders for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 147. 62–62.
- 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. 475–480.
- Januskauskas, A., Lukoseviciute, K., Nagy, S., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 2005. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology*. 63. 160–178.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*. 60. 743–758.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*. 53. 859–875.
- Januskauskas, A., Gil, J., Soderquist, L., Haard, M. G. M., Haard, M. C., *et al.* 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*. 52. 641–658.
- 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. 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. In: *Book of abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), Dublin, Ireland, 26–29 August*. No 13. 235–235. ISBN: 9086860451.
- 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. 28–38.
- Kelso, K. A., Redpath, A., Noble, R. C., Speake, B. K. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109. 1–6.
- Kommisurd, E., Berg, K. A. 1996. The influence of duration of sexual preparation on bovine semen characteristics and fertility rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 31. 369–371.
- Komprda, T., Dvořák, R., Fialová, M., Šustová, K., Pechová, A. 2005. Fatty acid content in milk of dairy cows on a diet with high fat content derived from rapeseed. *Czech Journal of Animal Science*. 50. 311–319.
- 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. 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. 14.
- Kumar, S., Millar, J. D., Watson, P. F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 46. 246–253.
- Kvapilík, J., Bucek, P., Kučera, J. et al. 2019. *Ročenka – Chov skotu v České Republice – Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2018*. Praha: Českomoravská společnost chovatelů, a. s. 77 s.

- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172. 1–9.
- 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., *et al.* 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 120. 31–38.
- 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. 1629–35.
- Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic*. Raportín: Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. 56 s. ISBN: 80-87144-05-3.
- Louda, F., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdíšek, J., Stádník L., Bezdíček J. 2007. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby*. Raportín: Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. 43 s. ISBN: 80-87144-01-5.
- Lucy, M. C. 2001. ADSA Foundation Scholar Award – Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*. 84. 1277–93.
- MacMillan, K. L., Lean, I. L., Westwood, C. T. 1996. The effects of lactation on the fertility of dairy cows. *Australian Veterinary Journal*. 73. 141–147.
- Machatý, Z., Peippo, J., Peter, A. 2012. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*. 78. 937–950.
- 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. 621–628.

- Mathevon, M., Buhr, M. M., Dekkers, J. C. M. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 81. 3321–30.
- 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. 161–166.
- Maurya, V. P., Tuli, R. K. 2003. Post-thaw thermal resistance test on motility and acrosomal integrity of filtered and non-filtered frozen semen of Murrah buffalo bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16. 1424–28.
- 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. 4886–94.
- Moce, E., Blanch, E., Tomas, C., Graham, J. K. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 57–66.
- 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. 1695–1706.
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C. O., Peña, A. I. 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*. 109. 27–39.
- Muiño, R., Fernández, M., Peña, A. I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*. 42. 305–311.
- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S. 2017. A comparison of semen diluents on the *in vitro* and *in vivo* fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*. 100. 1541–54.

- 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. 822–828.
- Nowicki, A., Baranski, W., Baryczka, A., Janowski, T. 2017. OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds-an update. *Journal of Veterinary Research*. 61. 329–336.
- Pace, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 39. 1144–49.
- Palmer, M. A., Olmos, G., Boyle, L. A., Mee, J. F. 2010. Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*. 74. 255–264.
- Perumal, P., Srivastava, S. K., Ghosh, S. K., Baruah, K. K., Bag, S., *et al.* 2016. Effects of low-density lipoproteins as additive on quality parameters and oxidative stress following cryopreservation of mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 51. 708-716.
- Petit, H. V., Dewhurst, R. J., Proulx, J. G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H. 2001. Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *Canadian Journal of Animal Science*. 81. 263–271.
- 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 of Dairy Science*. 83. 2664–71.
- Přinosilová, P., Kopecká, V., Hlavicová, J., Kunetková, M. 2014. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno*. 83. 313–327.
- Reist, M., Koller, A., Busato, A., Kúpfer, U., Blum, J. W. 2000. First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology*. 54. 685–701.

- 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. 5769–5801.
- Roche, J. F., Mackey, D., Diskin, M. D. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*. 60. 703–712.
- Rodríguez-Martínez, H. 1998. Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 33. 233–237.
- Rossi, F., Righi, F., Romanelli, S., Quaranteli, A. 2008. Reproductive efficiency of dairy cows under negative energy balance conditions. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*. 28. 173–180.
- 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. 79–86.
- Řehák, D., Volek, J., Bartoň, L., Vodková, Z., Kubešová, M., Rajmon, R. 2012. Relationships among milk yield, body weight, and reproduction in Holstein and Czech Fleckvieh cows. *Czech Journal of Animal Science*. 57. 274–282.
- 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. 193–200.
- 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. 345–357.
- Salmon, V. M., Leclerc, P., Bailey, J. L. 2016. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation. *Biology of Reproduction*. 94.

- Sansone, G., Nastri, M. J. F., Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*. 62. 55–76.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Rozenboim, I., Arav, A. 2009a. Protective effects of iodoxanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology*. 71. 1425–32.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Zeron, Y., Rozenboim, I., Arav, A. 2009b. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 115. 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. 610–615.
- Siddique, M., Ali, R., Raza, A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 2. 117–119.
- Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. 2015. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 50. 20–26.
- Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. 2006. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*. 89. 4858–65.
- Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O, Doležalová, M., Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015a. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno*. 84. 125–131.
- Stádník, L., Ducháček, J., Beran, J., Toušová, R., Ptáček M. 2015b. Relationships among milk fatty acid composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows. *Animal Reproduction Science*. 155. 75–79.
- Stádník L., Doležalová, M., Ducháček, J. 2015c. *Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky*. Praha: Copy Centrum Powerprint. 27 s. ISBN: 80-213-2615-6.
- Stádník L., Beran, J., Doležalová, M., Ducháček, J., Toušová, R. 2014. *Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků*. Praha: Copy Centrum Powerprint. 37 s. ISBN: 80-213-2536-4.

- 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. In: *Proceedings of the 15th European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Antalya, Turkey, 15-17 September. 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. 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. 1249–55.
- Šimoník, O., Šichtař, J., Beran, J., Maňásková-Postlerová, P., Tůmová, L., Doležalová, M., Folková, P., Stádník, L., Rajmon, R. 2019. Low Density Lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction*. 16. 267–276.
- Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., Šichtař, J., Beran, J., Ducháček, J., Hodek, P., Trefil, P. 2016. Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results. *Czech Journal of Animal Science*. 61. 560–567.
- Špaleková, E., Makarevich, A. V., Kubovičová, E., Ostro, A., Chrenek, P. 2014. Effect of caffeine on functions of cooling-stored ram sperm in vitro. *Acta Veterinaria Brno*. 83. 19–25.
- Tamadon, A., Kafi, M., Saeb, M., Ghavami, M. 2011. Association of milk yield and body condition score indices with the commencement of luteal activity after parturition in high producing dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 12. 184–191.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., *et al.* 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: Much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47. 65–75.

- 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. 18–27.
- Thara, K. M., Nair, S. 2007. Sire effect on in vitro fertilizability of matured cattle oocytes. *Indian Journal of Biotechnology*. 6. 421–422.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57. 1087–94.
- Tsiligiani, T., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P. 2001a. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone/PGF2alfa) estrus. *Theriogenology*. 55. 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. 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. 227–235.
- van Wagtenonk-de Leeuw, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L., den Daas, J. H. G. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 54. 57–67.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., *et al.* 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at four degrees C. *Asian Journal of Andrology*. 13. 281–286.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E., *et al.* 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number *per dose* on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl (R) and Bioxcell (R). *Theriogenology*. 71. 895–900.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., de Kruif, A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*. 63. 912–922.

- Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62. 23–53.
- Wall, R. J., Foote, R. H. 1999. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *Journal of Dairy Science*. 82. 817–821.
- 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. 127–138.
- Wathes, D. C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., *et al.* 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*. 68. 232–241.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60. 481–492.
- 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. 569–580.
- Zhang, X. G., Hong, J. Y., Yan, G. J., Wang, Y. F., Li, Q. W., Hu, J. H. 2015. Association of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. *Czech Journal of Animal Science*. 60. 256–262.