



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Inovace metod produkce embryí skotu
požadovaného genomu**

**Ing. Marie Machatková, CSc.
Ing. Ivona Trávníčková
MVDr. Pavlína Hulínská Ph.D.
Mgr. Kateřina Hanzalová**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA 2021/139

Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu

Autoři

Ing. Marie Machatková, CSc.

Ing. Ivona Trávníčková

MVDr. Pavlína Hulínská Ph.D.

Mgr. Kateřina Hanzalová

ISBN 978-80-7672-011-4

2021

Č. osvědčení: SVS/2021/116652-G

Vydala: Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

SVS/2021/116652-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu**

Autor / autoři: M. Machatková, I. Trávníčková, P. Hulínská, K. Hanzalová

Název organizace/cí: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Místo vydání: **BRNO**

Rok vydání: 2021

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektu MZE-RO 0521-VZ014, který je součástí DKRVO.

Ústřední veterinární správa
Státní veterinární správy
Slezská 100/7, 120 00 Praha 2
- 4 -

V Praze dne 24. 9. 2021

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

MVDr. Zbyněk Semerád

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ústřední ředitel

.....
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 19. 10. 2021

.....
MGR. JAN RADOŠ

Obsah

I)	Úvod	1
II)	Cíle a vývoj metodiky	2
	2.1. Zrání limitovaného počtu oocytů	2
	2.2. Selektce kapacitačního agens a systému	3
	2.3. Produkce embryí požadovaného genomu	3
III)	Vlastní popis metodiky	4
	3.1. Příprava embryí požadovaného genomu	4
	3.1.1. Zrání limitovaného počtu oocytů	4
	3.1.2. Selektce kapacitačního agens a systému	4
	3.1.3. Optimalizace oplození pro rodičovské páry	4
	3.1.4. Kultivace raných embryí	5
IV)	Srovnání novosti postupů	6
V)	Popis uplatnění certifikované metodiky	7
VI)	Ekonomické aspekty metodiky	7
VII)	Seznam použité související literatury	8
VIII)	Seznam publikací předcházející metodice	9
IX)	Dedikace	10
X)	Jména oponentů	10
XI)	Podíl práce	10

I. Úvod

Aplikace biotechnologií ve šlechtitelské praxi přináší nové možnosti, jak významně zintenzivnit selekční tlak v chovu hospodářských zvířat na základě včasného a objektivního hodnocení rodičů (Kadarmideen et al 2015; Sirard 2018). Umožňuje nejen efektivněji využívat reprodukční potenciál geneticky cenných jedinců ale i modifikovat populaci zvířat požadovaným směrem pomocí účinnějších selekčních strategií. Moderní strategie ve šlechtění skotu cíleně využívají metody molekulární genetiky, jako je genomická selekce rodičů (GS) a techniky asistované reprodukce (AR), metodu ovum-pick up (OPU), produkci embryí *in vitro* (IVP) a embryotransfer (OPU/IVP/ET), které umožňují zvýšit a urychlit genetický zisk. Transvaginální aspirace oocytů od vysokoužitkových krav a geneticky cenných jalovic, zrání a oplození oocytů nesexovanými i sexovanými spermii elitních býků a embryotransfer nebo kryokonzervace IVP embryí patří v chovatelsky vyspělých zemích mezi intenzivně využívané metody v oblasti reprodukce a šlechtění skotu. Uvedené metody stále více nahrazují konvenčně používané ekonomicky i časově náročnější postupy sběru dat získaných testováním a hodnocením vysokého počtu jedinců.

V České republice jsou embrya skotu pro embryotransfer nebo kryokonzervaci získávána především v rámci programů MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer). Na rozdíl od chovatelsky vyspělých zemí EU nenašla dosud progresivní metoda využití IVP embryí od genomicky selektovaných rodičů v chovech skotu adekvátní uplatnění. Jedním z důvodů je nižší účinnost produkce embryí požadovaného genomu ve srovnání s účinností vývoje embryí pro experimentální účely.

Hlavní příčinou nižší efektivity produkce IVP embryí od geneticky cenných rodičů je skutečnost, že pro přípravu embryí je dostupný limitovaný počet oocytů, které jsou vysoce heterogenní z hlediska meiotické a vývojové kompetence (Machatkova et al 2009a, Machatkova et al 2012; Jeseta et al 2014). Účinnost zrání v podmínkách *in vitro* je navíc negativně ovlivněna snižující se kvalitou oocytů v důsledku zhoršujících se podmínek životního prostředí. Autoři metodiky prokázali, že vývojovou kompetenci bovinních oocytů lze zvýšit během procesu zrání pomocí specificky účinných látek, jako jsou epidermální růstový faktor (EFG) nebo aktivátor mitochondrií L-carnitin, což lze využít pro zefektivnění současných metod zrání oocytů v systému *in vitro* (Knitlova et al 2017).

Již dříve bylo potvrzeno, že za standardních podmínek oplození oocytů spermii kapacitovanými heparinem se plodnost plemenných býků v systému *in vitro* významně liší, a to i v případě, kdy plemenici jsou vysoce úspěšní v inseminaci (Katska and Smorag 1996; Zhang et al 1997). Autoři metodiky prokázali, že do procesu oplození zralých oocytů sexovanými i nesexovanými spermii elitních býků lze cíleně zasáhnout pomocí účinnějších kapacitačních stimulans jako jsou kombinace heparinu, penicillaminu, hypotaurinu a epinefrinu (PHE mixu) nebo heparinu a kofeinu (Travnickova et al 2021).

II. Cíle a vývoj metodiky

Cílem navrhované metodiky bylo systematicky zefektivnit produkci embryí skotu vyvíjejících se *in vitro* z limitovaného počtu oocytů na základě modifikace metod jejich zrání a oplození. Zvýšit účinnost produkce embryí z gamet geneticky cenných rodičů na úroveň, která je dosahována při produkci experimentálních embryí. Inovovat současné biotechnologické postupy používané pro produkci experimentálních embryí tak, aby byly využitelné pro produkci embryí od genomicky selektovaných rodičů a šlechtění dojeného skotu.

K dosažení finálního záměru bylo nutno realizovat experimentální aktivity a dosáhnout následující dílčí cíle:

- ✓ Modifikovat zrání u limitovaného počtu oocyt
- ✓ Optimalizovat oplození selekcí kapacitačního agens a systému
- ✓ Zefektivnit produkci embryí požadovaného genomu

V rámci řešení uvedených cílů byly získány poznatky, které umožnily modifikovat standardní metody přípravy bovinních embryí a navrhnout technologické postupy přispívající ke zvýšení zisku embryí definovaného genomu.

2.1. Zrání limitovaného počtu oocytů

Oocyty od geneticky cenných donorek, které jsou získány v různém stadiu folikulogeneze transvaginální aspirací (OPU) nebo post mortem, mají nižší schopnost dokončit jaderné i cytoplazmatické zrání a po oplození se vyvíjet do přenosuschopných embryí. Zatímco jaderné a cytoplazmatické zrání experimentálních oocytů v médiích s gonadotropiny probíhá spontánně a dosahuje průměrně 80,0 % a 60,0 %, cytoplazmatické zrání limitovaného počtu oocytů je nutno stimulovat suplementací kultivačního systému. Doplnění kultivačního média s FSH/LH nebo EGF o aktivátor mitochondrií L-carnitin (LC) zvýšilo jaderné i cytoplazmatické zrání u méně i více kompetentních oocytů (na 90,2 % a 78,1 %) ve srovnání se standardními metodami zrání. Signifikantní zvýšení cytoplazmatického zrání u méně kompetentních oocytů po doplnění L-carnitinu bylo nalezeno v kultivačním systému jak s FSH/LH (71,3 %), tak i s EGF (84,8 %). Získané výsledky potvrdily, že suplementací kultivačního systému o aktivátor mitochondrií L-carnitin lze významně zefektivnit zrání limitovaného počtu bovinních oocytů v podmínkách *in vitro*.

2.2. Selekce kapacitačního agens a systému

Předpokladem pro úspěšnou fertilizaci oocytů v systému *in vitro* je dostatek motilních spermií schopných prodělat akrozomální reakci (AR), které je nutno separovat z komerčních inseminačních dávek. Autoři zjistili, že účinnost oplození oocytů je ovlivněna, jak metodou separace motilních spermií (swim up vs gradient Percollu), tak i systémem použitým pro oplození oocytů (makro vs mikro). Účinnost oplození a produkce embryí byly vyšší, pokud byly motilní spermie izolovány metodou swim up a oplození oocytů probíhalo v makrosystému, a naopak, jestliže byly spermie separovány na gradientu Percollu a k oplození oocytů došlo v mikrosystému.

Již ve svých dřívějších studiích autoři prokázali, že býci se středně rychlým průběhem AR jsou výrazně úspěšnější při produkci embryí *in vitro* ve srovnání s býky s rychlým nebo pomalým průběhem AR (Molnarova et al 2006). Ve svých současných studiích našli, že průběh AR a penetraci spermií do oocytů lze ovlivnit cílenou selekcí kapacitačního agens a kokultivačního systému (Machatková et al 2018; Travnickova et al 2021). Na základě získaných výsledků potvrdili, že optimalizací interakce spermií s oocyty pomocí vhodné kombinace kapacitačního agens (heparin vs heparin/penicillamin, hypotaurin a epinefrin vs heparin/kofein) a systému (mikro vs makro) je možno zefektivnit produkci přenosuschopných embryí požadovaného genomu z limitovaného počtu oocytů, přičemž lze do určité míry ovlivnit i poměr samčího a samičího pohlaví u produkovaných embryí.

2.3. Produkce embryí požadovaného genomu

Suplementace kultivačního systému s gonadotropiny (FSH/LH) nebo s EGF o aktivátor mitochondrií L-carnitin zvýšila nejen účinnost zrání oocytů ale i účinnost embryonálního vývoje průměrně na 20 % a akcelerovala diferenciaci raných embryí do přenosuschopných stádií 7. den po oplození. Signifikantní zvýšení účinnosti embryonálního vývoje bylo dosaženo po zrání oocytů s nižší vývojovou kompetencí v systému FSH/LH/LC. Naproti tomu signifikantní zrychlení diferenciaci ve stádiu blastocysty bylo pozorováno u embryí vyvíjejících se z oocytů s vyšší vývojovou kompetencí, které zrály v systému EGF/LC. Tyto výsledky potvrdily, že modifikací kultivačního systému během zrání lze významně zefektivnit vývoj raných embryí z limitovaného počtu oocytů a akcelerovat jejich vývoj do stádií hatchingující blastocysty, což je významné pro prognózu úspěšného vývoje po embryotransferu nebo kryokonzervaci.

III. Vlastní popis metodiky

3.1. Příprava embryí požadovaného genomu

3.1.1. Zrání limitovaného počtu oocytů

Průměrně 5-7 oocytů/aspiraci nebo 10-15 oocytů/disekci ovariálního cortexu, které jsou získány z ovárií donorky během jednorázové OPU nebo post mortem, je izolováno do média TCM-199 stabilizovaného 25 mM Hapesem a doplněného 1 % estrálního bovinního séra. Pouze oocyty s neukončeným růstem, výraznými defekty cytoplazmy nebo bez přítomnosti kumulárních buněk jsou eliminovány v průběhu morfologického hodnocení oocytů při zvětšení 50 x. Oocyty každé z donorek jsou přeneseny do mikroplotny (NUNCLON) obsahující 500 µl zracího média/jamku. Pro zrání je použito médium TCM-199 doplněné o 5 % estrálního séra krav (ECS), 0,2 mM pyruvát sodný, buď FSH/LH (P.G. 600; 15 I.U./mL) nebo EGF (50 ng/mL) a antibiotika (50 IU/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu). Zrací médium je nejdříve ekvilibrováno po dobu 1 hodiny, kdy je přidáno mitochondriální stimulans L-carnitin v koncentraci 2,5 mM a následně je médium opět ekvilibrováno po dobu 2 hodin. Oocyty jsou kultivovány při teplotě 38,5 °C, v atmosféře s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO₂, po dobu 24 hodin. Před oplozením jsou oocyty přeneseny do centrifugační zkumavky s 2 ml média a částečně zbaveny kumulárních buněk vortexováním při 20 Hz po dobu 45 sekund.

3.1.2. Selektce kapacitačního agens a systému

Před oplozením oocytů je hodnocen funkční stav spermií separovaných z inseminačních dávek elitních býků a testována jejich odezva na kombinace kapacitačních agens a kokultivačních systémů. Pro testaci se používají soubory experimentálních oocytů získané od běžné populace jatečných krav v počtu minimálně 50 oocytů na jednu kombinaci. Podíly normálně oplozených oocytů se hodnotí za 18 hodin po oplození postupem popsáným v certifikované metodice „Predikce fertility býků *in vitro* pomocí penetračního testu“ (Machatková et al 2009b). Účinnost embryonálního vývoje je hodnocena 8.-9. den po oplození oocytů, kdy embrya dosáhnou vývojových stádií hatchingující blastocysty.

3.1.3. Optimalizace oplození pro rodičovské páry

Na základě výsledků testace penetrační schopnosti spermií jsou optimalizovány podmínky pro gamety každého z rodičovských párů tak, aby pravděpodobnost získání přenosuschopných embryí z limitovaného počtu oocytů byla co nejvyšší.

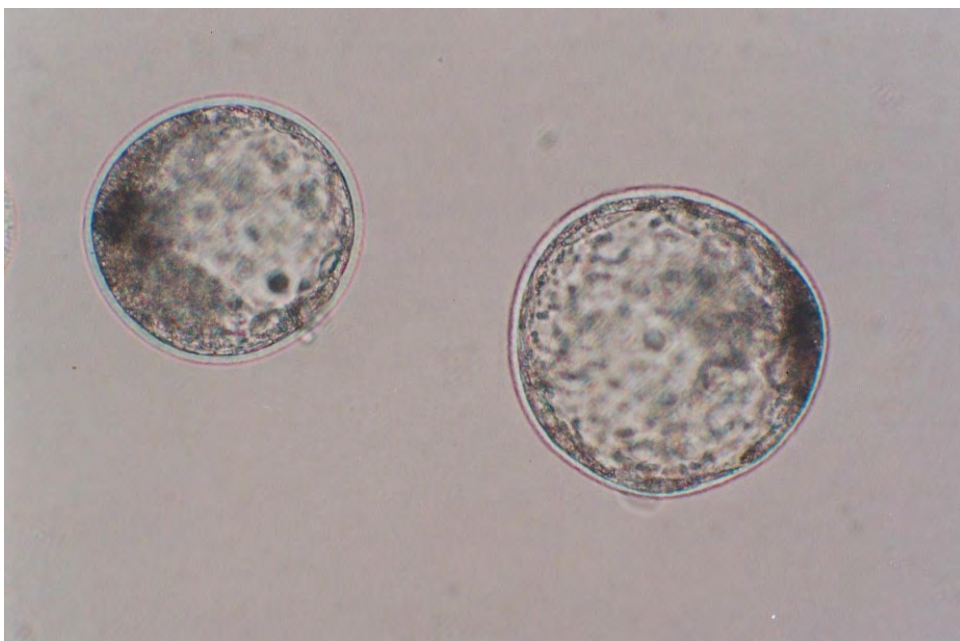
Separace motilních spermií z inseminačních dávek plemenných býků pomocí metody swim up i gradientu Percollu byly detailně popsány v předcházejících certifikovaných metodikách (Machatková et al 2013, 2017).

Pro oplození oocytů každé z donorek je zvolena kombinace kapacitačního agens a systému, při které bylo dosaženo nejvyšší produkce embryí v testaci. Modifikované Tyrodovo médium (IVF-TALP) je nejdříve doplněno buď rozdílnou koncentrací heparinu (10-100 µg/ml) nebo kombinací 10 µg heparinu a PHE-mixu (2 mM penicillaminu, 1 mM hypotaurinu a 250 µM epinefrinu), případně kombinací 10 µg heparinu a 1 mM kofeinu. Připravené médium je následně ekvilibrováno v inkubátoru po dobu nejméně 2 hodin. Zralé oocyty jsou před oplozením částečně denudovány a přeneseny buď a) do modifikovaného mikrosystému, do kapek fertilizačního média o objemu 50 µl s poměrem 8.000 spermií/oocyt, kde probíhá kokultivace po dobu 60 minut, kdy je objem média navýšen na 450 µl a kokultivace následně pokračuje dalších 17 hodin, nebo b) do makrosystému, do 500 µl fertilizačního média obsahujícího stejný poměr gamet, ve kterém jsou oocyty kokultivovány po dobu 18 hodin.

K oplození oocytů v obou systémech dochází při teplotě 39 °C v atmosféře vzduchu s vysokou relativní vlhkostí a 5 % CO₂.

3.1.4. Kultivace raných embryí

Za 20 hodin po oplození jsou potenciální zygoty přeneseny na buněčný monolayer stabilní linie BRL (Buffalo rat liver cells, ATCC, USA). Pro kultivaci je používáno kultivační medium B2 Menezo s 10 % estrálního bovinního séra stabilizované 0,2 mM Hapesem, ve kterém se embrya vyvíjejí při teplotě 39 °C v atmosféře vzduchu s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO₂ po dobu 7–8 dnů do stádií časně až expandující blastocysty, kdy mohou být použita pro embryotransfer nebo kryokonzervaci.



Obr.1 - Embrya skotu ve stádiu diferencované blastocysty použitelná pro transfer nebo kryokonzervaci; světelná mikroskopie, zvětšení 200 ×.



Obr.2 - Embrya skotu ve stádiích hatchingující blastocysty s prognózou vývoje po transferu nebo kryokonzervaci; světelná mikroskopie, zvětšení 200 ×.

IV. Srovnání novosti postupů

Navržená metodika vychází ze současných i předchozích poznatků získaných autory v průběhu jejich základního i aplikovaného výzkumu. Byl vyvinut efektivnější postup zrání a oplození bovinních oocytů, který je vhodný nejen pro produkci přenosuschopných embryí

od genomicky selektovaných rodičů a tvorbu i uchování genových zdrojů, ale také pro přípravu kvalitních cytoplastů a donorových jader nezbytných ke klonování geneticky cenných jedinců. Metody zrání oocytů v systému doplněném o specificky účinné látky a optimalizace oplození založená na selekci kokultivačního systému a kapacitačního agens umožňují významně zvýšit produkci embryí požadovaného genomu z limitovaného počtu oocytů, které lze získat během opakovaných aspirací oocytů (OPU) nebo post mortem z ovárií geneticky cenných donorek.

Dosud byly pro přípravu embryí požadovaného genetického původu využívány postupy, které jsou používány pro přípravu experimentálních embryí z oocytů běžné populace jatečných krav, a které jsou založeny na standardních metodách zrání a oplození oocytů. Tyto metody jsou pro přípravu embryí od geneticky cenných rodičů méně účinné s relativně nízkou pravděpodobností zisku přenosuschopných nebo zmrazitelných embryí.

Navržená inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu cestou modifikace metod zrání a oplození přináší možnost, jak zefektivnit produkci geneticky cenných embryí využitelných pro embryotransfer nebo kryokonzervaci průměrně na 20-25 %, která je v současné době dosahována v laboratořích IVF při produkci embryí pro experimentální účely.

V. Popis uplatnění certifikované metodiky

Navržená metoda produkce embryí požadovaného genomu odpovídá současným potřebám chovatelů i strategickým cílům chovatelských svazů, poněvadž získání kvalitního potomstva v co možná nejkratším časovém horizontu je především v chovech dojeného skotu významným chovatelským i ekonomickým přínosem.

Metodika je určena specializovaným laboratořím, které jsou oprávněny k produkci a přenosu IVP embryí od geneticky cenných zvířat, subjektům poskytujícím chovatelům služby v oblasti reprodukce a šlechtění skotu a současně i špičkovým chovatelům, kteří mají reálné předpoklady využívat nové metody reprodukčních biotechnologií pro své šlechtitelské záměry. Metodika může najít své uplatnění také u komerčních subjektů zajišťujících chovatelům služby v oblasti inseminace, poněvadž umožňuje objektivně hodnotit fertilizační schopnost sexovaných i nesexovaných spermií za standardních podmínek kapacity a oplození a testovat kvalitu inseminačních dávek plemenných býků před jejich použitím v inseminaci.

VI. Ekonomické aspekty metodiky

Produkce embryí skotu požadovaného genomu v systému *in vitro* pomocí modifikovaných metod zrání a oplození oocytů nevyžaduje ve srovnání se standardními metodami produkce experimentálních embryí další finanční náklady. Umožňuje využít běžné vybavení laboratoří IVF, včetně přístrojů, syntetických médií a kultivačních plastů. Hlavním

ekonomickým přínosem inovace metod produkce geneticky cenných embryí je především přínos pro chovatele, poněvadž vyšší počet embryí vyprodukovaných od požadovaných rodičů zvyšuje počet potomků narozených po ET a přispívá k rychlejšímu dosažení očekávaného genetického zisku. Současně snižuje finanční náklady na produkovaná embrya i odchované potomstvo, především v případě produkce embryí predikovaného pohlaví ze sexovaných spermií. Zvýšení pravděpodobnosti zisku IVP embryí požadovaného pohlaví z nesexovaného spermatu je ekonomicky výhodné u býků s velmi nízkou plodností sexovaných spermií.

Konkrétní ekonomický přínos inovace metodických postupů bude závislý na plemenné hodnotě rodičů a na intenzitě využívání metod reprodukčních biotechnologií chovateli.

VII. Seznam použité související literatury

JESETA, M., CTVRTLÍKOVÁ-KNITLOVÁ, D., HANZALOVÁ, K., HULINSKÁ, P., MILAKOVIC, I., NEMCOVÁ, L., KANKA, J., MACHATKOVÁ, M. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic, competence related to their in vitro maturation. *Reprod Dom Anim* 2014;49:469–475.

KADARMIDEEN, N., MAZZONI, G., WATANABE, Y., SRTOBECH, L., BARUSELLI, P., MEIRELLES, F., CALLESEN, H., HYTTEL, P., FERRAZ, J., NOGUEIRA, M. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Anim Reprod* 2015;12(3):389–396.

KATSKA, L., SMORAG, Z. Bull effect on in vitro embryo production in cattle. *J Physiol Pharmac* 1996;47(1):71–78.

KNITLOVÁ, D., HULINSKÁ, P., JESETA, M., HANZALOVÁ, K., KEMPISTY, B., MACHATKOVÁ, M. Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* 2017;102:16–22.

MACHATKOVÁ, M., JESETA, M., HULINSKÁ, P., KNITLOVÁ, D., NEMCOVÁ, L., KANKA, J. Characteristics of bovine oocytes with different meiotic competence in terms of their mitochondrial status and expression of nuclear-encoded factors. *Reprod Dom Anim* 2012, 47(5):806–814.

MOLNAROVÁ, Z., MACHATKOVÁ, M., MACHAL, L., HORAKOVÁ, J., HANZALOVÁ, K. A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their in vitro fertilizing ability. *Zygote* 2006;14(1):63–69.

SIRARD, M. A. Review: 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* 2018;156:1–7.

ZHANG, B., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., RODRIQUEZ-MARTINES, H. Relationship between embryo development in vitro and 56-day non-return rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology* 1997;48:221–231.

VIII. Seznam publikací předcházející metodice

TRAVNICKOVA, I., HULINSKA, P., KUBICKOVA, S., HANZALOVA, K., KEMPISTY, B., NEMCOVA, L., MACHATKOVA, M. Production of sexed bovine embryos in vitro can be improved by selection of sperm treatment and co-culture system. *Reprod Dom Anim* 2021;56:864–871.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro. Certifikovaná metodika SVS/2018/141169-G, 2018, s. 10, ISBN 978-80-88233-32-9.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Metoda fertilizace oocytů sexovanými spermii plemenných býků in vitro. Certifikovaná metodika SVS/2017/142514-G, 2017, s. 12, ISBN 978-80-86895-12-3.

M. MACHATKOVÁ, M. JEŠETA, D. ČTVRTLÍKOVÁ-KNITLOVÁ, K. HANZALOVÁ. Diferencované zrání bovinních oocytů využitelných pro reprodukční biotechnologie. Certifikovaná metodika SVS/2013/054311-G, 2013, s. 9, ISBN 978-80-86895-32-1.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, M. JEŠETA, K. HANZALOVÁ, Z. REČKOVÁ. Příprava kryotolerantních embryí skotu in vitro. Certifikovaná metodika SVS 19/2009, 2009a, s. 11, ISBN 80-86895-10-6.

M. MACHATKOVÁ, M. JEŠETA, P. HULÍNSKÁ, Z. REČKOVÁ, K. HANZALOVÁ. Predikce fertility býků in vitro pomocí penetračního testu. Certifikovaná metodika SVS 18/2009b, 2009, s. 8, ISBN 80-86895-09-2.

IX. Dedikace

Metodika vznikla na základě poznatků získaných v rámci řešení projektu MZE-RO 0521-VZ014, který je součástí DKRVO.

X. Jména oponentů

MVDr. Miroslava Lutzová
Ústřední veterinární správa
SVS
Slezská 100/7
120 56 Praha 2

Prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Zemědělská 1665/1
613 00 Brno

XI. Podíl práce

Ing. Marie Machatková, CSc. - 45 %
Ing. Ivona Trávníčková - 25 %
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D. - 25 %
Mgr. Kateřina Hanzalová - 5 %

VU^{Ve}L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz