

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Biotechnické metody v reprodukci samic lam a velbloudů

Bakalářská práce

Autor práce: Vít Smejkal

Obor studia: ABPS

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

© 2016/17 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Biotechnické metody v reprodukci samic lam a velbloudů " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2017

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Jirímu Šichtařovi, Ph.D. za odborné vedení při psaní bakalářské práce, za cenné rady a také ochotu a čas, který mi věnoval. Děkuji Vám.

Biotechnické metody v reprodukci samic lam a velbloudů

Souhrn

Tato práce shrnuje poznatky o biotechnických metodách v reprodukci samic lam a velbloudů. Ultrasonografie je jednou z těchto metod, která se využívá k zmapování tkání zcela bez použití chirurgie. Provádí se dvěma způsoby. Účinnost transrektální metody je velice vysoká a dosahuje až 91% přesnosti měření. Druhým způsobem je transkutánní metoda, která je méně účinná, neboť ultrasonografické vlny musí prostupovat skrz dutinu břišní. Druhou nejvíce využívanou technikou je inseminace. Jedná se o nejúčinnější biotechnickou metodu v reprodukci, nejvíce využívanou při selektivní genetice a zvýšení produkce zvířat. Inseminační dávka, která se při této technice využívá, se vyskytuje ve třech variantách. Čerstvá dávka, chlazená dávka a mražená s procentem zabřeznutí u lam v průměru 50%, 45% a 40%, u velbloudů 40%, 30%, 10%. Výhodami inseminace jsou: finanční úspora, zjednodušení páření a zamezení zdravotních rizik. Nevýhodami jsou: narušení instinktu reprodukce a menší procento zabřezávání při nekvalitním provedení. Při další metodě, jež je embryo transfer, dochází k výplachu embryí od dárkyně do příjemkyně. Při této technice se velice často využívá superovulace za pomoci hormonálních stimulantů. Samotný odběr probíhá tak, že je katetr veden skrz děložní krček do dělohy, kde probíhá výplach embryí. Čerstvá embrya určená k přenosu se ukládají do pejet a ty se následně použijí v transferové zbrani a deponují se do příjemkyně. Embrya určená ke kryokonzervaci je možné zamrazit dvěma způsoby. Vitifikací, kde se následné procento zabřezávání u lam pohybuje okolo 45 % a pomalým zmrazováním s 33% zabřezáváním. Avšak u velbloudů je kvůli zmrazování embryí procento zabřezávání ještě nižší, dosahující okolo 10 %. Bylo zjištěno, že lepší je stále metoda pomalého zmrazování. V poslední části bakalářské práce je popsána produkce embryí in vitro. Jedná se o biotechnickou metodu, při níž může docházet k hormonální indukci ovulace nebo superovulace, odebírání oocytů, fertilizaci oocytů a vývoji embryí v in vitro podmínkách. U lam je úspěšnost při vývoji embryí taková, že v průměru 25 % zygot se dostane do fáze moruly a 12 % do fáze blastocysty. U velbloudů se dostane 14-21 % zygot do fáze blastocysty. Tato metoda je sice nejméně využívaná v reprodukční praxi, avšak má největší potenciál u celé čeledi velbloudovitých.

Klíčová slova: lama, velbloud, biotechnologie, reprodukce, ultrasonografie

Biotechnical methods of reproduction of female llamas and camels

Summary

This work summarizes the knowledge about biotechnical methods in the reproduction of female llamas and camels. The ultrasonography is one of the methods used to map tissues completely without use of the surgery. It is done in the two ways. The efficiency of the transrectal method is very high and reaches up to 91% of the accuracy of the measurement. The second way is a transcutaneous method which is less effective, because the ultrasonographic waves must penetrate through the abdominal cavity. The second most used technique is the insemination. It is the most effective biotechnical method used in the reproduction, mostly used in the selective genetics and animal husbandry. The insemination dose utilized in this technique can be used in three variants. Fresh dose, chilled dose and frozen dose with the percentage of successful gestation on average 50%, 45% and 40% for llamas, 40%, 30%, and 10% for camels. The benefits of the insemination includes: financial savings, mating simplification and prevention of health risks. The disadvantages are: disturbance of the reproduction instinct and a smaller percentage of the successful gestation if the procedure is carried out poorly. Another method, which is embryo transfer, utilizes washing the embryos from the donor to the recipient. The superovulation with hormonal stimulants is often used in this technique. The sampling is done by passing the catheter through the cervix into the uterus where the embryo is being flushed. The fresh embryos for transfer are stored in a pejets. These are then used in the transfer weapon and are deposited in the recipient. The embryos for cryopreservation can be frozen in two ways. The one way is the vitrification, where the percentage of the successful gestation for llamas is about 45% and slow freezing with a 33% percentage of successful gestation. However, for camels, the successful gestation rate is even lower, reaching about 10% because of the embryo freezing. It has been found that the slow freezing method is still better. The last part of the bachelor thesis describes the production of embryos in vitro. It is a biotechnical method, which can utilize hormonal induction of the ovulation or superovulation, oocyte extraction, oocyte fertilization, and embryo development at in vitro conditions. On average 25% of the zygotes will enter the morula phase and 12% of the zygotes will enter the blastocyst phase within the embryo development for llamas. For camels, 14-21% of the zygote enters the blastocyst phase. Although this method is the least used one in reproductive practice, it has the greatest potential in the entire Camelidae family.

Keywords: llama, camel, biotechnology, reproduction, ultrasonography

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Biotechnologie	1
1.2	Biotechnika	1
1.3	Velbloudovití	1
1.4	Historie Biotechnologie	2
1.5	Historie velbloudovitých	2
2	Cíl práce	4
3	Přehled literatury	4
3.1	Anatomie samičích pohlavních orgánů	4
3.2	Fyziologie reprodukce	6
3.2.1	Hormony samičí pohlavní soustavy.....	6
3.2.2	Pohlavní cyklus lamy	7
3.2.3	Pohlavní cyklus velblouda	9
3.2.3.1	Působení hormonů u velbloudů na samičí pohlavní soustavu	11
3.3	Biotechnika v reprodukci samic lam a velbloudů	12
3.3.1	Ultrasonografie	13
3.3.2	Inseminace	17
3.3.3	Embryo transfer	19
3.3.3.1	Výběr dárkyň a příjemkyň.....	21
3.3.3.2	Indukce superovulace.....	24
3.3.3.3	Proplachování dělohy.....	25
3.3.3.4	Přenos embryí do příjemkyně	27
3.3.3.5	Kryokonzervace embryí	27
3.3.3.6	Embryo transfer mezi různými druhy	28
3.3.4	In vitro fertilizace (IVF) a produkce embryí	29
3.3.4.1	Ovum pick up.....	29
3.3.4.2	Manipulace s oocyty	30
3.3.4.3	In vitro oplození	30
3.4	Závěr	32
4	Seznam literatury	33

1 Úvod

1.1 Biotechnologie

Biotechnologie je věda zabývající se empirickými metodami využívanými především k výrobě nebo modifikaci potravin denních komodit, anebo dokonce léčiv. Disciplíny, jež do biotechnologie spadají, se staly jedním z nejvíce inovativních řešení do budoucnosti, při řešení otázek nedostatku potravin a každodenních předmětů. Díky stále se zvyšujícímu porozumění buněčných procesů se výrobní kmeny stále více a více optimalizují a stávají se účinnějšími. S pomocí bio procesů se stávají chemikálie a léčiva stále silnějšími (Al-Kaidy et al., 2014).

1.2 Biotechnika

Jedná se o jedno z odvětví biotechnologie. Hovoří se o využívání zvířecích organismů, jejich vlastností a poznatků o nich, které se dále využívají v konstrukcích a při vývoji nových technických zařízení, sloužících ke zvýšení produktivity živočichů nebo ke zlepšení života pro zvířata (Al-Kaidy et al., 2014).

1.3 Velbloudovití

Velbloudovití (*Camelidae* Gray, 1821) patří do řádu sudokopytníci (*Artiodactyla* Owen, 1841), třídy savci (*Mammalia* Linnaeus, 1758) a kmenu strunatci (*Chordata* Bateson, 1885).

Jedná se o živočichy s dlouhýma, štíhlýma nohama a s velice specifickou chůzí, jež vypadá tak, že se přední i zadní končetina na jedné straně pohybují současně dopředu a dochází tak ke kymácivé chůzi. Velbloudovití se vyznačují malou hlavou s rozštěpeným horním pyskem, hustým kožichem, který velice dobře přes den izoluje chlad a v chladných nocích nebo ve vyšších nadmořských výškách naopak zatepluje. Velbloudovití se také liší od sudokopytníků tím, že svou tělesnou hmotnost nerozprostírají na celé kopyto, ale na dva prsty, které jsou ze spodu vybaveny polštářky. Na rozdíl od všech savců jsou velbloudovití jedinými savci, kteří mají oválné červené krvinky za účelem lepšího proudění krve při dehydrataci. Vztahy mezi jedinci určitých druhů jsou jasně určeny a většinou se jedná o jednoho samce a jeho harém samic. Do této čeledi řadíme 6 druhů. Velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius* Linnaeus, 1758), velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus ferus* Przewalski, 1883), guanako (*Lama guanicoe* Müller, 1776), lama krotká (*Lama guanicoe f. glama* Linnaeus, 1758), vikuňa (*Vicugna vicugna* Molina, 1782), alpaka (*Lama guanicoe f. pacos* Linnaeus, 1758) (Clutton-Brock, 2001).

1.4 Historie Biotechnologie

Historie biotechnologie sahá již do pre-genetické éry do 6000 let před naším letopočtem. Již 6000 let př. n. l. využívali obyvatelé Mezopotámské říše kvasné procesy. Další velký objev přišel roku 1663 objevením buňky Robertem Hookem. Následovalo roku 1865 formulování zákonů dědičnosti Gregorem Mendelem. Následováno objevem nukleových kyselin v jádře buňky panem Friedrichem Miescherem.

Těmito objevy skončila pre-genetická éra a posouváme se do éry genetické. Tato éra trvala od roku 1900 do 1970. Významné objevy v oblasti biotechnologie, k nimž v tomto období došlo, jsou například: 1910 objev chromozomů Thomasem Morganem, 1919 Karl Ereky definoval termín biotechnologie. V roce 1953 se Jamesovi Watsonovi a Francisovi Crickovi podařilo rozluštit molekulární strukturu DNA. V roce 1967 byl rozluštěn mechanismus genové exprese, což vedlo ke genetickému kódu (Khoran, Holley, Nirenberg).

Počátky moderní biotechnologie 1970-1980. V roce 1972 byly vytvořeny první molekuly rekombinantní DNA Paulem Bergem. Dále se v roce 1975 podařilo sekvencovat geny (Milstein, Kohler, Jerne). Téhož roku také započala produkce monoklonálních látek (Milstein, Kohler, Jerne). V roce 1976 vznikla první biotechnologická společnost s názvem Genentech, následována 1978 Biogenem, první biotechnologickou společností v Evropě.

V letech 1980-1990 došlo k období komercializace biotechnologií. 1982 byl vytvořen Humulín, první rDNA lék. Následovalo mnoho a mnoho nových léků například Recombivax, Intron, Erythropoetin.

Poslední éra je éra genomiky 1990- současnost. V roce 1990 se uskutečnilo první využití genové terapie u člověka. Následovalo první klonování, jehož výsledkem byla ovce Dolly v roce 1996. Téhož roku se také určila úplná sekvence genomu *E.coli*. V roce 2003 byla určena kompletní sekvence lidského genomu (Jaroslav Hořejší, 2006).

1.5 Historie velbloudovitých

Za předky velbloudovitých se považuje rod *Camelops* (*Camelops* Leidy, 1854) a to druhy *Camelops hesternus* Webb, 1965), *Camelops huerfanensis* Cragin, 1892), *Camelops kansanus* Leidy, 1854), *Camelops minidokae* Hay, 1927), *Camelops sulcatus* Wortman, 1898), *Camelops traviswhitei* Mooser & Dalquest, 1975). Jedinci tohoto druhu žili v období Pliocénu-Pleistocénu, tzn. 10 000 let př. n. l. (Baskin a Thomas, 2016; Johnson, 2014).

Rod *Camelidae* je velice rozmanitý z pohledu vyhynulých druhů. Jen velice málo zástupců se dožilo dnešní doby. Tito jedinci se dělí do podčeledi *Camelinae* (*Camelinae*, Gray, 1821) a dále se dělí na kmeny *Lamini* a *Camelini* (Honey et al., 1998). K dnešnímu dni se nám dochovaly čtyři druhy Nového světa Guanaco (*Lama guanicoe*), Vicuña (*Vicugna vicugna*) a z nich vzniklé poddruhy lama krotká (*Lama glama*) a alpaky (*Vicugna Pacos*) (Stanley et al, 1994). Dochovaly se také dva druhy Starého světa, kam patří velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*) a velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*) (Martini et al., 2015; Johnson, 2014).

2 Cíl práce

Cílem práce je vypracovat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o biotechnických metodách v reprodukci samic lam a velbloudů.

3 Přehled literatury

3.1 Anatomie samičích pohlavních orgánů

Vaječníky jsou párové žlázy, ve kterých se vyvíjejí vajíčka. Nacházejí se v dutině břišní za ledvinami. V této oblasti jsou zavěšené pomocí okruží (mesovarium). Mesovarium je součástí širokého závěsného vazů dělohy, který zahrnuje okruží vejcovodů (mesosalpinx) a vaz děložní (mesometrium). Epitelové buňky obklopují kolagenní vazivo, které se nazývá bělavý obal (tunica albuginea). Pod tímto obalem se nachází korová vrstva obsahující různě veliké folikuly. V centru je dřev, která se skládá z řídkého kolagenního vaziva, krevních a lymfatických cév a nervů (Reece, 2011).

U lam jsou tyto útvary nepravidelně kulovité, měřící v průměru 1,9 x 2 x 0,8 cm, zatímco u alpak jsou více kulaté, dosahující velikosti 1,6 × 1,1 × 1,1 cm (Whitehead, 2011; Aba, 2014). Dosahují hmotnosti od 1,9-2,4 g. V tomto ohledu jsou tyto samice velice podobné prasnicím. U velbloudů je tomu tak, že dosahují velikosti 3,54 x 2,58 x 7,66 cm. Hmotnost vaječníků dosahuje od 2-7,8 g (průměrně tedy 4,1 g) (El-Wishy, 1988). Velikost vaječníků se může lišit v závislosti na reprodukčním cyklu samice (Hjyasu, 2014).

Vejcovod je párová zvlněná trubice, tvořená kruhovou i podélnou hladkou svalovinou a vystlána sekrečními a řasinkovými buňkami. Epitel ve vejcovodech se skládá z jedné řasinkové vrstvy a neřasinkové vrstvy cylindrických buněk. U vaječníků se rozšiřuje a tvoří nálevku vejcovodu (infundibulum). Nálevka je opatřená třásněmi (fimbriemi), které usměrňují vajíčko při ovulaci (Reece, 2011).

U lam se vejcovody proplétají a vytvářejí srdčitý útvar. Měří v průměru 10,5-18,3 cm a u alpak je tomu 20,4 cm (Anderson et al., 2013).

Struktura vejcovodů u velbloudů je více podobná kravským vejcovodům. Vejcovody mají v průměru 0,1-0,2 cm, a jsou dlouhé 14-30 cm (Hjyasu, 2014).

Děloha se skládá z krčku a dvou děložních rohů. Je vystlána nežláznatými výběžky houbovitého tvaru, nazývanými se karunkuly. Obsahuje myometrium, což je střední svalová vrstva stěny děložní, složená z hladké svaloviny. Serózní povrch je pak tvořen pobřišnicí (perimetriem). (Reece, 2011).

Špičky děložních rohů u lam jsou tupé, zaoblené a dohromady tvoří písmeno Y. Levý roh je oproti pravému rohu trochu delší (Aba, 2014). Tělo dělohy je u alpaky asi 3 cm dlouhé, u lamy asi 3,5 cm. Oproti délce děložních rohů je tělo dělohy vcelku krátké (8 cm u alpaky, 8 až 15 cm u lamy) (Whitehead, 2011). Děložní čípek měří okolo 2-5 cm v délce a 2-4 cm v průměru. V děloze (děložním čípku) se nacházejí 2-3 nepravidelné spirálovité záhyby epitelových buněk (Sumar, 1996). Tyto záhyby udávají vzhled tří prstenců.

Děloha velbloudů je ve tvaru písmene T na rozdíl od běžněji se vyskytujícího tvaru Y. Levý roh je výrazněji delší (7,8cm) než pravý (5,9cm). Délka dělohy se pohybuje okolo 6,7 cm. Děložní čípek je velmi krátký (0,3 cm). Děložní čípek se skládá ze 4-5 řádků hřebenů epitelových buněk. Délka pochvy je okolo 32,2 cm. Zúžení dělohy (krček) je silné 0,0850 cm, což je více než u krav. Vagina je elastický orgán, načervenalé barvy, měřící 30-35 cm (Salari et al., 2011).

Za děložním čípkiem následuje pochva (vagina). Jedná se o reprodukční orgán, který spojuje vulvu a dělohu. Je vystlána sliznicí, která je krytá dlaždicovým epitelem bez žláz. Pochva přechází v poševní předsíň (vestibulum vaginae), končící vnějším vyústěním (Reece, 2011). Na ventrální straně pochvy se nachází uretrální oblast, kde na vrchu ústí močová trubice. Vymezení místa, kde končí a začíná vagina a vulva je dáno panenskou blánou, nebo jejími zbytky (Iijyasu, 2014). Externím genitálem pohlavní soustavy je vulva tvořená klitorisem (samičí rudimentální analog penisu, který je zakryt spodní částí vulvy a je tvořen topořivou tkání), stydkými pysky a stydkou štěrbinou (Anderson et al., 2013).

U lam měří pochva 15-16 cm u nedospělých samic, do 26 cm u dospělých samic (Whitehead, 2011). U alpak tomu je průměrně 13,4 cm (Aba, 2014). Pochva u velbloudů měří okolo 8 cm (Salari et al., 2011).

3.2 Fyziologie reprodukce

3.2.1 Hormony samičí pohlavní soustavy

Hypotalamo-hypofyzární systém, je systém, který je uložen na spodině třetí mozkové komory jako část mezimozku a je tvořen hypofýzou a hypotalamem (Vácha, 2004).

Adenohypofýza (přední lalok) je pravou endokrinní žlázou hypofýzy. Produkuje hormony bílkovinného charakteru. Každý z těchto hormonů je regulován určitým množstvím hormonů z hypotalamu (stimulace, liberiny), (tlumení, statiny). K hormonům, jež adenohypofýza produkuje, patří somatotropní růstový hormon (STH, somatotropin), který ovlivňuje růst organismu. Také sem patří folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Jedná se o hormony, které jsou produkovány v důsledku působení releasing hormonů z hypotalamu. Hormony následně putují do hypotalamo-hypofyzárního portálního krevního systému. Oba hormony spadají do kategorie glykoproteiny. FSH podporuje růst folikulů u samic před ovulací. LH vyvolává ovulaci. Prolaktin (PRL, luteotropní hormon) je další z hormonů předního laloku. Přípravuje mléčnou žlázu, tvorbu mléka a stimuluje růst alveolů. Dále také blokuje ovulaci a přerušuje menstruační cyklus během kojení (Vácha, 2004). Hladiny těchto hormonů jsou zvyšovány estrogény a snižovány progesteronem (Reece, 2011).

Neurohypofýza (zadní lalok) je levou endokrinní žlázou hypofýzy. Produkuje hormony, které jsou vylučovány přímo do krve. Patří sem oxytocin, který podněcuje na konci těhotenství stahy hladké svaloviny a napomáhá tak k rychlejšímu porodu. Jeho působením dochází také ke správnému vyprázdnění mléčných žláz a správnému kojení (Vácha, 2004).

Šišinka (epifyza) je nepárový výběžek třetí komory mezimozku. Produkuje hormon melatonin, který vzniká ze serotoninu. Tento hormon způsobuje správný vývoj ovarií, potlačuje pohlavní činnost. Dále je také velice potřebný zejména u lam a velbloudů, neboť se jedná o zvířata, která se rozmnožují sezónně, a tudíž působením tohoto hormonu se mění i intenzita působení pohlavních orgánů (Vácha, 2004).

V kůře nadledvin se také produkují pohlavní hormony. Ve vnější zrnité vrstvě se vytvářejí glukokortikoidy a mineralokortikoidy, ve vnitřní vrstvě hlavně androgeny, ale i další pohlavní hormony i glukokortikoidy (Vácha, 2004).

Ve vaječnicích se tvoří za pomoci působení hormonů vajíčka, dále vzniká Graafův folikul a tvoří se zde estrogeny. Jedná se o hormony, které se vyskytují v přírodní i syntetické formě. Do této skupiny patří steroidy, produkovány vaječníky, placentou a kůrou nadledvin. 17 β -estradiol a estron, jsou nejdůležitějšími estrogeny u samic. Funkcemi estrogenů jsou stimulovat buněčnou proliferaci a růst tkání, ve vztahu k reprodukci (růst žláz endometria, regulace sekrece LH nebo stimulace růstu cest mléčných žláz) (Vácha, 2004).

Graafův folikul následně praskne a na jizvě po prasknutí se vytvoří žluté tělísko. Žluté tělísko začne produkovat progesteron (P). Progesteron je velice podobný estrogeneru. Produkují ho žluté tělísko, placenta a kůra nadledvin. Progesteron velice často působí spolu s estrogeny, kdy estrogeny nabudí určité reakce. Funkcemi progesteronu jsou podpora růstu žláz endometria, stimulace sekreční aktivity, nebo bránění děložním stahům během březosti (Vácha, 2004).

V děloze se také vytváří další velice důležitý hormon. Pokud nedojde k zabřeznutí, vzniká prostaglandin F2 alfa (PGF2 α), který spouští luteolýzu (Vácha, 2004).

3.2.2 Pohlavní cyklus lamy

K zapouštění lam, když mají vyvinuté všechny potřebné pohlavní orgány (puberta), dochází v různých intervalech podle oblasti výskytu. Například v Austrálii dochází k prvnímu zapouštění již ve 12. měsíci věku zvířete. V USA nebo UK dochází k zapouštění až v 18. měsíci. Samice lam dospívají ve dvou letech, samci pak ve dvou a půl letech (Whitehead, 2011).

Estrální cyklus je odlišný od ostatních zemědělských zvířat tím, že se zde neprojevuje žádná cyklická sexualita. Stejně, jako u koní, je folikulární soustava lam zvlněná a růst folikulů je určen v intervalech. Avšak folikulární soustava je oproti ostatním sudokopytníkům s kratšími vlnami a s menšími váčky (Adams et al., 1990).

Součástí estrálního cyklu (11-22 dní) je vývoj více folikulů. Folikuly na vaječnicích se rozlišují do tří skupin. Primordiální (primární), obsahující pouze jeden oocyt s jednou vrstvou granulóznicích buněk. Rostoucí, vytvořený z primárního folikulu, obsahující jeden oocyt, dvě vrstvy granulóznicích buněk a zonu pellucidu, kterou prochází granulózní buňky. Třetí skupinou jsou měchýřkovité (Graafovy) folikuly, obsahující velice dobře viditelnou dutinu (antrum folliculi). Dále je složen z vnitřního a vnějšího obalu (theca folliculi externa a theca folliculy interna).

Běžné folikuly u lam dosahují většinou velikosti 5-12 mm (Hoops a Kauffold, 2013).

Estrální cyklus je rozdělen do několika fází. Fáze růstu, což je růst sekundárních a dominantních folikulů vlivem hormonů FSH a LH a následné zanikání recesivních. Dochází také k růstu děložní sliznice. Tato fáze trvá 5-9 dní. Následuje fáze zrání (vlastní říje), zde dochází k tvorbě žlutého tělíska a následné ovulaci 3-9 dní. Velikost dominantních folikulů se pohybuje okolo 7-16mm. Při této fázi je samice ochotná se pářit (Hoops a Kauffold, 2013).

Lamy vykazují sexuální chování tím, že samice lam, které jsou připravené na páření, si lehnou na hrudník na zhruba 60 vteřin. Samice, které nejsou připravené na páření, samce odhánějí a plivou (Whitehead, 2011). U mladých krav lam může docházet ke zmatení při prvním páření, kdy pořádně neví co dělat. V takových chvílích pak dochází k pozorování jiného páru pářících se lam.

K páření dochází vleže, kdy si samice lehne, samec přijde k ní. Předními končetinami samici uchopí a předřepne si za ni (skoro vleže) (Hoops a Kauffold, 2013).

K ovulaci dochází při stimulaci samcem (San-Martin et al., 1968). Pro mnoho krav v chovu, ale i v zajetí, je důležitá vokalizace samce a stimulování koitem samce. V této chvíli dochází k ovulaci (Hoops a Kauffold, 2013). Při ovulaci dochází ke zvyšování OIF, který byl podle nedávných studií identifikován jako nervový růstový faktor (beta nervu) (Kershaw-Young et al., 2012).

Ovulace u lam je proces, při kterém dochází k uvolňování vajíčka ze zralého folikulu. Pouze jedno vajíčko je vypuštěno z jednoho folikulu. Do ovulace se zapojuje luteinizační hormon. K ovulaci nedochází jako u ostatních druhů v důsledku působení estradiolu, ale jako reakce na podněty samce a teploty (Aba, 2014). U 95-98% samic dochází k oplození v levém děložním rohu (Bravo a Varela, 1993). Může dokonce dojít k narození dvojčat. I přesto, že jsou lamy uniparní zvířata (Hoops a Kauffold, 2013). Avšak živých dvojčat se narodí jen velice málo (Bravo et al., 2000).

V případě, že nedojde k ovulaci, nastává fáze regrese. K této fázi dochází, když nedojde k oplodnění. Žluté tělísko zaniká (luteolýza) a dochází k poklesu progesteronu a regresi děložní sliznice. Tato fáze trvá 3-9 dní. V případě nezabřeznutí je luteolýza kompletní po 9-10 dnech po páření. Luteolýza, se objeví jen tehdy, když dojde ke luteolytickým pulzům $PGF2\alpha$. Když se objeví funkční žluté tělísko v pravém vaječníku, je luteinizační fáze zpožděná. Avšak pokud není žluté tělísko v levém rohu, způsobí luteinizační fáze konec březosti i v pravém rohu.

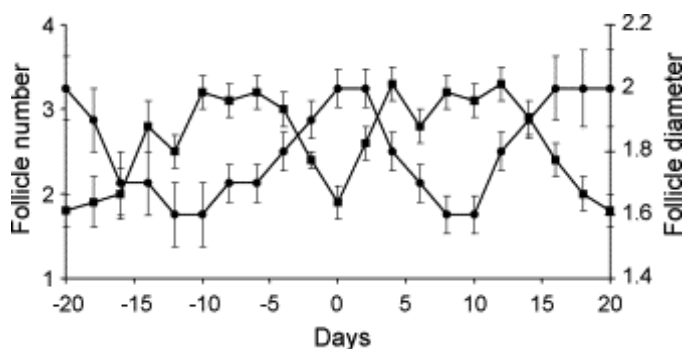
U lam však ihned po skončení (2-3) dny, někdy i hned v průběhu regresní fáze, dochází k novému estrálnímu cyklu (Bravo et al., 1990).

3.2.3 Pohlavní cyklus velblouda

Velbloudí samice dosahují pohlavní dospělosti ve 2-3 letech, avšak většina velbloudů se nechává připouštět až ve čtyřech letech (Beniwal a Chaudhry, 1984).

Chování a změna těla samic se projeví v důsledku estrogenního působení. U velbloudích samic začne docházet k neklidu, otoku vulvy, stání obkročmo a zvýšenému močení. V pochvě se objevuje poševní hlen a samice jsou více náklonné k samcům (Wilson, 1984). Toto období, kdy se tvoří větší množství estrogenu, trvá v rozmezí 1-21 dnů a lze ho pozorovat i několik dní po ovulaci. V důsledku vysoké variability a intenzity účinku estrogenu se dá velice obtížně určit říje (Skidmore, 2011). Podle studií Skidmore et al. (1995) došlo k tomuto objevu. Na jedné farmě byl přítomen samec společně se samicemi. Jedna samice začala projevovat silné pářící chování, začala roztahovat nohy a výrazně močit. Samec na druhé straně byl velice silně váben k samici, očichával ji a všude ji následoval. Po prozkoumání sonografem se následně ukázalo, že vaječníky dané samice neprokazují žádnou folikulární aktivitu. Častěji dochází k takovému jevu, že samec stojí opodál samice a nejeví žádný zájem o samici. Najednou si vybere určitou samici, kterou pronásleduje, až samice přistoupí na páření. Zde můžeme vidět, že příznaky říje jdou u tohoto druhu opravdu velmi obtížně určit. Nedá se zde se 100% jistotou určit podle chování, zda dochází k folikulární aktivitě, či nikoliv (Skidmore et. al., 1995).

Folikuly se vyvíjejí v krátkých časových intervalech. Můžeme říci, že dochází k „ovulačním vlnám“, kdy se folikuly tvoří a ihned v několika dnech zanikají. Průměrná délka životnosti folikulů se pohybuje okolo 20 dní. Tyto vlny se liší u každé velbloudí samice. Ovulační vlny mohou být rozděleny do 3 fází estrálního cyklu. Fáze růstu, fáze zrání a fáze regrese. Při fázi růstu dochází k tvorbě malých váčků, které dorůstají až 0,5-1 mm za den. Do té doby než mají velikost 1 cm. Poté se začne objevovat dominantní folikul (folikuly, viz. pohlavní cyklus lamy). Při růstu tohoto folikulu dochází k zanikání menších folikulů (recesivních). Tato fáze růstu trvá většinou 6-10 dní (Adams et al., 1990; Tibary a Anouassi, 1997). Dominantní folikuly obvykle dorůstají do velikosti 2 cm. Avšak až u 50 % velbloudů dochází k maximálnímu růstu 4,2 cm. K vytvoření dominantních a recesivních folikulů dochází v důsledku účinku folikuly stimulujícího hormonu, který se tvoří v hypofýze a pomalu dochází k jeho potlačování. Následně se začínají tvořit gonadotropní hormony, potřebné pro rozvoj folikulů. Při studii Tibary a Anouassi (1997) bylo potvrzeno, že počet folikulů je zvýšen při stejné vlně a velikost všech folikulů dosahuje až 1 cm i po zvýšené imunizaci samice.



Obr. 1

Inverzní vztah mezi průměrným počtem folikulů detekovaných a průměrem největšího folikulu detekovaného. Kdy den 0 je den, kdy dominantní folikul dosáhl největšího maximálního průměru (Skidmore et al., 1995).

Druhá fáze se nazývá fáze zrání. V této fázi dochází k samotné ovulaci. Případně když nedojde k zabřeznutí, nastává fáze regrese folikulů. Tato fáze zrání trvá průměrně 10 dnů (Skidmore et al., 1995). K ovulaci nedochází u příliš velikých folikulů. Je prokázáno histologickými poznatky, že rostoucí folikuly jsou vybaveny 1-2cm vrstvou theca interna. U příliš velkých folikulů, větších než 3 cm, jsou granulované buňky redukovány a tím se ztenčuje i vrstva theca interna. Tato skutečnost následně vede ke snížené regulaci receptorů luteinizačního hormonu a to má pak za následek menší reakce na stimulaci ovulace.

U velbloudích samic chovaných společně se samcem dochází k připouštění, když je velikost folikulu již kolem 1,3 cm. Toto je nejlepší čas pro připouštění, neboť folikuly stále mohou dorůstat a je menší šance, že folikuly budou přerostlé (Skidmore et al., 1996a).

U takto chovaných samic je detekováno vymizení plně vyvinutých folikulů do 28-36 hodin. Poté dochází k regresi. V případě že nedojde k zabřeznutí, má žluté tělíčko velbloudů oproti ostatním sudokopytníkům vcelku krátkou životnost (Skidmore et al., 1995).

Když se vyskytnou dobré podmínky pro páření, samec ihned začne očichávat samici a tlačit ji k zemi. V důsledku toho samice utíká a samec ji pronásleduje. Dojde tak často k vážným zraněním samice, když ji samec kouše do boku. Když je samice na zemi, samec ji obkročí a přidřepne si skoro k hrbu a pomalu sjíždí až k vulvě. Samice je většinou při páření velice neklidná a snaží se kousnout samce do krku (Yagil 2006). Velbloudi jsou stádová zvířata, tudíž nástup říje je ovlivněn přítomností samce ve stádě plném samic.

Období rozmnožování probíhá u velbloudů v chladnějších měsících, kdy jsou lepší pastevní podmínky. Z tohoto vyplývá, že velbloud se rozmnožuje pouze sezónně. K tomuto závěru je možné také dojít spočítáním telat narozených v tomto období. Sezóna páření, je tedy určena od prosince do března. V teplejších krajinách od listopadu do dubna (Chen a Yuen, 1979). Mimo páření, vaječníky přestávají konat svou funkci a stávají se tím neaktivní. Může však stále docházet k tvorbě omezeného počtu folikulů s nepravidelným uspořádáním (Musa a Abusineina, 1978). Na nástup říje má vliv teplota. Při horkých dnech mají samci snížené libido a nedochází tak k velkému množství oplození. Vlivem většího tepla dochází k větší úmrtnosti embryí. Dalšími faktory ovlivňujícími nástup říje jsou například: v jaké oblasti velbloudi žijí, zda u rovníku nebo na severu, dále množství potravy a množství srážek (Bono et al., 1989).

Když nedojde k páření nebo ke spuštění ovulace, dochází ke třetí fázi regrese. Tato fáze trvá průměrně 12 dní při menších folikulech a 15 dní při větších folikulech. Při regresi vzniká folikulární tekutina, ve které volně plavou vlákna fibrinu. Ta se začnou následně formovat do řetízků. Nicméně tyto velké folikuly nezasahují do růstu nových malých folikulů na tom samém vaječníku. Tudíž již při regresi dochází k startu růstu nových folikulů, i když staré folikuly pořád ještě nezmizely. K tomuto následujícímu růstu dochází už v 19. dni vlnového intervalu (Skidmore, 2011).

Činnost vaječnicků po porodu je taková, že v prvním týdnu po porodu dochází k regresi žlutého tělíska. Následně se však doba opětovného působení vaječnicků a opětovného folikulárního cyklu jedince od jedince liší. Faktory, jež ovlivňují poporodní neaktivitu (aneostrus), jsou nutriční stav samice a délka kojení mláďete. Podle studií Tibary (1997) vyšlo najevo, že při správném krmení velbloudů dochází u 70-80 % velbloudů k 30 denní době sexuální neaktivity. Obvyklá doba ve volné přírodě je 45 dní. Také samice, které ztratí potomka, se ke své sexuální aktivitě vrací po 10-12 dnech, avšak správné fungování, než se folikulární aktivita vrátí do správné funkce, může trvat až 8-10 měsíců.

Reprodukční účinnost velblouda je považována za velmi špatnou. V Tunisku je počet narozených živých mláďat velbloudů pouze 40% a úmrtnost v prvním roce dosahuje 17% (Djellouli a Saint-Martin, 1992).

3.2.3.1 Působení hormonů u velbloudů na samičí pohlavní soustavu.

Hladina luteinizačního hormonu se zvýší po 1 hodině, kdy dojde k páření na 3-19 ng/ml, následně pak dochází k ovulaci a koncentrace už jen klesá (Skidmore et al., 1996a).

Koncentrace estradiolu je vysoce variabilní u každého jedince a tak je velice obtížné určit množství působícího hormonu. Obecně platí, že zvýšení hladiny estradiolu se nachází v rozmezí 25 pg/ml až 39 pg/ml při velikosti folikulu 1,7 cm. Když folikuly přerostou 2 cm, ustálí se množství estradiolu kolem 25 pg/ml a toto množství přetrvává do následující vlny folikulů (Skidmore, 2011).

Dalším velice důležitým hormonem, který působí na pohlavní soustavu samic velbloudů, je progesteron. Hlavním zdrojem tvorby progesteronu je žluté tělísko. Když nedojde k ovulaci, hladina progesteronu zůstává velice nízká (1 ng/ml). Když dojde k ovulaci, tak i 3-4 dny zůstává tato hladina stále nízká. Poté se začne hladina rychle zvyšovat okolo 3 ng/ml/den. Po dosažení 10. dne, začne množství progesteronu prudce klesat. Dokud hodnota nedosáhne opět 1 ng/ml (Skidmore et al., 1996b).

Při působení ProstaglandinuF2 α dochází k luteolýze u velblouda. Studie (Skidmore et al., 1998) ukázala, že při tvorbě žlutého tělíska dochází ke zvýšení 13,14-dihydro-15-keto PGF2 α (PGFM), což je hlavní metabolit krve. Došlo tedy ke zvýšení koncentrace z 30 pg/ml na 59 pg/ml. Dvanáct dní po ovulaci došlo k jeho snížení opět na 3 pg/ml (Skidmore et al., 1998).

3.3 Biotechnika v reprodukci samic lam a velbloudů

V posledních desetiletích dochází ke kladení velkého důrazu na reprodukci a fyziologii u lam a alpak, díky rostoucím hodnotám a užitkovosti těchto zvířat. Reprodukční biotechnologie umožňuje šíření genetického kódu kvalitnějších jedinců. Cílem biotechnologie je mimo jiné poskytovat informace ohledně nejdůležitějších záležitostí týkajících se reprodukce lam. Těmito záležitostmi se rozumí folikulární synchronizace, superstimulace vaječnicků, obnova a přenos embryí, zrání oocytů, různé techniky asistované reprodukce (In vitro), přenášení jader a embryí a kryokonzervace (Miragaya et al., 2006).

Nejvíce využívanými metodami v biotechnice samic lam jsou umělé oplodnění a přenos embryí. Avšak zde dochází k problémům při správném načasování inseminace a ovulace. Studie by se měly zaměřit na kryokonzervaci. Když se podíváme na ostatní biotechnické metody, tak jsou u této čeledi velbloudovitých teprve na začátku svého vývoje. Například in vitro fertilizace je hlášena jen u několika případů. Je velice malé množství jatečných vaječnicků, což také

zpomaluje vývoj biotechniky. Řádným zkoumáním a dostatkem informací by mohly vzniknout nové biotechnické metody. Je třeba úplné zmapování genomu pro produkci in vitro, anebo dokonce klonování embryí (Purohit 1999).

3.3.1 Ultrasonografie

Je metoda, při níž dochází k vysokofrekvenčním zvukovým vlnám a tím dochází k zmapování tkání a určení březosti zcela bez použití chirurgických metod. Metoda nijak neškodí zkoumanému zvířeti. Tato metoda velice dobře slouží při zjištění, zda dané zvíře netrpí predispozicemi k vrozeným nebo získaným vadám a je ideální pro chov (Petelíková, 1995; DesCôteaux et al., 2009).

Ultrasonografie hraje velice důležitou roli při gynekologickém vyšetření lam. Toto vyšetření může být provedeno několika způsoby. Transrektálně a transkutánně na levém nebo pravém boku. Transrektální ultrasonografie se provádí obzvláště opatrně, neboť může dojít ke zranění rekta. Nejpřesnější diagnózu využitím této metody skrz rektum dostáváme v období 20. dne ode dne zabřeznutí. Při využití metody transkutánně se nejpřesnější výsledky dostávají po 50.-60. dnu po zabřeznutí při levém boku a po 90. dni při pravém boku. Ultrasonografie se využívá ke zjištění březosti u samic, ale také tehdy, když je nutné prozkoumat vaječníky a celou dělohu (Hoops et al., 2013).

Transrektální ultrasonografie velbloudů se podobně jako u lam užívá k určení březosti a určení stáří plodu. Sleduje se také, zda dochází k růstu, zrání, nebo regresi folikulů. Optimální doba pro páření velbloudů je určena velikostí rostoucích folikulů 0,9-1,9 cm v průměru (Abu-Seida, 2016). U velbloudů se transvaginální ultrazvuk používá pro sběr vajíček nebo jejich komplexů. Využívá se však i k určení stáří plodu a to nejlépe v 11. týdnu březosti, kdy je přesnost ultrasonografie až 91,7% (Ali et al, 2013). Mimo jiné je tato metoda velice prospěšným nástrojem pro porovnání březostních statistik u velbloudů, pro porovnání hluboké intrauterinní inseminace a inseminace v děložním čípku (Skidmore a Billah, 2006).

Před provedením určité biotechnické metody je nutné zjistit, zda samice cykluje. To se zjistí podle rozdílných útvarů na vaječnicích, jež jsou charakteristické pro určité období cyklu. Ultrazvuková sonda začne vysílat odrážené vlny, které se následně vrací k sondě a ty jsou následně zpracovány v sonografickém přístroji do konečného obrazu (Petelíková, 1995).

Výhodou ultrasonografie je podstatně včasnější zjištění výsledku inseminace nebo připouštění, než by tomu bylo u vyšetření palpací. Dalším pozitivem je snížení nákladů na krmné dny jalových zvířat. Nevýhodou je však vysoká cena potřebného vyšetření (Petelíková, 1995).

Pro správné vyšetření musí být lama fixována ve stojanu určeném pro tuto příležitost a je přidržována člověkem jednou rukou za hrud' a druhou v místě ramenního kloubu. Při takovémto zafixování jsou lamy tolerantnějšími a vyšetření zvládají v klidu. Lama se dá zafixovat taky pomocí zdi, kdy se lama přitiskne ke zdi a provádí se vyšetření. Zde je však nebezpečí, že se lama začne pohybovat a v takovém případě musí dojít k okamžitému ukončení ultrasonografie. Po správné fixaci je na řadě provozovatel měření s ultrazvukovou sondou. Ta může být vedena ručně nebo za pomoci vodící lišty, která je vyrobená z kovu nebo plastu. Tyto lišty je možno koupit nebo se dají vyrobit z tyčí a plastových trubek (Hoops et al., 2013).

Před vložením sondy do zvířete musíme zajistit odstranění výkalů z rekta a jeho následné umytí. Pro lepší měření by mělo být použito mazivo, například stříknutím 50 ml gelu do konečníku (Hoops et al., 2013).



Obr. 2

Sonda s vyrobenou lištou (Hoops et al., 2013).

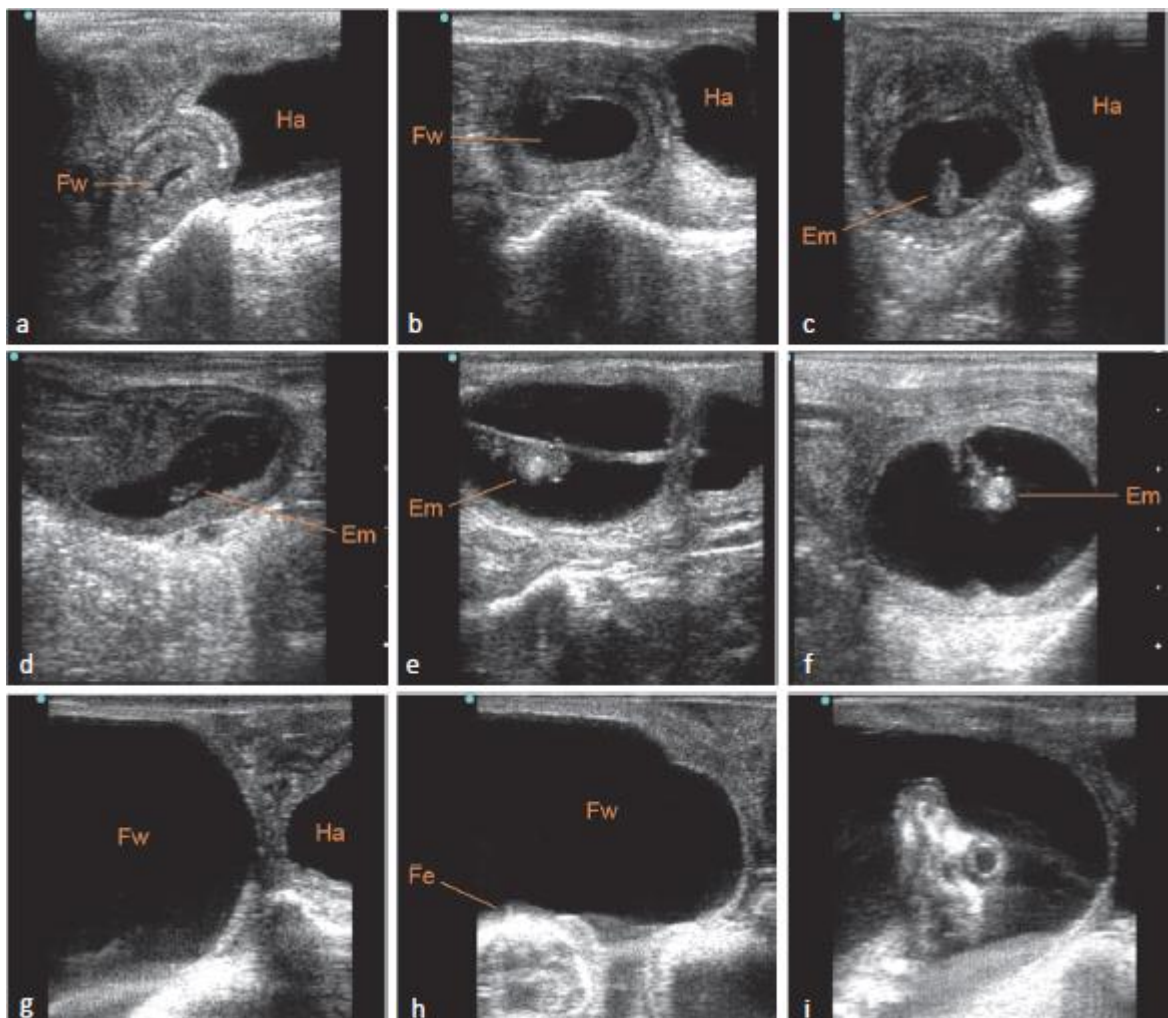
Po správném zafixování lamy dochází k samotné aplikaci ultrasonografické metody.

Nejdříve se musí řádně vyčistit rektum (otřít hadrem od výkalů a vydezinfikovat). Následně dojde k upevnění ocasu k hřbetu, aby nepřekážel při zkoumání. Provozovatel ultrasonografie si nasadí chirurgické rukavice a nageluje si ruku, kterou bude vstupovat do rekta samice. Do ruky si chytí sondu a následnými jemnými a točivými pohyby začne pronikat skrz rektum. Je dobré naklánět sondu všemi směry, aby došlo k úplnému zaznamenání dvojrozměrného obrazu (Grygar a Kudláč, 1997).

Po vložení sondy se nejprve najde na obrazovce sonografu močový měchýř zvířete (Diaz et al., 2007), který se jeví jako velká černá skvrna. Od močového měchýře se pomalu postupuje dále,

dokud se nenarazí na dělohu. Ta leží hned vedle močového měchýře. Na začátku luteální fáze se děloha zdá být homogenní (světle šedá) (Adams et al., 1989). Děložní čípek se pak najde tak, že se na sonografu objeví 3 příčné nosníky, které představují čípek. Ty jsou na začátku luteální fáze velice dobře viditelné (Del Campo et al., 1995). Následně se důkladně vyšetří celá děloha, zda se zde nenachází žádné anomálie a nechtěné útvary. Pro správné nalezení vaječníků je zapotřebí postupovat systematicky a velice pomalu. Rotací sondou zleva doprava se hledají vaječníky, ty by měly být veliké 2x1x1 cm.

Je zde také riziko záměny folikulů s cévami, a aby k takovéto záměně nedošlo, musí provozovatel ultrasonografie změnit a natočit sondu jinak, aby se dal dobře rozlišit tvar vejčitých útvarů od podlouhlých cév (Reyna, 2008). Není-li možné nalézt útvary, pohybuje se sondou ven a zase zpět dovnitř. Při správné aplikaci sondy a měření by se měly na sonografu objevit určité útvary (Diaz et.al., 2007).



Obr. 3

Transrektální diagnostika ukazující dělohu lamy v několika fázích těhotenství, podle dnů. 15(a), 20 (b), 30 (c), 36 (d), 39 (e), 46 (f), 70 (g), 118 (h) a 130 (i). FW= embryonální tekutina, EM= embryo, FE= plod, HA= močový měchýř (Hoops et al., 2013).

Velbloudovi se při transrektální ultrasonografii připne ocas na stranu a důkladně se očistí rektální oblast. Velblouda je také dobré přidržovat, aby nedošlo k nechtěným pohybům a znemožnění měření (Hoops et al., 2013). Samotné měření probíhá tak, že je zvířeti v ležící poloze za pomoci vodící lišty zaveden snímač skrze vulvu až do kraniální oblasti vagíny.

Při transkutánní metodě se bok lamy namaže látkou (gelem), která umožňuje jednodušší měření a následně se přiloží snímač. Doporučuje se vystříhání místa měření.

Tato metoda je však méně přesná, kvůli ultrasonografickým vlnám, které putují skrz dutinu břišní (Hoops et al., 2013). U velbloudů jsou transkutánní snímky většinou získávány tak, že se zkoumá kaudální část levého břicha (u základu vemene) (Abu-Seida, 2016).

V jedné studii Bourke et al. (1992) byl použit ultrazvukový snímač k pozorování změn vaječnicků a dělohy spojené s vývojem folikulů a jejich regresi u nestimulovaných samic lam. Dominantní folikuly dosahovaly velikostí 9-13 mm na obou vaječnicích. Ovulace byla vyvolána pářením u 80 % jedinců, a když se k tomu podal i choriový gonadotropin, tak se hodnota zvýšila až na 90 %. Zkrátila se také doba ovulace. Životnost žlutého tělíska čítala okolo 11 dní a následně docházelo k regresi za pomoci prostaglandinu.

V jiné studii You et al. (2013) bylo provedeno měření v sedmém dni po páření. Ultrasonografické obrázky byly pořízeny B-mode skenerem (HONDA, HS-1500, Japonsko). Tento přístroj byl dále připojen k 10 MHz sondě. Se sondou bylo manipulováno zvenčí za pomoci polyethylenové trubky (35 cm). Celý přenosný aparát byl zvlhčen lubrikantem. Snímky byly u každé lamy pořízeny do 1-2 minut. Diagnostika březosti byla určena v několika intervalech 7-10 dnů, 12-15 dnů, 17-20 dnů, 30-40 dnů a 50-60 dnů po páření. Tato měření probíhala celý jeden rok a poté se vzala v potaz všechna narozená telata. Takto se získala data, která jsou velice potřebná pro lepší pochopení a efektivnější využití umělého oplodnění u lam (You et al., 2013).

3.3.2 Inseminace

Jedná se v reprodukci o nejúčinnější biotechnickou metodu. Nejvíce se využívá pro selektivní genetiku za účelem vylepšení a zvýšení produkce zvířat.

Umělé oplodnění je velice důležitým procesem při zachování a rozšiřování genetické rozmanitosti u ohrožených druhů zvířat. Využití této biotechniky u velbloudovitých má veliký potenciál, neboť domestikovaných velbloudů a lam je stále více, což poskytuje dobré příležitosti pro výzkum a lepší vývoj této techniky (Adams et al., 2009).

Podle studií Deen (2008) je umělé oplodnění u velbloudů méně efektivní než přirozené oplození, tudíž se moc nevyužívá.

První zprávy o využití umělého oplodnění u lam se objevily již před 40 lety (Fernández-Baca et al., 1968). Avšak i po takovéto době je jeho vývoj u velbloudovitých teprve na začátku a výzkum probíhá velice pomalu. Je tomu tak především díky samčímu spermatu, kdy dochází k nezdařeným odběrům, špatným manipulacím a zmrazováním pohlavních buněk (Adams et al., 2009).

Existují tři typy a dvě varianty inseminačních dávek. Prvním typem je dávka čerstvá, kde se procento zabřezávání pohybuje okolo 50 % u lam (Bravo et al., 2013) a 40 % u velbloudů (Deen et al., 2003). Druhým typem jsou chlazené dávky, s procentem zabřezávání 45 % u lam (Bravo et al., 2013) a 30 % u velbloudů (Deen et al., 2003) a třetím typem jsou dávky mražené, s procentuálním zastoupením zabřeznutí 40 % (Bravo et al., 2013) u lam a 10 % u velbloudů (Deen et al., 2003). První variantou jsou pejety. Jedná se o malé trubičky, u kterých se v jejich dutinách uchovává sperma o objemu 0,25 – 0,5 cm³. Druhou variantou jsou pelety, což je sperma, které je uloženo v podobě kuličky o objemu 0,1 cm³.

Za pomoci ultrasonografie se nejprve zjistí aktivita vaječníků a teprve poté, pokud není ovulace přítomna, se indukuje za pomoci GnRH nebo hCG, když je velikost folikulů okolo 13-18 mm. Sperma se ukládá do dělohy většinou do 24 hodin po ovulaci. Procento zabřeznutí závisí na počtu uložených spermií a na metodě udržení životnosti spermií. Umělé oplození probíhá v levém děložním rohu a březost se dá za pomoci ultrasonografie zjistit již po 18 dnech. Také se dá zjistit pomocí rektální palpce, ale až po delší době (Monaco et al., 2015).

Při umělém oplodnění u lam je velice důležité správně zafixovat zvíře. Nejprve by se však mělo opravdu zjistit, zda je zvíře skutečně v říji. Pokud ano, je vše v pořádku. Kráva by se měla

odvézt do známého prostředí, aby nedošlo ke zbytečným stresovým situacím. Totéž platí i o izolaci od samců. Aby nedocházelo ke vzrušení samic. Kráva by měla být fixovaná ve stojanu, s ocasem připnutým ke hřbetu. Inseminační pomůcky by měly být udržovány suché a vždy sterilní. Inseminační dávky by taktéž měly být uloženy v chladících sterilních boxech. Jakmile je inseminační aparát připraven, nesmí dojít k jeho kontaminaci nebo zmrznutí. Pomůcky k nagelování rekta by neměly přijít do kontaktu s vulvou. Vulva musí být čistá a utřená čistým ručníkem. Tímto se zabrání případné kontaminaci a infekci. Následně se do spodní části vulvy vloží papírový ručník a může již dojít k vložení inseminační pejety do vulvy, aniž by došlo ke kontaktu s vulvou. Mohou se využívat také ochranné obaly. Při této metodě je pejeta obalená v plastovém obalu. Aparát je následně veden skrz děložní krček až do děložních rohů. Avšak nutnost využití ochranných obalů by měla být vždy zkontrolována s veterinárním lékařem (O'Connor a Peters, 2003).

Posouvání pejety skrz vulvu by mělo být pod úhlem 30 – 40 °, aby nedošlo k vniknutí do močového měchýře. Pro lepší vniknutí skrz děložní krček se doporučuje pohybovat aparátem dopředu a zpět. Následuje nejtěžší část celého umělého oplodnění a tou je uložení semene na správné místo. Uvolnění spermatu by mělo být na konci děložního krčku a začátku dělohy. Při vypouštění semene by se mělo dávat pozor, aby prsty nepřekážely toku inseminační dávky.

K vytažení celého aparátu by mělo docházet pomalu a po úplném vyprázdnění pejety. Když se kráva začne během inseminace pohybovat, je nutné okamžitě celý proces přerušit (O'Connor a Peters, 2003).

Výhodami umělé inseminace jsou:

- Finanční úspora (není potřeba dovážet samce, stačí jen nakoupit inseminační dávky).
- Zamezení zdravotních rizik (pohlavních nemocí a jiných rizik).
- Zlepšení genetických vlastností a predispozic.
- Zjednodušení páření (když samice odmítá samce).

Nevýhodami jsou:

- Může dojít k narušení instinktu reprodukce a samice se následně nebude chtít sama rozmnožovat.
- Nedostatečná přesnost inseminátorů a tudíž menší procento zabřezávání.

Během let probíhalo mnoho pokusů s touto technikou na lamách a alpakách.

První pokus o umělé oplodnění u lam byl, když se elektro-ejakulací odebralo sperma od 2 vikuní a 4 pako-vikuní a následně se připustilo 42 samic alpak. Narodilo se pouze jedno jediné mládě (Fernandez-Baca a et al., 1968).

Druhým pokusem bylo odebrání spermatu od samců alpak a následné připuštění 96 samic alpak. Při tomto pokusu došlo k 25 % zabřeznutí (Calderón et al., 1968).

Třetím pokusem pak bylo sebrání samčího semene elektro-ejakulací od vikuní a následné připuštění 83 samic alpak a 11 samic lam. Sperma bylo uloženo do děložních rohů a úspěšnost zabřeznutí dosahovala 31%. Pro samice indukované hCG bylo procento zabřeznutí ještě vyšší 48% (Leyva et al., 1979).

Absence údajů o porodnosti ve studiích provedených na lamách a alpakách je velice znepokojující a může odrážet problém týkající se způsobu a načasování indukované ovulace. Ve studii Ratto et al. (2005) byly lamy zkoumány ultrazvukem každé 4 hodiny. Interval od ovulace indukujícího stimulu (páření, LH, GnRH) až po ovulaci, byl v průměru 29,4 h. Tento interval se však nelišil od různých skupin samic. Pro správnou produkci gamet je zapotřebí systematické hodnocení vlivu spermatu (správná manipulace a načasování umělé inseminace) (Adams et al., 2009).

Výzkum v oblasti umělého oplodnění u jihoamerických velbloudovitých je velice pomalý, avšak v některých zemích je vidět veliký pokrok. V příštích letech se tato metoda velice dobře podepíše na genetickém vylepšení alpak i lam (Bravo et al., 2013).

K prvnímu zkřížení guanako a velblouda došlo za pomoci umělého oplodnění v Arabských Emirátech. Bylo využito spermatu od velblouda „Musehan“ a byla využita samice guanako „Smokey“. Mládě se narodilo roku 1998 a má vzezření velblouda i guanako. Nemá hrb, ale má krátké uši jako velbloud a na nohách má dva nehty jako guanako (Bravo et al., 2013).

3.3.3 Embryo transfer

Jedná se o metodu, při níž dochází k výplachu embryí od dárkyně do příjemkyně. Při této technice se velice často využívá superovulace za pomoci hormonálních stimulantů.

Přenos embryí umožňuje zvýšit počet potomků u vybraných jedinců a tím získat větší počet zvířat s lepší genetickou výbavou. (Picha et al., 2013)

Lamy ve srovnání s ostatními domácími zvířaty vykazují jedinečné reprodukční vlastnosti. Jedná se o indukované ovulátory, růst jejich folikulů je uskutečněn ve vlnách. Období březosti

trvá zhruba 340 dní. Ovulace se objevuje na obou vejcovodech, avšak embryo se implantuje v 95-98% do levého rohu. Byla dokázána také možná migrace z pravého rohu do levého, což vyúsťuje ve veliký počet mrtvých embryí (Vaughan et al., 2013).

Ve studii Sansinena et al. (2003) bylo zjištěno, že nukleární transfer může být úspěšně aplikován na produkci lamích embryí. Je však potřeba dalších výzkumů, aby se určily optimální parametry a vylepšila úspěšnost těchto transferů u tohoto druhu.

První zprávy o využití embryo transferu u alpak byly zaznamenány před 42 lety v Peru, kdy došlo k prvnímu sběru zygot z vejcovodů po páření. Po 3 dnech došlo k propláchnutí vejcovodů dělohy Ringerovým roztokem, avšak těsný svěrač, který je mezi vejcovody a dělohou neumožňoval průtok tekutiny. U 80 % ovulujících samic tedy muselo dojít k použití pipety skrz řez v děloze.

Ve Spojených Státech došlo v roce 1985 u první lamy k nechirurgickému zákroku pro sběr a přenos embryí (Wiepz a Chapman, 1985). V tomto pokusu došlo k synchronizaci a ovulaci u příjemce za pomoci GnRH a sběr a přenos vylíhnutých blastocytů byl proveden 7 dní po ošetření GnRH. Po přenosu dvou embryí do dvou samic došlo k narození jednoho mláděte (Sumar, 2013).

Embryo transfer u velbloudů byl zahájen s cílem reagovat na poptávku velbloudího průmyslu hlavně ve Spojených arabských emirátech roku 1990. Pro program embryo transferu se využívají dva systémy. Těmito systémy jsou ovulace se superstimulací, nebo bez ní. Množství zabřezlých samic se pohybovalo okolo 19 – 44 % do 60 dní po oplození. Hlavním úkolem rozvoje embryo transferu je zajistit přenos velkého množství embryí a vyhledat velice dobré dárce a příjemce s kvalitními oocyty a spermii (Anouassi et al., 2013). Většinou se počet vypláchnutých embryí pohybuje okolo 5,6 na jednu samici (Tinson a Singh, 1998).

Vzhledem ke složité fyziologii lam je velice náročná synchronizace vaječnicků dárkyň i příjemkyň, zotavení embryí a jejich přenos. V posledních letech však došlo k velikému převratu v biotechnologiích a přenos embryí se stal rutinní záležitostí. Úspěšnost přenosu dosahuje až 37 %. Z důvodu jejich velikosti a fáze vývoje bývají embrya ihned přenesena (Vaughan et al., 2013).

Jedním z faktorů, jež ovlivňují úspěšnost embryo transferu je kojení. U lam snižuje velikost dominantních folikulů, ale velikost žlutých tělísek se neliší. Je známo, že embrya dosáhnou děložní dutiny 6. den po ovulaci. Odběr by se měl tedy provádět 6-7 dní po ovulaci. Z těchto

znalostí můžeme usoudit, že informace o faktorech, které mají vliv na přenos embrya, jsou založeny na velice málo údajích (Vaughan et al., 2013).

Pomůcky pro odběr oocytů by podle Sumara (2013) měly být tyto:

1. Obousměrný Foleyův katetr (14-18 FR).
2. 6,2 in dlouhá jehla opatřená sponou, aby nevypadla z katetru.
3. Hygienický plastický sáček, aby se zabránilo možné kontaminaci při průchodu katetru skrz vulvu a pochvu.
4. 10ml injekční stříkačka se sterilní destilovanou vodou nebo fyziologickým roztokem, aby se naplnil balónek v katetru.
5. Filtr pro odběr embryí umístěný na odstupňovaném kontejneru. Kontejner umožňuje sběrači měřit množství spláchnutých objektů získaných z dělohy.
6. Ústí trubky pro splachování embryí. Zakoupené trubky by se měly vždy zkrátit na požadovanou délku, aby nedošlo ke ztrátě embryí.
7. Petriho misky, do kterých se ukládá obsah filtrů, a hledají se v nich embrya.
8. Pipety nebo stříkačky, kterými se oplachuje filtr za účelem spláchnutí všech embryí.

3.3.3.1 Výběr dárkyň a příjemkyň

Chovatelé by měli klást veliký důraz na to, aby docházelo k využívání pouze těch nejlepších jedinců. Náklady jsou totiž velmi vysoké, a tudíž je zde kladen obrovský důraz na co nejlepší potomstvo. Samice vybrané z celého dobrého stáda jako dárkyně, by měly být vysoce nadprůměrné. Měly by mít dobrou stavbu těla a být bez dědičných vad. Také by se měl brát zřetel na reprodukční fitness. Dárkyně jsou dále hodnoceny dle hmatu, ultrasonografie a vaginoskopie, aby nedošlo v pohlavní soustavě k nechtěnému zavlečení abnormalit.

Většinou je zapotřebí 2-3 příjemkyň na každou dárkyni. Příjemkyně by měly být v dobré kondici, ve stáří 2-8 let a bez reprodukčních poruch. Stejně podmínky jako pro dárkyně by měly platit i pro příjemkyně. Příjemkyně však mohou být vybrány i s nežádoucími dědičnými vadami. K tomu dochází tehdy, když je žádána například vícebarevná srst, modré oči, předkus atd. (Sumar, 2013). V nedávných studiích Sumar et al. (2010) bylo zjištěno, že se březost vyskytuje u nelaktujících samic o 26 % více než u samic v laktaci. Ideální příjemkyně by měla mít měkký děložní tonus, uzavřený děložní čípek, žádné výměšky ve vulvě a tělesnou kondici ohodnocenou lepší známkou než tři z pěti možných (Sumar, 2013).

Dárkyně

Dárkyně jsou vybírány podle toho, zda mají ovulaci pouze s jedním vajíčkem, nebo zda mají ovulaci s více vajíčky (superovulace).

První superovulace u lam byla dosažena u 8 samic alpak při užití 750 IU eCG a následného použití 1000 U hCG (choriový gonadotropin). Za užití laparotomie (svislý řez v podbřišku) bylo odebráno 56 embryí z vejcovodů. Z nich bylo použito 44 morulí pro 44 příjemkyň. V důsledku tohoto přenosu čtyři samice zabřezly a došlo k narození jednoho zdravého potomka (Sumar, 2013).

K tomu, aby se navodila ovulace s jedním vajíčkem, se používá 4 µg buserelinu (Receptal®) Aby se indukovala ovulace již existujících folikulů, používá se analog k GnRH. Takovýmito zvířatům se injekčně podá 200 µg kloprostenolu (Juramate®). Pro ovulaci s více vajíčky se používá stejná metoda i dávka s tím rozdílem, že se s kloprostenolem podá i 4 µg buserelinu a poté dvakrát denně po dobu 4 dnů FSH (Folltropin V®) (Sumar, 2013).



Obr. 4

Vaječníky lam s jedním vajíčkem (vlevo), vaječníky lam s více vajíčky (uprostřed a vpravo) (Sumar, 2013).

Pro zhodnocení dárkyň se využívají tato kritéria podle Vaughan et al. (2013):

- Počet žlutých tělísek určených k ovulaci
- Počet embryí získaných po výplachu dělohy
- Doba potřebná pro obnovení/procentuální obnova (celkový počet vypláchnutých embryí děleno celkovým počtem žlutých tělísek, vynásobeno 100x)
- Kvalita a stupeň vývoje embryí
- Velikost embryí

Příprava dárkyně na odběr embryí

Odběr se provádí u lamy dárkyně vleže. Lama může být pod sedativy, ale nemusí. V případě, že je pod sedativy, využívá se acepromatin (0,02-0,05 mg/kg). Používá se i lidokain (2% 1 ml/100kg tělesné hmotnosti). Při odběru embryí se ocas lamy obalí obvazem a pevně se připne sponou k jejímu hřbetu, aby se minimalizovala kontaminace celého procesu odběru. Pro ideální transrektální manipulaci by měl mít člověk obvod ruky menší nebo roven 20 cm. Musí být připraveny měkké latexové rukavice a dostatečné množství lubrikantu. Při zavádění ruky do konečníku je pro lepší průnik zapotřebí lehce otáčet s rukou. Odstraní se co největší množství výkalů a perineální oblast je vyčištěna mýdlem a vodou a následně pročištěna 70% ethanolem (Sumar, 2013). Příprava dárkyně velblouda na odběr embryí spočívá v tom, že se podává FSH v sestupných dávkách dvakrát denně po dobu 7 dnů. Po 14 dnech progesteronového ošetřování dochází k injekci prostaglandinu. Případně nutnosti se použijí sedativa. Při odběru se musí dbát zvýšené hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci oocytů (Tinson et al., 2000).

Příjemkyně

Pro synchronizaci ovulace u příjemkyň se používá 4 µg busorelinu mezi 1 dnem před nakrytím a 1 dnem po nakrytí, aby se indukovala ovulace a zformovalo žluté tělísko. Když dojde k předčasné nebo zpožděné ovulaci, řeší se tento problém podáváním různých léků. Čerstvě získaná embrya jsou vložena do 0,25 ml pejety a uložena do dělohy. Ukládá se do jedné hodiny po odběru od dárkyně. Embryo se umísťuje podle potřeby (vlevo nebo vpravo), do různé hloubky (mělce, středně, do rohů), podle obtížnosti přenosu (snadná, průměrná, těžká) a podle množství hlenu ve vulvě. Následně po 60 dnech dochází k testu březosti. A to pomocí

ultrazvuku nebo transrektálně. Měřítka úspěšnosti je pak vypočítáno jako počet živě narozených mláďat dělený počtem přenášených embryí, vynásobeno 100x (Vaughan et al., 2013).

Příprava příjemkyně na oplození

Využívá se podobných příprav jako u lamy dárkyně. Jsou zkoumány ultrazvukem a ovulace se vyvolává podáváním GnRH. Ideální je, když dárkyně a příjemkyně ovulují v rozmezí 1 dnu a méně. Za tímto účelem se minimalizují luteolitické účinky děložních zánětů, které vznikly v důsledku manipulace. Před embryo transferem se podává syntéza prostaglandinu a mohou se podávat i anestetika. Jako u dárkyně, tak i u příjemkyně je ocas svázan a připnut k hřbetu. Výkaly jsou odstraněny. Perianální oblast je vyčištěna. K transrektální ultrasonografii, zda byl přenos úspěšný, dochází 12-13 dní po navozeném páření (Adams a Domínguez, 2007; Sumar, 2013).

Příprava příjemkyně velblouda na příjem embryí spočívá v podáváním progestagenu po dobu 10 dní a následné podání 1500 I.U eCG (koňský chorionový gonadotropin), PG a 1300 I.U hCG. V roce 1998 bylo procento zabřeznutí 63 % (Tinson et al., 2000). Od roku 1990-2010 bylo přeneseno 11 477 embryí velbloudů. Výsledkem bylo 2858 odstavených telat, což představuje 27% účinnost embryo transferu u velbloudů (Anouassi et al., 2013).

3.3.3.2 Indukce superovulace

Superovulace je ovulace dosažená hormonálními stimulanty, čímž se získá více vajíček. Dosažení superovulace u lam se dá zjistit tím, že se změní koncentrace estradiolu v krvi. Podle studie Nikjou et al. (2008) se u velbloudů využívalo pro spuštění superovulace jak GnRH, tak progestogenové léčby. U velblouda dvouhrbého se například využívalo 20ug GnRH ve dnech nula a bylo podáváno po 18 dnech a další dávka po 4 dnech. Velbloudům, kterým byl podáván progestogen, také začali podávat ve dnech nula a podávali jej ve dnech 8 a 14. Při obou metodách však je zapotřebí, aby samice obdržely norgestomet implantáty a 200 g progesteronu. Implantáty následně musely být 14 dní po ošetření progestogenem odstraněny. Kombinace eCG a FSH se následně používala k vyvolání konečné superovulace. Po první injekci GnRH se začaly do 1-2 dnů objevovat zralé folikuly a nová vlna folikulů do 3-4 dnů. Rostoucí folikuly se po podání progestogenu přeměnily v atretické nebo trvalé folikuly. Avšak po spuštění superovulace nebyly téměř žádné rozdíly mezi těmito dvěma metodami (Nikjou et al., 2008).

Ratto et al., (2013) uvádí, že základem pro vyvolání superovulace lam je využití koňského gonadotropinu (eCG), folikulo-stimulujícího hormonu, nebo jejich kombinace. Hormon eCG se obvykle podává do svalů v dávce 500-1500 IU (Velásquez a Novoa, 1999). FSH, pocházející od prasat nebo ovcí se taktéž užívá intramuskulárně, ale v klesajících dávkách po dobu 4-5 dnů (Sansinema et al., 2007). Tyto superstimulanty jsou většinou doprovázeny GnRH nebo LH. Během několika posledních let dochází ke zkoumání superovulace lam a fyziologických stavů těchto samic. Těmito stavy rozumíme: sexuální receptivní fázi, běžnou luteální fázi a umělou luteální fázi (Ratto et al., 2013).

3.3.3.2.1 Sexuální receptivní fáze

Po pěti po sobě jdoucích sexuálních dnech dostávají lamy 20 mg pFSH minimálně 2x denně. Následuje podání 750 IU hCG k vyvolání ovulace (Ratto et al., 1997).

3.3.3.2.2 Luteální fáze

Samice, u kterých dosahuje velikost folikulů alespoň 9 mm v průměru, jsou léčeny GnRH nebo hCG. Po 7 dnech je podáváno 1000 IU eCG. V 9. den je podávána dávka prostaglandinu a dávka 750 IU hCG. Tak se docílí synchronní ovulace (Bourke et al., 1995).

3.3.3.2.3 Umělá luteální fáze

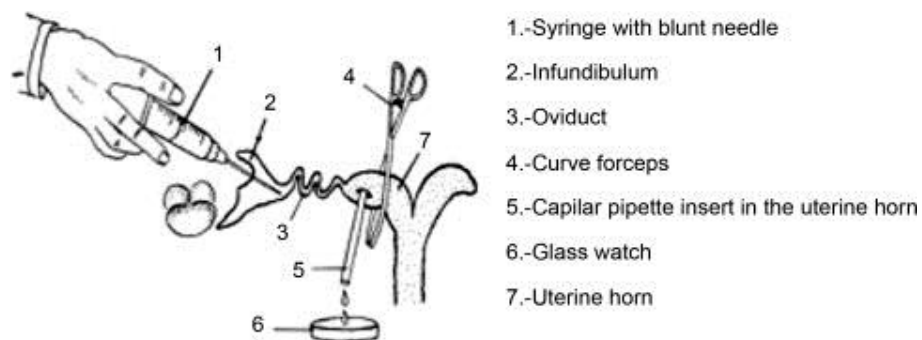
Napodobení luteální fáze probíhá tím způsobem, že se do vagíny samice vloží houbička napuštěná medroxyprogesteron acetátem. Dále jsou použity implantáty uvolňující hormony rovnou do těla (CIDR, Crestar). Superstimulace je dosaženo následným podáním 20 mg pFSH 2x denně po dobu 5 dní. Konečná ovulace pak je vyvolána podáním GnRH nebo hCG (Bourke et al., 1995).

3.3.3.3 Proplachování dělohy

S pomocí asistenta se rozevřou stydké pysky, aby vykonavatel proplachování mohl zavést katetr pro výplach. Katetr směřuje ke hřbetu pochvy. Poté dojde ke stáhnutí plastového obalu katetru zpět. Když katetr dosáhne vagíny, vykonavatel umístí ruku, již namazanou lubrikantem, do konečníku zvířete a vede katetr skrz děložní krček až do těla dělohy. Celá děloha se proplachuje najednou a nedochází k proplachování jednoho a následně druhého rohu. Jehla katetru je následně lehce stažena tak, že špička je kaudálně k balónku Foleyova katetru. Balónek se následně napustí do velikosti 5-10 ml destilovanou vodou. Poté se jehla odstraní z katetru a připojí se spojení ve tvaru Y, aby mohlo dojít k napojení vaku s teplým proplachovacím

médiem. Asistent při tomto úkonu napomáhá při řízení toku kapalin tím, že palcem svírá trubičku a reguluje tak tok. Musí se dbát veliké obezřetnosti, aby nedošlo k přeplnění dělohy. Děloha by se měla proplachovat v určitých intervalech, většinou 3x po 30 sekundách. Aby došlo k vypuzení tekutiny, zahrnuje každé propláchnutí masáž děložních rohů. Po třetím děložním výplachu dojde k vypuštění balónku a odstranění katetru a jeho obsah je následně vypuštěn do embryu filtru (Sumar, 2013). Pro správnou inkubaci embryí se u lam využívají propylen glykol a ethylen glykol. (Ratto a Adams, 2007).

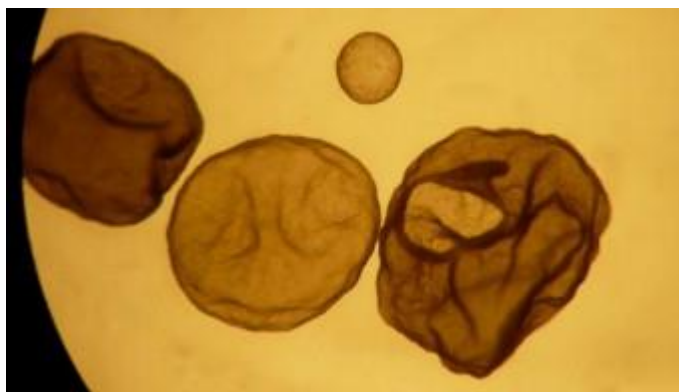
Po výplachu by se měla dárkyni podat dávka prostaglandinu, aby nedošlo k nechtěnému zabřeznutí (Sumar, 2013).



Obr. 5

Proplachování vejcovodů za účelem získání embryí u alpak (Novoa a Sumar, 1968).

Dárkyně jsou po výplachu vejcovodů léčeny 200 µg kloprostenolu. Aby se indukovala lůžka žlutých tělísek. Kapalina se následně zkoumá pod stereomikroskopem a roztřídí se blastocytů podle stupně vzhledu. Stupeň 1 - velmi dobrý, stupeň 2 – průměrně dobrý, stupeň 3 – špatný, stupeň 4 – prasklý (Vaughan et al., 2013).



Obr. 6

8. den po ovulaci blastocytů. Zleva stupeň 2., stupeň 1. 2 embrya, poslední vpravo stupeň 4. (Vaughan et al., 2013).

3.3.3.4 Přenos embryí do příjemkyně

Pro přenos embryí se využívá přenosné brčko, které se pod stereoskopem naplní 0,25 ml roztoku. Použitím tuberkulinové stříkačky jsou následně nasáté určené sloupce: médium, vzduch, médium s embryem, vzduch a médium.



Obr. 7

Schéma přenosného brčka při embryo transferu (Sumar, 2013).

Příčemž bavlněný špunt společně s polyvinyl-alkoholem musí být nepropustný. Brčko je následně vloženo do transferové zbraně a překryto pláštěm.

Přenosová pistole je potom vložena do vagíny příjemkyně a vrchol pistole je veden skrz děložní čípek do děložního rohu. Tato manipulace v reprodukčním traktu je minimalizována jen na pouhých pár úkonů, aby nedošlo k poranění sliznice. Brčko je následně vyňato z dělohy a je zkontrolováno, zda vše proběhlo v pořádku (Sumar, 2013).

3.3.3.5 Kryokonzervace embryí

Jedná se o zmrazení embryí, čímž dojde k jejich delšímu uchování. Při kryokonzervaci se využívají dvě metody: metoda pomalého zmrazování a vitrifikace (Pegg, 2007).

Metoda pomalého zmrazování je metoda, při které dochází k pomalému zmrazování embryí a vylučování vody tak, aby nedošlo k tvorbě ledových krystalků. Při kryokonzervaci se využívá několika přístrojů a nástrojů. Jsou to tyto: kryogenický zmrazovač, nádoba s tekutým dusíkem, pejety, odsávač vlhkosti. (Pegg, 2007).

Podle studie Pałasze et al., (2000) vyšlo najevo, že existuje velice málo údajů o mražení lamích nebo alpacích embryí. V této studii byly zkoumány trofoblasty lam a došlo se k závěru, že pro zmrazení by se měla vytvořit určitá opatření:

Vystavení 10% ethylenglykolu (propylenglykolu nebo glycerolu) doplněného o 10% BSA a 1% hyaluronátu sodného teplotě 22 ° C po dobu 15 minut. Pro následné odstranění kryopreservantu bylo použito 0,5 M roztoku sacharózy (Pałasz et al., 2000).

Vitrifikace má v moderní době vysokou tendenci nahrazovat metodu pomalého zmrazování. Umožňuje snadnější zmrazování vajíček a embryí a otevírá nové perspektivy při jejich darování při stejné fertilitě. V budoucnosti dojde k plnému nahrazení pomalého zmrazování a budou se tak moci lépe zamrazovat i nejranější stádia embryí (blastocyty). Tímto způsobem nebude docházet k nechtěným komplikacím způsobených časnou manipulací s embryem (Griveau et al., 2015).

Při vitrifikaci dochází k velice rychlému zmražení embryí. Proces se skládá z dehydratace embrya při pokojové teplotě za pomoci vysoce koncentrovaného média a prudkého zmražení (Allera et al., 2002).

Cílem práce Allera et al. (2002) bylo zhodnocení přežití vitrifikovaných embryí přenesených do příjemkyně. Dárkyně byly ošetřeny pomocí CIDE- estradiol benzoát- EKG a ovulace byla vyvolána přirozeně. Po páření bylo ihned podáváno GnRH. Další páření bylo povoleno až po 24 hodinách. Získávání embryí probíhalo mezi 8. – 9. dnem po prvním páření. Z 12 dárkyň bylo získáno 22 embryí. Embrya byla následně vystavena vitrifikaci ve formě (20% glycerolu + 20% ethylenglykolu + 0,3 M sacharózy + 0,375 M glukózy a 3% polyethylenglykolu) 3x po sobě a po naplnění pejety do 0,25 ml. Poté se pejeta ponořila do tekutého dusíku. Příjemkyním bylo podáváno GnRH ve stejný čas jako dárkyním. Bylo podáno 8 rozmražených vitrifikačních dávek s embryi pro 4 samice a 12 čerstvých dávek pro 6 samic. Výsledky byly velice úspěšné, neboť prokázaly, že při podání čerstvých embryí byla míra zabřeznutí u lam 33,3 % a u vitrifikovaných dávek tomu bylo okolo 45 %. U velbloudů byly provedeny studie, které prokázaly, že se úspěšnost zabřeznutí pohybuje okolo 10 % (Skidmore et al., 2009).

Podle studií Von Baera a Del Campa (2002) bylo zjištěno, že při otevření přenosného brčka s embryi v rozmezí od 300-800 μm , jeho vystavení 40% ethylenglykolu a následném ponoření do tekutého dusíku, byly výsledky embryí velice přijatelné. Avšak po jejich použití nedošlo k žádnému zabřeznutí. V jiných studiích Lattanzi et al. (2002) došlo k testu životaschopných rozmražených blastocytů v kultuře SOFaa + BSA. Po 48 hodinách v médiu se rozdíl mezi pomalu zmraženými embryi a vitrifikací téměř nelišil.

3.3.3.6 Embryo transfer mezi různými druhy

První zprávy o zkřížení lam a alpak zmiňují Taylor et al. (2001) a Sumar (2013). V prvním případě lama porodila mládě alpaky. Ve druhém případě lama porodila mládě guanako. Embrya

byla získána spláchnutím embryí lam a alpak a přenesena na příjemkyně jiného druhu. Počet přijatých embryí byl okolo 57 %.

3.3.4 In vitro fertilizace (IVF) a produkce embryí

Jedná se o biotechnickou metodu v reprodukci, kdy se v laboratoři vytváří z oocytů embrya. Existují dvě metody odběru oocytů. Z jatečných vaječníků nebo ze živých samic pomocí tzv. transvaginální, ultrazvukem řízené aspirace (ovum pick-up), při níž může docházet k superovulaci (Sansinena et al., 2007).

Takto získané útvary se přenesou pod mikroskop, zjišťuje a identifikuje se velikost a zralost oocytů. Po přesném zjištění stádií zralosti oocytů dochází k inkubaci za pomoci pomalého nebo rychlého zmražení. Pro potřebné oplození vajíček se přidávají spermie a čeká se, zda dojde k oplození nebo ne. (Sansinena et al., 2007).

3.3.4.1 Ovum pick up

Jakmile se zjistí přítomnost antrálních folikulů, provede se odběr oocytů. Takovýto odběr probíhá za pomoci ultrasonografie.

Před samotným ovum pick-up se využívá superstimulace po kontrole růstu folikulů. Stejně jako u ostatních přežvýkavců je u lam možné využít několik metod kontroly vývoje folikulů, například ultrasonografie. Ta je však u velikých stád ekonomicky nepřijatelná, proto se spíše využívá hormonální terapie (LH nebo GnRH). S úspěšným rozvojem a čím dál větším praktickým využitím těchto metod se dá velice dobře naplánovat spuštění superovulace (Ratto et al., 2013). Při užití progesteronu dochází k inhibici vývoje folikulů a vzniku nového dominantního folikulu 7 dní před spuštěním ovulace (Chaves et al., 2002). V novějších studiích Huanca et al. (2009) bylo dokázáno, že výtěžnost oocytů je vyšší, pokud je léčba zahájena již v okamžiku folikulární vlny vyvolané podáním LH. V tomto ohledu bylo zjištěno, že eCG účinně indukuje produkci více oocytů u lam (Huanca et al., 2009). Dospělé samici, která je stimulována ECG a pFSH je podáváno 20 µg GnRH 24- 28 hodin před plánovaným odběrem (Wani a Skidmore, 2010).

Při ovum pick-up se využívá anestezie a komplikace s jejím využitím jsou velice malé. Rizikem může být snížení objemu plic, hypoxie, zvýšený krevní tlak a jiné. Při této metodě dochází jen málokdy k poškození samice zapříčiněné člověkem (Teixeira et al., 2015).

Pro získávání oocytů z živých samic se využívá aspirace laparoskopická, což je získávání oocytů skrz malý chirurgický řez v břiše. Více využívanou je aspirace skrz pochvu. Je to nejvyužívanější nechirurgická metoda odběru oocytů, protože k ní není potřeba složitých přístrojů. Vybráním neinvazivní metody se zabrání různým srůstům a jizvám. Při tomto odběru se také používá neinvazivní ultrasonografie, aby se monitorovala aktivita folikulů (Sumar, 2013). Samici je nejprve nutné zafixovat. Poté se připne její ocas k hřbetu, očistí se rektum a oblast pochvy. Samotný odběr se provádí za pomoci vodící lišty, která je vedena skrz vulvu do kraniální části vagíny. Na vodící liště je zajištěna dlouhá jehla. Celý aparát postupuje skrz děložní rohy až k folikulu. Folikulární tekutina je následně pomocí vakuové pumpy odjímána do zkumavek, které obsahují určité médium. Takto získaná tekutina je dále zkoumána za použití stereomikroskopu (Wani a Skidmore, 2010).

3.3.4.2 Manipulace s oocyty

Obsah zkumavky se přesune na Petriho misku.

Pro lepší zacházení s vajíčky se k pipetám připojují tuberkulinové stříkačky. Díky nim se před odsátím oocytu odsává malé množství média. Tím se zabrání vysušení oocytu. Vajíčko je potřeba opláchnout v mycím médiu (Hyclon). Kvalitní přenos se rozpozná tak, že dochází k několikanásobnému promývání ve splachovacím séru společně s telecím fetálním sérem. Díky tomuto úkonu se odstraní hlen, nečistoty a bakterie.

Takto upravené vajíčko je následně uloženo na Petriho misku při teplotě 37 °C a s médiem obsahujícím 3% BSA (Sumar, 2013).

Celkový průměr kumulo oocytárních komplexů se pohybuje okolo 5- 24 kusů. Většina kumulů se vyskytuje s rozšířenými buňkami. Podíl získaných oocytů do 28-19 h (91 ± 4) a 26- 27 h (82 ± 3) bývá vyšší než počet z 24-25 hodin (40 ± 16). Dále se také z in vivo odběrů získá více oocytů (84 ± 2) než z odběrů z jatečných vaječníků (61 ± 3) (Wani a Skidmore, 2010).

3.3.4.3 In vitro oplození

In vitro produkce je u tohoto druhu jen velice málo prozkoumána, proto není moc využívána (Tibary et al., 2005).

Po kultivaci oocytů do metafáze II se do kultivačního média s oocyty přidají spermie a čeká se, zda dojde k oplození (Xu et al., 2016).

Pokud se však při odběru pomocí ovum pick-up aspirují oocyty, které jsou již v MII fázi vývoje, tak se inseminují do 6-12 hodin po odběru a dále se kultivují po dobu vývoje kolem 8 dnů. V takovém případě se největší počet blastocyst vyvíjí z oocytů, které byly oplozeny do 6 hodin po odběru. Méně pak v době do 12 hodin. Je to okolo 22 % ze všech oocytů. (Makita et al., 2016).

U lam se do fáze moruly dostává zhruba 25 % oocytů a do fáze blastocysty 12 % oocytů (Sansinena et al., 2007). U velbloudů je procento oocytů, které dozrají do fáze blastocysty podobné, okolo 14-21 % (Wani, 2009).

První úspěšné in vitro dozrání a oplození proběhlo v letech 1992 a 1994. Výzkumníci zjistili, že 62 % ze všech použitých oocytů dosáhlo metastáze II po 36 hodinách a 57 % všech oocytů vykazovalo známky oplození spermatem. Následně bylo 236 oocytů uloženo do epitelu vejcovodů a kultivovalo se 4 dny. 32 % se začalo štěpit, 5,6 % dosáhlo stádia moruly, 6 % dosáhlo stadia rané blastocysty a 4,7 % dosáhlo blastocysty (Del Campo et al., 1992).

Produkce embryí má vysoký dopad na populaci velbloudovitých držených v zajetí nebo i ve volné přírodě. Proto poznání a zlepšení in vitro produkce může vést k běžnému a účinnému využívání reprodukce lam i velbloudů (Trasorras et al., 2013).

3.4 Závěr

Tato práce shrnuje poznatky o biotechnických metodách v reprodukci samic lam a velbloudů. Mezi nejvíce využívané biotechnické metody patří ultrasonografie. Využívá se k monitoringu reprodukčních orgánů, především k detekci březosti. Tato technika je velice dobrá. Má 91% úspěšnost a její přesnost se dá srovnat s přesností měření u ostatních druhů zvířat. Další technikou je inseminace, která je u této čeledi méně efektivní, než samotné přirozené páření, a proto se moc nevyužívá. Procento zabřezávání se velice liší na základě použití typu dávky od 10-60 %. V chovech velbloudů a lam se využívá také embryo transfer. Tato metoda byla již úspěšně aplikována, avšak je stále potřeba zajistit a provést mnohem více výzkumů, aby bylo možné definitivně určit, zda se dá zvýšit počet vyplavovaných embryí, který se nyní pohybuje okolo 6 embryí na jednu samici. Po odběru se určitý počet embryí může ihned použít k přenosu do příjemkyně a část embryí se může konzervovat. Kryokonzervace embryí je méně výnosná než použití čerstvých embryí, neboť dochází k odumírání a rupturám buněk, tudíž následné procento zabřeznutí se pohybuje okolo 10-45 %. Nejmladší biotechnickou metodou je in vitro produkce embryí. Při in vitro produkci je nutné provést získání oocytů. Bylo prokázáno, že z vaječnicků živých samic, se dá získat více oocytů, než z jatečných vaječnicků. Takto získané oocyty se posléze v laboratorních podmínkách oplodní a kultivují. Touto metodou se dá získat ze všech kultivovaných oocytů až 21 % blastocyst. Tato metoda má největší potenciál ve využití v reprodukční praxi této čeledi.

4 Seznam literatury

- Aba, M.A. 2014. Anatomy and Physiology of Reproduction in Female Llama and Alpaca. 140-150. In: Cebra, CH., Anderson, D.E., Tibary, A., Van Saun, R.J., Johnson, LR.W. 2014. Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health. Elsevier. St. Louis p. 808. ISBN: 9781437723526.
- Abu-Seida, A.M. 2016. Systematic Review on Ultrasonographic Applications in Camels. Journal of Camel Practice and Research. 23 (1). 139-146.
- Adams, G.P., Domínguez, M. 2007. Pregnancy diagnosis in llamas and alpacas. 889-895. In: Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. 2007. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. [2nd ed.]. Mo.: Saunders Elsevier. St. Louis. p. 1088. ISBN: 9780721693231.
- Adams, G.P., Griffin, P.G., Ginther, O.J. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. Biol Reprod. 41. 551-558.
- Adams, G.P., Ratto, M.H., Collins, C.W., Bergfelt, D.R. 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. Theriogenology. 71 (1). 166-175.
- Adams, G.P., Sumar, J., Ginther, O.J. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas. J Reprod Fertil. 90. 535-545.
- Ali, A., Al-Sobayil, F.A., Derar, R., El-Tookey, O. 2013. Ultrasonographic foetometry and prenatal foetal sex assessment in camels (*Camelus dromedarius*). Theriogenology. 80. 609-618.
- AL-Kaidy, H., Duwe, A., Huster, M., Muffler, K., Schlegel, Ch., Sieker, T., Stadtmueller, R., Tippkoetter, N., Ulber, R. 2014. Biotechnology and Bioprocess Engineering - From the First Ullmanns Article to Recent Trends. Chemie Ingenieur Technik. 86 (12). 2215-2225.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H. 2002. Successful transfer of vitrified Llama (*Lama glama*) embryos. Animal Reproduction Science. 73 (1-2). 121-127.

- Anderson, D.E., Jones, M.L., Miesner, M.D. 2013. *Veterinary Techniques for Llamas and Alpacas*. Wiley-Blackwell. Ames. p. 360. ISBN: 9780813819877.
- Anouassi, A., Tibary, A. 2013. Development of a large commercial camel embryo transfer program: 20 years of scientific research. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 211-221.
- Baskin, J., Thomas, R. 2016. A review of *Camelops* (Mammalia, Artiodactyla, Camelidae), a giant llama from the Middle and Late Pleistocene (Irvingtonian and Rancholabrean) of North America. *Historical Biology*. 28 (1-2). 120–127.
- Beniwal, B.K., Chaudhry, A.L. 1984. Age at first calving in Bikaneri camel. *Indian J. Anim. Sci.* 54. 598-599.
- Bono, G., Dahir, A.M., Comin, A., Jumale, M.A. 1989. Plasma LH, corticoid and sex steroid variations in camels (*Camelus dromedarius*) in relation to seasonal climatic changes. *Anim. Reprod. Sci.* 21. 101-113.
- Bourke, D., Adam, C., Kyle, C. 1992. Ultrasonography as an Aid to Controlled Breeding in Llama (lama-Glama). *Veterinary Record*. 130 (19). 424-428.
- Bourke, D.A., Kyle, C.E., Mc Evoy, T.G., Young, P., Adam, C.L. 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*. 44. 255-268.
- Bravo, P.W., Alarcon, V., Baca, L., Cuba, Y., Ordonez, C., Salinas, J., Tito, F. 2013. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 157-163.
- Bravo, P.W., Fowler, M.E., Stabenfeldt, G.H., Lasley, B.L. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod*. 43. 579-585.
- Bravo, P.W., Maytag, M.M., Cesar, A., Ordonez, A. 2000. Growth of the conceptus in alpacas. *Am J Vet Res*. 61. 1508-1511.

- Bravo, P.W., Varela, M.H. 1993. Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci.* 32. 245-252.
- Calderón, W., Sumar, J., Franco, E. 1968. Avances de la inseminación de las alpacas (*Lama pacos*). *Rev. Fac. Med. Vet.* 22. 19-35.
- Clutton-Brock, J. 2001. Savci. 86-257. In: Burnie, D., kol. 2002. *Zvíře: obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů*. [1. vyd.]. Knižní klub. Praha. s. 624. ISBN: 8024208628.
- Deen, A. 2008. Artificial insemination in camel is not successful. *Bikaner: Rajasthan Agricultural University.* 11-34.
- Deen, A., Vyas, S., Sahani, M.S. 2003. Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Anim. Reprod. Sci.* 77 (3-4). 223-233.
- Del Campo, M.R., Del Campo, C.H., Adams, G.P., Mapletoft, R.J. 1995. The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology.* 43. 21-30.
- Del Campo, M.R., Donoso, M.X., Del Campo, C.H., et al. 1992. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. *Proceedings of the 12th International Congress on animal Reproduction.* 324-326.
- DesCôteaux, L., Colloton, J., Gnemmi, G. 2009. *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Wiley-Blackwell. Ames. p. 244. ISBN: 9780813815510.
- Diaz, O.S., Smith, G., Reef, V.B. 2007. Ultrasonographic appearance of the lower urinary tract in fifteen normal horses. *Vet Radiol Ultrasound.* 48. 560-564.
- Djellouli, M., Saint-Martin, G. 1992. Productivity and economy of camel breeding in Tunisia. *Proc. 1st Int. Camel Conf.* 209-212.
- El-Wishy, A.B. 1988. A study of the genital organs of the female dromedary (*Camelus dromedarius*). *Egypt. J. Reprod. Fert.* 82. 587-593.

Fernández-Baca, S., Novoa, C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) noc semen de vikuña (*Vicugna vicugna*). *Rev. Fac. Med. Vet.* 22. 9-18.

Griveau, J.F., Lopes, M., Jouve, G., Veau, S., Ravel, C., Morcel, K. 2015. Vitrification: Principles and results. *Journal De Gynecologie Obstetrique Et Biologie De La Reproduction.* 44 (6). 485-495.

Grygar, I., Kudláč, E. 1997. *Ultrasonografie ve veterinárním porodnictví a gynekologii.* Slezan. Hlučín. s. 247. ISBN: 8090194869.

Honey, J.G., Harrison, J.A., Prothero, Stevens, M.S. 1998. Camelidae. Evolution of Tertiary Mammals of North America: Terrestrial Carnivores, Ungulates, and Ungulatelike Mammals. 1. 439-462.

Hoops, M., Kauffold, J. 2013. Physiology and pathology of reproduction in domesticated New World camelids with special emphasis on ultrasonography. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere.* 41 (3). 166-175.

Hořejší, J. 2006. Budoucnost začala před třiceti lety: biotechnologie v medicíně včera, dnes a zítra. *Medical Tribune CZ.* Praha. s. 80. ISBN: 8090370853.

Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., Cardenas, O., Adams, G.P., Ratto, M.H. 2009. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progetin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology.* 72. 803-808.

Chaves, M.G., Aba, M.A., Agüero, A., Egey, J., Berestin, V., Rutter, B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 69. 37-46.

Chen, B.X., Yuen, Z.X. 1979. Reproductive pattern of the Bactrian camel. *The Camelid. An All Purpose Animal.* 1. Scandinavian Institute of African Studies, Uppsala. 364-396.

Ilyasu, D. 2014. Anatomy and physiology of reproductive system of she camel. Health and medicine [online]. 10. prosince 2014 [cit. 15. února 2017]. Dostupné z <<http://www.slideshare.net/daudailyasu/anatomy-and-physiology-of-reproductive-system-of-she-camel>>.

Johnson, W. E., 2014. Camelid Genetics and Reproductive Biotechnologies. *Journal of Heredity*. 105 (6). 837-838.

Kershaw-Young, C.M., Druart, X., Vaughan, J., Maxwell, W.M. 2012. β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fertil Dev*. 24. 1093-1097.

Lattanzi, M., Santos, C., Chaves, G., Miragaya, M., Capdevielle, E.F., Judith, E., Egey, J., Agüero, A., Baraňao, J.L. 2002. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slowing freezing and vitrification. *Theriogenology*. 57. 585.

Leyva, V., Franco, E., Sumar, J. 1979. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Resúmenes de proyectos de investigación realizados por la UNMSM, periodo 1975–1979. 2. 105.

Makita, M., Ueda, M., Miyano, T. 2016. The fertilization ability and developmental competence of bovine oocytes grown in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 62 (4). 379-384.

Martini, P., Costeur, L., Le Tensorer, J. M., Schmid, P. 2015. Pleistocene camelids from the Syrian Desert: The diversity in El Kowm. *Anthropologie*. 119 (5). 687–693.

Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Agüero, A. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. 61 (2-3). 299-310.

Monaco, D., Padalino, B., Lacalandra, G.M. 2015. Distinctive features of female reproductive physiology and artificial insemination in the dromedary camel species. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27 (4). 238-337.

- Musa, B.E., Abusineina, M.E. 1978. The oestrous cycle of the camel (*Camelus dromedarius*). *Vet. Rec.* 102. 556-557.
- Nikjou, D., Niasari-Naslaji, A., Skidmora, J.A., Mogheiseh, A., Razavi, K., Gerami, A., Ghanbari, A. 2008. Synchronization of follicular wave emergence prior to superovulation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology*. 69 (4). 491-500.
- Novoa, C., Sumar, J. 1968. Colección de huevos in vivo y ensayos de transferencia en alpacas. *Boletín extraordinario IVITA- UNMSM*. 3. 31-34.
- O'Connor, M., Peters, J. 2003. Artificial Insemination Technique. *Agricultural Research and Cooperative Extension*. 1-6
- Pałasz, A.T., Adams, G.P., Brogliatti, G.M., Mapletoft, R.J. 2000. Effect of day of collection and permeating cryoprotectants on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*. 53. 341.
- Pegg, D.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 368. 39–57.
- Petelíková, J. 1995. Využití v reprodukci hospodářských zvířat (metodika) 1. vydání. Ministerstvo zemědělství České Republiky. s. 46.
- Picha, Y., Tibary, A., Memon, M., Kasimanickam, R., Sumar, J. 2013. Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology*. 79 (4). 702-708.
- Purohit, G.N. 1999. Biotechnologies in camelid reproduction: Current status and future perspectives. *Journal of Camel Practice and Research*. 6 (1). 1-13.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 63. 2445-2457
- Ratto, M., Mauricio, H., Silva, E., Huanca, W., Huanca, T., P.Adams, G. 2013. Induction of superovulation in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 164-169.

- Ratto, M.H., Adams, G.P. 2007. Embryo Technologies in South American Camelids. 900-904. In: Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. [2nd ed.]. Mo.: Saunders Elsevier. St. Louis. p. 1088. ISBN: 9780721693231.
- Ratto, M.H., Gatica, R., Correa, J.E. 1997. Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim. Reprod. Sci.* 48. 325-330.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P. 2005. Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 91. 299-306.
- Reece, W.O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada. Praha. s. 480. ISBN: 9788024732824.
- Reyna, J. 2008. A practical guide to exploration and visualisation of ovarian structures in alpacas by transrectal ultrasound. <<http://www.alpacacareproduction.com>>.
- Salari, E., Raji, A.R., Farzaneh, N. 2011. Comparative study of anatomy and histology on the ovary and oviduct in camel (*Camelus dromedarius*) and cow. *Journal of Camel Practice and Research.* 18 (1). 115-118.
- San-Martin, M., Copaira, M., Zuniga, J., Rodreguez, R., Bustinza, G., Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 16. 395-399.
- Sansinena, M. J., Taylor, S. A., Taylor, P. J., Denniston, R. S., Godke, R. 2003. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning and Stem Cells.* 5 (3). 191-198.
- Sansinena, M.J., Taylor, S.A., Taylor, P.J., Schmidt, E.E., Denniston, R.S., Godke, R.A. 2007. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science.* 99 (3-4). 342-353.

Skidmore, J.A. 2011. Reproductive physiology in female Old World Camelids. *Animal Reproduction Science*. 124 (3-4). 148-154.

Skidmore, J.A., Billah, H., Allen, W.R. 1996. Patterns of hormone secretion throughout pregnancy in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reprod. Fertil. Dev.* 8. 863-869.

Skidmore, J.A., Billah, M. 2006. Comparison of pregnancy rates in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) after deep intra-uterine versus cervical insemination. *Theriogenology*. 66. 292-296.

Skidmore, J.A., Billah, M., Allen, W.R. 1995. The ovarian follicular wave pattern in the mated and non-mated dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* 49. 545-548.

Skidmore, J.A., Billah, M., Allen, W.R. 1996. The ovarian wave pattern and induction of ovulation in the mated and non-mated one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* 106. 185-192.

Skidmore, J.A., Schoevers, E., Stout, T.A. 2009. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 113 (1-4). 196-204.

Skidmore, J.A., Starbuck, G.R., Lamming, G.E., Allen, W.R. 1998. Control of Luteolysis in the One-Humped Camel (*Camelus Dromedarius*). *J Reprod Fertil.* 114 (2). 201-209.

Stanley, H.F., Kadwell, M., Wheeler, J.C. 1994. Molecular Evolution of the Family Camelidae: Mitochondrial DNA Study. *Proceedings. Biological science/The royal Society*. 256 (1345). 1-6

Sumar, J., Picha, Y., Arellano, P., Montenegro, V., Londoño, P., Rodriguez, C., Snachez, D., Tibary, A. 2010. Effect of recipient lactation on pregnancy rate following embryo transfer in alpacas. *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology*. 2. 399.

Sumar, J.B. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 405-415

- Sumar, J.B. 2013. Embryo transfer in domestic South American camelids. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 170-177.
- Taylor, S., Taylor, P.J., James, A.N., Denniston, R.S., Godke, R. 2001. Alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology*. 55. 401.
- Teixeira, P.P.M., Padilha, L.C., Silva, A.D.L., Barros, F.F.P.D., Coutinho, L.N., Silva, M.A.M., Flores, F.N., Lopes, M.D.S., Vrisman, D.P., da Conceicao, M.E.B.A.M., Vincente, W.R.R. 2015. Ovum Pick-up Technique in Recently Weaned Ewe Lambs Subjected to Ovarian Stimulation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43. 1280.
- Tibary, A., Anouassi, A. 1997. Reproductive Physiology in Female Camelidae. U.A.E. 169-241.
- Tibary, A., Anouassi, A., Khatir, H. 2005. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*. 64 (3). 618-638.
- Tinson, A.H., Singh, K. 1998. Embryo transfer in the Camel, Can it be Applied to Field Conditions with Realistic Costs?. *Proceedings of the Third Annual Meeting for Animal Production Under Arid Conditions*. 1. 108-121.
- Tinson, A.H., Singh, K., Kuhad, K.S. 2000. Large scale management of camels for embryo transfer. *Journal of Camel Practice and Research*. 7 (2). 143-147.
- Trasorras, V., Giuliano, S., Miragaya, M. 2013. In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 187-193.
- Vácha, M. 2004. Srovnávací fyziologie živočichů. [2. vyd.]. Masarykova univerzita. Brno. s. 166. ISBN: 8021033797.
- Vaughan, J., MIHM, M., Wittek, T. 2013. Factors influencing embryo transfer success in alpacas-A retrospective study. *Animal Reproduction Science*. 136 (3). 194-204.

- Velásquez, C., Novoa, M.C. 1999. Superovulación noc PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Invest. Vet. (Perú)*. 10 (1). 234-238.
- Von Baer, A., Del Campo, M. 2002 Vitrification and cold storage of llama (*Lama glama*) hatched blastocysts. *Theriogenology*. 57. 489.
- Wani, N.A. 2009. In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 degreesC. *Anim. Reprod. Sci.* 111 (1). 69-79.
- Wani, N.A., Skidmore, J.A. 2010. Ultrasonographic-guided retrieval of cumulus oocyte complexes after super-stimulation in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*. 74 (3). 436-442.
- Whitehead, C. 2011. Reproductive anatomy, physiology and behaviour in camelids. *Proceedings of Camelid Branch of the NZVA. FCE Publication No. 290.* 5.3.1-5.3.10
- Wiepz, D.W., Chapman, R.J. 1985. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*. 24. 251-257.
- Wilson, R.T. 1984. *The Camel*. Longman. New york. p. 244. ISBN: 0582775124.
- Xu, J.J., Fang, R., Chen, L., Chen, D.Z., Xiao, J.P., Yang, W.M., Wang, H.H., Song, X.Q., Ma, T., Bo, S.P. Shi, CH., Ren, J., Huang, L., Cai, L., Yao, B., Sunney Xie, X., Lu, S. 2016. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113 (42). 11907-11912.
- Yagil R. 2006. Reproductive processes in camels (*Camelus dromedarius*). *Israel journal of Veterinary Medicine*. 61 (2). 1-6.
- You, R., LV, L., Cheng, Z., HE, J., W.Smith, G., Dong, CH. 2013. Application of Ultrasonography for Early Pregnancy Diagnosis in Alpacas (*Lama pacos*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 12 (4). 539-543.