

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

Diplomová práce

Úspěšnost inseminace klisen ve vztahu k době ovulace

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. David Vacek

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. David VACEK
Osobní číslo: Z18132
Studijní program: N4103 Zootechnika
Studijní obor: Zootechnika
Téma práce: Úspěšnost inseminace klisen ve vztahu k době ovulace
Zadávací katedra: Katedra zootechnických věd

Zásady pro vypracování

Inseminace je moderní biotechnologická metoda, která se stává nepostradatelnou zvláště v chovu sportovních plemen koní, s ohledem na možnosti dovozu spermatu špičkových hřebců ze zahraničí.

Cílem práce je posoudit vztah mezi dobou ovulace a dobou inseminace klisen na základě úspěšnosti jejich zabřeznutí.

Na základě literárních podkladů zpracujete informace o vývoji folikulu v průběhu pohlavního cyklu klisen a u vybraného souboru klisen budete sledovat vývoj folikulu v průběhu estrální fáze.

Zaznamenáte údaje o době ovulace a určení vhodné doby pro inseminaci.

Provedete analýzu dat souvisejících s dobou ovulace s dobou inseminace a porovnáte tyto výsledky s úspěšností zabřezávání klisen.

Do vyhodnocení zahrmete inseminaci chlazeným spermatem a podle možnosti rovněž inseminaci spermatem mrazeným a posoudíte rozdíly mezi čerstvým chlazeným a mrazeným spermatem ve výsledcích zabřezávání.

Zjištěná data zpracujete vhodnými biometrickými metodami a vyhodnotíte doporučení využitelná v praxi.

Rozsah pracovní zprávy: 40 – 50 stran
Rozsah grafických prací: dle pokynů vedoucího práce
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

DUŠEK, Jaromír. *Chov koní*. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2011. ISBN 978-80-209-0388-4
SAMPER, Juan C. a kol.: *Current therapy in equine reproduction*. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier, c2007. ISBN 978-0-7216-0252-3.
GOMES, Gustavo M. a kol.: Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares?. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019, 73, 43-47
KARESKOSKI, Maria a kol.: Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen. *Theriogenology* . 2019, 127, 7-14
MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology* . 2008, 70(3), 463-468

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Beran, Ph.D.
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 5. února 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020

V.7 - 

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Vyšebrodská 1868, 370 05 České Budějovice
L.S.



prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích2020

.....
David Vacek

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Janu Beranovi Ph.D. za jeho odbornou pomoc, metodické vedení, cenné rady a připomínky, kterými mi pomohli při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří při mně stáli a podporovali mě při psaní diplomové práce a také jedno velké dík patří Mgr. Veronice Čoudkové Ph.D., která mi také nesmírně pomohla svými cennými radami, metodickým vedením a připomínkami k dokončení diplomové práce.

Abstrakt

Zabřezávání u klisen je ovlivněna řadou faktorů. Kromě zásadního vlivu samotné klisny a hřebce má významnou roli sám chovatel. Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv typu uskladnění inseminační dávky, intervalu mezi inseminací a ovulací a vliv věku klisny na zabřezávání.

Celkem bylo hodnoceno 49 teplokrevných klisen z farem Újezd a Zduchovice. Bylo sledováno zabřezávání v roce 2019 a mezi hodnocené faktory byl zahrnut typ uskladnění spermatu (chlazené nebo mražené), věk klisny a interval mezi ovulací a inseminací.

Neprokázal se vliv uskladnění spermatu (p -hodnota $> 0,05$), kdy zabřezávání v případě mraženého spermatu byla 52 % a u chlazeného spermatu pouze o 6 % vyšší, tedy 58 %. Při sledování věku u zabřezlých a nezabřezlých klisen na první říji nebyl zaznamenán průkazný rozdíl (p -hodnota $> 0,05$). Průměrný věk klisen, které nezabřezly, byl 10 let ($n = 19$) a byl vyšší pouze o rok v porovnání s věkem klisen, které zabřezly (9 let, $n = 30$). Ani v případě intervalu mezi ovulací a inseminací se neprokázal vliv tohoto faktoru na zabřezávání. V rámci sledování však žádný časový interval nepřesahoval doporučenou délku.

Závěrem lze konstatovat, že chovatel je schopen svým přístupem snižovat působení negativních vlivů na zabřezávání, jako jsou věk klisny, interval mezi inseminací a ovulací či typ uskladnění inseminační dávky.

Klíčová slova: inseminace, reprodukce, klisna, ovulace

Abstract

Mare rate of conception is influenced by many factors. Apart from the impact of the mare and the stallion, the breeder also represents one of these factors. The aim of this master's thesis is to assess the impact of the insemination dose storage, the period between the insemination and ovulation and the mare's age on the actual conception.

The results are based on the assessment of forty-nine Czech Warmblood mares from the farms of Újezd and Zduchovice. Their conception rate was monitored throughout the years 2019 and the assessed affecting factors include the kind of semen storage (frozen or fresh chilled semen), the mare's age and the period between ovulation and insemination.

The initial assumption that the sort of semen storage (p -value > 0.05) influences the rate of conception has been disproven because the conception rate for frozen semen was 52 % and it increased only by 6 %, amounting to 58 % in total for fresh chilled semen. As far as the age factor is concerned, there was almost no difference (p -value > 0.05) in the ages of gravid and non-gravid mares that were supposed to conceive during their first rut. The average age of pregnant mares is 10 ($n = 19$), therefore only one year more in comparison with non-pregnant mares (9 year, $n = 30$). The influence of the period between the insemination and the ovulation on the conception rate has not been proven either. While being monitored, no period between the insemination and ovulation exceeded the recommended length.

In conclusion, the breeder can lessen the impact of harmful factors on the conception rate, for example the mare's age, the period between insemination and ovulation and the kind of semen storage.

Key words: insemination, reproduction, mare, ovulation

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíl práce a hypotézy	11
3	Literární přehled	12
3.1	Anatomie pohlavního aparátu klisny.....	12
3.1.1	Vulva.....	12
3.1.2	Pochva.....	12
3.1.3	Děložní krček.....	13
3.1.4	Děloha.....	13
3.1.5	Vejcovody	13
3.1.6	Vaječníky	14
3.2	Oogeneze, Folikulogeneze	14
3.3	Estrální cyklus klisen.....	16
3.4	Fáze estrálního cyklu.....	17
3.5	Zapouštění klisen.....	17
3.6	Detekce říje a doba inseminace klisny	18
3.7	Březost.....	19
3.8	Diagnostika březosti	20
3.9	Faktory ovlivňující plodnost	21
3.9.1	Faktory ovlivňující plodnost samců:.....	22
3.9.2	Faktory ovlivňující plodnost samic:	22
3.10	Poruchy oplodnění.....	22
3.11	Ztráta březost	22
3.12	Způsoby reprodukce	24
3.12.1	Přirozené připouštění	24
3.12.2	Umělá inseminace	25
3.13	Embryotransfer	30
3.13.1	Historie embryotransferu:	30
3.13.2	Klisna dárce embrya („dárkyně“)	31
3.13.3	Klisna příjemce embrya („příjemkyně“).....	32
3.13.4	Synchronizace říje.....	32
3.13.5	Superovulace.....	33

3.13.6	Výplach embryí.....	33
3.13.7	Přenos embryí	35
3.13.8	Chlazení a přeprava embryí	35
3.13.9	Zmrazování embryí.....	36
3.14	In vitro produkce embryí.....	36
3.14.1	Odběr oocytů.....	37
3.14.2	Zrání oocytů	37
3.14.3	In vitro fertilizace pomocí ICSI	37
3.14.4	Intrafallopialní transfer gamet.....	38
3.15	Sexace spermí.....	38
3.16	Klonování	39
4	Materiál a metodika	40
4.1	Charakteristika sledovaných chovů.....	40
4.1.1	Farma Újezd.....	40
4.1.2	Jezdecké centrum Zduchovice	41
4.2	Materiál	42
4.3	Metodika.....	42
4.3.1	Detekce říje u klisen	43
4.3.2	Statistické vyhodnocení dat	45
5	Výsledky a diskuze	46
5.1	Vliv typu uskladnění spermatu na míru zabřezávání	46
5.2	Vliv věku klisny na zabřeznutí na první říji a první inseminaci.....	48
5.3	Vliv doby ovulace v závislosti na době inseminace na zabřeznutí ..	50
5.3.1	Vliv intervalu mezi ovulací a inseminací při použití mraženého spermatu	50
5.3.2	Vliv intervalu mezi ovulací a inseminací při použití chlazeného spermatu	52
6	Závěr	54
7	Seznam použité literatury	56

1 Úvod

Spojení člověka s koňmi trvá již 6000 let a Česká republika patří mezi země s tradičním chovem koní. V dřívějších dobách se koně využívaly převážně na práci. Význam chovu koní nadále přetrvává a koně jsou využíváni převážně pro sportovní účely, hipoterapii, agroturistiku nebo jako hobby.

V současné době, kdy je kůň využíván převážně pro sportovní účely je nutné se zaměřit na produkci kvalitních sportovních koní specializovaných na jednotlivé sportovní aktivity. Při vstupu České republiky do Evropské Unie se zvýšila možnost dovozu spermatu od kvalitních zahraničních hřebců. Hřebci by měli působit v chovu jako zlepšovatelé a postupně pozdvihnout úroveň chovu. Další možností, která přispěla k produkci kvalitních koní je umělá inseminace. Inseminace je moderní biotechnologická metoda, která se stává nepostradatelnou zvláště v chovu sportovních plemen koní, s ohledem na možnosti dovozu spermatu špičkových hřebců ze zahraničí.

Inseminace není jediná biotechnologická metoda, která se využívá v chovu koní. Řada metod je ještě na začátku vývoje nebo jsou pro chovatele těžko dostupné, jak po stránce finanční, tak technologické. Mezi další biotechnologické metody patří: embryotransfer, in vitro produkce embryí, sexace spermií nebo klonování.

Cílem chovatele je, aby klisna měla každý rok jedno hříbě, bohužel je pravidelná reprodukce u koní ztížena dlouhou dobou březosti s porodem jednoho hříběte.

2 Cíl práce a hypotézy

Cílem práce bylo posoudit vliv vybraných faktorů na zabřezávání klisen-Do hodnocení byly zahrnuty faktory typu uskladnění použité inseminační dávky (chlazená a mražená), věk klisen a interval mezi dobou ovulace a dobou inseminace. V práci byly testovány následující tři hypotézy:

1.Hypotéza: Lze předpokládat, že způsob uchování spermatu má vliv na zabřezávání.

2.Hypotéza: Je pravděpodobné, že úspěšnost zabřezávání klisen na první říji a inseminaci je ovlivněna jejich věkem.

3. Hypotéza: Lepší výsledky zabřezávání lze očekávat při kratším časovém intervalu mezi inseminací a ovulací.

3 Literární přehled

3.1 Anatomie pohlavního aparátu klisny

Pohlavní ústrojí klisny slouží k produkci pohlavních buněk, k vývoji zárodku a následně plodu. Ve vaječniku tvořené hormony estrogeny vyvolávají vznik sekundárních pohlavních znaků a dále mají vliv na rozvoj mléčné žlázy a její sekreci. Kaudální část pohlavního ústrojí klisny je vhodně utvořena pro kopulaci a zároveň slouží jako porodní cesty při vypuzování plodu (SLEZÁKOVÁ a NAJBRT, 1982).

3.1.1 Vulva

Vulva je vnější oblastí pohlavního aparátu klisny, která chrání pochvu před vniknutím rizikových agens. Štěrbina vulvy ohraničená pysky má po obou stranách topořivá tělesa překrytá příčně pruhovaným svalstvem (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016). Tento sval udržuje „vulvální těsnění“ a odkrývá klitorisovou oblast během říje známé jako „blýskání“ (DAVIES, 2015). Ve spodní komisuře, která je zaoblená se nachází dobře vyvinutý klitoris (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016). Vnější oblast vulvy je inervovaná a prokrvená pokrytá pigmentovanou kůží s mazovou a potní žlázou (DAVIES, 2015).

3.1.2 Pochva

Pochva je dlouhá 18–23 cm a 10–15 cm široká. Stěna je tvořena silnou svalovou vrstvou, jejíž elasticita je potřebná při porodu. Pochva je vystlána bledě růžovou sliznicí vytvářející řasy, které probíhají podélně a příčně (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Hymen (panenská blána) je-li přítomna rozděluje pochvu na přední a zadní pochvu, která je někdy označována jako předsíň (DAVIES, 2015). V tomto místě také vyúsťuje močová trubice (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Prostředí pochvy působí jako bariéra zabraňující vniknutí různých mikroorganismů do hlubší části reprodukčního traktu, protože žlázy produkují sekret, který vytváří acidické prostředí nevhodné pro přežití a rozmnožování mikroorganismů. Na druhé straně je toto prostředí nevhodné i pro spermie, proto je jejich deponování při páření zabezpečeno do krčku dělohy (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.1.3 Děložní krček

Děložní krček se nachází u vstupu do dělohy. Poskytuje těsný, silnostěnný svěrač, který působí jako konečný ochránce systému, ale je také schopen se velmi přizpůsobit při porodu. Stěnu děložního krčku tvoří řada záhybů a je svalnatá. Sliznice je tvořena složeným sloupcovým epitelem obsahující mukózní sekret produkující buňky. V sexuálně neaktivním diestrálním stavu je děložní čípek pevně smrštěný, bílé barvy a měří přibližně 6–8 cm, v průměru 4–5 cm, sekrece je minimální a hustá.

Během říje se svalový tonus uvolňuje, dochází ke zvýšení sekrece. Děložní čípek při říji má růžovou barvu a může být vidět, jak vyčnívá do pochvy (DAVIES, 2015).

3.1.4 Děloha

Děloha klisny je dutý a svalnatý orgán spojující děložní krček a vejcovody. Nachází se hlavně v dutině břišní a je připevněna k bederní oblasti dvěma širokými vazy (GINTHER, 1992). Děloha má tvar Y a dělí se na dvě oblasti: tělo a rohy. Tělo dělohy obvykle měří 18–20 cm a je široké 8–12 cm a dělí se na dva děložní rohy (DAVIES, 2015). ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ (2016) uvádí, že velikost dělohy závisí na věku a počtech porodů klisny.

Děložní rohy vidlicovitě probíhají od předního okraje stydké kosti na obě dvě strany v mírném oblouku. Jsou dlouhé přibližně 25 cm, za tělem dělohy jsou široké přibližně 4–6 cm a postupně směrem k vejcovodům se zužují až na 1–2 cm (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Stěna dělohy se skládá ze tří vrstev: perimetrium, myometrium a endometrium. Myometrium má silnou vrstvu svaloviny, která má pro klisny značnou úlohu. Endometrium je uspořádáno ve 12–15 podélných záhybech spojených se záhyby děložního krčku. Endometrium se skládá z epiteliálních buněk, vnitřní submukozní pojivové tkáně endometria, přidružených žláz a kanálků. Aktivita a tím i výskyt endometriálních žláz a epiteliálních buněk závisí na cyklických hormonálních změnách spojených s estrálním cyklem. Tato vrstva je do značné míry zodpovědná za podporu vyvíjejícího se plodu a za připevnění a vývoj placenty (DAVIES, 2015).

3.1.5 Vejcovody

Vejcovody jsou dlouhé 25–30 cm, v průměru 2–5 mm široké, směrem do ampuly se rozšiřují na 5–10 mm. Probíhají klikatě k příslušnému rohu dělohy. U

vaječníku se nálevkovitě rozšiřují a specificky se připevňují k vaječníku, aby zůstala volná ovulační jamka. Poslední třetina vejcovodu připojená k děloze je zúžená. Při vstupu vejcovodu do rohu dělohy se nachází bradavka a na ní velmi malé vyústění (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.1.6 Vaječníky

DAVIES (2015) uvádí, že vaječníky představují vlastní výkonný párový orgán. Mají dvě funkce. První funkce je gametogenní (místo produkce gamet-vajíček), druhá funkce je steroidogenní (produkce hormonů).

Vaječníky jsou uloženy kraniálně od rohů dělohy. Tvar a velikost je velmi variabilní. Velikost se pohybuje od 2–4 cm na délku a 2–3 cm na šířku. Mohou být kulovité, oválné, na povrchu více či méně hrbolaté nebo velké jako holubí vejce. V období cyklu se jejich velikost může zvětšit 2–3krát. Kromě ovulační jamky jsou celé pokryté pobřišnicí.

Korová vrstva se nachází v centru vaječníku. Na tuto vrstvu je připojený zárodečný epitel, který se nachází v ovulační jamce. Ovulace probíhá jen v místě ovulační jamky a v tomto místě se tvoří corpus luteum, které je z větší části vnořené v parenchymu, a tak není při palpačním vyšetření hmatné. Celá korová vrstva je obalená dřevnou vrstvou (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.2 Oogeneze, Folikulogeneze

Vaječník je tvořen dvěma základními typy buněk. Intersticiálními buňkami, které poskytují podporu a zárodečnými buňkami, které poskytují rezervoár pro všechny budoucí vajíčka. Počet potenciálních vajíček obsažených ve vaječníku je určený už před narozením. Vývoj vajíček a dozrávání k ovulaci se nazývá oogeneze. Nezralá vajíčka se nazývají oogonie. Nesou úplnou komplementu chromozomů a spolu s okolní vrstvou epiteliálních nebo granulóznic buněk se nazývá primordiální folikul. Při narození se oogonie a primární oocyty začínají vyvíjet v různých rychlostech, aby vytvořily vajíčka dostatečně zralá pro oplodnění.

Folikulogeneze může být rozdělena do dvou fází. V první fázi dochází k přeměně primordiálního folikulu obsahující primární oocyt. Ve druhé fázi dochází ke konečnému vývoji a k produkci Graafových folikulů obsahující zralé vajíčko. První fáze se může začít objevovat kdykoliv po narození nebo dokonce v pozdním fetálním vývoji. Dochází k vývoji oogonií, kdy z primordiálních folikulů vznikají primární oocyty obklopené vrstvou granulóznic buněk. Primární oocyty, obklopené

epitelovými nebo granulózními buňkami, procházejí prvními fázemi meiózy. Trvání této fáze není zcela jasné, protože nezávisí na gonadotropních hormonech. Proto některé oogonie zahajují první fázi folikulogeneze před nástupem puberty. Tyto částečně vyvinuté primární oocyty se zvětšují a poté podstupují první stádium meiózy I a zastavují se ve stádiu profáze I. V této fázi se nazývají ootidy, které jsou obklopeny hustou, želé podobnou, vrstvou nazývanou se zona pellucida (DAVIES, 2015). Okolní buňky v primárním folikulu se diferencují na dvě vrstvy buněk granulózy (FAIR, 2003). Výsledkem je ootid v primordiálním folikulu, který nyní čeká na pubertu, při které jsou vylučovány hormony z přední hypofýzy, které řídí jeho další vývoj. Od puberty dál může nastat druhá fáze meiózy ve vlnách, která má zajistit pravidelný přísun rozvinutých folikulů pro ovulaci každých 21 dní během období rozmnožování. Tato druhá fáze folikulogeneze je řízena gonadotropními hormony a je tedy spojena s estrálním cyklem klisny. Nicméně ne všechny primární folikuly pokračují do ovulace, protože mnoho z nich se degeneruje a atrofuje. U monokulárních druhů jako je klisna, obvykle jen jeden dosáhne stádia připraveného k ovulaci (DAVIES, 2015).

Délka druhé fáze folikulogeneze je u klisny nejasná, ale může trvat až 21 dní. Ať už je délka jakákoliv, vlny druhé fáze oocytogeneze a folikulogeneze se vyskytují nepřetržitě a pokud se shodují se zvyšující se hladinou hormonů na konci estrálního cyklu, vzniká Graafův folikul, pokud ne dochází k atrofii (GINTHER *a kol.*, 2003). Působením hormonů na primární folikul se vyvíjí okolní epiteliální buňky, které se diferencují na theca folliculli a folikulární epitelové buňky, které vylučují folikulární tekutinu a vyplňují dutinu obklopující ootid. Folikul se nyní nazývá antrální neboli sekundární folikul. Jak roste akumulace tekutiny, zvětšuje se velikost folikulu. Samotný ootid se také zvětšuje a dokončuje meiózu I a nyní se nazývá sekundární oocyt a má haploidní počet chromozomů. Sekundární oocyt se sdružuje s vnitřním okrajem folikulu a leží na hromadě granulózních buněk zvaných cumulus ophorus. Buňky obklopující zbytek folikulu se nazývají theca. Rozdělují se na theca externa a theca interna. Buňky theca mají vaskularizovanou vnitřní vrstvu. Buňky theca interna zajišťují živiny a endokrinní kontrolu. Zatímco vnější vrstva není – theca externa. Tyto sekundární folikuly se nadále vyvíjí a nazývají se Graafovy folikuly, v nichž sekundární oocyt začíná meiózu II, která je zastavena ve fázi metafázy II. Meióza je dokončena při oplodnění nebo v době, když k němu dochází. Na konci této druhé fáze se získají zralá vajíčka připravená k ovulaci. Během této druhé fáze

folikulogeneze vyvíjí folikul hormonální receptory. Zpočátku folikuly stimulující hormonální (FSH) receptory a poté luteinizační hormonální (LH) receptory. Tyto receptory umožňují folikulům vyvíjet se synchronně s pohlavním cyklem.

V rámci folikulogeneze lze definovat tři fáze:

- Nábor – nábor folikulů ze souboru dostupných primárních folikulů.
- Selektce – selektce několika potencionálních pre-ovulačních folikulů, které podléhají dalšímu vývoji.
- Dominance – identifikace jednoho možná dvou folikulů, které budou ovulovat.

Úspěšný vývoj folikulů v těchto třech fázích závisí alespoň částečně na jejich schopnosti reagovat na zvyšování hladiny FSH, LH a estradiolu. Ačkoliv přesné mechanismy nejsou jasné (DAVIES, 2015).

U monovulárních druhů se pouze jeden z mnoha dostupných folikulů vyvine v dominantní nebo ovulační folikul (GINTHER, 2003). Dominance nebo divergence dominantního folikulu je patrná asi 3–4 dny před ovulací. S rostoucími folikuly se vyvíjejí receptory LH a LH převzme roli vedoucího folikulogeneze. Největší folikuly nyní spoléhají na vývoj LH nikoliv na FSH, proto se mohou pořád zvětšovat, i když hladina FSH klesá. Proto další nyní podřízené folikuly, které se spoléhají na FSH pro vývoj, začínají ustupovat a atrofovat s klesající hladinou FSH. Počet dominantních folikulů, které se vyvinou do stádia vhodného pro ovulaci, závisí na mnoha faktorech včetně plemene. (DAVIES, 2015).

3.3 Estrální cyklus klisen

Termínem „estrální cyklus“ označujeme všechny fyziologické změny, které můžeme pozorovat na pohlavních orgánech a v chování klisen. Tyto změny se týkají především pravidelných period, kdy je klisna svolná k páření (estrus = říje). Jeden interval cyklu definujeme od začátku jednoho cyklu říje (svolnosti k páření) k dalšímu (REECE, 2010).

Z pohledu změn na vaječnicích má estrální cyklus folikulární a luteinizační fázi a stádia proestrus, estrus, metestrus a diestrus. Nicméně se můžeme setkat i s dvojfázovou charakteristikou cyklu (estrus a diestrus) (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.4 Fáze estrálního cyklu

Proestrus

V proestru dochází pod vlivem FSH k růstu a zrání folikulů a současně pod vlivem prostaglandinu $F_{2\alpha}$ probíhá regrese žlutého tělíska z předchozího cyklu. Ve zrajících folikulech se tvoří estrogenní hormony, díky kterým se zvyšuje přívod krve do pohlavního ústrojí, dochází k edematóznímu prosáknutí sliznic, otevírá se děložní krček a začíná tvorba cervikálního hlenu. Hlavní psychickou změnou je neklid samice a zvýšená erotizace (JELÍNEK a KOUDELKA, 2003).

Estrus

Během říje, která trvá 5–10 dní, dozrávají dominantní folikuly, produkující estrogeny, které indikují sexuální aktivitu. Ukončení vývoje dominantních folikulů uzavírá ovulace, která probíhá 24–48 hod. před skončením ochoty se pářit (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Metestrus

Metestrus je stádium po říji, které je charakterizováno zánikem příznaků psychického a pohlavního podráždění. Dochází k uzavření děložního krčku a děloha ztrácí zvýšený tonus. Na vaječnicích dochází k vývoji jednoho nebo více žlutých tělísek, v kterých začíná produkce progesteronu (JELÍNEK a KOUDELKA, 2003).

Diestrus

Dokončený vývoj žlutého tělíska charakterizuje diestrus. Pokud klisna zabřežne, nedojde k uvolňování prostaglandinu $F_{2\alpha}$, žluté tělísko zůstává na vaječnicích a dále produkuje progesteron, který garantuje další nerušený vývoj embrya plodu v průběhu březosti až do porodu (JELÍNEK a KOUDELKA, 2003).

V případě, že nedošlo k páření, anebo klisna nezabřežla, vyvíjející se žluté tělísko po 14–15 dnech přestane produkovat progesteron a postupně zanikne. Nová říje se objeví po 1–2 dnech (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.5 Zapouštění klisen

Správné zapouštění klisny je rozhodujícím momentem pro graviditu. Při připouštění dbáme na kvalitu spermatu, vhodnou dobu připuštění, důslednou hygienu a správnou dobu připuštění.

Pro správné připuštění klisen je důležité znát dobu, po kterou si spermie v pohlavním aparátu klisny zachovává svojí oplozovací schopnost. Oplozovací schopnost spermie ztrácí postupně, záleží na kvalitě spermatu a vnitřním prostředí

pohlavního aparátu klisny. Obecně lze uvažovat, že životnost spermií u přirozené plemenitby je 48 hod., u inseminace čerstvým spermatem 36–48 hod. a u inseminace zmrazeným spermatem 12–24 hodin (DUŠEK *a kol.*, 2011).

3.6 Detekce říje a doba inseminace klisny

Schopnost detekovat říji a inseminovat nebo připouštět klisny v termínu ovulace je jedním z nejdůležitějších předpokladů úspěšné reprodukce. V chovu koní je detekce říje pracná, každodenní a čas vyžadující činnost v sezóně páření. Zároveň je i činností, která vyžaduje jistý stupeň odbornosti, protože říje klisen je především procesem kaskádovitých změn v chování klisen v souvislosti se změnou v dominanci hormonálního řízení (ŠŤASTNÁ *a ŠŤASTNÝ*, 2016).

Určení doby inseminace znamená předpovědět dobu ovulace, což není snadná záležitost. K určení doby ovulace můžeme využít rektální vyšetření folikulu na vaječnicku sonografem a palpací, rektální vyšetření dělohy sonografem, fenomén tažnosti cervikálního hlenu a délky říje vzhledem k individualitě jedince a ročnímu období (DUŠEK *a kol.*, 2011).

Ačkoliv existují i alternativní metody detekce říje klisen, nejefektivnější je použití hřebce na zjištění ochoty se pářit. V chovech s problémovou detekcí říje je vhodné využití alternativních metod zjišťování březosti. Mezi alternativní metody patří zjišťování vaginální impedance, zjišťování říje androgenizovanou klisnou (ošetřená testosteron propionátem), měření tělesné teploty, měření teploty mléka (v první poporodní říji), zjišťování hladiny progesteronu (ŠŤASTNÁ *a ŠŤASTNÝ*, 2016).

Aby se maximalizovala účinnost šlechtitelského programu a v konečné fázi i míra březosti, je přesné načasování ovulace důležitou součástí chovu (SAMPER, 2009).

K ovulaci obvykle dochází 24–48 hodin před koncem říje (MCKINNON, 2011). Při inseminaci zmrazeným spermatem je vhodné klisny inseminovat těsně před nebo po ovulaci. Tato technika vyžaduje vícenásobné vyšetření, úsilí a náklady (AVANZI, 2015).

Nejprůkaznějšími příznaky říje klisen jsou:

- stáhnuté uši dozadu
- tlačení se na stěnu
- zvednutý ocas
- vykopávání
- dupání
- krčení
- řehtání
- časté močení
- blýskání

3.7 Březost

Březost je proces, při kterém se v děloze savců vyvíjí jeden anebo více plodů. Začíná nidací oplozeného vajíčka a končí porodem zralého plodu nebo se může předčasně přerušit (KLIMENT, 1983).

Klisna je samice s nitroděložním typem oplození, takže při páření nebo inseminaci je ejakulát deponovaný do krčku dělohy, případně při inseminaci přímo do dělohy. U klisen jako u jiných druhů dochází při průchodu spermií dělohou a vejcovodem k selekci spermií především na základě jejich pohybové aktivity a povrchové rezistence, aby odolaly prostředí dělohy, které není pro jejich přežití příznivé (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Pokud klisna zabřezne, ustanou další příznaky říje a také skončí všechny změny na pohlavních orgánech. Dojde k uklidnění klisny, říje se neopakují. Pohlavní orgány se zcela připravují k jedinému účelu, a to k výživě vyvíjejícího a rostoucího plodu (SPECIÁLNÍ ZOOTECHNIKA, 1958).

Po oplození sestupuje embryo do dělohy po dobu 4 až 6 dnů. Po přechodu zárodku ve stádiu moruly do dělohy je vyživovaný absorbcí živin z děložního mléka. Po dobu první 16 dní blastocysta volně migruje z jednoho do druhého rohu dělohy. Toto stádium končí centrální implantací neboli nidací 16. den nezávisle na straně ovulujícího vaječníku a následnou tvorbou placenty (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Březost klisny trvá průměrně 335 dní, nicméně klisna často nosí hříbě buď kratší anebo delší dobu (SPECIÁLNÍ ZOOTECHNIKA, 1958).

DUŠEK *a kol.* (2011) uvádí délku gravidity 333 dní s fyziologickým rozpětím 310–360 dní.

3.8 Diagnostika březosti

Jednoduchou metodou diagnostiky gravidity je zevní vyšetření klisny. Zakládá se na vizuální kontrole změny konfigurace dutiny břišní, která se mění ve vysokém stádiu gravidity, nicméně tato metoda je málo efektivní a v případě časně diagnostiky odhalení negravidních klisen je nepoužitelná. U vysokobřezích klisen můžeme diagnostikovat graviditu na základě pohybů plodu, které se přenáší na stěnu dutiny břišní. Větší vypovídací hodnotu má metoda poslechu srdečních ozev plodu, která je použitelná od druhé poloviny březosti (ŠŤASTNÁ *a* ŠŤASTNÝ, 2016).

DUŠEK *a kol.* (2011) uvádí, že diagnostiku gravidity lze rozdělit na hormonální metody a přímé metody průkazu gravidity. Mezi přímé metody patří palpační vyšetření březí dělohy, které může poskytovat poměrně přesné údaje od 1. měsíce březosti. Absolutně nejspolehlivější metodou je sonografické vyšetření. Sonograf je možné použít od 11. dne po oplodnění.

Mezi hormonální metody, které se uplatnily u koní nejvíce, patří metoda chemického průkazu estrogenů v moči klisen od 120. dne březosti neboli Cubonihova reakce a metoda biologického průkazu séra březích klisen v krvi klisny od 40. do 120. dne březosti – Asheim-Zondakova reakce.

ŠŤASTNÁ *a* ŠŤASTNÝ (2016) rozdělují metody diagnostiky gravidity na klinické a laboratorní metody diagnostiky gravidity klisen. Mezi klinické metody patří:

- Vaginální diagnostika gravidity

Vaginální vyšetření se vykonává pomocí poševního spekula. U gravidních klisen lze už při zasouvání spekula cítit mírný odpor z přítomného hustého lepkavého hleny. Sliznice je matnější bledší, hlen je sivožluté barvy a vytváří na povrchu sliznice pochvy závoj. Vnější branka krčku je uzavřena hustým hlenem.

- Rektální vyšetření klisny (palpační vyšetření)

Může se použít od 30. dne březosti. Podstatné změny se týkají především gravidní dělohy.

- Ultrasonografická diagnostika

Mezi laboratorní metody diagnostiky gravidity patří:

- Stanovení sériového gonadotropinu

Sérový gonadotropin PMSG je placentový hormon, který se nachází díky přítomnosti specifických struktur jen v děloze klisen a pouze v určitém období gravidity, takže se na základě přítomnosti GTH dá stanovit v čase od 40. do 140. dne březosti. Po 40. dnu březosti je 92 % přesnost metody. U této metody je nevýhoda, že se můžou získat falešné výsledky, protože endometriální pohárky produkují GTH i po embryonální mortalitě.

- Stanovení estron sulfátu

Estron sulfát je možné stanovit z krve, mléka, moči i z výkalů. Vysokého procenta jistoty se dosahuje po 60. dnu gravidity.

- Stanovení faktoru časně gravidity

Faktor časně gravidity se vyskytuje ve dvou formách jako faktor vejcovodu a faktor vaječníku. Nachází se v krvi a mléku velmi brzo po oplodnění a není detekovatelný po 30. dnu březosti. Je produktem živého embrya.

- Cubonihova reakce

Je test na stanovení estrogenů v moči na základě fluorescence moče. Po 100. dni gravidity má 90 % úspěšnost, po 150. dni má 100 % výpovědnou hodnotu (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

3.9 Faktory ovlivňující plodnost

Plodnost vyjadřuje schopnost zvířat produkovat pohlavní buňky schopné oplodnění. U samic plodnost znamená schopnost pravidelného oplodnění, gravidity a donošení životaschopného mláděte, u samečů poté schopnost páření a produkci kvalitního ejakulátu při udržení si dobré oplozovací schopnosti do vysokého věku (KLIMENT a kol., 1983).

3.9.1 Faktory ovlivňující plodnost samců:

Vlivy působící na plodnost samců lze rozdělit na genetické a negenetické faktory. Genetické faktory jsou dány geneticky a jsou známy vlivy dané druhovou a plemennou příslušností. Pokud samec trpí anomálií jako kryptorchismus nebo hypoplazie varlat, pak z důvodu zhoršené plodnosti a dědičnosti těchto vad je nutno samce vyřadit z plemenitby.

Negenetické faktory reagují na podmínky chovu. Patří mezi ně: výživa, teplota, světlo, využívání samců při připouštění, pohyb, ošetřování a věk (MAJZLÍK, 2000).

3.9.2 Faktory ovlivňující plodnost samic:

Plodnost samic se z genetického hlediska vyznačuje značnou druhovou stabilitou. Plodnost u samic dále ovlivňuje individualita a věk samice. Rovněž je doložena tendence dědění vícečetných porodů. Nejdůležitějším faktorem z vnějších činitelů je úroveň výživy, kdy nedostatečná výživa samic zhoršuje plodnost, případně způsobuje sterilitu, u březích zapříčiňuje vyšší embryonální mortalitu. Mezi další faktory ovlivňující plodnost je technika a technologie chovu, která zahrnuje i vliv člověka. Teplota působí přes sezónní vlivy. Špatný zdravotní stav ovlivňuje negativně plodnost (MAJZLÍK, 2000).

TOLMAN (2019) uvádí jako faktory ovlivňující plodnost, věk klisny, temperament klisny a kondici klisny.

3.10 Poruchy oplodnění

Selhání oplodnění může být následkem smrti vajíčka dříve, než dojde ke spojení se spermií, strukturální nebo funkční abnormalitou vajíčka nebo spermatu, fyzické bariéry v genitálním traktu klisny a následné zabránění přenosu gamety na místo hnízdění a ovulačního selhání.

3.11 Ztráta březost

Ztráta březosti je zodpovědná za většinu poruch březosti u hospodářských zvířat. Ztrátu březosti lze rozdělit na embryonální a fetální mortalitu. Ke ztrátě březosti může dojít v různých fázích:

1. Před uznáním březosti klisnou – časná embryonální mortalita
2. Po uznání březosti klisnou – pozdní embryonální mortalita
3. Během fetálního stádia – fetální mortalita (HAFEZ a HAFEZ, 2000).

Embryonální mortalita

Embryonální mortalita označuje smrt oplodněných vajíček a embrya až do konce implantace. Asi 20 až 40 % embryí se u hospodářských zvířat ztratí. Časná embryonální mortalita je častější než pozdní embryonální mortalita. Časná embryonální mortalita by měla být považována za normální proces eliminace nevhodných genotypů (HAFEZ a HAFEZ, 2000). K většině těchto ztrát dojde během prvních 40 dnů gravidity. Odumření je zjištěna absencí konceptu téměř v 50 % případů (TOLMAN, 2019). Mezi příčiny, které mohou způsobovat embryonální mortalitu, patří:

- endokrinní faktory – Zrychlený nebo zpožděný transport vajíčka v důsledku nerovnováhy estrogenu a progesteronu vede k předimplantační smrti.
- laktace – Připouštění klisen s hříbětem vedlo k časně embryonální mortalitě, která je přičítána ke snížené obranyschopnosti dělohy, stresu z laktace a neúplné regeneraci.
- výživa klisny – Kalorický příjem a specifické nutriční nedostatky ovlivňují rychlost ovulace a oplodnění, stejně jako mohou způsobit embryonální mortalitu. U klisen je kritické období pro embryonální resorpci 25 až 31 dní po ovulaci.
- věk klisny,
- ukončení v děloze – Stupeň placentárního vývoje je primárně ovlivněn dostupností prostoru a cévním zásobením v děloze. Se zvyšujícím se počtem implantací se snižuje cévní zásobení na každé místo a omezuje vývoj placenty. To má za následek embryonální a fetální úmrtnost.
- tepelný stres,
- sperma,
- Nekompatibilita – Zděděný genotyp může zahrnovat řadu genetických faktorů, které vedou k nekompatibilitě a časným ztrátám embryí. Může existovat nekompatibilita mezi spermií a matkou, mezi spermií a vajíčkem nebo zygotou a matkou.

Fetální mortalita

Do fetální mortality patří potrat. Potrat je ukončení březosti s vyloučením plodu rozpoznatelné velikosti. Potraty mohou být spontánní nebo indukované nebo infekční a neinfekční (HAFEZ a HAFEZ, 2000).

3.12 Způsoby reprodukce

3.12.1 Přirozené připouštění

Přirozené připouštění lze definovat jako fyzický kontakt samice a samce, kdy dojde k páření. Při přirozené plemenitbě záleží hlavně na ochotě samice se pářit (REECE, 2010).

První zařazení hřebce do plemenitby by mělo být ve 3 letech, ale v jeho první sezóně by měl pokrýt jen pár klisen. Čtyřletý hřebec je schopen pokrýt kolem 50 klisen, ale u míry plodnosti a libida lze očekávat, že nebude konzistentní. Do 5 let by měl dosáhnout svého plného potencionálu, což je u hřebců 50–100 klisen za sezónu a až tři klisny denně s dobou odpočinku (DAVIES, 2015).

U přirozeného připouštění můžeme rozeznat několik způsobů zapouštění klisen. První možností je divoké připouštění. Divoké připouštění je přirozený způsob u stád volně žijících, polodivokých nebo divokých koní. Nejsilnější hřebec vyhledává klisny v říji a odhání slabší hřebce. Tento způsob se u nás nepoužívá.

Dalším způsobem, kterým můžeme zapustit klisny, je připouštění skupinové, kdy do vybraného stáda klisen připustíme vybraného hřebce, který se volně pase a připouští klisny v říji.

Posledním způsobem je připouštění individuální, které se dá rozdělit na připouštění volné nebo z ruky.

Při volném připouštění se klisna s hřebcem pouští volně do ohrady a tam hřebec sám klisnu připustí. Tato metoda zaručuje vysoké procento březosti, ale kvůli vysokému riziku poranění a vysílení hřebce se nepoužívá.

Nejvíce je rozšířené připouštění z ruky (SPECIÁLNÍ ZOOTECHNIKA, 1958). Připouštění z ruky je standardem ve většině zemí a s rostoucí hodnotou chovu je značně praktikováno.

Během procesu připouštění z ruky by měli být pouze dva vodiči, jeden pro každého koně, v ideálním případě by měli mít pevnou obuv a přilbu. Vodič hřebce by měl také nést hůl, kvůli případnému pokárání hřebce.

Jakmile je klisna připravena k zapuštění, nejdříve se „zkouší“ za zkušební stěnou, aby nedošlo k poranění hřebce. Pokud je klisna připravena k zapuštění, odvede se od zkušební stěny a přivede se k ní hřebec. Jakmile je penis hřebce zcela vztyčen, dovolí se mu skok. Pomocný ošetřovatel přitáhne ocas klisny k jedné straně a zavede penis do vaginy. Tato metoda se však již nepovažuje za správnou praxi, protože neočekávané vnější podněty mohou narušit normální sled událostí vedoucí k ejakulaci, zejména u mladých hřebců. Úspěšná ejakulace je signalizována rytmickými pohyby ocasu hřebce. Po ejakulaci by si měl hřebec odpočinout na klisně. Po seskoku z klisny odvedou vodiči koně pryč. Klisna se může provázet, aby nedošlo k vypuzení spermatu. Hřebec se odvede do mycího boxu, kde by mu měl být umyt penis a jeho genitálie vyšetřeny (DAVIES, 2015).

3.12.2 Umělá inseminace

Historie inseminace klisen se datuje až do roku 1300, kdy se Arabům podařilo přenést sperma kvalitního hřebce a oplodnit s ním několik klisen. V roce 1678 v Nizozemsku A. van Leeuwenhoek, který objevil mikroskop, byl první, který viděl spermatozoa, které považoval za předchůdce živých tvorů.

Po první světové válce se výzkum inseminace přesunul na skot a ovce. Důvodem byl nejen klesající význam koně, ale také bylo u těchto druhů snadnější dosáhnout pokroku. Ve dvacátých až šedesátých letech došlo k významným pokrokům, jako byl vývoj umělých vagin a fantomů, které umožňují odběr spermatu.

Vzhledem k tomu, že se role koně změnila ze zemědělského pracovního koně na partnera pro jezdecké sportovní a volnočasové aktivity, se pokles počtu koní v 60. a 70. letech zvrátil (AURICH, 2012).

Rozvoj inseminace u koní v Evropě omezila válka. Po druhé světové válce došlo k rozšiřování inseminace i v bývalém Československu v souvislosti s likvidací hřebčí nákazy, které byla kvůli velkému importu koní značně rozšířená.

Inseminace zvířat byla mnoho roků 20. století akceptována a řádně využívaná metoda reprodukce u krav a prasat, až se dospělo k širšímu využití v chovu koní. Dnes existují stejné podmínky pro její využití v chovu koní jako u jiných druhů zvířat (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).

Umělá inseminace se praktikuje po celém světě u hospodářských zvířat a koní a stále více se využívá u společenských zvířat a volně žijících druhů. Dále je inseminace základem pro další biotechnologické metody od embryotransferu po

klonování. Po desetiletí výzkumu se inseminace zaměřila na skot, ale během posledních 25 let získala tato biotechnologie stále větší uznání v chovu koní. Důležité rané studie inseminace u savců byly provedeny u koňovitých, avšak až na konci 19. století byly u koní zavedeny první programy umělé inseminace.

Vzhledem k dlouhému a proměnlivému trvání estra u klisen a k obtížné diagnostice, která by přesně dokázala předpovědět ovulaci, vyžaduje inseminace koní podrobné znalosti fyziologie estrálního cyklu klisny a časné určení březosti (AURICH, 2012).

Výhody inseminace klisen

- Zdravotní kontrola. Nedochází k přenosu pohlavních chorob jako při páření.
- Snížení rizika poranění hřebce, klisen a ošetřovatele.
- Možnost uskladnit ejakulát, je možné inseminovat klisny v libovolné době (co nejbližší k ovulaci), bez ohledu na přítomnost hřebce.
- Deponování ejakulátu přímo do těla dělohy v optimální době.
- Lepší využití hřebců při ředění ejakulátu a k přípravě většího počtu inseminačních dávek, což nám umožňuje inseminovat jedním ejakulátem víc klisen ve stejném čase a v důsledku kontroly ejakulátu se zabezpečí požadovaná kvalita.
- Možnost hlubokého zmrazení ejakulátu a jeho uskladnění v tekutém dusíku na neomezenou dobu.
- Klisna nemusí přijít do kontaktu s hřebcem.
- Ejakulát určený na inseminaci je možné použít čerstvý, chlazený, který se může přepravit i mimo místo odběru na větší vzdálenost anebo uskladněný zmrazený na pozdější použití (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016).
- Snížení nákladů a stresu při přepravě klisny nebo klisny s hříbětem (SCHWEIZER a kol., 2006).
- Nepřetržitá dostupnost mražených inseminačních dávek.
- Lepší načasování inseminace při inseminaci mraženým spermatem.
- Zvýšení genetické zásoby (SAMPER, 2009).

Umělá inseminace je technika, při které se vpraví klisně do dělohy v optimálním čase sperma, které má dostatečný počet živých a normálních spermií. I když se může zdát tento postup jednoduchý, správné načasování a koordinace událostí vede k optimální míře březosti. (SAMPER, 2009).

Nevýhody inseminace:

- U chlazeného spermatu lze brát jako nevýhodu náklady majitele klisny na sběr, balení a přepravu spermatu a zvýšené veterinární náklady na vyšetření klisny a případnou hormonální kontrolu cyklu,
- Sperma od některých hřebců nepřežije chlazení a transport (SCHWEINER *a kol.*, 2006).
- Nevýhodou u mraženého spermatu je nižší míra březosti od některých hřebců a nedostatečné ujištění o kvalitě inseminační dávky.
- Zvýšení nákladů pro majitele.
- Zvýšení práce.
- Nižší míra březosti průměrně 50 % (SAMPER, 2009).

Inseminace čerstvým spermatem

Za inseminaci čerstvým spermatem se považuje takové provedení, kdy je hřelec odebrán na farmě a sperma je použito buď okamžitě v nezpracovaném stavu, nebo je zředěno (SAMPER, 2009).

Inseminace zchlazeným spermatem

Inseminace zchlazeným spermatem znamená, že sperma se po odběru zředí a nástřikem se pomalu ochladí na teplotu 5-8 °C. Poté se transportuje k použití do 12–36 hodin (SAMPER, 2009). DUŠEK *a kol.* (2011) uvádí použitelnost zchlazeného spermatu 12–48 hodin po odběru podle použitého ředidla.

Inseminace dlouhodobě konzervovaným (mrazeným) spermatem

Dlouhodobě konzervované sperma je odebíráno a zpracováno vhodným způsobem a poté skladováno v tekutém dusíku, aby byla možnost použití několik dní, měsíců nebo let po odběru (SAMPER, 2009). Takto skladované a uchovávané sperma si udržuje svoji oplozovací schopnost po desítky let (DUŠEK *a kol.*, 2011).

Inseminace nízkou dávkou spermatu

Nedávno byly vyvinuty metody inseminace s nízkou dávkou, které umožňují použití menších vzorků spermatu jako vzorku pro inseminaci. To je potencionálně důležité u hřebců se špatnou kvalitou spermatu jako např. s nízkou koncentrací nebo objemem (DAVIES, 2015). Obecně doporučený minimální počet spermií potřebný pro umělé oplodnění u klisny je vyšší než 200×10^6 progresivně pohyblivých spermií. Řada studií prokázala, že ultrazvukem řízená nebo rektálně vedená hluboká inseminace s 5×10^6 čerstvých spermatozoí může produkovat uspokojivé míry březosti. Při použití hysteroskopické inseminace je možné úspěšně snížit inseminační dávku na 1×10^6 zmrazených a rozmrazených spermií. Chirurgickým oplodněním vajíček u klisen lze snížit inseminační dávku na pouhých 2×10^5 spermatozoí, při uspokojivé míře březosti (MCKINNON, 2011).

Inseminace kryokonzervovanými epididymálními spermiemi

Rostoucí povědomí o nových technologiích při uchování spermatu a požadavky na zachování cenné genetiky vedlo ke zvýšení dříve nedostupných postupů, jako je zmrazení spermatu od kastrováných nebo nedávno zemřelých hřebců.

Obecně platí, že většina těchto konzervovaných buněk se shromažďuje v důsledku ejakulace a buď se ochladí na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a skladuje se po dobu 24–48 hodin, nebo se zmrazuje a uchovává v kapalném dusíku po neurčitou dobu. Mohou však nastat situace, které brání přirozenému odběru a uchování spermatu. Patří mezi ně odběr spermatu od samců, kteří byli kastrováni nebo kteří mají smrtelné zranění (MCKINNON, 2011). Odběr epididymálních spermií u živého sedovaného koně je v porovnání s izolací spermií z nadvarlete v laboratoři neefektivní metoda, jelikož se získá velmi malý počet spermií. Chirurgické odstranění obou varlat s nadvarlaty je považováno za nejefektivnější způsob získávání epididymálních spermií (ŠICHTAŘ a JANOŠÍKOVÁ, 2017).

Spermie lze sbírat buď usazením epididymálního kanálu nebo rozdrcením tkáně, aby se uvolnily spermie. Přestože byla po použití zmrazených a rozmrazených epididymálních spermií hlášena březost, je plodnost epididymálních spermií in vivo nižší než u ejakulovaných spermií (MCKINNON, 2011). ŠICHTAŘ a JANOŠÍKOVÁ (2017) uvádí tři metody izolace spermií: aspirace, flotace a retrográdní výplach hlavy nadvarlete. MORRIS a kol. (2001) uvádí březost 45 %, při použití hysteroskopické metody inseminace s koncentrací 200×10^6 čerstvých

epididymálních spermií. Při použití kryokonzervovaných epididymálních spermií se březost snížila na 18 %.

Tato metoda není ještě dostatečně prozkoumaná a je nutné provést další výzkum (MCKINNON, 2011).

Postup při inseminaci klisen

Vlastní proces inseminace klisen není složitý. Na rozdíl od krav, kdy se inseminační pipeta zavádí do krčku dělohy prostřednictvím manipulace přes konečník, inseminace klisen se vykonává úplně vaginálně.

Po detekci říje a výběru klisny na inseminaci se klisna přivede do prostoru určenému na inseminaci (fixační box) a tam se klisna fixuje. Před inseminací se klisně spoutají pánevní končetiny nebo se zvedne hrudní končetina kvůli bezpečnosti (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016). Kořen ocasu se ováže a odtáhne se na bok. Vnější pohlavní orgány se důkladně omyjí, osuší a vydezinfikují, aby se zabránilo kontaminaci pochvy (SAMPER, 2009).

Pokud je klisna připravená, z přepravní nádoby se vyjme inseminační dávka, buď z přepravního boxu, nebo z kontejneru na dusík. Na inseminaci klisen se používají plastové katetry – pipety, na které se připojí injekční stříkačka anebo plastová nádobka s naředěným ejakulátem, případně rozmrazenou inseminační dávkou. Katetr má zpravidla délku 50–60 cm s průměrem 1–2 mm. Samotná inseminace se provádí vaginální metodou s vizuální kontrolou nebo bez vizuální kontroly.

Při inseminaci s vizuální kontrolou se používá poševní spekulum, které musí být sterilní a má přibližně tělní teplotu. Spekulum se opatrně zasune do pochvy, kde se rozevře. Pod kontrolou zraku se zavede katetr do krčku dělohy asi 10–20 cm hluboko, kde se deponuje inseminační dávka. Jednodušší a rychlejší metodou je metoda zasouvání katetru pod kontrolou ruky (ŠŤASTNÁ a ŠŤASTNÝ, 2016). Špička inseminační pipety se umístí do sevřené ruky a na zadní stranu ruky se nanese sterilní nespermicidní lubrikační gel. Zakrytá ruka a inseminační pipeta jsou zavedeny do pochvy až k vnější brance krčku dělohy, kde inseminátor identifikuje děložní krček a opatrně zavede inseminační pipetu do dělohy, kde deponuje inseminační dávku (BRINSKO a kol., 2011).

3.13 Embryotransfer

Embryotransfer je metoda asistované reprodukce, která ve světě vstoupá v oblibě (PYCOCK, 2014). První úspěšný přenos embryí u koní byl uskutečněn v roce 1972 (KRAEMER a DUANE, 2013). Principem embryotransferu je vyjmutí embrya z dělohy klisny (dárkyně) a jeho přenesení do dělohy jiné klisny (příjemkyně) (DUŠEK a kol., 2011). Nejdůležitějším bodem úspěchu je plodnost klisny „dárkyně“ a „příjemkyně“, plodnost hřebce a zkušenosti a technické dovednosti veterináře (GUERIN a kol., 1997).

Přínosem metody embryotransferu je:

1. Zkrácení generačního intervalu. Možnost reprodukčního využití již tříletých, případně dvouletých klisen. Dochází ke zkrácení intervalu danou rozdílem pohlavní a tělesné dospělosti.
2. Intenzivní reprodukční využití vynikajících klisen. Možnost narození více hříbat od jedné klisny za jeden rok. Teoreticky lze při každé říji využít dozrávající vajíčko, klisnu oplodnit a embrya přenést do náhradních matek
3. Využití klisen působících ve sportu. Chov a sportovní využití klisny se vzájemně vylučují. Díky embryotransferu lze mít od sportovně aktivní klisny hříbata.
4. Řešení některých druhů neplodnosti klisen. Nejvíce u klisen, které jsou sice schopné vyprodukovat embryo, ale kvůli neodpovídajícím podmínkám v děloze embryo odumírá (ERC MULLER, 2019).

3.13.1 Historie embryotransferu:

První zmínky o embryotransferu u koní byly v roce 1972, kdy se prováděly přenosy embryí mezi koněm, oslem, mulou nebo mezkem. Přenesené a shromážděné zygoty byly přeneseny zpět do klisen nebo oslů (KRAEMER a DUANE, 2013). V roce 1974 se poprvé narodilo živé hříbě, které pocházelo z embryotransferu. Ze začátku byla koňská embrya přenesena ihned po vypláchnutí, dokud nebyly v pozdních osmdesátých letech popsány kultivační média a technika pro úspěšné chlazení a krátkodobé skladování. První úspěšná kryokonzervace koňských embryí byla poprvé popsána v roce 1982, kdy nejúspěšnějším způsobem bylo buď pomalé zmrazení nebo vitrifikace (ultrarychlé zmrazení) malých embryí (MCCUE, 2015). KREAMER a DUAN (2013) uvádí, že první potomek ze zmrazeného embrya byl v roce 1983. Pokročilé techniky asistované reprodukce jako je transfer oocytů,

intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI) a klonování byly zavedeny do chovu koní koncem 90. let a počátkem 20. století. V současné době embryotransfer zahrnuje superovulaci, přenos čerstvých nebo chlazených embryí, vitrifikaci embryí, odběr oocytů, intracytoplazmatickou injekci spermií a klonování (MCCUE, 2015). V tabulce č. 1 je znázorněn časový sled událostí ve vývoji embryotransferu.

Tabulka 1: Časový úsek v historii embryotransferu u koní:

Rok	Mezník
1972	První potomek po embryotransferu u koní (hybrid, chirurgická)
1974	První koňský potomek po embryotransferu (neoperační metoda,
1974	Superovulace u sezónně anestrických klisen
1975	5 březích klisen z neoperačního přenosu embryí
1979	Žádost o registraci koní po embryotransferu (zamítnuto)
1980	Dvě hříbata z rozděleného embrya
1983	První krátký kurz embryotransferu u koní
1983	Potomci embryotransferu ze zmražených embryí
1983	Superovulace v období rozmnožování
1984	První mezinárodní sympozium o embryotransferu u koní
1984	Komerční využití koňského odborného vzdělání (vysokoškolské
1985	Komerční využití koňského odborného vzdělání (soukromé
1985	První potomek zebry z embryotransferu
1985	První potomek koně převalského z embryotransferu
1985	Mezinárodní přeprava embryí koní v dusíku
1987	Chlazení embryí na 24 hodin
1989	Přeprava chlazených embryí
1991	Intrafolikulární transfer oocystů
1991	První koňský potomek oplodněný in vitro
1993	Přenos koňských oocytů
1997	Biopsie Koňského embrya
1998	První koňský potomek z intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI)
2000	První koňský potomek z intramalfopickýtransfěr gamety
2002	Kryokonzervace koňských oocytů
2003	První potomek koní klonovaný z plodových buněk
2003	První potomek koní klonovaný ze somatických buněk
2010	První hříbě z biopsie, vitrifikované embryo
2012	Superovulace klisen pomocí rekombinantních koňských

Zdroj: *KRAEMER a DUANE*, 2013

3.13.2 Klisna dárce embrya („dárkyně“)

Hlavním důvodem, proč se embryotransfer provádí je možnost získání oocytů klisen, které nemohou zabřeznout a odchovat vlastní hříbě z důvodu fyziologického zdraví. Získané oocysty se přenesou do zdravé klisny, která hříbě odnese a porodí (PYCOCK, 2014).

Klisny „dárkyně“ jsou obvykle cenné, za které stojí vynaložit peníze. Měly by být zdravé, ale i klisna se zánětem dělohy může zabřeznout. Vypláchnuté embryo z dělohy se zánětem se omyje a vloží se do klisny „příjemkyně“. Nicméně je vzácné, když tato embryo přežijí. Klisna „dárkyně“ by měla být ideálně ve věku 3-10 let a měla by být zdravá (HARTMAN *a kol.*, 2011).

Každá klisna „dárce embrya“ by měla mít minimálně dvě klisny „příjemce embrya“ (SAMPER, 2007).

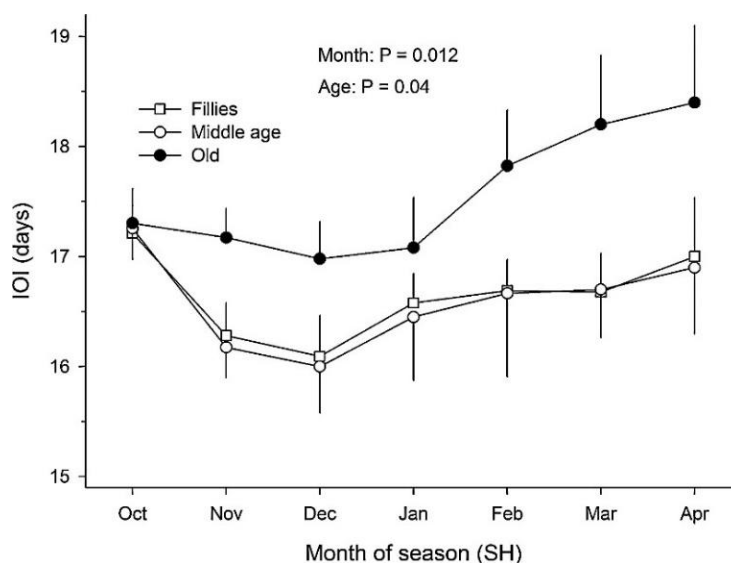
3.13.3 Klisna příjemce embrya („příjemkyně“)

Správný výběr a příprava klisen „příjemkyň“ je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem ovlivňující úspěšnost embryotransferu. Jako klisny „příjemkyně“ jsou upřednostňovány mladé klisny, které měly v minulosti jedno nebo dvě hříbata. Ideální jsou klisny ve věku 3-10 let. Nejčastěji se používají klisny, které měly dva nebo více normálních říjových cyklů a důležité je, aby byly vybrány příjemkyně, které ovulovaly 1 den před, ve stejný den nebo 3 dny po ovulaci „dárkyně“ (MCKINNON, 2007).

3.13.4 Synchronizace říje

Jedním z nejdůležitějších prvků úspěšného postupu přenosu embryí je synchronizace cyklů klisen-dárkyně a příjemkyně. Důležité je, aby děloha klisny příjemkyně byla připravená k přijmutí a výživě embrya (LESTÉ-LASSERRE, 2015). Nejčastěji se k synchronizaci používá prostaglandin F_{2α} (NETO *a kol.*, 2018). Největší vliv na synchronizaci říje u dárkyně a příjemkyně má věk, kdy klisny od 3-10 let měly délku pohlavního cyklu podobnou, ale klisny ve věku 13-26 let měly pohlavní cyklu delší než klisny ve věku 3-10 let viz. graf č.1 (MARINONE *a kol.*, 2015).

Graf 1: Průměrná délka pohlavního cyklu v závislosti na věku klisny:



Zdroj: MARINONE *a kol.*, 2015

3.13.5 Superovulace

Při superovulaci se získává více oocytů během jednoho estrálního cyklu. Získáním většího počtu oocytů nebo embryí dochází ke zvýšení počtu potomků a počtu ovulací, které mohou umožnit získání více in vivo zralých oocytů.

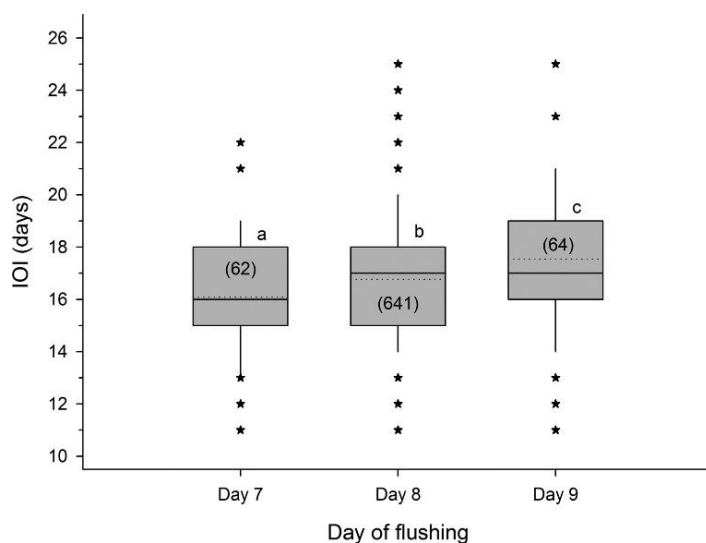
Látky používané pro superovulaci

1. Gonadotropin-releasing hormon (GnRH)
2. Equine Pituitary Extract (EPE), (extrakt z hypofýzy)
3. FSH hormon
4. Inhibinová vakcinace (MCKINNON, 2007).

3.13.6 Výplach embryí

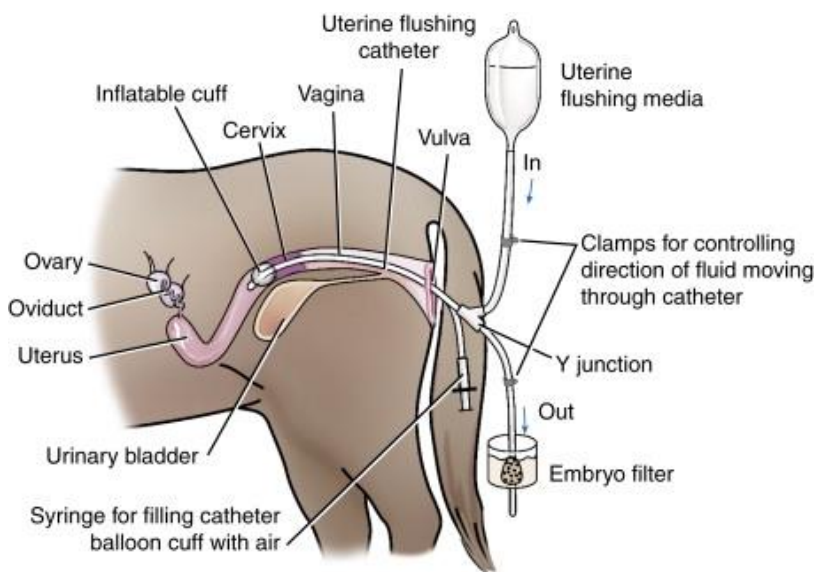
Výplach embryí se provádí pomocí vyplachovacího média, které se pomocí katetru vlévá do dělohy klisny. Vypláchnutá embrya jsou získávána přes speciální filtr. Embryo obvykle vstupuje do dělohy 5. den po ovulaci ve fázi moruly. Výplach embryí se provádí 7. den po ovulaci transcervikálním děložním výplachem viz obrázek č. 1. V tomto okamžiku většina embryí dosáhne vývojového stupně blastocysty. Pokud bude embryo kryokonzervováno, je nejlepší ho vypláchnout 6. den po ovulaci (REENSKAU, 2014). MARINONE *a kol.* (2015) uvádí, že den vypláchnutí embrya nemá vliv na prodloužení pohlavního cyklu viz graf č.2.

Graf 2: Vliv dne provedení výplachu na délku pohlavního cyklu



Zdroj: MARINONE *a kol.*, 2015

Obrázek 1: Výplach dělohy



Zdroj: SQUIRES *a kol.*, 2003

Odebraná embrya je potřeba zhodnotit. Embrya se řadí do čtyř skupin od 1 do 4. Nejlepší skupina je 1 - excelentní, kdy embryo má symetrický kulovitý tvar, jednotnou barvu a velikost buněk. Nejhorší skupina je 4 – špatné, kdy embryo je obdélníkovitého nebo nepravidelného tvaru s degenerativními buňkami. Hodnotí se také vývojová stádia viz tabulka 2 (BRINSKO *a* BLANCHARD, 2011).

Tabulka 2: Předpokládaný vývoj embryí podle stáří:

Stáří embrya (dny)	Průměrná velikost embrya (um)	Vývojové stádium
6	200	morula/raná blastocysta
7	400	morula/blastocysta
8	1000	blastocysta
9	2000	blastocysta

Zdroj: BRINSKO a BLANCHARD, 2011

3.13.7 Přenos embryí

Pro přenos embryí se využívají dvě metody, a to chirurgická a nechirurgická metoda.

Principem chirurgické metody je provedení laparotomie. Klisna, do které se vkládá embryo, je lokálně znecitlivěná. Za sterilních podmínek chirurg provede řez na boku klisny, lokalizuje dělohu, vytáhne děložní roh. Technik udělá malý otvor do děložního rohu a zavede malou plastovou pipetu do děložního rohu. Pipeta obsahuje embryo. Poté se klisna zašije a po dobu pěti dní se klisně podává penicillin.

Nechirurgická metoda přenosu embrya je podobná procesu umělé inseminace. Používá se jednorázový umělý inseminační katetr. Technik zavede sterilní katetr, který obsahuje embryo přes děložní krček do dělohy, kam je embryo vloženo (STRICKLAND, 2001).

3.13.8 Chlazení a přeprava embryí

Embrya mohou být zchlazena a uchovávána při teplotě 5°C. Chlazení a skladování embryí při této teplotě umožňuje přepravu embryí do centrálních stanic pro přenos do klisen dárkyň. Postupy pro chlazení a transport embryí byly poprvé popsány v publikaci pana CARNEVALE a kol. (2012), kteří prokázali, že Hamova směs F-10, která byla zplyňována se směsí 5 % oxidu uhličitého, 5 % oxidu křemičitého a 90 % dusíku, udrží životaschopnost embryí po dobu 24 hodin. Po použití této směsi nejde po uplynutí 24 hodin embrya zmrazit (SQUIRES a kol., 2003).

3.13.9 Zmrazování embryí

Pomalé zmrazování

Pomalé zmrazování embryí bylo první metodou zmrazování. Principem metody bylo přidání kryoprotektantu např. glycerolu a postupné zmrazování. Embrya uchovávána při teplotě 4 °C byla ochlazená na teplotu -6 °C po dobu 15 minut, poté se ochladila na -30 °C až -33 °C a ponořila se do dusíku. Pomalé zchlazení trvá 1-2 hodiny a je za potřebí mrazák, který je nákladný. To pravděpodobně vyvolalo hledání alternativních metod jako je vitifikace embryí, která je rychlejší a nevyžaduje drahé vybavení (SQUIRES a MCCUE, 2016).

Kryokonzervace – Vitifikace embryí

Alternativou k pomalému zmrazování embryí je proces zvaný vitifikace. Jedná se o metodu ultrarychlého zmrazení, která zabraňuje tvorbě ledových krystalků a kapalina se změní na pevnou sklovitou fází bez tvorby ledu. Výhoda je v rychlosti a ve snadnosti provedení, ale nevýhodou je vystavení embryí vysokým koncentracím kryoprotektantů (CARNEVALE a kol., 2012).

HOCHI a kol. (1995) uvádějí různou životaschopnost po vitifikaci embryí, nejproblémovější jsou embrya větší než 300 µm.

Podle HINRICHS a CHOI (2016) nelze mrazit embrya větší než 300 µm kvůli tvorbě blastocoelu, prvotní dutiny, která je vyplněna tekutinou. Dlouhou dobu se předpokládalo, že narušení dutiny vede k usmrcení embrya. Výsledky studií došly k možnosti mikromanipulace s blastocoelem a k narušení dutiny. Po rozpadu blastocysty následovala vitifikace embrya. Takto se mohou krajně kryokonzervovat embrya do velikosti 650 µm. Avšak tato metoda je nákladná a náročná.

3.14 In vitro produkce embryí

In vitro produkce embryí u koní je reprodukční biotechnologická metoda (ŠICHTAŘ, 2018). Vývoj metod pro produkci embryí in vitro u koní byl opožděn ve srovnání s ostatními druhy zvířat. Reprodukční charakteristiky klisen jsou z části odpovědné za nedostatek výzkumu v této oblasti. Klisna je sezónně polyestrická, proto umožňuje sběr oocytů jen v určitých měsících roku. Ve srovnání s ostatními druhy zvířat může být od klisny získáno poměrně málo oocytů z jednoho vaječníku a dostupnost vaječníků z jatek je omezená (CARNEVALE a kol., 2012).

3.14.1 Odběr oocytů

Oocyty z ovariálních folikulů lze získat několika možnými způsoby. Pokud klisna uhynula a jsou k dispozici vaječníky z jatek, je možné folikuly otevřít skalpelem a celý vnitřní povrch folikulu pečlivě seškrabat kyretou. Druhou možnou metodou je aspirace pomocí jehly připojené na stříkačku nebo vakuovou pumpu (ŠICHTAŘ, 2018). Avšak CARNEVALLE *a kol.* (2012) uvádí, že tato metoda je pro klisny neúspěšná a většinou je folikul otevřen skalpelem. Ze živých klisen se oocyty získávají aspirací, kterou je možno provést laparoskopicky-transkutánní punkcí přes slabinu nebo transvaginální aspirací pomocí ultrazvuku TUGA (ŠICHTAŘ, 2018).

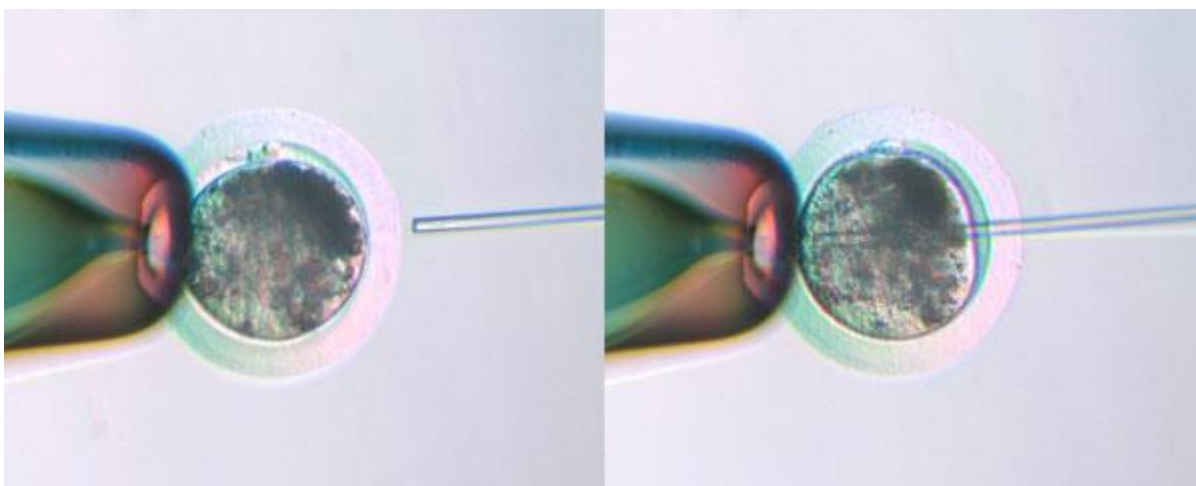
3.14.2 Zrání oocytů

Většina odebraných oocytů je nezralých. In vitro zrání je důležité, aby oocyty byly ve stádiu schopného oplození. Zrání oocytů probíhá v inkubátoru nastaveném na teplotu 38,2 °C s atmosférou 5 % CO₂ a trvá cca 24 hodin a oocyty jsou umístěny v chemicky definovaných kultivačních médiích (ŠICHTAŘ, 2018).

3.14.3 In vitro fertilizace pomocí ICSI

Intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI) je injekce jednoho spermatu do cytoplazmy oocytů viz obrázek 2 (MASERATI *a kol.*, 2016). Technika ICSI umožňuje použití spermií od hřebců se špatnou kvalitou spermatu nebo s omezenou aktivitou po rozmrazení (CARNEVALLE *a kol.*, 2012). ICSI se provádí pomocí sady dvou jehel, z nichž jedna orientuje a udržuje zralý oocyt na místě, zatímco druhá mnohem jemnější jehla se používá k injektování jedné spermie přímo do cytoplazmy oocytů. Spermie vybrané pro injekci jsou subjektivně pozorovány. Sledují se parametry motility a morfologie, které by mohly ovlivnit oplodnění (MASERATI *a kol.*, 2016).

Obrázek 2: Schéma ICSI



Zdroj: KINDRA, 2017

3.14.4 Intrafalopiální transfer gamet

Gamete intrafallopian transfer (GIFT) je metoda, která zahrnuje přenos oocytů spolu s nízkým počtem spermií ($2-5 \times 10^5$) do vejcovodu (SAMPER, 2009). Tato metoda se provádí laparoskopicky (BRINSKO a BLANCHARD, 2011), kdy se spermie ukládají v infundibulární nebo v ampulové oblasti vejcovodu. Tato metoda vyžaduje nižší počet spermií, proto je tato technika užitečná u subfertilních hřebců, u zmrazeného spermatu nebo u sexovaného spermatu (SAMPER, 2009).

3.15 Sexace spermií

Již v předešlých letech byla snaha o ovlivnění pohlaví. Metody, které se o separaci spermií snaží, se zakládají na principu, že chromozom X je větší než chromozom Y, a tudíž je i těžší (ŘÍHA a kol., 1999).

První narozené hříbě ze sexovaného spermatu bylo hlášeno v roce 2000. Sexing spermií se prováděl různými metodami s různým úspěchem u různých zvířat, včetně diferenciatního barvení X a Y chromozomu, analýzy karyotypu spermií a průtokovou cytometrií.

Průtoková cytometrie se jeví jako metoda s největším potenciálem a byla úspěšně použita u králíčího, býčího a hřebčího spermatu. Nedávný vývoj v průtokové cytometrii vedl k fluorescenčně aktivované buněčné separaci (FACS), o které se uvádí, že je velmi úspěšná pro výběr pohlaví. FACS pracuje na základě, že chromozomy nesoucí X a Y se liší svým obsahem DNA. Spermie jsou zředěny a inkubovány s fluorescenčním barvivem. Množství odebraného barviva závisí na

obsahu DNA spermií. Poté se prochází argonovým laserovým paprskem, který indukuje fluorescenci spermií, aniž by spermie poškodil a pak přes vychylovací desky s vysokým napětím průtokového cytometru, které je oddělují podle jejich fluorescence na spermie nesoucí X nebo Y. Účinnost této metody je uváděna 94–96 % s 60 % mírou březosti u čerstvého a chlazeného spermatu. U mraženého spermatu je míra březosti asi 20 % (DAVIES, 2015).

3.16 Klonování

Klonování je produkce geneticky identických jedinců bez rozmnožování. Klonování využívá somatické nebo tělní buňky a je důležitým nástrojem pro množení zvířat s cenným genotypem nebo pro ochranu ohrožených druhů zvířat (SAMPER, 2009).

Jedná se o metodu, která poutá v poslední době mnoho pozornosti. Z oocytu se odstraní vlastní jádro a transplantuje se do něj jádro somatické buňky dárce s jeho kompletní genetickou informací. Odstranění jádra z oocytu se provádí zpravidla odsátí mikropipetou, transfer dárcovského jádra pak rovněž injekčně skleněnou kapilárou. Poté nastupuje navození buněčného dělení, které je nejdůležitější. Klonování je velmi náročná a málo účinná metoda (DUŠEK *a kol.*, 2011).

4 Materiál a metodika

4.1 Charakteristika sledovaných chovů

Sběr dat byl prováděn ve dvou chovech koní, a to na farmě Újezd a v jezdeckém centru Zduchovice.

4.1.1 Farma Újezd

Farma Újezd se nachází v jižních Čechách 8 km od města Týn nad Vltavou. Hlavní činností farmy je chov a následný prodej sportovních koní. Chov koní v Újezdě započal v roce 1995. Vybraná lokalita a členitý terén Albrechticka velmi dobře vyhovoval chovu sportovních koní. V roce 2004 byl přikoupen Dvůr Újezd, který byl postupně přestavěn tak aby splňoval podmínky pro výcvik sportovních koní. Historie Dvora Újezd se datuje až do dob vlády Marie Terezie.

Skutečným průlomovým okamžikem pro chov bylo otevření hranic a možnost dovozu špičkového genetického materiálu na nejlepší vybrané jedince. Na velmi kvalitní holštýnské a hanoverské klisny se používá sperma těch nejlepších hřebců na světě, kteří jsou prověřeni ve světovém špičkovém sportu jako je mistrovství Evropy, mistrovství světa nebo olympijské hry. Potomstvo se testuje ve sportu a nejlepší jedinci i v chovu.

Chov přispívá k dobré prezentaci Albrechtic nad Vltavou a podílí se na udržení kulturního vzhledu krajiny a její ekologické stability. Týká se to především využití trvalých travních porostů pro pastvu.

Farma je z části soběstačná v zajišťování objemného krmiva. Farma obhospodařuje přibližně 100 ha travních porostů, z čehož asi 15 ha tvoří pastviny. Klisny s hříbaty jsou chovány v režimu přes den výběh a na noc box. V letním období při vysokých teplotách se tento režim může změnit na přes den box a v noci výběh. Klisny, které v předchozím roce nezabřezly, jsou chovány v režimu 24/7 na pastvě s přístřeškem a vodou. V zimním období mají k dispozici adlibitní příkrmy v podobě travní senáže. Ve stáji jsou dvakrát denně krmeny senem a jadným krmivem.

Obrázek 3: Stáj a výběhy pro chovné klisny



Zdroj: MAPY.CZ(a)

Na obrázku 3 jsou žlutě znázorněny výběhy pro chovné klisny, červeně je ohraničené zimoviště, kde se nachází přístřešek a nezámrzná napáječka. Číslo 1 na obrázku znázorňuje stáj pro klisny a hříbata.

4.1.2 Jezdecké centrum Zduchovice

Jezdecké centrum resort Zduchovice se nachází na okraji obce Zduchovice. Areál se nachází v turistické oblasti mezi přehradami Slapy a Orlík na pomezí Sedlčanska a Příbramska. Funguje od roku 2004.

Jezdecké centrum resort Zduchovice se nezabývá pouze chovem koní, ale také ubytováním v penzionu Jezerná, pronájemem boxů, pronájemem kolbiště a haly, prodejem koní, pořádáním jezdeckých závodů.

Areál obhospodařuje cca 200 ha orné půdy a 200 ha trvalých travních porostů, na kterých se pěstuje tráva na seno a senáž. V úseku chovu koní a ustájení pracuje 8 lidí. V areálu se nachází přibližně 135 koní ve všech věkových kategoriích.

Jezdecké centrum resort Zduchovice se zabývá chovem holštýnského teplokrevníka. Tento chov patří k největším na území České republiky. Produktem chovu je moderní typ koně s bezvadným charakterem, vynikající jezditelností, elastickým, pružným a silným skokem a příjemným temperamentem, vhodný pro amatéra i profesionála.

Chovné stádo v resortu Zduchovice se skládá z 40 klisen, ale v roce 2019 jich bylo pouze 30 inseminovaných. Klisny jsou ustájeny celoročně na pastvě a přes zimu

jsou přikrmovány vojtěškotravní senáží. Na pastvě se nachází nezámrazná napáječka a přístřešek. Před porodem jsou ustájeny v individuálním boxe, kde čekají na porod a po ohřebení jsou zde ustájeny po dobu 14 dní. Poté jsou přesunuty do volné stáje, kde jsou s hříbaty společně. Přes den jsou pouštěny do výběhu a na noc se zavírají do stáje, kde jsou ustájeny na hluboké podestýlce od března do dubna následujícího roku. Podestýlka se během května až dubna dvakrát vyvážá a je pravidelně vápněna.

Obrázek 4: Jezdecké centrum Zduchovice



Zdroj: MAPY.CZ(b)

Na obrázku 4 je znázorněna číslem 1 stáj s individuálními boxy, kde se hřebí klisny, číslem 2 je označena volná stáj, kde jsou klisny ustájeny s hříbaty do odstavu hříbat. Obrázek číslo 3 znázorňuje výběh, kam jsou hříbata s matkami pouštěna.

4.2 Materiál

Do sledování bylo zařazeno 49 klisen ve věkovém rozmezí od 3 do 20 let. U klisen byla sledována doba ovulace a doba inseminace čerstvým chlazeným nebo mraženým spermatem, vliv použitého spermatu na zabřeznutí a vliv věku na zabřeznutí na první říji v daném roce. Celkem byly klisny připouštěny osmdesátkrát.

4.3 Metodika

Klisny před připuštěním byly vyšetřovány ultrazvukem Aloka SSD-500, aby bylo možné co nejpřesněji určit dobu ovulace. Při inseminaci čerstvým chlazeným spermatem byly inseminovány před ovulací a ovulace nastala nejdéle do 72 hodin.

Ovulace byla kontrolována po 24 hodinách. Kontrola březosti byla také diagnostikována na základě sonografického vyšetření a to 15. den od dne, kdy byla diagnostikována ovulace.

Při inseminaci mraženým spermatem byly klisny vyšetřovány v časových intervalech podle změn na děloze a vaječníku, kde dozrával dominantní folikul. Při zjištění říje byly vyšetřovány po 24 hodinách. Při ustávání příznaků říjné dělohy (tzv. loukoťové struktury) byly klisny vyšetřovány v intervalu 4-6 hodin. Při změně kulovité struktury folikulu na protáhlý tvar byly klisny vyšetřovány v intervalu do 2 hodin. Po ovulaci byly klisny inseminovány mraženou dávkou spermatu. Kontrola březosti proběhla taktéž 15. den od inseminace.

4.3.1 Detekce říje u klisen

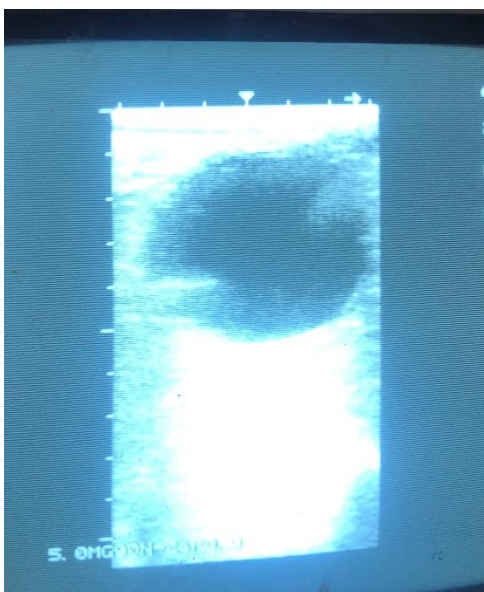
Klisny byly při říji vyšetřovány ultrazvukovým zařízením Aloka SSD-500. Při vyšetřování byly klisny fixovány na stání. Před ultrazvukovým vyšetřením bylo provedeno rektální vyšetření a vyndání skybal. Poté bylo provedeno rektální ultrasonografické vyšetření dělohy a vaječníku. Na děloze se pozorovalo, zda děloha neobsahuje náplň a přítomnost typické struktury říjné dělohy tzv. loukoťová struktura (obrázek 5). Na vaječníku se sledoval růst dominantního folikulu (obrázek 6). Při inseminaci čerstvým chlazeným spermatem byly klisny inseminovány před ovulací. Po inseminaci se po 24 hodinách kontrolovala ovulace. Při inseminaci klisen mraženým spermatem byla dále pozorována říjná děloha, která přestávala mít typickou strukturu. Dominantní folikul, který s končící říjí mění svůj tvar z pravidelného na protáhlý neboli tzv. hruškovitý tvar. Při změně tvaru folikulu byly klisny vyšetřovány ve dvouhodinových intervalech do ovulace. Po ovulaci byly klisny připuštěny hysteroskopickou metodou.

Obrázek 5: Příčné zobrazení střední části děložního rohu na počátku říje.



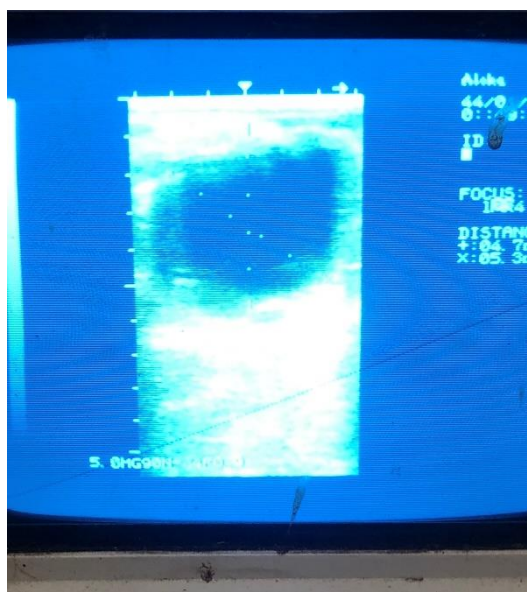
Zdroj: GRAGAR, 1997.

Obrázek 6: Dominantní folikul



Zdroj: VLASTNÍ, 2019.

Obrázek 7: Dominantní folikul před ovulací



Zdroj: VLASTNÍ, 2019.

Obrázek 8: Folikuly na vaječniku v přechodném období („před říjí“)



Zdroj: VLASTNÍ, 2020.

4.3.2 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program Statistica.12 (Tibco) a Microsoft Excel. Vyhodnocení vlivu sledovaných faktorů bylo provedeno pomocí chí-kvadrát testu, který porovnává pozorované a očekávané četnosti. Dále byl použit dvouvýběrový t-test pro nezávislé vzorky. Všechna hodnocení byla provedena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vliv typu uskladnění spermatu na míru zabřezávání

Dle první hypotézy existuje rozdíl v zabřezávání klisen v závislosti na typu uskladnění použitého spermatu, a to buď čerstvého chlazeného nebo mraženého. Do sledování byly zahrnuty všechny říje, na kterých byly klisny inseminovány. Celkem bylo hodnoceno 80 vzorků. Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrát testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Dle výsledků chí-kvadrát testu s p-hodnotou 0,64 tuto hypotézu zamítají. Tedy neexistuje statisticky významný rozdíl v zabřezávání mezi klisnami, které byly inseminovány chlazeným či mraženým spermatem. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3: Pozorované četnosti při hodnocení vlivu typu uskladnění spermatu na zabřezávání klisen chí-kvadrát testem

Pozorované četnosti				
	sperma	březost (ano)	březost (ne)	Řádky (součty)
Četnost	mražené	12	11	23
		52,17 %	47,83 %	
Četnost	chlazené	33	24	57
		57,89 %	42,11 %	
Četnost	celkem	45	35	80

V tabulce 3 jsou uvedeny pozorované četnosti zabřezlých a nezabřezlých klisen inseminovaných chlazeným a mraženým spermatem. Z těchto údajů vyplývá, že březost v případě mraženého spermatu byla 52 % a u chlazeného spermatu pouze o 6 % vyšší, tedy 58 %.

Tabulka 4: Očekávané četnosti při hodnocení vlivu typu uskladnění spermatu na zabřezávání klisen chí-kvadrát testem

Očekávané četnosti Pearsonův chí-kv. : ,217936, sv=1, p=,6406				
	sperma	březost (ano)	březost (ne)	Řádky (součty)
Četnost	mražené	12,94	10,06	23,00
Četnost	chlazené	32,06	24,94	57,00
Četnost	celkem.	45,00	35,00	80,00

V tabulce 4 jsou uvedeny očekávané četnosti zabřezlých a nezabřezlých klisen pro sledované typy uskladnění spermatu. Lze vidět, že bylo očekáváno pouze o jednu zabřezlou klisnu více v případě použití mraženého spermatu a o jednu klisnu méně v případě chlazeného spermatu. To vedlo k potvrzení nulové hypotézy chí-kvadrát testu, která říká, že očekávané a pozorované četnosti se rovnají.

U klisen připouštěných umělou inseminací se vyskytuje řada faktorů, které ovlivňují zabřezávání. Mezi základní patří plodnost hřebce a klisny, druh spermatu použitého k inseminaci (čerstvé, chlazené, přepravované nebo mražené), počet spermií v inseminační dávce, koncentrace spermatu a doba po kterou je tekuté sperma skladováno před inseminací (SIEME, 2003). Dalším významným faktorem je sám chovatel a jeho schopnost správně detekovat dobu ovulace a správně provést inseminaci.

WATSON (2000) uvádí, že mražené sperma má sníženou oplozovací schopnost ve srovnání s chlazeným spermatem. SAMPER (2001) udává březost u mraženého spermatu v rozmezí 30 až 40 %, GOVAERE (2014) 40 %, SQUIRES *a kol.* (2006) 51 % a TOLMAN (2019) v průměru 40-60 %. Na základě výsledků této práce lze konstatovat, že březost při inseminaci mraženým spermatem je ve sledovaných stájích na dobré úrovni.

Jedním z nejdůležitějších důvodů, proč se zmrazené sperma v širším měřítku moc nepoužívá, je velká variabilita schopnosti spermatu u různých hřebců tolerovat proces zmrazení a rozmrazení (SAMPER, 1995). VIDAMENT *a kol.* (1997) uvádí, že pouze 25 % hřebců má procento zabřeznutých klisen po inseminaci mraženým spermatem srovnatelné s inseminací čerstvým spermatem nebo přirozenou plemenitbou, pokud budou inseminace provedeny správně ve správný čas. Přestože dalších 75 % hřebců bude produkovat nižší procento březosti na jeden cyklus, plodnost na konci sezóny při inseminaci alespoň ve třech cyklech dosáhne u některých hřebců více než 80 % (SAMPER, 1991). Aby však bylo možno dosáhnout této úrovně plodnosti, dochází ke zvyšování průměrného počtu cyklů ve srovnání s přirozeným chovem nebo s využitím čerstvého spermatu (DARENIUS, 1992).

AMANN *a* PICKETT (1987) odůvodňují nižší březost při inseminaci mraženým spermatem oproti chlazenému poškozením spermií při procesu zmrazení a rozmrazování. Výsledky ve sledovaných chovech ukazují na profesionální přístup, díky kterému bylo dosaženo stejné březosti v případě využití chlazeného a

mraženého spermatu. To potvrzuje LOOMIS (2001), který uvádí, že lze získat srovnatelné březosti u obou typů spermatu, při dodržení správných postupů a zásad.

5.2 Vliv věku klisny na zabřeznutí na první říji a první inseminaci

V druhé hypotéze se předpokládá, že věk klisny má vliv na zabřeznutí na první říji a první inseminaci. Celkem bylo hodnoceno 49 klisen. Byl zaznamenán věk každé klisny a výsledek první říje, na které byla inseminována. Pro testování hypotézy byl použit dvouvýběrový t-test pro nezávislá pozorování. Výslednou hodnotu t-testu -0,98 lze vidět v tabulce č.6. P-hodnota 0,33 vede k závěru potvrzení nulové hypotézy, že věk klisen zabřeznutých na první říji a první inseminaci je v průměru shodný. Grafické zpracování výsledku je uvedeno v grafu č. 3, ze kterého je patrné, že průměrný věk u klisen, které nezabřezly (10,79) je vyšší v porovnání s věkem klisen, které zabřezly (9,43). Tento průměrný rozdíl věku 1,36 roku nebyl však statisticky průkazný. Druhou hypotézu této diplomové práce tedy nelze přijmout, jelikož se neprokázal statisticky průkazný vliv věku klisen na zabřeznutí na první říji a první inseminaci. Přehled zabřezlých klisen v jednotlivých věkových skupinách a se zohledněním doby ovulace je uveden v tabulce 5.

VIDAMENT *a kol.* (1997) pozorovali, že březost při inseminaci mraženým spermatem byla vyšší u klisen mladších 16 let než u klisen starších. Jako další faktor, který měl významný vliv na březost uvádí dobu přípuštění. Klisny přípuštěné do 15. května měly vyšší míru březosti než klisny inseminované po 15. květnu. TOLMAN (2019) uvádí, že věk klisny v rozmezí 5-12 let nemá výrazný vliv na březost, avšak u starších klisen je možnost sníženého procenta zabřezávání. Také KARESKOSKI (2019) zmiňuje ve své odborné publikaci vliv věku klisen na zabřezávání. Se zvyšujícím se věkem klisny se snižuje procento zabřezávání. Jako optimální věkovou skupinu uvádí klisny ve věku od 2-9 let. Na základě výsledků uvedených v tabulce 6 lze říci, že vliv věku klisny na zabřeznutí byl eliminovaný přístupem chovatele. Klisny, které nezabřezly, měly průměrný věk 8,8 let a nelišil se průkazně od průměrného věku zabřezlých klisen (9,4 let).

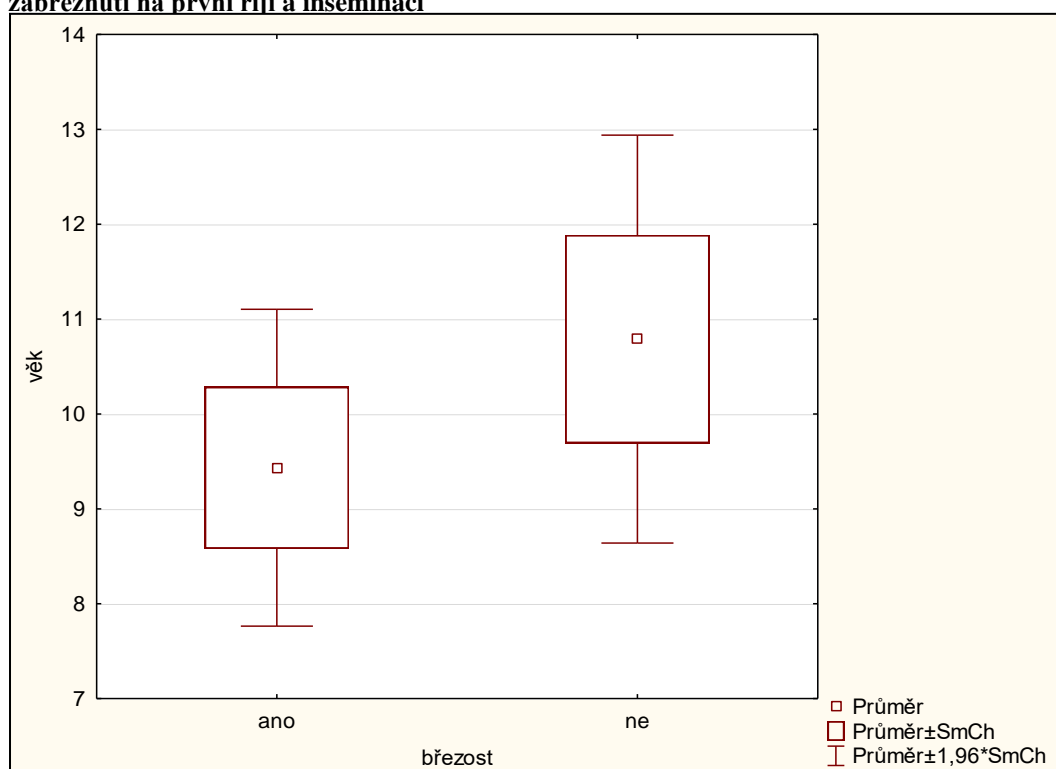
Tabulka 5: Březost podle věku a době ovulace

		Věk			
		Doba ovulace	3-6	7-11	12 a víc
Sperma	Mražené	2 hod. před inseminací	3	1	1
		2 hod. a více před inseminací	2	4	1
	Chlazené	Do 24 hod	3	5	6
24-48 hod		5	5	5	
48-72 hod		1		2	
Celkem		14	15	15	

Tabulka 6: Výsledek dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv věku na zabřeznutí na první říji

Prom	Dvouvýběrový t-test, březí, poprvé inseminované								
	Průměr (ano)	Průměr (ne)	t	sv	p	Poč.plat (ano)	Poč.plat. (ne)	Sm.odch. (ano)	Sm.odch. (ne)
věk	9,43	10,79	-0,98	47	0,33	30	19	4,67	4,78

Graf 3: Grafické znázornění výsledku dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv věku na zabřeznutí na první říji a inseminaci



5.3 Vliv doby ovulace v závislosti na době inseminace na zabřeznutí

Obsahem třetí hypotézy je předpoklad, že lepší výsledky zabřezávání lze očekávat při kratším časovém intervalu mezi inseminací a ovulací. Do hodnocení byly zahrnuty údaje o ovulaci u mraženého spermatu a čerstvého chlazeného spermatu. V případě mraženého spermatu se sleduje doba ovulace a následně se inseminuje, naopak u chlazeného spermatu se inseminuje a poté se určuje čas ovulace, oba způsoby inseminace jsou tedy hodnoceny jednotlivě. Hypotéza byla testována pomocí dvouvýběrového t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.3.1 Vliv intervalu mezi ovulací a inseminací při použití mraženého spermatu

Podíly zabřezlých klisen v závislosti na době ovulace před inseminací mraženým spermatem jsou uvedeny v tabulce 7. V případě mraženého spermatu byla p-hodnota 0,32, tedy vyšší než 0,05 a nepotvrdil se tak vliv délky intervalu mezi inseminací a ovulací (tabulka 8). Grafické znázornění výsledků lze vidět na grafu 4, kde je patrný větší interval mezi ovulací a inseminací mraženým spermatem u zabřezlých klisen (3,25) v porovnání s klisami, které nezabřezly (2,50 hod). Rozdíl je však v průměru pouze 0,75 hod a není statisticky průkazný.

Při inseminaci mraženým spermatem je březost uváděna variabilní, vysoce závislá na hřebci (GRAHAM, 1996). SIEME (2003) a SQUIRES *a kol.* (2006) se shodují, že optimální doba pro přípuštění mraženým spermatem je 6 až 12 hodin před inseminací nebo po ovulaci. V rámci této práce byla maximální doba ovulace při využití mraženého spermatu 6 hodin před inseminací.

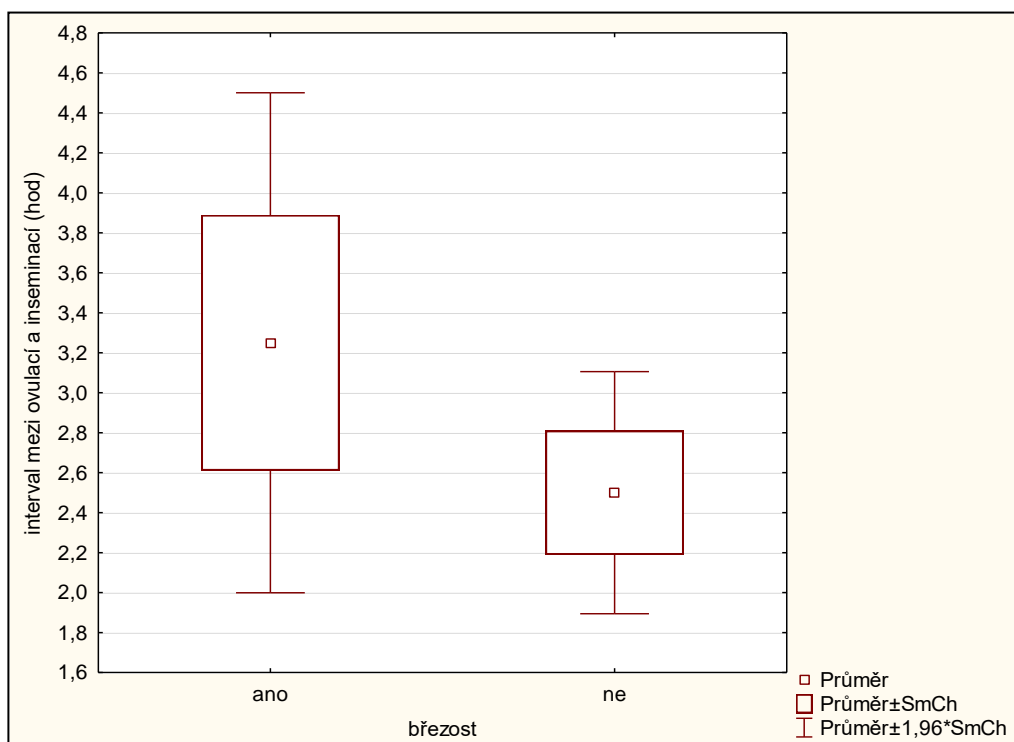
Tabulka 7: Podíl březích klisen v závislosti na době ovulace před inseminací mraženým spermatem

	březost	počet inseminovaných
2 hod. před inseminací	7	10
2,5 hod. a více před inseminací	6	13
Celkem	13	23

Tabulka 8: Výsledek dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv intervalu mezi ovulací a inseminací mraženým spermatem na zabřeznutí

Proměnná	Dvouvýběrový t-test, mražené sperma								
	Průměr (ano)	Průměr (ne)	t	sv	p	Poč.plat (ano)	Poč.plat. (ne)	Sm.odch. (ano)	Sm.odch. (ne)
Čas	3,25	2,50	1,03	21,00	0,32	12	11	2,21	1,02

Graf 4: Grafické znázornění výsledku dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv intervalu mezi ovulací a inseminací mraženým spermatem na zabřeznutí



5.3.2 Vliv intervalu mezi ovulací a inseminací při použití chlazeného spermatu

Při použití chlazené inseminační dávky se doba ovulace zjišťuje až po samotné inseminaci. Podíly březích klisen v závislosti na době ovulace po inseminaci chlazeným spermatem jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Podíl březích klisen v závislosti na době ovulace po inseminaci chlazeným spermatem

	Březost	Počet
Do 24 hod	12	28
24-48 hod	16	23
48-72 hod.	3	6
Celkem	31	57

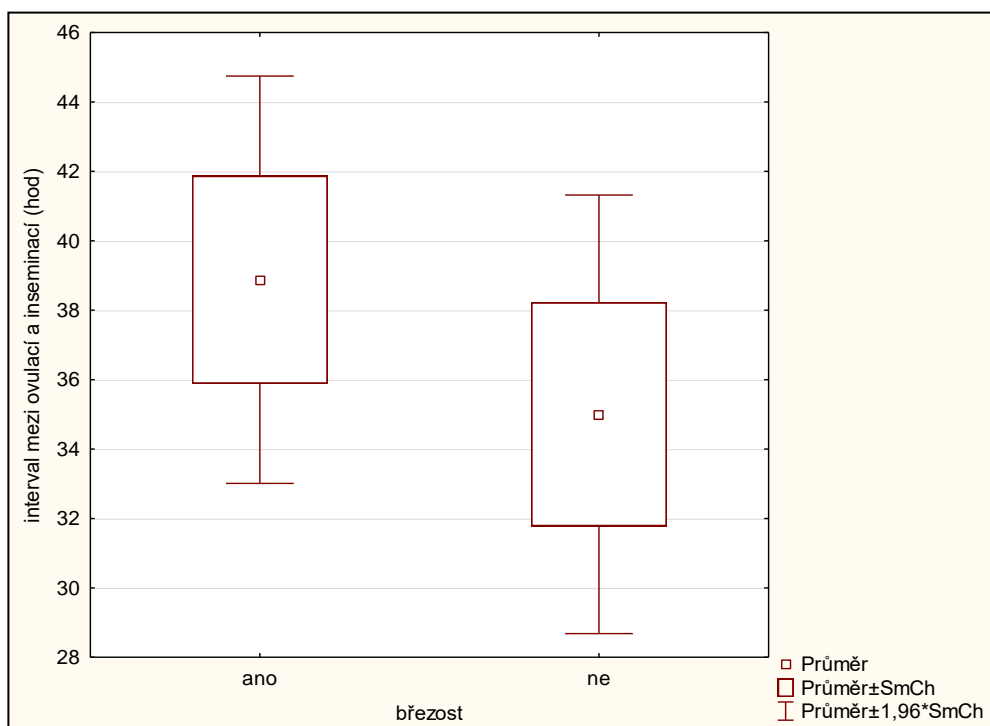
V případě využití chlazeného spermatu k inseminaci měly březí klisny v průměru interval mezi inseminací a ovulací 38,88 hodin a ne březí 35 hodin. Výsledná p-hodnota 0,39 potvrdila nulovou hypotézu, že se sledované skupiny v průměru neliší (tabulka 9, graf 5). Tedy průměrný rozdíl 3,88 hodiny v délce intervalu mezi inseminací a ovulací nebyl prokázán jako statisticky významný u březích a ne březích klisen.

Podle BEDFORD-GUAUSE (2007) lze optimální březosti u chlazeného spermatu dosáhnout jen tehdy, jsou-li hřebec i klisna reprodukčně zdraví, bylo dodrženo příslušné zacházení se spermatem pro účely chlazení, ale také správná manipulace a aplikace veterinárním lékařem. Literatura je plná studií využívajících chlazené sperma hřebce s dosaženou mírou březosti od 31 % do 96 %. Ačkoliv se některá doporučení mezi autory liší, obecně platí, že by se klisny měly připouštět do 48 hodin před ovulací, aby se dosáhlo optimálních výsledků. V rámci této práce byla maximální doba ovulace při využití chlazeného spermatu 72 hodin po inseminaci.

Tabulka 9: Výsledek dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv intervalu mezi ovulací a inseminací chlazeným spermatem na březnost

Prom	Dvouvýběrový t-test, mražené sperma								
	Průměr (ano)	Průměr (ne)	t	sv	p	Poč.plat (ano)	Poč.plat. (ne)	Sm.o dch. (ano)	Sm.odch. (ne)
čas	38,88	35,00	0,87	55	0,39	33	24	17,20	15,79

Graf 5: Grafické znázornění výsledku dvouvýběrového t-testu, který hodnotí vliv intervalu mezi ovulací a inseminací chlazeným spermatem na zabřeznutí



Řada autorů odborných publikací se shoduje, že ve výsledcích březosti nemá vliv inseminace před nebo po ovulaci, ale čím větší je interval mezi inseminací-ovulací a ovulací-inseminací tím se možnost zabřeznutí snižuje (TOLMAN, 2019). Ve sledovaných stájích se vlivem působení chovatele eliminoval i tento negativní faktor, protože se neprokázalo působení velikosti intervalu mezi ovulací a inseminací.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce v první části shrnuje obecné a nejnovější poznatky a postupy z oblasti reprodukce koní. Umělá inseminace se jeví jako ideální pomoc v chovu koní při rozšiřování genetické základny možností dovozu spermatu od špičkových zahraničních hřebců. Metoda je sice více náročná než přirozená plemenitba, ale při dodržení základních podmínek a dodržení určitých zásad umělá inseminace přináší uspokojivé výsledky zabřezávání klisen. Mezi další výhody inseminace řadíme snížení přenosu pohlavních chorob, možnost zvýšené kontroly spermatu hřebců, snížení možnosti poranění koní, snížení stresu a nákladů u klisen spojené s dovozem za hřebcem a další. Úspěšnost reprodukce koní je ovlivněna celou řadou faktorů. Mezi ty hlavní řadíme vliv samotného hřebce a klisny. Zásadní roli má však také lidský faktor, který v průběhu inseminace ovlivňuje odběr spermatu hřebce, manipulaci se spermatem jak při skladování, tak při samotné umělé inseminaci. Důležitá je také správná detekce říje.

Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv typu uskladnění inseminační dávky, intervalu mezi inseminací a ovulací u jednotlivých typů uskladnění spermatu a vliv věku klisny na zabřezávání v první říji.

U klisen zahrnutých do sledování se neprojevila neplodnost. Ze 49 klisen pouze 5 nezabřezlo. Neprokázal se vliv uskladnění spermatu (p -hodnota $> 0,05$) na březost. Zabřezávání v případě mraženého spermatu bylo 52 % a u chlazeného spermatu pouze o 6 % vyšší, tedy 58 %. Jedná se však hlavně o potvrzení kvalitního přístupu chovatele. Při aplikaci mražené dávky se provádělo více sonografických vyšetření k přesné detekci ovulace v porovnání s aplikací chlazené inseminační dávky. Bylo dosaženo stejného procenta zabřezávání u obou typů uskladnění spermatu i přes zjištění jiných autorů, že mražená inseminační dávka má zhoršené oplozovací schopnosti v porovnání s chlazenou.

Při sledování věku u zabřezlých a nezabřezlých klisen na první říji nebyl zaznamenán průkazný rozdíl (p -hodnota $> 0,05$). Průměrný věk klisen, které nezabřezly, byl 10 let ($n = 19$) a byl vyšší pouze o rok v porovnání s věkem klisen, které zabřezly (9, $n = 30$). I v tomto případě působení chovatele eliminovalo v literatuře zmiňovaný negativní vliv věku na úspěšnost zabřezávání.

Ani v případě intervalu mezi ovulací a inseminací nebyl prokázán vliv tohoto faktoru na zabřezávání. Větší interval mezi ovulací a inseminací mraženým

spermatem byl zaznamenán u zabřezlých klisen (3,25) v porovnání s klisnami, které nezabřezly (2,50 hod). Rozdíl je však v průměru pouze 0,75 hod a nebyl statisticky průkazný (p-hodnota = 0,32). V případě využití chlazeného spermatu k inseminaci měly zabřezlé klisny v průměru interval mezi inseminací a ovulací 38,88 hodin a nezabřezlé 35 hodin. Průměrný rozdíl 3,88 hodiny v délce intervalu mezi inseminací a ovulací nebyl prokázán jako statisticky významný u zabřezlých a nezabřezlých klisen (p-hodnota = 0,39). V rámci sledování však žádný časový interval nepřesahoval doporučenou délku.

Závěrem lze konstatovat, že chovatel je schopen svým přístupem snižovat působení negativních vlivů na zabřezávání klisen. V rámci výsledků této práce nebyl prokázán vliv věku klisny, intervalu mezi inseminací a ovulací či typu uskladnění inseminační dávky. V praxi je tedy možné u umělé inseminace dosahovat optimálních výsledků zabřezávání klisen při dobrém načasování a správném provedení.

7 Seznam použité literatury

- AMANN, R.P. a B.W. PICKETT. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* [online]. 1987, **7**(3), 145-173 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4. ISSN 07370806.
- AURICH, J.E. Artificial Insemination in Horses—More than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science* [online]. 2012, **32**(8), 458-463 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.06.011. ISSN 07370806.
- AVANZI, B.R., R. dos Santos RAMOS, G.H.M. ARAUJO, et al. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? *Theriogenology* [online]. 2015, **83**(9), 1389-1393 [cit. 2020-02-03]. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.007. ISSN 0093691X.
- BEDFORD-GUAUS, S. J. Transported Stallion Semen and Breeding Mares with Cooled or Frozen-Thawed Semen. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online]. 2007, **6**(4), 239-248 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1053/j.ctep.2007.09.003. ISSN 15347516.
- BRINSKO, S.P. a T.L. BLANCHARD. *Manua lof equine reproduction*. 3rd ed. St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier, c2011. ISBN 978-032-3064-828.
- CARNEVALE, E.M. a D.R. SESSIONS. In Vitro Production of Equine Embryos. *Journa lof Equine Veterinary Science*. 2012, **32**(7), 367-371. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.05.054. ISSN 07370806.
- DARENIUS, K., 1992. Early pregnancy loss in the mare. Ph.D. Dissertation, Sveriges Lantbrunskuniversitet. Uppsala, Sweden, pp. 3–30.
- DAVIES M., Mina C. G. *Equine reproductiv ephysiology, breeding and stud management*. 4th edition. Boston, MA: CABI, [2015]. ISBN 9781780644417.
- DUŠEK, J. *Chov koní*. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2011. ISBN 978-80-209-0388-4.
- ERC Muller: Embryotransfer. *ERC Muller* [online]. c2019 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <http://www.muller-equine.cz/reprodukce-koni-1/embryotransfer.htm>
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* [online]. 2003, **78**(3-4), 203-216 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/S0378-4320(03)00091-5. ISSN 03784320.

- GINTHER, O.J., M.A. BEG, F.X. DONADEU a D.R. BERGFELT. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* [online]. 2003, **78**(3-4), 239-257 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/S0378-4320(03)00093-9. ISSN 03784320.
- GOVAERE, J.L.J., M.K. HOOGEWIJS, C.D.E. SCHAUWER, S.D.E. VliegHER, A. VAN SOOM, L. DUCHATEAU a A. DE KRUIF. Effect of Artificial Insemination Protocol and Dose of Frozen/Thawed Stallion Semen on Pregnancy Results in Mares. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 2014, **49**(3), 487-491 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1111/rda.12316. ISSN 09366768.
- GRAGAR CSC., MVDr. Ivo a Prof. MVDr. Eduard KUDLÁČ, DRSC. *Ultrasonografie ve veterinárním porodnictví a gynekologii*. Hlučín: Slezan, 1997. ISBN 80-901948-6-9.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online]. 1996, **12**(1), 131-147 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1016/S0749-0739(17)30300-0. ISSN 07490739.
- GUERIN, B., M. NIBART, B.Marquant-Le GUIENNE a P. HUMBLLOT. Sanitaryrisksrelated to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*. 1997, **47**(1), 33-42. DOI: 10.1016/S0093-691X(96)00337-8. ISSN 0093691X.
- HAFEZ, B. a E. S. E. HAFEZ. *Reproduction in farmanimals*. 7th ed. Philadelphia: LippincottWilliams& Wilkins, c2000. ISBN 0-683-30577-8.
- HARTMAN, D.L.: Embryo transfer. In: MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E., VARNER, R.D.: *Equinereproduction*, 2nd ed. BlackwellPublishing Ltd., 2011.p. 2871-2879.
- HINRICHS, K. a Young-Ho CHOI. Equine Embryo Biopsy, Genetic Testing, and Cryopreservation. *JournalofEquineVeterinary Science*. 2012, **32**(7), 390-396. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.05.005. ISSN 07370806.
- HOCHI, S., T. FUJIMOTO a N. OGURI. Largeequineblastocysts are damaged by vitrificationprocedures. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995, **7**(1). DOI: 10.1071/RD9950113. ISSN 1031-3613.
- JELÍNEK, P. a K. KOUDELA. *Fyziologie hospodářských zvířat*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-644-1.

- KINDRA, R. Equine intracytoplasmatic sperm injection. In: *Veterinary medicine a biomedical sciences* [online]. 2017 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <http://vetmed.tamu.edu/equine-embryo-laboratory/clinical-services/icsi>
- KLIMENT, J. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda ve spolupráci se SZN Praha, 1983. Živočišna výroba.
- KRAEMER, D.C. A History of Equine Embryo Transfer and Related Technologies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013, **33**(5), DOI: 10.1016/j.jevs.2013.03.007. ISSN 07370806.
- LESTÉ-LASSERRE, M.A., Ch. Embryotransfer: From one mare to another. *Thehorse* [online]. 2015 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <https://thehorse.com/111595/embryo-transfer-from-one-mare-to-another/>
- LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science* [online]. 2001, **68**(3-4), 191-200 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00156-7. ISSN 03784320.
- MAJZLÍK, I. *Chov zvířat I*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2000. ISBN 80-213-0641-6.
- MAPY.CZ(a) [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://mapy.cz/letecka?x=14.3520454&y=49.2343582&z=17&l=0&q=%C3%BAjezd%2018>
- MAPY.CZ(b) [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://mapy.cz/letecka?x=14.2192785&y=49.6388466&z=17&l=0&source=mu&id=4407>
- MARINONE, A.I., L. LOSINNO, E. FUMUSO, E.M. RODRÍGUEZ, C. REDOLATTI, S. CANTATORE a J. CUERVO-ARANGO. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Animal Reproduction Science*. 2015, **158**, 53-59. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.04.007. ISSN 03784320
- MASERATI, M. a A. MUTTO. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016, **41**, 42-50. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.04.004. ISSN 07370806
- MCCUE, P. M. a Edward L. SQUIRES. *Equine embryo transfer*. Jackson, Wyo.: Teton New Media, 2015. ISBN 9781591610472.

- MCKINNON, A. O., ed. *Equine reproduction: Volume 1*. 2nd ed. Chichester, WestSussex, U.K.: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-0-8138-1971-6.
- MCKINNON, ANGUS & L. SQUIRES, E.. (2007). Embryo Transfer and Related Technologies. *Current Therapy in Equine Reproduction*. 319-334.
- MORRIS L.H.A., TIPLADYCA, ALLENWR. Hysteroscopic insemination of mares with frozen-thawed epididymal spermatozoa. In: Havemeyer Foundation Monograph Series No. 6, 2001; pp. 38–40.
- NETO, I.V.O., I.F. CANISSO, L.G. SEGABINAZZI, C.P.F. DELL'AQUA, M.A. ALVARENGA, F.O. PAPA a Jose A. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. *Animal Reproduction Science*. 2018, 1-9.
- PYCOCK, J.F. *Veterinární problematika reprodukce a chovu koní*. Přeložil V. GRÝMOVÁ, přeložila I. SEKANINOVÁ. Plzeň: Medicusveterinarius, 2004. Otázky a odpovědi ve veterinární medicíně. ISBN 80-902224-5-5.
- REECE W. 2010. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada. 480 s. ISBN: 978-80
- REENSKAU, A. Embryo Transfer in Horse-Method, Possibilities and Limitations. 2014. Faculty of Veterinary Science.
- ŘÍHA, J., M. MACHATKOVÁ, J. PETELÍKOVÁ, V. JAKUBEC, J. PYTLOUN, L. ŠEREDA a A. PAVLOK. *Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat*. 1. Rapotín: Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 1999.
- SAMPER J. C., J.C. Hellander, B.G. Crabo, Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility and with glass wool/Sephadex filters *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 44 (1991), pp. 107-114
- SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science* [online]. 2001, **68**(3-4), 219-228 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00158-0. ISSN 03784320.
- SAMPER, J.C., 1995. Stallion semen cryopreservation: male factors affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Theriogenol.*, 160-165.
- SAMPER, Juan C. *Equine breeding management and artificial insemination*. 2nd ed. St. Louis, MO: SaundersElsevier, c2009. ISBN 978-1-4160-5234-0.
- SAMPER, J.C., J.F. PYCOCK a A.O. MCKINNON. *Current therapy in equine reproduction*. St. Louis, Mo.: SaundersElsevier, c2007. ISBN 978-0721602523.

- SCHWEIZER, Christine M., Ch.S. CABLE a E.L. SQUIRES. *Breeder's guide to mare, foal & stallion care*. Lanham, MD: Distributed to trade by National Book Network, 2006. ISBN 978-1-58150-143-8.
- SIEME, H., T. SCHÄFER, T.A.E STOUT, E. KLUG a D. WABERSKI. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* [online]. 2003, **60**(6), 1153-1164 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00113-4. ISSN 0093691X.
- SLEZÁKOVÁ, N., Najbrt, R. 1982. Veterinární anatomie. 2. díl. SZN. Praha. 520 s. ISBN: 07-00682-04/50.
- SPECIÁLNÍ ZOOTECHNIKA: Chov koní. 3. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1958. Učebnice (Státní zemědělské nakladatelství).
- SQUIRES, E., S. BARBACINI, P. MATTHEWS, W. BYERS, K. SCHWENZER, J. STEINER a P. LOOMIS. Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *Equine Veterinary Education* [online]. 2006, **18**(2), 96-99 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2006.tb00425.x. ISSN 09577734.
- SQUIRES, E.L, E.M CARNEVALE, P.M MCCUE a J.E BRUEMMER. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* . 2003, **59**(1), DOI: 10.1016/S0093-691X(02)01268-2. ISSN 0093691X.
- SQUIRES, E.L. a P.M. MCCUE. Cryopreservation of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016, **41**, 7-12. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.03.009. ISSN 07370806.
- STRICKLAND, Ch. Embryotransfer for horses. *Thehorse* [online]. 2001 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <https://thehorse.com/14393/embryo-transfer-for-horses/>
- ŠICHTAŘ, J., JANOŠÍKOVÁ M., Využití epididymálních spermií v asistované reprodukci koní. *Veterinářství* 2017;**67**(2):104-107.
- ŠICHTAŘ, J., In vitro produkce embryí u koní. *Veterinářství*. 2018, (10), 718-720.
- ŠŤASTNÁ, D. a P. ŠŤASTNÝ. *Špeciálna reprodukcia zvierat*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2016. ISBN 978-80-552-1511-2.
- TOLMAN. Reprodukce koní od A do Z. *Tolmanservices* [online]. 2019 [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <http://www.tolmanservices.eu/index.php/cs/poradenstvi/reprodukce-od-a-do-z>
- VIDAMENT, M., A.M. DUPERE, P. JULIENNE, A. EVAIN, P. NOUE a E. PALMER. Equine frozen semen: Freezability and fertility field

results. *Theriogenology* [online]. 1997, **48**(6), 907-917 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1016/S0093-691X(97)00319-1. ISSN 0093691X.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* [online]. 2000, **60-61**, 481-492 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3. ISSN 03784320.