

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického
zemědělství**

Biotechnologické metody v reprodukci velbloudů

Bakalářská práce

Praha 2019

Vypracovala:

Adéla Pěnkavová

Vedoucí práce:

Ing. Tamara Fedorova, Ph.D.

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Biotechnologické metody v reprodukci velbloudů vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne

.....
Adéla Pěnkavová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Ing. Tamaře Fedorové, Ph.D. za skvělé vedení, vstřícný přístup a poučné připomínky při tvorbě mé práce. Dále bych chtěla poděkovat PhDr. Lence Peškové, DiS. za významnou pomoc s vyhledáváním a získáváním zdrojů informací. Ráda bych touto cestou poděkovala i své rodině a blízkým za pomoc, podporu a trpělivost během mého studia.

Abstrakt

Biotechnologické metody v reprodukci velbloudů

Velbloudi jsou důležitými hospodářskými zvířaty v mnoha oblastech tropů. Jejich reprodukce je však spojena s několika omezeními, se kterými tato bakalářská práce čtenáře seznamuje. Problematikou reprodukce velbloudů se v posledních letech zabývá stále více studií a využití moderních biotechnologických metod, jako je inseminace, synchronizace říje či embryotransfer, roste na významnosti. Cílem této bakalářské práce bylo z dosavadního vědeckého bádání utvořit ucelený přehled jednotlivých metod, což může být východiskem pro další výzkumy zaměřené na problematiku reprodukce nejen velbloudů. Tyto biotechnologické metody by mohly být využity i v záchranném programu kriticky ohroženého divokého velblouda dvouhrbého, jehož počty stále klesají. Nejčastěji využívanou metodou je umělá inseminace, avšak další pokročilé reprodukční technologie, jako je embryotransfer či klonování, budou nejspíš hrát důležitou roli v budoucích vyhlídkách pro úspěšnou reprodukční výkonnost hospodářských zvířat.

Klíčová slova: *Camelus*, dromedár, drabař, inseminace, embryotransfer, synchronizace, říje

Author's abstract

Reproductive technologies in camels

Camels are important livestock in many areas of the tropics. However, their reproduction is connected with several limitations that this bachelor thesis introduces to the reader. The issue of camel reproduction has been increasingly studied in recent years and the use of modern biotechnological methods such as insemination, oestrus synchronization or embryo transfer is increasing in importance. The aim of this bachelor thesis was to create a comprehensive overview of individual methods from the current scientific research, which can be the starting point for further research focused on the issue of reproduction not only of camels. These biotechnological methods could also be used in the rescue program of the critically endangered wild Bactrian camel, whose numbers are still falling. The most commonly used method is artificial insemination, but other advanced reproductive technologies such as embryo transfer or cloning are likely to play an important role in future prospects for successful livestock reproductive performance.

Key words: *Camelus*, dromedary, bactrian camel, insemination, embryotransfer, synchronization, rut

Obsah

1. Úvod	- 11 -
2. Metodika	- 12 -
3. Literární rešerše	- 13 -
3.1. Základní charakteristika a využití velbloudů	- 13 -
3.2. Popis druhu	- 14 -
3.3. Výživa, chování a adaptace na stres	- 16 -
3.4. Záchranný program divokého velblouda dvouhrbého	- 17 -
3.5. Reprodukce velbloudů	- 18 -
3.5.1. Pohlavní orgány samce	- 19 -
3.5.1.1. Charakteristika semene	- 20 -
3.5.2. Pohlavní orgány samice	- 21 -
3.5.2.1. Folikulární vlna, ovulace	- 22 -
3.6. Biotechnologické metody reprodukce	- 22 -
3.6.1. Inseminace	- 23 -
3.6.1.1. Odběr spermatu	- 23 -
Příklady konkrétních výzkumů	- 24 -
3.6.1.2. Zpracování spermatu	- 27 -
3.6.2. Synchronizace říje	- 28 -
3.6.3. Embryotransfer	- 30 -
3.6.3.1. Odběr embryí	- 30 -
3.6.3.2. Hodnocení embryí	- 32 -
3.6.3.3. Uchování embryí	- 33 -
3.6.3.4. Transfer embryí	- 35 -
3.6.4. Klonování	- 36 -
4. Závěr	- 38 -
5. Reference	- 40 -

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Geografické rozdíly v období páření - 19 -

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Taxonomie čeledi velbloudovití (Camelidae) - 13 -

Obrázek 2: Velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*) - 14 -

Obrázek 3: Počet velbloudů v jednotlivých zemích - 15 -

Obrázek 4: Velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*) - 16 -

Obrázek 5: Umělá bovinní vagina - 25 -

Obrázek 6: Maketa velbloudí samice - 26 -

Obrázek 7: Trojcestný a dvoucestný katetr - 32 -

Obrázek 8: Klasifikace embryí u skotu - 33 -

Obrázek 9: Příklad způsobu vkládání pejetý pro zmrazení v 10% glycerolu - 35 -

Obrázek 10: Příklad způsobu vkládání pejetý pro zmrazení v 1,5M v EG - 35 -

Seznam zkratk použitých v práci

IUCN – Mezinárodní svaz ochrany přírody; z anglického International Union for Conservation of Nature

eCG – choriový gonadotropin

FSH – folikulostimulační hormon

PGF2 α – prostaglandin F2 alfa

GnRH – gonadotropiny uvolňující hormon

hCG – lidský choriový gonadotropin

LH – luteinizační hormon

PBS – fosfátem pufovaný roztok

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EG - ethylenglykol

rpm – otáčky za minutu

M – molární hmotnost

c – koncentrace

resp. – respektive

cca – cirka; přibližně

1. Úvod

Zvyšování teploty planety Země způsobené globálním oteplováním je jedním z faktorů zapříčiňujících rozšiřování plochy pouští neboli desertifikaci. Velbloud má díky svým vlastnostem dobré vyhlídky na přežití v těchto nepříznivých podmínkách jako vhodné hospodářské zvíře pro projekty udržitelného zemědělství a živočišné výroby. V minulosti byli velbloudi využíváni především pro transport zboží a osob na dlouhé vzdálenosti, ale v posledních letech roste jejich potřeba pro produkci masa, mléka a dalších produktů. Jsou totiž svými vlastnostmi dokonale přizpůsobeni životu v drsných podmínkách, jako jsou vysoké teploty, sucho a nedostatek potravy, které nepříznivě ovlivňují výkonnost ostatních hospodářských zvířat.

Reprodukční výkonnost velbloudů je však v porovnání s ostatními hospodářskými zvířaty nízká. To se odráží především na klesajících počtech divokého velblouda dvouhrbého, který patří mezi kriticky ohrožená zvířata. Stále více studií se zabývá možnostmi zlepšení reprodukce velbloudů, díky čemuž je možné zároveň docílit i zvýšení mléčné a masné produkce.

Tato bakalářská práce v první části pojednává o reprodukci velbloudů a podrobněji se zabývá problémy s ní spojenými. V další části, která vychází především z vědeckých článků, jsou popsány jednotlivé biotechnologické metody, které jsou účinným nástrojem ke zlepšení reprodukce. Cílem práce je tyto poznatky shrnout do uceleného přehledu, jenž může posloužit například v záchranném programu divokého velblouda dvouhrbého jako východisko při výběru vhodné biotechnologické metody – po zvážení dostupnosti vhodných technologií a kvalifikovaného týmu.

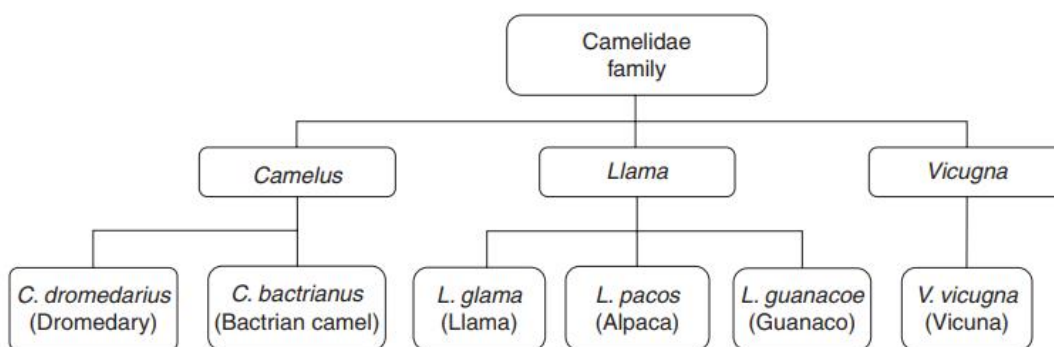
2. Metodika

Literární rešerše byla zpracována především na základě vědeckých publikací. Ty byly vyhledávány v elektronických databázích za pomoci klíčových slov. Veškerá literatura byla citována podle závazných pravidel FTZ. Práce byla sepsána a strukturována dle Manuálu pro psaní bakalářských prací FTZ.

3. Literární rešerše

3.1. Základní charakteristika a využití velbloudů

Čeď velbloudovití (Camelidae) zahrnuje tři rody (viz Obrázek 1) – velbloudy (*Camelus*), lamy (*Lama*) a vikuně (*Vicuna*) (Skidmore 2003; Kadim et al. 2012). Velbloudi patří mezi významná hospodářská zvířata, a to díky svým jedinečným vlastnostem, jako je adaptace na vysoké teploty, nízká spotřeba vody a krmiva a celková nenáročnost (El-Bahrawy et al. 2015; Kadim et al. 2012). Jsou důležitou transportní silou. Dokážou unést velice těžké náklady (až 300 kg) na dlouhé vzdálenosti. Od nepaměti byli nazýváni „koráby pouště“ („the ship of the desert“) (Feldhamer et al. 2007). Při běhu dokážou vyvinout rychlost až 64 km/h (DesertUSA 2019). Po staletí jsou díky tomu využíváni i v dostihových závodech, především ve Spojených arabských emirátech. Dále lidem slouží jako zdroj mléka, které je v poslední době stále vyhledávanější komoditou pro výrobu různých dalších produktů (Yasin & Wahid 1957). Neméně důležitá je i produkce srsti či masa, která se stává stále významnější, vzhledem ke změnám klimatu, které negativně ovlivňují výkony ostatních masných zvířat (El-Bahrawy 2013; Skidmore 2003). Rychlý nárůst lidské populace v rozvojových zemích vede k vysoké poptávce po produkci masa. Důležité je také využití velbloudího trusu jako paliva, které je snadno dostupné, levné, obnovitelné a produkuje méně znečištění než spalování fosilních paliv (DesertUSA 2019).



Obrázek 1: Taxonomie čeledi velbloudovití (Camelidae). Zdroj: (Kadim et al. 2012)

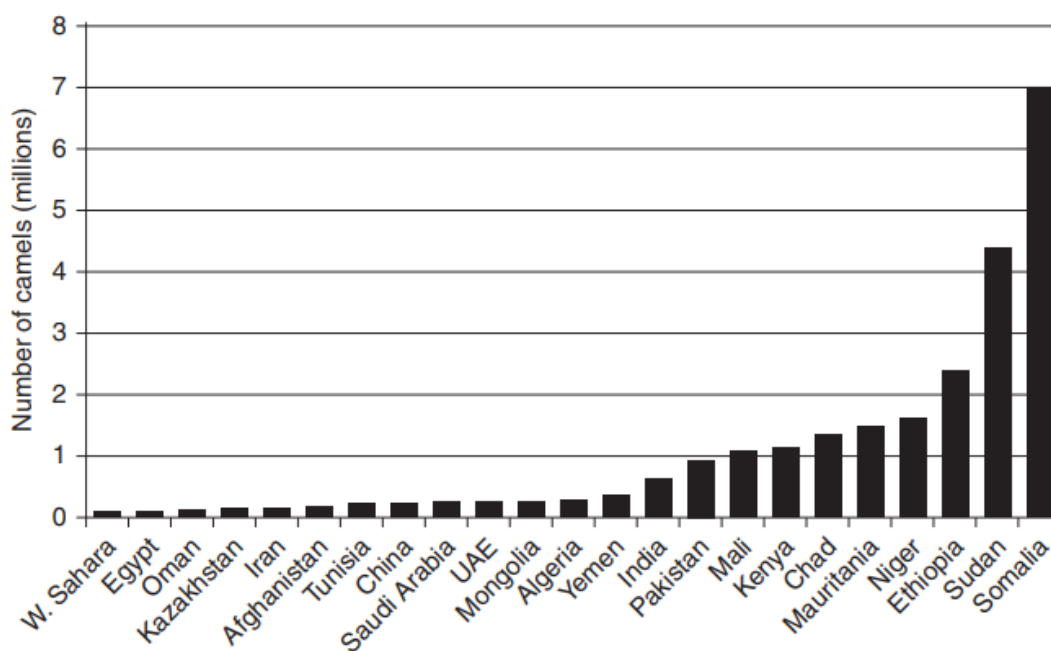
3.2. Popis druhu

Rod velbloudů zahrnuje tři druhy – velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*), domestikovaný velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*) a divoký velbloud dvouhrbý (*Camelus ferus*). Velbloud jednohrbý, známý též pod názvem dromedár (viz Obrázek 2), je rozšířen v oblastech s aridním klimatem s nízkým množstvím srážek a bez mrazivých zim. Dromedáři hrají důležitou ekonomickou roli především v Egyptě, ale i v mnoha dalších zemích (Ismail et al. 1998). Mezi ty patří především Blízký východ, Pákistán, Afghánistán a Indie a dále suché pouštní oblasti střední a jihovýchodní Asie a pouště Sahary v severní Africe (viz Obrázek 3) (DesertUSA 2019; Kadim et al. 2013). Mají široká mozolnatá chodidla s paznehty, která jim umožňují bezproblémovou chůzi v hlubokém písku, ale i po skalnaté krajině. Jejich srst je zbarvena do světle hnědé, ale existují i velice cenní jedinci bílé barvy. Dromedár je ideální pro pěší pochody s těžkým nákladem a samice mají velmi vysokou mléčnost (Kotpal 2010).



Obrázek 2: Velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*). Zdroj: (Ševčík 2019)

Velbloud dvouhrbý, nebo také drabař (viz Obrázek 4) se vyskytuje v severnějších pásmech s výskytem mrazivých zim, např. v Kazachstánu, Mongolsku, Číně a východně od Sibíře. Společně s dromedárem se pak vyskytuje také v Íránu, Afghánistánu, Pákistánu a Indii (Kadim et al. 2012). Divoký velbloud dvouhrbý je podle IUCN považován za kriticky ohrožený druh, nachází se v pouštích Gobi a Gashun Gobi v severozápadní Číně a Mongolsku, kde celkem žije pouze kolem 950 jedinců (Katzensky et al. 2014; Hare 2008; Kadim et al. 2012). Tento druh je ohrožen především lidmi, pytláctvím, hybridizací, konkurencí a přenosem chorob z domestikovaných velbloudů dvouhrbých (Katzensky et al. 2014). Domácích velbloudů dvouhrbých je zhruba 1,4 milionu (DesertUSA 2019). Drabaři mají kratší krk a zároveň delší tělo s kratšíma nohama, než mají dromedáři. Nejsou tedy tolik vhodní jako soumaři pro nošení těžkých nákladů, ale zato jsou lepší jako tažná zvířata. Dále jsou důležití pro produkci srsti, jelikož na zimu obrůstají velmi dlouhou a hustou hřívou, která bývá tmavší než u dromedárů (Kotpal 2010).



Obrázek 3: Počet velbloudů v jednotlivých zemích. Zdroj: (Kadim et al. 2012)



Obrázek 4: Velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*). Zdroj: (Romanow 2012)

3.3. Výživa, chování a adaptace na stres

Velbloudi jsou býložravci, živí se trávou a pouštními rostlinami a dosáhnou i na vyšší stromy. Vnitřek jejich úst je lemován hustou kůží, která jim umožňuje žvýkat i trnité rostliny, které jiná zvířata nemohou konzumovat. Mohou jíst i rostliny s vysokým obsahem soli (Feldhamer et al. 2007). Velbloudi cestují ve stádech nebo karavanách, kde převažují samice a mláďata s jedním dominantním samcem (DesertUSA 2019). Pokud jde o přizpůsobení se drsnému prostředí, mají velbloudi oproti ostatním domestikovaným zvířatům značné výhody. Jejich morfologické rysy je činí dobře přizpůsobenými k přežití v aridních, semiaridních a hornatých oblastech (Kadim et al. 2012). K tomu jim pomáhá i jejich hrb, který se skládá z tukové tkáně. Ta minimalizuje tepelnou izolaci ve zbytku těla a udržuje je chladnější. Dále mají hustou srst, která odráží sluneční záření a nedosáhne jejich kůže. V nejteplejších dnech tak může teplota na povrchu jejich srsti vystoupat až k 80 °C, teplota kůže je však kolem 40 °C (Feldhamer et al. 2007). Jejich tělesné teploty se pohybují od 33,8 °C během noci do 41 °C během dne. Tento tepelný rozdíl jim pomáhá snížit množství tekutiny, kterou ztratí pocením. Velbloudi mohou pocením ztratit 20–25 % tělesné hmotnosti, nežli dojde k dehydrataci. Přičemž většina ostatních zvířat nesmí překročit 3–4% ztrátu, jinak by došlo k srdečnímu selhání. Nosní dírký velbloudů dokážou zachytit a recyklovat vodní páry z výdechu a vrátit je zpět do těla, což snižuje

množství vody ztracené během procesu dýchání. Ke snižování ztrát vody napomáhá i lepší vstřebávání, takže jejich trus je suchý a moč má hustou konzistenci. Velbloudi se dožívají 40–50 let. Většina velbloudů (skoro 90 %) je domestikována (DesertUSA 2019).

3.4. Záchranný program divokého velblouda dvouhrbého

V Mongolsku byl založen program pro ochranu divokého velblouda dvouhrbého nadací Wild Camel Protection Foundation. Jedná se o naléhavou prioritu zachování, jelikož v Číně a Mongolsku žije v současné době v zajetí pouze 15 divokých velbloudů. S tak malým počtem zajatých zvířat může celý druh vymizet, pokud budou zničena jejich přirozená stanoviště v Číně a Mongolsku, kde žije pouze kolem 950 jedinců. Je proto důležité chovat v zajetí dostatek zvířat, aby se této možné katastrofě zabránilo. Přirozená reprodukce bohužel k nárůstu počtů zvířat není dostačující, vzhledem k problémům s ní spojených. Je tedy nutné využívat jednotlivých biotechnologických metod, které pomáhají počty zvířat zvyšovat a zlepšovat jejich genetickou výbavu (Hare 2008). V roce 1976 byla na hranicích Mongolska a Číny založena přísně chráněná rezervace Great Gobi a jedná se o čtvrtou největší biosférickou rezervaci na světě. Nachází se zde vzácné pouštní a horské stepní vegetace, které poskytují útočiště jak divokým velbloudům dvouhrbým (cca 350 jedinců), tak i divokým oslům, gobijským medvědům a jiným ohroženým zvířatům (Hare 2008; UNESCO 2008; Katzensky et al. 2014).

3.5. Reprodukce velbloudů

Velbloudi jsou schopni přežít a rozmnožovat se ve velice nevlídných podmínkách. Díky svým jedinečným adaptačním vlastnostem se považují za nejvšestrannější zvířata, která žijí a působí v tak přísných podmínkách životního prostředí. Avšak reprodukční úspěšnost velbloudů nepříznivě ovlivňuje několik faktorů (El-Bahrawy et al. 2015; Ismail et al. 1998). Mezi ty patří například věk pohlavní dospělosti, dlouhé mezidobí (tj. období mezi dvěma porody), dlouhé období březosti (13 měsíců), sezónní rozmnožování či indukovaná ovulace (Abdussamad et al. 2011; El-Hassainen et al. 2010). Obvykle se každé dva roky rodí pouze jedno mládě, což podle Ismaila (1998) může být způsobeno krátkou dobou rozmnožování spolu s dlouhým obdobím laktace (Ismail et al. 1998).

Páření nastává pouze v určitých obdobích roku, proto jsou velbloudi považováni za sezónně polyestrická zvířata. Období přirozeného páření se vyskytuje ve všech oblastech v době roku, kdy je folikulární vlna nejdelší. Ve Spojených arabských emirátech vykazují velbloudi ovariaální aktivitu po celý rok, pokud jsou dobře živěni (Agarwal et al. 1997). Tato perioda se liší na základě geologické polohy (viz Tabulka 1) a genetiky. Začátek období páření může souviset i s prodlužováním délky denního světla (Merkt et al. 1990). Při vzrůstu teplot pohlavní aktivita ustává (Hafez & Hafez 2001). Dalšími faktory ovlivňujícími sexuální aktivitu jsou tělesná hmotnost, optimální výživa, fotoperioda, teplota a dostupnost pitné vody (Basiouni 2007). Samice sice pohlavně dospívají již ve věku 3 let, připouštění se však povoluje od věku 4 let (Abdussamad et al. 2011) a fakticky bývají připouštěny až v 6 letech. Samice mohou být sexuálně aktivní 20–30 let (Merkt et al. 1990). Říje u velbloudích samců je zřetelná a nastává během chladného suchého období mezi říjnem a prosincem (Abdussamad et al. 2011), v egyptských klimatických podmínkách od poloviny prosince do pozdního února (El-Bahrawy et al. 2015), a mezi její příznaky patří roztažený postoj, časté močení, házení ocasem a nechutenství vedoucí ke ztrátě hmotnosti, z týlní žlázy vylučuje černý zapáchající sekret, pysky se mu obalí pěnou, skřípe zuby, kouše a kope (Abdussamad et al. 2011; El-Bahrawy et al. 2015). Samci bývají agresivní a těžko zvladatelní, měli by být od sebe odděleni, aby se předešlo bojům a případným zraněním či smrti. Příznaky u samic nejsou tak zjevné, ale může se vyskytovat zvýšené prokrvení pohlavních orgánů,

dráždivost, neklid, časté močení a vyhledávání samce (Abdussamad et al. 2011). Samec v říji často sleduje samici, kousá ji do hrbu či zadní nohy a očichává její vulvu. Samice se v odezvě rozkročí, zvedne hlavu a ocas do vzduchu a periodicky močí, dokud nesvolí k páření. Páření velbloudů probíhá vleže. Samice se o zem opírá svými hrudními mozoly a samec se hrudí opírá o zadní část jejího hrbu. Samotný pohlavní akt trvá zhruba 13–14 minut. Může ale trvat déle, a to až 26 minut (Abdussamad, et al. 2011).

Tabulka 1: Geografické rozdíly v období páření. Zdroj: (Merkt et al. 1990)

Doba říje	Země	Klima	Nutriční status
Listopad - březen	Indie	Délka dne se nejprve snižuje, poté zvyšuje	V závislosti na úrovni výživy
Listopad - únor	Indie	Délka dne se nejprve snižuje, poté zvyšuje	V závislosti na úrovni výživy
Říjen - březen	Indie	Délka dne se nejprve snižuje, poté zvyšuje	V závislosti na úrovni výživy
Prosinec - únor	Indie	Délka dne se zvyšuje	
Prosinec - březen	Pákistán	Délka dne se zvyšuje	
Pol. ledna - kon. května	Turkmenistán	Délka dne se rapidně zvyšuje; velmi chladné klima se otepluje	Chudý, především v časném období
Leden - únor	Írán	Délka dne se rapidně zvyšuje	
Leden - březen	Izrael	Chladné klima, oteplování	Krátké období růstu
Březen - duben	Egypt	Délka dne se zvyšuje - teplé až horké klima	
Březen - květen	Egypt	Délka dne se zvyšuje - teplé až horké klima	
Listopad - duben	Tunisie	Délka dne se nejprve snižuje, poté zvyšuje; déšť; oteplení	Vcelku dobrý
Prosinec - květen	Maroko	Délka dne se nejprve snižuje, poté zvyšuje	Vcelku dobrý
Listopad - duben	Maroko	Teplé až horké klima	
Srpen - září	Mali	Délka dne se snižuje; déšť	Dobrý
Únor - březen	Mali	Délka dne se zvyšuje; oteplování	Závislý na zimních podmínkách
Červen	Somálsko	Délka dne neměnná	Dobrý
Září - listopad	Somálsko	Délka dne se pomalu snižuje	Dobrý
Červen - září	Austrálie	Délka dne se zvyšuje	Dobrý

Pro detekci říje při řízeném zapouštění se používá prubíř. Pokud je samice v říji, ulehne před ním na zem a prubíře nahradí vybraný plemeník. Tento druh zapouštění je z plemenářského hlediska prospěšný, ale nejprve je nutné určené samce naučit pohotovosti k okamžitému páření (Abdussamad et al. 2011).

3.5.1. Pohlavní orgány samce

Varlata velbloudího samce jsou oválného tvaru a nacházejí se v šourku několik centimetrů pod sedacím obloukem. Po narození jsou malá, zvětšují se na začátku puberty a nejvyšší hmotnosti dosahují ve věku 10–14 let (Bravo et al. 2000). Každé varle váží 80–120 g a levé ve většině případů bývá větší než pravé. Slouží k produkci samčích hormonů a spermií. Nadvarlata se nacházejí na přední hraně varlat a dochází zde k dozrávání spermií (Merkt et al. 1990).

Předstojná žláza neboli prostata se nachází v úrovni hrdla močového měchýře. Je tvořena tubuloalveolárními žlázkami a je pokryta membránou z tenké vrstvy svalů. Produkuje prostatický sekret, který je důležitou složkou ejakulátu a umožňuje pohyblivost spermií. Bulbouretrální žláza, která ústí do močové trubice, vylučuje zásaditý sekret chránící spermie před kyselými zbytky moči. Chámovod sahá od nadvarlete do pánevní části močové trubice a při ejakulaci do ní vede sperma. Penis velblouda je zhruba 60 cm dlouhý. Je fibroelastického typu s charakteristickou kličkou esovitého tvaru před šourkem a žalud je zakřiven do tvaru háčku a je tvořen chrupavčitou tkání (Hafez & Hafez 2001; Merkt et al. 1990).

Počet pohlavních buněk na jeden gram tkáně velbloudího varlete je menší než u ostatních druhů zvířat. Velký vliv na produkci spermií mají sezónní změny (Merkt et al. 1990). Největší průměr semenotvorného kanálku a nejvyšší počet spermatogonií, spermatid a spermií, byl naměřen z materiálu shromážděného během jara. Počet Leydigových buněk, které ovlivňují zrání spermií a vývoj pohlavních znaků produkcí testosteronu (Rateb 2011), se zvyšuje na konci zimy a během jara je většina z nich dospělého typu. Degenerativní změny, se snižujícím se počtem dospělých Leydigových buněk, nastávají v létě a tento trend pokračuje do poloviny podzimu (Abdel-Raouf et al. 1974).

3.5.1.1. Charakteristika semene

Počáteční laboratorní test pro hodnocení plodnosti samců je analýza odebraného spermatu. Hodnocení spermatu zahrnuje vizuální kontrolu (barva ejakulátu a objem) a evaluaci fyzických charakteristik (pohyblivost, životaschopnost, morfologie a případně abnormality u spermií (El-Bahrawy et al. 2015). Barva spermatu závisí na poměru šedé želatinové složky a bílé složky bohaté na spermie. Průměrně nejvyšší objem spermatu byl zaznamenán během února (7,9 ml) a nejnižší během prosince (3,9 ml) (El-Bahrawy 2005). Pohyblivost spermií bývá v široké škále 0–90 %, průměrně však kolem 46,7 % (El-Bahrawy et al. 2015). Spermie velblouda je obvykle menší než u ostatních domestikovaných zvířat. Její celková délka je zhruba 42,2 μm . Objem ejakulátu kolísá mezi 5 až 22 ml a průměrně činí 8,5 ml. Barva semene je světle šedá až mléčně bílá. Ihned po odběru má želatinovou konzistenci, která po 7 až 8 minutách zřídne. Koncentrace spermií v ejakulátu bývá nejvyšší v průběhu zimy

($0,736 \times 10^6$) a přes léto klesá ($0,176 \times 10^6$). PH je zásadité (přibližně 7,8). Průměrný obsah živých spermií je 55 % (Merkt et al. 1990).

3.5.2. Pohlavní orgány samice

Vaječníky jsou oválného zploštělého tvaru. Velikost a tvar se liší na základě obsahu folikulů a žlutého tělíska, díky kterým je jejich povrch nerovný (Srikandakumar et al. 2001). Hmotnost a velikost vaječníků je ovlivněna věkem a velikostí samice a také stádiem reprodukčního cyklu. Průměrně měří kolem 3 cm na délku a 2 cm na šířku s tloušťkou menší než 1 cm. Nefunkční vaječník váží přibližně 4 g, zatímco vaječník obsahující Graafovy folikuly či žluté tělísko může vážit 5,5 až 8 g (Merkt et al. 1990; Basiouni 2007).

Graafovy folikuly vznikají na začátku ovulace a obsahují oocyt. Jsou náhodně dopravovány na povrch vaječníku. Průměrný čas potřebný k jejich dozrání činí 6 dní a liší se u jedinců i v průběhu cyklu. Po dozrání zachovávají svou velikost zhruba 13 dní a během dalších 8 dní opět ustupují. Tato perioda od vzniku až po zánik Graafova folikulu se nazývá folikulární vlna (Merkt et al. 1990).

Žluté tělísko se tvoří 1 až 2 dny po páření. Zraje po dobu 5 až 10 dní a v této podobě dále zůstává 3 dny. Zralé tělísko se svým tvarem a velikostí podobá zralému folikulu. Pokud po ovulaci nedojde k početí, žluté tělísko během 10 až 12 dní vymizí. Vejcovod je dlouhý 17–28 cm. Každý vejcovod ústí do děložního rohu úzkým otvorem na vrcholku papily. Na děložním konci jsou vejcovody prodloužené, aby umožnily delší dobu uložení vysokého počtu spermií (Merkt et al. 1990).

Děloha velbloudí samice je dvourohá a dostatečně velká, aby se vešla do pozice, která je částečně břišní a částečně pánevní. Z dobře vyvinutého děložního těla vybíhají dva děložní rohy, které dávají vzniknout typickému děložnímu tvaru do písmene T (Srikandakumar et al. 2001). Sliznice dělohy je hladká. Děložní krček je krátká struktura tvořená pěti prstencovými slizničními záhyby lehce vyčnívajícími do pochvy. Pochva je elastická, dlouhá zhruba 30,5 cm. Ve vaginální stěně jsou podélné a kruhové slizniční záhyby. Gartnerův kanálek je dlouhý a Bartholiniho žláza, nacházející se v oblasti vnějšího otvoru děložního čípku, je dobře vyvinutá (Merkt et al. 1990).

3.5.2.1. Folikulární vlna, ovulace

Je známo, že ovulace velbloudích samic je provokovaná. K vyvolání neuroendokrinního reflexu, zahrnujícího zahájení uvolňování luteinizačního hormonu je nutná kopulace nebo jiná stimulace (El-Hassainen et al. 2010; Merkt et al. 1990). Ovulace se následně dostaví po 32–46 hodinách. Je tedy nesprávné používat termín estrální cyklus – jedná se spíše o folikulární vlny. Ovulace je ovlivněna sezónně, v některých měsících je činnost vaječnicků nižší, zatímco v jiných je velmi vysoká. Délka folikulární vlny se liší s ohledem na geografickou polohu. V Indii je průměrná délka cyklu 23,4 dne, v Egyptě 24,2 dne a v Súdánu až 28 dní. Říje trvá 4–6 dní. Délka cyklu bývá 19 dní a proestrus obvykle trvá 5 dní (Merkt et al. 1990).

3.6. Biotechnologické metody reprodukce

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, reprodukční efektivita velbloudů je velmi nízká a omezená několika faktory. Velbloudi jsou známí pro jejich unikátní sexuální chování během období říje. Mají přirozená omezení v oblasti reprodukce, jako je dlouhé období příchodu do puberty, sezónnost páření, dlouhá doba březosti a vysoký výskyt embryonální smrti. Dalším problémem je také pokračující využívání tradičních systémů reprodukčního managementu ve většině případů chovných stád. Metody umělé inseminace a přenosu embrya by mohly být využity k překonání některých z těchto problémů a poskytnout příležitost k produkci více potomků z požadovaných kombinací samce a samice (Skidmore 2003).

Je tedy důležité zlepšovat vědomosti ohledně ovariální funkce a vlastností semene a pomocí aplikace technologií asistované reprodukce umožnit zkvalitnění reprodukce a genetické vylepšení velbloudů (El-Bahrawy 2013). Tyto alternativní reprodukční techniky jsou dostupné nejen pro manipulaci s reprodukčními procesy, ale také se ukázaly být mocnými nástroji při potlačení šíření vertikálně přenášených chorob (Chakravarthi & Sri Balaji 2010).

Množství informací ohledně problémů s reprodukcí velbloudů je značně omezené. Sběr dat probíhá většinou formou dotazníků vyplněných majiteli velbloudů, materiálů z jatek nebo pozorováním zvířat na farmách či klinikách (Merkt et al. 1990). Nedostatek veterinárních znalostí v biotechnologických technikách, jako je například

embryotransfer či umělé oplodnění, souvisí s nedostatkem informací v dostupné literatuře (Skidmore 2003).

3.6.1. Inseminace

Umělá inseminace je nejefektivnější a také nejméně invazivní asistovanou reprodukční metodou, jež obchází fyzikální nebo behaviorální překážky přirozeného páření a zajišťuje genetickou výměnu mezi populacemi a genetické vylepšení zvířat (Durrant 2009). Reprodukční schopnost a efektivita se od zavedení umělé inseminace u hospodářských zvířat výrazně zlepšila (Chakravarthi & Sri Balaji 2010). Zatímco se u velbloudích samců říje vyskutuje pouze v určitém období, samice mohou být sexuálně aktivní i mimo období říje (El-Bahrawy et al. 2006). Pokrok ve vývoji umělého oplodnění, metody uchování spermatu a dalších technik souvisejících s tímto oborem není u velbloudovitých natolik pokročilý v porovnání s ostatními druhy hospodářských zvířat. Důvodem je poměrně limitované množství informací o anatomii a fyziologii čeledi velbloudovitých v dostupné literatuře (Bravo et al. 2000), problematický odběr spermatu, málo informací v literatuře ohledně charakteristik semene, jeho ředění a následného zmrazení (El-Bahrawy et al. 2006). Dalším limitujícím omezením je efektivní detekce říje, která vyžaduje mnoho času, dovedností a výdajů (El-Hassainen et al. 2010).

Studie biofyzických a biochemických vlastností spermatu jsou esenciální pro jeho další zpracování, zachování a následnou inseminaci (Mosaferi et al. 2005). U velbloudů se využívá několika metod odběru spermatu. Ty mohou ovlivnit jeho biochemické vlastnosti, jako je například objem nebo kvalita. Zájem o používání biotechnologických metod reprodukce u velbloudů v posledních letech významně vzrostl, a to především díky jejich komerčnímu potenciálu (El-Bahrawy et al. 2006).

3.6.1.1. Odběr spermatu

Odběr spermatu je důležitým krokem k jeho hodnocení a zpracování. Zvýšení povědomí o charakteristikách velbloudího spermatu a jeho schopnosti zmraznout může pomoci porozumět jednomu z mnoha faktorů ovlivňujících špatnou plodnost velbloudů (El-Bahrawy et al. 2006).

Existuje několik metod odběru, které byly upraveny tak, aby se přizpůsobily chování velbloudího samce při kopulaci (El-Bahrawy 2013). Podle Brava (2000) patří mezi přijatelné metody odběru spermatu elektroejakulace a odběr pomocí umělé bovinní vaginy (Bravo et al. 2000). Jedním z největších problémů, které zpomalují vývoj umělé inseminace, je mukoidní povaha velbloudího spermatu. Je zaznamenána korelace mezi vysokým počtem selhání zabřeznutí a touto viskózní formou semene. Ta snižuje schopnost posuzovat ejakulát při určování koncentrace a pohyblivosti spermií (El-Zanaty et al. 2004).

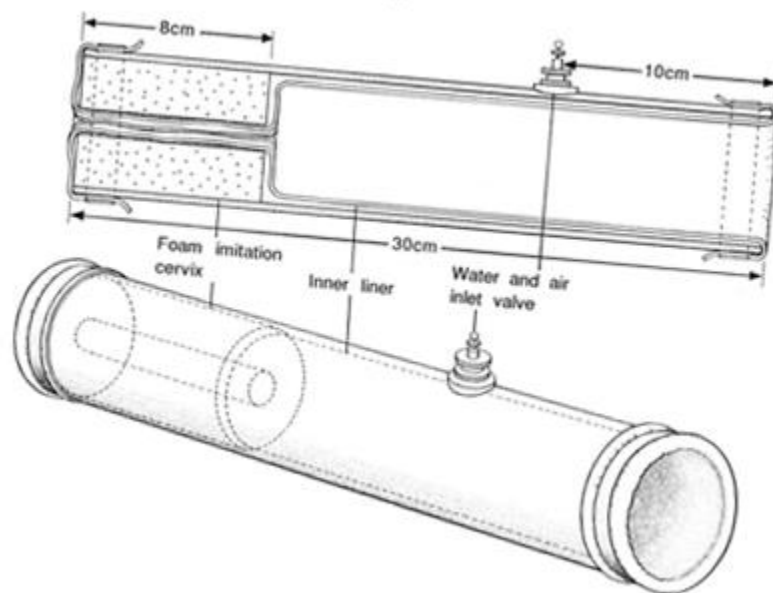
Vědecký článek Brava (2000) popisuje elektroejakulaci jako ejakulaci vyvolanou působením elektrického proudu prostřednictvím rektální sondy. Tato metoda je nejcennější v období říje samců, kdy jejich agresivní chování může způsobit ublížení na zdraví člověka, který sperma odebírá. K ejakulaci dochází zhruba po pěti minutách, kdy se v deseti vteřinových intervalech rektálně aplikují elektrické impulzy. Agresivní reakce samců se dají zmírnit použitím uklidňujícího prostředku. Výsledkem tohoto odběru spermatu je sice menší množství ejakulátu, ostatní parametry se ale shodují s ejakulátem odebraným pomocí umělé vaginy (Bravo et al. 2000).

Podle El-Bahrawyho (2013) je však tato metoda v některých společnostech eticky nepřijatelná, jelikož se jedná o velice stresující záležitost, neposkytuje vždy reprezentativní vzorek semene a neumožňuje hodnocení sexuálního chování velbloudů (El-Bahrawy 2013).

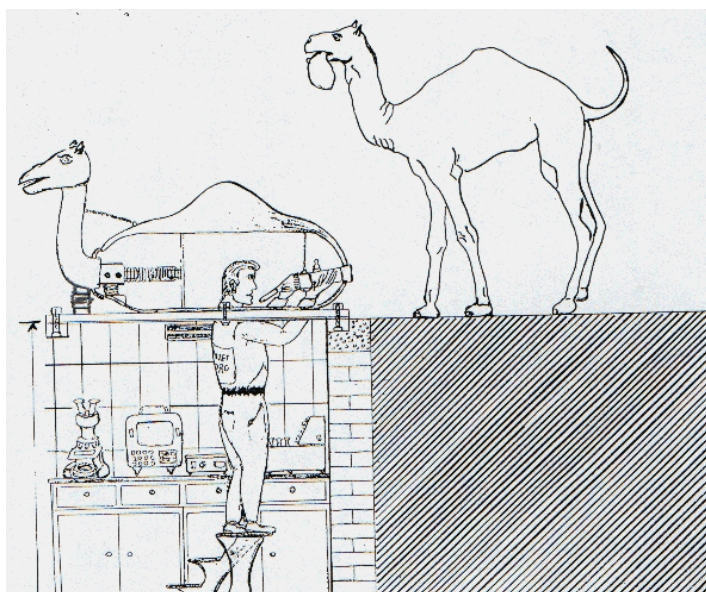
Příklady konkrétních výzkumů

Odběr spermatu byl popsán v řadě studií. Například Mosaferi (2005) píše o výzkumu provedeném v letech 2001 a 2002 v Íránu ve výzkumném centru Jahadabad, Meshkinshahr, provincie Ardabil. Zúčastnilo se jej 10 jedinců velblouda dvouhrbého ve věku od 4 do 12 let. V období říje byl jednou týdně prováděn odběr spermatu pomocí umělé bovinní vaginy, která je vidět na Obrázku 5 (30 cm dlouhá, 5 cm vnitřní průměr; IMV Technologies, Francie). Pro zamezení kontaktu odebíraného ejakulátu s vnitřní gumovou vložkou umělé vaginy, což by mohlo vést ke snížení pohyblivosti spermií, byl její povrch pokryt tenkou vrstvou vazelíny. Dále byla ke konci této vnitřní vložky připojena nádrž na odběr spermatu, obklopena termálním pláštěm pro minimalizaci chlazení v průběhu odběru ejakulátu (Mosaferi et al. 2005). Kopulační čas činil přibližně 5,3 min. a po odběru byl ejakulát vložen do inkubátoru nastaveného na 37 °C

a byl hodnocen jeho objem, barva, osmolarita, pH, koncentrace a pohyblivost živých spermií. Celkový objem byl určen pomocí odstupňovaného odměrného válce a průměrně činil 8,2 ml. Barva a konzistence byly hodnoceny přímou vizuální prohlídkou a evidovány jako smetanová, mléčná nebo čirá. Převládala však barva mléčná, která byla zjištěna u 83,6 % vzorků. PH bylo měřeno elektronickým pH metrem a pohybovalo se v rozmezí 7,1–7,9 – tedy mírně alkalické. Poté byly vzorky zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a později biochemicky analyzovány. Metody odběru a uchování spermatu, prezentovány v této studii, byly přínosné především díky odstranění viskozity semene, která bývá překážkou v dalším zpracování spermatu velbloudů (Mosaferi et al. 2005). Jako alternativa k aplikaci vazelíny pro zabránění doteku s gumovým materiálem se dá použít jednorázová plastová vložka (Bravo et al. 2000).



Obrázek 5: Umělá bovinní vagina. Zdroj: (Bravo et al. 2000)



Obrázek 6: Maketa velbloudí samice.

Zdroj: (El-Hassainen 2019)

Ve studii napsané El-Bahrawym (2006) se píše o výzkumu provedeném v Egyptě na výzkumné stanici Maryout. Zúčastnilo se jej 5 velbloudů jednohrbých ve věku 6 let. Sperma jim bylo odebíráno dvakrát týdně pomocí makety velbloudí samice, která se tvarem a velikostí podobá samici v pářící pozici, je v ní umístěna umělá vagina, pomocí které je odebíráno sperma člověkem, který se nachází v prostoru pod samicí, jak je vidět na Obrázku 6. Vzorky spermatu byly poté přeneseny do vodní lázně o teplotě 37 °C. Byly vyloučeny ty vzorky, které byly kontaminovány močí, výkaly nebo měly neobvyklou barvu či zápach. Poté byla měřena pohyblivost spermií pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Leica), pH pomocí pH metru a koncentrace spermií hemocytometrem. Semenná plazma, která byla v této studii dále používána, byla připravena odstředěním při 18 000 rpm po třiceti minutách a poté nasáta do čistých trubiček. Pro stanovení několika dalších parametrů byl použit kolorimetr. Dále byly zjištěny hladiny proteinů, cholesterolu, glukózy a testosteronu (El-Bahrawy et al. 2006).

Ve dvoukrokové metodě zmrazení použili ředidlo na bázi sacharózy doplněné antibiotiky a glycerolem (c: 2 %), fungujícím jako kryoprotektant, a vaječným žloutkem (c: 15–20 %), který je účinnou ochranou vůči šokům z chladu. Před použitím byla tato ředidla nejprve jemně promíchána a zahřáta na 37 °C ve vodní lázni. Ke vzorkům spermatu bylo nejprve přidáno ředidlo bez kryoprotektantu, společně byly důkladně promíchány a po dobu 90 minut ponechány ve vychlazené komoře na 5 °C. Poté se přidal

glycerol a naředěné sperma bylo ponecháno další dvě a půl hodiny při 5 °C. Nakonec byly vzorky po dobu 15 minut ponechány v –140 °C a poté ponořeny do tekutého dusíku (–196 °C). Několik vzorků bylo následně rozmrazeno pomocí tavicího zařízení za působení 37 °C po dobu 40 minut, pro posouzení motility spermií po rozmrazení (El-Bahrawy et al. 2006).

Objem spermatu byl naměřen v širokém rozsahu od 1 do 18 ml s průměrem 8,43 ml. Také motilita spermií ukazovala velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky a to od 0 % až po 90 %, průměrně však činila 46,7 %. Průměrná koncentrace spermií byla $296,76 \times 10^6$. PH se pohybovalo kolem 8,72, osmolarita 0,367 Osmole/kg a průměrný bod mrazu –0,681 °C. Průměrná koncentrace cholesterolu v semenné plazmě byla 97,9 mg/dl, glukózy 3,4 mg/dl a testosteronu 5,47 ng/ml (El-Bahrawy et al. 2006).

Srovnání obou výzkumů odběru spermatu

Výsledky obou výzkumů se od sebe výrazně neliší. Jediný větší rozdíl je v naměřených hodnotách pH, přičemž v prvním výzkumu se pohybuje v rozmezí 7,1–7,9 ml a ve druhém výzkumu v rozmezí 8,06–9,46. Tento rozdíl může být dán faktem, že prvního výzkumu se zúčastnili velbloudi dvouhrbí, zatímco druhého výzkumu se zúčastnili velbloudi jednohrbí. Dále zde může hrát roli geografická poloha, strava a podmínky života nebo rozdílná manipulace se vzorky. Jako důležitý krok při odběru spermatu se jeví použití vazelíny k zabránění kontaktu ejakulátu s gumovou vložkou umělé vagíny v prvním výzkumu, jelikož pomáhá odstranit problém viskozity semene.

3.6.1.2. Zpracování spermatu

Vzhledem ke zvýšenému zájmu o aplikaci moderních reprodukčních technologií, především o umělou inseminaci, se stává optimalizace dávky spermatu nutností. Pro tento účel byla testována různá ředící činidla a kryoprotektanty. Jako ředidla spermatu (El-Bahrawy et al. 2015) testovali tris-sacharózu, tris-citrát, laktózu, odstředěné mléko, sacharózu I (15% vaječný žloutek) a sacharózu II (20% vaječný žloutek) ve vztahu k posuzování spermatu po rozmrazení. Nejvyšší pohyblivost spermií po rozmrazení (45,8 %) spolu s nejvyšší mírou přežití (73,3 %) zaznamenali při použití tris-laktózy spolu s 2% glycerolem (El-Bahrawy et al. 2015).

Jedním z problémů při zpracování spermatu může být jeho kontaminace bakteriemi, a to kvůli dlouhé době odběru a pozici vsedě při kopulaci. Pro eliminaci této kontaminace je tedy vhodné zaměnit ředící činidlo antibiotikem Ciprofloxacinem, přičemž nedojde k ovlivnění fyzikálních charakteristik spermií po rozmrazení. Dalším důležitým krokem je odstranění viskózního charakteru spermatu. Jako nejúčinnější mukolytická látka byla vyhodnocena α -amyláza, která zcela eliminovala viskozitu a výrazně zlepšila pohyblivost spermií dopředu v porovnání s neošetřeným spermatem (El-Bahrawy et al. 2015).

3.6.2. Synchronizace říje

Estrus je nejzranitelnějším obdobím v sexuálním životě samice velblouda. Synchronizace estru jako prostředku ke zlepšení reprodukční výkonnosti se v současné době využívá v reprodukčních programech většiny hospodářských zvířat (Ismail et al. 1998). Podle Basiouniho (2007) snaha o zlepšení reprodukční činnosti samice velblouda úzce souvisí s lepším pochopením průběhu folikulární vlny. Přesný mechanismus regulující folikulogenezi byl popsán pouze částečně (Basiouni 2007).

Jelikož ovulace velbloudů je indukovaná, synchronizace ovulace ve skupinách příjemců představuje značný praktický problém vzhledem k absenci cyklického žlutého tělíska mimo období březosti (Nikjou et al. 2008; Kennady et al. 2018; Skidmore & Billah 2005). Z tohoto důvodu jsou pro velblouda nevhodné způsoby, které se běžně používají pro synchronizaci říje skotu – buď poskytnutím dvou injekcí prostaglandinu PGF₂ α po 11 dnech, nebo podáváním exogenního progesteronu nebo progestagenu s nebo bez PGF₂ α (Skidmore & Billah 2005; Kennady et al. 2018; Nikjou et al. 2008).

U spontánních ovulátorů (ovce, kozy a skot) se cyklus estru skládá ze čtyř fází známých jako proestrus, estrus, metestrus a diestrus. V jiné klasifikaci byly tyto čtyři fáze rozděleny do dvou hlavních fází – folikulární a luteální fáze (Basiouni 2007). U velbloudů neexistuje klasický estrální cyklus rozdělený do folikulárních a luteálních fází, ale dochází k vývoji folikulů ve vlnových vzorcích – folikulární vlny (Tibary & Anouassi 1996; Nikjou et al. 2008; Nikjou et al. 2009; Basiouni 2007; Merkt et al. 1990).

V pravidelných intervalech se na vaječníku objevují soubory malých folikulů. Jeden z těchto folikulů se stává dominantním, pokračuje v růstu a zároveň potlačuje růst ostatních folikulů ze souboru. Pokud nedojde k páření, tento dominantní folikul projde

několika vývojovými fázemi – růstová, zralá nebo statická fáze a nakonec regrese. Když tento folikul ztrácí svou dominanci, začne se formovat nová folikulární vlna (Tibary & Anouassi 1996; Basiouni 2007). Doba mezi vznikem dvou po sobě jdoucích folikulárních vln, resp. mezivlnového intervalu, činí cca 18 dní u nelaktujících samic a 16 dní u laktujících samic, což je mnohem delší doba nežli například u skotu (Nikjou et al. 2008). Jakmile dominantní folikul dosahuje průměru 0,9–1,0 cm stává se citlivým na stimuly indukce ovulace a zůstává citlivým až do dosažení velikosti 1,9–2,0 cm. Do 14. dne po ovulaci je většina dominantních folikulů v průměru mezi 1,3 a 1,9 cm (Skidmore et al. 2009).

Principem veškerých programů synchronizace ovariálních cyklů je odstranění supresivního účinku dominantního folikulu, aby se vyvolala nová folikulární vlna. Toho lze dosáhnout buď fyzikálními, nebo hormonálními metodami, které byly popsány ve studiích (Nagy & Juhasz 2012; Skidmore et al. 2009).

Fyzikální metoda, odstranění účinku dominantního folikulu pomocí ultrazvuku, je účinná, ale časově náročná a zároveň vyžaduje drahé vybavení a odborné znalosti pracovníků (Nagy & Juhasz 2012; Skidmore et al. 2009). Hormonální léčba pro synchronizaci vzniku folikulárních vln zahrnovala ve studii napsané Nikjou (2009) použití GnRH (gonadotropiny uvolňující hormon), hCG (choriový gonadotropin), LH (luteinizační hormon) a steroidů. Progesteron samotný nebo v kombinaci s 17β -estradiolem byl používán v různých formách (v oleji jako injekce, jako intravaginální zařízení, jako implantáty), dávky 100–200 mg na zvíře a pro různá období (jednorázová léčba, 7–15 dnů). Steroidy obecně mohou do konce léčby snížit velikost dominantního folikulu, ale nesynchronizují vývoj folikulů (Nikjou et al. 2009; Skidmore et al. 2009).

Indukce ovulace se podle Ismaila (1998) jeví jako nejúčinnější a nejpraktičtější metoda pro synchronizaci vzniku folikulárních vln u velbloudů. Jediná injekce GnRH indukuje ovulaci přibližně u 50 % dromedárů. Opakovaná léčba GnRH v intervalu 14 dnů by mohla vést k ovulaci až u 75–90 % samic (Skidmore et al. 2009; Nikjou et al. 2008). Léčba pomocí hCG je schopna vyvolat ovulaci během 1–2 dnů po injekci u samic velbloudů, které mají zralé Graafovy folikuly, během období říje i mimo něj. Navíc $\text{PGF}2\alpha$ může indukovat luteolýzu (2–4 dny) a estrus (3–5 dnů) po injekci u samic, které mají fungující žluté tělísko. Změna hodnot 17β -estradiolu a progesteronu během období, kdy nedochází k rozmnožování po léčbě GnRH, svědčí o skutečné indukci

estru a růstu folikulů po 6–8 dnech po dané léčbě. Aby se zvýšila účinnost synchronizace estrů, použití GnRH nebo hCG by se mělo kombinovat s dalšími aktivujícími látkami, jako je PGF₂α (Ismail et al. 1998).

3.6.3. Embryotransfer

Další biotechnologickou metodou reprodukce je embryotransfer. Technologie přenosu embryí je v dnešní době považována za hlavní metodu, která je velmi důležitá pro dosažení úspěchu v různých asistovaných reprodukčních technologiích, zejména v případě oplodnění in vitro a klonování zvířat (Kennady et al. 2018).

Tato metoda umožňuje produkci mláďat od geneticky cenných rodičů a zkracování generačního intervalu. Dále je důležitá jako diagnostická metoda pro případy neplodnosti, zejména v diagnostice blokových oviduktů, získání mláďat od neplodných samic, produkce mláďat požadovaného pohlaví, konzervace embryí za účelem přizpůsobení sezónních šlechtitelských nebo dlouhodobých strategií chovu, export a import embryí a zlepšení kontroly nemocí (Smith 2015; Kennady et al. 2018; Skidmore & Billah 2005). Tato metoda může být využívána v kombinaci s dalšími asistovanými reprodukčními technikami, jako například umělá inseminace čerstvým nebo chlazeným spermatem (McKinnon et al. 1994). Dosažení vyšší míry plodnosti závisí především na kvalitě embryí a reprodukční schopnosti příjemkyň (Kennady et al. 2018).

Větší úspěšnost přenosu embryí však stále zůstává velkou výzvou, a je proto nezbytné správné teoretické porozumění a technické znalosti (Kennady et al. 2018). Při výběru vhodné dárkyně by mělo být zvaženo několik faktorů, především její genetická dominance, čistota plemene, normální fyziologie, zdravotní stav, normální reprodukční stav, věk a ekonomická hodnota potencionálního potomka (Kennady, et al. 2018).

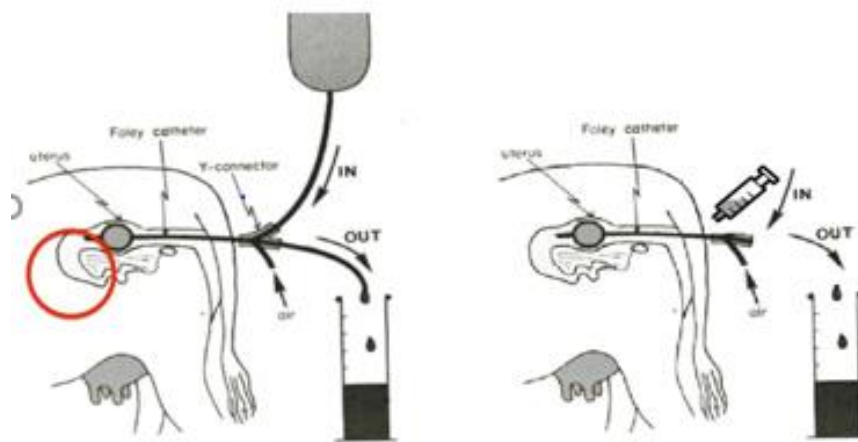
3.6.3.1. Odběr embryí

Během každé folikulární vlny se jeden folikul stává dominantním a ten poté potlačuje vývoj podřízených folikulů, které zajišťují, že pouze jeden oocyt bude vyzávat a bude k dispozici pro ovulaci v estru. Po rozpadu žlutého tělíska na konci cyklu estru se dominantní folikul současné vlny stává ovulačním folikulem. Použitím superovulační

léčby je dle Nikjou (2008) možné hormonálně podpořit podřízené folikuly tak, aby při ovulaci bylo k dispozici několik zralých folikulů pro ovulaci. Cílem superovulace je zvýšit počet vajíčků schopných ovulace dávkou gonadotropinového stimulu následovaného kontrolou luteolýzy, synchronní ovulace, vysoké fertilizace a rychlého vývoje embrya. Superovulace se běžně dosahuje použitím komerčně připraveného hormonu stimulujícího folikuly – FSH. Odezva vaječníků na superovulaci závisí na počtu gonadosenzitivních folikulů přítomných v době zahájení superovulace (Nikjou et al. 2008).

Avšak podle Skidmore (2004) přibližně 20–30 % samic na tyto hormony nereaguje. Bylo také zjištěno, že u zvířat léčených FSH dochází k velkému výskytu předčasné regrese folikulů, což by mohlo být způsobeno nevhodným dávkováním hormonů nebo způsobem aplikace. Navíc u některých samic jsou vaječníky nadměrně stimulovány a obsahují mnoho generací folikulů různých velikostí, kdy ne všechny z nich budou dostatečně zralé na ovulaci, když dojde ke spáření. Dromedáři mohou být vůči tomuto léčení rezistentní, což může být způsobeno imunizací proti těmto hormonům (Skidmore 2004).

Odběr embryí se provádí sedmý den cyklu estru, což umožňuje sběr nejflexibilnějších stádií vývoje embrya pro zmrazení i čerstvý přenos. Ačkoli dřívější techniky přenosu embryí využívaly chirurgické přístupy k odběru, nyní se využívají především nechirurgické postupy, vyžadující transcervikální katetrizaci děložního rohu (Smith 2015). Před samotným odběrem se mezi obratle na hřbetě dárkyně podá lokální anestetikum, aby se snížily rektální kontrakce, a vulva se důkladně vyčistí, aby se zabránilo kontaminaci embryí (Kennady et al. 2018). Na Obrázku 7 jsou vidět dva typy odběru embryí (Hastie 2009).



Obrázek 7: Trojcestný a dvoucestný katetr – příklady použití u skotu. Zdroj: (Hastie 2009)

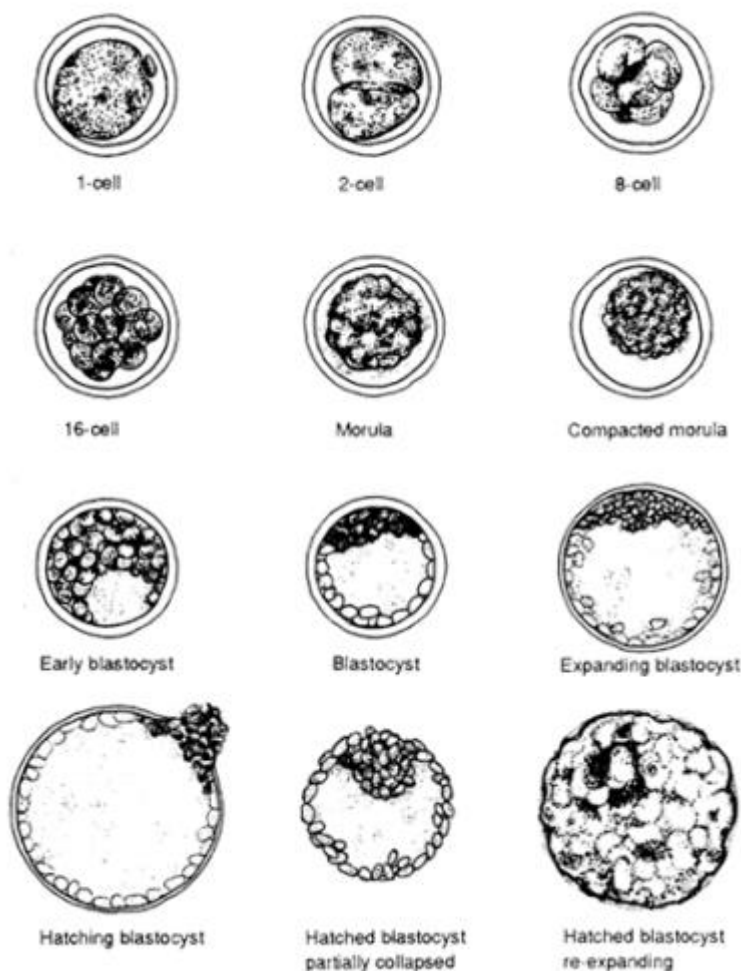
Dvoucestný, při kterém se využívá katetr se dvěma trubicemi. Jedna trubice se používá k nafouknutí latexové manžety v blízkosti špičky katetru, zatímco druhá umožňuje proplachovacímu médiu vstoupit a následně opustit děložní roh. Jedná se o snadno použitelnou metodu, a je tedy nejběžněji využívána na mezinárodní úrovni. Nevýhodou této metody je vysoká spotřeba proplachovacího média, jelikož je proplachována velká část děložního rohu (Smith 2015).

Dalším typem odběru je trojcestný, který je tvořen třemi trubicemi. Jedna trubice umožňuje nafouknutí manžety deset centimetrů za špičkou katetru. Pomocí druhé trubice se od špičky katetru zavede proplachovací médium do lumenu dělohy a průtok média jedním směrem je vytvořen médiem vracejícím se dolů třetí trubicí přes vstupní otvor na úrovni latexové manžety. Proplachovací média bývají na bázi PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok) a do lumenu jsou vehnána, aby se umožnilo mírné roztažení před vypuštěním gravitačním průtokem spolu s embryi a vajíčky do sběrného filtru. Ten obsahuje kovovou nebo plastovou mikrosíťku s průměrem pórů polovičním, než je průměr embrya (140–170 μm) umožňující průchod nadbytečného média při zachování embryí. Jakmile jsou oba dva děložní rohy propláchnuty, provádí se vyhledávání embryí (Smith 2015; Skidmore & Billah 2005). Z jednoho výplachu je získáno průměrně 4–6 přenosných embryí (Kennady et al. 2018).

3.6.3.2. Hodnocení embryí

Obsah filtru se vyprázdní do Petriho misky a je dále zkoumán. Životoschopnost embryí může být podle Kennadyho (2018) vyhodnocena morfologickou metodou nebo různými vitálními barvicími metodami a fluorescenčními technikami. Morfologickou metodu v této studii provedli pod stereoskopickým mikroskopem při zvětšení 6 \times –10 \times .

Získaná embrya umístili do speciálního roztoku a dále klasifikovali (viz Obrázek 8). Vyhodnocení embryí provedli vizuálním hodnocením pod stereoskopickým zvětšením 50×. Hodnotili tvar, barvu, počet, kompaktnost buněk atd. (Kennady et al. 2018).



Obrázek 8: Klasifikace embryí u skotu.

Zdroj: (Drost M. 1991)

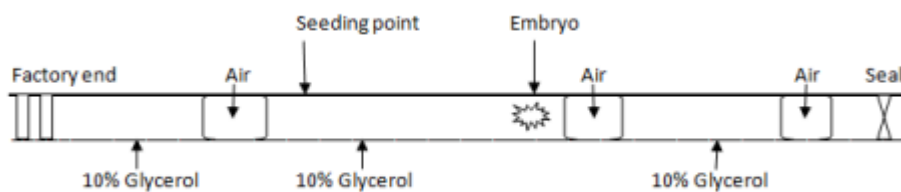
3.6.3.3. Uchování embryí

Dalším důležitým krokem embryotransferu je uchování embryí. Ta podle Smithe (2015) mohou přežít po dobu 8 hodin při okolní teplotě 20 °C s malým poklesem úspěšnosti zabřezávání. Je však lepší je zmrazit nebo zapravit do 3 až 4 hodin po odběru. Zmrazení zahrnuje nejprve částečnou dehydrataci embrya v kryoprotektantu, aby se zabránilo případnému poškození. Úspěšnost nebo selhání zmrazování ovlivňují dva hlavní faktory. Prvním je efekt roztoků. Koncentrace rozpuštěné látky v buňce se zvyšuje v důsledku dehydratace vytvořené kryoprotektantem a způsobuje poškození buněk,

zejména když je chlazení pomalejší než optimum. Druhým problémem je vznik mezibuněčného ledu, který má za následek fyzické poškození a tvoří se v případě, že je chlazení rychlejší nežli optimum (Smith 2015).

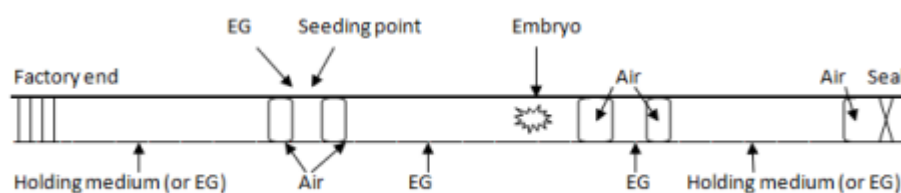
Kryoprotektanty snižují teplotu, při které se intracelulární led tvoří, snižují velikost ledu přítomného v extracelulární tekutině, zmírňují účinek rozpouštědel a pomáhají stabilizovat buněčnou membránu. Hlavními účinky jsou snížení množství ledových krystalů vytvořených intracelulárně a maximalizace tvorby malých ledových krystalů, které jsou méně škodlivé ve srovnání s velkými ledovými krystaly. Ty by mohly vysokým tlakem způsobit prasknutí buněčné stěny. Některé kryoprotektanty samy o sobě mohou způsobit osmotické poškození buněk a je třeba je přidávat postupně. Nejčastěji používanými kryoprotektanty jsou 10% glycerol a 1,5M ethylenglykol. Embrya se zmrazí v 0,25ml pejetách, které musí být označeny jménem dárce, jménem otce, kódem sběrného týmu, kódem plemene a kódem data. Pejety jsou utěsněny buď plastovou zátkou, nebo jsou tepelně zalisovány. Použitá chladicí křivka je předem naprogramována do mrazicího zařízení a pejety se zmrazí řízenou rychlostí tak, aby se zajistilo optimální přežití embrya. Následuje proces, který se nazývá výsev a probíhá při teplotě $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na konci mrazicího programu se pejety ponoří přímo do tekutého dusíku, poté se umístí do plastových kalíšků a skladují se v kapalném dusíku v kryogenních baňkách (Smith 2015).

Rozmrazování pejet je opakem předchozích postupů. Vyjmou se z tekutého dusíku a následně se vloží do nádoby s teplou vodou. Teplota vody ($22\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$), doba ponoření (7–30 sekund) a doba tání na vzduchu (0–10 sekund) jsou závislé na metodě a programovém protokolu použitém ke zmrazení. Dále musí být zkontrolovány jednotlivé štítky a veškeré podrobnosti o nich zaznamenány. Pejety s embryi zmrazenými v 1,5M ethylenglykolu mohou být po rozmrazení a vysušení naloženy do přenosové pistole pro okamžitý přenos. Embrya zmrazena v 10% glycerolu musí být odstraněna z pejet a dále projít sníženými koncentracemi glycerolu (z 10 % přes 5 % do 2,5 %). Poté jsou umístěna do speciálního roztoku pro uchování embryí, znovu vyšetřena, zkontrolována, a nakonec naložena k přenosu (viz Obrázky 9 a 10) (Smith 2015; Skidmore et al. 2002).



Obrázek 9: Příklad způsobu vkládání pejetý pro zmrazení v 10 % glycerolu.

Zdroj: (Smith 2015)



Obrázek 10: Příklad způsobu vkládání pejetý pro zmrazení v 1,5M ethylenglykolu

(EG). Zdroj: (Smith 2015)

3.6.3.4. Transfer embryí

Výběr vhodné příjemkyně je pro úspěšný přenos embrya esenciální. Kritéria pro výběr příjemkyň jsou normální fyziologický a zdravotní stav zvířete, dobrý reprodukční stav, nepřítomnost reprodukčních poruch, slučitelnost s dárkyní s ohledem na velikost plodu a snadná synchronizace říje. Říje dárkyň a příjemkyň by měly být synchronizovány do 24 hodin, jinak budou míry úspěšnosti zabřezávání značně nižší, protože nejvyššího počtu je dosaženo, když je embryo transplantováno do prostředí dělohy, které se nejvíce podobá prostředí, z něhož embryo pochází (Kennady et al. 2018; Smith 2015).

Nejvyšší míry zabřezávání bývá dosaženo, pokud má příjemkyně ovulaci 1–2 dny po dárkyni. To není u velbloudů neočekávané, protože mají relativně krátkou životnost žlutého tělíska, pouze 8–10 dnů, což znamená, že čas pro přenos embryí do dělohy, než dojde k luteolýze, je krátký. Březosti však také může být dosaženo, jestliže se embrya přenášejí do neovulující příjemkyně, které byly podávány denní dávky 150 mg progesteronu v oleji. Což podle Skidmora a Billaha (2005) naznačuje, že míra synchronizace mezi mladým embryem a dělohou příjemkyně není možná tak důležitá, dokud koncentrace sérového progesteronu zůstanou zvýšené. Denní intramuskulární injekce však nejsou velmi praktickým řešením kvůli dlouhé době březosti. Z tohoto důvodu se stávají atraktivnějšími jiné metody, které by mohly inhibovat luteolýzu

a prodloužit životnost žlutého tělíska. Nedávné studie ukázaly, že PGF2 α se podílel na luteolýze u velbloudů, a že perorální podání inhibitoru prostaglandinové syntetázy meklofenamové kyseliny prodloužilo životnost žlutého tělíska. Mohlo by se jednat o vhodné řešení v případě velbloudů, protože pokud by životnost žlutého tělíska mohla být prodloužena, umožnilo by to více času, aby embryo vylučovalo důležité mateřské rozpoznání těhotenského signálu matce, aby byla inhibována luteolýza a udržována březost (Skidmore & Billah 2005).

Pro správný vývoj plodu je také důležité minimalizovat stres u příjemkyň. Po dobu 3–4 týdnů před a po převozu by měly být zakázány změny režimu krmení a samice by měly mít k dispozici odpovídající prostor (Kennady et al. 2018).

Postup přenosu příjemkyni je stejný pro čerstvá nebo zmrazená embrya. Před přenosem embrya se vaječníky vyšetřují manuální palpací (pohmatem) nebo pomocí ultrazvuku na přítomnost žlutého tělíska. Existují dvě metody přenosu embryí – chirurgická a nechirurgická. Při chirurgické metodě se zvíře nejprve oholí a vydezinfikuje v místě, kde se provede řez a provede se lokální anestezie. Do odkrytého děložního rohu se provede malý řez, embryo se natáhne do 0,25 ml zkumavky připojené k malé injekční stříkačce a vloží do dělohy. Řez je poté uzavřen několika stehy a do oblasti stehů se aplikuje roztok antibiotika, aby se zabránilo infekci (Kennady et al. 2018). Při nechirurgické metodě, před vložením embrya, dostanou příjemkyně epidurální anestetikum a po vyčištění hráze (*perineum*) je transferová pistole vedena přes děložní čípek a roh dělohy ke žlutému tělísku (Smith 2015; Kennady et al. 2018; Skidmore & Billah 2005).

3.6.4. Klonování

Klonování poskytuje silný nástroj pro rychle se měnící populaci zvířat. Jedná se o proces, kdy se celý organismus reprodukuje z jediné buňky odebrané z mateřského organismu geneticky identickým způsobem. To znamená, že naklonované zvíře je přesná kopie rodiče a má stejné DNA. Ke klonování jsou použita geneticky nadřazená zvířata vybraná na základě žádoucích vlastností, jako je například vysoká mléčná produkce, růst, efektivita krmení či odolnost vůči nemocem (Chakravarthi & Sri Balaji 2010).

Proces klonování zahrnuje odebrání chromozomální DNA ze zralých oocytů a její nahrazení buňkou zvířete, které má být naklonováno. Tato buňka je dále spojena

s vyloučeným oocytem a aktivována buď chemicky, nebo pomocí elektrického impluzu, aby se přeprogramovala z genomu somatické buňky na embryonální. Životaschopná embrya jsou poté přenesena do těla synchronizovaných příjemkyň, ve kterých se vyvíjí až do porodu (Chakravarthi & Sri Balaji 2010). Přesto že počet klonovaných druhů stále roste, zatím se dle Waniho (2010) tato metoda nedá svou úspěšností srovnávat s ostatními asistovanými reprodukčními technikami. Do budoucna by se však mohla využívat k produkci velbloudů s vysokým potenciálem pro produkci mléka nebo šampionů ve velbloudích závodech. První naklonované velbloudí mládě, samice Injaz, se narodila 8. dubna 2009 (Wani et al. 2010).

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo především představit biotechnologické metody, které se v současné době stále více využívají ke zlepšení reprodukce velbloudů, jelikož jsou považováni za důležitá hospodářská zvířata v zemích postižených suchem a vysokými teplotami, které znevýhodňují ostatní zvířata. Reprodukce velbloudů je obecně považována za velmi problematickou vzhledem k dlouhé době březosti, dlouhému mezidobí, sezónnosti rozmnožování či délce laktace.

Jedná se o literární rešerši vědeckých článků, která nejprve stručně popisuje rostoucí význam velbloudů a dále se zabývá problematikou reprodukce. Další část rešerše pojednává o jednotlivých biotechnologických metodách reprodukce. Nejčastěji využívanou metodou je umělá inseminace, která přispívá ke zlepšení reprodukčních problémů spojených se samci. Skládá se z důležitých kroků, jako je odběr a následné uchování spermatu. Studie využití v této části rešerše jsou přínosné především poskytnutím informací ohledně vlastností semene, odstranění jeho viskozity, která způsobovala problémy v dalších postupech, a také následného zpracování – ředění a zmrazení semene. Mezi metody, které se zabývají zlepšením reprodukce u samic, patří synchronizace říje, která je úzce spojena s pochopením folikulárních vln u velbloudích samic. Použití synchronizace říje je důležité především v kombinaci s ostatními biotechnologickými metodami, jako je již zmíněná inseminace či embryotransfer. Embryotransfer zahrnuje odběr, hodnocení, uchování a následné přenesení embryí do vybraných dárkyň. Lze jej použít jako základní metodu pro většinu technologií asistované reprodukce. V posledních letech získává na významu a mnoho vědeckovýzkumných činností se týká právě přenosu embryí. Do budoucna je možné předpokládat, že na významu bude nabývat i metoda klonování, která zatím není natolik vyvinutá, aby se svou úspěšností dala srovnávat s ostatními metodami.

Vzhledem ke klesajícímu počtu populace divokých velbloudů dvouhrbých se použití těchto biotechnologických metod k jejich záchraně stává nutností, jelikož jejich přirozená reprodukce není dostačující.

Hlavní nevýhodou spojenou s biotechnologickými metodami reprodukce je potřeba řádného zaškolení veterinářů v terénu, jinak bude úspěšnost velmi malá. Mělo by jim tedy být poskytnuto vhodné školení, aby bylo dosaženo lepších výsledků. Dalším

omezením je nedostatek informací ohledně dané problematiky v dostupné literatuře. Proto by bylo vhodné, aby se jí věnovala větší pozornost v rámci publikační činnosti.

5. Reference

- Abdel-Raouf M, Fateh El-Bab MR, Owaida MM. 1975. Studies on reproduction in the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of reproduction and fertility* **43**:109-16.
- Abdussamad AM, Holtz W, Gauly M, Suleiman, MS, Bello MB. 2011. Reproduction and breeding in dromedary camels: insights from pastoralists in some selected villages of the Nigeria-Niger corridor. *Livestock Research for Rural Development* **23**:178.
- Agarwal SP, Rai AK, Khanna ND. 1997. Induction of sexual activity in female camels during the nonbreeding season. *Livestock Research for Rural Development* **47**:591 - 600.
- Basiouni GF. 2007. Follicular Wave Pattern, Folliculogenesis and Assisted Reproductive Techniques in the Non-pregnant Female Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*): A Review. *Journal of Biological Sciences* **7**:1038-1045.
- Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science* **62**:173-193.
- Chakravarthi PV, Sri Balaji N. 2010. Use of Assisted Reproductive Technologies for Livestock Development (Review). *Veterinary World* **3**:238-240.
- DesertUSA. 2019. Camel. Digital West Media, Inc Available from <https://www.desertusa.com/animals/camel.html> (accessed March 2019).
- Drost M. 1991. Embryo handling and evaluation. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/3/t0120e/t0120e07.htm> (accessed March 2019).
- Durrant BS. 2009. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology* **71**:113-122.
- El-Bahrawy KA, El-Hassanein EE, Fateh El-bab AZ, Zeitoun M. 2006. Semen Characteristics of Camels Raised Under Hot Arid Egyptian Conditions and Its Freezability after Dilution in Different Extenders. Conference: International Scientific Camel Conference. 2037-2053.
- El-Bahrawy KA. 2013. Old world camel reproduction: nature, current technologies and future prospects. Animal and Poultry Physiology Department, Desert Research Center.

- El-Bahrawy KA. 2005. Reproductive studies on Desert Animals: Sexual Behaviour and Semen Characteristic and Freezability of Male Dromedary Camels [Ph.D. Thesis]. Alexandria University, Alexandria.
- El-Bahrawy KA, Khalifa MA, Rateb SA. 2015. Recent advances in dromedary camel reproduction: An Egyptian field experience. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. **27**:350-354. DOI: 10.9755/ejfa.v27i4.19907.
- El-Hassainen EE. 2019. An Invention for Easy Semen Collection from Camels. Maryout Research Station, Cairo, Egypt. Available from <http://esarf2.tripod.com/hassanein.htm> (accessed March 2019).
- El-Hassainen EE, El-Bahrawy KA, Zagloul AA. 2010. Artificial insemination and ovulation induction in dromedary she-camel. *Nature and Science*. **8**:203-208.
- El-Zanaty S, Malm J, Givercman A. 2004. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *International Journal of Andrology* **27**:94-100.
- Feldhamer GA, Drickamer LC, Vessey SH, Merritt JF, Krajewski C. 2007. *Mammalogy: Adaptation, diversity and ecology*: The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Hafez ESE, Hafez B. 2001. Reproductive parameters of male dromedary and bactrian camels. *Archives of Andrology* **46**:85-98.
- Hare J. 2008. *Camelus ferus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Available from <https://www.iucnredlist.org/species/63543/12689285> (March 2019).
- Hastie G. 2009. Victoria, Australia. Available from <http://www.bairnsley.com/Breeding%20-%20ET.htm> (accessed March 2019).
- Ismail AA, Siam AA, El-Nahla A, Abuzead SMM. 1998. Synchronization of estrus in the she-camel. Proceeding of the third annual meeting for animal production under arid conditions. United Arab Emirates University. **1**:96-107.
- Kadim IT, Mahgoub O, Faye B, Farouk MM. 2012. *Camel meat and meat products*. CAB International, Oxfordshire.
- Katzensky P, Adiya Y, Wehrden E, Mijiddor B, Walzer C, Guthlin D, Enkhbileg D, Reading RP. 2014. Space and habitat use by wild Bactrian camels in the Transaltai Gobi of southern Mongolia. *Biological conservation* **169**:311-318.
- Kennady V, Manimegalai J, Verma R, Chaudhry V. 2018. Embryo transfer technology in animals: An overview. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**:2215-2218.

- Kotpal RL. 2010. Modern textbook of zoology: Vertebrates, Animal diversity. Rastogi Publications.
- McKinnon AO, Tinson AH, Nation G. 1994. Embryo transfer in dromedary camels. *Theriogenology* **41**:145-150.
- Merkt H, Rath D, Musa B, El-Naggar MA . 1990. Reproduction in camels. A review. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.
- Mosaferi S, Niasari-Naslaji A, Abarghany A, Gharahdaghi AA, Gerami A. 2005. Biophysical and biochemical characteristics of bactrian camel semen collected by artificial vagina. *Theriogenology* **63**:92-101.
- Nagy P, Juhasz J. 2012. Fertility after ovarian follicular wave synchronization and fixed-time natural mating compared to random natural mating in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Animal reproduction science* **132**:223-230. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.010.
- Nikjou D, Niasari-Naslaji A, Skidmore JA, Mogheiseh A, Germai A, Razavi K, Ghanbari A. 2009. Ovarian follicle dynamics in bactrian camel (*camelus bactrianus*). *Journal of Camel Practice and Research* **16**:97-105.
- Nikjou D, Niasari-Naslaji A, Skidmore JA, Mogheiseh A, Germai A, Razavi K, Ghanbari A. 2008. Synchronization of follicular wave emergence prior to superovulation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* **69**:491-500.
- Rateb SA. 2011. Improving Reproductive Efficiency of Sub-fertile One-Humped Bull Camels Under Semi-Arid Conditions [MSc. Thesis] Alexandria University, Alexandria.
- Romanow P. 2012. Velbloud dvouhrbý domácí. BioLib. Available from <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id172752/?taxonid=133617> (accessed March 2019).
- Skidmore JA, Billah M. 2005. Embryo transfer in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) using asynchronous, meclofenamic acid-treated recipients. *Reproduction, Fertility and Development* **17**:417-21.
- Skidmore JA. 2003. The main challenges facing camel reproduction research in the 21st century. *Reproduction supplement* **61**:37-47.
- Skidmore JA, Adams GP, Billah M. 2009. Synchronisation of ovarian follicular waves in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Animal reproduction science* **114**:249-55.

- Skidmore JA, Billah M, Allen WR. 2002. Investigation of factors affecting pregnancy rate after embryo transfer in the dromedary camel. *Reproduction, Fertility, Development* **14**:109-116.
- Skidmore L. 2004. Embryo transfer. IVIS - International Veterinary Information Service, Ithaca, New York.
- Smith A. 2015. Principles of Embryo Transfer. *Australian Reproduction Veterinarians* 20-27.
- Srikandakumar A, Johnson EH, Mahgoub O, Kadim IT, Al-Ajmi DS. 2001. Anatomy and histology of the female reproductive tract of the Arabian camel. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **13**:23-26.
- Ševčík, J. 2019. Vebloud jednohrbý. BioLib. Available from <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id286560/> (accessed March 2019).
- Tibary A, Anouassi A. 1996. Ultrasonographic changes of the reproductive tract in the female camel (*Camelus dromedarius*) during follicular cycle and pregnancy. *Journal of camel practise and research* **3**:71-90.
- UNESCO. 2008. Biosphere Reserve Information. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Available from <http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?mode=gen&code=M ON+01> (accessed April 2019).
- Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA. 2010. Production of the First Cloned Camel by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biology of Reproduction* **82**:373-379.
- Yasin SA, Wahid AA. 1957. Pakistan camels. A preliminary survey. *Pakistan Agriculture* **8**:289-297.