Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

Faktory ovlivňující efektivitu embryotransferu u dojnic

Diplomová práce

Bc. Kamila Bulušková
Živočišná produkce

doc. Ing. Luděk Stádník, PhD.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Faktory ovlivňující efektivitu embryotransferu u dojnic" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019 _____

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, PhD. za trpělivost, odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce. Rovněž děkuji Ing. Jaromírovi Ducháčkovi, PhD. za konzultace a v neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu.

Faktory ovlivňující efektivitu embryotransferu u dojnic

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat podrobný literární přehled na téma embryotransfer v chovu skotu a vyhodnotit faktory ovlivňující efektivitu získávání embryí a působící na podíl přenosuschopných embryí u skupiny holštýnských dojnic.

V teoretické části práce jsem blíže popsala holštýnské plemeno skotu, jeho historii i současný stav populace v ČR. Dále jsem se věnovala tématu plodnosti skotu. Popsán byl například pohlavní cyklus plemenic, ukazatele plodnosti nebo vlivy působící na plodnost. V závěru literární rešerše jsem rozvedla problematiku embryotransferu, jeho historii, současný stav a podrobnou metodiku.

Data k analytické části práce byla získána ze školní farmy Ruda. Do experimentu bylo zapojeno 54 holštýnských dojnic, které byly ošetřeny superovulačním protokolem, inseminovány a následně byl u nich proveden výplach embryí. Zařazené plemenice se nacházely průměrně na 2,1. laktaci, jejich průměrná tělesná kondice dosahovala hodnoty 2,84 BCS a průměrný nádoj této skupiny dojnic činil 9 160 kg mléka na laktaci.

Cílem pozorování bylo vyhodnotit vliv tělesné kondice, aktuálního metabolického stavu a pořadí laktace dárkyň na výtěžnost a kvalitu embryí. Plemenice byly v daném faktoru vždy rozděleny do tří skupin, a to na podprůměrné, průměrné a nadprůměrné. Dle množství CL na vaječnících jsme sledovali reakci na superovulaci, dále množství všech získaných embryí a množství přenosuschopných embryí.

Statistickým vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že větší celkové množství i množství přenosuschopných embryí bylo získáno od krav v průměrné tělesné kondici, oproti plemenicím s kondicí nadprůměrnou a prodprůměrnou.

Obdobných výsledků bylo dosaženo při sledování vlivu úrovně mléčné užitkovosti. Nejvyšší počet získaných i přenosuschopných embryí byl získán od krav s průměrnou užitkovostí, nejnižší pak od dojnic vysokoužitkových. V souvislosti s aktuálním metabolickým stavem dárkyň jsme sledovali také poměr obsahu tuku a bílkovin v mléce. Od každé dojnice byly odebrány 3 vzorky, a to 25 a 11 dní před výplachem embryí a 3 dny po výplachu embryí. Zjistili jsme, že u všech tří vzorků byl vždy nejvyšší počet embryí získán od skupiny krav podprůměrných (tzn. s nejnižším poměrem), což poukazuje na skutečnost, že rozhodujícím faktorem v ohledu na poměr tuku a bílkovin v mléce je funkčnost metabolismu dárkyně při zahájení hormonálního ošetření.

Vyšší počet získaných embryí i embryí vhodných k přenosu byl získán od krav na 2. laktaci, oproti prvotelkám a kravám na laktaci 3. a vyšší. Vliv pořadí laktace se neprojevil jako statisticky významný faktor, svou roli na efektivitu výtežnosti embryí hraje spíše věk plemenice.

Klíčová slova: reprodukce, biotechnologie, embryotransfer, fat-to-protein ratio, tělesná kondice, pořadí laktace.

Factors influencing the efficiency of embryo transfer in dairy cows

Summary

The aim of this diploma thesis was to elaborate a detailed literature review on the topic of embryotransfer in cattle breeding and to evaulate factors influencing the efficiency of embryotransfer in the specific group of Holstein dairy cows.

In the theoretical part I described Holstein cattle breed, its history and present state of population in the Czech republic. Then I wrote about cattle fertility. For example, the breeding cycle, indicators of fertility or factors influencing fertility have been described. At the end of the literature research I elaborated on the issue of embryotransfer, its history, current state and detailed methodology.

Data for the analytical part of the thesis were obtained from school farm in Ruda. 54 Holstein cows were involved in the experiment. These cows were treated with a superovulation protocol, then inseminated and subsequently embryo lavaged. The included cows were on average 2,1. lactation, their average body condition was 2,84 BCS and the average milk yield of the group was 9,160 kg per lactation.

The aim of the observation was to evaulate the influence of body condition, current metabolic status and the order of lactation on the quantity and quality of gained embryos. Donors have always been divided into three groups: below average, average and above average. According to the amount of CL's on the ovaries, we monitored the response to superovulation. Then the amount of obtained embryos in total and the number of transferable embryos.

Statistical evaluation of the results revealed that the greater total amount and amount of transferable embryos was obtained from cows in average body condition, compared to cows with below-average and over-average condition.

Similar results were obtained in monitoring the effect of milk performance. The highest number of acquired and transmissible embryos were obtained from cows with average milk performance, the lowest from high-yield cows. In relation to the current metabolic status of donors, we also monitored the ratio of fat and protein content in milk. Three samples were taken from each cow, 25 and 11 days prior to embryo lavage and 3 days after embryo lavage. We found out that for all three samples, the highest number of embryos was always obtained from a sub-average cows (ie with the lowest ratio), suggesting that the decisive factor in the fat-to-protein ratio in milk is the functionality of the donor's metabolism before start of hormonal treatment.

Higher amount of all embryos and embryos suitable for transfer were obtained from cows at the 2nd lactation, compared to cows at 1st and 3rd and higher lactation. The effect of the order of lactation did not appear to be a statistically significant factor, but rather the age of the cow plays its role in the efficiency of embryo gain.

Keywords: reproduction, biotechnology, embryotransfer, fat-to-protein ratio, body condition, order of lactation.

Obsah

1 Úvod 9

2 Cíl práce a vědecká hypotéza 10

3 Literární rešerše 11

3.1 Holštýnský skot 11

3.1.1 Historie chovu holštýnského skotu 11

3.1.2 Chovný cíl v ČR 12

3.1.3 Současná populace holštýnského plemene v ČR 12

3.1.4 Kontrola užitkovosti pro rok 2017/2018 12

3.2 Plodnost skotu 13

3.2.1 Morfologie pohlavního ústrojí dojnic 13

3.2.2 Neurohumorální řízení pohlavních funkcí a pohlavní hormony 14

3.2.3 Oplození a vznik embrya 14

3.2.4 Pohlavní cyklus 15

3.2.5 Ukazatele plodnosti 17

3.2.5.1 Zabřezávání po první inseminaci 17

3.2.5.2 Zabřezávání po všech inseminacích 18

3.2.5.3 Inseminační interval 18

3.2.5.4 Servis perioda 18

3.2.5.5 Inseminační index 19

3.2.5.6 Interinseminační interval 19

3.2.5.7 Natalita krav 19

3.2.5.8 Počet živě odchovaných telat na sto krav 20

3.2.5.9 Mezidobí 20

3.2.6 Vlivy působící na plodnost 20

3.2.6.1 Genetické založení jedince 20

3.2.6.2 Zdravotní stav 21

3.2.6.3 Věk a pořadí laktace 21

3.2.6.4 Technologie ustájení 21

3.2.6.5 Mikroklima stáje 21

3.2.6.6 Výživa 22

3.2.6.7 Negativní energetická bilance (NEB) 22

3.2.6.8 Tělesná kondice 23

3.3 Řízení reprodukce 25

3.3.1 Detekce říje ... 25
3.3.2 Výběr plemenic k zapouštění ... 26
3.3.3 Inseminace ... 26
3.3.4 Synchronizace říje ... 27
3.4 Embryotransfer ... 27
3.4.1 Historie embryotransferu ... 28
3.4.2 Aktuální situace embryotransferu v ČR ... 28
3.4.3 Metodika embryotransferu ... 29
3.4.3.1 Selekce dárkyň a jejich příprava na přenos embryí ... 29
3.4.3.2 Návrat dárkyň do reprodukce ... 32
3.4.3.3 Izolace embryí ... 32
3.4.3.4 Hodnocení embryí ... 32
3.4.3.5 Selekce a příprava příjemkyň ... 34
3.4.3.6 Přenos embryí ... 34

4 Materiál a metodika ... 36
4.1 Charakteristika podniku ... 36
4.2 Metodika ... 36
4.2.1 Superovulační ošetření donorek ... 36
4.2.2 Inseminace a reinseminace ... 37
4.2.3 Získávání embryí ... 37
4.2.4 Hodnocení tělesné kondice dárkyň ... 38
4.2.5 Hodnocení pořadí laktace ... 38
4.2.6 Hodnocení nádoje a mléčných složek ... 39
4.3 Statistické metody ... 41

5 Výsledky ... 42
5.1 Základní statistiky sledovaných faktorů ... 42
5.2 Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí ... 42
5.3 Vliv mléčné užitkovosti na množství a kvalitu embryí ... 44
5.4 Vliv poměru tuku a bílkovin v mléce na množství a kvalitu embryí ... 46
5.5 Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí ... 49

6 Diskuze ... 51
6.1 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle tělesné kondice dárkyň ... 51
6.2 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle úrovně mléčné užitkovosti ... 51
6.3 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle poměru tuku a bílkovin ... 52
6.4 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle pořadí laktace ... 52

7 Závěr ... 53

8 Literatura 54

9 Přílohy I

9.1 Seznam vložených příloh I

9.2 Samostatné přílohy I

1 Úvod

Chov skotu pro zisk mléka má na světě již velmi dlouhou tradici. Se stoupajícím počtem lidské populace se zvyšuje také poptávka po živočišných produktech, jako je právě mléko. Cílem chovatelů skotu tedy v minulých letech bylo rozsáhlé šlechtění na zlepšování mléčné užitkovosti dojnic. Jelikož mléčná produkce negativně koreluje se schopností reprodukce, toto soustavné zvyšování mléčné produkce krav zapříčinilo s reprodukcí nemalé problémy.

Schopnost reprodukce je jednou z nejdůležitějších vlastností plemenic, je nezbytná pro mléčnou produkci a významně ovlivňuje ekonomiku chovu. Reprodukční potenciál skotu je veliký, a proto je nutné umět ho jako chovatel co nejlépe využít. S maximálním využitím genetického potenciálu skotu mohou výrazně pomoct reprodukční biotechnologie.

Jednou z hojně využívaných biotechnologických metod je embryotransfer neboli přenos embryí. Embryotransfer umožňuje intenzivnější využití genetického potenciálu těch nejlepších plemenic tím, že se embrya získaná právě od těchto špičkových zvířat vpravují do méně geneticky cenných příjemkyň. To znamená, že tímto způsobem lze od cenných dojnic získat mnohem větší množství potomků, kteří budou (potencionálními) zlepšovateli chovu.

Embryotransfer od doby svého vzniku prošel výrazným pokrokem. Od původního, chirurgického, získávání embryí jsme se posunuli k metodám nechirurgickým, které jsou jak pro dárkyně, tak pro příjemkyně mnohem méně invazivní. Základem pro úspěšné provedení přenosu embryí je dokonalé zvládnutí superovulace dárkyň, synchronizace říje příjemkyň, samotné provedení výplachu embryí nebo konzervace získaných embryí.

O efektivitě embryotransferu rozhoduje spousta faktorů, z nichž ještě ne zcela všechny jsou nám dnes známy. Můžeme se ovšem domnívat, že vliv na výtěžnost a variabilitu embryí by mohla mít úroveň mléčné užitkovosti dárkyně, její aktuální metabolický stav, nebo pořadí laktace.

Ve světě se embryotransfer těší trvalé popularitě a má stále stoupající trend. Naopak v České republice bohužel počty přenosů embryí klesají, a to zřejmě z důvodu změny dotačního systému, který není pro chovatele příznivý, a tudíž z důvodu relativně vysokých nákladů přestali tuto biotechnologii využívat.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem diplomové práce bude vypracovat detailní přehled literatury zaměřený na vybrané faktory ovlivňující výsledky embryotransferu u dojnic holštýnského skotu a uvedení konkrétního praktického příkladu vyhodnocením vlivu těchto faktorů na výtěžnost embryí v rámci provozního sledování. Předpokladem je, že zisk embryí vhodných k přenosu bude ovlivněn úrovní úžitkovosti dárkyně, jejím aktuálním metabolickým stavem a pořadím laktace.

3 Literární rešerše

3.1 Holštýnský skot

Holštýnský skot je díky své vysoké mléčné užitkovosti nejpočetněji chovaným kulturním plemenem na světě. Je využíván ke zvyšování užitkovosti ostatních plemen a rovněž napomáhá vzniku plemen nových. Během minulého století bylo toto významné plemeno intenzivně šlechtěno na funkční mléčný užitkový typ většího tělesného rámce a ušlechtilosti (Bouška et al. 2006).

Toto plemeno je charakteristické svou černobílou strakatostí s černou hlavou a bílými odznaky. Typický je velký tělesný rámec, dobře vyvinuté středohrudí uzpůsobené k bezproblémové konzumaci velkého množství krmiva, obdélníkový tvar těla, vysoko upnuté a prostorné vemeno, suché končetiny. Vyznačuje se ale také poněkud horším osvalením, nižším zastoupením cenných partií masa, vyšším podílem kostí, horší zmasilostí a vyšším protučněním (Motyčka et al. 2005).

Setkat se lze i s červenostrakatými jedinci tohoto plemene, což je dáno působením recesivní alely. Recesivně homozygotní založení dává vzniknout právě této červenostrakaté variantě. Tito jedinci se označují jako RED holštýn (Svaz chovatelů holštýnského skotu 2018).

3.1.1 Historie chovu holštýnského skotu

Populace holštýnského skotu se odvozuje od černostrakatého skotu severozápadní Evropy, konkrétně pochází z oblasti Německa (Holstein-Frisian) a proto se v literatuře lze setkat i s názvem holštýnsko-fríský skot (Staněk 2009).

První plemenné knihy byly založeny v 80. letech 19. století v Holandsku, Německu a Dánsku. V této době nastal také intenzivní vývoz černostrakatého skotu do USA, kde došlo k jeho dalšímu rozvoji. Vznik holštýnsko-fríského plemene se datuje k roku 1885 (Sambraus 2006).

První informace o chovu holštýnského skotu na území ČR se objevovaly od roku 1830, největší rozmach byl ale zaznamenán v letech 1870-80, kdy vzrostl zájem o zvýšení mléčné užitkovosti. Jelikož bylo toto plemeno oproti původnímu domácímu skotu náročnější na chovatelské podmínky a zejména na kvalitu krmení, netěšilo se u malých zemědělců příliš velké oblibě. Své uplatnění našlo zejména ve velkovýrobě, kde byly modernější technologie chovu a rovněž výživa na vyšší úrovni (Motyčka et al. 2005).

K rozsáhlým dovozům plemenných zvířat ze zahraničí docházelo v 60. letech minulého století. V tomto období byly ale investice do rozvoje a šlechtění holštýnského skotu minimální, pokrok tedy u nás nebyl tak výraný jako v jiných zemích. Svaz chovatelů černostrakatého skotu v ČR byl založen roku 1990, šlechtitelský program byl pak vypracován roku 1993. Byl v něm kladen důraz na šlechtění na mléčnou užitkovost. Požadovány byly dojnice velkého tělesného rámce s výborně utvářeným vemenem, vyrovnanou tělesnou stavbou, výrazně mléčným charakterem a dobře utvářenými končetinami. Tento program byl přepracován v roce 2000, kdy zdůraznil šlechtění na produkci mléčných bílkovin a také funkční typ plemenic. Od roku 2001 je cílem šlechtění holštýnského skotu systematické zlepšování rentability chovu na základš genetického zlepšování vlastností zvířat (Motyčka et al. 2005).

3.1.2 Chovný cíl v ČR

Cílem chovu holštýnského skotu v ČR je systematické zvyšování rentability chovu na základě genetického zlepšování vlastností zvířat. Dosažení potřebné rentability chovu dojnic předpokládá kromě produkce zvířat s vysokou mléčnou užitkovostí i dobrou úroveň funkčních vlastností jako je zdraví, plodnost a utváření zevnějšku. Funkční zevnějšek je charakterizován vhodným utvářením tělesných partií, zejména vemene a končetin, což umožňuje bezproblémový chov zvířat v rozšířených systémech technologie ustájení a dojení. Z hlediska plodnosti a zdraví je základem pravidelné zabřezávání a produkce životaschopných telat, odolnost proti mastitidám a dalším onemocněním (Motyčka et al. 2005).

Tabulka 1: Chovný cíl holštýnského skotu v ČR

Ukazatel	Prvotelky	Dospělé krávy
Dojivost v normované laktaci	7500-7800 kg	8500-8700 kg
Obsah bílkovin	3,30 % a více	
Prům. počet ukončených laktací		3,5
Celoživotní užitkovost	28 000 kg	
Věk při otelení	23-25 měsíců	
Mezidobí	Do 400 dnů	
Výška v kříži	141-154 cm	149-153 cm
Živá hmotnost	570 kg	650-680 kg

Zdroj: Motyčka et al. (2005)

3.1.3 Současná populace holštýnského plemene v ČR

V roce 2018 bylo do kontroly užitkovosti zařazeno 349 262 dojnic všech plemen (o 3000 ks méně, než v roce předchozím). Poměrně výrazně se změnila struktura populace, kdy počet plemenic holštýnské příslušnosti poklesl o 3728 ks (celkem 207 998 ks) a naopak počet českých strakatých krav mírně narostl. V současné době podíl holštýnského skotu činí necelých 60 %, z toho je cca 3,2 % krav RED holštýnských. Současná koncentrace krav ve stádě činí 300 ks na stádo (Svaz chovatelů holštýnského skotu 2018).

3.1.4 Kontrola užitkovosti pro rok 2017/2018

Průměrná užitkovost černostrakaté holštýnské populace dosáhla 10 030 kg mléka, 384 kg tuku (při tučnosti 3,83 %) a 340 kg bílkovin (3,39 %). U červených holštýnských krav došlo k nárůstu užitkovosti o 287 kg mléka na 8 891 kg, tučnost se snížila o 0,05 %, obsah bílkovin naopak o 0,05 % narostl, a to na 4,07 % tuku a 3,59 % bílkovin.

Z ukazatelů reprodukce velmi pozitivně působí výrazné snížení hodnoty mezidobí na 402 dnů (v předchozím roce 407 dnů). Rovněž věk při prvním otelení se oproti loňsku snížil o 3 dny na současných 25 měsíců a 24 dnů (Svaz chovatelů holštýnského skotu 2018).

Tabulka 2: Výsledky KU z let 2017 a 2018

	2017	2018	rozdíl
Užitkovost [kg]	9 789	10 030	+ 241 kg
Obsah tuku [kg]	376	384	+ 8 kg
Obsah bílkovin [kg]	328	340	+ 12 kg
Délka mezidobí [dny]	407	402	− 5 dnů

Zdroj: Svaz chovatelů holštýnského skotu (2017;2018)

3.2 Plodnost skotu

Plodnost je definována jako základní biologická a užitková vlastnost skotu. Je to schopnost pravidelně zabřezávat a produkovat životaschopné potomstvo. Je realizována produkcí pohlavních buněk, oplozením vajíčka a narozením životaschopného telete (Louda et al. 2008).

Lze ji sledovat a na různých úrovních hodnotit u obou pohlaví. Počínaje schopností produkovat pohlavní buňky, oplozením vajíčka, udržením a dokončením březosti, optimálním průběhem porodu a konče u počtu telat na býka či krávu, resp. 100 krav za rok (Stupka et al. 2010).

Zajištění pravidelné reprodukce je základním aspektem ekonomické produkce v chovu hospodářských zvířat. U skotu je tato skutečnost nesmírně důležitá, jelikož skot patří k živočišným druhům, které se vyznačují relativně nízkou reprodukční výkonností, jenž je dána jejich uniparitou a poměrně dlouhým generačním intervalem. Právě březost a porod spouštějí u plemenice důležité hormonální mechanismy nezbytné pro následující laktaci (Louda et al. 2000).

Jelikož každá laktace nastupuje až po otelení, můžeme plodnost považovat za směrodatnou užitkovou vlastnost skotu, nadřazenou mléčné i masné produkci. Dědivost plodnosti je velmi nízká a je závislá především na podmínkách vnějšího prostředí, ve kterém jsou plemenná zvířata chována (Louda et al. 2008).

Opakem plodnosti je neplodnost neboli sterilita. V důsledku sterility není plemenice schopná zabřeznout nebo porodit životaschopné potomstvo. Lze se setkat i s termínem subfertilita, jenž představuje stav, kdy je zabřezávání plemenice obtížné a potomstvo se rodí v dlouhých a ekonomicky nevýhodných intervalech (Kudláč et al. 1987).

3.2.1 Morfologie pohlavního ústrojí dojnic

Samičí pohlavní orgány mají vedle tvorby pohlavních buněk a hormonů a zajištění páření ještě další speciální funkci. Slouží jako prostředí poskytující ochranu a výživu pro vyvíjející se zárodek a plod od oplození vajíčka do porodu.

Samičí genitálie jsou uloženy v pánevní dutině a rozdělují se na **vnitřní,** tj. vaječník, vejcovod, děloha a pochva a **zevní**, k nimž patří poševní předsíň, vulva a poštěváček (Marvan et al. 2003).

3.2.2 Neurohumorální řízení pohlavních funkcí a pohlavní hormony

Chod pohlavní činnosti plemenic je řízen nervově a hormonálně. Probíhá po ose hypotalamus – hypofýza – gonády (Bouška et al. 2006).

Hypofýza je dále rozdělena na dvě části, adenohypofýzu a neurohypofýzu. Je uložena těsně pod hypotalamem, což umožňuje přímý přenos releasing hormonů z hypotalamu do adenohypofýzy skrz hypofýzový portální systém. Dále zajišťuje přímý vstup axonů sekrečních hormonů z hypotalamu do neurohypofýzy (Reece 2011).

Hormon hypotalamu **GnRH** – gonadotropní releasing hormon stimuluje sekreci a syntézu gonadotropinů FSH a LH. Je ve vlnách uvolňován neurony hypotalamu, přičemž vlny s vysokou frekvencí stimulují uvolnění LH a vlny s nízkou frekvencí stimulují uvolnění FSH (Říha et al. 1999; Reece 2011).

Folitropin neboli folikuly stimulující hormon, **FSH** je hormon předního laloku hypofýzy a působí především na růst, vývoj a funkci folikulů (Reece 2011). Stimuluje také produkci estrogenů. Zvyšující se koncentrace estrogenů na základě negativní zpětné vazby na hypotalamus snižuje uvolňování FSH (Louda 2007).

LH neboli luteinizační hormon je podobně jako FSH uvolňován z adenohypofýzy. Jeho funkcí je dokončení zrání folikulů a podpora tvorby žlutého tělíska (Marvan et al. 2003). LH je odpovědný za produkci androgenů v theca interna folikulu. Androgeny jsou využívány buňkami granulozy pro produkci estrogenů, což je stěžejní pro růst primárních folikulů (Říha et al. 1999).

Estrogeny jsou steroidní hormony, syntetizované z cholesterolu. Jsou uvolňovány ze žlutého tělíska, vaječníků a placenty. Jejich hlavní funkcí je stimulace buněčné proliferace, růst tkání nezbytných pro reprodukci (mléčná žláza, žlázy endometria), navození sexuálního chování a regulace sekrece LH (Reece 2011).

Progesteron je rovněž steroidní hormon – chemicky velmi podobný estrogenům. Produkován je žlutým tělískem, placentou a kůrou nadledvin. K jeho funkcím patří stimulace růstu žláz endometria a alveolů mléčné žlázy, bránění děložním stahům po čas březosti, poskytování výživy vyvíjejícímu se embryu před jeho uhnízděním a regulace sekrece gonadotropinů (Reece 2011).

Oxytocin je uvolňován neurohypofýzou po stimulaci neuroendokrinními reflexy. Při sání telete nebo stimulaci struků vyvolává sekreci mléka z mléčné žlázy a rovněž při porodu přivozuje silnější stahy dělohy. Oxytocin je uvolňován také při ovulaci a způsobuje následné myometrální kontrakce, které během kopulace pomáhají při transportu spermií do vejcovodu (Reece 2011).

Prostaglandin F2α je přírodní luteolytický hormon, který ukončuje luteální fázi estrálního cyklu, způsobuje regresi žlutého tělíska a pokud nedošlo k oplození plemenice, umožňuje zahájení nového cyklu (Reece 2011).

3.2.3 Oplození a vznik embrya

Embryonální vývoj začíná oplozením vajíčka. Jedná se o proces splynutí samčích a samičích pohlavních buněk (Kudláč et al. 1987). K oplození dochází v horní třetině vejcovodu

a trvá 20-24 hodin. Po oplození vzniká zygota s diploidním počtem chromozomů (Verlhac & Villeneuve 2010).

Oplození má několik fází. První fází je sbližování gamet, kdy se spermie transportují k místu oplození (do horní třetiny vejcovodu). Spermie při průchodu pohlavním ústrojím samice kapacitují – dozrávají a získávají oplozovací schopnost. Transport spermií k místu oplození je realizován pomocí aktivního pohybu spermií a kontrakcí samičích pohlavních orgánů. Druhou fází je penetrace, což je složitý proces, při kterém spermie pronikají do oocytu, který se nachází v metafázi druhého zracího dělení. Při průniku spermie do oocytu vzniká kortikální reakce, kdy je vylučován obsah kortikálních zrn oocytu. Kortikální zrna obsahují hydrolytické enzymy, jenž mění vlastnosti buněčné membrány oocytu a zona pellucida. Touto reakcí je zabráněno průniku dalších spermií do cytoplazmy oocytu. Během poslední fáze (tzv. fáze impregnace) oocyt dokončuje druhé zrací dělení, při kterém se od oocytu oddělí sekundární pólové tělísko. Jádro spermie nabývá granulární podoby, postupně dosáhne velikosti samičího jádra a lze ho morfologicky bezpečně rozlišit. V obou prvojádrech se tvoří homogenní jadérka. Obě prvojádra mají haploidní počet chromozomů, postupně v nich dochází k syntéze a ke zdvojení chromozomů (Marvan et al. 2003). Prvojádra se zvětšují, dochází k výměně genetické informace a nastupuje mitotické dělení – rýhování (Peters & Ball 1995).

Rýhování u skotu trvá 6-7 dní. 40-56 hodin po ovulaci se zygota rozděluje na dvě buňky, tzv. blastomery. Dalším rýhováním se dvoubuněčné embryo rozdělí postupně na 4, 8 a 16 blastomer. Při sestupu z vejcovodu do dělohy má embryo právě 16 blastomer a samotný sestup trvá 3-4 dny (Marvan et al. 2003). K poslednímu dělení, na 32 blastomer, dochází až v děloze a vzniká tzv. morula. Z moruly po 7-8 dnech vzniká blastocysta, jejíž dutina se postupně zvětšuje, dochází k dalšímu dělení buněk, praská zona pellucida a dochází k hatchingu blastocysty (Peters & Ball 1995).

Blastocysta se po hatchingu nadále zvětšuje. Z embryoblastu se v průběhu procesu gastrulace vyvíjejí tři zárodečné listy embrya – ektoderm, mezoderm a entoderm. Z těchto zárodečných listů se později diferencuje kostra, svaly, nervový systém, kůže a další orgány zárodku (Cibulka et al. 2004).

3.2.4 Pohlavní cyklus

Krávy a jalovice jsou polyestrická zvířata. Estrální cyklus probíhá u pohlavně dospělých plemenic opakovaně, a to v intervalu 18 až 25 dnů (pokud není přerušen březostí). Jalovice mohou mít délku cyklu o den zkrácenou (Burdych et al. 2004).

Podle chování a změn na pohlavních orgánech v průběhu říje se estrální cyklus rozděluje na čtyři období: proestrus, estrus, metestrus a diestrus (Louda et al. 2008).

Proestrus

Proestrus neboli období před říjí, trvá přibližně tři dny a to 18. – 20. den cyklu. Nastává po regresi žlutého tělíska, která je způsobena vlivem Prostaglandinu F2α. Regresí žlutého tělíska klesá hladina progesteronu a zvyšuje se sekrece FSH a LH (Louda et al. 2008). Jeden z folikulů na vaječníku se stává výraznějším a vzniká tzv. Graafův folikul (Whittier 1993). Za podpory FSH nastává vlivem granulózních buněk přeměna androgenů na estrogeny a zvyšuje

se hladina 17β-estradiolu. Lze pozorovat zvýšenou tonizaci dělohy, mírné zduření a otok vulvy a zarudnutí a zvlhnutí pochvy. Vlivem zvýšené hladiny estrogenů dochází k prvním změnám v chování plemenice, provázené neklidem, naskakováním na jiné krávy, avšak prozatím bez ochoty k páření (Louda et al. 2008).

Při zjištění proestru je potřeba nahlásit plemenici k inseminaci na následující den (Stupka et al. 2010).

Estrus

Estrus nazýváme jako vlastní říji. Je to období ochoty k páření a označujeme ho jako 0. den cyklu. Trvá přibližně jeden den +- dvanáct hodin (Louda et al. 2008).

V období estru je dokončena regrese žlutého tělíska a z folikulu se stává tzv. Graafův folikul o průměru 15 až 25 mm. V Graafově folikulu se nachází folikulární tekutina, ve které dozrává vajíčko. Z adenohypofýzy se vyplavuje LH, který způsobí dozrání folikulu, který následně praskne a dojde k uvolnění dozrálého vajíčka (ovulaci). Ovulace nastává 12 až 14 hodin po skončení estru (Burdych et al. 2004).

Vysoká hladina estrogenů z Graafova folikulu navozuje v tomto období intenzivní vnější projevy říje. Je patrné otevírání děložního krčku a dostavuje se rovněž reflex nehybnosti, který trvá sedm až deset hodin. Plemenice na sebe nechá naskakovat ostatní krávy a pozorujeme výtok sklovitého hlenu o vysoké vazkosti. Plemenice může mít zvýšenou teplotu a nechuť k žrádlu. V tomto období inseminujeme (Louda et al. 2008).

Metestrus

Metestrus neboli poříjové období následuje po ovulaci a probíhá od 1. do 4. dne estrálního cyklu. Během této periody se začíná na místě prasklého Graafova folikulu tvořit žluté tělísko, které vystupuje až 20 mm nad povrch vaječníku. Jeho vznik je zapříčiněn progesteronem, který zároveň tlumí účinky FSH a LH. Žluté tělísko produkuje progesteron. Ovulované vajíčko se přesouvá z nálevky vejcovodu do vejcovodu, kde dojde k oplodnění. Na začátku metestru lze plemenici ještě inseminovat, avšak výsledky této inseminace jsou spíše podprůměrné (Louda et al. 2008).

Na pohlavních orgánech dochází k postupnému ústupu příznaků říje, plemenice se pomalu uklidňuje a začíná se chovat normálně. Dva dny po skončení říje se může objevit krvavý výtok (Louda et al. 2008).

Poovulační krvavý výtok může přispět k hodnocení správnosti času inseminace (Stupka et al. 2010).

Diestrus

Tuto část estrálního cyklu označujeme jako období pohlavního klidu. Trvá od 5. do 18. dne cyklu a chování plemenice i její pohlavní orgány zůstávají beze změny (Louda et al. 2007).

Žluté tělísko pokračuje v růstu, maximální velikosti dosahuje 10. den cyklu a perzistuje v případě, že plemenice zabřezla. Tím zabraňuje nástupu další říje. Pokud plemenice nezabřezne, děložní sliznice začne 14. až 15. den cyklu produkovat Prostaglandin F2α, který svými luteolytickými účinky navodí regresi žlutého tělíska (Louda et al. 2008).

Po regresi žlutého tělíska stoupá hladina FSH a na vaječníku začíná vznikat nový folikul, jenž produkuje estrogeny a celý cyklus se tím opakuje (Burdych et al. 2004).

Diestrus je období charakteristické aktivitou progesteronu. Ten je výborně zjistitelný z krve i mléka, často se tedy pro detekci případné březosti v tomto období provádějí tzv. progesteronové testy (Burdych et al. 2004).

Anestrus

Anestrus (nebo také acyklie ovárií) je speciálním obdobím, kdy jalovice nebo dospělá kráva nevykazuje žádné příznaky říje. Tento jev je běžně pozorován u jalovic, jež ještě nedosáhly pohlavní dospělosti, nebo u krav v období puerperia. Délka trvání toho období může být zkrácena nepříklad vhodnou krmnou dávkou s vyváženou nutriční hodnotou, a hlavně pravidelnou a pečlivou kontrolou zdravotního stavu plemenic (Parish et al. 2010).

3.2.5 Ukazatele plodnosti

Úroveň plodnosti se hodnotí podle ukazatelů, jejichž hodnoty posuzujeme ve vztahu k mléčné užitkovosti (Stupka et al. 2010).

Pravidelná kontola a vyhodnocování reprodukčních ukazatelů krav umožňuje jednak odhalit existující problémy reprodukčního procesu v chovu, ale druhak bývá i zrojem prvotních příznaků o neschopnosti plemenic nadále se vyrovnávat s podmínkami prostředí, ve kterých žijí. Každý chovatel by si měl v rámci stáda určit cílové ukazatele, kterých by chtěl dosáhnout Při sestavování těchto cílů musí brát v úvahu hlediska ekonomická a biologická (Bouška et al. 2006).

3.2.5.1 Zabřezávání po první inseminaci

Tento ukazatel vyjadřuje procentický podíl plemenic, které skutečně zabřezly po 1. inseminaci z počtu všech prvně inseminovaných plemenic (Jílek et al. 2002). Vypočítá se ze vztahu: počet březích po první inseminaci/celkový počet prvních inseminací x 100 (Bouška et al. 2006).

Tabulka 3: Výsledky zabřezávání po první inseminaci

Hodnocení	Hodnota [%]
Výborné	Nad 60 %
Dobré	50-60 %
Průměrné	40-50 %
Špatné	Pod 40 %

Zdroj: Burdych et al. (2004)

U jalovic je zabřezávání po první inseminaci o 15-20 % lepší, než u dospělých krav, jelikož nejsou zatížené produkcí (Louda et al. 2008).

3.2.5.2 Zabřezávání po všech inseminacích

Jedná se o procentický podíl zabřezlých plemenic po všech inseminacích z celkového počtu inseminovaných plemenic (Bouška et al. 2006). Tento ukazatel lze vypočítat následovně: podíl zabřezlých/celkový počet provedených inseminací za určitý časový úsek x 100 (Stupka et al. 2010).

Hodnota zabřezávání po všech inseminacích by neměla klesnout pod úroveň dolní klasifikační hranice zabřezávání po první inseminaci sledovaného chovu (Říha et al. 2004) a cílem je u tohoto ukazatele dosáhnout úspěšnosti alespoň 80 % (Bouška et al. 2006).

3.2.5.3 Inseminační interval

Inseminační interval představuje časový úsek od otelení do dne, kdy byla plemenice po porodu poprvé inseminována. Jeho délka závisí na průběhu poporodní involuce dělohy, na nástupu ovariální a ovulační aktivity doprovázené projevy říje. U běžných plemenic toto období trvá 5-6 týdnů, u vysokoužitkových krav i déle (Louda et al. 2008). Dosáhne-li interval hodnot nad 60 dnů, doporučuje se sonografické vyšetření plemenice a na základě nálezu následné stanovení např. hormonálního ošetření na podporu ovariální činnosti. Ani v chovech s vysokou mléčnou užitkovostí by neměla být překročena hranice 85 dnů (Burdych et al. 2004).

Nejčastějšími příčinami prodlouženého inseminačního intervalu jsou způsob chovu, nedostatečná detekce říje a poruchy plodnosti dojnic (Bouška et al. 2006).

Tabulka 4: Hodnocení inseminačního intervalu

Hodnocení	Hodnota [dny]
Výborný	61-75
Vyhovující	76-80
Nevyhovující	80-90
Špatný	Nad 90

Zdroj: Burdych et al. (2004)

3.2.5.4 Servis perioda

Servis perioda patří mezi ekonomicky nejvýznamnější ukazatele plodnosti. Vyjadřuje počet dnů, které uplynuly mezi porodem a inseminací, po které plemenice skutečně zabřezla. Vyhovující délka servis periody v chovech s průměrnou užitkovostí je 80-90 dnů (Říha et al. 2004). Ve vysokoužitkových chovech lze za vyhovující považovat servis periodu 110-125 dnů za předpokladu, že mezidobí nepřekročí délku 400 dnů (Louda et al. 2008).

V letech 2007 až 2011 byla na území ČR nevyhovující hodnota servis periody u vysokoužitkových krav (nad 125 dnů) zjištěna u 43 % plemenic (Bucek 2012).

Hodnota servis periody zahrnuje pouze plemenice, které zabřezly, a proto je třeba, aby jich zabřezlo nejméně 80 %. Stejně jako u inseminačního intervalu je servis perioda ovlivňována poruchami plodnosti, nedostatky v managementu reprodukce a úrovní inseminace (Bouška et al. 2006). Servis periodu lze regulovat brakací (Louda et al. 2008).

3.2.5.5 Inseminační index

Udává celkový počet inseminací, které byly zapotřebí k zabřeznutí jedné plemenice. Čistý inseminační interval stanovujeme následovně: celkový počet inseminací zabřezlých plemenic/počet zabřezlých plemenic (Burdych et al. 2004). Hrubý inseminační index lze získat zahrnutím všech inseminací, a to včetně inseminací plemenic, které nezabřezly a jejich vztažením k počtu zabřezlých (Bouška et al. 2006). Čím nižší je hodnota inseminačního indexu, tím je lepší ekonomika zapouštění (Louda et al. 2008).

Tabulka 5: Hodnocení inseminačního indexu

	Hodnota
Velmi dobrý	do 1,5
Dobrý	1,6-1,8
Nepříznivý	1,9-2,0
Nevyhovující	nad 2,0

Zdroj: Burdych et al. (2004)

3.2.5.6 Interinseminační interval

Interinseminační interval se vyjadřuje počtem dnů mezi dvěma po sobě jdoucími inseminacemi u jednotlivých zvířat nebo v rámci celého stáda (Bouška et al. 2006). Měl by být shodný s délkou říjových cyklů u přebíhajících se plemenic. Lze ho rozdělit do tří skupin následovně:

Tabulka 6: Hodnocení interinseminačního intervalu

	Hodnota [dny]
Zkrácené cykly	pod 18
Normální cykly	18-25
Prodloužené cykly	nad 25

Zdroj: Burdych et al. (2004)

Vyskytují-li se v chovu s vyšší frekvencí zkrácené cykly (pod 18 dnů), pak tato skutečnost svědčí o nedostatečném sledování říje, a to včetně té, ve které byla plemenice inseminována. Dále vypovídají o poruchách hormonální funkce, zvýšeném výskytu folikulárních cyst a poruchách zpětných vazeb. Zvýšený výskyt prodloužených cyklů poukazuje na výskyt embryonální mortality a pokud frekvence těchto nepravidelných cyklů překročí hranici 40 %, je nutné tuto situaci řešit komplexní analýzou příčin (Burdych et al. 2004).

3.2.5.7 Natalita krav

Natalita neboli porodnost je vyjadřována počtem narozených telat na průměrný počet krav za období jednoho roku (Louda & Čeřovský 1994).

Čistá natalita vyjadřuje počet živě narozených telat od krav. Obecně platí, že pokud stádo dosáhne výsledku pod hodnotu 80, jedná se o natalitu nevyhovující (Burdych et al. 2004).

Hrubá natalita udává počet živě narozených telat na sto krav za rok, a to včetně telat narozených jalovicím. Tato hodnota je závislá na rychlosti obratu stáda a intenzitě převodu jalovic do stavu krav. Cílem je u hrubé natality dosáhnout alespoň 110 telat (Bouška et al. 2006).

3.2.5.8 Počet živě odchovaných telat na sto krav

Tento ukazatel reprodukce je jedním z nejkomplexnějších a nejobjektivnějších. Počet živě odchovaných telat na sto krav by neměl klesnout pod spodní hranici natality (Burdych et al. 2004).

3.2.5.9 Mezidobí

Mezidobí je časový úsek mezi dvěma porody jedné plemenice. Tudíž ho lze stanovit pouze od zvířat, která se telila nejméně dvakrát (Louda et al. 2008). Počítá se jako aritmetický průměr délky mezi dvěma porody všech krav, včetně vyřazených (Burdych et al. 2004).

Mezidobí lze rozdělit na tři části: graviditu, poporodní anestrus a servis periodu (Dayyani et al. 2013). Díky téměř neměnné délce březosti závisí hodnota mezidobí hlavně na servis periodě (Bouška et al. 2006).

Za velmi dobrou je obecně považována hodnota do 365 dnů, naopak za nevyhovující hodnota nad 405 dnů. Vysokoprodukční krávy mívají zpravidla mezidobí delší (Burdych et al. 2004).

Tabulka 7: Vývoj průměrné délky mezidobí u holštýnských krav (včetně kříženek) v ČR

Rok	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**
Mezidobí [dny]	414	412	408	407	402

Zdroj: Svaz chovatelů holštýnského skotu (2014; 2015; 2016; 2017; 2018)

3.2.6 Vlivy působící na plodnost

Vlivem rostoucí mléčné užitkovosti byl v posledních desetiletích zaznamenán silný propad úrovně reprodukce. Plodnost je vlastnost, kterou ovlivňuje spousta faktorů a její zhoršení lze přičíst genetickým, environmentálním a manažerským vlivům (Walsh et al. 2011).

3.2.6.1 Genetické založení jedince

Heritabilita ukazatelů plodnosti je nízká a koeficient dědivosti se u ní pohybuje v rozmezí 0,01-0,2 (Petr 2015). Hlavními faktory ovlivňujícími plodnost jsou tedy chovatel a podmínky vnějšího prostředí (Zahrádková et al. 2009).

3.2.6.2 Zdravotní stav

Nejen z hlediska welfare zvířete, ale i z pohledu ekonomického je nesmírně důležitá minimalizace zdravotních problémů plemenic. Onemocnění jako jsou mastitida, metritida, laminitida, dislokace slezu, ketóza nebo ovariální cysty významně zvyšují náklady na veterinární zákroky, působí ztráty za ušlé mléko, zvyšují čas strávený zaměstnanci léčbou zvířete a v neposlední řadě způsobují zvířeti stres, který je často spojený s dalšími poruchami plodnosti (Becker et al. 2012).

3.2.6.3 Věk a pořadí laktace

Plodnost se zpravidla do poloviny reprodukční fáze života zvyšuje a po jejím dosažení rychle klesá. Z hlediska reprodukční výkonnosti se jako nejvýhodnější skladba stáda jeví ta s nejvíce plemenicemi ve věku krátce před dosažením vrcholu reprodukční výkonnosti. Schopnost reprodukce se u skotu za běžných okolností může zvyšovat do 8. až 10. roku stáří (tzn. 5. až 7. laktace). Tento potenciál v našich chovech ale není ani zdaleka využit z důvodu časnějšího vyřazení dojnic z chovu ze zdravotních důvodů, nebo z důvodu nízké užitkovosti. Ideální stav by ve stádě představovalo maximální zastoupení krav ve věku 5 až 9 let, tedy krav na 3. až 6. laktaci (Hofírek et al. 2009).

3.2.6.4 Technologie ustájení

V chovu skotu jsou využívány rozmanité systémy ustájení, z nichž každý poskytuje odlišnou úroveň chovného prostředí (Stupka et al. 2010).

Zpravidla rozlišujeme ustájení vazné a ustájení volné. Z hlediska reprodukce skotu lze říci, že při volném nebo pastevním systému ustájení dochází u plemenic k intenzivnějším projevům říje, což významně ulehčuje její detekci. Na úroveň projevů říje působí i kvalita podlahy, která by neměla být kluzká. Jednoznačnou výhodou vazného systému ustájení je snadná identifikace zvířat podle stájových tabulek a jednodušší manipulace se zvířaty (Říha et al. 2004).

Při výběru vhodného typu ustájení je nutné vzít v potaz etologické požadavky dojnic. Dojnice potřebuje až dvanáct hodin denně v klidu ležet a přežvykovat (Pařilová 2007).

3.2.6.5 Mikroklima stáje

Mezi jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících reprodukci patří teplota a vlhkost ve stáji. Dlouhodobě vysoká teplota a vysoká relativní vlhkost ve stáji bývají zejména v letním období u vysokoužitkových dojnic příčinou tepelného stresu. Tepelný stres plemenicím znepříjemňuje život, jelikož negativně ovlivňuje jejich pohodu, životní projevy, užitkovost, schopnost reprodukce, zdravotní stav a tím i ekonomiku celé produkce (Knížková et al. 2003).

Tepelný stres se projevuje útlumem hormonální aktivity, snížením hladiny progesteronu, zkrácením přítomnosti žlutého tělíska a snížením procenta zabřezávání až o 20-

25 %. Rovněž citlivost embrya vůči teplotnímu stresu je vysoká, zvláště v prvních dvou týdnech po zabřeznutí (Ježková et al. 2004).

Tepelně komfortní zóna pro dojnice byla odhadnuta na 5 až 25 °C. Tepelný stres pak začíná při teplotě vzduchu nad 25 °C, u vysokoužitkových dojnic už od 21 °C. Mezi příznaky tepelného stresu patří zvýšená rektální teplota, pocení, slinění, zvýšená frekvence dechu a změny v chování (Knížková et al. 2003).

3.2.6.6 Výživa

Výživa krav je považována za nejvýznamnější faktor vnějšího prostředí, který ovlivňuje produkci mléka, plodnost a zdravotní stav zvířat (Slavík et al. 2004).

Výživa významně ovlivňuje vývoj a funkčnost reprodukčních orgánů. Nedostatky ve výživě se ve vztahu k plodnosti projevují buď přímo nebo prostřednictvím změn vnitřního prostředí v průběhu poruch metabolismu. Poruchy metabolismu mají vliv na neurohumorální struktury a mechanismy řídící pohlavní funkce (Říha et al. 2004). Nedostatečná kvalita krmé dávky se u plemenic projevuje tichými a nepravidelnými říjemi, prodlužováním období involuce dělohy nebo embryonální mortalitou (Stupka et al. 2010).

Neadekvátní výživa může zasahovat do celého procesu na úrovni hypotalamu nebo hypofýzy, kde má vliv na vývoj vajíčka a na endokrinní funkce. Výživou je mimo jiné ovlivněn i transport spermií, fertilizace, vývoj časných i pozdnějších embryí a plodu (Říha et al. 2004).

Ve vztahu k plodnosti jsou nezanedbatelnou složkou krmné dávky minerální látky. Pravidelné dodání ML je základním předpokladem k dosažení vysoké produkce a reprodukce skotu (Šustala 2001). Další faktor, který ovlivňuje fertilitu je příjem dusíkatých látek. Podle jejich kvality a množství v krmné dávce se řídí hladina koncentrace progesteronu v séru a mění se prostředí v děloze a v důsledku toho může klesat plodnost. Krmné dávky s vysokým obsahem dusíkatých látek (17-19 %) jsou předkládány kravám v období časné laktace, a to jak ke stimulaci jejího řádného nástupu, tak i k udržení vysoké mléčné produkce. Krmné dávky bohaté na N-látky jsou ale spojovány se sníženou reprodukční výkonností (Říha et al. 2004).

3.2.6.7 Negativní energetická bilance (NEB)

Po otelení zažívá vysokoužitková dojnice dramatické zvýšení energetických nároků potřebných k uspokojení náhlého nárůstu užitkovosti na počátku laktace. Vrchol nárůstu nastává mezi 4. a 8. týdnem po porodu. Tyto nároky na energii jsou z části naplněny zvýšením krmné dávky, zbytek zajišťuje mobilizace tělesných rezerv, což má za následek nástup negativní energetické bilance (Walsh et al. 2011).

V průběhu prvního měsíce laktace je až 30 % mléčné produkce postaveno na využití tělesných zásob dojnice. Nejvýznamnější energetický zdroj představuje podkožní tuk, kterého se během časného nástupu laktace uvolní 50-60 kg. Úbytek živé hmotnosti v tomto období o více než 1 kg za den nebo o více než 10 % hmotnosti zvířete v průběhu 60 dnů po porodu významně narušuje následnou reprodukční výkonnost plemenice, tzn. zpomaluje involuci dělohy, zpožďuje nástup pohlavního cyklu, snižuje úroveň zabřezávání a zvyšuje výskyt poruch funkce ovárií (Hofírek et al. 2004).

Období hluboké negativní energetické bilance nepříznivě ovlivňuje nástup první ovulace, která se obvykle dostavuje v rozmezí 17-42 dní po otelení. Způsobuje prodloužení inseminačního intervalu, a tudíž je žádoucí snažit se NEB minimalizovat (Říha et al. 2004).

3.2.6.8 Tělesná kondice

Tělesná kondice je považována za nástroj pro zhodnocení energetického stavu a rezerv tělesného tuku zvířete pomocí vizuálního a hmatového hodnocení. Určuje se pětibodovou stupnicí BCS (Body Condition Scoring) a nabývá hodnot 0 až 5 (Roche et al. 2007).

BCS je mezinárodně uznávaným subjektivním měřítkem tělesné kondice. Změny v BCS monitorují zdravotní a výživový stav vysokoužitkových krav během jejich produkčního cyklu. Tělesná kondice geneticky a fenotypově koreluje se schopností reprodukce (Walsh et al. 2011).

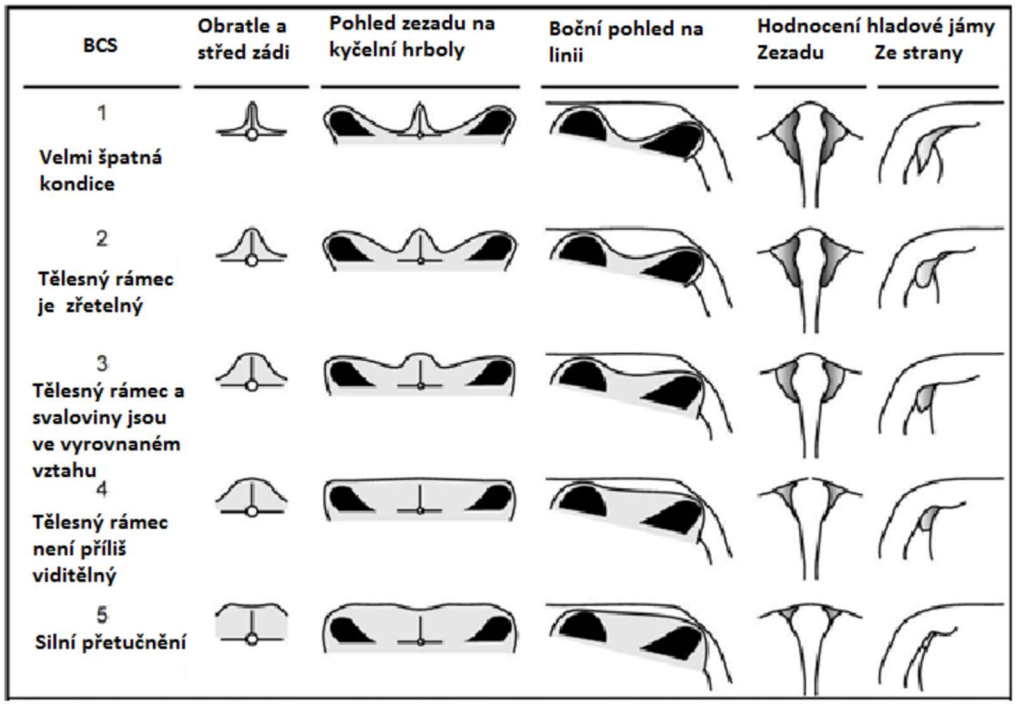
Hubená zvířata mají prodlouženou servis periodu do nástupu ovariálních funkcí po porodu, nepravidelné pulzy luteinizačního hormonu, nedostatečnou odezvu folikulů na stimulaci gonadotropiny a sníženou funkčnost folikulu, což způsobuje sníženou produkci estradiolu (Chagas et al. 2007). Plodnost krav s nadměrnou kondicí je také ohrožena, jelikož takovéto krávy mají tendenci k větší mobilizaci tuků a po porodu mají sníženou chuť ke žrádlu což má za následek závažnější negativní energetickou bilanci (Walsh et al. 2011). Výsledkem zvýšené mobilizace tělesného tuku a větší akumulace triacylglycerolů v játrech je prodloužení intervalu do první ovulace a snížení plodnosti (Říha et al. 2004).

Tabulka 8: Pětibodová stupnice BSC

BCS	Hodnocení
1	Dojnice je extrémně vyhublá.
2	Dojnice je vyhublá, ale kosti nevystupují tak zřetelně.
3	Dojnice je v průměrné tělesné kondici.
4	Dojnice působí zakulaceně a plně.
5	Dojnice je přetučnělá.

Zdroj: Rodenburg (2000)

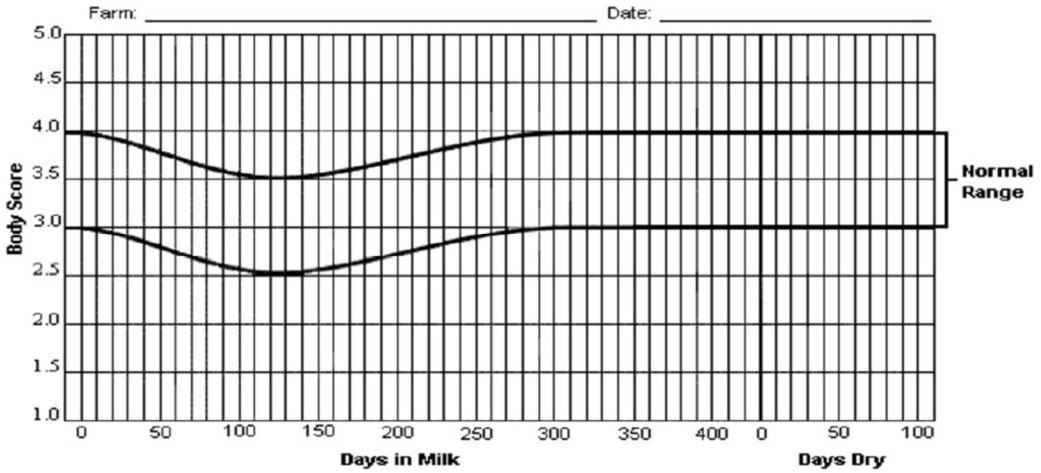
Obrázek 1: Hodnocení tělesné kondice dle pětibodového systému



Zdroj: Rysová (2017)

V optimální kondici je plemenice tehdy, když má v období stání na sucho hodnotu BCS v rozmezí od 3,0 do 4,0 (ideálně 3,5). V období telení a počátku latkace pak 2,5 až 3,5 bodu. Žádná dojnice by v průběhu laktace neměla změnit svou běžnou kondici o více než jeden bod (Rodenburg 2000).

Obrázek 2: Normální tělesná kondice v období mléčné produkce a stání na sucho



Zdroj: Rodenburg (2000)

3.3 Řízení reprodukce

Z důvodu potřeby zefektivnění reprodukce chovaných zvířat chovatelé zasáhli do původně čistě biologického děje. Byly vyvinuty a zavedeny rozsáhlé biotechnické metody jako je synchronizace říje, umělá inseminace nebo embryotransfer. Chovatel v dnešní době hraje důležitou roli v reprodukčním procesu skotu a předpokladem je tedy hlubší znalost problematiky reprodukce (Bouška et al. 2006).

3.3.1 Detekce říje

Vyhledávání říje ve stádě je základním předpokladem prosperity chovu. Problémem jsou nedostatečné projevy říje, efektivní detekce tedy vyžaduje zkušenosti (Hopper 2014). Nezachycená, nebo špatně určená říje způsobuje neprovedení inseminace, nebo její provedení v nevhodný čas, což způsobuje ekonomické ztráty (Hegedüšová et al. 2010). Ke zjednodušení detekce říje je v současné době možné použít celou škálu pomůcek, je nutné mít na paměti, že tyto vynálezy mají za úkol pouze usnadnit vizuální detekci, nikoliv ji plně nahradit (Hopper 2014).

Vizuální sledování a záznamy

Vizuální sledování zvířat je založeno na pozorování příznaků jednotlivých fází estrálního cyklu. Předpokladem je jejich výborná znalost (Hanuš et al. 2006).

Vizuální kontrole je nutné věnovat notnou dávku času, ideální je sledovat plemenice alespoň 3x denně po dobu 30 minut (Holman et al. 2011).

Každá plemenice musí být po celý svůj život jasně a permanentně označená buď obojkem, plastovými náušnicemi nebo pálením a její identifikační číslo musí být viditelné a rozpoznatelné. Kvalitní záznamy obsahují identifikační číslo plemenice, včetně data narození a původu. Dále záznamy o datech říjí, inseminacích, datech otelení, průběhu porodu a pohlaví telete. Tyto záznamy nejsou pouze součástí dobrého managementu, ale jsou také první pomůckou při vyšetřování neplodnosti (Diskin & Sreenan 2000).

Arborizační test

Ke zjištění průběhu říje a určení nejvhodnější doby k inseminaci lze použít metodu posouzení arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu. Tento test se provádí mikroskopickým pozorováním roztěru hlenu na podložním sklíčku. Odběr cervikálního hlenu se provádí sterilní pipetou z oblasti růžice děložního krčku nebo kaudální části děložního krčku (Louda et al. 2008).

Progesteronový test

Progesteronový test umožňuje stanovení hladiny progesteronu v mléce a na základě výsledků potvrzení fáze říjového cyklu. Slouží pro kontrolu při detekci říje a pomáhá odhalit i říje tiché, nicméně neurčí přesnou fázi estrálního cyklu (Burdych et al. 2004).

Tato metoda založena na kolísání hladiny progesteronu může také podpořit detekci folikulárních cyst. Sedmý den po inseminaci může test napomoci zjistit, zda proběhla normální ovulace. Pokud ovulace neproběhla, pravděpodobně místo žlutého tělíska na ováriu vznikla cysta (Hegedüšová et al. 2010).

Pedometry

Pedometry jsou zařízení, která se připevňují na nohy krav a monitorují počet kroků, které zvíře udělá za určitý časový úsek. Lze je využít pouze v chovech s volným systémem ustájení. Frekvence kroků je snímána čipy na dojírně a následně vyhodnocována počítačem (Burdych et al. 2004).

V období říje se výrazně zvyšuje fyzická aktivita krav. Říjící se plemenice nachodí denně až čtyřikrát více kroků ve srovnání s kravami v diestru (Diskin & Sreenan 2000).

3.3.2 Výběr plemenic k zapouštění

Při určování vhodnosti jalovic k plemenitbě hraje důležitou roli pohlavní dospělost. Nezáleží ani tolik na věku jalovic, jako spíš na jejich hmotnosti. Optimální hmotnost jalovice by měla v období první inseminace být přibližně 420 kg, což odpovídá 65 % předpokládané hmotnosti v dospělosti. Této hmotnosti plemenice dosahují ve věku 14 až 18 měsíců (Hanuš et al. 2006).

U krav je vhodnost k zapouštění dána především průběhem puerperia a úrovní mléčné užitkovosti. Je důležité, aby došlo k bezproblémové involuci dělohy, která trvá 3 až 6 týdnů. Po involuci dělohy nastupuje první říje (Burdych et al. 2004).

K opětné inseminaci vybíráme zdravé krávy, u kterých proběhla obnova funkční schopnosti vaječníků, involuce dělohy a dále plemenice v optimálním stupni tělesné kondice (Louda et al. 2008).

3.3.3 Inseminace

Inseminací se rozumí vpravení semene do pohlavních orgánů samice rukou inseminačního technika. Aby mohla být inseminace úspěšná, je důležité především optimální načasování (Bouška et al. 2006).

Správný čas inseminace určují čtyři faktory:

1. Čas uvolnění zralého vajíčka z folikulu (10-12 hodin po skončení říje).
2. Doba, po kterou je vajíčko životaschopné a může tudíž dojít k oplození (6 hodin).
3. Doba potřebná pro kapacitaci spermií (5-6 hodin).
4. Životnost spermií (20-24 hodin). (Říha et al. 2004).

Obecně platí, že plemenice, u které byla v ranních hodinách zjistěna fáze proestrus by měla být inseminována následující den ráno, nebo dopoledne. Plemenice, které v ranních hodinách zaujímají postoj k páření a nechávají na sebe naskakovat ostatní krávy, by měly být inseminovány ještě tentýž den odpoledne a plemenice se stejnými příznaky zjištěnými odpoledne by měly být inseminovány následujícího rána (Říha et al. 2004).

Hlavními výhodami inseminace jsou genetický zisk, eliminace přenosu pohlavních onemocnění, bezpečnost a relativně nízké náklady (Peters & Ball 2004).

V našich podmínkách pracujeme při inseminaci téměř výhradně s dlouhodobě zmraženými dávkami, které jsou skladovány v tekutém dusíku (Bouška et al. 2006).

3.3.4 Synchronizace říje

Synchronizace říje v posledních letech dosáhla značné popularity. Při uplatňování synchronizace jsou plemenicím podávána účinná farmaka tak, aby se říje dostavila v konkrétní požadovaný čas (Říha et al. 1999).

Základem pro všechny metody synchronizace říje je manipulace s luteální fází (zkrácení, prodloužení nebo umělé navození luteální fáze) doplněná aplikací preparátů působících na folikulární populaci (řízení folikulárních vln, indukce populace). Ke zkrácení luteální fáze se využívá preparátů s luteolytickým účinkem jako je Prostaglandin F2α, dinoprost nebo cloprostenon. Jsou používány buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými preparáty. Naopak k prodloužení luteální fáze se využívá toho, že podané gestageny inhibují aktivitu hypotalamu, což má za následek také inhibici uvolňování LH. Po dobu aplikace gestagenů nedochází k ovulaci (Čech & Doležel 2008).

Základním předpokladem efektivního výsledku je využívání zdravých a pravidelně cyklujících plemenic. Neméně důležitá je také samotná aplikace preparátů, která musí být provedena ve správný čas, a to v době, kdy žluté tělísko disponuje receptory na Prostaglandin F2α (Bouška et al. 2006). Přípravky pro synchronizaci říje lze podávat ve formě injekce, v krmné dávce, v podkožních implantátech nebo v poševních tamponech (Čech & Doležel 2008).

Navzdory tomu, že synchronizace říje je u skotu běžně používanou metodou, není prozatím znám ani jeden způsob synchronizace, který by zajistil efektivnost za každé situace. Výhodou je nepřeberné množství synchronizačních protokolů, ze kterých může chovatel s ohledem na podmínky a cíle svého chovu vybírat. Výsledkem synchronizace může být výrazná úspora času v důsledku snížené četnosti detekce říje. Nepostradatelné zastoupení má synchronizace říje v programech embryotransferu při přípravě dárkyň a příjemkyň (Říha et al. 1999).

3.4 Embryotransfer

Přenos embryí neboli embryotransfer, je biotechnická metoda umožňující intenzivnější využívání genetického potenciálu špičkových plemenic (Bouška et al. 2006). Hlavním cílem embryotransferu je produkce co nejvíce potomků od vynikajících rodičů a současně zkrácení generačního intervalu. Ve šlechtění přenos embryí přináší genetický zisk, tzn. zlepšuje ekonomiku chovu. Produkcí embryí je možné eliminovat zhoršené reprodukční parametry

špičkových dojnic, které jsou způsobeny jejich metabolickou zátěží. Embrya získaná od vysokoužitkových krav lze s vysokou úspěšností uchycení embrya přenést do produkcí nezatížených jalovic. Narozené jalovičky lze úspěšně odchovat a zařadit do chovu (Stádník et al. 2013).

3.4.1 Historie embryotransferu

První úspěšný embryotransfer byl proveden v roce 1890. Uskutečněn byl panem Walterem Heapem, kterému se podařilo přenést embryo králíka s cílem ověřit vliv prostředí na projev fenotypu. Tento objev se stal významným mezníkem v oblasti přenosu embryí (Strapák & Tančin 2013). U skotu byl první přenos embryí uskutečněn ve Spojených státech amerických roku 1949 panem Umbaughem na univerzitě ve Wisconsinu (Hasler 2003).

První komerční přenosy embryí u skotu byly prováděny v 80. letech minulého století, a to zejména v Severní Americe a ve Velké Británii. Pokroku v embryotransferu následně začalo být využíváno k dovozu evropských masných plemen do Spojených států a Kanady. Mezi roky 1973-1975 se zde po embryotransferu narodilo na 1500 telat plemene masný Simentál (Hasler 2013). V bývalém Československu se první tele vzniklé přenosem čerstvého embrya narodilo v roce 1976, po přenosu zmrazeného embrya pak roku 1982 (Říha 1990).

Po roce 1980 došlo k pokroku v oblastech doprovázejících embryotransfer, jako jsou mikromanipulace s embryem, oplodnění in vitro, molekulární biologie nebo určování pohlaví embrya (Betteridge et al. 2003).

3.4.2 Aktuální situace embryotransferu v ČR

Počty přenosů embryí od roku 2004 v ČR soustavně klesají (viz Tabulka 9). V roce 2011 bylo v ČR vypláchnuto pouze 82 dárkyň, což je oproti roku 2006 o 1128 plemenic méně. V roce 2004 bylo provedeno 6427 přenosů, kdežto v roce 2011 jich bylo pouze 182. Snížil se také průměrný počet přenosuschopných embryí z výplachu. V roce 2011 bylo uváděno pouze 3,4 embryí na dárkyni, přičemž v roce 2004 to bylo 5,4 (Stádník et al. 2013).

Tabulka 9: Přehled počtu provedených přenosů embryí v ČR v letech 2004-2011

Rok	Počet dárkyň	Počet přenosů
2004	1184	6427
2005	1151	5920
2006	1210	6075
2007	1002	5880
2008	469	2245
2009	255	1725
2010	229	1213
2011	82	182

Zdroj: Stádník et al. (2013)

Uvedené snížení efektivnosti přenosu embryí může souviset se zvyšující se užitkovostí dojnic v ČR. Zároveň snížením četnosti embryotransferu se snižují praktické zkušenosti reprodukčních techniků s touto biotechnologickou reprodukční metodou (Stádník et al. 2013).

3.4.3 Metodika embryotransferu

Před začátkem využívání metody embryotransferu je nutné vykonat důkladnou plemenářskou analýzu stáda a vybrat na základě užitkovosti, exteriéru a původu plemenice vhodné k zařazení do procesu přenosu embryí. Přenos vyžaduje rozřazení vybraných plemenic podle stádia reprodukčního cyklu do několika skupin a přizpůsobení plánu připouštění jalovic potřebám příjemkyň. V případě, že nemáme zájem o produkci býčků pro některou z inseminačních stanic, je na místě zvážení možnosti sexování embryí a přenos pouze těch samičích. Je nutné zabezpečit kvalitní odchov zvířat získaných embryotransferem a jejich následné zařazení do plánu přenosů embryí budoucích let (Říha et al. 2004).

Jedním z nejdůležitějších kroků embryotransferu je selekce jedinců, kteří se budou přenosu účastnit – dárkyň a příjemkyň. Dárkyní se zpravidla stává kráva vysoké genetické hodnoty, příjemkyní naopak plemenice s podprůměrnou vlastní užitkovostí nebo plemenice, která je potomkem krávy s užitkovostí pod průměrem stáda (Vinkler 2009).

3.4.3.1 Selekce dárkyň a jejich příprava na přenos embryí

Příprava dárkyň k přenosu embryí je komplexní záležitostí a zahrnuje následující postupy:

- výběr dárkyň
- synchronizaci jejich pohlavního cyklu
- superovulační opatření
- inseminaci a reinseminaci dárkyň
- výplach a odběr embryí 7. den po inseminaci a jejich přenos, případně zamrazení (Stádník et al. 2013).

Neméně důležitý je zdravotní stav dárkyně (donorky). Při základním vaginálním a rektálním vyšetření nesmí být zjištěny žádné patologické změny na pohlavních orgánech a dárkyně by celkově měla být ve výborné kondici (Říha 1990).

Výběr dárkyň:

Potencionální dárkyně by měla dosahovat maximálních výsledků reprodukce a zároveň mít dobrou úroveň výživy a mléčné produkce. Při výběru dárkyň je požadován pravidelný pohlavní cyklus, inseminační index v hodnotách do 2 inseminací, co nejvyšší vlastní mléčná užitkovost, nadprůměrná produkce potomstva z předcházejících inseminací, snadné předchozí porody, plemenice bez chyb v exteriéru nebo zjistitelných genetických poruch (Pivko et al. 2000).

Synchronizace pohlavního cyklu:

Je dokázáno, že synchronizaci říje lze navodit u krav během jejich luteální fáze podáním Prostaglandinu F2α. V průběhu dalších let byly vyrobeny analogy, které jsou ještě účinnější než přírodní PGF2α. Jeho plikace musí proběhnout ve fázi, kdy má žluté tělísko receptory pro prostaglandin, přičemž za vhodný termín je považován 5. až 17. den cyklu (Rowson et al. 1971). Aplikace byla účinná v případě, že byla detekována říje a přítomností žlutého tělíska potvrzena ovulace. Říje se dostaví po 3-4 dnech, kdy se plemenice inseminuje (Stádník et al. 2013).

Výsledky synchronizace říje analogy PGF2α pro účely přenosu embryí se dají shrnout následovně:

- snadné ošetření zvířat
- nástup říje 36-72 hodin po aplikaci účinné látky
- ošetření prostaglandinem umožňuje inseminaci v předem stanovené době (72 hodin po podání)
- srovnatelná úspěšnost zabřezávání po inseminaci v synchronizované říji s plodností po inseminaci ve spontánní říji (Stádník et al. 2013).

Superovulační opatření:

Superovulace je stav, kdy na ováriích dozrává a ovuluje větší počet folikulů najednou. Superovulace lze dosáhnout opakovaným podáním gonadotropních nebo placentárních hormonů (Bouška et al. 2006). Vhodnou dobou k zahájení ošetření je období interfáze, kdy dominantní folikul dosahuje maximální velikosti (8-12 mm) a začíná se tvořit druhý dominantní folikul (Louda, 2001). Superovulace se provádí ideálně 9. - 13. den cyklu, kdy probíhá luteální fáze (Hegedüšová et al. 2010).

Principem superovulace je stimulace folikulů podáním přípravků na bázi gonadotropinů schopných imitovat efekt FSH (Stádník et al. 2013). Dříve se k superovulaci běžně používala injekce sérového gonadotropinu březích klisen (PMSG). Bylo ale zjištěno, že při použití FSH a LH v poměru 5:1 lze dosáhnout většího počtu ovulací. FSH a LH se v klesajících dávkách podávají po dobu čtyřech dnů, a to dvakrát denně v intervalu dvanácti hodin (Pivko et al. 2000). V našich podmínkách se k vyvolání superovulace nejčastěji používá FSH, preparáty Folicotropin nebo Pluset, což je přírodní preparát získaný extrakcí ovčích nebo vepřových hypofýz (Stádník et al. 2013).

Výsledky superovulace se vyznačují značnou variabilitou. Záleží na plemenné příslušnosti plemenic, optimálním zdravotním stavu, úrovni užitkovosti apod. (Mapletoft et al. 2002).

Inseminace a reinseminace dárkyň:

Při inseminaci po superovulačním ošetření musíme respektovat odlišnosti, které mohou u říje nastat. Těmito odlišnostmi se rozumí větší množství uvolněných oocytů během ovulace a obecně její delší průběh (Vinkler 2009). Ovulace superovulovaných krav probíhá až 24 hodin a příznaky říje bývají u dárkyň méně zřetelné. Efektivně využívaným systémem je inseminace superovulovaných krav 12, 14 a 36 hodin po nástupu stálé tělesné teploty (Selk 2002).

Reinseminace se tedy provádí ve dvanáctihodinových intervalech tak dlouho, dokud neodezní poslední příznaky říje (Vinkler 2009).

Důležitým faktorem embryotransferu je sperma použité k inseminaci. Mělo by se jednat o velmi kvalitní sperma s vysokým podílem normálních, životaschopných spermií (Selk 2002).

Výplach a odběr embryí:

V dřívějších dobách se embrya získávála chirurgickými zákroky. Tyto metody ale často způsobovaly srůsty na pohlavních orgánech, které snižovaly plodnost dárkyň. Z tohoto důvodu byly vyvinuty nové, nechirurgické metody získávání embryí (Pivko et al. 2000).

Nechirurgický výplach embryí se provádí vždy 6 až 7 dní po první aplikaci inseminační dávky, jelikož v tomto období embrya nejlépe snáší manipulaci. Sestoupila již také do dělohy, a tak je možné je získat přes děložní čípek výplachem (Říha et al. 1999). Pozdější výplachy se nedoporučují, jelikož embrya jsou již po hatchingu, bez zony pellucidy a obtížněji se vyhledávají (Říha 1990).

Před výplachem se doporučuje dárkyni fixovat v kleci tak, aby přední část jejího děla byla o 30 až 35 cm výše, než zadní část. Tímto postavením se orgány posunou směrem dozadu a děloha má tendenci se zvednout, což značně usnadňuje přístup pro manipulaci s dělohou během výplachu (Robertson 2015). Po očištění zevních pohlavních orgánů se nejprve vyšetří oba vaječníky a odhadne se počet žlutých tělísek. Pokud je pozorována pozitivní reakce na superovulaci, za účelem zklidnění plemenice je provedeno epidurální znecitlivění (Peters & Ball 1995). Za pozitivní reakci na superovulační ošetření je považován výskyt pěti až šesti žlutých tělísek na jednom vaječníku (Richard et al. 2015). Ocas krávy se přiváže na stranu tak, aby nepřekážel při zákroku a dárkyně je připravena k výplachu (Peters & Ball,1995).

Základním nástrojem pro výplach dárkyň je Foleyův dvoucestný nebo třícestný katetr. Katetry jsou vyráběny v mnoha různých délkách a velikostech (Hasler 2013). Prvním krokem je rozhrnutí stydkých pysků a zavedení katetru do pochvy. Následuje jeho zavedení skrz děložní krček. Katetr je běžně vyztužen ocelovým mandrenem a uložen v ochranném krytu. Mandren zajišťuje tuhost katetru při jeho průchodu děložním krčkem (Vinkler 2009). Průchod katetru děložním krčkem je velmi podobný jako u inseminace až na to, že katetr je podstatně větší. Během jeho zavádění je potřeba dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k poranění dárkyně (Robertson 2015).

Katetr je fixován v děložním rohu latexovým balonkem naplněným přiměřeným množstvím (10-20 ml) vzduchu. Správná poloha katetru je kontrolována ručně ošetřovatelem přes rektum (Říha et al. 1999). K již zavedenému katetru se připojuje spojka s přítokovou a odtokovou hadičkou ve tvaru Y (Selk 2002). Na přítokovou hadičku je napojena nádoba s vyplachovacím médiem a na odtokovou jímací nádoba (Vinkler 2009). K výplachu se používá jednoduché výplachové médium, nejčastěji BPS (phosphate buffered salt solution) nebo KRF (Krebs-Ringer fosfát) s přídavkem 1 % telecího séra, nebo bovinního sérového albuminu (Coufalík 2013). Je-li katetr správně zaveden a fixován balonkem, lze přejít k samotnému výplachu. Výplachové médium dávkujeme v množství zhruba 300 cm^3 na jeden děložní roh. Teplota média by měla být přibližně 30 °C. Do děložního rohu je vždy vpuštěno malé množství média (20-60 ml) a po jeho vypláchnutí je roh vyprázdněn a výplašek zachytáván do sterilní

jímací nádoby. Tento proces je opakován až do úplného spotřebování výplachového média (Říha et al. 1999).

3.4.3.2 Návrat dárkyň do reprodukce

Existuje několik možností, jak dárkyni navrátit do reprodukce. Buď můžeme vyčkat na první spontánní říji, nebo k jejímu vyvolání použít Prostaglandin. Prostaglandin F2α lze aplikovat ihned po výplachu, přičemž na první indukované říji potom plemenici neinseminujeme. Inseminace se po tomto ošetření běžně provádí na první spontánní říji. Další alternativou je podání PGF2α 12. den po výplachu a projeví-li se říje s čirým hlenem, inseminujeme, neobjeví-li se říje, pak 42. den vyšetříme plemenici na březost (Říha et al. 1999).

3.4.3.3 Izolace embryí

Při jakékoliv manipulaci s embryi v prostředí in vitro je důležité vytvořit takové prostředí, které bude nejvíce vyhovovat fyziologickým potřebám embryí. Veškeré práce by měly probíhat ve sterilním prostředí a bez zbytečného prodlužování doby setrvání embryí v podmínkách in vitro (Říha et al. 1999).

Vyplachovací médium s embryi je po výplachu zachycováno dvěma způsoby. Prvním z nich je zachycování embryí do sterilních filtrů určených přímo k odběru embryí (př. EZ Way filter, Canton, TX, PETS atp.), přičemž výplachové médium odtéká. Na filtrech se pomocí stereomikroskopu vyhledají embrya a umístí se do Petriho misky s uchovávacím médiem. Druhou možností je zachycování embryí i výplachového média do autoklávového odměrného válce, nebo Erlenmeyerovy baňky (Hasler 2013). Při využití válce nebo baňky se médium po 45 minut nechá usadit. Během této doby embrya klesnou na dno, následně se většina média odčerpá (zbyde asi 10 až 20 mm) a embrya jsou i s médiem přesunuta do Petriho misek (Peters & Ball 1995).

3.4.3.4 Hodnocení embryí

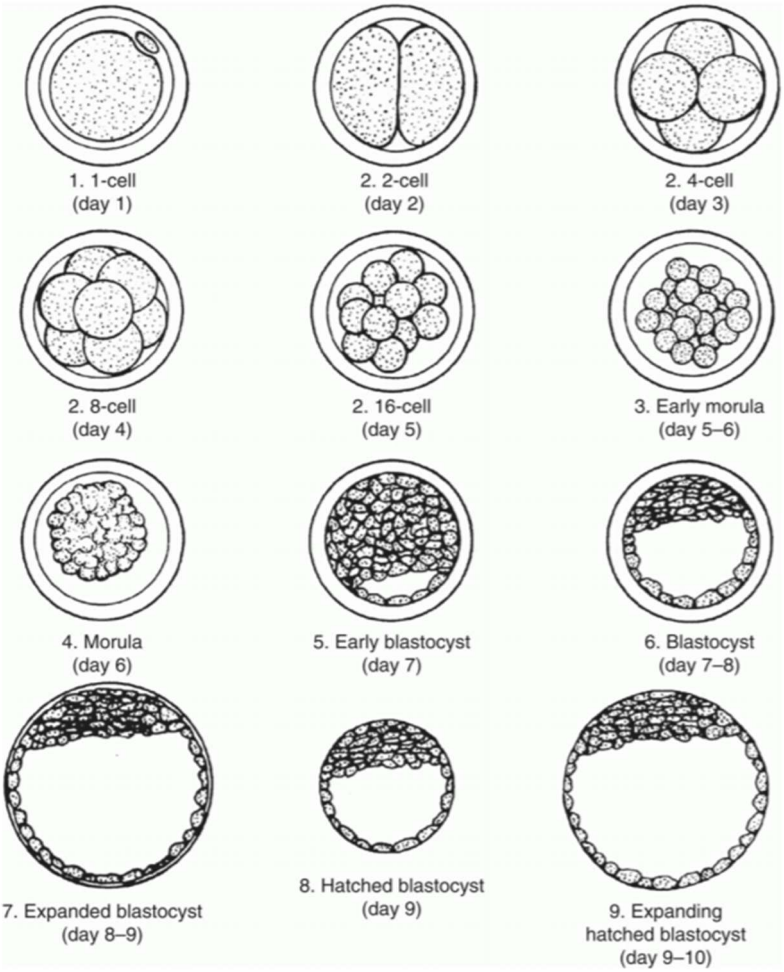
Hodnocení embryí skotu se zpravidla provádí pod strereomikroskopem. Je nutné, aby bylo možné embrya a zonu pellucidu prohlédnout z různých stran. Svým vývojem by embrya měla odpovídat fázi, která by měla být přítomna v den výplachu. Nejčastěji se výplach provádí 7. den po inseminaci, embrya by tedy správně měla být ve stádiu kompaktních morul nebo blastocyst (Říha 1990).

Embrya lze hodnotit podle vývojového stádia následovně:

1. Zygota po oplození – oplozené vajíčko první den po oplození. Je charakteristická jednou buňkou s vyloučeným pólovým tělískem v ampuli vejcovodu s neporušenou zonou pelucida.
2. 2-16 buněk – druhý až čtvrtý den po oplození, v ampuli vejcovodu.

3. Časná morula – čtvrtý až pátý den, útvar o 16-32 buňkách s patrnými jednotlivými blastomerami. Blastomery jsou od sebe zřetelně odděleny a zabírají většinu prostoru zony pellucida.
4. Kompaktní morula – šestý den, jednotlivé blastomery splynuly, tvoří kompaktní hmotu. Toto stádium je již vhodné pro přenos.
5. Raná (včasná) blastocysta – sedmý den, embryo má vytvořenou dutinu nebo blastocel naplněný kapalinou. Vhodné pro přenos.
6. Blastocysta – sedmý až osmý den, je pozorovatelná výrazná diferenciace vnější vrstvy trofoblastu do kompaktnější masy buněk. Vhodné pro přenos.
7. Rozšířená (expandovaná) blastocysta – osmý až devátý den, perivitelní prostor se ztrácí, celkový průměr embrya se zvyšuje a zona pellucida se ztenčuje.
8. Vylíhlá (volná) blastocysta – devátý den, embryo vystupuje ze zony pellucida a zůstává volně, zřetelný trofoblast, ve kterém je uzavřený embryoblast.

Obrázek 3: Vývojová stádia embrya



Zdroj: Jahnke et al. (2010)

Dle morfologických kritérií se embrya rozdělují do čtyř tříd. Hodnotí se pravidelnost tvaru, průměr, barva, struktura a pravidelnost zony pellucidy, popř. přítomnost nežádoucích fragmentů. Třídy jsou následující:

1. Vynikající embryo
2. Dobré embryo
3. Slabé embryo
4. Degenerované embryo (Gordon 2003).

Po ohodnocení jsou embrya nasáta do pejet o objemu 0,25 ml a buď se ihned v čerstvém stavu přenášejí nebo jsou kryokonzervována (Peters & Ball 1995).

3.4.3.5 Selekce a příprava příjemkyň

Výběr příjemkyň (recipientek) je jedním z limitujících faktorů, které rozhodují o úspěšnosti přenosu (Říha et al. 1999). Jako příjemkyně jsou většinou vybírány jalovice, jelikož zpravidla snadněji zabřezávají. Vhodnými příjemkyněmi jsou jalovice, které pravidelně cyklují, nebyly v minulosti inseminovány, jsou pohlavně dospělé a ve vhodné kondici. Nevhodnými příjemkyněmi jsou plemenice, které po opakované inseminaci nezůstaly březí (Selk 2002). Zvolíme-li jako recipientku krávu, měla by být minimálně 45 dnů po otelení. Výhodou využívání krav je, že známe jejich reprodukční historii (Robertson 2015). Poměr dárkyň a příjemkyň by měl být 1:5-7 (Strapák & Tančin 2013).

Nejdůležitějším faktorem přípravy recipientek je synchronizace říjového cyklu dárkyň s cykly příjemkyň (Gordon 2003). Synchronizaci říjového cyklu je nutno zahájit tak, aby při výplachu dárkyně byla příjemkyně ve stejné fázi cyklu jako dárkyně (Peters & Ball, 1995). Přípustná asynchronnost je +- 1 den (Gordon 2003).

Říje u recipientek před přenosem může být buď spontánní, nebo indukovaná Prostaglandinem. Ošetření Prostaglandinem F2α se provádí buď 7.-17. den po zjištěné říji, nebo při rektálním/sonografickém zjištění přítomnosti žlutého tělíska na vaječníku (Stádník et al. 2013).

Příprava příjemkyně na vlastní embryotransfer spočívá v její fixaci a očištění a desinfekci vnějších pohlavních orgánů. Ke znecitlivění rekta a genitálií se provádí epidurální anestezie, nejčastěji 2% prokainem v množství cca 5 ml (Vinkler 2009). Nezbytným krokem je rektální palpace vaječníků za účelem zjištění strany, ve které probíhá ovulace (Hasler et al. 1995).

3.4.3.6 Přenos embryí

Přenos embryí se provádí pomocí speciální embryotransfer zbraně, která se přes rektálně fixovaný děložní krček zavádí přímo do děložního rohu tak, aby nedošlo k poškození krčku a endometria (Strapák & Tančin 2013). K deponaci embrya vybíráme vždy ten děložní roh, na jehož straně se na ováriu vyskytuje žluté tělísko (Peters & Ball 1995). Úspěšnost embryotransferu je závislá nejen na kvalitě přenášeného embrya, ale i na co nejmenší traumatizaci děložního krčku a endometria délkou celého procesu (Strapák & Tančin 2013).

Při přenosu je děloha náchylná k infekci, proto by uchovávací médium mělo obsahovat malé množství antibiotik a veškerá technika musí být sterilní. Přenos by měl provádět zkušený technik, který se ujistí, že embryo nebylo aparaturou zpětně vtaženo (Říha et al. 1999).

Přenos kryokonzervovaných embryí je obdobný jako u čerstvých, s vyjímkou toho, že rozmrazená embrya musí být přenesena okamžitě, kdežto čerstvá klidně až za 6-8 hodin. Rozmrazování se provádí pomocí vody, vzduchu nebo jejich kombinací (Robertson 2015). Rychlost rozmražení by se měla shodovat s rychlostí zmražení (Peters & Ball 1995).

Vyšetření březosti se provádí palpací okolo 42. dne po embryotransferu, nebo sonograficky (Říha et al. 1999).

4 Materiál a metodika

Následující kapitola obsahuje informace o vykonaném experimentu. Sledovány byly faktory ovlivňující efektivitu embryotransferu u holštýnských dojnic na školním statku Ruda. V této kapitole popíšu podnik, průběh získávání dat, metodiku a vyhodnocení pokusu.

4.1 Charakteristika podniku

Jedním ze středisek Školního zemědělského podniku Lány České zemědělské univerzity v Praze je farma Ruda. Středisko Ruda se nachází v suché, mírně teplé bramborářské oblasti v obci Ruda (okres Rakovník) ve středočeském kraji. Farma se specializuje na chov holštýnských dojnic a na odchov telat do věku tří týdnů. Podnik byl založen již v šedesátých letech minulého století a v roce 2015 prošel rozsáhlou rekonstrukcí. V dnešní době se jedná o jednu z nejmodernějších farem pro chov dojnic v ČR. Farma disponuje ustajovacími prostory pro 440 kusů dojnic.

Dojnice jsou ustájeny v halách s volným boxovým systémem ustájení, které je vhodně doplněno krytým venkovním krmištěm. Postýlky jsou stlány separátem. Uspořádání hal je do půlkruhu s vnitřní naháněcí uličkou, která je využívána pro průchod dojnic do dojírny. Podle užitkovosti a fáze reprodukce jsou dojnice rozděleny do několika skupin (po cca 100 kusech) a ustájeny právě po těchto skupinách. Dojení v podniku probíhá 3x denně.

Krmivo je dojnicím předkládáno 2x denně tak, aby po příchodu z ranního a večerního dojení měly přístup rovnou k němu, během dne je pak pravidelně přihrnováno. Ke krmení je využíván míchací krmný vůz s bočním řetězovým dopravníkem. Složení krmné dávky je odlišné pro každou skupinu dojnic, kdy závisí na výši mléčné užitkovosti a fázi reprodukce.

V současnosti (KU 2017/2018) je na farmě chováno 395 dojnic základního stáda, jejichž průměrná užitkovost dosahuje 9708 kg mléka na laktaci při 3,99 % tuku a 3,51 % bílkovin v mléce.

4.2 Metodika

Experiment, při němž byla sledována výtěžnost embryí proběhl na farmě Ruda v šesti různých turnusech, a to v období od března do listopadu. Do pokusu bylo zařazeno celkem 54 krav holštýnského plemene ve věku 1,4 až 7,8 let. Výplachy embryí probíhaly v průměru 142. den laktace, vybrané dárkyně byly na 1. – 5. laktaci (průměrné pořadí laktace 2,1) a jejich tělesná kondice kolísala od 2 do 5 BCS (průměr 2,84 BCS). Průměrná užitkovost sledovaných krav se pohybovala okolo 9 160 kg mléka na laktaci. Některé z krav byly do pokusu zařazeny dvakrát, v součtu proběhlo 59 výplachů embryí.

4.2.1 Superovulační ošetření donorek

Všechna vybraná zvířata byla před zahájením přípravy na embryotransfer sonograficky vyšetřena a v případě nálezu CL byla zařazena do schématu hormonálního ošetření. V případě

pozitivního nálezu a zařazení do pokusu byla u těchto plemenic nejprve injekčním podáním analogu PGF2α – Oestrophanu (Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, CZE) v dávce 0,5 μg PGF2α provedena synchronizace říje (0. den).

Následně byla 3. den provedena kontrola vývoje CL a všechny dárkyně, které se nacházely v 13. až 16. dni pohlavního cyklu byly superovulovány aplikací preparátu FSH - Pluset® (Laboratorios Callier, Barcelona, ESP) a to podáváním vždy ráno a večer po dobu čtyř dnů, přičemž dávka se postupně snižuje a 4. den aplikace probíhá už pouze ráno. 15. den od zahájení superovulačního ošetření byl za účelem detekce říje znovu podán Oestrophan (Stádník et al. 2013).

4.2.2 Inseminace a reinseminace

Příznaky říje všech donorek se projevily 16. až 17. den od začátku experimentu. 12 hodin po zjištění říjí se všechny dárkyně inseminovaly předem rozmraženou inseminační dávkou. Následně u každé ošetřené krávy proběhly tři reinseminace v intervalu 12 hodin. K reinseminaci každé dárkyně byla vždy použita dávka od stejného býka, vyrobená ve stejné šarži jako při první inseminaci. Rovněž samotné inseminace a reinseminace prováděl vždy stejný technik (Stádník et al. 2013).

4.2.3 Získávání embryí

Výplach kraniální části děložních rohů za účelem zisku embryí byl proveden 7. den od první inseminace. K výplachu jednoho rohu bylo použito 300 ml klasického výplachového média doplněného o Krebs-Ringer fosfát s 1 % inaktivovaného bovinního séra (Bioniche, Ontario, CAN).

Vypláchnutá vajíčka a embrya byla izolována a přenesena do kultivačního média pufrovaného fosfátem (PBS) s přídavkem 20% fetálního telecího séra (FCS, Gibco BRL, USA).

Získaná embrya byla následně za použití stereomikroskopu morfologicky hodnocena. Hodnocena byla také výtěžnost embryí, tedy jejich počet, přenosuschopnost a životaschopnost. Embrya vypláchnuta ve stádiu kompaktní moruly, časné blastocysty a blastocysty byla označena za vhodná k přenosu, naopak degenerovaná embrya a neoplodněná vajíčka jsou k přenosu nevhodná.

Tabulka 10: Schéma provedených ošetření dárkyň

Den od začátku pokusu	Ošetření	
	Ráno	Večer
0.	Sonografické vyšetření na přítomnost CL, aplikace Oestrophanu	
3.	Kontrola vývoje CL	
12.	Kontrola vývoje CL	
13.	Aplikace 3 ampulí Pluset®	Aplikace 3 ampulí Pluset®
14.	Aplikace 2 ampulí Pluset®	Aplikace 2 ampulí Pluset®
15.	Aplikace 1 ampule Pluset®	Aplikace 1 ampule Pluset®
16.	Aplikace 1 ampule Pluset®	
17.	Inseminace	Reinseminace
18.	Reinseminace	Reinseminace
24.	Výplach embryí	

4.2.4 Hodnocení tělesné kondice dárkyň

Tělesná kondice dárkyň byla zootechnikem chovu hodnocena s přesností na 0,25 bodu dle metodiky hodnocení BCS pro holštýnské dojnice. Hodnocení proběhlo před počátkem experimentu. Aritmetickým průměrem bylo zjištěno, že průměrná kondice dárkyň byla 2,84 BCS, přičemž rozložení bylo následovné:

Tabulka 11: Přehled tělesné kondice vybraných dárkyň

BCS	Počet dárkyň	% zastoupení
2-2,75	35	59,32
3-3,75	18	30,51
4-5	6	10,17

Z tabulky 11 vyplývá, že nejvyšší zastoupení (59,32 %) měly ve skupině dárkyně s tělesnou kondicí do 2,75 BCS, druhou největší skupinou (30,51 %) byly plemenice s kondicí 3 až 3,75 BCS. Nejnižší počet dárkyň (10,17 %) byl v kondici 4-5 BCS.

4.2.5 Hodnocení pořadí laktace

Sledované plemenice vybrané do přípravy na embryotransfer byly na 1. až 5. laktaci, přičemž průměrné pořadí laktace bylo aritmetickým průměrem stanoveno na 2,1.

Z tabulky 12 vyplývá, že největší zastoupení (45,76 %) měly v souboru prvotelky, kterých bylo celkem 25, druhou největší skupinu (33,90 %) tvořily krávy na 3. a vyšší laktaci, bylo jich 18 a nejmenší zastoupení (20,34 %) měly plemenice na 2. laktaci, kterých bylo 11.

Tabulka 12: Přehled pořadí laktace vybraných dárkyň

Pořadí laktace	Počet dárkyň	% zastoupení
1.	27	45,76
2.	12	20,34
3. a vyšší	20	33,90

4.2.6 Hodnocení nádoje a mléčných složek

Hodnocení denního nádoje bylo u dárkyň provedeno vždy 30 dní před odběrem embryí. Aritmetický průměr denního nádoje dárkyň činil 28,24 kg mléka.

Z tabulky 13 vyplývá, že 18 dárkyň (30 %) 30 dní před výplachem embryí dosahovalo denního nádoje do 23,41 kg mléka. Nejpočetnější skupinu (43,33 %) tvořily krávy s nádojem v rozmezí 23,42 až 33,06 kg mléka a nejméně početkou skupinou (26,67 %) byly ty dojnice, které v kontrolní den dosáhly denního nádoje nad 33,06 kg mléka.

Tabulka 13: Denní nádoj dárkyň 30 dní před výplachem

Rozpětí hodnot [kg]	Počet dárkyň	% zastoupení
do 23,41	18	30 %
23,42-33,06	26	43,33 %
nad 33,07	16	26,67 %

V tabulce 14 je znázorněna kontrola mléčné užitkovosti dárkyň za 100 dní laktace. Z tabulky vyplývá, že 19 dárkyň, což odpovídá 31,67 %, za 100 dní nadojilo méně než 2881,88 kg mléka. Nejpočetnější skupinou jsou dojnice, které za sto dní dosáhly užitkovosti v rozmezí 2981,89 až 3686,15 kg mléka. Bylo jich 22, což odpovídá 36,66 % ze sledovaného výběru. 19 dojnic (31,67 %) nadojilo v tomto časovém úseku více než 3686,16 kg mléka.

Tabulka 14: KU 100 vybraných dárkyň

Rozpětí hodnot [kg]	Počet dárkyň	% zastoupení
do 2981,88	19	31,67 %
2981,89-3686,15	22	36,66 %
nad 3686,16	19	31,67 %

Odběr vzorků na analýzu obsahu mléčných složek se uskutečňoval průběžně každých 14 dní. Pro tento experiment jsem k hodnocení vybrala tři odběry vzorků mléka, a to 25 a 11 dní před výplachem a následně 3 dny po výplachu embryí. Průměrný obsah tuku v mléce byl ze vzorků všech tří pokusných dní stanoven na 3,51 %, obsah bílkovin na 3,39 %. Ukazatelem aktuální energetické bilance dárkyň je FPR (fat-to-protein ratio) - poměr tuku a bílkovin v mléce.

Tabulka 15 znázorňuje rozdělení dárkyň do skupin podle FPR – poměru tuku a bílkovin v 1. vzorku mléka, který byl odebrán 25 dní před výplachem embryí. Největší skupinu (50 %) tvoří dojnice s FPR v rozmezí 1,04 až 1,34. Nejnižší poměr tuku a bílkovin, a to do hodnoty

1,03 mělo 30,36 % dárkyň. Naopak nejvyššího poměru čili nad hodnotu 1,35 dosáhlo 19,64 % krav.

Průměrný poměr tuku a bílkovin v mléce v 1. vzorku vybrané skupiny dojnic byl 1,19.

Tabulka 15: FPR v 1. vzorku (25 dní před odběrem)

Rozpětí hodnot	Počet dárkyň*	% zastoupení
do 1,03	17	30,36 %
1,04-1,34	28	50 %
nad 1,35	11	19,64 %

*FPR 1. vzorku byl hodnocen u 56 dárkyň, 3 měly mastitidu.

Z tabulky 16 vyplývá, že 11 dní před výplachem embyrí 23 dárkyň (38,98 %) dosahovalo nejnižších hodnot poměru mléčného tuku a bílkovin, a to do hodnoty 1,05. Stejný počet dárkyň (38,98 %) pak dosáhlo hodnot v rozmezí 1,06-1,36 a nejvyšší poměr sledovaných složek byl pozorován u 13 dárkyň (22,04 %), a to nad hodnotu 1,37.

Průměrná hodnota poměru tuku a bílkovin v mléce ve 2. vzorku vybrané skupiny dojnic byla 1,21.

Tabulka 16: FPR v 2. vzorku (11 dní před výplachem)

Rozpětí hodnot	Počet dárkyň	% zastoupení
do 1,05	23	38,98 %
1,06-1,36	23	38,98 %
nad 1,37	13	22,04 %

Tabulka 17 vypovídá o tom, že nejnižších hodnot poměru tuku a bílkovin ve třetím vzorku, tedy 3 dny po výplachu embryí, dosahovalo 18 dárkyň (31,03 %). Druhou a nejpočetnější skupinou byly krávy, které vykázaly hodnoty v rozpětí 0,96 až 1,17. Těch bylo 25, což odpovídá 43,11 %. Poslední skupinu tvořilo 15 dojnic (25,86 %), které dosáhly nadprůměrných výsledků, a to hodnot nad 1,18.

Průměr poměru tuku a bílkovin v mléce ve 3. vzorku byl u vybrané skupiny dojnic 1,07.

Tabulka 17: FPR v 3. vzorku (3 dny po výplachu)

Rozpětí hodnot	Počet dárkyň*	% zastoupení
do 0,95	18	31,03 %
0,96-1,17	25	43,11 %
nad 1,18	15	25,86 %

*FPR 3. vzorku byl hodnocen u 58 dárkyň, 1 byla vyřazena.

Průměrná hodnota poměru tuku a bílkovin ze všech vzorků dohromady byla 1,16.

4.3 Statistické metody

Pro vyhodnocení výsledků byl použit program SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011). Pro stanovení základních parametrů souborů byla využita procedura UNIVARIATE. Pro stanovení vzájemných korelací byla využita procedura CORR. Pro vlastní vyhodnocení bylo uvažováno, že všechny proměnné mají normální rozdělení. Pro vlastní vyhodnocení efektů byla použita procedura GLM, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu.

Výsledky jsou průkazné, pokud je hodnota $P < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Základní statistiky sledovaných faktorů

Tabulka 18: Základní statistiky sledovaných faktorů

proměnná	n	x̄	s	min.	max.	s.e.	V(%)
Poř. laktace	59	2,12	1,29	1	5	0,17	60,78
TK	59	2,84	0,67	2	5	0,09	23,51
Nádoj	59	28,24	9,75	1,4	48,3	1,27	34,51
KU100	59	3323,32	705,39	1914	4891	91,83	21,23
FPR1	56	1,19	0,32	0,71	2,53	0,04	26,85
FPR2	59	1,21	0,32	0,77	2,25	0,04	26,52
FPR3	58	1,07	0,23	0,59	1,82	0,03	21,41
Vypláchnutá embrya	59	3,95	4,35	0	24	0,57	110,12
Přenosuschopná embrya	59	2,78	2,75	0	10	0,36	98,88

n… počet měření; x̄… aritmetický průměr; s… směrodatná odchylka; min.… minimální hodnota; max.… maximální hodnota; s.e.… střední chyba aritmetického průměru; V (%)… variační koeficient

5.2 Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí

Množství a kvalita získaných embryí v závislosti na tělesné kondici dárkyň je uvedena v tabulce 19, tabulce 20 a znázorněna v grafu 1.

Sledované dárkyně byly podle tělesné kondice rozděleny do tří skupin. 1. skupinu tvořily dárkyně o BCS 2 až 2,75. 2. skupinu zvířata o tělesné kondici 3 až 3,75 BCS a poslední skupinu pak dojnice o hodnotě tělesné kondice 4 až 5. Nejvyššího průměrného zisku embryí (5,3) dosáhla skupina dojnic s kondicí 3 až 3,75 bodů, přičemž přenosuschopných bylo v průměru 2,5 na dárkyni. Naopak nejnižších průměrných výsledků bylo dosaženo u dárkyň s nadměrnou kondicí, tedy u 3. skupiny, kde zisk přenosuschopných embryí dosáhl průměru pouhých 0,2 embrya na dárkyni.

Z výsledků lze určit minimální a maximální hranici tělesné kondice, která je vhodná pro embryotransfer. Dárkyně s hodnotou tělesné kondice nižší než 2,75 bodu mají zhoršenou reakci na superovulaci, což lze doložit nižším podílem vypláchnutých dojnic při současném nižším počtu získaných, potažmo přenosuschopných embyí. totéž platí pro přetučnělé dárkyně s hodnotou BCS nad 4.

Vliv tělesné kondice na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi tělesnou kondicí a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (0,068 a -0,027).

Tabulka 19: Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí

Tělesná kondice	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						x̄ vš	Vhod. př.	x̄ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina 2 – 2,75 BCS	**35**	110	139	**249**	11	40	65	10	6	**132**	**3,8**	**87**	**2,5**
2. skupina 3 – 3,75 BCS	**18**	80	76	**156**	8	27	46	9	6	**96**	**5,3**	**62**	**3,5**
3. skupina 4 – 5 BCS	**6**	26	23	**49**	0	2	8	1	2	**13**	**2,2**	**1**	**0,2**

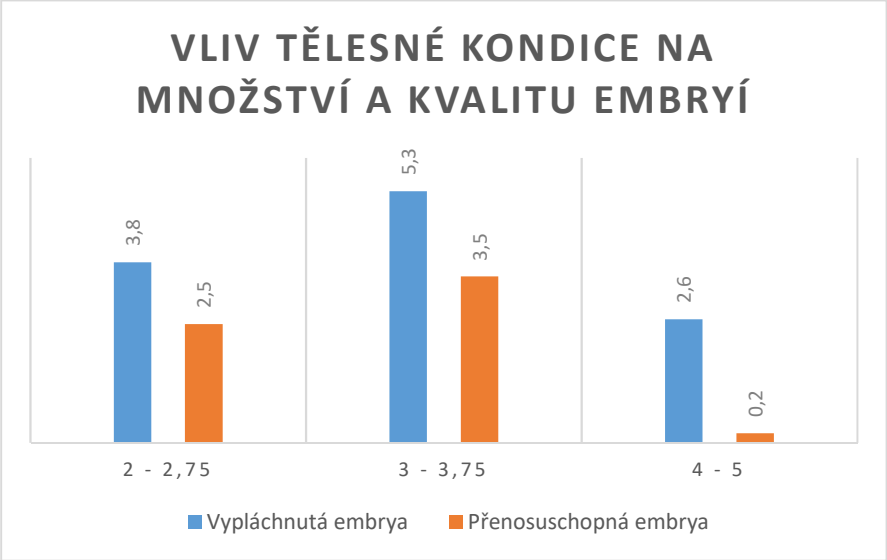
n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; x̄ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; x̄ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Tabulka 20: Základní statistiky dle tělesné kondice

TK	proměnná	n	x̄	s	min.	max.	s.e.	V(%)
2	**Vypláchnutá embrya**	3	2,67	2,52	0	5	1,45	94,37
	Přenosuschopná	3	2	1,73	0	3	1	86,60
2,25	**Vypláchnutá embrya**	15	3,13	3,25	0	10	0,84	103,67
	Přenosuschopná	15	2,67	3,04	0	10	0,78	113,98
2,5	**Vypláchnutá embrya**	10	4,90	7,05	0	24	2,23	143,81
	Přenosuschopná	10	2,30	2,91	0	10	0,92	126,43
2,75	**Vypláchnutá embrya**	7	3,14	3,13	0	9	1,18	99,66
	Přenosuschopná	7	3	3,16	0	9	1,20	105,41
3	**Vypláchnutá embrya**	8	4,38	3,81	0	11	1,35	87,20
	Přenosuschopná	8	3,50	2,56	0	7	0,91	73,24
3,25	**Vypláchnutá embrya**	7	5	4,86	1	15	1,84	97,30
	Přenosuschopná	7	2,86	2,73	0	7	1,03	95,70
3,5	**Vypláchnutá embrya**	2	10	5,66	6	14	4	56,57
	Přenosuschopná	2	6,5	0,71	6	7	0,5	10,88
3,75	**Vypláchnutá embrya**	1	4	.	4	4	.	.
	Přenosuschopná	1	4	.	4	4	.	.
4	**Vypláchnutá embrya**	3	3,67	2,08	2	6	1,20	56,77
	Přenosuschopná	3	3	2,65	1	6	1,53	88,19
4,5	**Vypláchnutá embrya**	2	1	1,41	0	2	1	141,42
	Přenosuschopná	2	0	0	0	0	0	.
5	**Vypláchnutá embrya**	1	0	.	0	0	.	.
	Přenosuschopná	1	0	.	0	0	.	.

n... počet měření; x̄... aritmetický průměr; s… směrodatná odchylka; min.… minimální hodnota; max.…maximální hodnota; s.e.... střední chyba aritmetického průměru; V (%)… koeficient variance

Graf 1: Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí



5.3 Vliv mléčné užitkovosti na množství a kvalitu embryí

Množství a kvalita získaných embryí v závislosti na mléčné užitkovosti z hlediska sledování kontroly užitkovosti za 100 dní laktace je uvedena v tabulce 21 a znázorněna v grafu 2.

Nejvyšší celkové množství vypláchnutých a získaných embryí vhodných k přenosu byly pozorovány u dárkyň s hodnotami KU100 v rozmezí 2981,89 až 3686,15 kg mléka. Tyto dojnice vyprodukovaly každá v průměru 5,2 embrya na výplach, z toho 3,5 přenosuschopných. Nejnižší hodnoty byly pozorovány u skupiny dojnic s nejvyššími hodnotami mléčné užitkovosti, a to nad 3686,16 kg mléka. Od těchto dojnic jsme v průměru získali 3,2 embrya, z toho pouze 2 životaschopná. Rovněž u dojnic s podprůměrnou dojivostí (pod 2981,88 kg) byly zjištěny nižší počty vypláchnutých i životaschopných (resp. přenosuschopných) embryí.

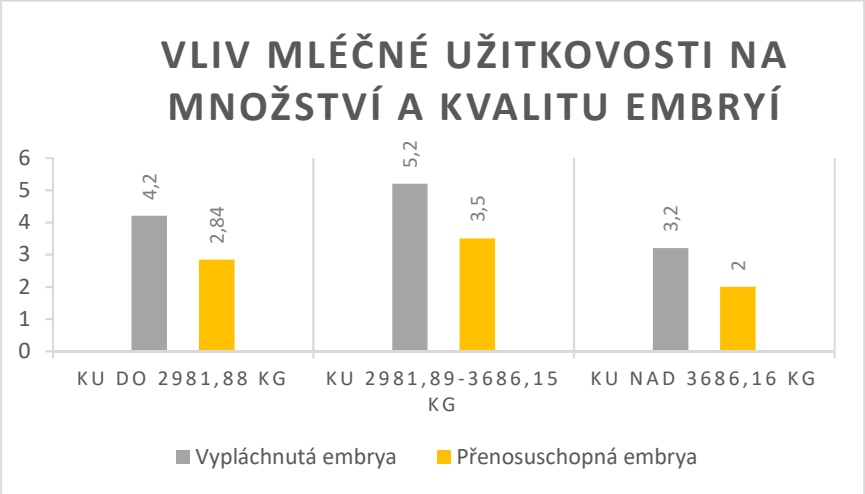
Vliv KU za 100 dní laktace na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi užitkovostí za prvních 100 dní laktace a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (-0,047 a -0,12).

Tabulka 21: Vliv mléčné užitkovosti (KU100) na množství a kvalitu embryí

Užitkovost KU100	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						$\bar{x}$ vš	Vhod. př.	$\bar{x}$ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina do 2981,88 kg	**19**	85	87	**172**	6	24	36	10	5	**81**	**4,2**	**54**	**2,8**
2. skupina 2981,89-3686,15 kg	**22**	89	70	**159**	12	28	54	10	11	**115**	**5,2**	**77**	**3,5**
3. skupina nad 3686,16 kg	**19**	60	53	**113**	6	14	34	5	4	**61**	**3,2**	**38**	**2**

KU100 = kontola užitkovosti za 100 dní laktace; n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; x̄ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; x̄ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Graf 2: Vliv mléčné užitkovosti na množství a kvalitu embryí



Z tabulky 22 a grafu 3 vyplývá, že nejvyšší počet vypláchnutých i přenosuschopných embryí bylo získáno od dojnic s nejnižším denním nádojem (do 23,41 kg mléka) den před výplachem. Zároveň nejnižší výtěžnosti embryí bylo dosaženo u dojnic s nadprůměrným nádojem v ten samý den.

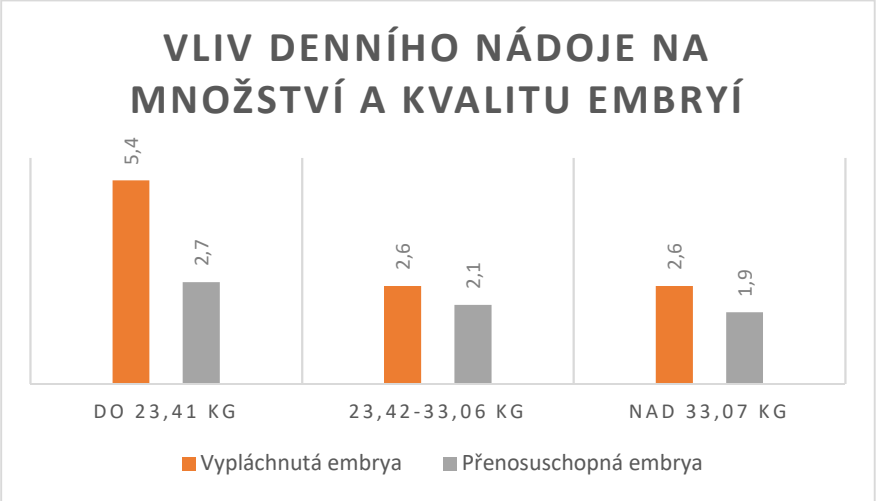
Vliv nádoje (30 dní před výplachem) na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi denním nádojem a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (-0,030 a -0,127).

Tabulka 22: Vliv denního nádoje na množství a kvalitu embryí

Denní nádoj den před výplachem	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						x̄ vš	Vhod. př.	x̄ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina do 23,41 kg	**18**	96	89	**185**	4	31	44	14	4	**97**	**5,4**	**49**	**2,7**
2. skupina 23,42-33,06 kg	**26**	91	87	**178**	7	14	38	1	8	**68**	**2,6**	**54**	**2,1**
3. skupina nad 33,07 kg	**16**	35	27	**62**	5	11	22	4	1	**43**	**2,6**	**31**	**1,9**

n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; x̄ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; x̄ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Graf 3: Vliv denního nádoje na množství a kvalitu embryí



5.4 Vliv poměru tuku a bílkovin v mléce na množství a kvalitu embryí

1. vzorek

Hodnoty poměru tuku a bílkovin 1. vzorku (25 dní před výplachem) znázorňuje tabulka 23 a graf 4. Z tabulky 21 a grafu 4 je patrné, že nejvyššího průměrného počtu získaných (5,5) i přenosuschopných (3,8) embryí dosahovaly krávy, jejichž poměr mléčného tuku a bílkovin v prvním vzorku (tzn. 25 dní před výplachem) byl nejnižší, tedy do hodnoty 1,03. Naopak nejnižší efektivita byla zjištěna u krav s nejvyšším poměrem tuku a bílkovin, a to nad hodnotu 1,34.

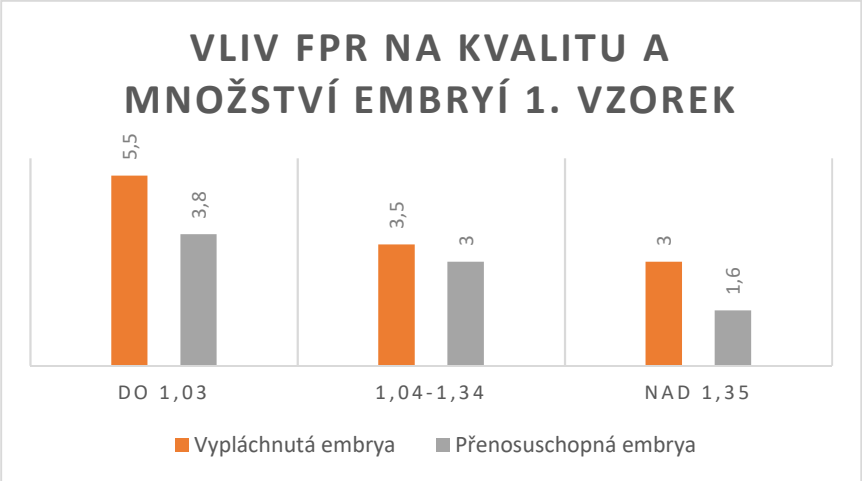
Vliv FPR1 na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi poměrem mléčného tuku a bílkovin v prvním vzorku a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (-0,055 a -0,120).

Tabulka 23: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 1. vzorku na množství a kvalitu embryí

FPR	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						$\bar{x}$ vš	Vhod. př.	$\bar{x}$ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina do 1,03	**17**	76	61	**137**	7	29	46	8	4	**94**	**5,5**	**64**	**3,8**
2. skupina 1,04 – 1,34	**28**	116	104	**220**	6	26	48	10	9	**99**	**3,5**	**83**	**3,0**
3. skupina nad 1,34	**11**	42	36	**78**	5	10	15	3	1	**33**	**3,0**	**18**	**1,6**

FPR = fat/protein ratio (poměr tuku a bílkovin v mléce); n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; $\bar{x}$ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; $\bar{x}$ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Graf 4: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 1. vzorku na množství a kvalitu embryí



2. vzorek

Vzorek č. 2, odebraný 11 dní před výplachem embryí, dopadl téměř podobně jako vzorek č. 1. Z tabulky 24 a grafu 5 vyplývá, že nejvyššího počtu jak získaných, tak přenosuschopných embryí bylo získáno od krav s poměrem tuku a bílkovin do hodnoty 1,03. Jednalo se konkrétně o průměrný zisk 5 embryí na plemenici, z čehož 3,5 bylo schopných embryotransferu. Od krav s FPR v rozmezí od 1,04 do 1,34 bylo získáno průměrně 3,7 embrya na kus (2,6 vhodných k přenosu). Nejnižší úspěšnosti dosáhly krávy s poměrem vyšším než 1,34, od kterých jsme průměrně získali pouze 3,1 embrya na výplach, z čehož jen 1,9 bylo schopných přenosu.

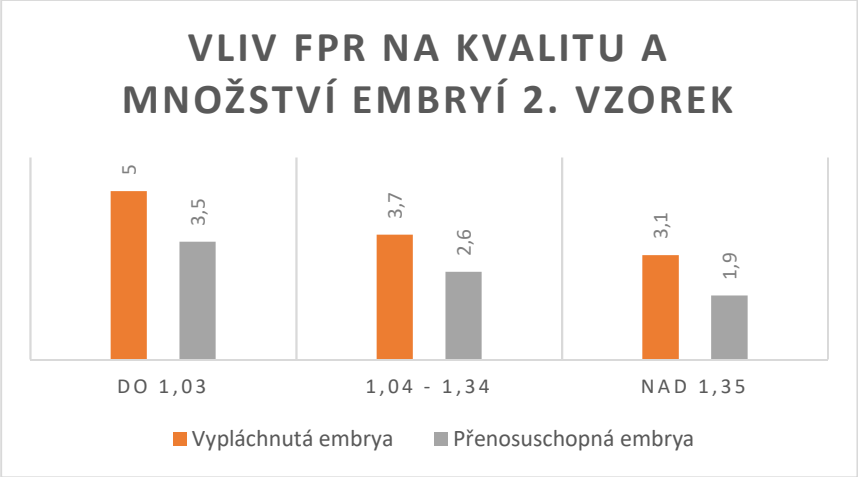
Vliv FPR2 na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi poměrem mléčného tuku a bílkovin ve druhém vzorku a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (0,01 a -0,027).

Tabulka 24: Vliv poměru tuku a bílkovin 2. vzorku na množství a kvalitu embryí

FPR	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						$\bar{x}$ vš	Vhod. př.	$\bar{x}$ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina do 1,03	**23**	101	79	**180**	5	36	54	12	8	**115**	**5,0**	**81**	**3,5**
2. skupina 1,04 – 1,34	**23**	80	84	**164**	8	23	47	5	1	**84**	**3,7**	**59**	**2,6**
3. skupina nad 1,34	**13**	56	56	**112**	6	10	17	3	4	**40**	**3,1**	**25**	**1,9**

FPR = fat/protein ratio (poměr tuku a bílkovin v mléce); n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; $\bar{x}$ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; $\bar{x}$ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Graf 5: Vliv poměru tuku a bílkovin 2. vzorku na množství a kvalitu embryí



3. vzorek

Ani ve vzorku odebraném 3 dny po výplachu embryí se nezměnilo pořadí úspěšnosti jednotlivých skupin. Tabulka 25 a graf 6 znázorňují, že rozdíly v množství a kvalitě získaných embryí už ale nebyly tak markantní. Nejvíce embryí bylo získáno opět od skupiny s hodnotami FPR do 1,03, a to 4 embrya na plemenici (3,2 přenosuschopná). Od krav ze skupiny s hodnotou poměru v rozmezí od 1,04 do 1,34 byla taktéž získána průměrně 4 embrya na plemenici, nicméně pouze 2,7 jich bylo schopných embryotransferu. Od plemenic z poslední skupiny (hodnota FPR nad 1,34) bylo vypláchnuto průměrně 3,8 embrya na kus, z toho 2,7 schopných transferu.

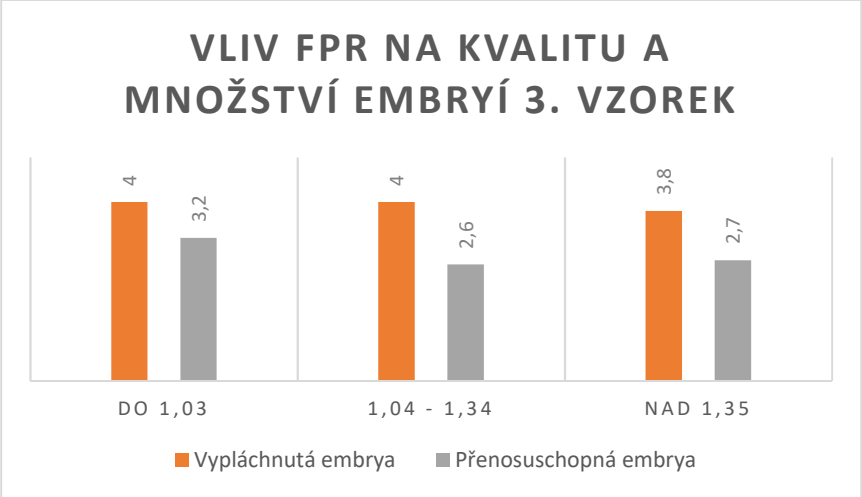
Vliv FPR3 na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi poměrem mléčného tuku a bílkovin ve třetím vzorku a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (0,003 a -0,093).

Tabulka 25: Vliv poměru tuku a bílkovin 3. vzorku na množství a kvalitu embryí

FPR	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						$\bar{x}$ vš	Vhod. př.	$\bar{x}$ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. skupina do 1,03	**18**	78	60	**138**	4	17	39	5	8	**73**	**4,0**	**59**	**3,2**
2. skupina 1,04 – 1,34	**25**	95	89	**184**	7	29	50	10	5	**101**	**4,0**	**65**	**2,7**
3. skupina nad 1,34	**15**	56	62	**118**	7	20	26	4	0	**57**	**3,8**	**41**	**2,7**

FPR = fat/protein ratio (poměr tuku a bílkovin v mléce); n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; $\bar{x}$ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; $\bar{x}$ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Graf 6: Vliv poměru tuku a bílkovin 3. vzorku na množství a kvalitu embryí



5.5 Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí

V tabulce 26, tabulce 27 a grafu 7 je znázorněn vliv pořadí laktace na množství získaných a přenosuschopných embryí. Z pozorování je patrné, že nejvyššího počtu získaných i přenosuschopných embryí bylo dosáhnuto u krav na druhé laktaci, u kterých bylo v průměru vypláchnuto 4,1 embyrí na plemenici, z toho přenosuschopných bylo 3,8 na plemenici. U krav na 1. laktaci bylo získáno průměrně 2,9 embrya na jedince, u krav na 3. a vyšší laktaci pak 4 embrya na jedince. Reakce na superovulaci u krav na 1. a na 3. a vyšší laktaci byla téměř stejná, stejně tak i počet embryí vhodných k přenosu.

Vliv pořadí laktace na množství ani kvalitu získaných embryí nebyl prokázán jako statisticky významný (P> 0,05), korelace mezi pořadím laktace a množstvím a kvalitou získaných embryí byla slabá (0,174 a 0,071).

Tabulka 26: Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí

Pořadí laktace	n	Superov. reakce (CL)			Zisk a vývojová stádia embryí						$\bar{x}$ vš	Vhod. př.	$\bar{x}$ vh
		Pv	Lv	∑	N	Fr	Mo	Vč Bl	Bl	∑			
1. laktace	**27**	95	82	**177**	9	18	39	10	1	**77**	**2,9**	**69**	**2,6**
2. laktace	**12**	48	40	**88**	1	6	26	4	12	**49**	**4,1**	**45**	**3,8**
3. a vyšší laktace	**20**	66	63	**129**	4	31	38	6	0	**79**	**4**	**47**	**2,4**

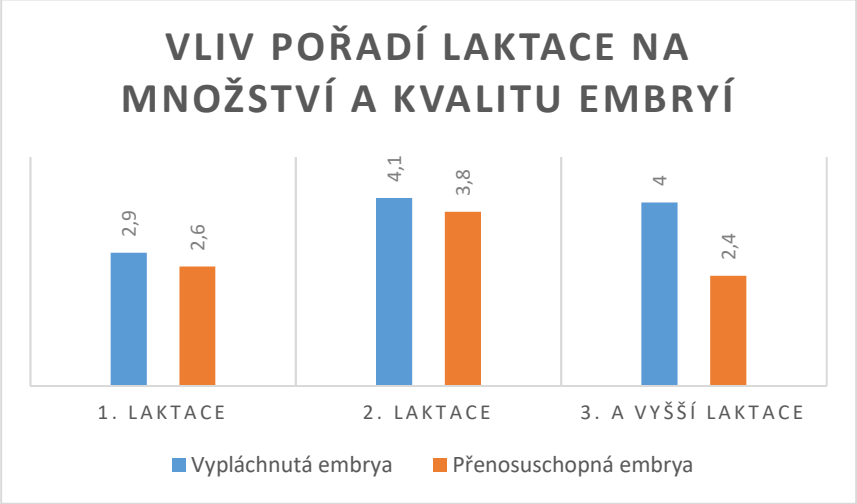
n = počet dárkyň; Pv = pravý vaječník; Lv = levý vaječník; N = nevyvinuté embryo; Fr = fragmentované embryo; Mo = morula; VčBl = včasná blastocysta; Bl = blastocysta; $\bar{x}$ vš = průměr všech získaných embryí na jednu dárkyni; Vhod. Př. = počet embryí vhodných k přenosu; $\bar{x}$ vh = průměr embryí vhodných k přenosu na jednu dárkyni.

Tabulka 27: Základní statistiky dle pořadí laktace

pořadí laktace	proměnná	n	x̄	s	min.	max.	s.e.	V(%)
1	Vypláchnutá embrya	27	2,96	2,64	0	11	0,51	89,04
	Přenosuschopná	27	2,30	2,09	0	7	0,40	91,04
2	Vypláchnutá embrya	12	4,75	4,20	0	15	1,21	88,47
	Přenosuschopná	12	3,67	3,06	0	9	0,88	83,32
3	Vypláchnutá embrya	10	3,90	4,72	0	14	1,49	121,14
	Přenosuschopná	10	2,90	3,45	0	10	1,09	118,84
4	Vypláchnutá embrya	6	7,67	8,43	0	24	3,44	109,96
	Přenosuschopná	6	3,33	3,56	0	10	1,45	106,77
5	Vypláchnutá embrya	4	2,75	3,77	0	8	1,89	137,27
	Přenosuschopná	4	2,25	3,30	0	7	1,65	146,85

n… počet měření; x̄… aritmetický průměr; s… směrodatná odchylka; min.… minimální hodnota; max.…maximální hodnota; s.e.… střední chyba aritmetického průměru; V (%)… koeficient variance

Graf 7: Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí



6 Diskuze

6.1 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle tělesné kondice dárkyň

Tělesná kondice dojnic je odrazem řízení výživy, zdravotního stavu, úrovně reprodukce, dlouhověkosti a v neposlední řadě ekonomiky chovu. V posledních letech je jejímu hodnocení při výběru plemenic pro embryotransfer věnována zvýšená pozornost (Stádník et al. 2013).

Obecně platí, že aby výsledky superovulace mohly být efektivní, měly by dárkyně být ve výborné kondici, aby se jejich endokrinní mechanizmy dokázaly vypořádat s nefyziologickou situací, která při superovulaci nastává (Petelíková 2008).

V našem sledování dosáhla nejlepších výsledků skupina krav s tělesnou kondicí 3-3,75 BCS, tzn. dojnice v průměrném až lehce nadprůměrném výživovém stavu. Stejného výsledku dosáhli i Stádník a kol. 2013. Dojnice s podprůměrnou kondicí nedosahovaly tak dobrých výsledků, a to pravděpodobně proto, že tyto plemenice mají sklony k poruchám tvorby žlutého tělíska a jeho nedostatečné funkční aktivitě, což může mít za následek dokonce až neplodnost. Dárkyně s tělesnou kondicí v rozmezí 4-5 BCS, tedy zvířata v nadprůměrné až přetučnělé kondici, dosáhly nejméně uspokojivých výsledků a byl u nich prokázán vyšší výskyt cyst na vaječnících (Roche et al. 2007).

6.2 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle úrovně mléčné užitkovosti

Čím vyšší energetický výdej má dojnice na produkci mléka, tím více je negativně ovlivněna její schopnost reprodukce (Gordon 2003).

Toto tvrzení se částečně potvrdilo i v našem sledování, kde bylo podle dat z kontroly užitkovosti za 100 dnů laktace zjištěno, že nejproblémovějšími jsou dojnice vysokoužitkové, od kterých bylo dosaženo nejnižšího počtu získaných i přenosuschopných embryí. Tyto dojnice jsou velice náročné na příjem a kvalitu krmiva. Je nutné dosáhnout souladu příjmu energie, mléčné užitkovosti a tělesné kondice, jinak dochází k poruchám folikulogeneze (Chagas et al. 2007).

Dalo by se očekávat, že nejvíce embryí bude tedy získáno od dojnic s podprůměrným nádojem, ale nebylo tomu tak. Nejvíce embryí bylo získáno od dojnic, které dosáhly výsledků průměrných, což svědčí o tom, že pokud se dojnice nachází v energetické a kondiční rovnováze, může vyprodukovat více kvalitních embryí než plemenice s podprůměrným nádojem, která sice není zatížena tak vysokou produkcí, ale mohou se u ní vyskytovat zdravotní problémy.

Obdobných výsledků dosáhli ve svém pokusu i Stádník et al. (2013), kde nejvyššího počtu získaných embryí dosáhly dojnice s průměrnou hodnotou KU100 3000-4000 kg mléka.

Data z nádoje v den odběru embryí potvrdila hypotézu o tom, že čím více je dojnice zatížena produkcí, tím klesá její schopnost reprodukce. Nejvyšší reakce na superovulaci jsme se dočkali od krav s nádojem podprůměrným a nejmenší reakce od krav nadprůměrných.

6.3 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle poměru tuku a bílkovin

Zdravotní stav dojnic a účinnost krmiv lze monitorovat kotrolou mléčných složek. Poměr lze vypočítat vydělením procenta mléčného tuku procentem mléčného proteinu. Ideální poměr je u holštýnského skotu přibližně 1,27 (Priestley 2016). Při nižším či vyšším poměru tuku a bílkovin klesá schopnost reprodukce a zvyšuje se riziko onemocnění (Čejna & Chládek 2005). Klesne-li poměr pod optimální hranici, zvyšuje se riziko acidózy, stoupne-li poměr nad optimální hranici, může docházet ke ketózám, vzniku ovariálních cyst a dalším onemocněním (Priestley 2016).

Průměrný poměr mléčného tuku a bílkovin ze všech tří vzorků v našem výběru dojnic byl aritmetickým průměrem stanoven na hodnotu 1,16.

Hodnocení prvního vzoreku mléka (odebraný všem plemenicím 25 dní před výplachem embryí) prokázalo, že nejvyššího počtu získaných embryí dosáhla skupina krav s poměrem nižším, než 1,03. Nejnižší množství vypláchnutých embryí jsme získali od krav s hodnotou poměru vyšší, než 1,34.

Obdobně dopadlo hodnocení druhého vzorku (odebraného o týden později, tzn. 11 dní před výplachem), kde opět nejlepších výsledků ve výtěžnosti embryí dosáhly dojnice s nižším poměrem tuku a bílkovin, než je optimum. Stejně jako u vzorku předchozího bylo nejméně embryí získáno od krav s poměrem vyšším, než je optimum.

Hodnocení třetího vzorku (odebraného 3 dny po výplachu embryí) potvrdilo tytéž výsledky, jako dva vzorky předchozí. Největší počet embryí vyprodukovaly krávy s poměrem tuku do hodnoty 1,03, tedy pod optimální hranici. Rovněž obdobně jako u vzorků minulých i u tohoto byl nejnižší počet ebryí získán od plemenic s poměrem mléčného tuku a bílkovin vyšším, než 1,34 (nad optimum).

Předpoklad, že poměr tuku a bílkovin nižší, než 1,27 zhoršuje úroveň reprodukce a zdravotní stav dojnic tedy nebyl potvrzen. Výsledky poukazují na to, že z hlediska poměru tuku a bílkovin v mléce je rozhodujícím faktorem funkčnost metabolismu dárkyně při zahájení hormonálního ošetření.

6.4 Hodnocení efektivity výtěžnosti embryí dle pořadí laktace

Nejlepší výsledky reakce na superovulaci a počet získaných embryí vhodných k embryotransferu lze očekávat od dárkyň ve věku 4-6 let, nejméně naopak od plemenic do 2 let věku (Hegedüšová et al. 2010). Tuto teorii svou studií potvrdili i Walters et al. (2009), kteří zjistili, že krávy na první laktaci mají nejnižší kvalitu embryí. Zároveň Amer (2008) prokázal, že dojnice na první a druhé laktaci dosahují nejlepších reprodukčních ukazatelů.

Tyto teorie potvrzuje i náš pokus. Nejvyšší počet vypláchnutých a z toho i přenosuschopných embryí byl získán od dojnic na 2. laktaci (tzn. ve věku cca 4 let). Prvotelky byly v průměrném počtu získaných embryí na posledním místě, nicméně v počtu přenosuschopných embryí starší krávy (na 3. a vyšší laktaci) předehnaly.

S tímto souhlasí i studie Hegedüšové (2011), kdy reakce na superovulaci i celkový počet embryí byla u krav na 3. a další laktaci vyšší než u prvotelek.

7 Závěr

Účelem této diplomové práce bylo vypracovat detailní přehled literatury na téma reprodukce skotu, zejména pak přenosu embryí a vyhodnotit účinek vybraných faktorů na efektivitu embryotransferu u konkrétního stáda holštýnských dojnic.

Provedeno bylo celkem 59 výplachů embryí. Ze zjištěných výsledků lze vyvodit následující skutečnosti:

Nejvyšší počet přenosuschopných embryí byl získán od dárkyň, které se v období odběru nacházely v ideální tělesné kondici, a to v rozmezí od 3 do 3,75 BCS. Aktuální metabolický stav dárkyň v období výplachu jsme hodnotili také sledováním poměru mléčného tuku a bílkovin ze tří vzorků mléka od každé dojnice. Na základě výsledků tohoto pozorování můžeme konstatovat, že poměr tuku a bílkovin v mléce závisí na funkčnosti metabolismu v období zahájení přípravy dárkyň na embryotransfer.

Nejlepších výsledků dále dosahovaly krávy s průměrnou užitkovostí za prvních 100 dnů laktace přibližně 2900 až 3700 kg mléka (což odpovídá průměru stáda), při denním nádoji v den výplachu embryí do 24 kg.

Z hodnocení vlivu pořadí laktace jsme zjistili, že nejméně embryí bylo získáno od prvotelek, naopak nejvíce od krav na 2. laktaci. Od krav na 3. a vyšší laktaci byl sice vypláchnut relativně vysoký počet embryí, nicméně velké množství z nich bylo fragmentovaných, či jinak nevhodných k přenosu.

Výše popsané skutečnosti poukazují na to, že efektivitu embryotransferu skutečně ovlivňuje úroveň mléčné užitkovosti dojnice i její aktuální metabolický stav. Pořadí laktace se neprojevilo jako faktro významně ovlivňující efektivitu embryotransferu, svou roli na úspěšnost zisku přenosuschopných embryí hraje spíše věk plemenice. Výsledky se ovšem projevily jako statisticky neprůkazné.

Před začátkem přípravy na embryotransfer je nejdůležitějším úkolem chovatele pečlivý výběr vhodných plemenic. Pro efektivní reakci na superovulační ošetření a následný zisk embryí je nutné vybírat zvířata zdravá, pravidelně cyklující, v odpovídající tělesné kondici, s funkčním metabolismem, spíše průměrnou užitkovostí a ve věku ideálně 3-4 let. Při dodržení těchto selekčních kritérií lze předpokládat efektivní zisk přenosuschopných embryí.

Bohužel jen malé množství geneticky cenných dojnic splňuje tato ideální kritéria, která pozitivně ovlivňují množství získaných přenosuschopných embryí a tím i přínosnost této biotechnologické metody. Pravděpodobně i z tohoto důvodu u nás v současné době klesají počty provedených embryotransferů.

8 Literatura

Amer, H. 2008. Effects of body condition score and lactation number on selective reproductive parameters in lactating dairy cows. Global veterinaria.130-138 ISSN: 1992-6197.

Becker, J. C., Heins, B. J., Hansen, L. B. 2012. Costs for health care in Holstein cows selected for large versus small body size. Journal of Dairy Science. 95 (9). 5384-5392.

Bouška, J., Doležal, O., Jílek, F., Kudrna, V., Kvapilík, J., Přibyl, J., Rajmon, R., Sedmíková, M., Skřivanová, V., Šlosárková, S., Tyrolová, Y., Vacek, M., Žižlavský, J. 2006. Chov dojeného skotu, Profi Press, Praha, 186 s. ISBN: 90-86726-16-9.

Bucek, P. 2012. Vyřazování krav v kontrole užitkovosti. Chov skotu. Roč. 9, č. 3, str. 6-8. ISSN: 1801-5409.

Burdych, V., Brychta, J., Divoký, L., Kvapilík, J., Stejskalová, E., Všetečka, J. 2004. Reprodukce ve stádech skotu. Chovservis a.s., Hradec Králové, 72 s.

Cibulka, J., Fučíková, A., Härtlová, H., Jílek, F., Lánská, V., Sedmíková, M. 2004. Základy fyziologie hospodářských zvířat. ČZU v Praze, Praha, 201 s. ISBN: 978-80-213-1247-0.

Coufalík, V. 2013. Současné problémy v reprodukci skotu. Agroprint, Olomouc, 184 s. ISBN: 978-80-87091-46-3.

Chagas, L. M., Bass, J. J., Blache, D., Burke, C. R., Kay, J. K., Lindsay, D. R., Lucy, M. C., Martin, G. B., Meier, S., Rhodes, F. M., Roche, J. R., Thatcher, W. W., Webb, R. 2007. Invited Reviw: New Perspectives on the Roles of Nutrition and Metabolic Priorities in the Subfertility of High-Producing Dairy Cows. Journal of Dairy Science. 90 (9). 4022-4032.

Čech, S., Doležel, R. 2008. Využití gestagenů v reprodukci mléčného skotu. Veterinářství č. 58 (11). 704-707.

Čejna, V., Chládek, G. 2005. The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in Holstein cows during lactation. Journal of Central European Agriculture. 6 (4). str. 539-546.

Dayyani, N., Karkudi, K., Bakhtiari, H. 2013. Reproductive performance definition in dairy cattle: affective factors. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 11 (1). 1392-1396.

Diskin, M., Sreenan, J. 2000. Expression and detection of oestrus in cattle. Reproduction Nutrition Development. 40. 481-491.

Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. CABI Publishong, 393 s. ISBN: 0851996663.

Hanuš, O., Bjelka, M., Hegedüšová, Z., Louda, F., Machálek, A. 2006. Reprodukce dojených krav, její problémy v současných podmínkách a faktory, které ji ovlivňují ve vztahu k produkci mléka. Výzkumný ústav pro chov skoru, s.r.o., Rapotín, 30 s. ISBN: 80-903142-6-0.

Hasler, J. F. 2013. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. Theriogenology, 81 s. 152-169.

Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology. 43 (1). 141-152.

Hegedüšová, Z., Holásek, R., Louda, F. 2010. Přenos embryí jako intenzifikační faktor šlechtitelské práce v chovu skotu. Karto Tisk s.r.o., Šumperk, Agrovýzkum Rapotín, 39 s. ISBN: 9788087144145.

Hegedüšová, Z. 2011. Vlivy působící na kvalitu produkovaných embryí a zabřezávání plemenic v dojených stádech skotu. Disertační práce. ČZU v Praze, Praha, 96 s.

Hofírek, B., Doležel, R., Dvořák, R., Němeček, L., Pospíšil, Z. a kol. 2009. Nemoci skotu. Noviko, a.s., Česká buiatrická společnost, Brno, 1149 s. ISBN: 978-80-86542-19-5.

Hofírek, B., Doležel, R., Dvořák, R., Fleischer, P., Haas, D., Kummer, V., Pavlata, L., Pechová, A., Pospíšil, Z., Ryšánek, D., Smola, J., Šlosárková, S., Tert, Z., Vinkler, A. 2004. Produkční a preventivní medicína v chovech mléčného skotu. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, 184 s. ISBN: 80-7305-501-5.

Holman, A., Cameron, J., Dobson, H., Grove-White, D., Jones, D. N., Routly, J. E., Smith, R. F., Thompson, J. 2015. Comparsion of oestrus detection methods in dairy cattle. Veterinary Record. 169. 47-55.

Hopper, R. M. 2014. Bovine Reproduction. Wiley-Blackwell, 816 s. ISBN: 9781118470831.

Jahnke, M. M., West, J. K., Youngs, C. R. 2015. Evaluation of In Vivo Derived Bovine Embryos. In: Hopper, R. M. Bovine reproduction. Wiley-Blackwell, str. 733-748. ISBN: 9781118470831.

Ježková, A., Louda, F., Stádník, L., Rákos, M. 2004. Faktory ovlivňující plodnost sojeného skotu. In: Den mléka 2004. ČZU v Praze, Katedra chovu skotu a mlékařství, Praha, str. 71-72. ISBN: 8021311665.

Jílek, F. a kol. 2002. Analýza reprodukčních ukazatelů krav jako prostředek ke zlepšení jejich reprodukční výkonnosti. Zemědělské informace, 2002/č.1, str. 35.

Knížková, I., Kunc, P., Doležal, O. 2003. Tepelný stres u skotu. Metodické listy. Výzkumný ústav živočišné výroby Praha – Uhříněves. 9 s. ISBN: 80-86454-33-9.

Kudláč, E., Elečko, J., Hájovský, T., Holý, L., Kudělka, E., Ševčík, A., Vlček, Z., Vrtěl, M. 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. Státní zemědělské nakladatelství Praha, Praha, 576 s.

Louda, F., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdníšek, J., Stádník, L., Bezdníček, J. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín, 43 s.

Louda, F., Čeřovský, J. 1994. Inseminace a biotechnické metody v reprodukci hospodářských zvířat. Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany, 167 s.

Louda, F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. ČZU v Praze, Praha, 225 s. ISBN: 80-213-0702-1.

Louda, F., Bezdníček, J., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdíšek, J., Stádník, L., Vaněk, D. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín, 55 s. ISBN: 978-80-87144-05-3.

Mapletoft, R. J., Adams, G. P., Steward, K. B. 2002. Superovulation in perspective. Western College of Veterinary Medicine.

Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2003. Morfologie hospodářských zvířat. ČZU v Praze, Praha, 303 s. ISBN: 80-209-0319-4.

Motyčka, J. 2005. Historie, vývoj a současný stav chovu holštýnského plemene. In: Motyčka, J., Vacek, M., Šlejtr, J., Chládek, G., Vondrášek, L., Pazdera, J. 2005. Šlechtění holštýnského skotu, Svaz chovatelů holštýnského skotu v ČR, Praha, 87 s.

Peters, A. R., Ball, P. J. H. 1995. Reproduction in cattle. Blackwell Science, Cambridge, 234 s. ISBN: 0632038276.

Petelíková, J. 2008. Výroční zpráva – Přenos embryí skotu v roce 2007. 25 s.

Petr, J. 2015. Genomika odhaluje poruchy plodnosti skotu. Náš chov. Výzkumný ústav živočišné výroby Praha – Uhříněves, č.1/2015.

Pivko, J., Grafenau, P., Sokol, J. 2000. Prenos raných embryí zvierat. Výzkumný ústav živočíšnej výroby, Nitra, 212 s. ISBN: 807148038.

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing, Praha, 480 s. ISBN: 987-80-247-3282.

Richard, C., Campion, E., Degrelle, S. A., Gelin, V., Heyman, Y., Hue, I., Chavatte-Palmer, P. 2015. Transcervical collectio of bovine embryos up to Day 21: An 8-year overview. Theriogenology. 83 (7). 1101-1109.

Robertson, E. G. 2015. Embryo collection and transfer. In: Hopper, R. M. Bovine reproduction. Wiley-Blackwell, str. 696-702. ISBN: 9781118470831.

Roche, J. E., Berry, D. P., Burke, C. R., Lee, J. M., Macdonald, K. A. 2007. Associating among body condition score, body weight and reproductive performance in seasonal calving dairy cattle. Journal of Dairy Science 90. 376-391.

Rowson, L. E. A., Lawson, R. A. S, Moor, R. M. 1971. Production of twins in cattle by egg transfer. Journal reproduction fertility. Str. 25. 261-268.

Říha, J., Jakubec, V., Machatková, M., Pavlok, A., Petelíková, J., Pytloun, J., Šereda, L. 1999. Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Výzkumný ústav chovu skotu, s.r.o., Rapotín, 167 s.

Říha, J., Čermák, V., Illek, J., Jakubec, V., Jílek, F., Kvapilík, J., Hanuš, O. 2004. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. Výzkumný ústav chovu skotu, s.r.o., Rapotín, 145 s. ISBN: 80-903143-5.

Říha, J. 1990. Biologická hlediska přenosu embryí u skotu. DDIS, Výzkumný ústav chovu skotu, s.r.o., Rapotín, 228 s.

Sambraus, H. 2006. Atlas plemen hospodářských zvířat. Nakladatelství Brázda, Praha, 296 s. ISBN: 978-80-2090-344-0.

Slavík, P., Illek, J., Halouzka, R., Škorič, M., Usvald, D. 2004. Lipomobilizační syndrom a steatóza jater u krav. Veterinářství č. 54, 217-222.

Stádník, L., Beran, J., Hegedüšová, Z., Kubovičová, E., Louda, F., Makarevich, A., Nejedlová, M. 2013. Zvýšení efektivnosti embryotransferu u holštýnskýh dojnic využitím hodnocení jejich tělesné kondice. ČZU v Praze, Praha, 34 s. ISBN: 978-80-213-2371-1.

Strapák, P., Tančin, V. 2013. Chov hovädzieho dobytka. SPU Nitra, Nitra, 230 s. ISBN: 978-80-522-0994-4.

Stupka, R., Čítek, J., Fantová, M., Ledvinka, Z., Navrátil, J., Stádník, L., Šprysl, M., Štolc, L., Vacek, M., Zita, L. 2010. Chov zvířat. Odborné nakladatelství Powerprint, s.r.o., Praha, 289 s. ISBN: 978-80-87415-08-5

Šustala, M. 2001. Krmné dávky a systémy krmení dojnic. Farmář, č. 7/2001 (2). str. 34-37.

Verlhac, M. H., Villeneuve, A. 2010. Oogenesis: The Universal Process. Wiley & Sons, Chichester, 501 s. ISBN: 978-0-470-69682-8.

Vinkler, A. 2009. Výběr a příprava dárců a příjemců. In: Hofírek, B., Doležel, R., Dvořák, R., Němeček, L., Pospíšil, Z. Nemoci skotu. Noviko, a.s., Brno, str. 1062-1063. ISBN: 978-80-86542-19-5.

Vinkler, A. 2009. Přenos embryí. In: Hofírek, B., Doležel, R., Dvořák, R., Němeček, L., Pospíšil, Z. Nemoci skotu. Noviko, a.s., Brno, str. 1066. ISBN: 978-80-86542-19-5.

Vinkler, A. 2009. Odběr embryí. In: Hofírek, B., Doležel, R., Dvořák, R., Němeček, L., Pospíšil, Z. Nemoci skotu. Noviko, a.s., Brno, str. 1063-1064. ISBN: 978-80-86542-19-5.

Walters, H., Bailey, T. L., Pearson, R. E. 2009. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality and hormones to 90 days post partum. Journal of Dairy Science 85, str. 824-832.

Walsh, S. W., Williams, E. J., Evans, A. C. O. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Animal Reproduction Science. 123. 127-138.

Zahrádková, R., Bartoň, L., Brychta, J., Bureš, D., Doležal, P., Illek, J., Kaplanová, K., Kvapilík, J., Rozsypal, R., Skládanka, J., Slavík, J., Stehlík, L., Stejskalová, E., Stěhulová, I., Šárová, R., Šeba, K., Špinka, M., Teslík, V., Veselá, Z., Vostrý, L., Zeman, L., Žďárský, P. 2009. Masný skot od A do Z. Český svaz chovatelů masného skotu. Praha. 397 s. ISBN: 978-80-254-4229-6.

Internetové zdroje:

Betteridge, K. J. 2003. A History of Farm Animal Embryo Transfer and some Associated Techniques [online].
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003001660>

Hasler, J. F. 2003. The Current Status and Future of Commercial Transfer in Cattle [online]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003001672>

Motyčka, J., Vacek, M., Šlejtr, J., Chládek, G., Vondrášek, L., Pazdera, J. 2005. Šlechtění holštýnského skotu [online] dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/soubory-ke-stazeni/slechteni/15-slechteni-holstynskeho-skotu/file>

Parish, J. A. 2010. The Estrous Cycle of Cattle [online]. Dostupné z: <http://msucares.com/pubs/publications/p2616.pdf>

Pařilová, M. 2007. Management reprodukce ve stádě dojnic [online]. Dostupné z: <http://www.agroweb.cz/Management-reprodukce-ve-stade-dojnic_s45x27815.html>

Priestley, M. 2016. Milk fat and protein ratio could unlock herd efficiency [online]. Dostupné z: <https://www.fwi.co.uk/livestock/dairy/milk-fat-protein-ratio-unlock-herd-efficiency>

Rodenburg, J. 2000. Body Condition Scoring of Dairy Cattle [online]. Dostupné z: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/00-109.htm#1>

Rysová, L. 2017. Tělesná kondice skotu [online]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/telesna-kondice-skotu/>

Selk, G. N. D. 2002. Embryo Transfer in Cattle [online]. Dostupné z: <http://www.humble.k12.tx.us/cms/lib2/TX01001414/centricity/domain/3026/embryo%20transfer-cattle.pdf>

Staněk, S. 2009. Mléčná plemena skotu [online]. Dostupné z: <http://www.zootechnika.estranky.cz/clanky/chov-skotu/dojena-plemena-skotu>

Svaz chovatelů holštýnského skotu. 2018. Ročenka Annual report 2018 [online]. Dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/rocenky/109-rocenka-2018-ku/file>

Svaz chovatelů holštýnského skotu. 2017. Ročenka Annual report 2017 [online]. Dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/rocenky/101-rocenka-2017-ku/file>

Svaz chovatelů holštýnského skotu. 2016. Ročenka Annual report 2016 [online]. Dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/rocenky/109-rocenka-2016-ku/file>

Svaz chovatelů holštýnského skotu. 2015. Ročenka Annual report 2015 [online]. Dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/rocenky/109-rocenka-2015-ku/file>

Svaz chovatelů holštýnského skotu. 2014. Ročenka Annual report 2014 [online]. Dostupné z: <https://www.holstein.cz/cz/rocenky/109-rocenka-2014-ku/file>

Whittier, J. C. 1993. Reproductive Anatomy and Physiology of the Cow [online]. Dostupné z: <http://extension.missouri.deu/p/G2015>

Statistika:

SAS Institute Inc. 2011: SAS/STAT® 9.3 User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.

9 Přílohy

9.1 Seznam vložených příloh

Tabulka 1: Chovný cíl holštýnského skotu v ČR
Tabulka 2: Výsledky KU z let 2017 a 2018
Tabulka 3: Výsledky zabřezávání po první inseminaci
Tabulka 4: Hodnocení inseminačního intervalu
Tabulka 5: Hodnocení inseminačního indexu
Tabulka 6: Hodnocení interinseminačního intervalu
Tabulka 7: Vývoj průměrné délky mezidobí u holštýnských krav (včetně kříženek) v ČR
Tabulka 8: Pětibodová stupnice BCS
Tabulka 9: Přehled počtu provedených přenosů embryí v ČR v letech 2004-2011
Tabulka 10: Schéma provedených ošetření dárkyň
Tabulka 11: Přehled tělesné kondice vybraných dárkyň
Tabulka 12: Přehled pořadí laktace vybraných dárkyň
Tabulka 13: Denní nádoj dárkyň před výplachem
Tabulka 14: KU 100 vybraných dárkyň
Tabulka 15: FPR v 1. vzorku (25 dní před odběrem)
Tabulka 16: FPR v 2. vzorku (11 dní před výplachem)
Tabulka 17: FPR v 3. vzorku (3 dny po výplachu)
Tabulka 18: Základní statistiky sledovaných faktorů
Tabulka 19: Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí
Tabulka 20: Základní statistiky dle tělesné kondice
Tabulka 21: Vliv mléčné užitkovosti (KU100) na množství a kvalitu embryí
Tabulka 22: Vliv denního nádoje na množství a kvalitu embryí
Tabulka 23: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 1. vzorku na množství a kvalitu embryí
Tabulka 24: Vliv poměru tuku a bílkovin 2. vzorku na množství a kvalitu embryí
Tabulka 25: Vliv poměru tuku a bílkovin 3. vzorku na množství a kvalitu embryí
Tabulka 26: Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí
Tabulka 27: Základní statistiky dle pořadí laktace
Obrázek 1: Hodnocení tělesné kondice dle pětibodového systému
Obrázek 2: Normální tělesná kondice v období mléčné produkce a stání na sucho
Obrázek 3: Vývojová stádia embrya
Graf 1: Vliv tělesné kondice na množství a kvalitu embryí
Graf 2: Vliv mléčné užitkovosti na množství a kvalitu embryí
Graf 3: Vliv denního nádoje na množství a kvalitu embryí
Graf 4: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 1. vzorku na množství a kvalitu embryí
Graf 5: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 2. vzorku na množství a kvalitu embryí
Graf 6: Vliv vztahu poměru tuku a bílkovin 3. vzorku na množství a kvalitu embryí
Graf 7: Vliv pořadí laktace na množství a kvalitu embryí

9.2 Samostatné přílohy

Výpočty korelace jednotlivých faktorů

		TK	nádoj	KU100	FPR1	FPR2	FPR3	Vypláchnutá embrya	Přenosuschopná embrya
Poř. laktace	r	0,208	-0,023	0,376	0,168	0,165	0,068	0,174	0,071
	P	0,114	0,861	0,003	0,216	0,213	0,612	0,189	0,594
	n	59	59	59	56	59	58	59	59
TK	r		-0,555	-0,066	-0,022	-0,171	-0,240	0	-0,027
	P		<0,001	0,621	0,870	0,195	0,069	0,999	0,841
	n		59	59	56	59	58	59	59
nádoj	r			0,608	0,200	0,153	0,346	-0,030	-0,127
	P			<0,001	0,140	0,246	0,008	0,823	0,338
	n			59	56	59	58	59	59
KU100	r				0,199	-0,019	0,151	-0,047	-0,120
	P				0,141	0,888	0,258	0,722	0,364
	n				56	59	58	59	59
FPR1	r					0,554	0,487	-0,055	-0,120
	P					<0,001	<0,001	0,688	0,378
	n					56	55	56	56
FPR2	r						0,460	0,010	-0,027
	P						<0,001	0,938	0,839
	n						58	59	59
FPR3	r							0,003	-0,093
	P							0,984	0,490
	n							58	58
Vypláchnutá embrya	r								0,849
	P								<0,001
	n								59