

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Využití metody ovum-pick up v chovu dojnic

Bakalářská práce

Autor práce: Nikola Marešová

Obor studia: Chovatelství

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Využití metody ovum-pick up v chovu dojnic" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Luděkovi Stádníkovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce.

Využití metody ovum-pick up v chovu dojnic

Souhrn

Bakalářská práce byla zpracována formou literární rešerše a její úvod byl věnován rozboru plemene holštýnského skotu jakožto nejvýznamnějšího plemene dojného skotu. V další části byly charakterizovány základy biologie a fyziologie reprodukce krav, včetně faktorů ji ovlivňujících a včetně zmínky o problémové reprodukci u vysokoužitkových krav. Dále byly popsány základní principy řízení reprodukce a šlechtění dojného skotu. V závěru práce byly rozebrány vybrané biotechnologické metody využívané v reprodukci a šlechtění skotu. Byly to umělá inseminace, synchronizace říje, embryotransfer a superovulace, produkce embryí v podmínkách *in vitro* (IVP) a nakonec transvaginální aspirace oocytů neboli ovum-pick up metoda (OPU). Cílem této bakalářské práce bylo tuto metodu charakterizovat, zpracovat přehled o jejím využívání a vypracovat také metodiku odběru.

Ovum-pick up je neinvazivní a opakovatelná technika odběru oocytů od živých dárců. Společně s IVP jde o velmi efektivní způsob, jak využít geneticky cenné jedince ke šlechtění. Při rutinním odběru dvakrát týdně po dobu několika týdnů až měsíců lze získat až několik desítek přenosuschopných embryí. O jejím využití a významu svědčí fakt, že v roce 2020 bylo metodou ovum-pick up odebráno celosvětově 4 120 754 oocytů, ze kterých se následně získalo 1 132 773 přenosuschopných embryí, což je přes třikrát více než zisk embryí ze systému MOET – superoovulací a embryotransferem. V podmínkách České republiky metoda ovšem zatím nebyla zavedena do praxe.

Klíčová slova: reprodukční biotechnologie, holštýnský skot, šlechtění, reprodukce, IVP, embryotransfer

Utilisation of the ovum-pick up method in the dairy cattle breeding

Summary

The bachelor thesis was written in the form of a literature search and its introduction was devoted to the analysis of the Holstein breed as the most important breed of dairy cattle. In the next part, the basic biology and physiology of reproduction of cows were characterized, including the factors affecting it and including the mention of problematic reproduction in high producing cows. Furthermore, the basic principles of reproduction management and breeding of dairy cattle were described. Finally, selected biotechnological methods used in cattle reproduction and breeding were discussed. These were artificial insemination, heat synchronization, embryo transfer and superovulation, embryo production under in vitro conditions (IVP) and finally transvaginal oocyte aspiration or ovum-pick up method (OPU). The aim of this bachelor thesis was to characterize this method, to provide an overview of its use and to develop a collection technique.

Ovum pick up is a non-invasive and repeatable technique for oocyte retrieval from live donors. Together with IVP, it is a very efficient way to use genetically valuable individuals for breeding. With routine collection twice a week for several weeks to months, up to several dozen transferable embryos can be obtained. Its use and importance is evidenced by the fact that in 2020, 4 120 754 oocytes were collected worldwide by the ovum-pick up method, which subsequently provided 1 132 773 transferable embryos, which is more than three times higher than the embryo gain from the MOET system - superovulation and embryo transfer. However, the method has not been put into practice in the Czech Republic for now.

Keywords: reproductive biotechnology, holstein cattle, breeding, reproduction, IVP, embryotransfer

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Cíl práce..... | 8 |
| 3. Literární rešerše..... | 9 |
| 3.1 Holštýnský skot | 9 |
| 3.1.1.1 Význam plemene | 9 |
| 3.1.1.2 Charakteristika..... | 10 |
| 3.1.1.3 Stav a vývoj plemene | 10 |
| 3.1.1.4 Chovný cíl a šlechtitelská práce ČR..... | 12 |
| 3.2 Reprodukce v chovu dojnic..... | 12 |
| 3.2.1 Základy biologie a fyziologie reprodukční soustavy samic | 13 |
| 3.2.1.1 Pohlavní orgány..... | 13 |
| 3.2.1.2 Pohlavní cyklus | 14 |
| 3.2.2 Faktory ovlivňující reprodukci | 16 |
| 3.2.3 Stav plodnosti | 17 |
| 3.3 Řízení reprodukce a principy šlechtitelské práce | 17 |
| 3.3.1 Základní principy šlechtění skotu | 17 |
| 3.3.1.1 Genetické hodnocení zvířat | 18 |
| 3.3.1.2 Selektce..... | 21 |
| 3.3.2 Řízení reprodukce v chovatelských stádech | 24 |
| 3.3.2.1 Selektce ve stádě..... | 24 |
| 3.3.2.2 Obrat stáda..... | 25 |
| 3.3.3 Vývoj šlechtění skotu | 25 |
| 3.4 Biotechnologické metody v chovu skotu | 26 |
| 3.4.1 Provozně využívané reprodukční biotechnologie..... | 27 |
| 3.4.1.1 Umělá inseminace | 27 |
| 3.4.1.2 Synchronizace říje a ovulace | 29 |
| 3.4.2 Embryotransfer a superovulace | 32 |
| 3.4.3 Průduktce embryí in vitro (IVP) a in vitro fertilizace (IVF)..... | 38 |
| 3.4.4 Transvaginální aspirace oocytů – ovum pick-up (OPU) | 44 |
| 3.4.4.1 Metodika..... | 48 |
| 4. Závěr | 51 |
| 5. Literatura..... | 52 |

1. Úvod

Reprodukce je klíčová vlastnost jak pro chov skotu, kde hraje významnou roli pro produkci, tak v jeho šlechtění. Skutečnost, že skot je uniparní zvíře a má dlouhý generační interval (Stupka et al. 2013) je limitujícím faktorem pro rozsáhlé šíření geneticky cenných jedinců. Nejoptimálnější pro zabezpečení reprodukčního procesu a plné využití reprodukčních schopností skotu je komplexně zpracovaný systém řízené reprodukce včetně širokého využívání biotechnických metod reprodukce (Kudláč & Holý 1984). Aplikace biotechnologií v oblasti reprodukce a šlechtění hospodářských zvířat přináší nové možnosti, jak zintenzivnit selekční tlak (Machatková et al. 2021), zefektivnit využití pohlavních buněk geneticky cenných jedinců a urychlit genetický zisk (Machatková et al. 2016). V současnosti existuje několik biotechnologických metod využívaných v reprodukci, některé z nich jsou běžnou součástí chovatelské praxe. Například umělá inseminace se v současné době používá u více než 90 % všech pohlavně dospělých samic mléčného skotu v zemích s vyspělými šlechtitelskými programy (Comizzoli et al. 2000; Comizzoli & Holt 2014). Metody jako jsou embryotransfer či produkce embryí v podmínkách *in vitro* (IVP) jsou využívány ve šlechtitelských stádech. Odběr oocytů od živých dárkyň pomocí transvaginální aspirace neboli ovum-pick up (OPU) metody se v zahraničí stává rutinní součástí plemenářské práce. Galli et al. (2003) zmiňuje, že tato metoda je nejpružnější a nejopakovatelnější technika produkce embryí od živých dárkyň.

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí literárního přehledu charakterizovat metodu ovum-pick up (OPU), zhodnotit její přínos a zpracovat její metodiku. Dále pak vypracovat přehled některých běžně využívaných biotechnologických metod ve šlechtění skotu a zhodnotit význam těchto metod pro zvýšení kvality šlechtění na úrovni stáda a populace.

3. Literární rešerše

3.1 Holštýnský skot

U původních primitivních plemen skotu stačila produkce mléka pouze pro tele. Dlouhodobým chovatelským úsilím se podařilo prodloužit laktaci krav a zvýšit produkci mléka tak, aby bylo k dispozici také jako potravina pro člověka. Modernější postupy šlechtitelské práce pak umožnily u jednotlivých plemen vyšlechtit dokonalejší zaměření a specializaci na mléčnou užitkovost. V současné době tak můžeme registrovat a rozdělovat plemena skotu na mléčná, masná a plemena s kombinovanou užitkovostí (Bouška et al. 2006). V evropských podmínkách má největší význam chov dojného skotu, protože kolem 40 % z celkové spotřeby bílkovin potravin živočišného původu je zde lidskou populací zkonzumováno v mléce a mléčných produktech (Urban et al. 1997). Pro dobrou ekonomiku zemědělských podniků je důležité dosažení dobrých výsledků jak v mléčné užitkovosti, tak také v reprodukci (Bezdiček & Louda 2015). Proto nás nejvíce z praktického i ekonomického hlediska zajímá narození telete, protože až po otelení dochází k tvorbě mléka, které u dojnic získáváme dojením. Mezi nejvýznamnější plemena patří holštýnský skot, dále pak jersey, ayshire, brown swiss či montbeliarde (Stupka et al. 2013).

3.1.1.1 Význam plemene

Holštýnský skot je nejrozšířenější světové plemeno, které odvozuje svůj původ z populace černostrakatého skotu severozápadní Evropy. Toto významné plemeno bylo intenzivně šlechtěno v podmínkách Severní Ameriky na funkční mléčný užitkový typ většího tělesného rámce a ušlechtilosti. Vzniklo tak plemeno, které nemá v produkci mléka konkurenci. Další šlechtění tohoto plemene se stává celosvětovou záležitostí (Bouška et al. 2006).

V současnosti je holštýnské plemeno nejvíce prošlechtěné mléčné plemeno a jeho populace je nejpočetnější z kulturních plemen (Stupka et al. 2013). Zároveň je to populace s největší užitkovostí, významnou roli má i při zvelebování mnoha místních plemen i při vzniku plemen nových (Urban et al. 1997).

Holštýnsko-fríské plemeno má bezesporu dominantní postavení ve světové populaci dojného skotu, neboť se na ní podílí více než jednou třetinou. Celosvětová populace holštýnského plemene a holštýnizovaného černostrakatého skotu představuje celosvětově 70-80 milionu krav. Dá se předpokládat, že expanze tohoto plemene bude nadále pokračovat (Bouška et al. 2006). Holštýnský skot včetně kříženek je v současné době nejvíce zastoupenou plemennou skupinou dojeného skotu v České republice s podílem 60 % z celkového stavu dojených krav. Koncem kontrolního roku 2018 bylo v kontrole užitkovosti evidováno celkem 207 998 krav holštýnského skotu včetně kříženek z převodného křížení (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

V průběhu uplynulých desetiletí se holštýnské plemeno stalo nejvýznamnějším dojeným plemenem skotu s jednostranným zaměřením na mléčnou produkci. Bezesporu se tak stalo díky intenzivnímu šlechtění na mléčnou produkci, velmi dobré přizpůsobivosti k rozmanitým podmínkám chovu, zlepšování podmínek vnějšího prostředí, především výživy a celkového managementu stád (Motyčka et al. 2005).

3.1.1.2 Charakteristika

Jedná se o rané plemeno velkého tělesného rámce. Tělesný rámec je obdélníkový s hlubokým a prostorným hrudníkem, svalstvo je málo vyvinuté, končetiny suché, vemeno prostorné a silně žlaznaté. Zbarvení plemene holštýn se vyskytuje ve dvou variantách. Dominantní varianta je černostrakaté zbarvení s černou hlavou a bílými odznaky. Recesivní homozygoti tvoří cca 3-10 % populace a mají červenostrakaté zbarvení (Stupka et al. 2013). Pro tato zvířata se vžilo označení červený holštýnský skot a v posledních desetiletích jsou využívána k zušlechťování zejména strakatých kombinovaných plemen (Motyčka 2005). Zvířata jsou živého temperamentu, jsou raná s dobrými reprodukčními vlastnostmi a snadným telením. Charakteristická je velká kapacita těla, která umožňuje konzumaci velkého množství objemných krmiv a dobrou konverzi na produkci mléka. Zvířata mají vynikající adaptabilitu na podmínky technizovaných stájí v ČR, jsou inteligentní, vynikají mléčnou produkcí a snadno se dojí (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

Výška v kříži je u dojnic tohoto plemene 145-153 cm a živá hmotnost 650-700 kg (Stupka et al. 2013). Sambraus (2006) uvádí, že u dojnic se výška v kohoutku pohybuje okolo 144-148 cm a váha pak v rozmezí 650-700 kg. U býka je pak výška v kohoutku 155-165 cm při váze 1000-1200 kg.

3.1.1.3 Stav a vývoj plemene

Cílem chovatelů holštýnského plemene v ČR jsou zvířata s vysokou mléčnou užitkovostí a dobrou úrovní funkčních vlastností jako je plodnost, zdraví a funkční 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. Významná je také produkce životaschopných telat, odolnost proti mastitidám a dalším onemocněním (Motyčka et al 2005).

V souladu s předpoklady koncepce se vyvíjela užitkovost holštýnských krav. Průměrná užitkovost holštýnských krav se zvýšila, zastavil se pokles průměrné tučnosti mléka a došlo k mírnému zvýšení obsahu bílkovin. Mezidobí u čistokrevných holštýnských krav s ukončenou laktací se zkrátilo o několik dní. Poměrně příznivý vývoj má věk při prvním otelení, který se pohybuje v hranicích obvyklých pro většinu zahraničních populací (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019). Vývoj stavů a ukazatelů výkonosti v ČR je znázorněn v Tabulce 1, užitkovost a počty dojnic ve světových chovech jsou znázorněny v Tabulce 2.

Tabulka 1: Vývoj ukazatelů výkonnosti holštýnského skotu v ČR od roku 1995

| Ukazatel | 1995 | 2000 | 2005 | 2010 | 2015 | 2020 | Rozdíl 2020-1995 |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|
| Počet krav HS* včetně kříženek 50 % a více | 227 381 | 218 657 | 228 981 | 204 347 | 212 597 | 209 234 | -18 147 |
| Užitkovost (kg) | 4 651 | 6 490 | 7 887 | 8 785 | 9 546 | 10 226 | +5 557 |
| Tučnost (%) | 4,26 | 4,13 | 3,86 | 3,74 | 3,78 | 3,90 | -0,36 |
| Tuk (kg) | 198 | 268 | 305 | 329 | 361 | 399 | +201 |
| Bílkoviny (%) | 3,23 | 3,31 | 3,26 | 3,27 | 3,34 | 3,41 | +0,18 |
| Bílkoviny (kg) | 150 | 215 | 257 | 288 | 319 | 349 | +199 |
| Věk při prvním otelení (měsíc/dny) | 28/25 | 27/28 | 27/01 | 25/27 | 25/04 | 24/17 | -4/11 |
| Mezidobí (dny) | 398 | 405 | 423 | 419 | 412 | 400 | +2 |
| Celoživotní užitkovost (kg) | - | - | 24 407 | 26 560 | 28 175 | 30 324 | +5 917** |

*holštýnského skotu **v porovnání s rokem 2005

Upraveno podle: Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR (2020)

Tabulka 2: Vývoj ukazatelů výkonnosti holštýnského skotu v zahraničí

| Země | Počet krav černostrakatého holštýnského skotu | Mléko (kg) | Tuk (%) | Tuk (kg) | Bílkoviny (%) | Bílkoviny (kg) |
|----------------|---|------------|---------|----------|---------------|----------------|
| Belgie | - | 8 459 | 4,01 | 340 | 3,36 | 285 |
| Kanada | 902 900* | 10 939 | 4 | 435 | 3,26 | 359 |
| Kolumbie | 14 000 000 | 6 790 | 3,8* | 401* | 3,2* | 264* |
| Chorvatsko | 33 681* | 8 342* | 4,1* | 342* | 3,4* | 284* |
| Dánsko | 389 118* | 9 222 | 4,12 | 380 | 3,52 | 325 |
| Finsko | 141 072* | 10 761 | 4,21 | - | 3,53 | - |
| Francie | 2 192 594 | 8 181 | 3,99 | 327 | 3,34 | 273 |
| Německo | 2 190 603 | 9 621 | 3,99 | 384 | 3,40 | 327 |
| Maďarsko | - | 10 448 | 3,66 | 382 | 3,33 | 348 |
| Irsko | 1 571 199 | 6 809 | 4,15 | 280 | 3,57 | 242 |
| Itálie | 1 400 000* | 10 382 | 3,79 | 394 | 3,35 | 348 |
| Japonsko | 831 200 | 9 851 | 3,89 | 383 | 3,27 | 322 |
| Litva | 177 337 | 9 679 | 4,28 | 414 | 3,39 | 328 |
| Mexiko | 1 305 000* | 9 431 | 3,41 | 322 | 3,18 | 300 |
| Nový Zéland | 1 609 346* | 4 492 | 4,47 | 199 | 3,77 | 169 |
| Polsko | 1 849 353* | 8 943 | 3,97 | 355 | 3,33 | 298 |
| Portugalsko | 127 083 | 9 948 | 3,74 | 371 | 3,31 | 329 |
| Slovensko | 68 662 | 9 730 | 3,84 | 373 | 3,34 | 325 |
| Španělsko | 795 000* | 10 686 | 3,72 | 398 | 3,23 | 346 |
| Švédsko | 138 400* | 10 787 | 4,14 | 447 | 3,51 | 379 |
| Švýcarsko** | 135 000* | 8 817 | 4,03 | 355 | 3,27 | 288 |
| Švýcarsko*** | 135 000* | 9 053 | 4,01 | 363 | 3,25 | 294 |
| Nizozemsko | 1 178 882* | 9 563 | 4,29 | 410 | 3,52 | 337 |
| Velká Británie | 1 600 000* | 10 115 | 4,07 | 408 | 3,27 | 329 |
| USA | 8 030 000* | 12 431 | 3,86 | 480 | 3,11 | 387 |

*odhadnuto **dle švýcarské plemenné knihy ***dle asociace Holstein Switzerland

Upraveno podle: World Holstein Friesian Federation (2021)

3.1.1.4 Chovný cíl a šlechtitelská práce ČR

Cílem šlechtění holštýnského skotu zůstává systematické zlepšování celkové rentability chovu v podmínkách ČR na základě genetického zlepšování vlastností zvířat. Systematické šlechtění a současné vytváření vhodných podmínek chovu směřuje k získání bezproblémové a rentabilní dojnice s dostatečnou výkonností a dlouhověkostí. Konkrétní požadavky lze vyjádřit následujícími parametry (viz Tabulka 3) hlavních ukazatelů s tím, že v jednotlivých chovech se mohou odlišovat v souladu s jejich výrobními podmínkami a ekonomickými potřebami (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

Tabulka 3: Chovný cíl českého holštýnského skotu

| Ukazatel | Prvotelky | Dospělé krávy |
|--|------------------|------------------|
| Dojivost v normované laktaci | 9 000 a více kg | 10 000 a více kg |
| Obsah bílkovin | 3,40 % a více | 3,40 % a více |
| Tučnost | 3,90 a více | 3,90 a více |
| Průměrný počet ukončených laktací | - | 3,5 |
| Celoživotní užítkovost | 35 000 kg a více | |
| Věk při otelení | 23 až 27 měsíců | - |
| Mezidobí | do 400 dnů | |
| Výška v kříži | 145 – 149 cm | 151 -155 cm |
| Žuvá hmotnost | 580 – 600 kg | 680 – 720 kg |

Upraveno podle: Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR (2019)

Šlechtitelský program není ale směřován jen na fenotypovou úroveň produkce, ale především na genetické zlepšování ekonomicky významných vlastností. V souladu s celosvětovým vývojem bylo šlechtění zaměřeno na souhrnný genotyp, tj. zlepšování více znaků na základě souhrnného selekčního indexu na ekonomické bázi. Souhrnný selekční index holštýnského skotu SIH je hlavním selekčním ukazatelem u býků i krav (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

3.2 Reprodukce v chovu dojnic

Reprodukce výrazně ovlivňuje ekonomiku chovu skotu (Urban et al. 1997). Její ekonomický význam spočívá v produkci telat a v hormonální stimulaci navazující laktace (Burdych et al. 2004). Vynikající reprodukční výkonnost je rozhodující pro rentabilitu chovu dojného skotu (Kudláč & Holý 1984, Berry et al. 2014), proto musí být úroveň reprodukce v popředí zájmů každého chovatele (Urban et al. 1997).

Plodnost skotu je po mléčné užítkovosti nejvýznamnější užítkovou vlastností. Za ideální se považuje získání jednoho zdravého telete od krávy za rok. Dobré plodnosti krav odpovídají délka inseminačního intervalu do 75 dnů, březost po první inseminaci nad 50 %, inseminační index do 1,5, délka servis periody do 100 dnů a délka mezidobí do 385 dnů. Při vysoké užítkovosti lze tolerovat prodloužení mezidobí na 400 dnů spolu s adekvátním prodloužením inseminačního intervalu a servis periody (Bucek et al. 2020).

Podle Burdycha et al. (2004) je základním ukazatelem dobré reprodukce stáda stav, kdy od jedné krávy dostaneme do roka jedno tele, kdy užítkové plemenice dají za život 4-6 telat při plnohodnotných laktacích a kdy vyřazování plemenic pro poruchy plodnosti nepřesáhne 15 % z celkového počtu brakovaných plemenic.

Kontinuální a pravidelně probíhající pohlavní funkce a celý reprodukční proces jsou základem pro uplatnění všech užitkových vlastností a jejich plné využití u plemenic. Uvědomění si této skutečnosti zákonitě vyúsťuje v nutnost organizovat a pečovat o rozmnožování na takové úrovni a v takové intenzitě, aby se reprodukce stala konstantním faktorem a zabezpečovala plánovanou produkci telat v každém zemědělském podniku a v celém chovu skotu (Kudláč & Holý 1984).

3.2.1 Základy biologie a fyziologie reprodukční soustavy samic

Biologické základy užitkovosti hospodářských zvířat spočívají v anatomické stavbě těla, fyziologických funkcích jednotlivých orgánových soustav a dědičnosti těchto vlastností. Protože veškerá produkce hospodářských zvířat je vázána na jejich reprodukci, je nutné tyto základy zmínit (Urban et al. 1997).

Samičí pohlavní orgány jsou specializovaným ústrojím těla, které svým morfologickým utvářením a funkcí slouží k uskutečňování nejdůležitějších fází reprodukce a získání potomstva jako základního předpokladu zachování druhu. Vytvářejí se v nich samičí pohlavní buňky – vajíčka a steroidní pohlavní hormony (Doležel et al. 1977).

K pohlavní dospělosti, tedy k začátku produkce pohlavních buněk, dochází u jalovic ve věku cca 9 měsíců. Nástup pohlavní dospělosti je ovlivněn plemenem, hmotností, výživou a dalšími faktory. Jalovice však začínáme zapouštět až po dosažení tzv. chovatelské dospělosti, kdy březost neznamena pro plemenic ani plod riziko. Obecným předpokladem chovatelské dospělosti je dosažení 2/3 z živé hmotnosti v dospělosti, raná plemena jako je holštýnský skot tuto hmotnost dosahují v 13-14 měsících. Při prvním otelení by živá hmotnost plemenic měla představovat 3/4 živé hmotnosti v dospělosti (Stupka et al. 2013).

Pohlavní ústrojí samic se dělí na vnitřní a vnější. K vnitřním pohlavním orgánům patří párové pohlavní žlázy – vaječníky a větší část vývodných pohlavních cest – dva vejcovody, děloha a pochva. K vnějším pohlavním orgánům patří poševní předsň a vulva (Doležel et al. 1977), Marvan et al. (1992) pak zařazuje mezi vnější pohlavní orgány samic i poštěváček.

3.2.1.1 Pohlavní orgány

Vaječník je párová pohlavní žláza samic, kde dochází k tvorbě vajíček a pohlavních hormonů, tedy estrogenů a progesteronu. U krávy je malé velikosti, tvarem připomínající švestku. Hmotnost dosahuje až 20 gramů (Jelínek et al. 2003). Povrchovou vrstvu vaječníku tvoří vrstva korová, centrálně je pak uložena dřev, základem obou je vazivové stroma (Sova et al. 1981). Ve vazivovém stromatu kůry jsou rozmístěny hlavní strukturální součásti vaječníku, a to vaječnickové váčky – folikuly. Zralý – terciální neboli Graafův folikul představuje poslední vývojové stadium vaječnickového váčku. Vaječník nemá žádný zvláštní vývod a vaječné buňky se z něj na povrch uvolňují prasknutím dozrálého folikulu – ovulací. U jednorodých zvířat, jako je skot, dozrává a praská zpravidla jen jeden folikul (Marvan et al. 1992). Výskyt dvojčat u skotu je většinou podmíněn ovulací dvou folikulů, jednovaječná dvojčata jsou velmi vzácná. U dojnic se výskyt dvojčat může pohybovat mezi 3-6 %, trend výskytu se statisticky zvyšuje (Smith 2011). Po ovulaci se na vaječníku v místě prasklého folikulu začne vyvíjet kompaktní útvar s endokrinní funkcí – žluté tělíčko, které produkuje progesteron. Pokud bylo vajíčko oplozeno a uhnízdí se v děloze, žluté tělíčko se silně zvětšuje a zůstává na vaječníku téměř po celou dobu březosti. Pokud nedojde k nidaci vajíčka, žluté tělíčko zaniká (Urban et al. 1997).

Vejcovod je párová svalová a slizniční trubička tloušťky stébla, u krávy dlouhá 20-30 cm (Marvan et al. 1992). Vede od vaječníků do děložních rohů, volný přední konec je otevřen do břišní dutiny a k vaječniku naléhá rozšířenou částí – nálevkou vejcovodu (Sova et al 1981). Ta slouží k zachycení ovulované vaječné buňky a k jejímu přemístění do dělohy (Marvan et al. 1992). V počátečním úseku vejcovodu dochází k dozrávání a následnému oplození oocyty (Jelínek et al. 2003).

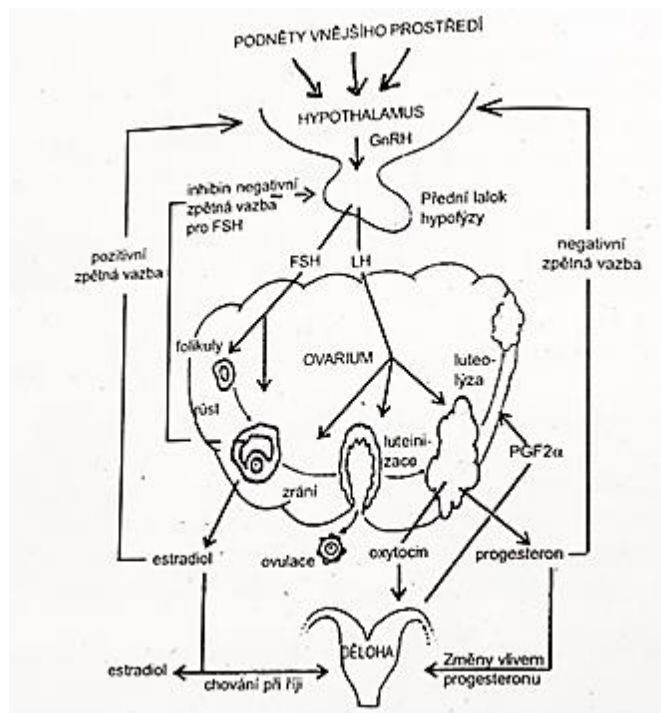
Děloha je silnostěnný dutý orgán, sloužící k vývoji nového jedince z oplozeného vajíčka až do narození mláděte. Děloha hospodářských zvířat se skládá ze tří základních částí. Je to kaudálně umístěný děložní krček, který dopředu přechází v děložní tělo, na které kraniálně navazují dva děložní rohy (Marvan et al. 1992). Přežvýkavci mají jednoduchou dvourohou rozdělenou dělohu, která má jednotné tělo rozděleno přepážkou, zasahující téměř až ke krčku (Sova et al 1981). Děložní rohy jsou u krávy v dospělosti dlouhé 35-45 cm, kaudálně na ně navazuje děložní tělo, které je dlouhé jen 3 cm. Děložní krček spojuje děložní tělo s pochvou. Má charakter tuhého válcovitého útvaru, je dlouhý 8-12 cm a jeho středem prochází úzký kanál, který se fyziologicky otvírá pouze při porodu a v období říje (Marvan et al. 1992). Děložní stěna se skládá ze tří vrstev, sliznice, svalové vrstvy a serózy. Sliznice obsahuje četné tubulózní žlázy, které u přežvýkavců vytváří vyvýšené hrbolky – karunkuly, v počtu 80-120, na které se v březosti přichycují kotyledony placenty (Sova et al 1981). Průměrná délka březosti je 280-285 dní (Ball & Peters 2004).

Pochva jako vlastní kopulační orgán je uložena v pánvi. Vlastní pochvu a poševní předsíně odděluje panenská blána – hymen (Sova et al 1981), ta je vytvořena u mladých samic, které ještě nepářily, u starších samic se nevyskytuje (Marvan et al. 1992). Na ventrální straně poševní předsíně se nachází také vyústění močové roury (Sova et al 1981).

Vulva je tvořena u samic domácích zvířat dvěma stydkými pysky. V jejich ventrální spojce je poštváček, což je vývojový zbytek po základu samčího pyje (Sova et al 1981).

3.2.1.2 Pohlavní cyklus

Pohlavní funkce jsou řízeny jak nervově, tak hormonálně. Základem celého velmi komplikovaného systému je hormonální kaskáda na ose hypotalamus – hypofýza – gonády. Tato kaskáda představuje v podstatě uzavřený funkční okruh, kde hypotalamus udává celé soustavě rytmus a usměrňuje aktivitu hypofýzy. Hypofýza danou informaci zesiluje do podoby, jakou jsou schopny zachytit pohlavní žlázy. Ty na tento podnět reagují produkcí příslušného steroidního hormonu, který působí na pohlavní orgány, nervovou aktivitu i celkový metabolismus organismu. Hladiny produktů gonád i hypofýzy registruje zpětně hypotalamus a podle situace upravuje svou signalizaci směrem k hypofýze (Bouška et al. 2006). Hormonální kaskáda je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma řízení pohlavních funkcí

Zdroj: Říha et al. (1999)

Hypotalamus je současně významná nervová struktura středního mozku. Do sekreční aktivity hypotalamu se tedy promítá i řada nervových podnětů. Právě přes hypotalamus dochází k útlumu pohlavních funkcí při hladovění, bolesti, strachu, či jiných formách stresu, uplatňují se přes něj i pozitivní stimulační režimy, flushingem nebo zařazením pleménka do skupiny plemenic. U samic hypotalamus řídí celý systém v pravidelných cyklech. Výsledkem jsou pravidelně se střídající změny na pohlavních orgánech a v sexuální aktivitě samice, označované jako pohlavní nebo též říjový cyklus (Bouška et al. 2006).

Období mezi začátkem jedné a začátkem příští říje se nazývá estrální, nebo také pohlavní cyklus. Krávy a jalovice jsou polyestrická zvířata (Louda et al. 2008), jeden estrální cyklus u krávy trvá v průměru 21 dní (Jelínek et al. 2003). Celý estrální cyklus se podle změn na pohlavních orgánech a změn chování v průběhu pohlavního cyklu dělí na 4 období (Louda et al. 2008).

Proestrus (období před říjí) – Louda et al. (2008) zmiňuje, že proestrus trvá v průměru 3 dny a to 18.-20. den cyklu. Marvan et al. (1992) souhlasí, že tato fáze trvá zpravidla 3 dny, ale podle něj zahrnuje 19.-21. cyklu. V této fázi začínají působit estrogény, které způsobují změnu chování krávy. Pleménice začíná být neklidná, je pozorná, pokouší se skákat na jiné krávy, snižuje se nádoj mléka. Vulva je zarudlá a vytéká z ní cervikální hlen (Stupka et al. 2013). Příznaky změněného chování krávy probíhají bez ochoty k páření. Je patrná zvýšená tonizace a kontrakce dělohy (Louda et al. 2008).

Estrus (říje) – je doba ochoty k páření. Toto období bývá označováno jako 0. den cyklu a trvá 12-36 hodin. Pleménice na sebe nechá skákat ostatní krávy, z pohlavních orgánů vytéká sklovitý hlen, jehož tažnost se prodlužuje. Krček děložní se otevírá, nastává reflex nehybnosti, který trvá 7-10 hodin (Louda et al. 2008). Zvíře je neklidné, ztrácí zájem o krmivo a odpočinek, očičává ostatní a zvyšuje se jeho pohybová aktivita (Bouška et al. 2006). Nejdůležitějším

jevem této fáze je ovulace, k níž dochází za 6-16 hodin po odeznění zevních příznaků říje. (Marvan et al. 1992). Kudláč & Holý (1984) a Jelínek et al. (2003) se shodují, že k ovulaci dochází v průměru za 8 hodin po odeznění příznaků říje. Období estru je optimální dobou pro provedení inseminace a nejlepších výsledků se dosahuje, když je plemence inseminována ke konci tohoto období. Plemence s detekovanou říjí ráno se zapouštějí tentýž den, zvířata s detekovanou říjí odpoledne se inseminují druhý den ráno (Stupka et al. 2013). U skotu se relativně často vyskytuje tichá říje, kdy vnější příznaky estru nejsou vůbec zaznamenány, ačkoliv cyklus ovariálních a hormonálních změn normálně probíhá. Četnost takových případů se zvyšuje s nepřízní životních podmínek zvířat a nízkou kvalitou ošetrovatelské péče (Bouška et al. 2006).

Metestrus (období po říji) – následuje po ovulaci od 1. do 4. dne cyklu (Louda et al. 2008). Marvan et al. (1992) uvádí, že trvá zpravidla 4 dny během 3.-6. dne cyklu. Během této fáze se začíná na vaječnicku vyvíjet žluté tělísko, které produkuje progesteron. Postupně mizí příznaky říje na pohlavních orgánech, plemence se uklidňuje. U krav bývá pozorován krvavý výtok 2 dny po skončení říje (Louda et al. 2008).

Diestrus (období pohlavního klidu) – trvá od 5. do 18. dne cyklu, pohlavní orgány i chování plemence jsou beze změn (Louda et al. 2008). V průběhu této fáze se na vaječnicku zvětšuje žluté tělísko, a to přibližně do 12. dne cyklu (Marvan et al. 1992). Pokud plemence zabřezla, žluté tělísko přetrvává, perzistuje a zabraňuje nástupu nové říje. V případě, že nedošlo k zabřeznutí, 14. – 15. den cyklu děložní sliznice začíná produkovat protoglandin F2 α , který svými luteolytickými účinky navodí regresi žlutého tělíska (Louda et al. 2008). Po diestrstu nastupuje u polyestrických zvířat znovu proestrus (Marvan et al. 1992).

3.2.2 Faktory ovlivňující reprodukci

Reprodukce patří mezi znaky, které jsou ovlivněny jak genetickými vlivy, tak také vlivy vnějšího prostředí. Proto jí zařazujeme mezi kvantitativní znaky, které jsou typické také tím, že šlechtění v této oblasti je časově mnohem náročnější (Bezdíček & Louda 2015). Určit přesně podíl dědičnosti a zevního prostředí na formování plodnosti je však velmi obtížné. Ukazuje se, že plodnost je především ovlivňována a nejméně z 80 % určována existenčními podmínkami zvířat, tj. především působením faktorů vnějšího prostředí (Kudláč et al. 1977).

Také podle Loudy et al. (2006) je plodnost jako užitková vlastnost s nízkým koeficientem dědivosti nejvýrazněji ovlivňována vnějším prostředím. Mezi nejzávažnější faktory vnějšího prostředí ovlivňující plodnost hospodářských zvířat počítáme výživu, klimatické podmínky, způsob chovu a exploatace zvířat, staří, napadení mikroorganismy nejrůznějšího druhu, organizace reprodukčního procesu a jiné (Kudláč et al. 1977).

Velký význam otázky dědičnosti přísluší v souvislosti s výskytem některých dědičně podmíněných vývojových anomálií na pohlavním ústrojí samic, způsobujících subfertilitu nebo úplnou sterilitu. Tyto poruchy jsou zpravidla podmíněny monogamně a při nesprávné organizaci reprodukčního procesu mohou svou frekvencí vážně ohrožovat celé chovy (Kudláč et al. 1977).

3.2.3 Stav plodnosti

Výskyt poruch plodnosti se v průběhu posledních 30 let postupně zvyšuje, a to především u mléčných krav v závislosti na zvyšující se užitkovosti (Hofírek et al. 2009). To přináší zvýšené požadavky především na včasný monitoring možných reprodukčních a zdravotních problémů (Bezdiček & Louda 2015). Na základě analýz rozsáhlých datových souborů lze konstatovat, že je zřejmý antagonistický vztah mezi mléčnou produkcí a reprodukcí u mléčného skotu (Dematawewa & Berger 1998; Hansen 2000).

Podle Loudy et al. (2006) je rychlý nárůst mléčné užitkovosti u dojných plemen skotu v posledních padesáti letech jedním z hlavních faktorů ovlivňující reprodukční výkonnost krav. Lze konstatovat, že nedostatečně geneticky fixovaná adaptace organismu na vysokou mléčnou užitkovost a s tím spojenou metabolickou zátěž se projevuje u plemenic zhoršením ukazatelů reprodukce a stupně zdraví.

Negativními trendy při vzrůstu dojivosti byly výrazné zhoršení reprodukčních ukazatelů a zkrácení dlouhověkosti, což má nesporně negativní ekonomické dopady. Například prodloužení servis periody o cirká 26 % z 99 dní (rok 1990) na 125 dní (rok 2003) a zkrácení produkčního věku krav cirká o 33 % nežřídka pod dvě laktace (Hanuš et al. 2006). Také podle Říhy et al. (2000) při zvyšování užitkovosti dochází často ke snižování schopnosti zvířat k reprodukci. Poruchy v reprodukci se většinou neprojeví u všech zvířat, ale u cca 10-15 % stáda. Sledováním trendů zabřezávání krav ukazuje, že v roce 1951 se březost po první inseminaci podle řady autorů pohybovala v průměru kolem 55-65 %. V současné době se březost po první inseminaci po spontánní říji pohybuje od 35-45 % (Louda et al. 2006).

Louda et al. (2006) dále zmiňuje, že základními faktory ovlivňující zabřezávání jsou podle Weigla (2003) management a vnější prostředí, které se podílí na zabřezávání až 96 %, dále pak genetické předpoklady dojnice, které se podílí na zabřezávání přibližně 3 %, a nejméně se na zabřezávání podílí plemeník, který prostřednictvím inseminační dávky ovlivňuje zabřeznutí jedním procentem. Zhoršené ukazatele plodnosti negativně ovlivňují ekonomické ukazatele výroby mléka a v chovech s neuspokojivou plodností zčásti nebo zcela eliminují ekonomické přínosy zvyšování užitkovosti krav (Burdych et al. 2004).

3.3 Řízení reprodukce a principy šlechtitelské práce

Současné poznatky o biologických zákonitostech reprodukčních funkcí ukazují, že neoptimálnější pro zabezpečení reprodukčního procesu a plné využití reprodukčních schopností skotu je komplexně zpracovaný systém řízení reprodukce včetně širokého využívání biotechnických metod reprodukce. Jejich prostřednictvím jsou dány veškeré základy k důslednému plánování, pravidelné realizaci a účinné kontrole reprodukčního procesu při jeho současné intenzifikaci (Kudláč & Holý 1984).

3.3.1 Základní principy šlechtění skotu

Šlechtěním skotu rozumíme cílené zlepšování genofundu populace skotu u sledovaných vlastností v požadovaném směru. Toho je dosahováno záměrným výběrem jedinců vhodného genetického založení pro dané vlastnosti do další generace (Skládanka et al. 2014). Cílem šlechtění je žádoucí změna genetického založení příslušných vlastností zvířat, které souvisí s ekonomikou jejich chovu (Stupka et al. 2013). Šlechtění je ekonomicky velmi efektivní činnost, která ovlivňuje ekonomiku chovu hospodářských zvířat na celostátní úrovni. Podstatou

šlechtění je dosahování genetického zisku, který se kumuluje ve sledu generací a přetrvává do budoucna. Šlechtění je nepřetržitý proces, který je v závislosti na nových poznatcích vědy a měnicích se podmínkách chovu průběžně upřesňován (Příbyl 1997).

Základní principy plemenářské práce v České republice jsou upraveny zákonem č. 154/2000 sb., neboli plemenářským zákonem a prováděcími vyhláškami. Primární zodpovědnost za šlechtění daného plemene nesou dle zákona uznaná chovatelská sdružení, tzv. svazy chovatelů, které vedou plemenné knihy a určují základní pravidla realizace příslušného šlechtitelského programu (Stupka et al. 2013).

Základem šlechtění je pak selekce, tedy výběr zvířat, které co nejvíce odpovídají stanovenému chovnému cíli (Stupka et al. 2013), Bouška et al. (2006) ale uvádí, že základem šlechtění je genetické hodnocení zvířat. Příbyl (1997) zmiňuje, že odhad plemenné hodnoty v návaznosti na kontrolu užítkovosti je základem pro výběr do plemenitby, a tedy současně i základem šlechtění hospodářských zvířat. Na základě selekce zvířat je dosahován genetický zisk.

3.3.1.1 Genetické hodnocení zvířat

Plemenná hodnota

Podle Příbyla (1997) je plemenná hodnota základem šlechtění hospodářských zvířat. Pojmem plemenná hodnota se rozumí odhad genetického založení jedince pro odchytku v užitkové vlastnosti od průměru vrstevníků. Jedná se o odhad, přestože se využívá soudobé nejlepší dostupné techniky jak laboratorní, tak výpočetní, neboť nikdy není úplná jistota správného verdiktu (Příbyl 1997). Skutečnou genetickou hodnotu zvířete pro užitkovou vlastnost totiž zjistit nelze, odhadnout však lze genetickým založením působený rozdíl v užítkovosti u jedinců ve srovnatelných chovatelských podmínkách. Tento rozdíl je vyjadřován právě plemennou hodnotou (Bouška et al. 2006).

Plemenná hodnota je tedy relativní číslo neboli odchylka, která se vztahuje pouze k těm vrstevníkům a k té populaci, ve kterém byla odhadnuta. Při odhadu plemenné hodnoty se vychází z testace a kontroly užítkovosti. Jedinec je porovnáván ke stejně starým vrstevníkům chovaných ve stejných podmínkách (Příbyl 1997). Na projevu užítkovosti se nejvíce podílí asi ze 60 % systematické činitele chovatelského prostředí, dále 30 % náhodné prostředí a na aditivně-genetické založení zbývá přibližně 10 %. Odhad PH proto spočívá především v „očistění“ údajů kontroly užítkovosti od vlivů prostředí (Bouška et al. 2006). Cílem je odhadnout rozdíly v genetickém založení jedinců co nej přesněji.

Na základě rozdílu užítkovosti od průměru užítkovosti vrstevníků (D) lze PH zjednodušeně stanovit podle:

$$PH = b \cdot D,$$

kde: PH – plemenná hodnota jedince

D – rozdíl užítkovosti od vrstevníků

b – (regresní) koeficient pro přepočítání odchylky užítkovosti na plemennou hodnotu.

Pomocí regresního koeficientu je rozdíl užítkovosti přepočten na genetickou hodnotu. Hodnota regresního koeficientu se odvíjí od počtu naměřených užítkovostí, na počtu vrstevníků a dědivost dané vlastnosti (Příbyl 1997). Tento způsob stanovení PH je ale v praxi těžko proveditelný, neboť na užítkovost souběžně působí velký počet činitelů. V posledních letech se stala standardem metoda „BLUP“ a její forma „individuální model jedince“ (animal model).

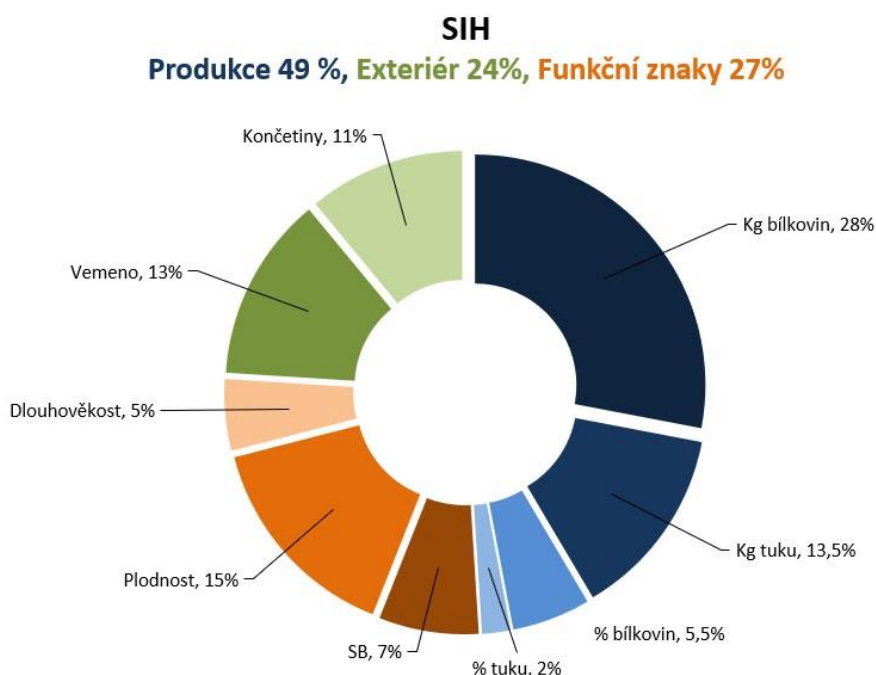
Tato metoda vede k řešení velkých soustav rovnic, pomocí kterých je při odhadu plemenné hodnoty zohledněn vliv chovatelského prostředí a současně jsou využity veškeré příbuzenské vztahy mezi zvířaty. To významně upřesňuje odhad PH, což se projevuje v zefektivnění celého procesu šlechtění. Lze takto stanovit PH všech zvířat bez ohledu na věk, třeba i právě narozených (Příbyl 1997).

Již od roku 1997 jsou v naší republice počítány plemenné hodnoty znaků mléčné užitkovosti za použití animal modelu, tedy modelu, který do výpočtu zahrnuje jak výsledek porovnání rozdílů mezi jedinci, tak také zohledňuje i vliv příbuzných, jak předků, tak potomků (Lorenc 2002). Přednost animal modelu spočívá v tom, že je možno odhadnout plemennou hodnotu jedinců na základě informací o užitkovosti jejich rodičů. Animal model se stal nejúčinnějším nástrojem k odhadu PH (Jakubec et al. 1999). V současné době je většina národních odhadů plemenných hodnot v chovatelských zemích pro různá hospodářská zvířata založena na tomto modelu (Skládanka et al. 2014).

Selekční index

Selekční index slučuje jednotlivé plemenné hodnoty do souhrnného ukazatele. Do selekčního indexu jsou kombinovány plemenné hodnoty takovým způsobem, aby byl co nejpřesněji předpovězen souhrn genetických hodnot jedince. Tato hodnota bývá vyjádřena ve finančních přínosech pro chovatele (Bouška et al. 2006). Seleční index shrnuje více selektovaných vlastností do jednoho čísla (Jakubec et al. 2010), vyjadřuje souhrnnou chovatelskou hodnotu zvířat, kde plemenná hodnota pro každou vlastnost je násobená ekonomickou hodnotou této vlastnosti. Tím je vyjádřena i ekonomická výhodnost pro chovatele (Příbyl 1997).

V chovu dojnic došlo k odklonu od jednostranného šlechtění na mléčnou produkci a současným cílem je vyvážené šlechtění a celkový genetický zisk. K dosažení tohoto cíle se využívá selekční index. Souhrnný selekční index pro holštýnský skot byl zaveden do rutinní praxe v roce 2004 pod názvem index SIH (Motyčka et al. 2005). Souhrnný selekční index SIH je založen na ekonomické bázi a je sestaven tak, aby plně vyhovoval českým podmínkám a byl tak vhodným nástrojem pro šlechtění holštýnského skotu. Proto je dle potřeby zdokonalován a upravován podle aktuálních doporučení. V roce 2020 došlo k mírné úpravě vah produkčních znaků SIH (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2020). Aktuální hodnota SIH je znázorněna na Obrázku 2.



Obrázek 2: Souhrnný selekční index holštýnského skotu

Zdroj: <https://www.holstein.cz/cz/slechteni#slozeni-sih>

Genomické hodnocení

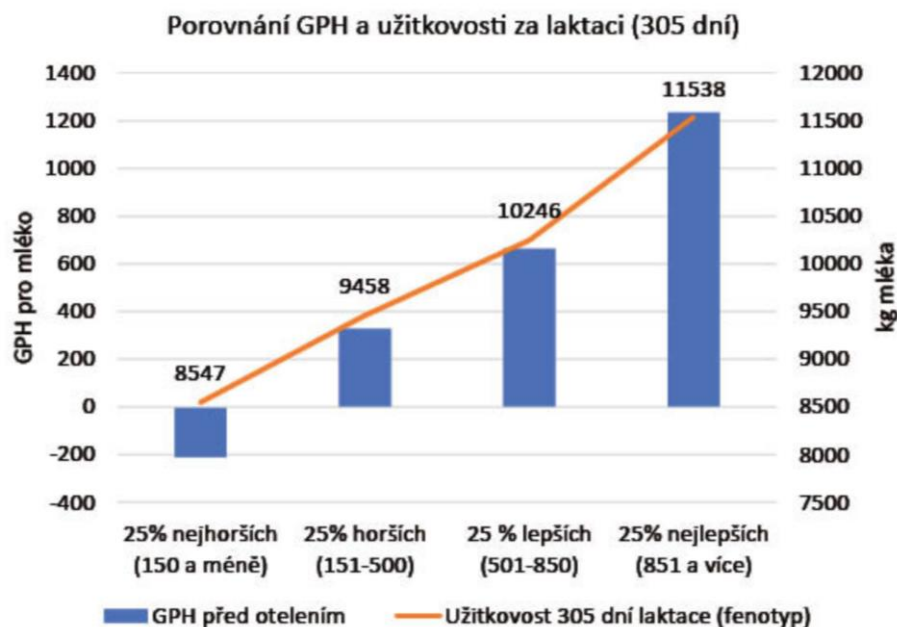
V současné době dochází k mohutnému rozvoji molekulární genetiky a jejímu konkrétnímu uplatnění ve šlechtitelské práci. V chovu skotu tak můžeme pozorovat uplatnění například genomické selekce, která umožňuje uplatnění pozitivních genů, a tak zintenzivnění selekce v raném věku (Jakubec et al. 2010). Genomická selekce představuje zásadní pokrok ve šlechtění skotu (Skládanka et al. 2014). Je to metoda, která kombinuje informace z tradičních plemenných hodnot s informacemi zjištěnými z DNA (Ondráková 2015). V každém případě je užitečným nástrojem ve šlechtění zvířat, který je ale potřeba využívat se znalostí jeho předností, ale i omezení. Dokáže zpřesnit rodokmenovou hodnotu mladých zvířat již v jejich velmi raném věku a tedy dříve, než dochází k výběru do plemenitby (Ondráková 2015).

Genomická selekce je založena na odhadu plemenných hodnot, které byly získány s využitím genotypování celého genomu zvířat (Skládanka et al. 2014). Při genomickém hodnocení se využívá bodových mutací tkz. SNP (Single nukleotide polymorphism), neboli jednonukleotidových polymorfismů v genomu skotu. U těch se můžeme pokusit stanovit jejich rozdílný vliv a tím odlišit genetickou hodnotu jednotlivých zvířat. Těchto bodových mutací se v DNA nachází velké množství, hovoří se asi o 25-30 milionech SNP v genomu skotu (Ondráková 2015). Jednotlivé SNP se genotypizují, jejich efekty jsou odhadovány v modelu a výsledná plemenná hodnota jedince je získána součtem jednotlivých efektů (Skládanka et al. 2014).

Jedna z největších výhod genomické selekce je, že dokáže odhadnout plemennou hodnotu u právě narozených telat, nebo dokonce i u embryí (Niemann & Seemark 2018). Při využití genomické plemenné hodnoty je možné značně zredukovat generační interval (Skládanka et al. 2014). Genomika dává selekci nové možnosti. Vypočtené genomické plemenné hodnoty slouží k rané selekci jalovic a výběru zvířat pro další chov. Chov holštýnského skotu se tak dostává na vyšší genetickou úroveň v poměrně krátkém čase a generační interval se výrazně zkracuje.

Genomická selekce umožňuje nejen zvýšení parametrů užitkovosti, ale i zlepšení exteriéru a zdravotních ukazatelů zvířat a stáda (Jelínková 2021).

Od zavedení genomiky se genetický zisk v holštýnské populaci více než zdvojnásobil. Genomika pomohla zpřesnit selekci, zvýšit její intenzitu při zachování variability a zkrátila generační interval (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2017). Porovnání genomických plemenných hodnot a užitkovosti za laktaci nabízí Obrázek 3.



Obrázek 3: Porovnání genomických plemenných hodnot a užitkovosti za laktaci

Zdroj: Jelínková (2021)

Nevýhodou využití genomické selekce může být zvýšení inbreedingu. V populaci holštýnských krav se zavedením genomické selekce zvýšil inbreeding na trojnásobek. Konkrétně z 0,10 % ročně před zavedení genomizace v letech 2003 až 2008, až na 0,31 % ročně v letech 2013 až 2018 po zavedení genomického hodnocení (Hošková et al. 2020). S příchodem genomické selekce došlo k rapidnímu meziročnímu nárůstu koeficientu příbuznosti, v Severní Americe o 0,33 % a celosvětově 0,36 %. Genomická selekce totiž přináší intenzivní využívání top genomických býků a kratší generační interval, což přispívá ke každoročnímu zvyšování koeficientu příbuznosti v populaci (Ondráková 2015).

Na druhou stranu přidání většího počtu genotypovaných krav do referenčních populací mléčného skotu má potenciál zvýšit genetický zisk a snížit příbuzenskou plemenitbu bez ohledu na velikost referenční populace (Thomassen et al. 2020). Využití genomických informací k řízení populace je pro chovatele dojnic velkou příležitostí, jak urychlit genetické zlepšování a minimalizovat dopady spojené se zvýšenou úrovní příbuzenské plemenitby (Howard et al. 2017).

3.3.1.2 Selekcce

Ve šlechtění je selekce klíčovým nástrojem (Jakubec et al. 2010). Selekcí jsou do plemenitby zařazeni pouze jedinci s vysokou plemennou hodnotou, kteří ve sledovaných vlastnostech vysoce převyšují své vrstevníky (Příbyl 1997). Selekcí jedinců pro další plemenitbu nemůžeme provádět přímo na základě fenotypu, který je zjišťován kontrolou

užitkovosti, ale na základě dědičného založení jedince, které je definováno plemennou hodnotou (Jakubec et al. 1999).

Účinnost selekce, která se zpravidla měří dosaženým genetickým ziskem, závisí na intenzitě selekce a na její přesnosti. U skotu se intenzita selekce liší podle kategorie rodičů, které se dělí na otce plemenných býků, matky plemenných býků, otce krav a matky krav. Největší intenzita selekce je možná u nejméně početné kategorie, tedy u otců plemenných býků a nejmenší u nejpočetnější kategorie, tedy matek krav – dojnic (Stupka et al. 2013). Význam jednotlivých úseků selekce závisí na výši plemenné hodnoty a délce generačního intervalu příslušného úseku. S tím souvisí i vhodnost investic do jednotlivých úseků selekce. Úsek přenosu genů od matek na dcery má téměř zanedbatelný vliv na zušlechťování stád a plemene. Největší podíl zlepšování je přes plemeníky (Bouška et al. 2006), viz. Tabulka 4.

Tabulka 4: Význam úseků selekce vyjádřený v procentech

| | (%) |
|-------------------------|-----|
| Otcové plemeníků | 39 |
| Otcové dcer | 26 |
| Matky plemeníků | 32 |
| Matky dcer | 3 |

Zdroj: Boušek et al. (2006)

Rodiče plemeníků, tedy matky a otcové býků musí splňovat přísná kritéria výběru, a proto by měly patřit mezi 1–2 % nejlépe ohodnocených rodičů umístěných podle PH na vrcholu žebříčku (Příbyl 1997).

Selekce otců plemeníků

Přesnost odhadu PH je u nich vysoká, takže přesnost selekce je rovněž velmi vysoká. Intenzita selekce je velmi vysoká, neboť pro produkci synů jsou využíváni pouze celosvětově nejlepší plemeníci daného plemene (Urban et al. 1997). K produkci synů by měli být využiti býci ze skupiny nejlepšího 1 % z hodnocených populací. Při výběru otců býků je nutné zohlednit zjištěné nositelství nežádoucích genů nebo sledovaných dědičných vad (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

Selekce matek plemeníků

Přesnost selekce je poměrně vysoká. Intenzita selekce je velmi vysoká, protože je využíváno 1-3 % nejlepších plemenic v populaci, a jsou využívána selekční kritéria zohledňující více vlastností (Urban et al. 1997). Například u domácí populace holštýnského skotu je základní selekční kritérium pro výběr matek plemeníků selekční index SIH a genomický selekční index gSIH. Na skladbě matek býků se podílejí všechny dostupné zdroje – domácí populace jalovic a krav, jalovice a krávy narozené z dovezených embryí z předních zahraničních holštýnských populací a jejich dcery, příp. vnučky. Na produkci býčků pro plemenitbu se budou i nadále podílet plemenice narozené z importovaných embryí (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019). Matky plemeníků je vhodné zapustit špičkovým komplexně prověřeným plemeníkem, s vysokou PH ve všech sledovaných vlastnostech a vysokou spolehlivostí. Je zde velká pravděpodobnost, že potomstvo takto vybraných rodičů bude opět velmi kvalitní (Příbyl 1997).

Další dvě kategorie, tedy selekce otců a matek dcer, již v daleko větší míře ovlivňují jednotliví chovatelé daného plemene (Urban et al. 1997). Šlechtitelské chovy bez návaznosti na chovy uživatelské, které od nich odebírají genetický materiál nemají opodstatnění (Příbyl 1997).

Přenos selektovaných znaků – dědičnost, dědivost a korelace

Při výběru konkrétních selekčních znaků je nutné brát v potaz stanovený chovný cíl. Selektované znaky musí mít dostatečně vysokou dědičnost, tím lze očekávat uspokojivou míru selekčního efektu (Urban et al. 1997). Většina hospodářsky důležitých vlastností je ovlivněna velkým počtem genů malého účinku, jejichž počet neznáme a nevíme, kde jsou přesně na chromozomech umístěny, jejich působení na uživatelskou se sčítá (Bouška et al. 2006). Míra genetického zlepšení je rozhodující měrou závislá na podílu aditivního působení genů na celkové proměnlivosti znaku a charakterizuje míru dědivosti dané vlastnosti (Motyčka et al. 2005). Rozmezí nejčastěji publikovaných hodnot koeficientů heritability (h^2) u holštýnského skotu uvádí Tabulka 5.

Tabulka 5: Koeficienty heritability vybraných znaků u holštýnského skotu

| Znak | h^2 | Znak | h^2 |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Dojivost | 0,2-0,3 | Hmotnost krav v dospělosti | 0,4-0,6 |
| Produkce tuku | 0,2-0,3 | Výška v kohoutku | 0,4-0,6 |
| Produkce bílkovin | 0,2-0,3 | Březost | 0,0-0,1 |
| Procento tuku | 0,5-0,6 | Zabřezávání | 0,0-0,1 |
| Procento bílkovin | 0,5-0,6 | Délka mezidobí | 0,0-0,2 |
| Perzistence laktace | 0,2-0,5 | Délka života | 0,1-0,3 |
| Dojivost na vrcholu laktace | 0,2-0,4 | Konverze krmiv | 0,3-0,4 |
| Dojitelnost | 0,3-0,6 | Odolnost proti mastitidám | 0,2-0,3 |
| Délka březosti | 0,3-0,5 | Celkový zevnějšek | 0,1-0,3 |
| Porodní hmotnost telat | 0,3-0,5 | Obsah somatických buněk | 0,1-0,2 |
| Dlouhovýkonnost | 0,2-0,3 | Obtížnost porodů | 0,0-0,1 |

Zdroj: Motyčka et al. (2005)

Další zásadou je zvážení genetických korelací mezi vlastnostmi, na které chceme zvířata selektovat. Selektace jedné vlastnosti může ovlivňovat selekci jiného znaku. Buď dojde k pozitivní nebo negativní reakci. Poslední zásadou šlechtění je výběr pouze nejnütnějších selektovaných znaků, protože se zvyšujícím se počtem selektovaných znaků se odezva selekce snižuje (Urban 1997). Výběr zvířat podle určitého znaku se neprojevuje pouze změnou tohoto znaku, ale i změnou dalších vlastností, které jsou se znakem ve vztahu, tzn. existuje mezi nimi genetická závislost neboli korelace, která může mít kladnou nebo zápornou hodnotu.

O zařazení znaku jako selekčního kritéria v rámci příslušného šlechtitelského programu však nerozhodují pouze hodnoty genetických parametrů, ale také možnost a nákladnost sledování a hodnocení znaku a jeho ekonomická hodnota nebo vztah k ekonomice chovu (Motyčka et al. 2005).

3.3.2 Řízení reprodukce v chovatelských stádech

Řízenou reprodukcí skotu se rozumí systematická kontrola a ovlivňování pohlavních funkcí jalovic a krav v pozitivním slova smyslu a zaměření na rychlou, kontinuální a potřebám výroby odpovídající produkci zdravých telat (Kudláč & Holý 1984). Řízení stáda pak představuje soubor opatření, procesů a rozhodnutí, která vytvářejí podmínky chovu a produkce zvířat. V širším slova smyslu se za součást řízení stáda pokládá i šlechtitelská práce ve stádě.

Šlechtění stáda pak sleduje zlepšování genetického založení zvířat z hlediska jejich produkčních a funkčních vlastností, které přímo nebo nepřímo souvisí s ekonomikou chovu. Cílem šlechtitelské práce ve stádě dojníc je dosažení co nejvyšší efektivity chovu prostřednictvím zlepšování plemenné hodnoty chovaných zvířat pomocí selekce a kombinace rodičů dalších generací potomků, především jalovic pro obměnu stáda nebo nákupem chovných zvířat nebo zárodků (Bouška et al. 2006).

Je nutné si uvědomit, že pro dobrého chovatele skotu existuje pouze jediná cesta zabezpečující prosperitu, a to neustálé zlepšování genetického potenciálu stád a jeho racionální využívání (Urban et al. 1997). V rámci chovu hospodářských zvířat je pro chovatele nejefektivnější šlechtitelská práce, neboť její jak krátkodobý, tak dlouhodobý efekt je ekonomicky mnohem výhodnější než vlastní produkce. Jednotlivý chovatel ovlivňuje šlechtění především nákupem chovných zvířat a výběrem plemenů pro své stádo (Příbyl 1997).

3.3.2.1 Selektce ve stádě

Cílem selekce je výběr nejvhodnějších zvířat k reprodukci stáda z hlediska dosažení co největšího genetického zisku ve směru k chovnému cíli s co nejmenšími náklady, jednoduše řečeno, co největšího ekonomického efektu (Bouška et al. 2006). Selektční program představuje soubor organizačních opatření, která prostřednictvím řízené plemenitby zajišťují zvyšování genetické úrovně chovaného plemene. Výchozím bodem je stanovení selektčního cíle, aby byl v souladu s ekonomickými potřebami chovatelů (Příbyl 1997).

V souladu s chovným cílem si chovatel s ohledem na kvalitu stáda stanoví selektční kritéria, podle nichž bude vybírat býky a plemence pro reprodukci. Jako selektční kritérium může být zvolen jeden nebo více znaků. V souvislosti se snižováním účinnosti selekce s rostoucím počtem znaků je nejvhodnější použití souhrnného selektčního indexu (Bouška et al. 2006).

Míra genetického zlepšení stáda je přímo úměrná intenzitě a přesnosti selekce uplatněné především při výběru býků pro inseminaci chovaných plemenic a nepřímo úměrná délce generačního intervalu (Bouška et al. 2006). Genetického zlepšení stáda můžeme dosáhnout vhodným výběrem krav a býků (Lorenc 2002). Na vybrané plemence se určí vhodní plemenci a pro stádo se připraví tzv. přípařovací plán (Stupka et al. 2013).

Selektce býků dcer

Cesta genetického zlepšení pomocí selekce býků je významnější, rychlejší a efektivnější, protože technologie zmrazování a uchovávání inseminačních dávek spolu s technologií umělé inseminace a pokročilými metodami kontroly dědičnosti umožňují vyvíjet enormní tlak na zvyšování genetického zisku a využívání těch nejlepších plemenů (Lorenc 2002).

Vlastní výběr plemenů k inseminaci plemenic ve stádě se řídí zvoleným cílem na základě analýzy stáda a podle zaměření chovu. K omezení nežádoucího působení inbreední deprese je nutné při výběru rodičovských párů zohlednit koeficient příbuznosti

u předpokládaného potomstva, který by neměl překročit 12,5 % (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

Při šlechtění stáda je výběr plemeníků rozhodujícím faktorem pro zajištění potřebného genetického pokroku. Zde rozhodujeme v nejvyšší míře o budoucí genetické úrovni stáda, tedy o vlastní výši realizovaného selekčního zisku ve stádě (Urban et al. 1997).

Selekce matek dcer

Vzhledem k tomu, že dojnice zůstávají v ČR ve stádě v průměru necelé tři laktace, lze při úspěšnosti odchovu 80 % získat za život krávy maximálně jednu otelenou jalovici. Ta má ale od své matky jen 50 % genů a do následných generací se podíly předávaných genů stále půlí (Boušek et al. 2006). Proto je výsledný efekt selekce na tomto úseku nejnižší (Boušek et al. 2006; Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR 2019).

I přestože význam selekce na tomto úseku je nízký, chovatel by měl znát krávy, které patří mezi nejlepších 5 % krav ve stádě (Lorenc 2002).

3.3.2.2 Obrat stáda

Základní stádo krav je každoročně obnovováno, to znamená doplňováno o vysokobřezí jalovice, které nahradí vyřazené dojnice (Stupka et al. 2013). Podle Bouška et al. (2006) je odchov jalovic od krav základního stáda rozhodujícím nástrojem reprodukce stáda. Tato potřeba obnova stáda je dána tím, že skot je uniparní a má dlouhý generační interval (Stupka et al. 2013).

Dobře fungující obrat stáda zabezpečí po celý rok pravidelný přísun dostatku jalovic, takže si chovatel bude moci dovolit vyřazovat plemenice i z jiných důvodů než z důvodu zdravotních (Lorenc 2002). K zabezpečení reprodukce stáda je třeba dostatečný počet narozených telat, tj. ve stádě musí být dostatečná natalita (Stupka et al. 2013).

Při zabezpečování obratu základního stáda je významná intenzita obratu, tedy procentický podíl vyřazovaných krav. V jednotlivých podnicích je velice rozdílný a v dojených stádech se pohybuje v širokém rozpětí asi 18 % až 40 %. Za intenzivní obrat základního stáda lze považovat obměnu stáda okolo 35 %. Mezi výhody takového obratu lze označit rychlejší zvyšování genetického základu ve stádě pro požadovanou produkci. Současně je nutno poukázat i na nedostatky intenzivního obratu stáda. Snižuje se dlouhověkost stád a nevýhodou jsou také vysoké odpisy na obnovu základního stáda, protože náklady na odchov jalovice od narození až do prvního otelení jsou převedeny do kategorie dojnic. Při zkrácení doby chovu, tedy i nižší celoživotní užitkovosti, je kráva zatížena stejným nákladem na odchov jalovice, jako kráva dlouhověká, s vysokou celoživotní užitkovostí a tím je vyšším podílem zatížen také každý litr vyprodukovaného mléka (Stupka et al. 2013).

3.3.3 Vývoj šlechtění skotu

Šlechtění skotu, jeho účinnost i zaměření byly během předchozího půlstoletí ovlivněny především rutinním rozšířením biotechnických metod a aplikací statisticko-matematických metod při odhadu plemenných hodnot zvířat na základě údajů od velkého počtu potomstva hodnocených zvířat.

Jednoznačně nejvýznamnější bylo rozšíření umělé inseminace, které kromě omezení přenosu chorob umožnilo nesrovnatelně vyšší intenzitu selekce a zpřesnění genetického hodnocení na základě prověřování býků podle potomstva. Významnou roli sehrává také

od 70. let minulého století rutinně využívaná superovulace a přenos embryí. Technologie MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) přispěla především ke zkrácení generačního intervalu a zpřesnění selekce na základě většího počtu potomků krav.

Schémata tzv. nukleových stád s juvenilní nebo adultní variantou podle věku zvířat při selekci a věku plemenic při získávání a přenosu jejich zárodků, přinesla řadu špičkových plemenů a potenciálních matek býků a jsou dosud především v otevřené formě využívána jako součást úspěšných šlechtitelských programů. Vyšší efektivnost šlechtění lze také očekávat od dalšího rozvoje biotechnických a molekulárně genetických metod (Motyčka et al. 2005).

3.4 Biotechnologické metody v chovu skotu

Asistovaná reprodukce neboli biotechnologie reprodukce představuje ovlivňování reprodukčních funkcí zvířat v podmínkách in vivo nebo manipulace s gametami a embryi v podmínkách in vitro s cílem kontroly a řízení využívání genetického potenciálu a reprodukce zvířat (Hofírek et al 2009). Hlavním cílem využití reprodukční biotechnologie u mléčného skotu je zvýšení produkce, reprodukční výkonnosti a míry genetického zlepšení (Bedasa et al. 2017). Řada biotechnologických postupů se dnes již uplatňuje běžně v praxi. Slouží například ke zvýšení efektivnosti produkce, jsou využívány rovněž pro zachování genových rezerv a také k zvyšování kvality produkce (Skládanka et al. 2014).

Aplikace biotechnologií v oblasti reprodukce a šlechtění hospodářských zvířat přináší nové možnosti, jak zintenzivnit selekční tlak (Machatková et al. 2021). Vývoj nových a účinnějších metod reprodukčních biotechnologií umožňujících efektivnější využití pohlavních buněk geneticky cenných jedinců je jedním ze základních předpokladů rychlého dosažení specifických cílů v chovu skotu. Na základě efektivnější produkce samčích i samičích gamet a mezinárodní výměny genetického materiálu lze urychlit genetický zisk, zlepšit kvalitu stávajících živočišných produktů (Machatková et al. 2016), rozšířit kombinace rodičovských párů a orientovat populaci zvířat požadovaným směrem pomocí specifických šlechtitelských strategií (Machatková et al. 2021). Reprodukční technologie mohou také být použity ke kontrole reprodukčních onemocnění, pokud jsou přesně dodržovány postupy a protokoly (Madan 2002).

V průběhu let se objevilo mnoho metod řízení reprodukce. Umělá inseminace a konzervace spermatu jsou významné a hojně využívané technologie. Hodnocení oplozovací schopnosti spermií, sexování spermií, synchronizace říje, superovulace, přenos embryí (ET) a in vitro produkce embryí (IVP) jsou dalšími technikami, které mohou zlepšit reprodukční účinnost (Madan 2002). Vedle inovace dnes již rutinně používaných biotechnologií, jako jsou umělá inseminace a systém MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer), je nezbytné začlenit do procesu šlechtění skotu technologicky náročnější metody, především metodu OPU/IVP/ET a kombinovat je s dalšími metodami, jako je selekce dárců gamet na základě genomiky a sexování spermií (Machatková et al. 2016).

Reprodukční biotechnologie již výrazně zvyšují užitkovost domácích zvířat (Niemann & Seamark 2018). Například produkce embryí pomocí MOET nebo OPU/IVP a následná kryokonzervace vedla k transportu špičkové genetiky po celém světě, a tím ke globalizaci šlechtitelských programů. Přeprava embryí je jednodušší, levnější a umožňuje lepší řízení rizika přenosu chorob ve srovnání s přepravou živých zvířat (Wagtendonk-de Leeuw 2006). Také

umělá inseminace, moderní metody odhadu plemenné hodnoty a nověji i genomická selekce přispěly k rychlému genetickému pokroku v chovu mléčného skotu (Hošková 2020).

3.4.1 Provozně využívané reprodukční biotechnologie

Praktický dopad řízené reprodukce a využívání biotechnických metod spočívá kromě zlepšení výsledků a zvýšení efektivnosti reprodukčního procesu i ve zjednodušení péče a úspoře pracovních sil, jmenovitě při detekci říje, vytváření turnusů a provádění turnusové inseminace, ve vytváření podmínek pro frontální inseminaci, průběh synchronizovaných porodů apod. Samozřejmým předpokladem zavádění a systematického využívání systému řízené reprodukce včetně reprodukční biotechniky je plné respektování biologických zákonitostí a fyziologických zvláštností pohlavních funkcí a celého reprodukčního procesu u skotu. Řízená reprodukce nenahrazuje nedostatky v chovu a vedení reprodukčního procesu, nepřinese užitek a nesplní očekávání, jestliže je prováděna neodborně, povrchně a nesystematicky bez zřetele na biologické zákonitosti v průběhu reprodukčních funkcí (Kudláč & Holý 1984).

3.4.1.1 Umělá inseminace

Biotechnické opatření, které více než 50 let slouží chovatelům ke zlepšování stád, je inseminace skotu. Vývoj technologie inseminace spolu se zdokonalováním metod odhadu plemenné hodnoty umožnily vypracování a realizaci moderních dlouhodobých selekčních programů (Říha et al. 1999). V současné době se umělá inseminace používá u více než 90 % všech pohlavně dospělých samic mléčného skotu v zemích s vyspělými šlechtitelskými programy (Comizzoli et al. 2000; Comizzoli & Holt 2014).

Až do zavedení umělé inseminace v první polovině dvacátého století byl pokrok v selekci a šíření vynikajících genotypů konvenčními šlechtitelskými postupy velmi pomalý (Niemann & Seemark 2018). Rozšíření umělé inseminace skotu po druhé světové válce znamenalo pro šlechtění základní změnu. Postupně se snížil počet potřebných býků na zajišťování reprodukce stád a mohl být značně zvýšen selekční tlak na kvalitu zařazovaných býků do plemenitby, zvýšil se také počet potomků od špičkových býků (Louda et al. 2008). Selektce býků podle objektivních ukazatelů plemenné hodnoty přispěla k rychlému zvyšování kvality býků působících v inseminaci a promítala se následně i do kvalitativního zlepšování samicí populace. Není zvláštností, že dokonale prověřený býk metodou animal model, tj. odhadem plemenné hodnoty na všechny vlastnosti a znaky, má v populaci 100 000 i více potomstva (Říha et al. 1999).

Zavádění umělé inseminace bylo zpočátku pomalé, ale dramaticky se zrychlilo po vývoji metod pro konzervaci spermatu, po snížení rizika přenosu pohlavních nemocí zařazením antibiotik, a především po vývoji účinných postupů zmrazování a kryokonzervace spermií v polovině dvacátého století (Niemann & Seemark 2018). Také podle Loudy et al. (2008) byl další krok ve změně technologie inseminace, který od základu změnil postupy šlechtění skotu, zavedení technologie hlubokého zmrazování spermatu. Technologie hlubokého mrazení spermatu a výpočetní techniky umožnila rozvoj moderních metod kontroly dědičnosti a realizaci šlechtitelských programů.

Výhody umělé inseminace jsou zřejmé – úspora nákladů na chov býků, vyšší bezpečnost práce, využívání kvalitnějších býků a rychlejší prověření mladých býků, tedy rychlejší postup

šlechtitelské práce a omezení přenosu infekčních chorob, zejména pohlavních nákaz (Bouška et al. 2006). Ball & Peters (2004) uvádějí, že problém s detekcí říje je limitujícím faktorem umělé inseminace ve stádech skotu. Také Šichtař (2018) zmiňuje, že i když je inseminace zvládnutá metoda plemenitby, přesná predikce ovulace je v praxi stále hlavní překážkou.

Rutinní odběr spermatu od býků dojných plemen začíná až po jejich osvědčení zpravidla okolo šesti let věku. Většina odběrů spermatu se provádí přivedením býka k ejakulaci pomocí umělé vagíny, která je konstruována tak, aby simulovala kravskou vagínu (Ball & Peters 2004). Mezistěna umělé vagíny je naplněna vodou o takové teplotě, aby při odběru uvnitř vagíny dosáhla 38-40 °C. Před použitím se umělá vagína vymaže sterilní vazelínou a mezi stěny se dofoukne vzduch tak, aby tlak činil přibližně 530 kPa. Umělá vagína je opatřena jednorazovým sběračem, který slouží pro sběr ejakulátu (Louda et al. 2007). Obvykle je odběr prováděn při vzeskoku býka na atrapu, jako např. na vola, neříjící se krávu nebo jiného býka, který vzeskok umožní. Býci jsou také někdy cvičeni na vzeskok na umělé fantomy, které mohou nahrazovat živé atrapy. Většina býků je odebírána asi dvakrát týdně během jejich produkčního života, který obvykle trvá 5-6 let. Pokud je ejakulát odebírán příliš často, tak se jeho objem a kvalita sníží při každé ejakulaci (Ball & Peters 2004).

Hodnocení a zpracování odebraného ejakulátu se provádí ve specializované laboratoři, základní vyšetření ejakulátu musí být zahájeno do 10 minut po odběru, celkové hodnocení spermatu je vícestupňové. Hodnocení a zpracování ejakulátu provádí laborant specialista. Základní charakteristiky ejakulátu u býků odebíraných na inseminační stanici: objem ejakulátu 3-12 cm³, koncentrace spermií 0,8-2 x 10⁶ v mm³, celková produkce spermií v ejakulátu 5-15 x 10⁹, aktivita – progresivní pohyb vpřed za hlavičkou 45-75 % i více, pH 6,4-7, patologické spermie do 5 výjimečně až 20 % (Louda et al. 2007). Ejakulát sloužící k výrobě inseminačních dávek je zkoumán a prověřován předepsanými laboratorními zkouškami. Na jejich základě se poté stanoví stupeň ředění (Louda et al. 2008).

Jako základní parametry kvality se také hodnotí konzistence, která by měla být hustá a zrnitá, barva by měla být mléčná až smetanová, zápach by měl připomínat čerstvě nadojené mléko a hodnotí se také přítomnost příměsí, kterých musí být sperma prosté. Sperma vyhovující požadavkům se poté ředí speciálními ředidly, které spermiím zajišťují výživu a ochranu. Následně se zchladí a po několika hodinách stabilizace se zmrazí na finální teplotu tekutého dusíku -196 °C. Inseminační dávky se v současnosti zmrazují do formy pejet, které jsou na povrchu označené jménem a registrem býka, místem a datem své výroby (Bouška et al. 2006). Pro běžné chovatelské účely lze nyní z jednoho ejakulátu býka vyrobit v průměru 200-300 inseminačních dávek, které se uchovávají zmrazené po neomezenou dobu (Comizzoli et al. 2000; Comizzoli and Holt 2014).

Před samotnou inseminací se musí pejeta s inseminační dávkou rozmrazit. Pejeta se rozmrazí ve vodní lázni o teplotě asi 35 °C, minimální doba rozmrazování u pejet o objemu 0,25 ml je 7 vteřin a 15 vteřin u pejety o objemu 0,5 ml. Pejeta, které se poté odstříhne zatavený konec, je nasazena do inseminační aparatury. Doba od rozmrazení do inseminace nesmí překročit 15 minut (Burdych et al. 2004). Inseminace by měla být provedena co nejpřesněji v období říje, kdy má hlen děložního krčku a dělohy největší baktericidní účinky, tento hlen navíc zvyšuje životaschopnost spermií. Nejvhodnější čas pro inseminaci začíná 10 až 15 hodin

po začátku pravé říje (Říha et al. 2004). Předpokladem maximální úrovně zabřezávání je, aby plemenice byly inseminovány v průběhu druhé poloviny říje, takže asi 6-10 hodin po zjištění příznaků říje (Hofírek et al. 2009). Stupka et al. (2013) zmiňuje, že plemenice s detekovanou říjí ráno se zapouštějí tentýž den, zvířata s detekovanou říjí odpoledne se inseminují druhý den ráno. Nezachycená nebo špatně určená říje má za následek, že se inseminace buď neprovede vůbec, anebo se provede v nesprávný čas, což způsobuje značné ekonomické ztráty (Říha et al. 2004).

Samotná inseminace se v současnosti provádí metodou rektální. Inseminátor do rozevřených stydkých pysků zasune inseminační katetr, poté druhou ruku zasune do rekta plemenice a rukou v rektu se snaží nasunout děložní krček na konec katetru, který je již v pochvě zavedený. Inseminační dávka je deponována do kraniální části krčku, na rozhraní krčku a dělohy. V případě, kdy se provádí opakovaná inseminace a březost plemenice nejde vyloučit, se katetr zavádí pouze do poloviny děložního krčku. Pokud jsou vnější příznaky říje patrné ještě 8-12 hodin po první inseminaci, je potřeba provést reinseminaci (Bouška et al. 2006).

Umělá inseminace zůstává nejrozšířenější a nejvíce používanou technologií a stále hraje ústřední roli v šíření cenné samčí genetiky po celém světě. V současnosti se používá ve většině chovů hospodářských zvířat, především u dojného skotu, kde se v zemích s moderními šlechtitelskými postupy více než 90 % mléčného skotu produkuje pomocí umělé inseminace (Niemann & Seamark 2018). Inseminace hospodářských zvířat představuje i v současné době nejefektivnější způsob přenosu požadovaných nejlepších genetických vlastností a informací do populace daného druhu, plemene, nebo chovu. Do inseminace jsou vybíráni potomci rodičů s ověřeným původem s nejvyšší plemennou hodnotou pro požadované užitkové znaky u daného plemene, vycházející ze strategie šlechtitelského programu (Louda et al. 2008). Je možno bez nadsázky říci, že inseminací se zvýšilo využití přirozeného samčího potenciálu. V samičí populaci se však pokrok nedostavil, například u skotu celoživotní produkce dosahovala trvale 3 až 4 telat (Říha et al. 1999).

3.4.1.2 Synchronizace říje a ovulace

Největšího rozšíření z řady biotechnických metod ovlivňujících neurohumorální řízení reprodukčního cyklu dosáhla synchronizace říje a ovulace (Říha et al. 1999). Do termínu synchronizace spadají všechna biotechnologická opatření, která mají u skupiny zvířat navodit říje v dopředu naplánovaném a co možná nejkratším časovém úseku (Skládanka et al. 2014). Využívání různých metod synchronizace říje v chovech skotu je běžné a velmi časté. Nejčastějším důvodem k použití této metody je nízká úroveň detekce říje, a tak potřeba usměrnění ovulace do přesného termínu, který umožňuje předem načasovanou inseminaci zvířete (Hofírek 2009). Synchronizace říje je možnost jak zefektivnit detekci říje a při použití protokolů pro zpřesnění doby ovulace dokonce nutnost detekce říje odpadá. To je nespornou výhodou, protože vizuální vyhledávání říjících krav je časově velmi náročné a může být i poměrně problematické. V posledních 50 letech se snížilo procento krav, které vykazují reflex nehybnosti z 80 na 50 % a taktéž se zkrátila samotná doba, kdy je možné pomocí tohoto reflexu krávy detekovat z 15 na 5 hodin (Šichtař 2018).

Při vývoji této biotechnické metody bylo nutné vycházet ze znalosti poměrů při přirozené říji a ovulaci. Do řízení říje a ovulace zasahují releasing hormony hypothalamu (GnRH), gonadotropní hormony hypofýzy (FSH, LH), specifické ovariální hormony (estrogen, inhibin, progesteron), a sekretorická činnost dělohy (prostaglandin F 2 alfa-PGF 2 alfa). Uplatňují se pozitivní i negativní zpětné vazby (Říha et al. 1999). Při ovlivňování pohlavního cyklu a říje je základním předpokladem zachování přirozeného sledu hormonálních změn a reakcí organismu souborně označovaných jako „count down“. Konkrétně jde o nenarušení kaskády změn v hormonálních hladinách vedoucích k nástupu říje a ovulace (Kudláč & Holý 1984). Při synchronizaci říje se count down uskutečňuje u jednotlivých plemenic nebo celých skupin plemenic po podání účinných farmak tak, aby se říje dostavila v určitém čase (Říha et al. 1999).

Samotnou synchronizaci je možné provést prodloužením nebo zkrácením luteální fáze a docílit tak, aby konec luteální fáze a posléze nástup folikulární fáze proběhl u vybrané skupiny dojnic současně. Jedná se o dvě skupiny farmak, která specificky zasahují do luteální fáze estrálního cyklu. Progesteron a progestageny fázi prodlužují tím, že brzdí po dobu svého působení nástup folikulární fáze estrálního cyklu. A naopak hormon PGF 2 alfa a jeho analogy luteální fázi estrálního cyklu zkracují tím, že působí regresi žlutého tělíska, pokles hladiny progesteronu a tím podmiňuje nástup folikulární fáze estrálního cyklu (Urban et al., 1997).

Metody synchronizace založené na prodloužení luteální fáze využívají přirozených nebo syntetických steroidních hormonů ze skupiny gestagenů. Jejich podávání simuluje plnou funkčnost žlutého tělíska a brzdí nástup folikulární fáze (Urban et al. 1997). Gestageny prodlužují luteální fázi estrálního cyklu tak, aby u všech ošetřených zvířat mohlo dojít k přirozené regresi žlutého tělíska (Říha et al. 1999). K synchronizaci říje gestageny se používá celá řada analogů progesteronu tzv. progestagenů. Způsoby podání gestagenů se různí. Je možno je podávat v krmné dávce, v podkožních implantech, nebo v poševních tamponcích. Ošetření gestageny je často doplňováno na začátku ošetření estradiolem nebo na konci ošetření je aplikován PGF 2 alfa. Také se v některých případech podává na konci ošetření PMSG, který stimuluje folikulární zrání a ovulaci (Říha et al. 1999). Po přerušení aplikace gestagenů dochází k náhlému poklesu jejich hladiny, což vyprovokuje řídicí hormonální centra k indukci nové říje (Bouška et al. 2006). Výsledky ukazují, že je dosahováno vyššího synchronizačního efektu a že nástup ovulace je exaktnější než při použití PGF 2 alfa (Říha et al. 1999). Podle Šichtaře (2018) říje při užití vaginálních insertů nastupuje u téměř 90 % plemenic za 36-72 hodin po ukončení hormonální terapie. Současně ale doporučuje po vyjmutí insertu, který se zpravidla aplikuje 7-12 dní, aplikovat luteolytikum k rozrušení žlutého tělíska. Pokud se totiž začalo s aplikací insertu v rané fázi luteálního vývoje, fyziologické žluté tělísko mohlo přetrvat. Urban et al. (1997) ale zmiňuje, že aplikace steroidních hormonů zvířatům určeným pro produkci živočišných produktů je vždy spojováno s možností určitých zdravotních rizik pro spotřebitele produktů. I z těchto důvodů se pro synchronizaci říje u skotu využívá spíše druhé metody založené na zkrácení luteální fáze.

Metoda založená na zkrácení luteální fáze využívá schopnosti některých látek ze skupiny prostaglandinů narušit funkci žlutého tělíska. Aplikace prostaglandinu navodí předčasnou regresi plně funkčního žlutého tělíska a umožní tak časnější nástup folikulární fáze, říje a ovulace (Urban et al. 1997). Po regresi žlutého tělíska dojde k poklesu hladiny

progesteronu a následně k akceleraci růstu a zrání dominantního folikulu (Šichtař 2018). Při synchronizaci říje pomocí PGF 2 alfa je předpokladem efektivního výsledku cyklující plemence a aplikace musí být provedena v době, kdy má žluté tělísko receptory na PGF 2 alfa (Říha et al. 1999). Proto je vhodné, aby plemence byla před aplikací prostagladinu vyšetřena rektální palpací nebo sonograficky na přítomnost žlutého tělíska. Vyšetření je nutné doplnit také detekcí březosti, protože během březosti může podání prostogladinu způsobit zmetání, či předčasný porod (Urban et al. 1997). Prostaglandin v jedné aplikaci bývá podáván v injekční formě do svalu a pokud je podán v luteální fázi, tedy mezi 4. až 17. dnem pohlavního cyklu, lze očekávat nástup říje za 48, ale častěji až za 72 hodin po injekci (Urban et al. 1997). Říha et al. (1999) uvádí, že vhodný termín je od 5. do 17. dne cyklu a říje se poté dostaví za 3 až 4 dny, kdy je vhodné plemenci inseminovat. Podle Šichtaře (2018) je ideální 8.-16. den aplikace. Systém jedné aplikace je účinný tehdy, byla-li detekována říje a ovulace byla potvrzena zjištěním žlutého tělíska. Zejména u vysokoužitkových krav mléčných plemen se doporučuje pracovat vždy s detekcí říje. V případě, že se detekce říje neprovádí, je vypracován systém dvou aplikací, a to po 11 dnech. Je však známo, že ani při použití dvou aplikací se nedostaví říje u 100 % ošetřených cyklujících plemenic. Také nástup říje není u všech plemenic současný, proto je doporučován systém dvou inseminací v době 72 a 96 hodin po aplikaci (Říha et al. 1999). Urban et al. (1997) uvádí, že říje se dostavuje dva až tři dny po druhé injekci. Zabřezávání jak u jednorazové, tak u opakované aplikace se pohybuje kolem 45-50 %, u jalovic asi 70 % (Šichtař 2018).

Celkově je možno říci, že i když synchronizace říje plemenic skotu je běžně používána, není znám ani jeden systém, který by byl efektivní ve všech situacích. V každém případě lze indukovat říji, v případě skupinového chovu synchronizovat říji a tím lze dosáhnout úspory času v důsledku snížené četnosti detekce říje (Říha et al. 1999). Synchronizace říje umožňuje snížit pracnost a počet pracovníků potřebných k výběru říjících se zvířat při současném zkrácení potřebné doby k jejich inseminaci, umožňuje také tvorbu turnusů, skupinovou výživu, progresivnější a racionálnější využití umělé inseminace, stabilizuje výsledky inseminace a efektivitu celého reprodukčního procesu (Kudláč & Holý 1984).

Kromě postupů modifikujících nástup říje byly vyvinuty i protokoly zpřesnění doby ovulace, neboť problém s nízkou úspěšností detekce říje vyvolává potřebu usměrnění ovulace do přesného termínu, který umožňuje předem načasovanou inseminaci. Principem protokolů modifikujících čas ovulace je synchronizace folikulárního vývoje, vyvolání regrese žlutého tělíska, dále následuje indukce ovulace a provedení inseminace v předem určeném časovém horizontu. Obecně lze říci, že v protokolech synchronizující ovulaci se pro kontrolu folikulární růstové dynamiky a regulace estrálního cyklu využívají přípravky na bázi GnRH, prostagladinu F2 alfa, progesteronu a případně estradiolu (Šichtař 2018).

Podle Šichtaře (2018) je nejběžnější synchronizační protokol Ovsynch, který se skládá ze tří injekcí GnRH, PGF2a a následně znovu GnRH. Jako první je aplikován GnRH, za 7 dnů poté prostaglandin, za 2-3 dny GnRH, a do 24 hodin následuje inseminace. I přesto, že první dávka GnRH může být aplikována v libovolné fázi cyklu, je doporučováno zahájit synchronizaci za přítomnosti žlutého tělíska v první polovině luteální fáze, tedy 5.–11. den cyklu (Čech 2012). Podle Šichtaře (2018) je každopádně nutné, aby v případě prvního podání GnRH v libovolné fázi cyklu byl na ovariu přítomen dominantní folikul větší než 10 mm. Druhá

aplikace GnRH se pak provádí v intervalu 48–72 hodin po ošetření prostaglandinem, nejlépe však za 56 hodin. Tento postup zaručuje vysokou míru ovulace do 24 hodin po inseminaci, kolem 90 % krav (Čech 2012). Podle Šichtaře (2018) je inseminace časována do období 12-16 hodin po druhé aplikaci GnRH a 45-65 % krav ovuluje. Vasconcelos et al. (1999) ale zjistil, že po druhé aplikaci GnRH ovulovalo celkově 87 % krav.

V současné době je pro zefektivnění reprodukce popsána řada programů presynchronizace, synchronizace i resynchronizace a jejich různé modifikace. Výběr správného protokolu závisí na mnoha faktorech, ovšem vždy by se měly využívat u reprodukčně zdravých, tedy cyklujících krav (Šichtař 2018). Podle Skládanky et al. (2014) patří mezi další synchronizační programy například Pre-Synch, CIDR, PRID, Co-Synch a Re-Synch.

Synchronizační programy zavádí systém do řešení reprodukce, můžou být využity při léčbě problematických anovulatočních plemenic a díky nim se zvyšuje počet inseminovaných krav, a tím index březosti, tj. počet březích krav za určité období (Skládanka et al. 2014). Další indikace k použití synchronizace říje v chovech skotu představuje synchronizaci pohlavního cyklu mezi dárkyní a příjemkyní v rámci transferu embryí (Hofírek et al 2009).

3.4.2 Embryotransfer a superovulace

Po prvním úspěšném přenosu savčích embryí v roce 1890 trvalo přibližně 60 let, než byl zaznamenán významný pokrok v základní technologii přenosu embryí (ET) u skotu (Hasler 2014). Intenzivní rozvoj embryotransferu nastal po zavedení nechirurgického přenosu embryí v polovině 70. let 20. století (Skládanka et al. 2014). Technologie pak pokročila natolik, že bylo možné podporovat založení komerčních programů ET v několika zemích. Dnes jsou dobře zavedené a spolehlivé techniky zahrnující superovulaci, získávání a přenos embryí, kryokonzervaci a in vitro fertilizaci celosvětově využívány ve stovkách, ne-li tisících komerčních podnicích v mnoha zemích (Hasler 2014).

Metoda přenosů embryí zasahuje do procesu reprodukce a šlechtění, pevné místo našla i při zdokonalování genofondu populací či jednotlivých stád (Říha et al. 1999). Hlavním cílem embryotransferu je produkovat více potomstva od vynikajících rodičovských párů při současném zkrácení generačního intervalu. Využívání přenosu embryí ve šlechtění přináší reálný genetický zisk a tím i ekonomický efekt pro chovatele i dané plemeno. Využívání ET u dojených plemen je zaměřeno na genetické zvyšování úrovně chovaných plemen, zkrácení generačního intervalu, možnost zisku embryí od jalovic nezatížených produkcí ještě před zařazením do klasického reprodukčního procesu (Stádník et al. 2013). Technologie je nejvíce využívána u matek býků, s cílem získat větší počet synů do plemenitby (Louda et al. 2008).

Vyvolání vícečetné ovulace hormonálním ošetření donorky, její inseminace a výplach i přenos získaných embryí do synchronizovaných příjemkyní dnes patří k běžně používaným metodám šlechtění (Machatková 2006). Vzhledem k tomu, že embrya skotu získaná in vivo mohou být promytím zbavena specifických patogenů, jsou ideálním prostředkem pro přenos genetiky zvířat po celém světě (Bó & Mapletoft 2018).

Charakteristickým rysem metody ET je její komplexnost, zahrnuje totiž několik dílčích postupů (Říha et al. 1999). Příprava vychází z obecných principů a zahrnuje výběr dárkyně a synchronizaci pohlavního cyklu, superovulační ošetření, inseminaci a reinseminaci,

synchronizaci pohlavních cyklů příjemkyň na vývojové stádium embrya a 7. den po 1. inseminaci odběr embryí a přenos čerstvých embryí (Stádník et al. 2013).

Výběr dárkyň

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 (Hofírek et al. 2009). Výběr dárkyň pro reprodukci vlastního stáda provádí sám chovatel, pro účely celopopulačního šlechtění určuje kritéria chovatelský svaz. V každém případě vybrané dárkyně musí splňovat dané zdravotní podmínky, důležitý je výběr podle vynikajících reprodukčních funkcí. Celkově musí být dárkyně ve výborné kondici, aby její regulační endokrinní mechanismy zvládly nefyziologickou hormonální stimulaci. Velký vliv na efektivnost ET má také reprodukční management v chovu, důležitá je přesná detekce říje a nezbytné je předcházet jakýmkoliv stresovým situacím (Říha et al. 1999). Základní podmínkou pro provedení a efektivitu odběru je superovulace dárkyně (Kudláč & Holý 1984).

Superovulace

Nárůst folikulu na vaječníku a jeho ovulace jsou řízeny hormony ze skupiny gonadotropinů, vylučovaných do krve z podvěsku mozkového. Uměle zvýšené hladiny gonadotropinů v těle plemenice mohou navodit růst vícečetné populace folikulů a jejich ovulaci – superovulaci (Urban et al. 1997). Superovulace tedy označuje uměle vyvolaný růst, zrání a ovulaci většího počtu folikulů než při přirozené říji (Hofírek et al. 2009). Přirozeně v každém estrálním cyklu ovulují jeden až dva oocyty. Naproti tomu v případě superovulace je to až 20 oocytů (Říha et al. 1999).

Superovulace vyžaduje aplikaci přípravků na bázi gonadotropinů schopných imitovat efekt folikul-stimulačního hormonu (FSH). Důležité je, aby hormony působily delší dobu a umožnily růst folikulů a dozrání oocytů, což je základním předpokladem úspěšného oplodnění (Stádník et al. 2013). Nejčastěji se pro účely superovulace používají gonadotropiny ze séra březích klisen (PMSG) nebo hypofyzární folikuly stimulující hormon (FSH). Gonadotropin je podáván zvířeti injekčně uprostřed luteální fáze estrálního cyklu, za optimální je považováno období mezi 8. až 12. dnem cyklu (Urban et al. 1997). Podle Říhy et al. (1999) je vhodná doba k ošetření mezi 9. až 13. dnem cyklu, optimálně však 11. den a před zahájením ošetření je nutné diagnostikovat přítomnost žlutého tělíska na ovariu.

PMSG stačí podat v jedné dávce, má dlouhý poločas biologické aktivity a koluje v krvi zvířete dostatečně dlouho, aby navodil růst folikulů (Urban et al. 1997). Nevýhoda dlouhého poločasu rozpadu je, že má za následek tvorbu cyst, což má negativní dopad na oplozenost oocytů, motilitu vejcovodu a kvalitu získaných embryí (Říha et al. 1999).

FSH má poločas biologické aktivity podstatně kratší, a proto bývá podáván injekčně dvakrát denně po dobu čtyř až pěti dnů (Urban et al. 1997). Častá aplikace je pro zvířata zdrojem stresu, na který hlavně vysokoužitková zvířata velmi citlivě reagují. Preparáty s FSH se vyrábí extrakcí vepřových a ovčích hypofýz (Říha et al. 1999).

Pro ovulaci folikulů je nezbytné luteální fázi přerušit, proto bývá 48 hodin po aplikaci PMSG nebo zároveň s pátou dávkou FSH podáván syntetický analog prostaglandinu. Říji lze očekávat spíše za 48 než za 72 hodin po podání prostaglandinu (Říha et al. 1999).

Superovulaci lze provádět u dárkyň embryí opakovaně, schopnost dárkyň reagovat opakovaně na superovulační stimulaci je ale individuální (Říha et al. 1999). Opakovaná superovulační léčba jalovic nebo krav má vedlejší účinky na plodnost (vznik cystických syndromů, potíže se zabřeznutím) a na vazy vemene, které mohou u výstavních zvířat povolit a zhoršit morfologii. U mladých jalovic může superovulační léčba způsobit nadměrný předčasný vývoj vemene, který může ohrozit budoucí výstavní možnosti dárkyně (Galli et al. 2003). Při superovulaci je třeba vždy předpokládat velkou variabilitu superovulační odpovědi, odpověď dárkyň nemusí být vždy dostatečná (Říha et al. 1999). U některých donorek nelze vyvolat odpovídající odezvu na hormonální preparáty, u jiných dochází po opakované stimulaci ke snížení odezvy, zhoršení kvality získaných embryí nebo prodloužení doby potřebné pro začlenění donorky zpět do reprodukce (Machatková 2006). Poměrně vysoká pracnost ošetření a téměř 100% variabilita výsledků staví superovulaci do role nejslabšího a nejméně stabilního článku metody (Říha et al. 1999). Podle Loudy (2001) 15 až 20 % potenciálních dárkyň nereaguje na provedenou superovulaci. Polyovulace dárkyň (superovulace) je prozatím hlavním zdrojem vhodných embryí k přenosu (Skládanka et al. 2014). Úspěšná superovulace je limitujícím faktorem pro široké uplatnění přenosů embryí (Hofírek et al. 2009; Stádník et al. 2013; Skládanka et al. 2014).

Synchronizace cyklů a inseminace

Přesná synchronizace pohlavního cyklu dárců a příjemců je dalším limitujícím faktorem, protože pro přijetí přenášeného embrya dělohou příjemce a další normální vývoj embrya je nezbytné, aby u dárce i příjemce embryí byla stejná fáze ovariálního cyklu, aby u obou zvířat bylo děložní prostředí odpovídající stáří přenášeného embrya (Hofírek et al. 2009).

V říji je nezbytné věnovat velkou pozornost inseminaci a reinseminaci dárkyň. Ta by měla být provedena kvalitním semenem v optimálním stadiu říje, nejčastěji 12 až 24 hodin po začátku říje (Urban et al. 1997). Doba a počet inseminací superovulované dárkyně rozhoduje o počtu oplozených oocytů. Nástup říje i následná ovulace probíhá u superovulované dárkyně většinou dříve. Vzhledem k tomu, že dochází k vícečetné ovulaci vždy v průběhu delšího časového období, je třeba provádět opakovaně reinseminaci (Louda 2001). Reinseminace se tedy provádí ve dvanáctihodinových intervalech tak dlouho, dokud neodezní poslední příznaky říje. Obvykle se inseminuje 3x v intervalu dvanácti hodin (Hofírek et al. 2009).

Výplach a přenos embryí

Na začátku metody byly výplachy i přenosy embryí prováděny metodou chirurgickou po celkové anestézii zvířat. Intenzivní rozvoj embryotransferu nastal až po zavedení nechirurgického přenosu embryí (Hegedušová et al. 2010). Bylo zjištěno, že nechirurgickým výplachem se získává 70 až 90 % embryí od superovulovaných dárkyň. Pro největší zisk embryí je rozhodující vybavení a zručnost pracovníků, ale také den výplachu po inseminaci s ohledem na umístění embryí v samičím pohlavním traktu (Říha et al. 1999).

Odběr embryí se provádí 7. den po první inseminaci dárkyně, kdy se převážná část embryí nachází v kraniální třetině rohu děložního ve stadiu moruly až blastocysty. Před výplachem je třeba posoudit úroveň odpovědi na superovulaci (Hofírek et al. 2009). Palpací se zjišťuje počet žlutých tělísek na vaječnicích, dárkyně s odpovědí jedna až dvě CL se zpravidla nevyplachují (Říha et al. 1999). Příprava dárkyně k odběru embryí spočívá v její fixaci

a provedení epidurálního znecitlivění (Hofírek et al. 2009). Technik poté zavádí vyplachovací katetr děložním krčkem přes tělo děložní do rohu děložního. Katetr se fixuje v rohu děložním latexovým balonkem naplněným přiměřeným množstvím vzduchu. Vyplachuje se horní část rohu děložního vymezená fixačním balonkem. Využívá se komerční medium, medium je vpouštěno do rohu děložního a po propláchnutí je výplach filtrován (Skládanka et al. 2014). Podle Mertona et al. (2003) lze očekávat průměrně pět přenositelných embryí na jeden výplach. Boland et al. (1991) zmiňuje, že v průměru se získá čtyři až šest kvalitních přenositelných embryí z jednoho odběru.

Získaná embrya jsou po určení stádia rozdělena na embrya určená k přenosu a ke zmrazení. K přenosu jsou nejvhodnější embrya ve vývojových stádiích kompaktní morula, časná blastocysta a blastocysta. Čerstvá embrya jsou přenesena do recipientek, které byly v průběhu hormonální přípravy synchronizovány a jsou ve stejné fázi ovariálního cyklu jako dárkyně (Stádník et al. 2013). Počty zabřeznutí po ET jsou částečně závislé na tom, zda je nástup říje u příjemkyň synchronní s nástupem říje u dárkyně embrya, rozdíl by neměl být více než 24 hodin (Hasler et al. 1987). Při přenosu jsou embrya uložena v plastových trubičkách, samotný přenos se provádí přes děložní čípek pomocí delší verze aparatury používané pro umělou inseminaci. Používá se i podobná technika, jen se více dbá na to, aby nedošlo ke kontaminaci inseminační pistole v pochvě. Embryo je také uloženo co nejhluběji do dělohy (Ball & Peters 2004). Embrya se přenáší do ipsilaterálního děložního rohu k vaječníku s dostatečně vyvinutým žlutým tělískem (Stádník et al. 2013).

Metoda embryotransferu zahrnuje i manipulaci s embryi, jejich izolaci, hodnocení, dekontaminaci, krátkodobé a dlouhodobé uchovávání, zmrazování a vitrifikaci. (Říha 1999) Burdych et al. (2004) zmiňuje, že metoda přenosu embryí umožňuje také mikrochirurgické dělení embryí, stanovování pohlaví embryí, tvorbu chymér a produkci transgenních a klonovaných embryí.

MOET - Multiple Ovulation and Embryo Transfer

Superovulace a embryotransferu využívají šlechtitelské programy MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer, tj. mnohonásobná ovulace a embryotransfer) (Říha et al. 1999). Systémy MOET vycházejí ze selekce uvnitř elitních stád – nukleů, vytvořených z nejlepších zvířat z vlastních, případně i cizích populací. Tyto systémy kombinují možnosti přenosu embryí s výhodami malého chovného stáda a umožňují intenzivní využívání nejlepších samců i samicích zvířat, vytvoření vybraných stád, testování zvířat a vypracování přípařovacích plánů s využitím přenosu embryí. Zavedení systémů MOET přináší možnost zvýšení genetického zisku díky zkrácení generačního intervalu, zvýšení genetické úrovně nukleových stád, objektivní kontrolu užitkovosti a úrovně chovu a možnost usnadnění aplikace nových biotechnologických metod v reprodukci a šlechtění. Nevýhodou pak zůstává nižší intenzita selekce, snížení přesnosti odhadu plemenné hodnoty a vysoká ekonomická náročnost (Šafus 2001).

Výsledky a využívání

Díky metodě embryotransferu je možné produkovat více potomstva od vynikajících plemenic. Je možno získat embrya od jalovic, stejně tak jako od starších krav, které by z různých důvodů nebyly schopny telata donosit. Pomocí ET je možno dosáhnout produkce identických a neidentických dvojčat, produkovat telata masných plemen skotu od krav mléčných plemen

s nízkou užítkovostí a poměrně rychle vybudovat specializovaná čistokrevná stáda z malého počtu importovaných jedinců. Zanedbatelné není ani zvýšení příjmu z prodeje embryí. Plánovitě a záměrně prováděný přenos embryí maximálně zkracuje čas nutný k vyhodnocování býků kontrolou dědičnosti. Využívání ET v moderních a kvalitních genetických programech šlechtění má za následek reálný genetický zisk a tím i nesporný ekonomický efekt (Říha et al. 1999).

Výsledky embryotransferu jsou však velmi variabilní, třetina dárkyň nereaguje na superovulaci, další třetina produkuje v průměru jedno až tři embrya a pouze jedna třetina skutečně superovuluje a poskytuje velký počet embryí (Boland et al. 1991). Říha et al. (1999) uvádí, že ročně lze získat opakovanou superovulací od jedné donorky až 25 embryí. Průměrně je to však 10 embryí na donorku (Machatková et al. 2016).

Technologie přenosu embryí je dnes nedílnou součástí moderních koncepcí šlechtění skotu a je široce využívána po celém světě (viz Tabulka 6 a 7). Přestože technologie přenosu embryí umožňuje lepší využití samičího genetického potenciálu než umělá inseminace, stále se používá pouze u 1-2 % nejlepších plemenic (Niemann & Seamark 2018). Přenos embryí v souvislosti s rozvojem dalších biotechnologií bude i nadále působit pozitivně z hlediska šlechtění, zejména u dojených plemen skotu (Stádník et al. 2013).

Tabulka 6: Počet odběrů embryí v podmínkách in vivo v letech 2014 a 2020 celosvětově dle oblasti

| Oblast | Odběr in vivo | | | | | |
|------------------------|---------------|---------------------|-----------------------|--------|---------------------|-----------------------|
| | Výplachů | Přenositelná embrya | Počet embryí na odběr | Odběrů | Přenositelná embrya | Počet embryí na odběr |
| | 2014 | | | 2020 | | |
| Afrika | 794 | 5782 | 7,28 | 359 | 2763 | 7,7 |
| Asie | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 |
| Evropa | 22 408 | 137 998 | 6,16 | 20 430 | 126 491 | 6,19 |
| Severní Amerika | 58 934 | 397 306 | 6,74 | 31 291 | 196 704 | 6,29 |
| Oceánie | 1326 | 5224 | 3,94 | 883 | 4211 | 4,79 |
| Jižní Amerika | 11 204 | 68 154 | 6,08 | 5428 | 31 559 | 5,81 |
| Celkově | 94 666 | 614 464 | 6,49 | 58 391 | 361 728 | 6,19 |

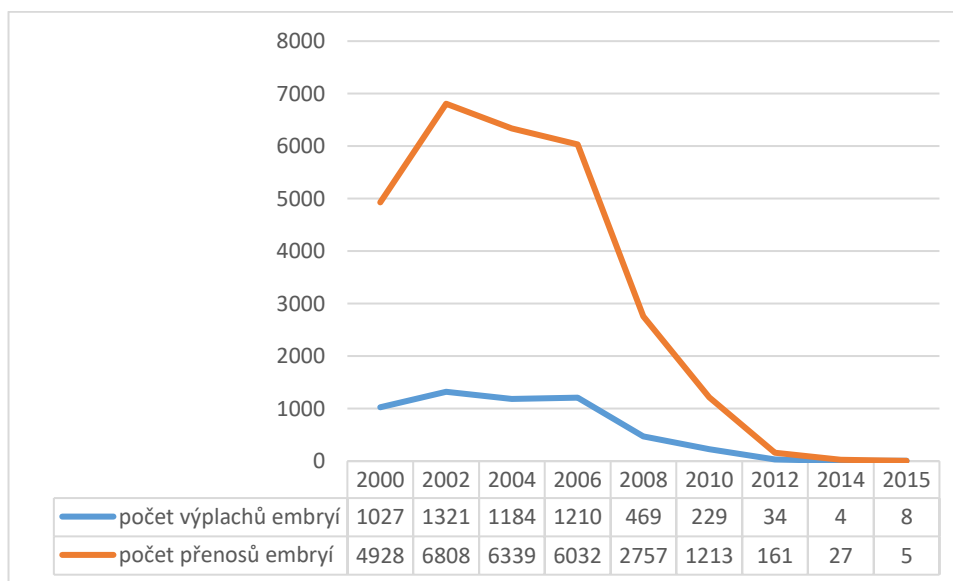
Upraveno podle: IETS (2015), IETS (2020)

Tabulka 7: Počet přenosů embryí v podmínkách in vivo v letech 2014 a 2020 celosvětově dle oblasti

| Oblast | Přenos embryí in vivo | | | | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|----------------|
| | Přenos čerstvých embryí | Přenos zmražených embryí | Přenosi celkem | Přenos čerstvých embryí | Přenos zmražených embryí | Přenosi celkem |
| | 2014 | | | 2020 | | |
| Afrika | 4455 | 944 | 5399 | 1224 | 1450 | 2674 |
| Asie | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Evropa | 59 546 | 63 434 | 122 980 | 44 362 | 48 449 | 92 811 |
| Severní Amerika | 107 700 | 163 646 | 271 346 | 62 016 | 106 710 | 168 726 |
| Oceánie | 2391 | 2180 | 4571 | 1374 | 2393 | 3767 |
| Jižní Amerika | 27 868 | 32 418 | 60 286 | 10 367 | 16 325 | 26 692 |
| Celkově | 201 960 | 262 622 | 464 582 | 119 343 | 175 324 | 294 670 |

Upraveno podle: IETS (2015), IETS (2020)

Česká republika patřila v roce 2000 mezi dvanáct nejlepších evropských zemí podle počtu embryí získaných a přenesených v podmínkách in vivo (IETS 2001). Obrázek 4 znázorňuje vývoj počtu výplachů a přenosů embryí in vivo v letech 2000-2015 v České republice.



Obrázek 4: Vývoj počtu výplachů a přenosů embryí in vivo v letech 2000-2015 v České republice

Zdroj dat: IETS (2001), IETS (2003), IETS (2005), IETS (2007), IETS (2009), IETS (2011), IETS (2013), IETS (2015), IETS (2016)

3.4.3 Produkce embryí in vitro (IVP) a in vitro fertilizace (IVF)

Historicky je název embryí produkovaných v laboratoři spojen s prvními pokusy o oplození vajíčka spermii laboratorních zvířat, které byly prováděny “ve skle”, což v latinském překladu znamená výraz *in vitro* (Říha et al. 1999). Produkce embryí in vitro je u skotu alternativní biotechnologickou metodou, kdy můžeme získat geneticky cenná embrya především od vysokoužitkových krav, které nejsou schopné reprodukce pomocí konvenčních biotechnik (Hofírek et al. 2009). Pojem produkce embryí in vitro (IVP) obecně označuje proces získávání embryí mimo tělo matky. Zahrnuje in vitro maturaci (IVM) a in vitro fertilizaci (IVF) oocytů a in vitro kultivaci (IVC) embryí. Oocyty je možné odebírat od živých dárkyň, kdy již prodělaly maturaci in vivo, nebo se oocyty získávají také z jatečných vaječníků, které vyžadují maturaci in vitro (Andrlíková et al. 2018).

První tele vyprodukované ze systému IVM-IVF-IVC se narodilo v roce 1987. V zahraničí je IVP v poslední době nedílnou součástí šlechtitelských programů v chovu skotu a je běžně využívána v komerční sféře společně s transferem embryí, kde jsou přednostně využívány oocyty odebírané od živých dárkyň (Andrlíková et al. 2018). Získávání oocytů za podmínek in vivo aspirací oocytů z folikulů u živých zvířat a následná in vitro produkce embryí výrazně zvyšuje využití genetického potenciálu vybraných zvířat (Hofírek et al. 2009). Metody přípravy embryí skotu v systému in vitro patří mezi reprodukční biotechnologie, které přispívají k efektivnějšímu využívání gamet geneticky cenných jedinců a zvyšují produkci potomstva od rodičů zařazených do šlechtitelských programů (Machatková et al. 2021). Fertilizace oocytů a příprava embryí in vitro (IVF) také umožňuje významně omezit používání hormonálních preparátů (Machatková 2006). IVP poskytuje chovatelům skotu zejména v mlékárenském průmyslu nové možnosti, jak překonat neplodnost a zvýšit rozšíření zvířat s vysokou genetickou hodnotou (Wrenzycki 2018). V našich podmínkách se IVP běžně v praxi neprovádí (Andrlíková et al. 2018).

Účinnost metody produkce embryí in vitro ovlivňuje řada faktorů. Je to především celkový a reprodukční stav dárkyň, kvalita oocytů, média, postupy pro zrání a fertilizaci oocytů, i techniky kultivace embryí (Hofírek et al. 2009).

Odběr oocytů

Oocyty lze získat jak za podmínek in vitro, tak za podmínek in vivo. Odběr oocytů in vitro je prováděn po porážce zvířete, zatímco u in vivo metody se jedná o odběr z živých dárkyň (Hofírek et al. 2009).

Při získávání za podmínek in vitro jsou vaječníky odebírány po porážce zvířete (Hofírek et al. 2009). V tomto případě je IVP jedinou možností, jak získat embrya od cenných dárců určených k porážce, vyřazených z důvodu sterility, nebo jiných důvodů (Lazzari & Galli 1993). Vaječníky odebírány po porážce zvířete musí být transportovány do laboratoře, k tomu může sloužit několik postupů. Hofírek et al. (2009) uvádí možnost vaječníky uložit do média Dulbecco obohaceného antibiotiky při teplotě 37 °C. Hasler et al. (1997) zase uvádí možnost transportovat vaječníky z jatek umístěním odebraných vaječníků do plastového sáčku bez kapaliny a přepravit je v izolované bedně, při teplotě 28 °C. Sanbuissho & Threlfall (1989) vaječníky do 10 minut po usmrcení dárkyň vložil do fyziologického roztoku o teplotě 37 °C, kde byly nejvýše 3 hodiny před samotným odběrem oocytů. Obecně jsou oocyty velmi citlivé

na teplotu, proto je důležité pečlivě sledovat teplotu během odběru a transportu (Galli et al. 2003).

Základními technikami pro odběr oocytů z ovaríí vyřazených krav jsou aspirace pomocí vakua, disekce folikulů nebo totální disekce ovariálního kortexu (Machatková et al. 2009).

Aspirace oocytů s folikulární tekutinou z folikulů je nejjednodušší postup. Oocyty se odebírají z folikulů o velikosti 2-8 mm pomocí tenké jehly a injekční stříkačky, nebo za použití aspirační pumpy (Hofírek et al. 2009). Hlavní výhodou aspirace je možnost odběru oocytů z folikulů požadované velikosti a stupně atresie. Nevýhodou je nižší počet oocytů získaných na donorku a větší časová náročnost (Machatková et al. 2009).

Disekce folikulů je pracnější metoda, která spočívá v preparaci jednotlivých folikulů a jejich následného naříznutí speciálním skalpelem. Tento způsob poskytuje oocyty excelentní kvality (Hofírek et al. 2009).

Totální disekce ovariálního kortexu neboli tzv. slicing, je metoda, při níž je povrch vaječníku nařezáván rovnoběžně pomocí žiletek a vytékající folikulární tekutina s oocyty je oplachována médiem do Petriho misky (Hofírek et al. 2009). Vyšší počet oocytů získaných na donorku v relativně kratším čase je hlavní předností techniky totální disekce, tato metoda však neumožňuje selekci jednotlivých folikulů (Machatková et al. 2009).

Počet oocytů získaných na donorku post mortem je vysoce variabilní, většinou kolísá mezi 5 až 50, stejně jako kvalita a relativní vývoj embryí je velmi rozdílný (0-66,6 %). Průměrně je možno izolovat 25 oocytů na donorku a při vhodné kombinaci rodičů lze post mortem získat průměrně 5 přenosuschopných embryí (Machatková et al. 2016). Galli et al. (2003) ve své práci zmiňuje, že podle Lazzari & Galli (1996) výsledky z hlediska produkce embryí souvisejí i s důvody porážky dárkyně. Výsledek je obvykle slabý (jedno až dvě embrya na dárkyni) u zvířat již uhynulých nebo u zvířat nacházejících se v kritickém celkovém zdravotním stavu. V případě porážky zdravých dárkyň je výsledek mnohem lepší s průměrnou produkcí šesti nebo více přenositelných embryí na dárkyni.

Odběr oocytů in vivo, tedy od živých zvířat, je výhodný díky možnosti opakovaného odběru, případně dalšího využití dárců v reprodukci. Dříve používané chirurgické metody byly nahrazeny zejména metodami punkce folikulů pomocí laparoskopie nebo ultrazvuku (Hofírek et al. 2009).

Obecným závěrem ale je, že laparoskopický přístup k odběru oocytů je poměrně komplikovaný a vyžaduje speciální prostředky a sterilní operační postupy, stejně jako zklidnění nebo celkovou anestezii. Invazivní povaha laparoskopie omezuje četnost jejího provádění a může vést ke vzniku jizev a srůstů (Gordon 2003).

Ultrazvukem naváděný odběr oocytů je méně invazivní, snižuje stres zvířete a je snadněji přizpůsobitelný pro použití na farmě než jiné metody (Gordon 2003). V současnosti je nejčastěji používanou metodou odběru oocytů transvaginální ultrazvuková punkce neboli OPU (ovum pick up) (Hofírek et al. 2009). Tato metoda bude podrobně rozebrána v samostatné kapitole 3.4.4.

Počet izolovaných, morfologicky kvalitních oocytů má rozhodující význam pro získání embryí (Machatková 2006).

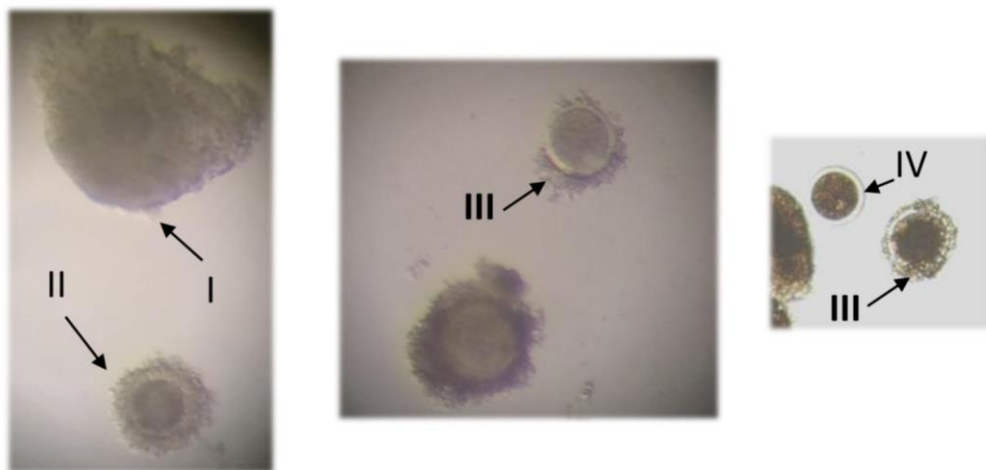
Hodnocení oocytů

Oocyty se po odběru hodnotí a selektují na základě comulus-oocyt komplexu. Buňky kumulu se podílí na zrání oocytu, zajišťují jeho nutriční požadavky a zprostředkovávají i řadu důležitých signálů přicházejících z oocytu (Říha et al. 1999). Pro hodnocení oocytů se používá několik systémů, většina závisí na vizuálním subjektivním hodnocení laboratorního pracovníka. Ten klasifikuje oocyty na základě kompaktnosti a množství okolních folikulárních buněk a dalších morfologických znaků, které jsou viditelné světelným mikroskopem (Gordon 2003). Například Andrlíková et al. (2018) použila ve své práci klasifikaci kumulů oocytárních komplexů modifikovanou podle Leibfrieda a Firsta (1979), viz. Tabulka 8 a Obrázek 5.

Tabulka 8: Klasifikace kumulů oocytárních komplexů

| Třída | Vlastnosti oocytu | Vlastnosti kumulárních buněk |
|-------|--|---|
| I | Tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma | Kompaktní, celý oocyt obklopující minimálně pětivrstevný kumulůs |
| II | Tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma | Kompaktní, celý oocyt obklopující méně než pětivrstevný kumulůs |
| III | Rovnoměrně, kompaktně jemně granulovaná ooplasma, ale obsahující i větší granula | Kumulární buňky obklopují minimálně polovinu zony pellucidy |
| IV | Abnormálně velké či malé oocyty; silně deformované oocyty; ooplasma s velkými granuly; výrazné rozdíly v kompaktnosti ooplasmy | Kumulůs bez kumulárních buněk či s částečně nebo úplně expandovaným kumulůsem |

Zdroj: Andrlíková (2018) podle Leibfrieda a Firsta (1979)



Obrázek 5: Třídy kumulů oocytárních komplexů

Zdroj: Andrlíková (2018)

Například Machatková et al. (2018) pro následné zrání použila pouze oocyty s ukončeným růstem (130 μm), bez výraznějších defektů v cytoplasmě, obklopené intaktní zónou pellucidou a coronou radiatou a nejméně jednou vrstvou buněk kumulu.

Maturace (IVM)

Nezávisle na tom, z jak velkých folikulů jsou oocyty izolovány, vždy jsou na úrovni jádra i cytoplazmy nezralé, proto musí být kultivovány ve zracím médiu (Machatková et al. 2009). Zrání neboli maturace oocytů je biologický proces, při kterém se primární oocyt v profázi I.

meiotického dělení mění na haploidní sekundární oocyt (Hofírek et al. 2009). Při zrání in vivo, několik hodin před prasknutím folikulu a ovulací, plně vyvinutý oocyt v preovulačním folikulu obnovuje meiózu na základě signálů spojených se zvýšenou koncentrací luteinizačního hormonu a postupuje z profáze prvního meiotického dělení do metafáze II. Tento proces zrání transformuje primární oocyt ve zralý sekundární oocyt (Gordon 2003). Ten již obsahuje kompletní buněčnou výbavu potřebnou pro oplození a následný raný embryonální vývoj. Zrání oocytů je charakterizováno změnami na jádře, v cytoplazmě a na kumulárních buňkách (Hofírek et al. 2009).

Odebrané oocyty jsou přenášeny do propíracího média, které obsahuje 10 % kravského říjového séra a odtud do tzv. zracího média (Hofírek et al. 2009). Existuje několik komerčních médií využívaných pro zrání oocytů. Obvykle se jedná o média s pufovanými bikarbonáty obsahující základní fyziologický roztok s přídavkem pyruvátu, laktátu a glukózy. Obvykle je médium doplněno sérem nebo albuminem se stopovým množstvím antibiotik, případně také o aminokyseliny, vitamíny, puriny a další látky, v podobných koncentracích jako se nacházejí v séru (Gordon 2003).

Machatková et al. (2018) pro zrání použila médium TCM-199 doplněné 0,2 mM pyruvátu sodného, 5 % ECS, gonadotropiny a antibiotiky. Médium je nejdříve ekvilibrováno po dobu 1 hodiny, kdy je přidáno mitochondriální stimulant L-carnitin v koncentraci 2,5 mM a následně je opět ekvilibrováno po dobu 2 hodin. Oocyty zrají při teplotě 38,5 °C, v atmosféře s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO₂, po dobu 24 hodin.

Za optimálních podmínek zrání více než 90 % oocytů dosáhne metafáze II. Před oplozovací fází mohou být kumulární buňky částečně odstraněny (Galli et al. 2003).

Fertilizace (IVF)

Oplození je složitý proces, jehož výsledkem je spojení spermie a oocyty, což představuje začátek přeměny oocyty v embryo. Úspěšné oplodnění skotu in vitro (IVF) vyžaduje vhodnou přípravu obou gamet, jakož i příznivé kultivační podmínky (Gordon 2003). Při fertilizaci tedy dochází ke spojení haploidních rodičovských pohlavních buněk a následnému vzniku kvalitativně nového jedince s diploidním počtem chromozomů (Hofírek et al. 2009).

Rozhodujícím kritériem při výběru býků pro produkci embryí je jejich plodnost v inseminaci. Nezbytným předpokladem pro oplození in vitro je získání motilních spermií s neporušenou cytoplazmatickou membránou a intaktním akrozomem, které je nutno izolovat z čerstvého nebo zmrazeného spermatu (Machatková et al. 2009). Nejčastěji se pro oplození používá sperma komerčně zmrazené. Více než 90 % plemeníků lze použít pro oplození po úpravě koncentrace spermatu na individuální hodnotu vhodnou pro každého býka, ne všichni plemeničí však poskytují dobrou výtěžnost embryí (Galli & Lazzari 1996). Pro zjištění oplozovací schopnosti může být sperma býků testováno na oocytech odebraných od jatečných krav (Galli et al. 2001). Vzhledem k tomu, že počet oocytů získaných od geneticky cenných donorek je limitován, je možné využívat pro fertilizaci oocytů in vitro (IVF) sexované inseminační dávky a připravit embrya požadovaného pohlaví. Nicméně dosud provedené studie potvrzují, že sexované inseminační dávky vykazují nižší kvalitu z hlediska koncentrace, motility, funkčního stavu akrozomu a fertilizační schopnosti spermií ve srovnání s dávkami konvenčními (Machatková et al. 2019).

Oocyty jsou po maturaci přeneseny ze zračního média do speciálního oplozovacího média nejméně 30-45 minut před přikápnutím spermatu. Toto médium obsahuje faktory k podpoře kapacity a motility spermií (Hofírek et al. 2009). Například Gordon (2003) zmiňuje oplozovací média TALP, SOF či Fert-CDM médium. K vyvolání kapacity spermií jsou fertilizační média doplňována kofeinem, Ca ionophorem a především heparinem. Spermie býků s vyšší afinitou k heparinu mají lepší schopnost prodělat akrozomální reakci a vázat se na zónu pellucidu, což koreluje s jejich plodností (Machatková et al. 2009).

V případě mrazeného spermatu jsou pejety v 39 °C po dobu 10 sekund rozmrazeny a je odebráno 100 µl spermatu, které se v kónických zkumavkách tzv. podvrství pod 1 ml média stimulující kapacitační proces (Hofírek et al. 2009). Předpokladem pro úspěšnou fertilizaci oocytů v systému in vitro je dostatek motilních spermií schopných prodělat akrozomální reakci, které je nutno separovat z komerčních inseminačních dávek (Machatková et al. 2021). Pohyblivé spermie mohou být separovány od ředidla několika způsoby. Běžnou metodou je „swim up“ technika a také metoda centrifugace na diskontinuálních Percollových gradientech. (Galli & Lazzari 1996). Pomocí obou technik lze získat populaci se 70 až 90% podílem motilních spermií a s intaktním chromozomem (Machatková et al. 2009).

Po separaci spermií od ředidla a zjištění koncentrace spermatu jsou oocyty inseminovány tak, aby výsledná koncentrace byla 1 000 000 aktivních spermií v 1 ml oplozovacího média. Oplozovací proces in vitro, tedy inkubace pohyblivých spermií spolu se zralými oocyty, probíhá po dobu 20 hodin v řízené atmosféře (Hofírek et al. 2009). Galli & Lazzari (1996) zmiňuje společnou inkubaci oocytů a spermatu v oplozovacím médiu po dobu 18-24 hodin při teplotě 38,5 °C a atmosféře s 5 % CO₂.

Pokud jsou morfologicky kvalitní oocyty oplozeny spermii prověřených býků s odpovídající schopností a je použita vhodná rodičovská kombinace, je podíl embryí vyvíjejících se z fertilizovaných oocytů relativně vysoký (25-35 %) (Machatková 2006).

Kultivace (IVC)

Po dozrání bovinního oocytu a oplození in vitro, je posledním krokem kultivace embrya do stádia blastocysty, kdy může být embryo buď přeneseno do čekající příjemkyně, nebo kryokonzervováno (Gordon 2003). Kultivace embryí je proces, kdy v umělých podmínkách probíhá raný vývoj zárodka od oplozeného vajíčka-zygoty až po morulu či blastocystu (Hofírek et al. 2009).

Pro růst zygot může být použit jeden ze tří systémů. V prvním systému mohou být oplozené oocyty transportovány do vejcovodů dočasného příjemce, například ovce nebo králíka (Eyestone et al. 1987). Raná embrya jsou přenesena chirurgickou cestou do podvázaných oviduktů dočasných příjemkyň (Machatková et al. 2009). Po 4-5 dnech, resp. 6 dnech po inseminaci, jsou embrya odebrána, roztríděna a následně mrazena nebo transportována (Eyestone et al. 1987). Tento způsob kultivace používají především společnosti s komerčním zaměřením, protože získávají vyšší podíl zmrazitelných embryí. Nevýhodou tohoto kultivačního postupu jsou vyšší pracnost i finanční náklady (Machatková et al. 2009).

Druhý a třetí systém využívá kultivace v syntetických kultivačních médiích (Machatková et al. 2009). Embrya musí z média získávat všechny živiny, jakmile jsou zásoby z oocytu vyčerpány a také musí být chráněna před možnými toxickými vlivy (Gordon 2003).

Médium představuje definovaný roztok minerálních solí upravujících pH a osmotický tlak, stopových prvků, aminokyselin, glukózy, pyruvátu a krevního séra. Dlouhý pobyt raného embrya v podmínkách *in vitro* vyžaduje takové kultivační podmínky, aby se co nejvíce přibližovaly prostředí vejcovodu a dělohy. Chemicky definovaná kultivační média jsou proto obohacována embryotrofními látkami, jako je např. dezaktivované fetální telecí sérum nebo sérový albumin. Vývojová schopnost raných embryí se zvyšuje používáním tzv. kokultivace se somatickými buňkami, jako jsou kumulární buňky, epiteliální buňky vejcovodu aj. Využívá se rovněž médií, která neobsahují somatické buňky, ale pouze látky jimi secernované (peptidy, růstové faktory apod.) (Hofírek et al. 2009).

Ve druhém systému jsou zygoty kultivovány spolu se somatickými buňkami (epiteliální buňky vejcovodu, granulóзовé buňky, jaterní buňky buvolů či potkanů) v roztoku TCM 199 nebo v roztoku B2 Menezo s 10 % séra nebo 1 % albuminového bovinního séra (BSA) při 38,5 °C v 5 % CO₂.

Ve třetím systému jsou zygoty kultivovány v prostém médiu bez podpory somatických buněk. Prostým médiem se v tomto případě rozumí syntetická vejcovodová tekutina neboli SOF (Synthetic Oviductal Fluid) (Tervit et al. 1972) doplněná sérem (Walker et al. 1992) nebo BSA a aminokyselinami (Gardner et al. 1994). Podle Machatkové et al. (2009) je médium doplněno pouze bovinním sérovým albuminem nebo polyvinylalkoholem, inkubace pak probíhá v atmosféře s 90 % N₂, 5 % O₂ a 5 % CO₂. Rosenkrans & First (1994) zmiňuje inkubaci při 38,5 °C v 5 % CO₂ a 5 % O₂. Tato kultivace dosud nepřináší očekávané výsledky, na druhou stranu, plně definovaná média jsou nezbytná pro studium faktorů regulujících vývoj embryí (Machatková et al. 2009).

V *in vitro* kultivačním systému probíhá produkce blastocyst hlavně 7. den po oplození, pokud 0. den je den oplození. U *in vivo* kultivačních systémů (např. vejcovod ovcí) dochází k formování blastocyst již 6. den (Galli & Lazzari 1996). Podle Machatkové et al. (2021) se embrya vyvíjejí po dobu 7–8 dnů do stádií časně až expandující blastocysty, kdy mohou být použita pro embryotransfer nebo kryokonzervaci.

Výsledky a využívání

Pokud jde o účinnost IVP, přibližně 80-90 % nezralých hovězích oocytů projde jaderným zráním *in vitro*, přibližně 80 % projde oplozením, 30-40 % se vyvine do stadia blastocysty a přibližně 50 % přenesených embryí naváže a udrží březost (Wrenzycki et al. 2007; Galli et al. 2014; Lonergan et al. 2016). Vývoj IVP embryí po embryotransferu je srovnatelný s vývojem embryí po superovulaci. Po přenosu kvalitních embryí lze dosáhnout u příjemkyní 50 % březosti s 10% embryonální mortalitou (Machatková et al. 2016).

Choulostivým problémem v produkci embryí *in vitro* je výskyt abnormalit u mláďat, mezi které patří vyšší embryonální úmrtnost a přerostlé plody (Thompson et al. 1994). U ovcí bylo prokázáno, že nadměrná velikost plodu po přenosu embryí vyvinutých *in vitro* byla způsobena přítomností séra během kultivace embryí (Thompson et al. 1994). Galli et al. (2003) zmiňuje, že většina popsaných telat se syndromem velkého plodu byla výsledkem společné kultivace s jaterními buňkami granulózy nebo buvolích potkanů anebo vysokým obsahem séra nebo vysokým obsahem BSA a pocházela z několika přenosů provedených převážně za nekontrolovaných podmínek výzkumnými laboratořemi. V komerčních programech, kde jsou podmínky více kontrolované a kde se používá buď kultivace *in vivo* v ovčím vejcovodu,

nebo systém SOF, bez vysoké hladiny séra nebo BSA, je více než 95 % březostí normálních a výskyt syndromu velkého plodu je nižší.

Produkce embryí skotu v podmínkách in vitro (IVP) našla již své nezastupitelné místo v chovatelsky vyspělých zemích (Machatková et al. 2019). Četnost využívání metody znázorňuje Tabulka 9.

Tabulka 9: Produkce embryí v podmínkách in vitro v letech 2014 a 2020 celosvětově dle oblasti

| Oblast | Produkce embryí in vitro | | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|
| | Získané oocyty | Přenositelná embrya | Přenosů celkem | Získané oocyty | Přenositelná embrya | Přenosů celkem |
| | 2014 | | | 2020 | | |
| Afrika | 20 976 | 5081 | 1372 | 16 793 | 4977 | 4159 |
| Asie | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Evropa | 121 199 | 17 062 | 13 972 | 195 859 | 47 470 | 35 352 |
| Severní Amerika | 812 726 | 206 326 | 93 123 | 2 394 280 | 578 995 | 339 716 |
| Oceánie | 30 695 | 6502 | 3431 | 57 053 | 14 345 | 14 571 |
| Jižní Amerika | 853 125 | 357 479 | 251 683 | 1 500 571 | 500 397 | 474 145 |
| Celkově | 1848 721 | 592 450 | 365 625 | 4 193 804 | 1 156 422 | 878 181 |

Zdroj dat: IETS (2015) a IETS (2020)

V České republice proběhly v roce 2014 odběry od 35 dárek post mortem, při kterých se získalo 526 oocytů a následně 223 embryí v podmínkách in vitro (IETS 2015).

3.4.4 Transvaginální aspirace oocytů – ovum pick-up (OPU)

Protože je produkce embryí z oocytů získaných z ovarií krav post mortem limitována a je určena pouze pro vyřazené, geneticky cenné donorky, pro získání oocytů od reprodukčně zdravých donorek byla vyvinuta metoda transvaginální aspirace oocytů (OPU – ovum-pick up) za pomoci sonografie (Říha et al. 1999, Machatková 2006). Opakovaná transvaginální aspirace oocytů (OPU) a následná fertilizace oocytů in vitro (OPU/IVF) je jedním z nejefektivnějších způsobů, jak využít geneticky cenné jedince k systematickému šlechtění skotu (Machatková et al. 2018). Galli et al. (2003) zmiňuje, že metoda ovum pick up je nejpružnější a nejopakovatelnější technika produkce embryí od živých dárek.

V roce 1988 nizozemský tým vedený M. C. Pietersenem provedl poprvé odběr oocytů in vivo pomocí transvaginální aspirace folikulů pod ultrazvukovou kontrolou u skotu (Boni 2012, Gordon 2003). Metoda byla původně vyvinuta pro použití v lidské asistované reprodukci a léčbě neplodnosti (Meiyu et al. 2013). Možnost punkce a odběru nezralých folikulů z vaječníků živých dárek otevřela nové perspektivy v programech reprodukční biotechnologie. Samičí gamety mohou být totiž k dispozici pro produkci embryí in vitro (IVP) během delšího časového období, což je v případě zisku oocytů post mortem nemožné (Bols & Stout 2018).

Odběr oocytů

Ovum pick up je neinvazivní a opakovatelná technika (Říha et al. 1999; Machatková et al. 2016, Bols & Stout 2018), kterou lze použít k odběru oocytů s hormonální stimulací nebo

bez ní (Bols & Stout 2018). Původní postup OPU nezahrnuje žádnou hormonální stimulaci. Rutinně se provádí dvakrát týdně (Meiyu et al. 2013; Bols & Stout 2018), což umožňuje získat maximum oocytů vhodné kvality pro produkci embryí v daném časovém intervalu. Odběr dvakrát týdně je nejziskovější, protože při odsátí všech viditelných folikulů v procesu OPU se nevyvíjí žádný dominantní folikul, který jinak způsobuje regresi a degeneraci ostatních folikulů, jako při odběru jednou týdně (Meiyu et al. 2013). Goodhand et al. (1999) zjistil, že aspirace dvakrát týdně oproti aspiraci jednou týdně zdvojnásobila počet přenositelných embryí vyprodukovaných za týden. Nejlepších výsledků se dosahuje, když se mezi jednotlivými sezeními OPU dodržuje interval 3 a 4 dnů nebo 2 a 5 dnů (Merton et al. 2003). Vzhledem k tomu, že dominantní folikul vzniká přibližně 3 dny po odběru oocytů, zabrání zejména 2 a 3 denní intervaly tomu, aby dominantní folikul negativně ovlivnil vývojovou kompetenci oocytů z menších folikulů (Wagtendonk-de Leeuw 2006). Oocyty lze od požadovaných donorek odebírat opakovaně po období několika týdnů nebo měsíců (Říha et al. 1999; Hofírek et al. 2009; Machatková et al. 2016). Machatková (2006) upřesňuje, že opakovanou aspiraci lze provádět po dobu tří až šesti měsíců.

Některá schémata aspirace zahrnují i hormonální stimulaci dárkyň (Hofírek et al. 2009). Podle Mertona et al. (2003) použití hormonální pre-stimulace může zvýšit počet folikulů. Podle Vieira et al. (2014) superstimulace před OPU vedla k významnému zvýšení produkce blastocyst u holštýnských dárkyň. Cavalieri et al. (2018) zjistil, že synchronizací ovariální folikulární vlny u dárkyň se umožnilo aspirovat homogennější folikuly ve vztahu k velikosti a fázi vývoje, což podpořilo získání kompetentnějších oocytů. Také průměrný počet zabřeznutí byl vyšší u příjemkyň, které obdržely embrya ze synchronizované skupiny, ve srovnání s kontrolní skupinou. Aby došlo k synchronizaci, dárkyním byl aplikován progesteronový implantát, estradiol benzoát a prostaglandin v náhodný den říjového cyklu a po pěti dnech proběhla OPU. Synchronizované dárkyně pak vykazovaly vyšší počet embryí (5.9 ± 0.5 vs. 4.5 ± 0.4) a vyšší míru produkce embryí (45,8 % vs. 38,5 %) než nesynchronizované dárkyně (Cavalieri et al. 2018). Nicméně i přes to, že hormonální pre-stimulační schémata mohou vést k vyššímu výtěžku embryí na krávu na jeden odběr OPU, výtěžek embryí na jednotku času na krávu nemusí být vyšší, protože hormonální pre-stimulaci lze provádět pouze jednou týdně (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Dárkyně oocytů

Jako dárkyně nejčastěji slouží cyklující krávy či jalovice a aspirovat lze i prepubertální jalovičky nebo březí zvířata (Hofírek et al. 2009). Dárkyní může být zvíře prakticky v jakémkoliv fyziologickém stavu a všech věkových kategorií, od dvouměsíčních telat po velmi staré jedince. Nevhodná jsou pouze zvířata, která překročila první trimestr březosti, dále jedinci v poporodním období, u kterých ještě nedošlo k obnovení ovariální aktivity a zvířata s těžkou ovariální hypoplasíí (Galli et al. 2001).

Vedle možnosti využít tuto metodu v době plného reprodukčního zdraví donorky je uvedený způsob získávání oocytů vhodný pro cyklující, reprodukčně problémové krávy, které nezabřezávají po inseminaci, neodpovídají na hormonální ošetření nebo neprodukují přenosuschopná embrya. Při správné aplikaci metody a opakované punkci folikulů dochází k aktivaci folikulárního vývoje, poněvadž každá z provedených aspirací oocytů vyvolává na ovarii přirozené folikulární vlny bez toho, že by negativně ovlivnila další reprodukční

schopnost donorky (Machatková 2006). OPU může mít vlastní terapeutický účinek na neplodné dárkyně, zejména ty, které jsou postiženy ovariálními cystami (Galli et al. 2001).

Dárkyněmi oocytů mohou být i telata ve věku přibližně 2 až 3 měsíců. Pro efektivní odběr bez vedlejších účinků je však nutné provést laparotomii v celkové anestezii. Řezem se obnaží vaječníky a oocyty se získají aspirací folikulů. Mladá telata jsou z pohledu chovatelských společností ideálními dárkyněmi, protože použití předpubertálních zvířat jim umožňuje zkrátit interval mezi generacemi, a tím urychlit proces genetického zlepšování (Galli et al. 2001). Tímto přístupem je možné dosáhnout generačního intervalu 11 měsíců. Pro dosažení konzistentních výsledků v tomto věku je nutné stimulovat vaječníky gonadotropiny (Galli et al. 2003).

Podle Fry et al. (1998) lze oocyty získat už z pětíměsíčních telat za použití transvaginálního přístupu řízeného ultrazvukem. Odběr trval přibližně 10-15 min a neměl žádné zjevné účinky na následnou reprodukční výkonnost zvířat. Je důležité udržovat takovou úroveň výživy, aby bylo dosaženo přibližně 100 kg živé hmotnosti před odběrem, tato velikost zvířete totiž umožňuje obsluhu manipulovat s vaječníky per rectum. Vzhledem k tomu, že vaječníky jsou ve věku 5 měsíců velmi malé, je nutné je hormonálně stimulovat, aby došlo k růstu folikulů do velikosti vhodné pro aspiraci.

Další pozitiva a případná negativa metody

Metoda OPU má několik výhod, například je méně traumatizující pro zvířata a méně invazivní než jiné systémy a má vysoký stupeň opakovatelnosti (Bols et al. 1995). Galli et al. (2001) podotýká, že odběr se provádí s minimálním stresem pro dárce. Díky metodě OPU je možná také produkce embryí od neplodných krav nebo donorek s neúspěšnou superovulací a rozšíření kombinací rodičovských párů oplozením oocytů spermiemi více býků (Machatková 2006). Každou dávku oocytů lze použít k inseminaci s jiným býkem, což zvyšuje počet možných genetických kombinací (Merton et al. 2003). Fertilizace odebraných oocytů několika býky je výhoda, která maximalizuje genetický zisk a minimalizuje inbreeding (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Výhodou metody OPU/IVF je také to, že bez jakékoliv aplikace hormonů donorce lze oocyty získat dvakrát týdně po dobu několika měsíců, a to dokonce i v 1. trimestru březosti dárkyně (Machatková et al. 2016). To, že použití hormonů není u této metody nutné je velmi důležitá výhoda zejména pro mladé jalovice, u nichž může stimulace gonadotropiny způsobit edém mléčné žlázy a syndrom ovariálních cyst. Případně pro výstavní krávy, u nichž může opakovaná superovulace způsobit uvolnění vazů vemene (Galli et al. 2003).

Machatková et al. (2016) při porovnání nákladů na superovulaci a OPU/IVF zjistila, že se ušetří na hormonální stimulaci, na inseminační dávce (jedna místa dvou) i na počtu získaných embryí. Po superovulaci se získá průměrně deset embryí za rok, zatímco při OPU/IVF se získá až 30 embryí. Použití OPU bude neocenitelné při rychlém rozšiřování vzácných genů a poskytne základ pro pokročilejší technologie, jako je klonování a transgenetika (Meiyu et al. 2013).

OPU/IVP ve srovnání s MOET vyžaduje sofistikovanější a nákladnější laboratorní prostředí. Náklady na jedno embryo OPU/IVP jsou přibližně dvakrát vyšší než náklady na embryo MOET (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Existují důkazy, že výtěžnost blastocyst po IVM, IVF a in vitro kultivaci (IVC) oocytů získaných OPU může být nižší než u oocytů získaných z jatečných vaječníků (Donnay et al. 1996). Oocyty odebrané pomocí OPU mohou být obklopené omezeným počtem vrstev kumulárních buněk a mohou mít nižší vývojovou kompetenci. Část tohoto problému může být způsobeno ztrátou kumulárních buněk v průběhu aspirace (Palma & Brem 1995).

Gordon (2003) ve své práci zmiňuje, že několik autorů uvádí, že OPU lze provádět dvakrát týdně po dobu několika týdnů, aniž by to mělo nežádoucí vedlejší účinky na plodnost dárcovského zvířete (Gibbons et al. 1994a,b,c, 1995; Bucher et al. 1996; Dolman et al. 1995; Goto et al. 1995; Lansbergen et al. 1995; Menard et al. 1995; Hepburn and MacMillan 1996; Boni et al. 1997; Broadbent et al. 1997a,b; Hanenberg and Van Wagendonk-De Leeuw 1997; Kurokin 1998; Hashimoto et al. 2000a; Park, S.J. et al. 2000). Figueiredo et al. (2020) podotýká, že (Kruip et al. 2014; Stangl et al. 1999; Petyim et al. 2000; Shalev et al. 2001; Viana et al. 2003; Kelada & Ghani 2007; Fouks et al. 2019) zase upozorňují, že metoda OPU byla spojena s lézemi reprodukčního traktu, jako jsou ovariální adheze a abscesy u lidí, krav a ovcí. Kromě toho byl rozsah ovariálních lézí u krav pozitivně korelován s počtem OPU procedur. Léze spojené s OPU mění nejen morfologii, ale i funkčnost reprodukčních orgánů s měřitelnými dopady na následné fyziologické děje a výsledky plodnosti. Například u holštýnských plemenic byly popsány nepravidelné intervaly mezi říjemi, pokud byly dárkyně podrobeny procedurám OPU, ve srovnání se stejnými zvířaty, u kterých nebyl odběr oocytů prováděn (Stubblings & Walton 1995). Potenciál vzniku abscesů na vaječnicích může být spojen se zavlečením patogenů během odběru. Ztráty plodnosti pozorované u dárců nebyly spojeny se zvýšeným vyřazováním (Figueiredo et al. 2020)

Výsledky a přehled využívání

Účinnost metody je závislá na individualitě donorky, technickém vybavení týmu, použité metodě punkce a aspiračním schématu (Machatková 2006). Počet oocytů odebraných zvířeti během jednoho sezení OPU závisí na řadě technických a biologických faktorů (Merton et al. 2003). Podle Meiyu et al. (2013) patří mezi důležité faktory, které ovlivňují úspěšnost OPU a kvalitu oocytů také zkušenosti operátora a individuální rozdíly dárkyň jako je věk, reprodukční fáze a individuální reakce. Podle Mertona et al. (2003) je možné při dvou OPU týdně vyprodukovat přibližně 150 embryí za rok, z nichž by se mělo narodit přibližně 70 telat, výsledky se však pohybují od 10 do 30 % přenositelných embryí ze zpracovaných oocytů. Výtěžnost oocytů na odběr se při schématu dvakrát týdně bez hormonální stimulace u jednotlivých dárkyň výrazně a opakovaně liší. Pohybuje se od 0 do 26 oocytů na odběr a od 0,5 do 15 oocytů na krávu, přičemž obvykle 20 % oocytů je nekvalitních (Wagendonk-de Leeuw 2006). Podle Machatkové (2006) lze při transvaginálním odběru oocytů z ovarii živých donorek dosáhnout asi 60% úspěšnosti, to znamená při punkci 10-12 folikulů aspirovat asi šest až sedm oocytů na jednu donorku. Po fertilizaci těchto oocytů je průměrně získáno 1,5 embrya. Galli et al. (2001) zmiňuje, že lze na jeden odběr získat v průměru 8 až 10 oocytů s průměrnou produkcí 2 přenositelných embryí. Kruip et al. (1994) získal průměrně 13 vhodných oocytů týdně na krávu, což znamenalo 16 % životaschopných blastocyst a celkem 2,1 embrya na krávu týdně. Během 6 měsíců by tedy mohla metoda přinést více než 50 embryí.

Celosvětově Severní a Jižní Amerika dohromady produkují více než 80 % embryí skotu na celém světě (Figueiredo et al. 2020). V Evropě můžeme zaznamenat velmi významné

zvýšení využití metody OPU/IVP/ET. Zatímco podíl embryí získaných metodou OPU/IVP představoval v roce 2006 pouze 39,2 % z počtu přenosuschopných IVP embryí, v roce 2016 představoval více než 91,9 % z přenosuschopných IVP embryí. Ačkoliv se Česká republika významně podílí na vývoji metod reprodukčních biotechnologií a tyto metody po řadu let úspěšně aplikuje v chovech skotu, patří v současné době mezi státy s relativně nízkou produkcí přenosuschopných embryí a provedených embryotransferů ve srovnání s chovatelsky vyspělými státy (Machatková et al. 2016).

Tabulka 10: Produkce embryí metodou ovum-pick up v letech 2014 a 2020 celosvětově dle oblastí

| Oblast | Produkce embryí metodou OPU | | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|---------|-----------|---------------------|
| | Dárkyně | Oocyty | Přenositelná embrya | Dárkyně | Oocyty | Přenositelná embrya |
| | 2014 | | | 2020 | | |
| Afrika | 1359 | 20 976 | 5081 | 866 | 12 898 | 4 301 |
| Asie | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Evropa | 9710 | 83 785 | 15 693 | 13 606 | 174 543 | 42 101 |
| Severní Amerika | 43 452 | 812 468 | 206 139 | 123 033 | 2 388 472 | 578 205 |
| Oceánie | 3250 | 30 549 | 6486 | 2 720 | 57 044 | 14 341 |
| Jižní Amerika | 71 327 | 861 100 | 356 960 | 81 932 | 1 458 546 | 483 587 |
| Celkově | 129 098 | 1 808 878 | 590 359 | 223 620 | 4 120 754 | 1 132 773 |

Zdroj dat: IETS (2015) a IETS (2020)

V České republice proběhl v roce 2012 jeden odběr pomocí OPU metody, při které se získalo 12 oocytů a následně 2 embrya (IETS 2013).

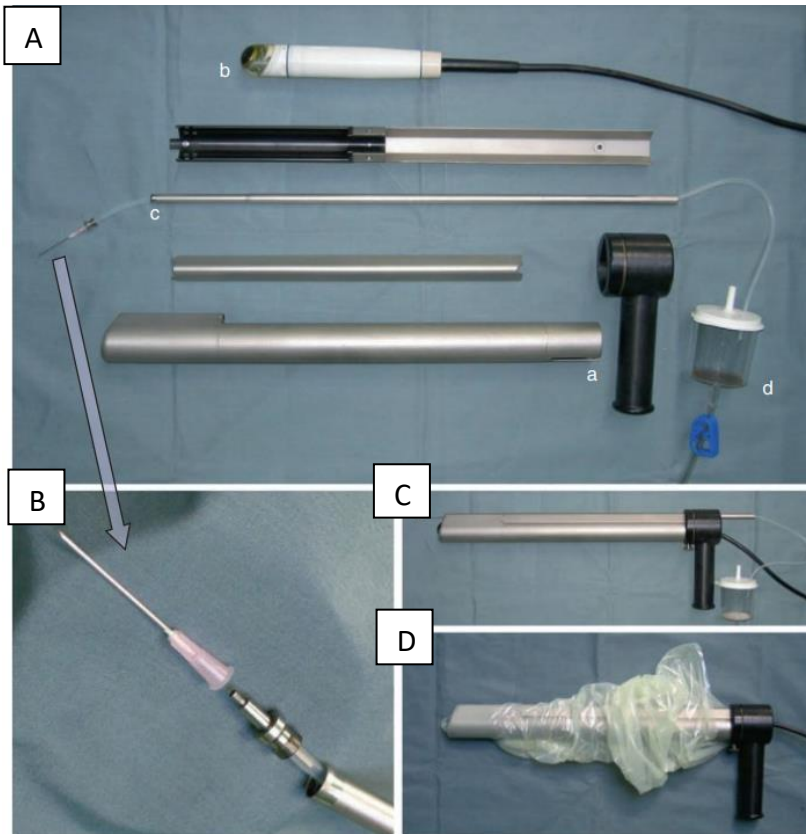
3.4.4.1 Metodika

Vybavení

System OPU se skládá ze tří hlavních součástí: ultrazvukového skeneru s příslušným snímačem (sondou), aspirační pumpy a systému vedoucí jehly napojený na zkumavku pro odběr oocytů. Snímač a vodič jehly jsou běžně konstruovány jako jedna operační jednotka, aby bylo možné přesně manipulovat s jehlou zvenčí krávy a zároveň přivést snímač do těsného kontaktu s vaječníky. Jehla je spojena s vakuovou pumpou silikonovou nebo teflonovou hadičkou tak, aby byl obsah folikulů aspirován, jakmile je prostřednictvím vakuové pumpy vyvinut aspirační tlak (Bols & Stout 2018) pomocí podtlaku nastaveným mezi 60 a 80 mmHg (Cavaliery et al. 2018). Folikulární tekutina a oocyty se shromažďují do sběrného zařízení umístěného mezi jehlou a pumpou. Tímto zařízením pro odběr oocytů může být běžný embryofiltr nebo jednoduchá Falconova trubice (Bols & Stout 2018). Zařízení pro odběr je zobrazeno na Obrázku 6.

Andrlíková et al. (2018) doporučuje před odběrem předem připravit desinfekční přípravek na kůži, lokální anestetikum, injekční jehly (18G) a stříkačky (5 ml, 20 ml), rektální rukavice, sonografický gel, buničitou vatou, fyziologický roztok na oplach a provázek na fixaci ocasu. Na vozíku by měla být připravena podtlaková pumpa, vyhřívací kontejner s nádobkami pro oběh o objemu 50 ml, nádobka s médiem, sonografický přístroj, držák s ultrazvukovou

sondou, vodič jehly, aspirační jehly a stojan s 50 ml nádobami na proplach aspiračního systému, jedna prázdná a jedna s lihem.



Obrázek 6: Zařízení OPU v demontovaném stavu (A), zařízení smontované a připravené k použití (C, D). Detail punkční jehly připojené k silikonové hadičce (B).
a) Intravaginální rukojeť b) mechanický více úhlový sektorový snímač c) naváděcí systém jehly d) filtr pro odběr oocytů
Zdroj: Bols & Stout (2018)

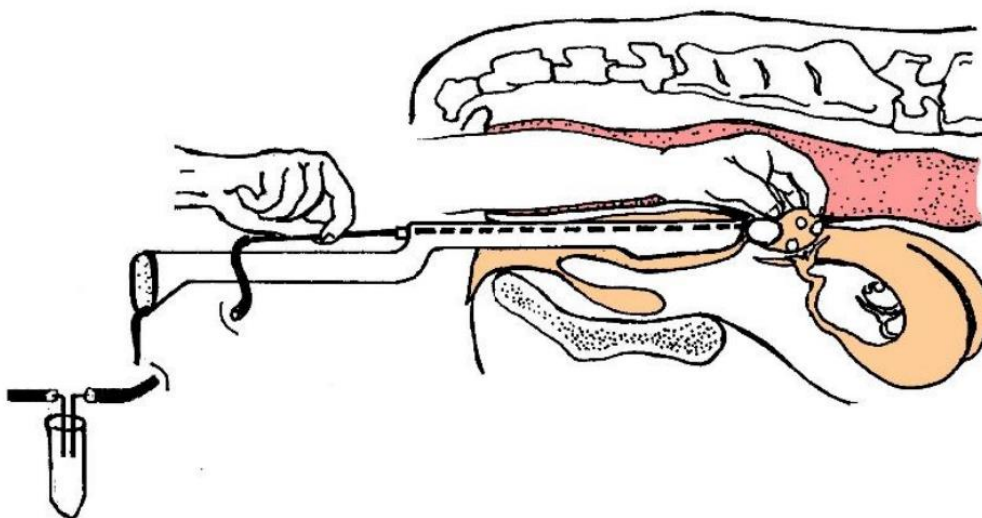
Příprava dárkyně

Před odběrem je nutné fixovat dárkyni ve fixačním zařízení (Galli et al. 2003; Andrlíková 2018). Galli et al. (2003) doporučuje také mírnou sedaci donorky. Bols et al. (1995) zmiňuje sedaci pomocí detomidin hydrochloridu 10 mg/ml intravenózně v dávce 0,1 ml na 100 kg tělesné hmotnosti, který kromě sedativního účinku usnadňuje i trans rektální manipulaci s vaječníky tím, že uvolňuje střeva. Následně je nutné odstranit výkaly z konečníku (Cavaliery et al. 2018), ocas vyvázat tenkým provázkem (Andrlíková et al. 2018) a perineální oblast očistit vodou a desinfikovat 70% etanolem. Pro lepší provedení techniky a snížení peristaltiky střev a nepohodlí zvířat se aplikuje před odběrem epidurální anestezie (Cavaliery et al. 2018). Před samotnou aplikací je místo pro epidurální anestezii vyholeno a desinfikováno. Následně je aplikováno 3,5 ml 2% procainu (Andrlíková et al. 2018). Cavaliery et al. (2018) zmiňuje použití 4 ml 2% lidocainu.

Aspirace oocytů

Před aspirací se odběrová nádobka označí ušním číslem zvířete a na dno nádobky je aspirováno malé množství média (Andrlíková et al. 2018). Poté je do pochvy zaveden držák obsahující sondu a vodič jehly. Držák je fixován jednou rukou, tak aby ultrazvuková sonda

mířila kranio-dorzálně vlevo nebo vpravo od děložního čípku, podle toho, z které strany se budou oocyty odebírat. Pomocí druhé ruky per rectum operátor fixuje vaječník a přitlačuje jej k ultrazvukové sondě (Bols & Stout 2018). Mezi aktivní plochou sondy a vaječníkem je jen poševní stěna a všechny funkční struktury přítomné na vaječníku se zobrazují na obrazovce přístroje. Do vodiče je zasunuta punkční jehla, která se přes stěnu pochvy vede do jednotlivých folikulů (Hofírek et al. 2009). Jakmile jehla pronikne do folikulu, aspirační pumpa je aktivována pomocí nožního pedálu a folikulární tekutina s oocyty je shromažďována do odběrové nádoby s médiem (Bols & Stout 2018). Během aspirace operátor postupně otáčí vaječníkem a jehlu vede do jednotlivých folikulů (Hofírek et al. 2009) viz Obrázek 7. Andrlíková et al. (2018) doporučuje aspirovat všechny folikuly větší než 3 mm. Po aspiraci je nutné odběrovou nádobku co nejrychleji přepravit do laboratoře pro vyhledání a zpracování oocytů (Andrlíková et al. 2018).



Obrázek 7: Schématické znázornění odběru oocytů metodou ovum-pick up
Zdroj: Mlejnková v práci Andrlíkové et. al (2018).

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí literárního přehledu charakterizovat metodu ovum-pick up (OPU), zhodnotit její přínos a zpracovat její metodiku. Tato metoda odběru oocytů v kombinaci s následnou produkcí embryí v podmínkách in vitro (IVP) má několik významných pozitiv. Díky možnosti odebírat oocyty dvakrát týdně po dobu několika týdnů či měsíců od širokého spektra možných donorek, bez nutnosti hormonální stimulace a konečně s dobrým výsledným ziskem embryí má tato metoda potenciál nahradit superovulaci. Z přiložených dat je zřejmé, že se metoda OPU/IVP dostává do popředí celosvětového zájmu v chovatelsky vyspělých zemích, zatímco využití systému MOET oslabuje. V České republice využití MOET také významně osláblo, ale na posílení produkce embryí in vitro se tato skutečnost neodrazila. Metoda OPU/IVP má ale potenciální využití i v podmínkách České republiky při šíření cenných genů a šlechtění místní populace.

Metodu ovum-pick up bych doporučila pro další intenzivní využívání, jelikož je výhodná jak z hlediska počtu získaných oocytů a následně embryí, tak je i díky malé invazivitě vhodná z hlediska welfare krav. Přesto bych doporučila důkladné sledování zdravotního stavu donorek a důkladně dodržovat pravidla asepse při samotném odběru, jelikož metoda OPU byla spojena i se vznikem ovariálních adhezí či abscesů u lidí, krav a ovcí. V tomto směru lze také doporučit další výzkum a tato rizika následně snížit na minimum.

5. Literatura

1. Andrlíková M, Čierníková Z, Kos V, Lopatářová M, Marková B, Stařecká V, Vránová L, Čech S. 2018. Praktický manuál *in vitro* produkce embryí u skotu. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
2. Ball PJH, Peters AR. 2004. Reproduction in Cattle. Blackwell Publishing, Cornwall.
3. Bedasa S, Kebede A, Abraha A. 2017. Review On Reproductive Biotechnology And Its Role In Dairy Cattle Production And Health. Report and Opinion **9**(3):60-70.
4. Berry DP, Wall E, Pryce JE. 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal* **8**:105-121.
5. Bezdíček J, Louda F. 2015. Efekty významně ovlivňující plodnost zvířat. Pages 3-8 in Král V, editor. Intenzifikační faktory plodnosti skotu. Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín.)
6. Bó G, Mapletoft RJ. 2018. Embryo Transfer Technology in Cattle. Pages 107-192 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. *Animal biotechnology 1*. Springer, Německo.
7. Boland MP, Goulding D, Roche JF. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* **35**:5-17.
8. Bols PEJ, Stout TAE. 2018. Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. Pages 209-267 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. *Animal biotechnology 1*. Springer, Německo
9. Boni R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. *Animal Reproduction* **9**:362-369.
10. Bouška J, et al. 2006. Chov dojeného skotu. Profi Press, Praha.
11. Bucek P, Kučera J, Syrůček J, et al. 2020. Chov skotu v České Republice 2020. Českomoravská společnost chovatelů, Praha.
12. Burdych V, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. Reprodukce ve stádech skotu. Chovservis, Hradec Králové.
13. Cavalieri FLB, Morotti F, Seneda MM, Colombo AHB, Andreazzi MA, Emanuelli IP, Rigolon LP. 2018. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology* **117**:57-60.
14. Comizzoli P, Holt WV. 2014. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **753**:331–356.
15. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development* **40**:493–504.

16. Čech S. 2012. Efektivní řízení reprodukce skotu. Informační magazín 2012. Společnost VVS Verměřovice s.r.o., Verměřovice.
17. Dematawewa CM, Berger PJ. 1998. Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility, and survival in Holsteins. *Journal of Dairy Science* **81**:2700–2709.
18. Doležel R, et al. 1997. Veterinární gynekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
19. Donnay I, DeRoover R, Van Langendonck A, Auquier P, Bombaerts P, Kinnar, T, Schuurbiens N, Dive M, Massip A, Dessy F. 1996. In vitro production of bovine embryos from oocytes collected by ultrasound-guided recovery in live cows: preliminary results. *Annales de Médecine Vétérinaire* **140**:283–291.
20. Eyestone WH, Leibfried-Rutledge L, Northey DL, Gillman BG, First NL. 1987. Culture of bovine one and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* **28**:1-7.
21. Fry RC, Simpson TL, Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* **49**:1077–1082.
22. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* **55**:1341-1357.
23. Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* **81**:138–151.
24. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* **59**:599-616.
25. Galli C, Lazzari G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* **42**:371-379.
26. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells-amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction* **50**:390-400.
27. Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. 1999. *Theriogenology* **51**:951–961.
28. Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford.

29. Hansen LB. 2000. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *Journal of Dairy Science* **83**:1145–1150.
30. Hanuš O, Hegedúšová Z, Bjelka M, Louda F, Machálek A. 2006. Reprodukce dojených krav, její problémy v současných podmínkách a faktory, které jí ovlivňují ve vztahu k produkci mléka. Pages 99-128 in Koza M, Jedelská R, Kopecký J, editors. Vliv výrobních faktorů a welfare na zdraví a plodnost dojnic a kvalitu a bezpečnost mléka jako potravinové suroviny. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
31. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Strokes JE. 1997. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* **48**:563-579.
32. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* **27**:139–168.
33. Hasler JF. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* **81**:152-169.
34. Hegedúšová Z, Louda F, Holásek R. Přenos embryí jako intenzifikační faktor šlechtitelské práce v chovu skotu. Agrovýzkum Rapotín, Rapotín.
35. Hofírek B, et al. 2009. Nemoci skotu. Česká buiatrická společnost, Brno.
36. Hošková K, Žalmanová T, Prokešová Š, Kott T, Petr J. 2020. Návrat dvou ztracených linií holštýnského skotu. *Náš chov* **8**:20-21.
37. Howard JT, Pryce JE, Baes CH, Maltecca CH. 2017. Invited review: Inbreeding in the genomics era: Inbreeding, inbreeding depression, and management of genomic variability. *Journal of Dairy Science* **100**:6009–6024.
38. IETS – international embryo technology society. 2001. 2000 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/december2001.pdf> (accessed April 2022)
39. IETS – international embryo technology society. 2003. 2002 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/december2003.pdf> (accessed April 2022)
40. IETS – international embryo technology society. 2005. 2004 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from

- <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/december2004.pdf>
f (accessed April 2022)
41. IETS – international embryo technology society. 2007. 2006 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2007.pdf>
f (accessed April 2022)
42. IETS – international embryo technology society. 2009. 2008 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2009.pdf>
f (accessed April 2022)
43. IETS – international embryo technology society. 2011. 2010 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2010.pdf>
f (accessed April 2022)
44. IETS – international embryo technology society. 2013. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2012.pdf>
f (accessed April 2022)
45. IETS – international embryo technology society. 2015. 2014 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2015.pdf>
f (accessed April 2022)
46. IETS – international embryo technology society. 2020. 2020 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf (accessed April 2022)
47. Jakubec V, Bezdíček J, Louda F. 2010. Selekce – inbríding – hybridizace. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
48. Jakubec V, Říha J, Golda J, Majzlík I. 1999. Odhad plemenné hodnoty hospodářských zvířat. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
49. Jelínek P, et al. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno.
50. Jelínková S. 2021. Genomika – fenomén šlechtění. *Náš chov* **8**:18-20.

51. Kruip AM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* **42**:675-684.
52. Kudláč E, Holý L. 1984. Řízení a kontrola reprodukce ve velkochovech skotu. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
53. Lazzari G, Galli C. 1993. Salvage of valuable germplasm of sterile cattle by in vitro technologies. Réunion Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Lyon.
54. Lonergan P, Fair T. 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences* **4**(4):255–268.
55. Lorenc M. 2002. Šlechtitelská práce v chovu skotu aneb cesta do hlubin genetiky skotu. Chovservis a.s., Hlavečnick.z
56. Louda F, Bjelka M, Ježková A, Pozdíšek J, Stádník L, Bezdíček L. 2017. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o, Rapotín.
57. Louda F, Stádník L, Ježková A, Bjelka M. 2006. Management reprodukčního procesu ve stádě dojených krav. Pages 129-131 in Koza M, Jedelská R, Kopecký J, editors. Vliv výrobních faktorů a welfare na zdraví a plodnost dojnic a kvalitu a bezpečnost mléka jako potravinové suroviny. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
58. Louda F, Vaněk D, Ježková A, Stádník L, Bjelka M, Bezdíček J, Pozdíšek J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
59. Louda F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita, Praha.
60. Madan ML. 2002. Biotechnologies in animal reproduction, key note address at international conference on animal biotechnology. Tamilnadu Veterinary and Animal Science University, Chennai.
61. Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K, Kubíčková S, Trávníčková I. 2019. Kryokonzervace embryí skotu definovaného pohlaví produkovaných in vitro pro embryotransfer. *Veterinářství* **69**:872-875.
62. Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K. 2016. Současné možnosti využití reprodukčních biotechnologií v chovech skotu. *Veterinářství* **66**:526-529.
63. Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K. 2018. Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro. Státní veterinární správa, Praha.

64. Machatková M, Jeřeta M. 2009. Faktory ovlivňující efektivnost produkce embryí skotu in vitro. *Náš chov* **11**:24-26.
65. Machatková M, Trávníčková I, Hulínská P, Hanzalová K. 2021. Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu. Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Praha.
66. Machatková M, Trávníčková I, Kubíčková S, Hulínská P. 2021. Efektivnější produkce sexovaných embryí skotu v systému in vitro. *Veterinářství* **71**:707-709.
67. Machatková M. 2006. Vývojové trendy v produkci geneticky cenných embryí skotu superovulací a metodou in vitro. *Veterinářství* **56**:299-301.
68. Marvan F, Hampel A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita, Praha.
69. Meiyu Q, et al. 2013. Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering* **18**:1-3.
70. Merton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quality in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology* **59**:651-674.
71. Motyčka J, Vacek M, Šlejtr J, Chládek G, Vodrásek L, Pazdera J. 2005. *Šlechtění holštýnského skotu*. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, Praha.
72. Niemann H, Seemark B. 2018. The Evolution of Farm Animal Biotechnology. Pages 1-22 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. *Animal biotechnology 1*. Springer, Německo.
73. Ondráková M. 2015. Jak vlastně pracuje genomická selekce?. *Náš chov* **9**:84-89.
74. Palma GA, Brem G. 1995. Effect of growth factors IGFI, TGF-alpha, EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology* **43**:291.
75. Příbyl J. 1997. *Šlechtění skotu a jeho vliv na jednotlivé chovy*. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, Praha.
76. Říha J, et al. 2000. *Reprodukce v procesu šlechtění skotu*. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
77. Říha J, Jakubec V, Jílek F, Illek J, Kvapilík J, Hanuš O, Čermák V. 2004. *Reprodukce v procesu šlechtění skotu*. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
78. Říha J, Machatková M, Petelíková J, Jakubec V, Pytloun J, Šereda L, Pavlok A. 1999. *Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat*. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.

79. Rosenkrans CF, First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of Animal Science* **72**: 434-437.
80. Sambauro HH. 2006. Atlas plemen hospodářských zvířat. Brázda, Praha.
81. Sanbuissho A, Threlfall WR. 1989. The effects of estrous cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* **31**:693-699.
82. Skládanka J, et al. 2014. Chov strakatého skotu. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
83. Smith BI. 2011. Nechat ji donosit dvojčata ...nebo ne? *Černostrakaté novinky* **4**:6-7.
84. Sova Z, Bukvaj J, Hampl A, Koudela K, Kresan J, Pješčak M, Podaný J. 1981. Biologické základy živočišné výroby. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
85. Stádník L, Hegedúšová Z, Makarevich A, Kubovičová E, Louda F, Beran J, Nejdlová M. Zvýšení efektivity embryotransferu u holštýnských dojnic využitím hodnocení jejich tělesné kondice. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
86. Stubbings RB, Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* **43**:705-12.
87. Stupka R, et al. 2013. Chov zvířat. Powerprint, Praha.
88. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR. 2017. Genetický zisk před a po genomice. *Černostrakaté novinky* **3**:18-19.
89. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR. 2019. Šlechtitelský program českého holštýnského skotu. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, Hradištko.
90. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR. 2020. Rozbor plnění šlechtitelského programu v roce 2020. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, Hradištko.
91. Šafus P. 2001. Možnosti využití systémů MOET ve šlechtitelských programech v chovu ovcí. Profi Press, Praha. Available from: <https://naschov.cz/moznosti-vyuziti-systemu-moet-ve-slechtitelskych-programech-v-chovu-ovci/> (accessed April 2022).
92. Šichtař J. 2018. Management reprodukce skotu. *Náš chov* **9**:57-58.
93. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Reproduction and Fertility* **30**:493-497.
94. Thomasen JR, Liu H, Sørensen AC. 2020. Genotyping more cows increases genetic gain and reduces rate of true inbreeding in a dairy cattle breeding scheme using female reproductive technologies. *Journal of Dairy Science* **103**:597–606.

95. Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. 1994. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biology of Reproduction* **53**(6):1385-91.
96. Urban F, et al. 1997. Chov dojeného skotu. Apros, Praha.
97. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* **52**(6):1067-78.
98. Vieira L, Rodrigues C, Netto AC, Guerreiro B, Silveira C, Moreira R, Filho M, Bo G, Mapletoft R, Baruselli P. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* **82**:318–324.
99. Wagtendonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology* **65**:914-925.
100. Walker SK, Heard TM, Seamark RF. 1992. In vivo culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology* **37**:111-126.
101. World Holstein Friesian Federation. 2021. 2020 Annual Statistics Report – World. Available from http://www.whff.info/documentation/documents/WHFFWebstatistics2020web_004.xlsx (accessed April 2022)
102. Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* **68**:77–83.
103. Wrenzycki CH. 2018. In Vitro Production of (Farm) Animal Embryos. Pages 269-304 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. *Animal biotechnology 1*. Springer, Německo.