

Josef Příbyl  
a kolektiv

## PRAVIDLA UCHOVÁVÁNÍ A VYUŽÍVÁNÍ V PLEMENITBĚ ZAMRAZENÝCH POHLAVNÍCH BUNĚK KONÍ



**ISBN:** 978-80-7403-169-4



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

### **Pravidla uchovávání a využívání v plemenitbě zamrazených pohlavních buněk koní**

Autoři

**J. Příbyl, A. Novotná, J. Příbylová, J. Šichtař, H. Vostrá-Vydrová, L. Vostrý**

<sup>1</sup> VÚŽV Uhřetěves

<sup>2</sup> ČZU Praha-Suchdol

Oponenti

**Ing. Zdenka Majzlíková**

Česká plemenářská inspekce, Praha

**doc. Ing. Karel Mach, CSc.**

Zpracována za podpory MZe ČR,

úkol č. QJ1330189

(Zlepšení systému chovu starokladrubského koně v NH Kladruby nad Labem).



Česká plemenářská inspekce, Praha

vydává

## OSVĚDČENÍ

(12273/ČPI-2017)

o uznání certifikované metodiky  
v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a hodnocení programů  
účelové podpory, schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107.

### **Pravidla uchovávání a využívání v plemenitbě zamrazených pohlavních buněk koní.**

*Autor a předkládající organizace:*

J. Příbyl<sup>1</sup>, A. Novotná<sup>1</sup>, J. Příbylová<sup>1</sup>, J. Šichtař<sup>2</sup>, H. Vostrá-Vydrová<sup>1</sup>, L. Vostrý<sup>1,2</sup>,  
<sup>1</sup> VÚŽV Uhřetěves v.v.i., <sup>2</sup> ČZU Praha-Suchbát, Praha Uhřetěves 2017,  
ISBN: 978-80-7403-169-4

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné  
organizace č. QJ1330189, Zlepšení systému chovu starokladrubského koně v NH  
Kladruby nad Labem.

Projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“ ANO/NE\*.  
V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je  
výsledek typu N<sub>met</sub> zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce  
[http://www.vuzv.cz/index.php?p=vydavatelstva\\_cinnost\\_kategorie&site=default&kateg=4](http://www.vuzv.cz/index.php?p=vydavatelstva_cinnost_kategorie&site=default&kateg=4)

V Praze dne 22. 12. 2017

Česká plemenářská inspekce

Slezská 100/7  
120 00 Praha 2

Razítko odborného orgánu státní správy:

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy: Ing. Zdenka Majzlíková

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ředitelka

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy:

**Souhlas Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:**

*Datum a podpis ředitelky odboru:*

27. 12. 2017  
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

MINISTERSTVO  
ZEMĚDĚLSTVÍ  
Právní 6/3, 12  
110 00 Praha 1 - Nové Město

\* Nchodící se škrtněte.

## Obsah

I. CÍL METODIKY	8
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	8
1. Úvod	8
2. Návrh postupu uchovávání	12
3. Závěr	22
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI NAVRŽENÝCH POSTUPŮ	23
IV. POPIS UPLATNĚNÍ	23
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	23
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	23
VII. VLASTNÍ LITERATURA PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE.	25

## Seznam zkratek

<b>A</b>	- Matice aditivní příbuznosti mezi jedinci
$\alpha_{xy}$	- Koeficient aditivní příbuznosti mezi jedinci x a y
ČMB	- Českomoravský belgik
DNA	- Deoxyribonukleová kyselina
$\Delta F_x$	- Přírůstek $F_x$ za generaci
$\Delta\sigma^2_G$	- Pokles genetické proměnlivosti ( $\sigma^2_G$ ) za generaci
EAAP	- European Association for Animal Production
FAO	- Food and Agricultural Organisation of the United Nations
$F_x$	- Koeficient příbuzenské plemenitby jedince x
$f_{xy}$	- Původový koeficient (Malécot)
GŽZ	- Genetické živočišné zdroje
H	- Hucul
$H_0$	- Heterozygotnost v základní populaci
$H_t$	- Heterozygotnost v generaci t
ID	- Inseminační dávka
L	- Generační interval
$N_e$	- Efektivní velikost populace
$N_{e_c}$	- Efektivní velikost populace na základě přírůstku $\bar{a}_{xy}$
$N_{e_f}$	- Efektivní velikost populace na základě $\Delta F_x$
NH	- Národní hřebčín
$N_i$	- Počet jedinců v generaci i
$N_f$	- Počet plemenic za generační interval použitých v plemenitbě
$N_m$	- Počet plemeníků za generační interval použitých v plemenitbě
NS	- Národní referenční středisko uchování a využití genetických zdrojů
PK	- Plemenná kniha
$R_{xy}$	- Koeficient příbuznosti mezi jedinci x a y (Wright)
SN	- Slezský norik
SNP	- Jednonukleotidový polymorfismus
STKL	- Starokladrubský kůň
$\sigma^2_{G_0}$	- Genetický rozptyl ve výchozí populaci nepříbuzných jedinců
$\sigma^2_{GF}$	- Genetický rozptyl pod vlivem příbuzenské plemenitby
t	- Ekvivalentní počet úplných generací předků
Y	- Samčí pohlavní chromozom

## I. CÍL METODIKY

Česká republika podepsala deklaraci o uchovávání genetických živočišných zdrojů (GŽZ), která se vztahuje především na hospodářská zvířata. Ministerstvo zemědělství ustanovilo "Národní referenční středisko uchování a využití genetických zdrojů" pro genetické zdroje zvířat (NS) a pověřilo Výzkumný ústav živočišné výroby Uhřetěves (VÚŽV) správou uvedeného střediska. Obecná pravidla a doporučení pro uchovávání GŽZ jsou vypracována pod hlavičkou FAO (Food and Agricultural Organisation of the United Nations) a EAAP (European Association for Animal Production).

Cílem předkládané práce je návrh pravidel pro uchovávání a využívání zamrazených pohlavních buněk v chovu GŽZ koní, aby populace vzniklé nově ze zamrazených buněk měly dostatečnou velikost a byly životaschopné.

Navržená pravidla vycházejí z mezinárodních doporučení a zákonitostí populační genetiky. Vstupními údaji jsou velikosti domácích populací a počty jedinců s již zamrazenými pohlavními buňkami a úspěšnost biotechnologie reprodukce. Výstupní údaje a propočty jsou pro několik možností a odpovídají přibližně stavu chovu starokladrubských koní (STKL).

## II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1. Úvod

Především ekonomické tlaky vedou k selekci a rozvoji vysoce výkonných plemen, která se používají v intenzivních způsobech chovu a výroby. Snižuje se význam místních plemen s nižší užitkovostí a výkonností (lower output), ale přizpůsobených místním podmínkám a s nižšími nároky (lower input). Důsledkem je nežádoucí vymírání plemen. Byly opakovaně zpracovány směrnice, například FAO (1998) pro záchranu a udržení ohrožených plemen a vydány knihy a příručky s metodickými zásadami pro práci s GŽZ (Jakubec a kol., 2012, Oldenbroek a kol., 1999). Ochrana GŽZ vyžaduje propracovaný organizační systém pro řízení dobře pracujícího selekčního programu a plemenitby. S tím souvisí počítačově vedený informační systém pro průběžný pečlivý sběr, zpracovávání a pravidelná vyhodnocování údajů o sledovaných vlastnostech, zdraví, plodnosti, molekulárně-genetických údajích a původech zvířat, který slouží ke genetickému hodnocení jedinců a populací a je podkladem pro selekční a chovatelská rozhodnutí.

Cílem je zachovat co největší genetickou rozmanitost chovaných druhů a plemen zvířat pro zajištění dostatečné výživy lidstva, s vyloučením rizika v nejistých budoucích podmínkách. Budoucí podmínky mohou klást jiné nároky na chovaná zvířata jednak z hlediska úrovně užitkovosti, ale i přizpůsobivosti měnícímu se podnebí, odolnosti vůči nákazám, s pravidelnou reprodukcí a zaměřením na odlišné (speciální) tržní výrobky z chovu zvířat.

Genetická proměnlivost uvnitř živočišného druhu je z 50 % dána rozdílnostmi mezi plemeny. Ztráta každého plemene je proto nenahraditelná. Ovšem plemena uvnitř Evropy jsou do značné míry příbuzná, mnohdy jde o stejné plemeno chované v další zemi pod jiným názvem. S plemenem jako jednotkou je proto třeba pracovat v souhrnu celé populace, bez ohledu na státní hranice. Ochrana GŽZ je celospolečenská, nikoliv pouze národní (Oldenbroek a kol., 1999, Vostrý a kol., 2011a).

Pokud z ekonomických důvodů nelze udržet všechna plemena, dělá se mezi nimi na základě více ukazatelů výběr. Těmito ukazateli jsou například schopnost přizpůsobení budoucím novým podmínkám, nositelství jedinečných a ekonomicky důležitých vlastností, kulturně-historická hodnota a genetická jedinečnost. Jedním z důležitých ukazatelů jsou genetické vzdálenosti mezi plemeny (Czerneková a kol., 2006, Jandurová a kol., 2005, Kasarda a kol., 2016, Vostrá-Vydrová a kol., 2016a) a uchovávána by měla být ta plemena, která se geneticky významně liší. S tím souvisí i posouzení, kteří jedinci do daného plemene patří.

Nejvhodnějším způsobem zachování daného plemene je nalézt způsob jeho chovatelského využití za stávajících hospodářských podmínek. To se často nedaří, proto se přistupuje k umělým opatřením pro záchranu ohrožených plemen. Jedná se o chov původním způsobem a v původních výrobních podmínkách



(in situ), nebo chov v náhradních podmínkách (ex situ) a zamrazování pohlavních buněk. V chovatelském provozu se používají všechny uvedené způsoby společně.

Ve všech případech je cílem zachování vnitroplemenné genetické proměnlivosti. Ta je ovlivněna selekcí, migrací, mutacemi, náhodným genetickým driftem a nárůstem koeficientu příbuzenské plemenitby ( $F_x$ ). Pozornost je třeba věnovat všem těmto případům.

Nárůst  $F_x$  za generaci ( $\Delta F_x$ ) a genetický drift souvisí s rozsahem populace, který bývá vyjadřován efektivní velikostí ( $N_e$ ). Parametry -  $\Delta F_x$  za generaci a  $N_e$  jsou na sobě závislé a lze je navzájem přepočítávat. U obou údajů jsou sledovány jednak "realizované" hodnoty, v jakém stavu populace ve skutečnosti je a dále předpověď vývoje do budoucna. S těmito dvěma přístupy souvisí i odlišné metodické nástroje. Hodnoty  $F_x$  a  $N_e$  závisí na způsobu řízení plemenitby. U hospodářských zvířat se neuplatňuje náhodné (panmiktické) připařování. Chovatel do plemenitby zasahuje, je proto třeba věnovat pozornost výběru rodičovských párů a organizaci plemenitby, aby průměrný  $F_x$  v daném plemeni byl co nejmenší. Zároveň se doporučuje, aby každý plemeník byl použit na co největší počet plemenic a každá plemenice byla při opakované plemenitbě zapuštěna jiným plemeníkem. Tedy i co největší počet plemeníků na plemenici a tím i co největší počet možností spojení rodičovských pohlavních buněk (gamet), který zaručuje uchování co nejširší genetické proměnlivosti. To zároveň znamená udržet dostatečně velké  $N_e$ , s velkým počtem jak plemenic, tak velkým počtem plemeníků zapojených v plemenitbě, kteří jsou co nejméně příbuzní. Za nejmenší udržitelný rozsah  $N_e$  je považováno  $N_e = 50$  reprodukčně schopných a použitých jedinců za generaci (ne nutně v každém chovném roce). Tato hodnota odpovídá  $\Delta F_x = 0,01$  (nárůst o 1 % za generaci).  $F_x$  a  $N_e$  je třeba stanovovat vhodnými metodickými postupy (Oldenbroek a kol., 1999).

Pro stanovení  $F_x$  lze použít rodokmenové záznamy, nebo molekulárně-genetické údaje (Langlois, 2005, Ollivier a kol., 2005, Vostrý a kol., 2011b). V obou případech lze postupovat několika metodami, je třeba zvolit tu, která nejlépe odpovídá způsobu chovu a plemenitby u daného plemene a dostupným údajům. Při práci s rodokmenem je, mimo použité metody, důležitý i počet generací předků (Vostrá-Vydrová a kol., 2016b). Počet generací předků, který se obvykle využívá v běžné plemenářské práci a při dovozech ze zahraničí, je z hlediska práce v GŽZ a pro stanovení  $F_x$  a  $N_e$  nedostačující. V otevřené populaci a pouze 4 až 5 generacích známých předků, je shoda, měřená korelací, mezi rodokmenovými údaji a skutečnou příbuzností na základě molekulárně-genetických SNP markerů přibližně 0,60 až 0,70 (Příbyl a kol., 2012). Zatímco v uzavřené populaci a hlubokém rodokmenu, překrývajícím několik staletí, je korelace přibližně 0,95 (Bauer a kol., 2016). Proto především v populacích s nedostatečnými rodokmenovými záznamy, by  $F_x$  a příbuznost mezi jedinci ( $R_{xy}$ ) měly být stanovovány zásadně podle molekulárně-genetických SNP údajů. Dříve používané mikrosatelity nejsou vhodné, neboť je jich pro vyjádření stavu celého genomu a vazeb mezi zvířaty malý počet.

Pokud se počty jedinců během generací mění, s  $N_i$  jedinců za generaci  $i$ , očekávaná heterozygotnost v generaci  $t$  ( $H_t$ ) vyjádřena relativně k heterozygotnosti v základní generaci ( $H_o$ ) je:

$$\frac{H_t}{H_o} = \prod_{i=1}^t \left(1 - \frac{1}{2N_i}\right) \quad (1)$$

Protože se jedná o harmonický průměr, vyplývají ze vztahu dva důležité závěry:

- 1) Největší  $N_e$  vznikne tehdy, když  $N_i$  má stejnou velikost populace přes všechny generace.
- 2)  $N_e$  je výrazně ovlivněna snížením počtu jedinců  $i$  v pouze jedné generaci.

Z toho vyplývá, že vzniklý efekt hrdla lahve (bottleneck), který jednou způsobil zvýšení hodnoty příbuzenské plemenitby, nemůže být v uzavřených populacích nahrazen pozdějším zvýšením velikosti populace. A to z toho důvodu, že četnost možných budoucích mutací je i ve velkých populacích nízká.

Genetické založení, které podmiňuje genetickou rozmanitost, je v buněčném jádru na chromozomech, ale i mimo jádro v cytoplazmě na mitochondriích. Jak hodnocení nejaderné DNA mitochondrií, tak samostatné hodnocení pohlavního chromozomu Y je vhodné pro posuzování genetického přenosu výlučně z mateřské, či otcovské strany (Cunningham, 2005, Czerneková a kol., 2013, Kavar a kol., 2005). Rovněž tyto údaje by měly být vzaty v úvahu při ochraně genetické proměnlivosti a sestavování rodičovských párů.

Jediné skutečné uchování původních genotypů je zamrazováním buněk, nebo embryí, neboť každá „živá“ populace podléhá trvalé záměrné a přírodní selekci. Zamrazeny by měly být buňky od co nejstarších jedinců – pokud možno zakladatelů. Chov živých populací je však nutný, neboť dochází k postupnému přizpůsobování plemene měnícím se podmínkám prostředí. Při uchovávání pouze zamrazených buněk by mohlo dojít i ke stavu, že po rozmrazení nebudou v nových podmínkách „geneticky staří“ jedinci životní (Oldenbroek a kol., 1999).

Pro zamrazování připadají v úvahu embrya (zárodky), samičí pohlavní buňky - vajíčka (oocyty), samčí pohlavní buňky - inseminační dávky (*ID*) a vzorky tkání, které by v budoucnu měly být využitelné pro oživení a obnovu populací. Nejjednodušší je uchovávání *ID*, jeho nedostatkem je však neuchování mitochondriální části DNA. Zatímco vajíčka a embrya umožňují obnovu plné genetické výbavy jedinců.

Důležitý je cíl zamrazování. Pokud jsou uchovávány pouze *ID* a cílem je obnova plemene v budoucnosti, potom bude potřeba velký počet inseminačních dávek po velkém počtu co nejméně příbuzných jedinců na opakované požití při několikageneračním převodném křížení na matkách jiného plemene. Nově obnovené plemeno bude však nést mitochondriální DNA matek jiného plemene, použitých při křížení a ne původního ochraňovaného plemene. Pokud je cílem zamrazování podpora chovu živé populace, je potřeba inseminačních dávek mnohem méně. V tomto případě se předpokládá, že pravidelně (každý rok) je určitý podíl matek v *GŽZ* inseminován plemeníky z předchozích generací a průběžně se obnovuje zásoba inseminačních dávek od nových plemeníků. Podobně se pracuje i se zamrazenými vajíčky a embryi (Oldenbroek a kol., 1999).

Pro uchování *GŽZ* je důležitá *Ne* za generaci. Do jedinců se započítávají i jedinci zastoupení pouze zamrazenými buňkami. Celá populace se skládá z části živých jedinců a části zamrazených. Zamrazování – například *ID* by měli být především jedinci, kteří nejsou používáni v plemenitbě živé populace a jsou se živou populací co nejméně příbuzní (Jakubec a kol., 2012, Oldenbroek a kol., 1999).

Nárůst *F<sub>x</sub>* a velikost *Ne* vyjadřuje stav za generaci. Při použití zamrazených buněk, například *ID* a embryí, lze chovatelsky prodloužit generační interval a tím uvnitř generačního intervalu snížit přírůstek  $\Delta F_x$  za jednotku času (za jeden rok). Tím lze dosáhnout za zvolený časový úsek, například 100 let, nižší celkový nárůst *F<sub>x</sub>*. Prodloužení generačního intervalu lze dosáhnout použitím v plemenitbě „geneticky starých“ jedinců, například narozených před čtvrt stoletím (Jakubec a kol., 2012, Oldenbroek a kol., 1999) a to jak inseminačních dávek, tak zamrazených vajíček a embryí. Dále inseminace zamrazenými *ID* umožňuje výběr z většího počtu plemeníků, vhodnější sestavování rodičovských párů a zaměření cíle šlechtění na „staré“ jedince, kteří více odpovídají původnímu typu chované populace (Müller a Müller, 2017).

Úspěšnost inseminace klisen je ovlivněna řadou činitelů a na úspěšném zabřezávání se podílí jak klisna, tak hřebec. Klisna ovlivňuje výsledek plemenitby z mnoha stran, avšak pokud má být reprodukce koní úspěšná, jeden z nejdůležitějších činitelů je věk klisny. Z mnohých přehledů, např. Morris a Allen (2002), vyplývá ideální věk pro reprodukci klisen do 14 let s tím, že zvyšující se věk je v záporné korelaci s reprodukční výkonností, protože je sníženo zabřezávání a zvyšují se ztráty březostí (např. Allen a kol., 2007). Z pohledu hřebce se jedná především o kvalitu čerstvé odebraného a rozmrazeného ejakulátu. Bohužel ne každý hřebec je schopen dát tak kvalitní sperma, aby se mohl zařadit do inseminace. Správný výběr vhodného hřebce do inseminace je tedy naprosto zásadní krok, který ovlivňuje zabřezávání klisen. Hřebce lze proto rozdělit do dvou skupin: 1/ okamžitá inseminace čerstvým ejakulátem nebo přirozená plemenitba, 2/ inseminace chlazenou či mrazenou inseminační dávkou.

V chovu *STKL* se povětšinou používala přirozená plemenitba. Zabřezávání *STKL* klisen po přirozené plemenitbě se v letech 2006-2009 pohybovalo okolo 40% a celková natalita přes 50 % (Šichtař, 2017). Je známo, že zabřezávání po přirozené plemenitbě je obecně lepší než po inseminaci a pohybuje se například u anglického plnokrevníka kolem 54-60 % (Morris a Allen, 2000, Allen a kol., 2007). Ztráty březostí se

v případě přirozené plemenitby u tohoto plemene pohybují okolo 17%, přičemž živé hříbě porodí 83% klisen z těch, u kterých nedošlo ke ztrátě březosti. Pro jasnou představu účinnosti přirozené reprodukce dle výsledků výše uvedených studií může posloužit příklad, kdy je zapuštěno 100 klisen, 60 z nich zabřežne, 10 ztratí hříbě v průběhu březosti a živé hříbě porodí z celkového počtu 100 zapouštěných klisen zhruba 40 klisen.

Plemena *ČMB*, *H*, *SN* a *STKL* jsou zařazena do *GŽZ* České republiky a je nutné uchovat genetický materiál vhodný pro zachování a případné obnovení populací těchto plemen. Vzhledem k rozšíření biotechnologických metod reprodukce koní v posledních desetiletích, lze dlouhodobě uchovávat spermie, vajíčka a embrya (Loomis a Squires, 2005, Hinrichs, 2013).

V koňské reprodukční praxi vždy dochází k selekci hřebců pro zařazení do inseminace, a to na základě zhodnocení kvality čerstvého, chlazeného a kryokonzervovaného ejakulátu. Tento způsob ovšem nelze v plné míře uplatnit u hřebců plemen patřících k ohroženým druhům nebo do *GŽZ* (Roldan a kol., 2006). Výsledek inseminace je tedy, z pohledu hřebce zařazeného do *GŽZ*, značně ovlivněn kvalitou ejakulátu po rozmrazení. U kvalitních kryokonzervovaných *ID* by po rozmrazení měla pohyblivost spermií vpřed za hlavičkou dosahovat alespoň 30%. Tento parametr je však značně ovlivněn plemennou příslušností a individualitou hřebce. Například rozmrazené spermie *STKL* hřebců dosahovaly průměrně pouze 13 a 23% pohyblivosti, v závislosti na ředidlech použitých ke kryokonzervaci ejakulátu (Šichtař a kol., 2017). Zabřezávání klisen v reprodukční sezóně se po inseminaci kvalitní kryokonzervovanou *ID* pohybuje v rozsahu 50-90% (Loomis, 2001). Z tohoto údaje ale nelze odvozovat, kolik bylo použito *ID* a jak dlouho (kolikrát) byla klisna inseminována, než zabřežla. Parametr s mnohem větší vypovídací hodnotou je zabřezávání klisny na říjový cyklus (na osemenění je téměř vždy použita pouze jedna *ID* během říje). Zde se již dostáváme na hodnoty zhruba 30-50% (Sieme a kol., 2003, Vidament, 2005).

V ČR bohužel nejsou úředně dostupné celostátní údaje o zabřezávání klisen (na rozdíl od skotu) po inseminaci kryokonzervovanou *ID*. Z výše uvedeného lze odvodit přibližný potřebný počet *ID* na zabřeznutí klisny a porod živého hříběte. V případě 40% zabřezávání po inseminaci jednou *ID* během jednoho říjového cyklu potřebujeme 2,5 *ID* na zabřeznutí klisny. Z důvodu krátké životaschopnosti kryokonzervovaných spermií po rozmrazení, lze během jednoho cyklu použít k inseminaci i více *ID*. Při využití dvou a více *ID* během jedné říje se však zabřezávání klisen zvýší zhruba o 10% (Vidament a kol., 1997). Aby bylo dosaženo po kryokonzervované *ID* ohřevení 64% klisen ze zabřezlých (Vidament, 2005), počet *ID* potřebných k vyprodukování jednoho živě narozeného zvířete činí zhruba 3,4 ks.

V dnešní době je sice nejvíce využívanou metodou reprodukce koní v ČR inseminace, ovšem mohou se vyskytnout případy, kdy není vhodné nechat zabřeznout geneticky hodnotnou klisnu a „vyblokovat“ ji tak na zhruba rok z reprodukčního procesu. V tomto případě lze využít ve světě hojně využívanou metodu embryotransferu. Tento proces zahrnuje inseminaci klisny, výplach embrya z dělohy a přenos takto získaného embrya do klisny příjemkyně. Tímto způsobem získané embryo od matky dárkyně se ovšem nemusí ihned přenést, ale lze jej poměrně účinně kryokonzervovat (embrya se povětšinou mrazí pomocí vitrifikace) a uchovat ho tak po několika desítkách let.

Embryotransfer je poměrně náročný, vyžaduje velmi zkušené pracovníky, s odpovídajícím vybavením, což zvyšuje finanční náročnost této metody. Na získání jednoho embrya je zapotřebí vypláchnout klisnu nejméně dvakrát (McCue a Squires, 2015), přičemž zabřezávání po přenosu vynikajících čerstvých embryí se pohybuje kolem 70% a procento ohřevených klisen příjemkyň se pohybuje kolem 64% ze všech přenesených embryí (Panzani a kol., 2016). V případě dlouhodobého uchování embryí lze využít vitrifikace. Po přenosu takto dlouhodobě uchovaných embryí lze očekávat zabřezávání kolem 65% (McCue a Squires, 2015) s tím, že v 64% případech se po přenosu narodilo živé hříbě. V podmínkách ČR uveřejnili Müller a Müller (2016) 53% zabřezávání, kdy v 50% se po přenosu vitrifikovaných embryí narodilo živé hříbě.

Velmi zajímavá metoda asistované reprodukce u koní je čím dál více se rozšiřující tvorba embryí v laboratorních podmínkách. V takovém případě je nutné odebrat vajíčka z vaječníků klisny. K tomu lze využít vaječníků odebraných post mortem, nebo lze opakovaně odebírat vajíčka z živé dárkyně. I když se jedná, ve světovém měřítku, o poměrně využívanou metodu, o úspěchu rozhoduje několik činitelů. Prvním je výběr dárkyně. Vzhledem k působení různých vlivů nelze odebrat vajíčka u jakékoliv klisny, nicméně zhruba 70% klisen je možné do takového programu zařadit (Hinrichs, 2012) a úspěšnost odběru vajíček

z vaječnicků živých dárkyň se pohybuje mezi 20-90% (Colleoni a kol., 2007). Po získání vajíček je nutné tyto v laboratorních podmínkách přebrat a pouze vhodná nechat dozrát do fáze, kdy jsou schopná oplození (do této fáze se dostane 50-70% z odebraných vajíček). Vzhledem k tomu, že u koní nelze použít „normální“ oplození v laboratorních podmínkách, využívá se speciálního přístroje (mikromanipulátor), kdy je jedna jednotlivá spermie vybrána a injikována do jednoho vajíčka. Zde je nutné zdůraznit, že ne každý hřebčí ejakulát lze použít. Studie autorů Hererra a kol. (2012) uvádí, že pouze dva ze sedmi hřebců bylo možné použít pro úspěšné "mikromanipulační" oplodnění a tvorbu embryí v laboratorních podmínkách. Autoři dodávají, že každý ejakulát každého hřebce by měl být pro tuto metodu nejdříve otestován. Výše uvedeným způsobem lze z injikovaných vajíček vyprodukovat 5-40 % použitelných embryí (Colleoni a kol., 2007). Jak je z výše uvedeného patrné, účinnost produkce embryí v laboratorních podmínkách je velmi proměnlivá a to především vzhledem k extrémním rozdílům mezi dárkyněmi vajíček a dárci spermatu (Galli a kol., 2014).

Pro produkci embryí v laboratorních podmínkách lze ovšem využít i vitrifikovaná vajíčka. V humánní asistované reprodukci je využití vitrifikovaných vajíček poměrně běžné (Cobo a Diaz, 2011), ovšem u koní jsou prozatím dvě studie, ze kterých si lze udělat obrázek o úspěšnosti metody. Po vitrifikaci dvaceti pěti vajíček částečně dozrálých v laboratorních podmínkách se po přenosu šesti zdravých embryí, vzniklých oplozením a vývojem v laboratoři, podařilo objevit srdeční činnost u čtyř embryí, což je úspěšnost 16% (Maclellan a kol., 2010). Další studie měla odlišný přístup. Vitrifikována byla nedozrálá vajíčka. Ze sedmdesáti dvou vajíček bylo přeneseno pět embryí (úspěšnost 7%) a po přenosu všech embryí se narodilo jedno hříbě (Ortiz-Escribano a kol., 2017).

## 2. Návrh postupu uchovávání

### 2.1. Příbuznost a genetická proměnlivost

Vzrůstem příbuznosti mezi jedinci uvnitř populace a s tím spojeným vzrůstem koeficientu příbuzenské plemenitby ( $F_x$ ) v následných generacích, stoupá na chromozomech počet lokusů, které se stávají homozygotní. Tím dochází k poklesu genetické proměnlivosti a vyššímu výskytu letálních vad. Sledování příbuznosti jedinců zařazovaných do plemenitby je proto velmi důležité. Příbuznost mezi jedinci  $x$  a  $y$  je vyjadřována koeficientem příbuznosti (Wright, 1969)

$$R_{XY} = \frac{\sum 0,5^{n_1+n_2}(1+F_A)}{\sqrt{(1+F_X)(1+F_Y)}}, \quad (2)$$

nebo koeficientem aditivní příbuznosti (Falconer a Mackay, 1996)

$$a_{XY} = \sum 0,5^{n_1+n_2} (1 + F_A), \quad (3)$$

kde  $n_1, n_2$  - Počty generací z otce a z matčiny strany ke společnému předku,

$F_A, F_X, F_Y$ , – Koeficient příbuzenské plemenitby společného předka, prvního a druhého rodiče.

Koeficient aditivní příbuznosti ( $a_{XY}$ ) je roven dvojnásobku původového koeficientu  $f_{XY}$  (Malécot, 1948). Je odlišný od koeficientu příbuznosti ( $R_{XY}$ ) dle Wrighta. Koeficient  $a_{XY}$  vychází z matice aditivní příbuznosti  $\mathbf{A}$ , která se rovněž používá ve statistických postupech BLUP - animal model. Počítačové programy, všeobecně používané na stanovení příbuznosti, pracují právě s hodnotami  $a_{XY}$ . Shoda mezi  $a_{XY}$  a  $R_{XY}$  je pouze tehdy, jestliže jedinci  $x$  a  $y$  nejsou sami výsledkem příbuzenské plemenitby. Pokud jsou  $x$  a  $y$  výsledkem příbuzenské plemenitby, dosahují uvedené koeficienty rozdílné hodnoty, v některých případech až krajní hodnoty, kdy například  $R_{XY} = 0,15$  odpovídá  $a_{XY} = 0,30$ .

V delším sledovaném období za více generací a náhodném připárování, se hodnoty vzájemné příbuznosti mezi jedinci a koeficienty příbuzenské plemenitby v populaci navzájem ustalují a mezi průměrnou hodnotou  $F_x$  v populaci a průměrnou aditivní příbuzností  $\bar{a}_{XY}$  je vztah

$$F_x = \bar{a}_{XY}/2 \quad (4)$$

Veličinu  $\bar{a}_{XY}$  lze využít pro přibližné stanovení efektivní velikosti populace ( $N_e$ ) (Lacy, 1995, Maignel a kol., 1996)

$$N_e \sim t / \bar{a}_{XY} \quad , \quad (5)$$

kde  $t$  - Ekvivalent úplných generací předků

Genetický rozptyl výchozí populace nepřibuzných zvířat s nulovým koeficientem příbuzenské plemenitby ( $\sigma_{G0}^2$ ) se v populaci s příbuzenskou plemenitbou v závislosti na hodnotě  $F_x$  snižuje na genetický rozptyl ( $\sigma_{GF}^2$ )

$$\sigma_{GF}^2 = (1 - F_x) \sigma_{G0}^2 \quad (6)$$

Závislost genetického rozptylu  $\sigma_{GF}^2$  v % na  $F_x$  je uvedena v tabulce 1. V tabulce jsou uvedeny i průměrné hodnoty za populaci pro  $\bar{a}_{XY}$  a přibližné hodnoty efektivní velikosti populace ( $N_e$ ), stanovené podle (5). Jak vyplývá z tabulky, při  $F_x = 0,05$  (5 %) je efektivní velikost populace  $N_e = 151$  jedinců. Jestliže  $F_x$  stoupl na  $F_x = 0,15$ , efektivní velikost populace klesla na  $N_e = 50,33$  jedinců a genetická proměnlivost v populaci poklesla na 85 % původní hodnoty v populaci nepřibuzných jedinců. Nad tuto hodnotu  $F_x$  již populace nedosahuje hodnot  $N_e = 50$  a je vysoce ohrožena. Přirozený vývoj v ní nezadržitelně vede k náhodnému zvyšování počtu geneticky homozygotních lokusů, postupné ztrátě původních vlastností a zániku plemene. Jestliže průměrný  $F_x$  v populaci dosáhl hodnoty  $F_x = 0,5$  (50 %), klesl genetický rozptyl na 50 % stavu ve výchozí populaci nepřibuzných jedinců a efektivní velikost populace dosáhla pouze  $N_e = 15,10$  jedinců, bez ohledu na počet jedinců skutečných.

Tab. 1. Genetické proměnlivosti  $\sigma_{GF}^2$  v % v závislosti na příbuzenské plemenitbě.

Průměrná hodnota koeficientu příbuzenské plemenitby ( $F_x$ )	Průměrná hodnota aditivního koeficientu příbuznosti ( $\bar{a}_{XY}$ ) <sup>1</sup>	$\sigma_{GF}^2$ %	Přibližná hodnota $N_e$ <sup>2</sup>
0	0	100	
0,05	0,1	95	151,00
0,10	0,2	90	75,50
0,15	0,3	85	50,33
0,20	0,4	80	37,75
0,25	0,5	75	30,20
0,30	0,6	70	25,17
0,35	0,7	65	21,57
0,40	0,8	60	18,88
0,45	0,9	55	16,78
0,50	1,0	50	15,10

<sup>1</sup> Koeficient aditivní příbuznosti ( $a_{xy}$ ), je odlišný od koeficientu příbuznosti dle Wrighta ( $R_{xy}$ ). Shoda mezi  $a_{xy}$  a  $R_{xy}$  je pouze tehdy, jestliže jedinci  $x$  a  $y$  nejsou sami výsledkem příbuzenské plemenitby.

<sup>2</sup> Stanoveno podle koeficientu aditivní příbuznosti a ekvivalentu úplných generací předků (Lacy, 1995, Maignel a kol., 1996), který u *STKL* dosahuje  $t = 15,1$  generací (Vostrá-Vydrová, 2016).

Plemenitbu je třeba organizovat tak, aby z generace na generaci co nejméně narůstala vzájemná příbuznost mezi jedinci. Nárůst příbuznosti souvisí s velikostí populace. Při velkém počtu jedinců obojího pohlaví zapojených v plemenitbě, je větší možnost připarovat nepříbuzné jedince, ve sledu generací střídat na populaci plemenic větší počet otcovských linií a plemeníků a tím zpomalit nárůst příbuznosti.

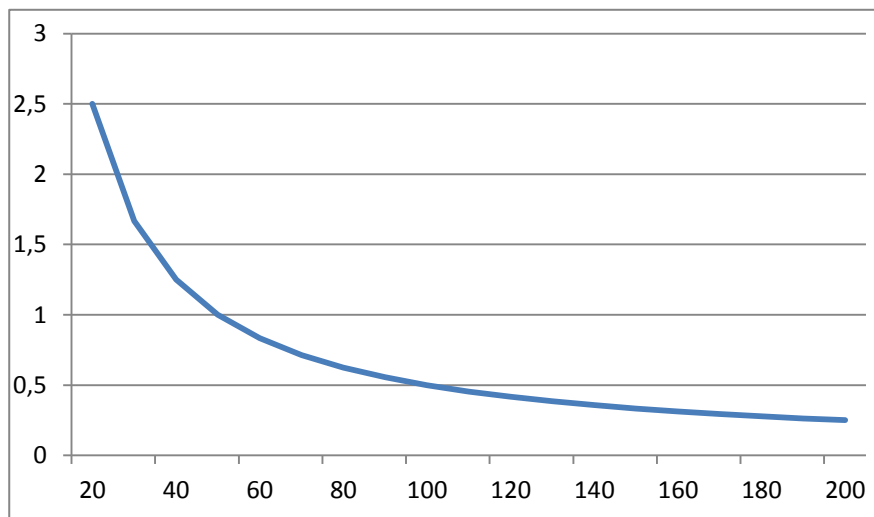
Ve sledu generací se vzájemná příbuznost mezi jedinci projevuje nárůstem koeficientu příbuzenské plemenitby. Nárůst  $F_x$  v populaci z generace na generaci ( $\Delta F_x$ ) odpovídá vztahu

$$\Delta F_x = 1 / 2Ne \quad (7)$$

S nárůstem příbuznosti a koeficientu příbuzenské plemenitby souvisí pokles genetické proměnlivosti za generaci ( $\Delta\sigma^2_G$ ). Vztah mezi změnou (úbytkem) genetické proměnlivosti za generaci v % a efektivní velikostí populace od  $Ne = 20$  do 200 je uveden na obrázku 1.

$$\Delta\sigma^2_G = \sigma^2_{G0} / 2Ne \quad (8)$$

Obrázek 1. Úbytek genetické proměnlivosti v % za generaci ( $\Delta\sigma^2_G$ ) v závislosti na efektivní velikosti populace ( $Ne$ ).



Snižování genetické proměnlivosti v závislosti na velikosti populace probíhá podle křivky. Při efektivní velikosti populace  $Ne = 20$  činí ztráta genetické proměnlivosti za generaci 2,5 %, při  $Ne = 50$  činí ztráta 1 %, při  $Ne = 100$  činí ztráta 0,5 % a při  $Ne = 200$  činí ztráta genetické proměnlivosti za generaci 0,25 %. Většina odborníků se shodla, že pokles genetické proměnlivosti za generaci  $\Delta\sigma^2_G = 1$  % je přijatelný a tudíž  $Ne > 50$  je dostatečné.

## 2.2. Velikost současných populací

Pro vybraná plemena koní byly vypočteny efektivní velikosti populací (tabulka 2), které odpovídají dosahovaným hodnotám  $\bar{a}_{XY}$  a  $F_x$ , a které souvisí rovněž se způsoby využívání jedinců v plemenitbě. Dále jsou uvedeny počty jedinců v populacích, přírůstky koeficientu příbuzenské plemenitby za generaci ( $\Delta F_x$ ) a ekvivalent úplných generací předků ( $t$ ). Hodnoty výpočtů vycházejí z jedinců zapsaných v plemenných knihách (PK), kteří jsou schopni reprodukce a mohli by být zařazeni do plemenitby (nikoliv z počtu jedinců v plemenitbě použitých). Jedná se pouze o jedince chované v ČR, bez zohlednění zástupců týchž plemen v zahraničí. U plemen slezský norik (SN), českomoravský belgik (ČMB) a hucul (H) je nižší počet známých generací předků. Efektivní velikosti populací jsou proto pravděpodobně nadhodnocené a příbuznosti a koeficient příbuzenské plemenitby podhodnocené. Při hlubších rodokmenech by vyšly hodnoty věrohodnější.

Různé koeficienty uvedené v tabulce vedou k částečně odlišným závěrům. Za nejsprávnější způsob stanovení efektivní velikosti populací považují autoři hodnotu stanovenou na základě aditivní příbuznosti mezi jedinci ( $N_{eC}$ ), neboť zohledňuje jak vzájemnou příbuznost jedinců, tak jejich výběrové a nerovnoměrné využívání v plemenitbě. Nerovnoměrné využívání v plemenitbě rovněž způsobuje, že u skutečných populací v tabulce 2 není v dané generaci dodržen vztah (4).

Tab. 2. Velikosti vybraných populací GŽZ v ČR <sup>3</sup>.

Plemeno	Hřebců	Klisen	Poměr pohlaví	$N_{eF}$	$N_{eC}$	$F_x$	$\Delta F_x$	$\bar{a}_{XY}$	$t$
STKL	56	551	1:10	52	45	0.13	0.010	0.21	15
STKL-B	28	264	1: 9	62	53	0.11	0.008	0.25	16
STKL-V	28	287	1:10	45	40	0.14	0.011	0.34	15
SN	44	454	1:10	95	80	0.05	0.005	0.12	9
ČMB	61	895	1:14	101	88	0.04	0.005	0.09	10
H	20	481	1:24	54	60	0.05	0.009	0.12	7

<sup>3</sup> Počty bez zahrnutí jedinců v zahraničí.

Kde: *STKL* – celé plemeno starokladrubského koně, *STKL-B* – samostatně bělouši starokladrubského koně, *STKL-V* – samostatně vraníci starokladrubského koně (Vostrá-Vydrová a kol., 2016a), *SN* – slezský norik (Vostrá-Vydrová a kol., 2016b), *ČMB* – českomoravský belgický kůň (Vostrá-Vydrová a kol., 2016b), *H* – hucul (Vostrá-Vydrová a kol., 2015),  $N_{eF}$  – efektivní velikost populace na základě přírůstku koeficientu příbuzenské plemenitby (Gutiérrez a kol., 2008),  $N_{eC}$  – efektivní velikost populace na základě přírůstku aditivní příbuznosti (Cervantes a kol., 2011),  $F_x$  – koeficient příbuzenské plemenitby,  $\Delta F_x$  – průměrný přírůstek koeficientu příbuzenské plemenitby,  $\bar{a}_{XY}$  – průměrný koeficient aditivní příbuznosti mezi jedinci,  $t$  – ekvivalent kompletních generací předků (Lacy, 1995, Maignel a kol., 1996).

Z tabulky 2 vyplývá, že skutečná velikost populace (počty hřebců + počty klisen) je přibližně 5,5 až 13,5 x větší, než efektivní velikost populace ( $N_e$ ).  $N_e$  vyjadřuje počet pro dokonalý stav rovnoměrného zapojení všech jedinců v plemenitbě a rovný počet podle pohlaví. Pro zajištění stejně velké efektivní populace a tím stejně úspěšné ochrany GŽZ, by bylo proto možno, při jiné organizaci plemenitby a jiném stupni vzájemné příbuznosti, chovat podstatně menší počty jedinců. Populace *STKL* mají (porovnání hodnot  $F_x$  v tabulkách 1 a 2) přibližně 86 až 89 % genetické proměnlivosti z původních hodnot uvnitř výchozích populací (ztraceno až 14 % genetické proměnlivosti) a za generaci ubývá přibližně 1 % proměnlivosti (obrázek 1).

### 2.3. Počty v současnosti uložených buněk

*NH* Kladruby n. Labem má uloženy *ID* od 19 *STKL* hřebců - běloušů a vraníků (Šancová, 2017). Průměrný počet dávek na plemeníka je 30, s rozpětím od 1 do 150 *ID*. Pro *NS* jsou uchovávány *ID* plemen *ČMB*, *H*, *SN* a *STKL* a v současnosti jsou odebírána vajíčka *STKL*. Znamé údaje jsou souhrnně uvedeny v tabulce 3 (Pikousová, 2017). Dávky jsou odebírány od roku 2002 do současnosti. Většinou se jedná o dávky plemeníků, kteří byli zároveň používáni v plemenitbě.

Tab. 3. Počty v současnosti uchovávaných *ID* pro *NS* (Pikousová, 2017).

Plemeno	Počet hřebců	<i>ID</i> průměr	<i>ID</i> nejméně	<i>ID</i> nejvíce	Zásoba <i>ID</i> celkem
ČMB	12	54	1	103	648
H	6	57	35	100	342
SN	11	63	25	100	693
STKL <sup>4</sup>	38	56	4	104	2128

<sup>4</sup> Dohromady pro bělouše a vraníky.

## 2.4. Úspěšnost oživení

Při přirozené plemenitbě *STKL* je úspěšnost zabřezávání při jednotlivých přípuštěních přibližně 40% a celková natalita přes 50 % (údaje z let 2006-2009). V současnosti jsou rozpracované postupy pro uchovávání zamrazených *ID*, vajíček a embryí. Biotechnologické metody prodělávají trvalý vývoj, který spěje jednak k vyšší úspěšnosti práce s biologickými vzorky a ke snížení ceny za úkony. Především práce se zamrazenými *ID* (Šichtař a kol., 2017) a zamrazenými embryi (Müller a Müller, 2016) je zvládnuta úspěšně. Práce s vajíčky je náročnější. Pro získání, dozrání do oplození schopného stavu a pro oplodnění je třeba použít speciálního vybavení a laboratorního zázemí (inkubátor, mikromanipulátor s mikroskopem), navíc je zapotřebí speciálně vyškoleného a velmi zručného člověka. Tento postup není v chovu koní v ČR běžně nabízen, nicméně je na hraně výzkumu a zavedení do praxe (Šichtař, 2017). V Evropě (např. Itálie, Holandsko) i ve světě se však jedná o poměrně běžný způsob reprodukce koní. Chovatelské služby poskytované v této oblasti v ČR jsou lacinější než od zahraničních laboratoří.

Úspěšnost celého postupu inseminace mrazenou *ID* závisí na kvalitě odebraných vzorků před zamrazením, životaschopnosti po rozmrazení, úspěšnosti inseminace, uhnízdění embrya a zdárném ukončení březosti porodem zdravého hříběte. V průměru lze očekávat, že na narození hříběte *STKL* jsou potřeba 4 *ID*. V případě práce s vajíčky, je minimální počet vitrifikovaných vajíček 6 a více, které se po rozmrazení oplodní pomocí mikromanipulátoru. Pro oplození vajíčka v laboratorních podmínkách je obecně počítáno s 1 *ID*. Nicméně pokud je *ID* zpracována v podobě pejet, lze ji nastříhat na 6-10 kusů a jednotlivě použít. Při využití zamrazených embryí pro produkci jednoho hříběte je obecně počítáno nejméně se třemi přenosy. Úspěšnost oživení je souhrnně uvedena v tabulce 4.

Dále je třeba počítat, že z narozených hříbat je po úspěšném odchovu, s přihlédnutím k chovatelským hlediskům, přibližně 1/2 klisen schopna pro zařazení do chovného stáda (Novotná, 2017, Petřík, 2017, Žlumov, 2017). To je podmíněno předchozí řízenou plemenitbou, aby se zabránilo zbytečnému narození vysoce příbuzných jedinců, z nichž jen jeden bude následně pokračovatelem v plemenitbě. Bez řízené plemenitby by se zařazoval z odchovaných hříbat nižší podíl. V tabulce 4 uváděné počty uvažují s poměrem pohlaví narozených hříbat 1 : 1.

Tab. 4. Hrubý odhad počtu zamrazených *ID*, vajíček a embryí potřebných na narození zdravého hříběte a odchov klisny a její zařazení do plemenitby.

	Inseminačních dávek	Vajíček <sup>5</sup>	Embryí
Na narozené hříbě	3-4	6 a více	3 a více
Na odchovanou klisnu	16	24	12

<sup>5</sup> Na oplodnění vajíček inseminační dávka. Pokud možno na vajíčka od jiné plemence *ID* jiného pleménika, aby byla zachována co největší genetická proměnlivost. Kolik dárkyň, tolik nejméně pleméniků.

## 2.5. Potřebné počty na obnovu plemene

V budoucnosti může nastat případ, že bude nutno celé plemeno obnovit ze zamrazených buněk a embryí. To vyžaduje dlouhodobě uchovávat takové množství buněk, aby obnova byla možná a aby obnovená populace byla životaschopná. To znamená, aby po obnově dosahovala  $N_e \geq 50$  a plemenitba v obnovené populaci byla organizovaná tak, aby se uvedená efektivní velikost populace udržela i nadále.

Současné populace jsou na úrovni  $F_x$  podle tabulky 2. Nově obnovované populace pod tuto hodnotu neklesnou, naopak je třeba počítat při tvorbě nové generace s nárůstem  $\Delta F_x$  oproti generaci dárců buněk. Genetická proměnlivost nové generace závisí na příbuznosti mezi jedinci, od nichž byly buňky odebrány. Při nepříbuzných jedincích a nízkém  $F_x$  dárců je možno obnovou vytvořit větší efektivní populaci, při příbuzných dárcích a s vyšším  $F_x$  je možno obnovou vytvořit pouze populaci s menší efektivní velikostí. Dále  $N_e$  obnovované populace závisí na předpokládaném poměru pohlaví v chovu používaných zvířat u nově vzniklé populace.



V tabulce 5 jsou uvedeny počty zvířat za generaci v plemenitbě podle  $F_x$  a  $\alpha_{xy}$  dárců a podle poměru pohlaví u obnovené populace, které zajistí nejméně  $N_e = 50$  za generaci. Dále potřeby buněk na vznik této nové populace. Jedná se o počet  $ID$  při 4 generacích převodného křížení, aby bylo dosaženo podílu genů původního plemene 93,75 %, nebo o počty při obnově pomocí oplodněných vajíček a o počty při obnově plemene pomocí přenosu embryí. Obnova plemene pomocí převodného křížení je vzhledem k délce generačního intervalu velmi dlouhodobá a jak bylo výše uvedeno, v takto vzniklé populaci je mitochondriální  $DNA$  od podkladového mateřského plemene a ne z původní populace, kterou hodláme obnovit.

Při použití na obnovu populace zamrazených vajíček, nebo embryí, mělo by na jednu dárkyni být použito pokud možno pouze takové množství, které zaručí zařazení do populace právě jedné dcery – pokračovatelky. Při větším počtu na dárkyni by stoupla vzájemná příbuznost mezi jedinci budoucí generace, což je nežádoucí.

Tab. 5. Počty jedinců za generaci v plemenitbě v obnovené populaci pro zajištění nejméně  $N_e = 50$  a počty potřebných  $ID$ , vajíček, nebo embryí pro obnovu populace podle poměru pohlaví v obnovené populaci a podle průměrných hodnot  $F_x$  a  $\alpha_{xy}$  dárců.

Poměr pohlaví	Počet hřebců	Počet klisen	Jedinců celkem	Převodné křížení $ID$	Vajíček <sup>6,7</sup>	Embryí <sup>7</sup>
<b>1)</b> $F_x = 0,15$ , $\alpha_{xy} = 0,30$ , $N_e = 50,33$ , $\Delta\sigma_G^2 = 0,99\%$						
1 : 1	25,17	25,17	50,33	1611	604	302
1 : 2	18,87	37,75	56,62	2416	906	453
1 : 5	15,10	75,50	90,59	4832	1812	906
1 : 10	13,84	138,41	152,25	8858	3322	1661
1 : 20	13,21	264,23	277,44	16910	6342	3171
<b>2)</b> $F_x = 0,10$ , $\alpha_{xy} = 0,20$ , $N_e = 75,50$ , $\Delta\sigma_G^2 = 0,66\%$						
1 : 1	37,75	37,75	75,50	2416	906	453
1 : 2	28,31	56,63	84,94	3624	1359	680
1 : 5	22,65	113,25	135,90	7248	2718	1359
1 : 10	20,76	207,63	228,39	13288	4983	2492
1 : 20	19,82	396,38	416,78	25368	9513	4757
<b>3)</b> $F_x = 0,05$ , $\alpha_{xy} = 0,10$ , $N_e = 151,00$ , $\Delta\sigma_G^2 = 0,33\%$						
1 : 1	75,50	75,50	151,00	4832	1812	906
1 : 2	56,63	113,25	169,88	7248	2718	1359
1 : 5	45,30	226,50	271,80	14496	5436	2718
1 : 10	41,53	415,25	456,78	26576	9966	4983
1 : 20	39,64	792,75	832,39	50736	19026	5913

<sup>6</sup> Na oplodnění vajíček inseminační dávka. Pokud možno na vajíčka od jiné plemenice  $ID$  jiného plemena, aby byla zachována co největší genetická proměnlivost. Kolik dárkyň, tolik nejméně plemeníků.

<sup>7</sup> Na dárkyni takový počet vajíček, nebo zárodků, aby zajistil zařazení do chovu pouze jedné dcery – pokračovatelky (nikoliv více) + rezervu, neboť každá dcera nemusí zabřeznout.

Vstupními údaji jsou zvolené  $F_x$  a  $\alpha_{xy}$  dárců buněk, které předurčují  $N_e$  nově vzniklé populace podle tabulky 1. Dále jsou vstupními údaji potřebné počty buněk na vznik jedince, který bude moci být zařazen do plemenitby podle odstavce 2.4. a tabulky 4. Souvislost mezi  $N_e$  a skutečnou velikostí populace - počty v plemenitbě používaných plemeníků a plemenic v budoucí populaci vyplývá ze vzorce

$$N_e = 4 N_m N_f / (N_m + N_f) \quad , \quad (9)$$

kde:  $N_m$  - Počet samců v plemenitbě za generaci,

$N_f$  - Počet samic v plemenitbě za generaci.

Pomocí uvedeného vzorce jsou stanoveny počty plemeníků a počty plemenic, které udrží u nově vzniklé populace  $N_e$  v následných generacích na té úrovni, na jaké při rozmrazení vznikla.

V tabulce jsou uvedeny hodnoty pro aditivní příbuznost dárců 10, 20 a 30 % a poměry pohlaví jedinců používaných v plemenitbě od 1 : 1 do 1 : 20. Samců bývá používáno podstatně méně než samic. Vzhledem k poměru pohlaví narozených hříbat přibližně 1 : 1, musí se narodit dvojnásobný počet hříbat, než kolik je potřebných jedinců četnějšího pohlaví (klisen) pro zařazení do plemenitby.

V tabulce jsou uvedeny 3 možnosti:

1) Populace vzniká z dárců buněk, kteří mají mezi sebou navzájem průměrnou aditivní příbuznost  $\alpha_{xy} = 0,30$  (30 %), což přibližně odpovídá stavu plemene STKL (tabulka 2). S tím souvisí průměrný koeficient příbuzenské plemenitby 0,15 (15 %), efektivní velikost populace 50,33 jedinců a ztráta 0,99 % genetické proměnlivosti za generační interval.

V závislosti na způsobu využívání jedinců této nové populace v plemenitbě (poměr počtu hřebců k počtu klisen), je třeba mít 25,17 až 264,23 klisen a 13,21 až 25,17 hřebců. Celkem je v populaci 50,33 až 277,44 jedinců. Stejně velká efektivní velikost populace ( $N_e$ ) a tím i stejný stupeň ochrany, může proto být udržovaná při velmi rozdílných počtech skutečných jedinců. Plemenic v plemenitbě bývá obvykle více než plemeníků. Při vysokém počtu plemeníků, přibližně vyrovnaném s počtem plemenic, může být skutečná populace poměrně malá. Jak vyplývá z údajů, při poměru pohlaví jedinců v plemenitbě 1 : 20 musí být ochraňovaná populace přibližně 5x větší, než při poměru pohlaví 1 : 2 (277,4 : 56,62 jedinců). S malým počtem plemeníků vznikají velké rodiny příbuzných polosourozenců, při velkém počtu plemeníků je mnoho malých skupin polosourozenců a průměrná příbuznost navzájem uvnitř celé populace je nižší. S velikostí populace souvisí i náklady na obnovu populace a každoroční náklady na provoz. Jedná se proto především o ekonomickou optimalizaci velikosti ochraňované populace, neboť z genetického hlediska výše uvedených 5 způsobů podle poměru pohlaví zajišťuje stejný stupeň ochrany.

Podle jednotlivých možností je na obnovu populace potřeba od 1611 do 16910 *ID*, nebo od 604 do 6342 vajíček, nebo od 302 do 3171 embryí.

2) Při nižší vzájemné aditivní příbuznosti dárců buněk  $\alpha_{xy} = 0,20$  lze docílit vyšší efektivní velikost obnovené populace  $N_e = 75,50$  a tím i menší ohrožení populace. V tomto případě jsou nižší průměrné hodnoty  $F_x = 0,10$  a  $\Delta\sigma_G^2 = 0,66$  %. V závislosti na poměru pohlaví jedinců v plemenitbě bude celková skutečná velikost populace od 75,50 do 416,78 jedinců.

Podle jednotlivých možností je na obnovu populace potřeba od 2416 do 25368 *ID*, nebo od 906 do 9513 vajíček, nebo od 453 do 4757 embryí.

3) Při ještě nižší aditivní příbuznosti dárců buněk  $\alpha_{xy} = 0,10$  bude efektivní velikost obnovené populace dosahovat  $N_e = 151$  jedinců, to znamená ještě větší stupeň jistoty záchrany populace. U dárců buněk bude  $F_x = 0,05$  a  $\Delta\sigma_G^2 = 0,33$  %. Podle způsobu použití v plemenitbě budou celkové počty skutečných jedinců od 151 do 832,39.

Podle jednotlivých možností je na obnovu populace potřeba od 4832 do 50736 *ID*, nebo od 1812 do 19026 vajíček, nebo od 906 do 5913 embryí.

Jak vyplývá z tabulky, při aditivní příbuznosti dárců buněk 0,30 a při poměru pohlaví 1 : 10 je třeba na obnovu populace převodným křížením 8858 *ID*, nebo 3322 vajíček, k jejichž oplodnění budou použity

spermie z uchovávaných *ID*, nebo 1661 embryí. S uvedenými počty jsou spojeny celkové náklady nutné pro zajištění biotechnologických metod reprodukce.

Obnova populace v běžném provozu bude pravděpodobně spojením uvedených třech možností. Jak bylo výše uvedeno, převodné křížení je bez přenosu mitochondriální *DNA*.

## 2.6. Potřebné počty na průběžné používání v plemenitbě

Doporučovaným způsobem plemenitby v *GŽŽ* je spojení přirozené plemenitby s použitím oživených zamrazených embryí a pohlavních buněk, většinou *ID* (Jakubec a kol., 2012, Oldenbroek a kol., 1999). To umožňuje překryv více generací, použít vyšší počet plemeníků a vhodnější sestavování rodičovských párů jak podle příbuznosti, tak podle typu zvířat. Rodičovské páry by měly být sestavovány přes generace. *ID*, vajíčka a embrya by měla pocházet od co nejstarších jedinců, aby došlo k prodloužení generačního intervalu a pokud možno od jiných, než byli používáni v plemenitbě živé populace.

V závislosti na dlouhověkosti činí obnova stáda klisen přibližně 12 až 15 % jedinců, což souvisí s kvalitou ročníku hříbat (Müller a Müller, 2017, Novotná, 2017, Petřík, 2017, Žlumov, 2017). Při úspěšné plemenitbě lze v závislosti na zabřezávání (odstavec 2.4.) ročně odchovat a zařadit do chovu na 100 matek přibližně 12,5 dcer. Stav reprodukce je tedy na hraně udržitelnosti stavů zvířat. Předpokládáme zařazení do plemenitby přibližně ve 4 letech a prvé hříbě v 5 letech. Obnova stáda 15 % představuje přežívání do dalšího roku 85 % klisen z předchozího stavu, v průměru dožití 6,4 reprodukčních roků a přibližný průměrný věk klisen při ohřebení 11,41 roků. Tento údaj přibližně odpovídá stavu u *STKL*, kde podle skupin zvířat a způsobu využívání v plemenitbě je generační interval (*L*) u klisen od 9,10 do 10,47 roků a celkový *L*, společně pro plemence i plemeníky, od 10,37 do 11,30 roků (Vostrá-Výdrová, 2016). Obnova stáda 12 % představuje přežívání do dalšího roku 88 % klisen z předchozího stavu, v průměru dožití 7,69 reprodukčních roků a přibližný průměrný věk klisen při ohřebení 12,69 roků.

S věkem počet jedinců klesá, v důsledku průběžného vyřazování na základě zdravotního stavu a záměrného zásahu chovatele. Uvažovali jsme stejný podíl vyřazování u všech věkových skupin. Přibližná věková skladba stáda klisen je pro obnovu stáda 12 % uvedena v tabulce 6. Při uvedeném modelovém propočtu je do věku 15 let více než 3/4 klisen. Na poslední skupinu, 24 a více, zbývá 8,81 % klisen.

Tab. 6. Věková skladby stáda klisen, při obnově 12 %.

Věk roků	Podíl %	Nápočet %	Věk roků	Podíl %	Nápočet %
5	12,00	12,00	15	3,34	75,49
6	10,56	22,56	16	2,94	78,43
7	9,29	31,85	17	2,59	81,02
8	8,18	40,03	18	2,28	83,30
9	7,20	47,23	19	2,00	85,30
10	6,33	53,56	20	1,76	87,07
11	5,57	59,13	21	1,55	88,62
12	4,90	64,04	22	1,37	89,98
13	4,32	68,35	23	1,20	91,19
14	3,80	72,15	24	8,81	100,00

V tabulce 7 jsou údaje, které odpovídají možnosti každoročního zařazení do chovu výše uvedené 1/2 z narozených hříbat a obnovy stáda 12 % podle tabulky 6, efektivní velikosti populace  $N_e = 50,33$ ,  $F_x = 0,15$  a  $\alpha_{xy} = 0,30$  (možnost (1)) a poměr pohlaví jedinců v plemenitbě 1 : 5 a 1 : 10 podle tabulky 5. Tento stav odpovídá přibližně stavu *STKL* podle tabulky 2. V umělé plemenitbě předpokládáme použití pouze zamrazených buněk a embryí, s využitím plemenných zvířat (hřebců i klisen) z předchozí generace. Tudiž u nich bude generační interval dvojnásobný, než je současný stav u živé populace, u hřebců 24,29 roků : 12,15 roků a u klisen 20,90 roků : 10,45 roků (Vostrá-Výdrová, 2016). Hodnota  $N_e$  a od ní odvozená hodnota  $\Delta F_x$  se vztahuje ke generaci. Prodloužením generačního intervalu dojde k rozdělení  $\Delta F_x$  na více let a tím ke snížení  $\Delta F_x$  za jednotku času (za rok) (Jakubec a kol., 2012, Oldenbroek a kol., 1999).

Tab. 7. Potřeby zamrazených ID, nebo vajíček a embryí v umělé plemenitbě ročně a délky generačního intervalu ( $L$ ) u populace s poměrem pohlaví jedinců v plemenitbě 1 : 5, nebo 1 : 10, průměrnou aditivní příbuzností všech jedinců  $\alpha_{xy} = 0,30$  a efektivní velikostí populace  $N_e = 50,33$ . Odpovídá možnosti (1) z tabulky 5.

Umělá plemenitba %	ID			ID + zárodky			
	L hřebců	L celkem	Potřeba ID	L klisen	L celkem	Potřeba <sup>8</sup> vajíček	Potřeba embryí
Poměr pohlaví 1 : 5 , <b>1A) Velikost populace klisen 75,50 , Ročně zařazovaných klisen 9,06</b>							
0	12,15	11,30	0	10,45	11,30	0	0
10	13,36	11,90	14,50	11,50	12,43	21,74	10,87
20	14,57	12,21	28,99	12,54	13,56	43,49	21,74
40	17,03	13,73	57,98	14,63	15,82	86,98	43,49
80	21,86	16,16	115,97	18,81	20,34	173,95	86,98
Poměr pohlaví 1 : 10 , <b>1B) Velikost populace klisen 138,41 , Ročně zařazovaných klisen 16,69</b>							
0	12,15	11,30	0	10,45	11,30	0	0
10	13,36	11,90	26,70	11,50	12,43	40,06	20,03
20	14,57	12,21	53,41	12,54	13,56	80,11	40,06
40	17,03	13,73	106,82	14,63	15,82	160,22	80,11
80	21,86	16,16	213,63	18,81	20,34	320,45	160,22

<sup>8</sup> Na oplodnění vajíček jiné klisny ID jiného plemeníka, aby nevzrůstala příbuznost uvnitř budoucí generace.

Klisy jsou během generace do chovného stáda zařazovány postupně a není nutné chovat celou populaci najednou. Cílem je od každé klisny odchovat a zařadit do chovu právě jednu dceru-pokračovatelku. Při vyšším počtu dcer v chovu na matku, by vzrůstala příbuznost v populaci a snižovala by se tím její efektivní velikost. Proto po získání dcery již není matka v GŽZ potřeba a může se natrvalo převést do běžného chovu mimo ochranu GŽZ. Je však třeba počítat s případy, že každá klisna nemusí zabřeznout, proto pro udržení velikosti populace se určitému podílu klisen s více dcerami nelze vyhnout.

Uvažujeme podíl inseminace v několika možnostech na 0, 10, 20, 40, nebo 80 % klisen. Nebo ve stejných poměrech použít společně inseminaci i přenosy rozmrazených a oplodněných vajíček a embryí. Jde tudíž souběžně o prodloužování generačního intervalu. Buď jednostranně ze strany otců při použití pouze inseminace, nebo oboustranně ze strany otců i matek při společném použití inseminace a přenosu oplodněných vajíček a zárodků.

Oplodněná vajíčka a zárodky mohou být přeneseny i do jakýchkoliv zdravých klisen- příjemkyň jiného plemene mimo GŽZ, které jsou podobného tělesného rámce, jako je GŽZ. S využitím těchto biotechnologických postupů lze proto snížit velikost živě chované populace GŽZ, která vyžaduje peněžní podporu.

V tabulce jsou uvedeny 2 možnosti.

1A) Poměr pohlaví v chované populaci 1 : 5, čemuž odpovídá celková skutečná populace klisen 75,50 ks a ročně je nutno nahrazovat úbytek 9,06 klisen. Nepoužijí-li se biotechnologické postupy umělé plemenitby, je generační interval 11,30 roků.

Při použití umělé inseminace na 1/10 populace, prodlouží se průměrný  $L$  plemeníků z 12,15 na 13,36 let a celopopulační  $L$  z 11,30 na 11,90 let. Při rozsahu umělé inseminace 80 % se prodlouží průměrný  $L$  u plemeníků na 21,86 let a u celé populace na 16,16 let.

Při souběžném použití inseminace i přenosu embryí se průměrný  $L$  u klisen prodlužuje z 10,45 až na 18,81 let a celkový  $L$  z 11,30 na 20,34 let při rozsahu biotechnologií 80 %.

Podle jednotlivých možností je potřeba ID od 0 do 115,97, případně potřeba vajíček do 173,95, nebo embryí do 86,98.

1B) Poměr pohlaví v chované populaci 1 : 10, čemuž odpovídá celková skutečná populace klisen 138,41 a ročně je nutno nahrazovat úbytek 16,69 klisen. Generační intervaly jsou stejné jako v části (A), ale jsou nutné vyšší počty klisen pro udržení stejné efektivní velikosti populace.

Podle jednotlivých možností jsou potřeby *ID* do 213,63, případně potřeby vajíček do 320,45, nebo embryí do 160,22.

## 2.7. Vytváření zásoby

Plemena *GŽZ* jsou ohrožena politickými rozhodnutími, ekonomickým stavem, zájmem chovatelů a nepředvídatelnými haváriemi a zdravotním nebezpečím. Živá populace by proto měla být chována na více místech a rovněž zásoby zamrazených buněk by měly být skladovány na více místech.

Pro obnovu plemene je třeba při poměru pohlaví 1 : 5 a možnosti (1)(tabulka 5) 4832 *ID*. Pro průběžné každoroční používání v plemenitbě a použití inseminace na 20 % klisen, možnost (1)(A) (tabulka 7) je třeba 28,99 *ID*. Průběžně spotřebované zamrazené buňky budou nahrazovány nově odebranými od vybraných jedinců a vybraných rodičovských párů, pokud možno od těch, kteří nebyli používáni v plemenitbě a jsou s ostatní populací co nejméně příbuzní.

Od každého plemeníka by měla být uchovávána „nedotknutelná“ zásoba, která může být použita jen se schválením *NS* a zásoba na průběžné používání v plemenitbě. Velikost nedotknutelné zásoby souvisí s rozvojem biotechnologických metod a mohlo by stačit 30 *ID* na plemeníka a podle jedinečnosti rodičovského páru, aby byla jistota, že se podaří odchovat pokračovatele linie a rodiny, alespoň dva jedince každého pohlaví (Müller, Müller, 2017).

*ID* by měly být skladovány od co největšího počtu co nejméně příbuzných jedinců, aby se uchovala co největší genetická proměnlivost. Pohlavní buňky a zárodky by měly být uchovány z každé linie, ověřené podle chromozomu Y a každé rodiny, ověřené podle mitochondriální *DNA* (Cunningham, 2005, Kavar a kol., 2005). Rodiny by měly být zastoupeny i při uchovávání pouze *ID* plemeníků (Oldenbroek a kol., 1999). *ID* by měly být uchovávány nejméně od takového počtu plemeníků, jak je velká skutečná populace, v tomto případě 90,59 jedinců (tabulka 5). Při nižším počtu jedinců nutně vznikají skupiny příbuzných jedinců, stoupá průměrná příbuznost a snižuje se efektivní velikost populace *Ne*.

Obdobným způsobem lze vypočítat i potřeby při samostatném použití vajíček, nebo embryí.

Cílové počty uchovávaných buněk lze odvodit pro různé způsoby plemenitby podle předchozích tabulek. Pro způsob uvedený v tomto odstavci jsou cílové počty shrnuty v tabulce 8.

Tab. 8. Cílové počty uchovávaných buněk a jedinců podle možnosti 1A), při použití průběžné umělé plemenitby na 20 % plemenic. Hřebců za generaci v plemenitbě 15,10, klisen za generaci v plemenitbě 75,50, zařazovaných plemenic ročně 9,06.

	<i>ID</i>	Vajíček	Embryí
Buněk zásoba celkem	4861	1855	928
Uchovávaných jedinců celkem	90,59	90,59	90,59
Buněk na jedince	53,66	20,48	10,24
Použitých buněk ročně	28,99	43,49	21,74
Chovaných plemenic	75,50	60,40	60,40

V chovatelském provozu lze předpokládat společné použití všech třech možností uvedených v tabulce a tím i příslušné podíly uváděných počtů. Při použití vajíček a embryí je možno v *GŽZ* chovat méně jedinců, neboť jako příjemkyně mohou být použity klisny jiných plemen s lacinějším způsobem chovu. Při pravidelné každoroční umělé plemenitbě bude průběžně doplňována zásoba od takového počtu jedinců, jaký se používá každoročně v umělé plemenitbě.

## 2.8. Doklady o uložení a uvolnění k použití.

GŽZ jsou pod správou NS a jejich zachování je v celospolečenském zájmu. O vytvářených zásobách zamrazených buněk a zárodků bude průběžně vytvářen protokol zahrnující původ, datum a místo odběru a zpracování, doloženou kvalitu a množství uchovávaných buněk. Údaje budou soustředěny u chovatelské organizace a v databázi GŽZ.

Tvorba zásob buněk a zárodků a jejich uvolnění pro použití v plemenitbě souvisí s řízením plemenitby v rámci celého GŽZ, aby byla zajištěna životaschopnost ochraňované populace. Rozhodnutí o tvorbě zásob a jejich uvolnění pro plemenitbu podléhá rozhodnutí chovatelského sdružení a rady NS a je pro chovatele závazné.

## 3. Závěr

Dlouhodobé uchování pohlavních buněk a zárodků by mělo zajistit budoucí možnou obnovu plemene a průběžné řízení plemenitby v živé populaci GŽZ. To znamená dosáhnout efektivní velikosti populace alespoň  $N_e = 50$  jedinců, čemuž odpovídají výše uvedené počty jedinců skutečných.

Počty  $ID$  by měly dosáhnout za každé plemeno alespoň údajů podle odstavce 2.7., tj. 4861  $ID$  od 91 plemeníků s navýšením „koeficientem bezpečnosti“ 1,3, celkem na plemeno 6320  $ID$ . V současnosti je uloženo společně pro STKL vraníky a bělouše 2128  $ID$  (tabulka 3), což je přibližně 17 % požadovaného množství na každé plemeno.

Zamrazení by měli být zástupci všech linií plemeníků ověřených podle chromozomu Y a zástupci všech rodin matek ověřených podle rozborů mitochondriální DNA. V minulosti byli do některých linií a rodin zařazováni z chovatelského hlediska i jedinci, kteří z těchto linií a rodin nepocházeli, zevnějškem se podobali, ale geneticky neodpovídají (Czerneková, 2013). Ti by měli být z hlediska práce v GŽZ zařazeni ke svým původním liniím a rodinám. V současnosti je zamrazeno společně pro bělouše a vraníky 38 jedinců. Pokud bude s bělouši a vraníky pracováno jako se samostatnými populacemi, je nutno uchovat buňky od 181 jedinců. V současnosti je uchováno 21 % z požadovaného počtu jedinců. Neposuzovali jsme ale vzájemnou příbuznost jedinců, která může chovatelská rozhodnutí značně změnit.

Uchovávat by se měly buňky především od jedinců, kteří nejsou používáni v plemenitbě živé populace, jsou navzájem mezi sebou a k živé populaci co nejméně příbuzní. Při vysoké vzájemné příbuznosti dárců buněk, kteří by v budoucnu měli být použiti pro obnovu plemene, nad  $\alpha_{xy} > 0,30$ , nebo průměrném koeficientu příbuzenské plemenitby  $F_x > 0,15$ , již nelze udržet efektivní velikost populace  $N_e$  na hodnotě  $N_e \geq 50$ , ale poklesne a populace je vážně ohrožena (tabulka 1).

Hodnoty  $\alpha_{xy}$  a  $F_x$  je třeba stanovovat vhodnými metodami a s dostatečným počtem generací předků, nebo pomocí molekulárně-genetických údajů.

Pro průběžné využívání v plemenitbě živé populace by se měly používat především zamrazené inseminační dávky plemeníků z předchozích generací.

Práce se zamrazenými buňkami a zárodky v GŽZ podléhá schválení Radě Národního centra pro genetické zdroje zvířat.

Uvedené výpočty odpovídají přibližně stavu chovu STKL. Pro jiné vstupní údaje lze zde uvedeným postupem hodnoty přepočítat pro jiné způsoby chovu a jiné úrovně ochrany ohroženého plemene.

### III. SROVNÁNÍ NOVOSTI NAVRŽENÝCH POSTUPŮ

Pravidla pro uchování zamrazených vzorků pro řízení plemenitby GŽZ zatím nebyla v ČR vypracována. Jedná se o nový návrh.

### IV. POPIS UPLATNĚNÍ

Základní uživatelé v ČR jsou chovatelská organizace, NH a Národní centrum pro genetické zdroje zvířat, které metodicky usměrňuje chov GŽZ podle schváleného národního programu (MZe, 2012).

Navržené metodické postupy mohou využít i další uživatelé z chovatelských organizací a výzkumných pracovišť při práci s uchováváním buněk a jejich následným využitím v plemenitbě i u ostatních plemen a druhů zvířat.

### V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika slouží především Národnímu referenčnímu středisku uchování a využití genetických zdrojů, NH Kladruby nad Labem a chovatelským organizacím, které jsou pověřeny řízením chovu GŽZ koní pro celou ČR. Tyto organizace nevytváří zisk a jejich činnost je podporována příspěvkem od MZe. Zájem uchovat GŽZ je celospolečenský, s možným hospodářským významem rovněž celospolečenským v budoucnosti (za dlouhé období), v závislosti na probíhajících změnách klimatických, hospodářských a společenských podmínek. Ekonomická hlediska nelze nyní vyjádřit.

### VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Allen, W.R., Brown, L., Wright, M., Wilsher, S. 2007. Reproductive efficiency of flatrace and national hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet. J.*, 39, 438-445.

Cervantes, I., Goyache, F., Molina, A., Valera, M., Gutiérrez, J. P. 2011. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *J. Anim. Breed. Genet.*, 128, 56-63.

Cobo, A., Diaz, C., 2011. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 96, 277-285.

Colleoni, S., Barbicini, S., Necchi, D., Duchì, R., Lazzari, G., Galli, C. 2007. Application of Ovum Pick-UP, Intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *AEEP Proceedings*.

Cunningham, E.P. 2005. Molecular methods and equine genetic diversity. *Conservation genetics of endangered horse breeds*. EAAP publication No. 116, 15-24.

Czerneková, V. 2013. Využití molekulárních markerů při hodnocení genové variability vybraných plemen koní genových rezerv České republiky. *Disertace, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha–Suchbát*.

Czerneková, V., Kott, T., Dudková, G., Sztankóová, Z., Soldát, J. 2006. Genetic diversity between seven Central European cattle breeds as revealed by microsatellite analysis. *Czech J. Anim. Sci.*, 58, 437-442.

Czerneková, V., Kott, T., Majzlík, I. 2013. Mitochondrial D-loop sequence variation among Hucul horse. *Czech J. Anim. Sci.*, 58, 437-442.

Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction into quantitative genetics*. Longman House, Harlow Essex., p. 464. ISBN: 978-0582243026..

FAO, 1998. *Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of Small Populations at Risk*. FAO, Rome, Italy. 215 p.

- 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.
- Gutiérrez, J.P., Cervantes, I., Molina, A., Valera, M., Goyache, F. 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating effective size from pedigrees. *Genet. Sel. Evol.*, 40, 359–378.
- Herrera, C., Dufourq, P., Freije, M., Morikawa, I., Centeno, J.E., Aristi, V., Menghini, L., Sporleder, C. 2012. Selection of stallions for in vitro embryo production by ICSI in commercial program. *J. Equine Vet. Sci.*, 32, 409.
- Hinrichs, K. 2013. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod. Fertility and Development*, 25, 80-93.
- Jakubec, V., Louda, F., Bezdíček, J. 2012. Šlechtění a management genetických zdrojů zvířat. Agrovýzkum Rapotín s.r.o.
- Jandurová, O.M., Kott, T., Czerneková, V., Milerski, M. 2005. Genetic relationships among Šumava, Valachian and Improved Valachian sheep. *Small Ruminant Res.*, 57, 157-165.
- Kavar, T., Habe, F., Solkner, H., Dovč, P. 2005. Variation of mitochondrial DNA in Lipizzan horses. *Conservation genetics of endangered horse breeds*. EAAP publication No. 116, 73-84.
- Lacy R. C. 1995. Clarification of genetic terms and their use in the management of captive populations. *Zoo. Biology*, 14,565-578.
- Langlois, B. 2005. A review on the methods of parentage and inbreeding analysis with molecular markers. *Conservation genetics of endangered horse breeds*. EAAP publication No. 116, 35-54.
- Loomis, P.R., 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 191-200.
- Maclellan, L.J., Stokes, J.E., McCue, P.M., Carnevale, E.M. 2010. Vitrification, warming, ICSI and transfer of equine oocytes matured in vivo. *Anim. Reprod. Sci.*, 121S, S260-S261
- Maignel, L., Boichard, D., Verrier, E. 1996. Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bull*, 14, 49-54.
- Malécot, G. 1948. *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Masson et Cie., Paris. 63 pp.
- McCue, P. M., Squires E.L. 2015. *Equine Embryo Transfer*. Teton NewMedia, WY, ISBN: 9781498734769
- Morris, L.H.A., Allen, W.R., 2002: Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.*, 34, 51-60.
- Müller, Z., Müller J. 2017. Osobní sdělení. ERC s.r.o., Mnětice u Pardubic. [www.muller-equine.cz](http://www.muller-equine.cz).
- Müller, J., Müller, J. 2016. Report of frozen equine embryos transfer in the Czech Republic. *J. Equine Vet. Sci.*, 37, 41:67.
- MZe, 2012. Národní program konzervace a využití genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství na období 2012-2016. MZE, č.j. 206553/2011-MZe-17253.
- Oldenbroek, J.K., editor, 1999. *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. DLO Inst. Anim. Sci. And Health, Lelystad, The Netherlands. 119 p.
- Ollivier, L., Chevalet, C., Foulley, J.L. 2005. The use of markers for characterising genetic resources. *Conservation genetics of endangered horse breeds*. EAAP publication No. 116, 25-34.
- Ortiz-Escribano, N., Pascottini, O.B., Woelders, H., Vanderberghe, L., Schauwer, C., Govaere, J., Van Den Abbeel, E., Vullers, T., Ververs, C., Roels, K., Van De Velde, M., Van Soom, A., Smits, K. 2017. An improved vitrification protocol for equine immature oocytes, resulting in a first live foal. 2017. *Equine Vet. J.*, doi: 10.1111/evj.12747
- Panzani, D., Vannozi, I., Marmorini, P., Rota, A., Camillo, F. 2016. Factors Affecting Recipients' Pregnancy, Pregnancy Loss, and Foaling Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. *J. Equine Vet. Sci.*, 37, 17-23.
- Petřík, F. 2017. Osobní sdělení. Sovětice, p. Nechanice.
- Pikousová, J. 2017. Počty zamrazených inseminačních dávek koní. Národní referenční středisko uchování a využití genetických zdrojů. VÚŽV Uhřetěves.



- Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Garde, J.J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., del Olmo, A., Soler, A.J., Arregui, L., Crespo, C., Gonzalez, R. 2006. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: Preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. *Reprod. Domestic Animals*, 41, 82-92.
- Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R., Klug, E. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod. Domestic Animals*, 38, 134-140.
- Šancová, Z. 2017. Počty zamrazených inseminačních dávek STKL koní. NH Kladruby n. Labem.
- Vidament, A. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 89, 115-136.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E. 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48, 907-917.
- Wright, S. 1969. *The Theory of Gene Frequencies: Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 2. Chicago University press, Chicago, USA. p. 520. ISBN: 9780226910390.
- Žlumov, P. 2017. Osobní sdělení. Kladruby n. Labem.

## VII. VLASTNÍ LITERATURA PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE.

- Bauer, J., Příbyl, J., Vostrý, L. 2016. Preliminary analysis of utilization of genomic relationship in mating plan of Old Kladruber horse. *Acta fytotechn zootech*, 19, (Special Issue), 80-86. SPU Nitra, Slovensko.
- Kasarda, R., Vostrý, L., Moravčíková, N., Vostrá-Vydrová, H., Dovč, P., Kadlečík, O. 2016. Detailed insight into genetic diversity of the Old Kladruber horse substructure in comparison to the Lipizzan breed. *Acta Agric. Scand., Section A – Anim. Sci.*, 66, 67-74.
- Novotná, A. 2017. Osobní sdělení. VÚŽV Uhřetěves.
- Příbyl, J., Hamaň, J., Kott, T., Příbylová, J., Šimečková, M., Vostrý, L., Zavadilová, L., Čermák, V., Růžička, Z., Šplíchal, J., Verner, M., Motyčka, J., Vondrášek, L. 2012. Single-step prediction of genomic breeding value in a small dairy cattle population with strong import of foreign genes. *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 151-159.
- Šichtař, J. 2017. Osobní sdělení. ČZU Praha.
- Šichtař, J., Nehasilová, A., Simoník, O., Bubeníčková, F. 2017. Effect of Two Freezing Extenders on Characteristic of Fresh and Frozen-Thawed Semen in Endangered Old Kladruber Stallions - A Pilot Study. *Czech J. Anim. Sci.*, 62, 227-233.
- Vostrá-Vydrová, H. 2016. Populačně genetický rozbor plemene starokladrubský kůň. Disertace, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha – Suchdol.
- Vostrá-Vydrová, H., Vostrý, L., Hofmanová, B., Krupa, E., Veselá, Z., Schmídová J. 2016a. Genetic diversity within and gene flow between three draught horse breeds using genealogical information. *Czech J. Anim. Sci.*, 61, 462-472.
- Vostrá-Vydrová, H., Vostrý, L., Hofmanová, B., Krupa, E., Zavadilová, L., 2016b. Pedigree analysis of the endangered Old Kladruber horse population. *Livestock Sci.*, 185, 17-23.
- Vostrá-Vydrová, H., Vostrý, L., Hofmanová, B., Veselá, Z., Schmídová, J., Majzlík, I. 2015. Population studies of Czech Hucul horses. *Poljoprivreda*, 21 (1), 41-43.
- Vostrý, L., Čapková, Z., Příbyl, J., Hofmanová, B., Vostrá-Vydrová, H., Mach, K. 2011a. Population structure of Czech cold-blooded breeds of horses. *Archiv für Tierzucht*, 54, 1-9.
- Vostrý, L., Kracíková, O., Hofmanová, B., Czerneková, V., Kott, T., Příbyl, J. 2011b. Intra- line and inter-line genetic diversity in sire lines of the Old Kladruber horse based on microsatellite analysis of DNA. *Czech J. Anim. Sci.*, 56, 163-175.



**Vydal:** Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.  
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

**Název:** **Pravidla uchovávání a využívání v plemenitbě zamrazených pohlavních buněk koní**

**Autor:** prof. Ing. Josef Příbyl, DrSc. (podíl na vzniku metodiky 50 %)  
Ing. Alexandra Novotná, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 5 %)  
Ing. Jana Příbylová, CSc. (podíl na vzniku metodiky 5 %)  
Ing. Jiří Šichtař, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 10 %)  
Ing. Hana Vostrá Vydrová, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 10 %)  
doc. Ing. Luboš Vostrý, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 20 %)

**Oponenti:** Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce, Praha  
doc. Ing. Karel Mach, CSc.

**ISBN:** 978-80-7403-169-4

Zpracována za podpory MZe ČR, úkol č. QJ1330189 “Zlepšení systému chovu starokladrubskeho koně v NH Kladruby nad Labem”.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

[www.vuzv.cz](http://www.vuzv.cz)