

RAZŠIRJANJE REZULTATOV PILOTNEGA PROJEKTA

***»Z izboljšanim postopkom embriotransferja do
hitrejšega napredka v prireji mleka«***

Živinoreja je v Sloveniji najpomembnejša kmetijska dejavnost. Glavna vejo predstavlja govedoreja, ki je razširjena po vsej Sloveniji. Razlog, da je govedoreja tako uveljavljena je predvsem v primernih podnebnih in talnih razmerah, ki omogočajo pridelavo dovolj krme. Skoraj dve tretjini vseh kmetijskih zemljišč predstavljajo travniške površine.

Prireja mleka in govejega mesa predstavljata najpomembnejši proizvodni usmeritvi slovenskega kmetijstva. Intenzivnost reje in prireje govedi na kmetijah se zelo razlikuje in temelji na povsem preprosti in skromni reji do rej, ki imajo visoko intenzivno proizvodnjo. Opažamo, da se je v zadnjih 20 letih močno zmanjšalo število rejcev govedi, rejci, ki nadaljujejo s prirejo mleka in mesa pa so povečali povprečne velikosti črede na svojih kmetijskih gospodarstvih. Prihaja do rasti mlečnosti krav in večji kakovosti mleka ter večjih prirastov na kmetijah, ki se ukvarjajo z pitanjem govedi. Iz teh procesov lahko sklepamo, da je govedoreja v postopku preoblikovanja iz ekstenzivne v bolj intenzivno rejo. Rejce k intenzivni reji v največji meri sili ekonomika prireje. Zaradi ekonomike poslovanja je v živinoreji vedno bolj prisotna želja po čim hitrejšem genetskem napredku.

Z izvedenim pilotnim projektom želimo seznaniti rejce z rezultati izboljšanega postopka embriotransferja, ki smo ga izvajali na 4 partnerskih KMG. Z povečanjem uporabe tega postopka bo prišlo do hitrejšega genetskega napredka, povečanja mlečnosti krav, zmanjšanje stroškov nabave dragih plemenskih živali iz uvoza in zmanjšanje emisij toplogrednih plinov ter večje ekonomičnosti reje.

V Sloveniji bo tako v prihodnje potrebnega več sodelovanja med strokovnjaki z področja živinoreje in rejci, slediti in razvijati bo potrebno načine reje in gospodarjenja z govedi, ki so že poznane v razvitih državah Evrope in Sveta. Le tako bomo lahko konkurenčni na trgu in bomo z rejo govedi ohranjali obdelano kmetijsko zemljo, z njo pa zadovoljivo naseljenost podeželja in lepo kulturno krajino.

Uvod

Reprodukcijski potencial vsakega zdravega rojenega teleta je izjemen. Predvidevamo, da žensko tele razpolaga s 150.000 »potencialnimi« jajčnimi celicami, moško pa z nemerljivimi milijardami spermijev.

Z naravnim pripustom se izkoristi le neznaten del tega reprodukcijskega materiala. Povprečno bo bik tako dal od 25 do 70 telet, krava pa samo eno tele na leto. Z razvojem umetne oploditve je bistveno zmanjšana količina potrebnih spermijev za oploditev krave. S tem je omogočeno hitrejše širjenje gensko superiornih bikov. Na drugi strani pa je genski potencial krave zanemarjen. Kot smo zapisali, krava povprečno da eno tele na leto, v življenjski dobi pa v povprečju 8-10 telet.

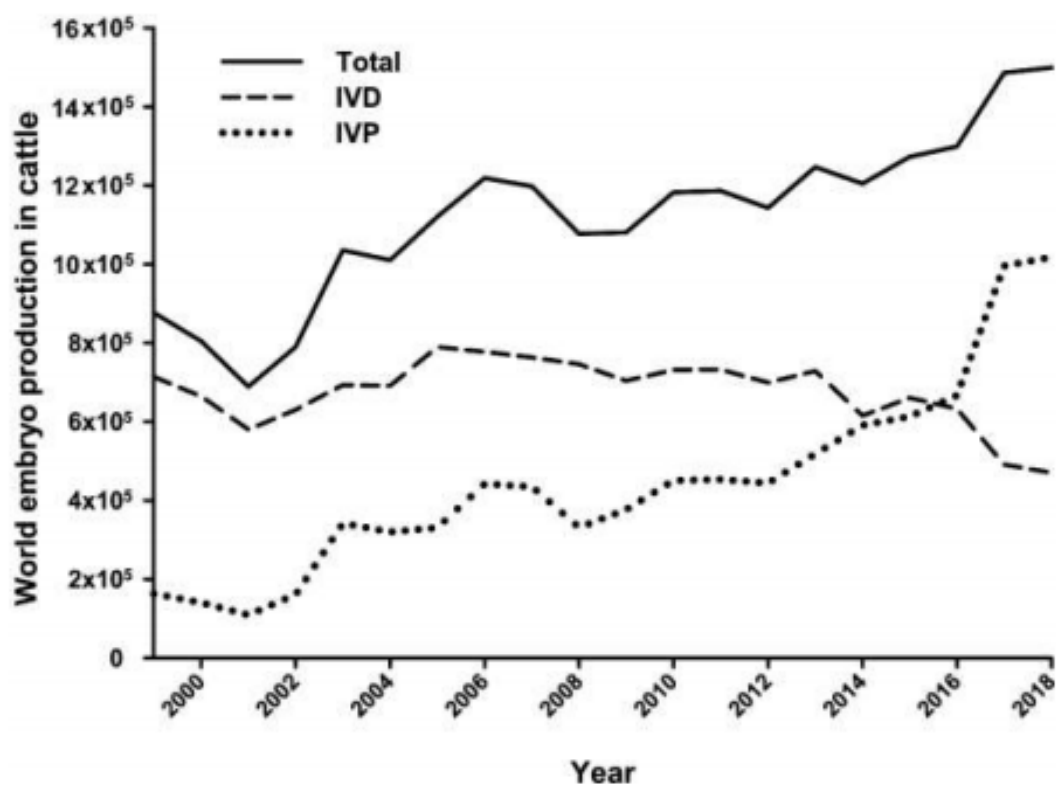
Tisto, kar je razvoj umetne oploditve omogočil za bika, nam embriotransfer omogoča za visoko proizvodno, gensko superiorno kravo – veliko hitrejše širjenje superiorne genetike in pridobivanje mnogo številnejših kakovostnih potomk. Z embriotransferjem se povprečna reprodukcijska sposobnost krave lahko izboljša za desetkratnik znotraj enega leta in v življenjski dobi za petkratnik ali več.

3

Komercialna industrija embriotransferja je bila razvita v Severni Ameriki v začetku sedemdesetih let prejšnjega stoletja z uvozom evropskih pasem goveda. Ko se je tehnologija razvijala in izboljševala, je presaditev zarodkov postala bolj običajna in cenovno dostopna. Primarno se embriotransfer uporablja za genetsko izboljšanje, ne pa za povečanje števila določene pasme ali fenotipa. [2]



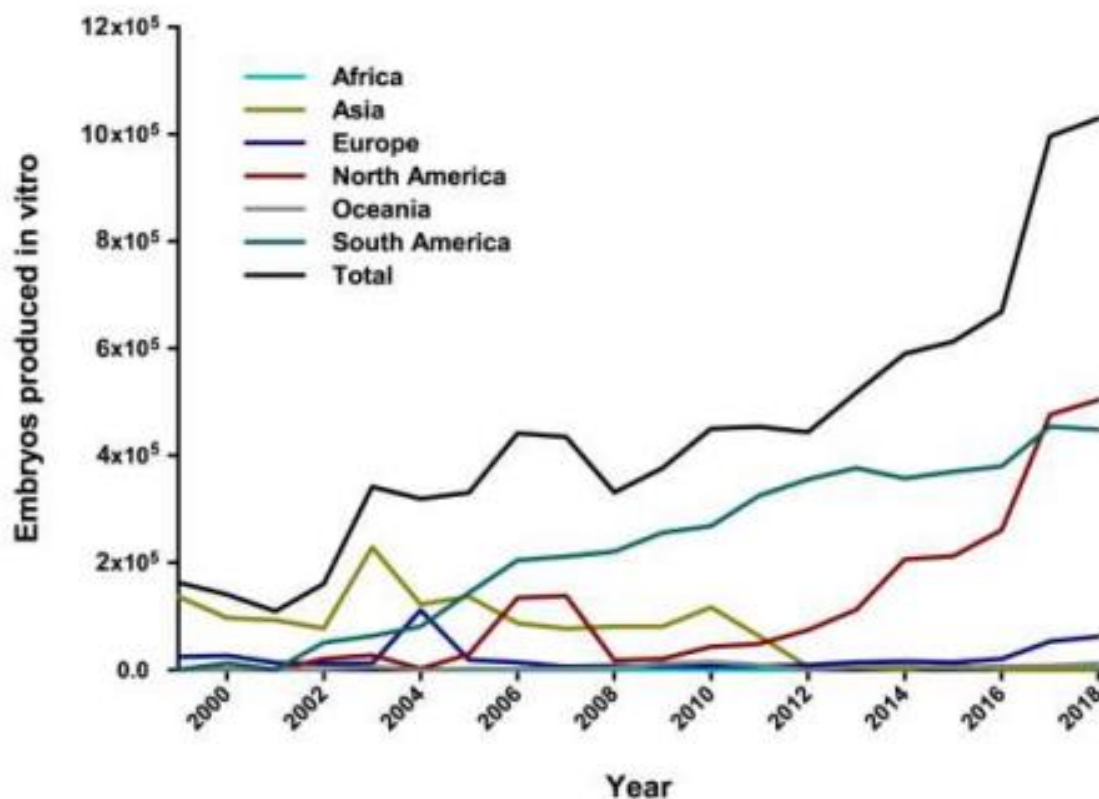
Slika 1. Prikaz držav, ki izvajajo embriotransfer na svetu



Slika 2. Svetovna proizvodnja zarodkov od leta 1999-2018



PROGRAM
RAZVOJA
PODEŽELJA



Slika 3. In vitro proizvodnja zarodkov po kontinentih od leta 1999-2018

5

Region	Cattle		Horses		Sheep		Goats	
	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP
Africa	6,651	3,741	0	0	3,325	0	100	660
Asia	162	0	0	0	0	0	0	0
Europe	141,209	61,816	1,395	2,107	3,661	457	227	158
North America	270,187	503,718	1,149	0	2,158	0	8,075	0
Oceania	4,445	11,997	0	0	2,970	0	0	0
South America	47,313	448,128	18,768	346	5,239	55	402	0
Total	469,967	1,029,400	21,312	2,453	17,353	512	8,804	818

Slika 4. Število uporabljenih zarodkov leta 2018 pri rejnih živalih

Partnerji v projektu:



- KMG Napotnik
- KMG Kotnik
- KMG Miklavžina
- PP-Agro poljedelstvo in proizvodnja d.o.o.
- KGZS Zavod MS
- KGZS Zavod PT
- Šolski center Šentjur



Country	Dairy				Beef				All		
	Collections conv semen	Collections sexed semen	Embryos & ova	Transferable embryos	Collections conv semen	Collections sexed semen	Embryos & ova	Transferable embryos	Collections total	Transferable Embryos total	Embryos/ collection
Austria	335	11	3 357	2 488	17	1	95	138	364	2 626	7,2
Belgium	121	8	813	543	875	0	5 656	4 198	1 004	4 741	4,7
Bosnia and Herzegovina	0	0	0	0	1	0	5	5	1	5	5,0
Croatia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Denmark	716	0	6 179	4 161	54	0	593	392	770	4 553	5,9
Estonia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Finland	431	55	4 007	2 714	3	0	24	4	489	2 718	5,6
France	4 497	1 053	50 792	29 275	1 242	94	13 825	7 494	6 886	36 769	5,3
Germany	3 166	0	31 472	21 100	464	0	4 654	2 499	3 630	23 599	6,5
Greece	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hungary	7	11	124	116	36	6	385	255	60	371	6,2
Ireland	664	0	8 190	3 904	0	0	0	0	664	3 904	5,9
Israel	41	1	239	156	1	0	6	6	43	162	3,8
Italy	2 432	0	28 397	19 418	150	0	1 575	1 063	2 582	20 501	7,9
Latvia	11	0	52	43	0	0	0	0	11	43	3,9
Lithuania	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Macedonia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Netherlands	2 735	16	20 847	15 675	0	0	0	0	2 751	15 675	5,7
Norway	87	0	888	586	11	0	155	54	98	640	6,5
Poland	131	138	2 193	1 493	0	0	0	0	269	1 493	5,6
Portugal	60	50	572	352	10	0	103	38	120	390	3,3
Romania	9	0	48	40	0	0	0	0	9	40	4,4
Russian Federation	109	442	5 205	2 682	1 530	4	13 143	11 416	2 085	14 098	6,8
Serbia	5	0	22	14	0	0	0	0	5	14	2,8
Slovakia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Slovenia	12	2	52	26	0	0	0	0	14	26	1,9
Spain	102	374	4 030	2 626	272	15	1 382	2 002	763	4 628	6,1
Sweden	127	0	864	562	3	0	4	2	130	564	4,3
Switzerland	212	147	3 615	2 129	16	1	149	67	376	2 196	5,8
Turkey	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ukraine	10	8	261	209	8	4	175	125	30	334	11,1
United Kingdom	116	15	970	709	112	0	216	572	243	1 281	5,3
Grand Total	16 136	2 331	173 189	111 021	4 805	125	42 145	30 350	23 397	141 371	6,0

Slika 5. Število izvedenih embriotransferjev v Evropskih državah

POSTOPEK IZVEDBE MOET (multiple ovulation embryo transfer)

Prvi korak je izbira darovalke. Merila za izbiro so odvisna od vzreje – mlečne ali mesne. Osnovna misel je seveda zaslužek. Pri izbiri darovalke za vzrejo mesne pasme govedi je pomemben prirast oziroma zaslužek prodaje telet, ki smo jih dobili z embriotransferjem. Pri izbiri darovalke za prirejo mleka pa so osnovna merila prirejena količina in kakovost mleka ter ocena zunanosti. Postopek je primeren za gospodarstva, ki želijo izboljšati kakovost črede v sorazmerno kratkem časovnem obdobju.

Pri izbiri darovalke mora biti krava popolnoma zdrava v reprodukcijskem smislu ter mora imeti najboljše možne rezultate v proizvodnji.

Osnovna merila za odbiro darovalke

Dva glavna kriterija za odbiro darovalke sta genetska superiornost in verjetnost, da bo proizvedla veliko število uporabnih zarodkov. [7]

Druga merila za izbiro darovalke:

- da sta bili predhodno potrebni največ dve osemenitvi do brejosti; redno se goni v pravih časovnih razmikih;
- nima vidnih patoloških sprememb na reprodukcijskih organih;
- doba med telitvama ni daljša od 365 dni;
- pravilno je grajena in pravih okvirja;
- na potomke ne prenaša degenerativnih sprememb;
- je v optimalni kondiciji, ker se presuhe ali predebele krave nagibajo k zmanjšani plodnosti;
- maščoba in beljakovine v mleku so v pravilnem razmerju – kot znak metabolnega ravnovesja zaradi pravilne prehrane ter proizvodnje.

Merila za odbiro prejemnice

Pravilni menedžment črede prejemnic je ključen za uspeh embriotransferja. Krave katere so reprodukcijski zdrave, niso imele težkih porodov in so tudi brez drugih zdravstvenih (presnovne bolezni, šepavost...) so primerne kandidatke za dobre

prejemnice. Da bodo rezultati dobri morajo pogoji v maternici prejemnice bit približno enaki tistim v kravi darovalki ob pridobivanju zarodkov. To zahteve sinhronizacijo estrusa darovalke in prejemnic z največ enodnevnim zamikom.

POSTOPEK IZVEDBE EMBRIOTRANSFERJA

Superovulacija

Začnemo s superovulacijo pri darovalki. Superovulacija je postopek pridobivanja več jajčnih celic v enem spolnem ciklusu oziroma v eni pojavu. S tem postopkom je mogoče dobiti deset ali več vitalnih jajčnih celic. Približno 85% vseh normalno plodnih darovalk bo odreagiralo z približno petimi uporabnimi zarodki.[8] Osnovni princip superovulacije je, da spodbudimo obsežni razvoj foliklov na kravjih jajčnikih s pomočjo hormona FSH (folikl stimulirajoči hormon), s katerimi spodbudimo rast in razvoj primarnih foliklov na jajčnikih ter številne ovulacije. Protokoli superovulacije se razlikujejo vendar generalno apliciramo FSH dva krat dnevno štiri dni približno 9-14 dan pojavnega ciklusa pri kravi. Tretji dan superovulacije apliciramo prostaglandine kateri povzročijo luteolizo in približno 48h po tem estrus in ovulacije.

8

Osemenitev

Darovalke semenimo s semenom vrhunskih bikov. Ker pa jajčne celice ne ovulirajo istočasno, zato kravo semenimo večkrat v določenih časovnih razmikih. Ena shema osemenjevanja je 12, 24 in 36h po prvih znakih stoječe pojave. Uporaba visoko kvalitetnega semena z visokim številom živih progresivno gibljivih semenčic je ključnega pomena za uspeh embriotransferja. Zaradi boljšega uspeha včasih istočasno uporabljamo tudi seme dveh različnih bikov. V tem primeru je po rojstvu teleta potrebna DNK-tipizacija oziroma dokazovanje očetovstva. Pravilno mesto osemenitve je telo maternice takoj za materničnim vratom.

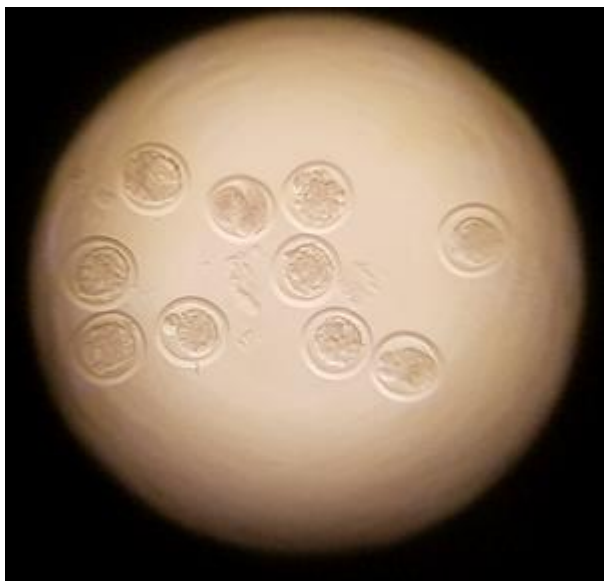
Pridobivanje zarodkov

Sedmi dan po osemenitvi je postopek spiranja maternice darovalke. Živali damo epiduralno anestezijo za umiritev peristaltike katera bi izvajalcu postopka onemogočala fiksacijo in zmanjševala tipljivost reprodukcijskih organov. Majhen

gumijast kateter vstavimo skozi maternični vrat v rog maternice, po namestitvi katetra v posamezen rog napihnemo balon kateri onemogoča odtekanje tekočine za spiranje.

1. Donorko postavimo v ločen prostor, da preprečimo kontaminacijo vzorca in morebitne motnje procesa
2. Donorka stoji z prvimi nogami v višjem položaju, približno 15-20cm ter izvajalec spiranja prav tako (npr. euro paleta)
3. Apliciramo epiduralno anestezijo in počakamo približno 3 minute
4. Izpraznimo blato iz črevesja in potem s suho brisačo temeljito očistimo perinealno področje
5. Z rigidnim katetrom pasiramo čez cerviks in z 60ml brizgo ustvarimo podtlak, da odstranimo cervikalno sluz. Postopek po potrebi ponovimo večkrat (vsakokrat nov sterilni kateter)
6. Ustavimo dilatator za cerviks in masiramo maternični vrat približno 1-2 minuti
7. Z katetrom za spiranje maternice gremo čez maternični vrat v vsaki rog, najbližje jajcevodu in po postavitvi na željeno mesto napihnemo "cuff" s približno 10-15ml zraka (odvisno od velikosti maternice prilagodimo napihnjenost balončka)
8. S 60ml brizgo sunkovito vbrizgavamo tekočino za spiranje, dokler skupaj ne dobimo 250ml izpirka (pozor na količino vbrizgane in pridobljene tekočine)
9. Postopek ponovimo za drugi maternični rog

Tako pridobljeno tekočino, v kateri so oplojene jajčne celice – embriji oziroma zarodki – pregledamo pod mikroskopom, kjer embrije poiščemo in ocenimo njihovo starost ter kakovost.



Slika 5. Zarodki - Spiranje pri kravi črno-bele pasme

Ocenjevanje zarodkov

Glavni kriteriji za ocenjevanje so:

- Oblika zarodka
- Kompaktnost blastomer
- Varijacije v velikosti celic
- Barva in tekstura citoplazme
- Premer zarodka
- Prisotnost ločenih celic
- Konstantnost zone pellucide
- Prisotnost veziklov

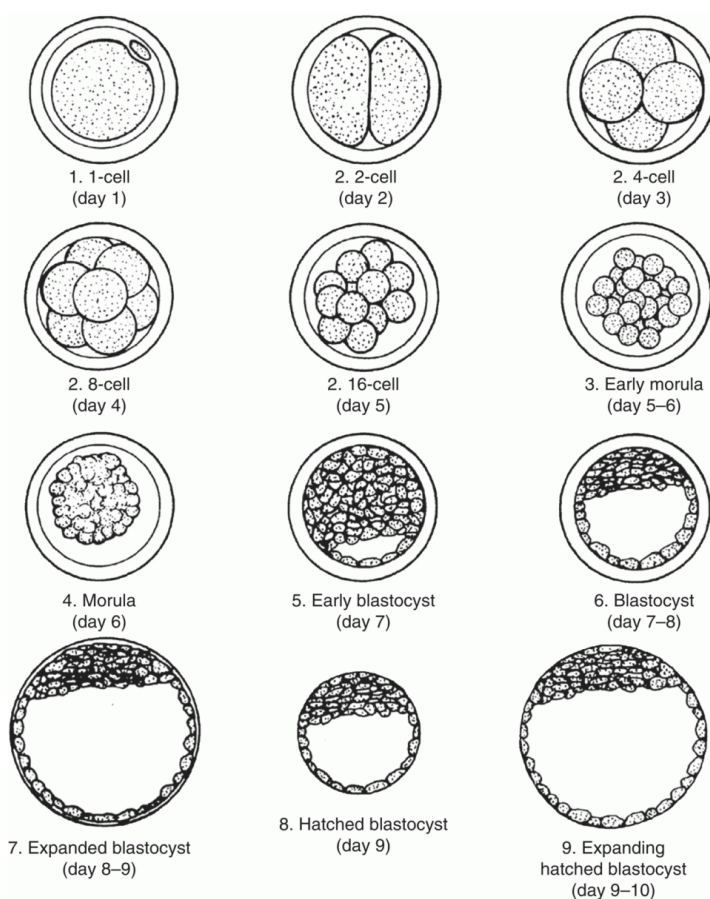
10

Glede na kriterije jih razvrstimo po kvaliteti v:

- Razred 1: odlično ali dobro
- Razred 2: zadovoljivo
- Razred 3: slabo
- Razred 4: mrtvo ali degenerirano

Glede na stadij razvitosti jih razdelimo (ne glede na kvaliteto) v:

- Stadij 1: neopolojen
- Stadij 2: 2-12 celic
- Stadij 3: Zgodnja morula
- Stadij 4: Morula
- Stadij 5: Zgodnja blastocista
- Stadij 6: Blastocista
- Stadij 7: Ekspandirana blastocista
- Stadij 8: Izvaljena blastocista
- Stadij 9: Ekspandirajoča izvaljena blastocista



Slika 6. Razvojni stadiji zarodka od ovulacije pa do desetega dne po oploditvi pri govedu.

Prenos zarodka

1. Prejemnici z ultrazvokom naredimo reprodukcijski pregled in ugotovimo prisotnost rumenega telesa
2. Zarodek vzamemo iz kontejnera z tekočin dušikom in držimo na zraku 5-10 sekund in potem potopimo v vodo z temperaturo 28-30°C za 15-20 sekund (v primeru svežega presajanja tega koraka ni)
3. Odtaljen zarodek damo v kateter za prenos zarodka z sterilno konico in prevleko
4. Prejemnici apliciramo epiduralno anestezijo in počakamo približno 3 minute
5. Izpraznimo blato iz črevesja in potem s suho brisačo temeljito očistimo perinealno področje
6. Pred materničnim vratom se ustavimo in asistent potegne prevleko čez kateter dokler ni popolnoma izven nožnice.
7. S katetrom gremo čez cerviks do velike krivine maternice v rog, kjer je bilo ugotovljeno rumeno telo in apliciramo zarodek.

Zamrzovanje zarodkov

1. Zamaške/posodico za hranjenje označimo z nalepkami, katere vsebujejo informacije o zarodku/ih (številka odobrene organizacije, datum spiranja, pasma, uš.št. donorke, pasma bika, uš.št. bika) – v primeru večjega števila bikov, naslednjega v enakem zaporedju dopišemo zraven)
2. Zarodek preperemo v tripsinu
3. Zarodke prestavimo iz petrijevke z medijem za hranjenje v petrijevko, ki vsebuje medij za zamrzovanje (etlien glikol) in potem postopek ponovimo približno 4x
4. S pomočjo pipete "posesamo" zarodke v sterilne slamice 0,25ml v zaporedju: holding medij, zrak, freezing medij, zrak, medij z zarodkom, freezing medij, zrak, holding medij
5. Slamice z zarodki damo v napravo za zamrzovanje na -6°C , po treh minutah naredimo "seeding" (dotaknemo se z kovino ohlajeno v tekočem dušiku, da sprožimo postopek zamrzovanja) s katerim sprožimo zamrzovanje in zagotovimo enakomerno smer zamrzovanja. Po opravljenem "seedingu" pustimo na temperaturi -6°C še 7 minut in začnemo zniževati temperaturo s hitrostjo $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
6. Ko dosežemo temperaturo -34°C , zarodke potopimo v tekoči dušik, prestavimo v posodice za shranjevanje ter prestavimo v kontejner s tekočim dušikom. [6]

IZBOLJŠANI POSTOPEK EMBRIOTRANSFERJA

Laser je naprava, ki spodbuja atome ali molekule, da oddajajo svetlobo pri določenih valovnih dolžinah, in jo ojačuje. Beseda "laser" je kratica, ki v prevodu pomeni ojačanje svetlobe s spodbujenim oddajanjem sevanja (*light amplification by the stimulated emission of radiation*). Laser običajno proizvaja zelo ozek žarek sevanja. Spekter svetlobe, ki jo oddaja običajno zajema zelo omejen obseg vidnih, infrardečih ali ultravijoličnih valovnih dolžin. Razvite so številne različne vrste laserjev z različnimi lastnostmi.

Uporaba laserjev v fizioterapiji je postala osnovna praksa v zadnjih desetletjih. Njihove terapevtske indikacije potrjujejo študije na področjih kot so: bolečina, celjenje ran, celjenje tetiv, regeneracija živčnih celic. Glavne fizikalne značilnosti LLL so valovna dolžina od daljne rdeče do bližnje infrardeče (600-1064 nm) in razpon moči od 0,001 do 5 W/cm² z časom izpostavljenosti od nekaj sekund do nekaj minut. Raziskave prav tako kažejo, da LLL modulira številne biokemične procese kot so celično dihanje in sinteza ATP-ja.

Laser z manjšo močjo (Low Level Laser-LLL) je posebna vrsta laserja, ki vpliva na biološke sisteme z ne termičnimi sredstvi. Uporaba laserja z manjšo močjo je pri miših in ljudeh pokazala pozitiven vpliv na stopnjo razvoja zarodkov, večjo stopnjo živorojenih živali, povečano ekspresijo določenih genov in ugotovili, da je LLL tehnologija uporabljena za izboljšanje postopkov pridobivanja zarodkov z IVF postopki.

	Št. prejemnic	Št. presajenih blastocist	Št. bregih miši	Stopnja brejosti (%)	Št. živih mladičev	Stopnja preživetja mladičev (%)
Kontrolna skupina	17	182	14	82,4	54	29,7
LLL skupina	18	195	18	100	92	47.2*

(*P < 0.05)

Študije kažejo, da LLL prav tako izboljšuje razvoj zarodkov oziroma zarodek hitreje doseže stopnjo na kateri se izleže (hatching blastocyt, P<0.05). Značilno se poveča stopnja brejosti ter stopnja preživetja mladičev iz skupine zarodkov stimuliranih z laserjem majne moči.



Nizka intenzivnost rdeče svetlobe vpliva na ekspresijo številnih genov, ki spadajo v različne funkcionalne kategorije, LLL z regulacijo ekspresije genov povezanih s celično proliferacijo stimulira rast celic in posredno z regulacijo ekspresije genov povezanih s celično migracijo, preoblikovanjem, sintezo in obnovo DNK, membranskim potencialom ter celičnim metabolizmom. Obsevanje z rdečo svetlobo prav tako povečuje proliferacijo celic z zaviranjem apoptoze celic.

Ime gena	Vloga	LLL vpliv
Platelet derived growth factor C	Proliferacija	Povečano izražanje gena
Serum response factor	Proliferacija	Povečano izražanje gena
Cullin 1	Preprečuje proliferacijo	Zmanjšano izražanje gena
Heat shock 70kD protein 1A	Apoptoza	Zmanjšano izražanje gena
Caspase 6	Apoptoza	Zmanjšano izražanje gena
Stress induced-phosphoprotein 1	Preprečuje proliferacijo	Povečano izražanje gena
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2	Metabolizem energije in vloga v respiratorni verigi	Povečano izražanje gena
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunit d	Metabolizem energije in vloga v respiratorni verigi	Povečano izražanje gena
Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	Metabolizem energije in vloga v respiratorni verigi	Povečano izražanje gena

PREDNOSTI MOET PRI GOVEDU

Obstajajo številne prednosti MOET pri govedu:

- izboljšano in povečano število potomcev, bodisi samcev ali samic, od gensko superiornih darovalk.
- vrhunska krava na ta način lahko proizvede večje število potomcev kot z klasičnim načinom razmnoževanja
- povečanje reprodukcijske in plemenske sposobnosti dragocenih živali, ki hkrati povečujejo genetske izboljšave črede . [10]
- lahko se uporabi tudi za testiranje dedovanja pomanjkljivosti pri bikih. Z parjenjem bika s hčera mi bo izražen recisivni gen. Te pomembni testi lahko prihranijo čas in stroške celotne populacije ni treba testirati.
- postopek se lahko uporablja za zdravljenje neplodnih samic zaradi bolezni, poškodbe ali staranja. [11]
- zmanjša se tveganje za prenos bolezni geografsko in tudi od črede do črede, ali od krave na teleta

16

Dejavniki, ki vplivajo na rast stopnje brejosti in uspešnosti MOET vključujejo prehrano, oceno zdravstvenega stanja darovalke in prejemnice, občutljivost na folikle stimulirajoči hormon (FSH), folikularna populacija, stres in lastnosti bikovega semena.

Prispevek k vzdržni intenzifikaciji

Z uporabo laboratorijske opreme zmanjšuje pritisk na naravne vire, ki se uporabljajo med naravnim postopkom vzreje; genotipi govedi in proizvodno okolje se lahko bolj ujemajo; in teoretično bi lahko kmetom omogočili učinkovitejšo uporabo črede najboljših krav darovalk z najemom nizko kakovostnih krav prejemnic. [12] Čeprav proizvodnja in prenos zarodkov morda ne bosta imel dramatičnih učinkov na hitrost genetskega dobička, lahko učinkovitost poveča. Programi zamenjave telic trajajo dolgo, vzdrževanje velikega števila samcev je lahko drago, komercialni pomen nekaterih pasem pa lahko upade. Če bi ET postal rutinski kot je umetna osemenitev,

bi na primer trgovanje govejega mesa, ki temeljijo na tem sistemu, lahko postale konkurenčnejše proizvodnji prašičev in perutnine v smislu učinkovitosti uporabe hrane

Strategija za obnovo črede v sušnih obdobjih

Suša je veliko tveganje za obolevnost živine in ponavljajoč se izziv pri ohranjanju velikosti črede, zlasti na območjih sušnih površin v državah v razvoju. V razvitih državah nekateri lastniki živine uporabljajo prenos zarodkov (ET) kot sredstvo za obvladovanje tveganja pred sušo ali drugimi nesrečami, ki lahko znatno zmanjšajo velikost črede. S tem, da se pridobljene zarodke zamrzne za uporabo v primeru suše, omogoča hitro regeneracijo staležev vrhunske kakovosti. Ta metoda je lahko tudi cenejša od odkupa goveda. Poleg tega se lahko kot nadomestki uporabljajo manj zaslužne, vendar kljub temu reproduktivno zdrave samice preživele črede. Čeprav ta strategija obvladovanja tveganj večini držav v razvoju ni na voljo, če bi tehnologija ET postane cenejša in bolj dostopna manjšim kmetom, bi lahko postala del nabora rešitev za izboljšanje odpornosti na sušo, podnebne spremembe in druge dejavnike, ki vplivajo na stopnjo umrljivosti živine.

17

Potencial za povečevanje dohodka

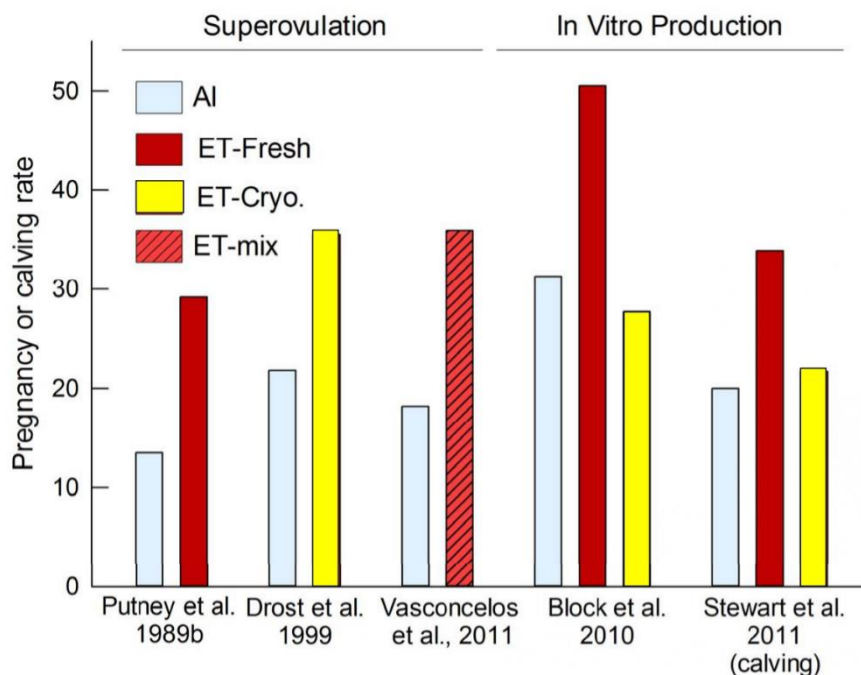
Dodano vrednost je mogoče pridobiti s povpraševanjem po prenosu zarodkov (ET). Na primer, kmetje, ki redijo avtohtone ali slabše kakovostne pasme, vendar imajo zadostno sposobnost razmnoževanja, lahko krave dajo v najem za nadomestne matere. Kmetje, ki redijo vrhunske pasme, lahko prodajo 100-150 jajčec na kravo na mesec. To strategijo je mogoče uporabiti za izboljšanje dohodka gospodinjstev in povečanje privlačnosti kmetovanja.

Izboljševanje reprodukcijskih rezultatov

V obdobju povišane temperature okolja so krave podvržene vročinskemu stresu kateri močno vpliva tako na njihove proizvodne rezultate kot tudi reprodukcijske. Vročinski stres vpliva na reprodukcijo na tak način, da krave manj kažejo znake estrusa, zmanjša plodnost (oploditev in embriološka rast) ter negativno vpliva na rast plodu. Zarodek v



stadiju morula/blastocista je bolj odporen na visoke temperature in zato s pomočjo presejevanja zarodkov v času vročinskih stresov lahko dosežemo boljše rezultate kot pa z umetno oploditvijo.



Slika 7. Embriotransfer v poletnih mesecih izboljšuje reprodukcijske rezultate

Prav tako lahko izboljšamo rezultate pri kravah katere se večkrat pregonijo. Te krave imajo redne pojatvene cikle, nobenih vidnih kliničnih nepravilnosti vendar vseeno ne ostanejo breje v dveh ali treh pojatvenih cikliih.



Study	Location	Definition of repeat-breeder	Treatment	Number of animals	Pregnancy rate, percent
Son and others, 2007	South Korea	3 rd or later breeding	AI at oestrus	27	18.5
			Timed AI	13	7.7
			Timed ET	13	53.8
Block and others, 2010	United States – Florida	> 3 rd breeding	Timed AI	33	21.1
			Timed ET-fresh	25	60.0
			Timed ET-vitrified	31	29.0
Canu and others, 2010	United Kingdom	4 th breeding	AI ^c	56	30.0
			AI + ET	114	52.6

Slika 7. Primerjava uspešnosti umetne osemenitve in embriotransferja pri kravah, ki se pogosto pregonijo

19

Pričakovani rezultati

Proizvodnja embrijev varira od krave do krave ter od spiranja do spiranja. Povprečje je približno šest zarodkov primernih za zamrzovanje (excellen or good) in osem zarodkov primernih za takojšnji prenos (excellent, good, fair, poor). Stopnja brejosti pa je prav tako drugačna pri vsakem spiranju z povprečno 60-70% brejosti pri prenosu svežih zarodkov in 50-60% pri prenosu zamrznjenih zarodkov. Veliko dejavnikov vpliva na stopnjo brejosti kot so kvaliteta zarodkov, prejemnice, tehnična sposobnost ekipe za pridobivanje zarodkov in seveda od darovalke. Določene darovalke konstantno proizvajajo embrije z visoko stopnjo brejosti za razliko od drugih katere vsakič dajo zarodke z slabo stopnjo brejosti.

Pričakujemo, da bo pri zarodkih po stimulaciji z LLL prišlo do povišanja stopnje brejosti pri testni skupini zarodkov, kar bi izboljšalo učinkovitost metode. Z višjo stopnjo brejosti bi tako zmanjšali stroške vzreje telet iz postopkov ET in s tem prispevali k hitrejšemu širjenju vrhunskega genetskega materiala. Povišano izražanje genov, vključenih v

proliferacijo, metabolizem energije in delovanje respiratorne verige prispeva k hitrejši delitvi celic tekom zgodnjega embrionalnega razvoja. Zmanjšano izražanje genov, ki so vpleteni v apoptozo prav tako vpliva na višjo stopnjo preživetja zarodkov obdelanih z LLL. Rezultati naloge bodo prispevali k boljšemu razumevanju molekularnih osnov predimplantacijskih faz razvoja zarodkov in potencialno omogočili poseganje v mehanizme, ki pomembno vplivajo na učinkovitost pridobivanja zarodkov.

S pomočjo laserja z nizko močjo se bo predvidoma stopnja brejosti z in-vitro pridobljenimi zarodki izboljšala za 10-20%. Prav tako se bo stopnja brejosti v času vročinskega stresa izboljšala za 10-30% v primerjavi z umetnim osemenjevanjem.

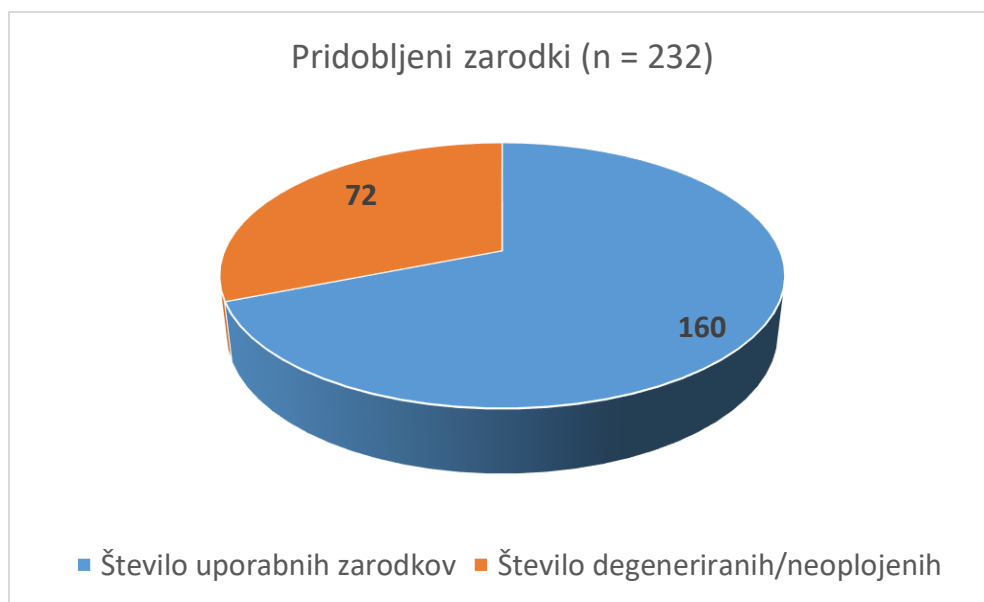
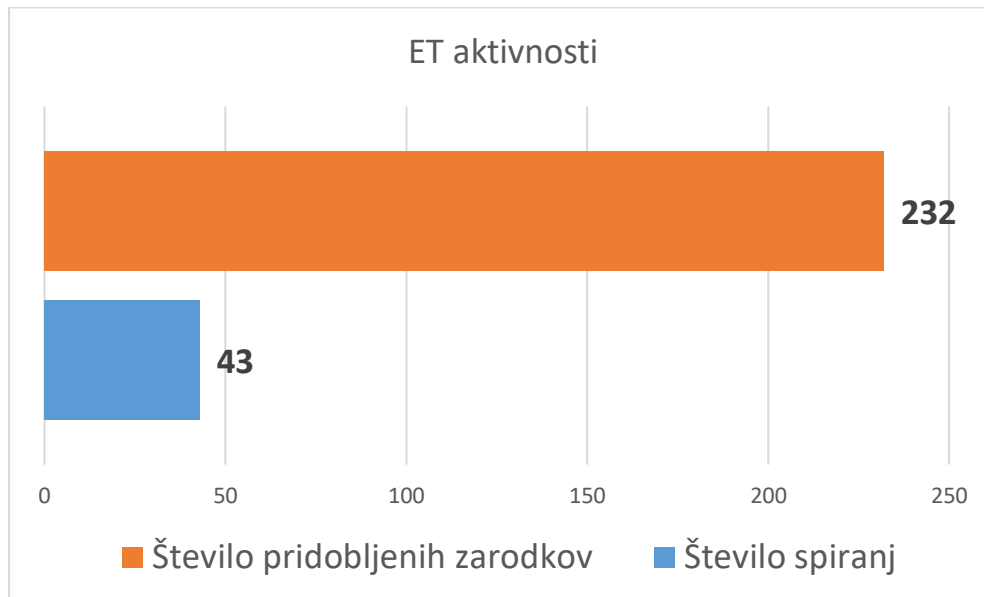
Metoda vrednotenja poskusa:

Eksperiment je bil razdeljen v analizo uspešnosti prenosa pridobljenih zarodkov takoj po spiranju. Zarodke smo obsevali z laserjem z nizko intenzivnostjo takoj po pridobitvi znotraj petrijevke (LLL) in takoj prenesli v prejemnice. Hkrati pa smo vzporedno izvedli prenos zarodkov na katerih nismo izvajali laserske stimulacije (kontrolna skupina).

20

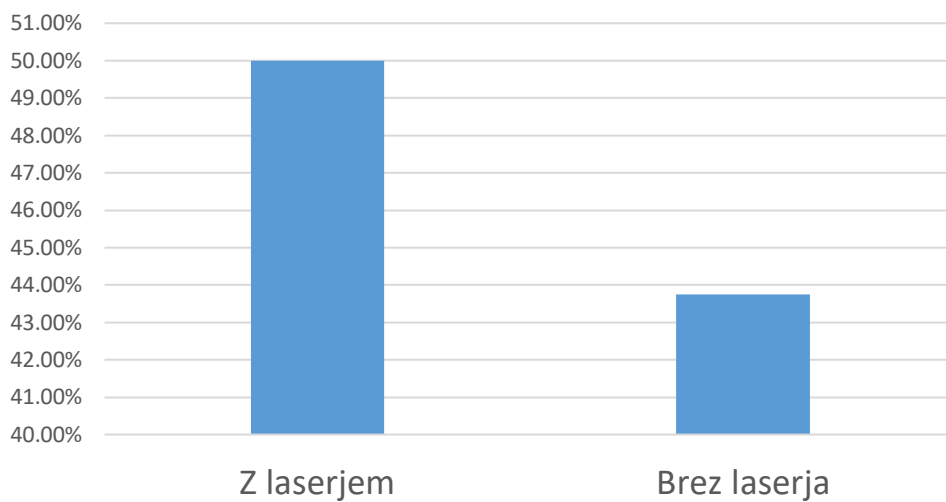
Drugi del analize uspešnosti pa je temeljil na primerjavi prenosa zamrznjenih zarodkov in umetne osemenitve v času vročinskega stresa (temperatura $<25^{\circ}\text{C}$). V prejemnice smo sedmi dan po pojatvi (estrusu) presadili zarodke, ki so bili hranjeni v tekočem dušiku (-196°C). Hkrati pa smo kontrolno skupino krav umetno osemenili (približno 15h po prvih znakih pojatve).

Rezultati:

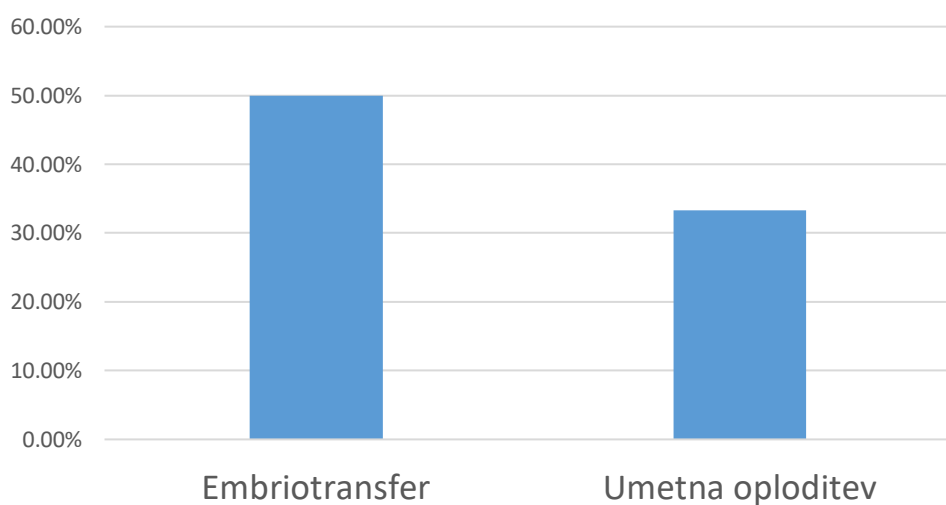




Doseganje brejosti



Pojav vročine



Sklepi ter priporočila

Glede na posebne potrebe vsakega rejskega programa je mogoče uporabiti različne pristope. Za rejce je pomembno, da razumejo, kako se lahko vsaka reproduktivna tehnologija uporabi v njihovi reji. Čeprav ET morda ni odgovor za vsak rejski program, so mnogi ugotovili, da gre za orodje, ki ponuja edinstvene možnosti za razširitev elitne genetike, ki jo zagotavljajo tako testirane darovalke kot redki ali dragi biki. Da bi učinkovito in ekonomsko vključili to tehnologijo v rejski program, rejce spodbujamo, da natančno pregledajo svoje cilje, razumejo priložnosti in omejitve obeh možnosti in sodelujejo z izkušenimi, strokovnimi skupinami za določitev najboljših tehnologij rejskih programov za doseg njihovih ciljev .

Prihodnost reprodukcije v govedoreji je v hitrem širjenju kakovostne genetike s povečano proizvodnjo in razvijanjem embriotransferja. Prepričan sem, da imamo dovolj znanja in možnosti, da to korenito spremenimo s spoštovanjem stroke ter prizadevnega dela dobrega gospodarja na vsakem gospodarstvu.