

SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTUDOMÁNYI TANSZÉK

Konzulens:

DR. LENCSÉS-VARGA ERIKA
egyetemi docens
PhD

**TELEPI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT ALKALMAZOTT ASSZISZTÁLT
REPRODUKCIÓS ELJÁRÁSOK VIZSGÁLATA**

Készítette:

SÁNDOROVÁ LILLA
mérnökjelölt

Állattenyésztő mérnök Szak

Mosonmagyaróvár
2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	4
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 Wagyu tenyésztés jelentősége	6
2.2. Wagyu fajta bemutatása	8
2.3. Korszerű biotechnológiai eljárások a szarvasmarhatenyésztésben	11
2.3.1. Az embrióátültetés története	11
2.3.2. Embrióátültetés jelentősége szarvasmarha fajban	12
2.3.3. Az embrióátültetés (ET) technológiája	16
2.4. Wagyu embrióátültetés	19
3.1. Az első vizsgálat	21
3.1.1. A vizsgálat helyszíne	21
3.1.2. A vizsgált állomány és a tartástechnológia bemutatása	22
3.1.3. Az embrióátültetés technológiája	23
3.1.3.1. A recipiensek kiválasztásának szempontjai és ciklusuk szinkronizálása	23
3.1.3.2. Az embriók beültetése	23
3.1.4. Vemhességellenőrzés, elletés technológiája	24
3.2. A második vizsgálat	26
3.2.1. A vizsgálat helyszíne	26
3.2.2. A vizsgált állomány és a tartástechnológia bemutatása	26
3.2.3. Az <i>in vivo</i> embrióelőállítás	27
3.2.3.1. A szuperovulációs kezelés	27
3.2.3.2. Az embriók kinyerése	28
3.2.3.3. A kinyert embriók osztályozása	28
3.2.3.4. Az embriók mélyhűtése	29
3.2.4. Az <i>in vitro</i> embrióelőállítás	29
3.2.4.1. Petesejtek kinyerése	30
3.2.4.2. Petesejtek mosása, majd érlelése (IVM)	30
3.2.4.3. In vitro termékenyítés, IVF	31
3.2.4.4. In vitro tenyésztés, IVC (1–7. nap)	31
3.2.4.5. Embriók bírálata az IETS elvei alapján	31

3.2.4.6. Embriófagyasztás	32
4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	33
4.1. A donor állat kora	34
4.2. Szuperoovulációs kezelés	35
4.3. Az embriókinyerés évszak hatása	37
4.4. A recipiens holstein-fríz egyedek eredményessége	38
4.4.1. A sárgatest helye és átmérője	38
4.4.2. A recipiens kora	40
4.4.3. Az eltérő fejlettségi állapotú embriók megtapadása	40
4.4.4. Évszakok hatása az embrióátültetés eredményességére	41
4.5. Születési eredmények	42
4.6. IVF- program	42
5.KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	44
6. FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE	46

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÚZÁS

„Bolondnak tartottak. Senki sem akarta vállalni az etikai kockázatot. Én azonban sosem aggódtam, a kutatásaim bebizonyították, hogy az IVF ugyanúgy működik, mint a természetes megtermékenyülés.”

ROBERT G. EDWARDS

(fiziológiai és orvostudományi Nobel-díj, 2010)

A gazdasági állatok szaporodásbiológiai gondozása összetett feladat, amely felöleli a nőivarú egyedek szaporítása során alkalmazott biotechnikai eljárásokat. Összetett feladat, hiszen sok esetben találkozhatunk a nem ivarzó, a csendesen ivarzó és az észre nem vett ivarzó állatok fogalmával. Állattenyésztőként a szándék ugyanaz, hogy a kiváló genetikával rendelkező nőivarú állatok potenciálját kihasználjuk oly módon, hogy a lehető legtöbb utódot nyerjük tőlük.

Ahhoz, hogy a hazai és nemzetközi állattenyésztés megőrizhesse a versenyképességét, elkerülhetetlen az asszisztált reprodukciós technikák (ART) alkalmazása. Az asszisztált reprodukciós technológiák csoportjába különböző eljárások tartoznak, mint a mesterséges termékenyítés, az ivarzás -és ovuláció szinkronizálása mellett ezek indukálása, a szuperovulációs kezelések, az embrióátültetés (ET) és nem utolsósorban az embriók és petesejtek fagyasztása. Ezen technológiák alkalmazása az emberben és a gazdasági állatokban egy célt szolgál, támogatni az adott faj szaporodását és fennmaradását (Szabari *et al.*, 2008).

Ellenben kell tennünk némi különbséget humán és állati szempontból. Embernél az ART-nak köszönhetően született meg az első lombikgyermek 1978-ban, Angliában. Robert Edwards eredményei tették lehetővé a terméketlenség kezelését, amely orvosi állapot, az emberiség jelentős részét, az összes pár több mint 15 százalékát érinti világszerte. Magyarországon 1987-ben végeztek először sikeres beültetést, egy olyan meddő nőnél, aki 10 éven keresztül várt a gyermekáldásra. Az *in vitro* termékenyítésnek (IVF) köszönhetően 1978 óta megközelítőleg kb. 8 millió gyermek jött világra. Hazánkban évente mintegy 6000 – 7000 IVF eljárást végeznek el (Cseh *et al.*, 2019). Ennek alapján elmondható, hogy embernél az ART-t kizárólag olyan esetekben alkalmazhatjuk, amikor egy adott házaspár valamelyik vagy mindkettő tagjánál csökkent reprodukciót vagy súlyosabb esetben teljes infertilitás, azaz meddőség áll fenn.

Az állatorvosi asszisztált reprodukciós eljárások során a legjobb anyákból (donor), melyek szaporodásbiológiai szempontból egészségesek, azaz fertilisek, az embriókat kinyerjük és beültetjük őket egy genetikailag gyengébb, azonban kiváló anyai tulajdonságokkal rendelkező

egyedbe (recipiens). Ebben az esetben nem gyógykezelési protokollban vesznek részt, hanem alapvetően megkíméljük őket néhány felesleges vemhességtől, miközben a fertilis nőtényekből újabb és újabb utódok nyerhetők. A mesterséges termékenyítés során úgy gondolom, hogy az apai génekre nagyobb hangsúlyt fektetünk, holott az utód fenotípusát a termékenyített anyaállat genotípusa is meghatározza. Ezzel szemben, az embrióátültetésnél jóval többről van szó. Az eljárásra az 1970-es évek végétől innovációként tekintettek, hamar felismerve előnyeit, mint például: a modern állattenyésztés elvárásainak kielégítése, ritka, őshonos és veszélyeztetett állatfajok létszámának gyarapítása, ezen állatok megmentése és fenntartása (Cseh *et al.*, 2012). Magyarországon 1978 óta végeznek embrióátültetést, különösen holstein-fríz fajtában (Szabari *et al.*, 2008).

Dolgozatom célja, hogy a különleges genetikai adottságú wagyu szarvasmarha fajta, milyen módon illeszthető be az *in vivo* vagy akár az *in vitro* embrióelőállítás lépéseibe. A hazai tenyésztői gyakorlatban eddig nem született publikáció a wagyu fajtánál alkalmazott embrióátültetés (ET) sikerességéről. Véleményem szerint az ET nem jelenik meg széleskörben, holott egy haladó szemlélettel rendelkező telep szaporodásbiológiai menedzsment részét képezhetné. Vizsgálataimban egy felvidéki holstein-fríz recipiens üszőállomány embrióátültetés-protokolljának elemzésével, illetve az eljárás eredményességét befolyásoló tényezőkkel foglalkozom. Ezen belül fontosnak tartom ismertetni a különböző szuperovulációs kezelések hatását az embrió-produkcióra. Munkám során wagyu embriókat ültettünk be holstein-fríz recipiensekbe; vizsgáltam a vemhesülési százalékot, a recipiens üszők életkorának hatását az embriók megtapadására, valamint az évszak hatását, mint befolyásoló tényezőt.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Wagyu tenyésztés jelentősége

Az őshonos japán szarvasmarhák eredete feltehetően a kontinentális kínai fajtákhoz köthető, amelyeket valamikor a Yayoi időszakban (i.e. 300-tól i.sz. 300-ig) importáltak Japánba a Koreai-félszigeten keresztül (*Motoyama et al.*, 2016). Japánban a 19. század végéig a szarvasmarhákra igavonó állatként tekintettek, hiszen az 1800-as évek végéig egyáltalán nem is fogyasztottak marhahúst. A japán buddhista hiedelem miatt, miszerint az emberek állatokká reinkarnálódhatnak, sok évszázadon át, a szarvasmarha, köztük a wagyu húsának fogyasztása is tiltott volt ([URL¹](#)).

A wagyu szó a japán marhát jelöl, melynek szóösszetételéből a „wa”, céloz a származása, azaz jelentése japán, míg a „gyu” a szarvasmarhát jelenti. A fajta kiváló genetikai jellegzetessége közé tartozik a húsminőség és márványozottság, melynek köszönhetően a világ legdrágább húsaként tartják számon. Később a Meji dinasztia hatalomra kerülésének köszönhetően kezdett el terjedni Japánban a marhahúsfogyasztás. A wagyu húsmarha fajta áttörését a I. világháború utáni időszak tette lehetővé, miután a japán kormány úgy döntött, hogy a kiemelkedő minőséget mutató hazai és külföldi szarvasmarha fajtáknál támogatni kell a szelekciót és regisztrációt. A II. világháború után a japán kabinet racionalizálta a regisztrációs folyamatokat, és hivatalosan három fő wagyu szarvasmarha fajtát ismert el, melyek a következők: japán fekete, japán vörös és japán szarvatlan. 1948-ban hivatalosan is létrehozták a Nemzeti Waqyu Szarvasmarha Regisztrációs Szövetséget ([URL²](#)).

Az 1970-es évekre virágzó, globalizált japán gazdaság egyre több wagyu-t fogyasztott, a kilencvenes évek elejéig fajtiszta wagyu szarvasmarhákat és embriókat szállítottak Amerikába, Ausztráliába és Nagy-Britanniába. Ez a wagyu marhahús globális árának robbanásához vezetett.

A japán kormány a hazai húsmarha ágazat védelmének érdekében szigorú törvényeket vezetett be, melyek betiltották az élő japán wagyu marha exportját és a japán wagyu-t nemzeti kincsnek nyilvánította.

A wagyu négy szarvasmarha fajta keresztezéséből jött létre, melyek az alábbiak: a japán fekete, a japán barna, a japán shorthon és a japán poll (1. ábra). A japán fekete fajta közé számos egyéb típust is besorolnak, mint például Tottori, Tajima vagy a Hiroshima vonalakat. A japán fekete a Chugoku régióból származik, másik elnevezése a „Kuro-ge” vagy röviden „Kuro” (*Motoyama et al.*, 2016).



Japán fekete



Japán barna



Japán shorthorn



Japán poll

1. ábra: Japán wagyu marhafajták (saját szerkesztés, forrás: URL³)

Jelenleg kétmillió tisztavérű egyed él világszerte, melynek 96%-a Japánban (Kagoshima, Miyazaki és Hokkaido) található, a második legnagyobb egyedszám Ausztráliában, valamint az Egyesült Államokban fordul elő. Ausztráliában évente háromszor annyi egyedet regisztrálnak, mint az Egyesült Államokban. Az utóbbi években már Európában is több helyen tenyésztik, amelyet az amerikai és ausztrál vérvonal jellemez (URL⁴).

Japánban 2017-ben 2,5 millió szarvasmarhát tenyésztettek hústermelés céljából, melyek közül kb. 1,6 millió japán fekete, 21 000 japán barna, valamint 25 000 egyéb wagyu fajta. Ebben az időszakban összesen 50 100 hústermelő gazdaságot jegyeztek fel, melyekben az átlagos wagyu egyedszám 50 volt. Az értékesített szarvasmarhák 35,6%-át Kyushu-n, 20,7% Hokkaidón nevelték. 2017-ben a borjak piaci átlagára 653 827 jen (körülbelül 6 226 USD), míg a hasított testek marhahúspiaci átlagára 1 313 694 jen (körülbelül 12 511 USD). A hasított testre jutó átlagos teljes előállítási költség 1 054 763 jen (körülbelül 10 045 USD) volt. Japán 2016-ban összesen 526 000 tonna marhahúst importált, főleg az Egyesült Államokból, Ausztráliából és Új-Zélandból. A hazai hústermelésük meghaladja a 324 000 tonnát, ennek alapján elmondható, hogy Japán a marhahússzükségletük 62%-át importálta. Az elmúlt években Japán több külföldi országba exportált marhahúst (Egyesült Államok, Kanada, Hongkong, Makaó, Mexikó, Új-

Zéland, Vietnam, Kambodzsa, Szingapúr, a Fülöp-szigetek), 2014 óta pedig Európai Unió is felkerült erre a listára (Gotoh *et al.*, 2018).

Európa az elmúlt 10 évben növekvő tendenciát mutat a fajta érdekeltségében, számos wagyu egyesület alakult (pl. Magyar Wagyu Egyesület) a fajta fejlesztésének elősegítésére. Erőteljes növekedés figyelhető meg Oroszországban is. Magyarországon 2009-ben 50 darab Ausztráliából származó fagyasztott embrió recipiens üszőkbe történő beültetésből származó egyedek szaporulata biztosította a wagyu tenyészet kezdetét, amely Zichy Mihály nevéhez köthető. Napjainkban a Hortobágy-Faluvéghalmi Kft. 85 tehénnel, 3 bikával, 10 vemhes üszővel, 50 tinóval, 50 borjúval, a szoboszlói telepen 25 növendékkel rendelkezik. Céljaik között szerepel az állomány 250 tehénre történő növelése, szerepet tulajdonítva a természetes fedeztetésnek, valamint a mesterséges termékenyítésnek és az embrió-átültetésnek (URL⁵).

2.2. Wagyu fajta bemutatása

Magyarországon, a jelenlegi indító állomány alapján elmondható, hogy a legfontosabb cél a japán fekete wagyu fajtatiszta populáció tenyésztésének magasabb szintre történő emelése. A fajta egyik legjelentősebb tulajdonsága, hogy a húsa hírhedten bársonyos állagú, szaftos, vajszerűen olvad a szájban. A hús márványozottsága, valamint a zsírsavösszetétele szörzet és a bőr puhaságával szoros korrelációban áll (2. ábra).



2. ábra: Wagyu marhahús márványozottsága (Forrás:URL⁶)

A wagyu marha egységesen fekete színű, ámde születésekor a borjú sötét barna színű, amely a növekedéssel párhuzamosan befeketedik. A barna szín előfordulása, kizárólag a Tajima vonalak esetében megengedett. A wagyu szarvalt fajta. A feje viszonylag rövidebb, a többi fajtához viszonyítva, különösen kiemelve a szemek közötti távolságot. A tehenek kifejlett kori testtömege 550 kg, míg a bikáké 630 kg. 8 – 9 hónapos korban ivarérett, célszerű üszők esetében

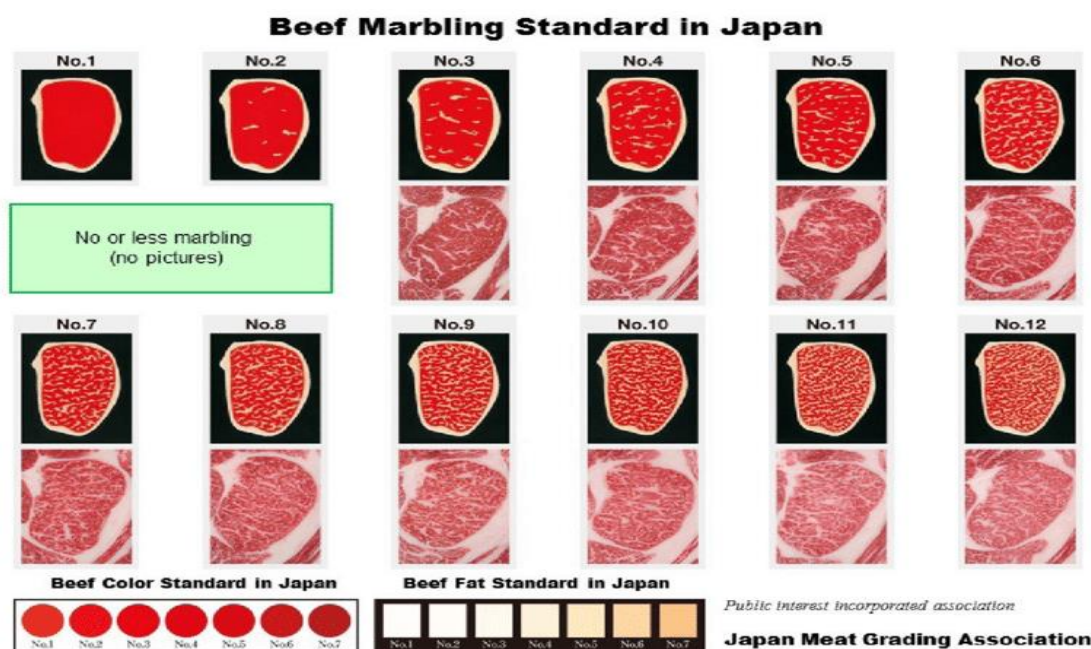
a 24 hónapos korban történő első borjazást időzíteni. A borjak kis születési súllyal (körülbelül 28 kg) jönnek a világra – ennek köszönhetően gyakorlatilag a wagyu fajta emberi segítség nélkül ellik. A borjak választása 200 napos korban történik, mintegy 160 kg testtömeg mellett (3.ábra). A láb- és körömszilárdság egyik nagyon fontos paramétere a testfelépítésnek, ami szoros összefüggésben áll a vágási életkorral, amely 36 hónapos kort jelent. A fajta növekedési erélyét tekintve, intenzív hizlalás mellett 600 g-os súlygyarapodást érnek el (URL^2).



3. ábra: Wagyu növendék üszők a felvidéki telephelyen (forrás: a szerző saját felvétele)

Japánban, a wagyu szarvasmarhákat általában 11 hónapos kortól 30 hónapos korukig koncentrált, magas energiatartalommal rendelkező takarmányadaggal etetik, melynek egyértelmű célja az intramuszkuláris zsír felhalmozódásának lehetővé tétele. A leggyakrabban alkalmazott hizlalási mód, kiemelve az időszak végét, amikor koncentrátum és ad libitum rizsszalma áll az állatok rendelkezésére. Az állatokat naponta két, illetve három alkalommal etetik. A hizlalási időszak felépítését is pontosan meg tudjuk határozni, az első időszak, amely 11 hónaptól 18 hónapig tart, növekvő koncentrátum mennyiséget és csökkenő mennyiségű szálastakarmányt jelent. A második szakaszban (18 hónaptól a hizlalás végéig) a takarmányadag 86,4- 84,2% koncentrátumot és 13,6 – 15,8% szálastakarmányt tartalmaz (Gotoh et al., 2018).

A wagyu hasított test minőségét a Japan Meat Grading Association (JMGA) akkreditált osztályozói értékelik, Japánban ezen személyek száma megközelíti a 200 főt. Az akkreditált osztályozók a Beef Model Score (BMS) alapján értékelnek. Japánban a hús márványozottságát hagyományosan 12 osztályba sorolják (4. ábra). Az értékelési szempontok között meg kell említeni a hús színét, élénkségét (1-5 pont), az állagot, rostosságot (1-5 pont), illetve a zsír színét, minőségét, konzisztenciát (1-5 pont), végül az értékes húsrészek arányát (A/ B/ C kategória). Az értékelés során a hasított test márványozottságát összehasonlítják a márványozási szabvány fényképével. Ezt a szarvasmarha fajtát is a hús mennyisége és minősége alapján osztályozzák. Az „A” jelenti a mennyiséget, azaz mennyi marhahúst nyernek egy adott szarvasmarhából; míg az „5” a legmagasabb minőségi fokozat jelzi, ez a marhahús rendelkezik a legjobb márványozottsággal, színnel, konzisztenciával és zsírminőséggel ([URL¹](#)).



4. ábra: A wagyu marhahús márványozási szabványa Japánban (forrás: [URL⁷](#))

A kiváló minőségű wagyu marhahús 13% nyersfehérjét, 40% nyers zsírt, valamint 47% vizet tartalmaz. Fontos kiemelünk, hogy mind a kilenc esszenciális aminosavat tartalmazza, a fehérjék felszívódásának eredményessége pedig 97%-os (*Mirae et al.*, 2016).

Zembayashi (1994) vizsgálatai szerint, a japán fekete szarvasmarha képes olyan lipidek termelésére, amelyek jóval magasabb arányban tartalmaznak egyszeresen telítetlen zsírsavakat (MUFA), mint például a holstein-fríz vagy ép a charolais. A MUFA-k nagyobb koncentrációban lévő előfordulása főként abban játszik szerepet, hogy lehetővé teszi a zsír lágyágát, javítva a marhahús ízét, valamint csökkentheti a véráramban keringő lipoprotein

koleszterin koncentrációját. *Gotoh et al.* (2011) már részletesebben vizsgálták a vázizomzat intramuszkuláris zsírtartalmát és zsírsavösszetételét. Megfigyelésük alapján, különösen C16:1, C18:1 és C20:1 zsírsavak fordultak elő a legnagyobb mennyiségben.

Oka et al. (2002) szerint, az egyes eltérő japán fekete apavonalak között meghatározó eltérések vannak, főként a zsírsav-összetételben. Joggal állítható, hogy ezt a fajta eltérést olyan genetikai tényezők határozzák meg, mint a lipidszintézis és a zsírsav-anyagcsere gének. Itt kell megemlítenünk, *Taniguchi et al.* (2004) vizsgálatait, amelyben bebizonyították, hogy a sztearoil-CoA-deszaturáz (SCD) az első olyan gén, amely befolyásolja a marhahús zsírsavösszetételét. Az SCD-nek köszönhető, hogy a telített zsírsavak képesek MUFA-ká átalakulni.

Összességében kijelenthető, hogy a szarvasmarhák húsának zsírsavösszetételéért felelős géneket poligénnek nevezzük. A japán tenyésztési programokban a reprezentatív géneknek, példának okán az SCD vagy a FASN, már DNS- markerként meghatározó szereppel bírnak a kiváló apák kiválasztásában. Alapvetően ezen genetikai DNS-markerek világszinten hozzájárulhatnak a marhahúsipar, valamint a humán táplálkozás innovációjához.

2.3. Korszerű biotechnológiai eljárások a szarvasmarhatenyésztésben

2.3.1. Az embrióátültetés története

Biotechnológiai módszerek során a nyulakat széles körben alkalmazták, mint kutatási modellek az embriológia területén a 19. század végétől egészen a 20. század közepéig. Az első sikeres nyúl embrió- átültetést 1890-ben, Walter Heape végezte el, aki két, négysejtes állapotban lévő embriót transzplantált, egyik nyúlfajtából a másikba. Fontos hangsúlyozni, hogy a nyúl petevezetője és méhe megfelelő, valamint viszonylag olcsó és egyszerűbb megoldásnak bizonyult, ezért először 1959-ben sikerült ebben az állatfajban előállítani életképes utódokat teljes mértékben *in vitro* (*Betteridge*, 2003).

Warwick és munkatársai kiemelkedő munkát végeztek juhok és kecskék esetében az 1930-as és 1940-es években (*Betteridge*, 1981). Az akkoriban alkalmazott technikát Hunter és munkatársai (1955), továbbá Moore és Shelton (1964) formálta még tökéletesebbé. A módszer lény median laparotomiára alapult. Szintén hangsúlyos kiemelni, hogy az anyajuh méhnyakcsatornájának kivételes az anatómiája, amely gátolja a katéter bevezetését az uterus bicornisba. Ellenben a szarvasmarhával, az anyajuhok esetében a nem sebészi embrió kinyerést majd beültetést nem vehetjük igénybe (*Cseh et al.*, 2012).

Az embriók széles távolságra történő szállítása először az 1970-es évek elején valósult meg. Fontos megemlíteni, hogy a sertés- és juhembriókat a nyulak petesejtjeiben tárolták, amelyre biológiai inkubátorként tekintettek. Ennek eredményessége igazolta az első sikeres szarvasmarha- IVF 1977-ben történését, amely során bikaspermiumokat kapacitáltak nyúlpetevezetőben (Niemann és Wrenzicky, 2018). Brackett és Bousquet (1982) számoltak be az első élő IVF borjúról, amely 1981-ben született meg. Sikeres lóembrióátültetést pedig 1974-ben végeztek el. Az első, *in vitro* előállított borjak 1987-ben születtek, Magyarországon pedig 1996-ban (Vincze *et al.*, 2020).

Az embrióátültetés nagyüzemi körülmények közötti alkalmazása szarvasmarhatenyésztésben a 70-es évek elején indult, amikor az európai kettőshasznú fajták teret hódítottak Észak-Amerikában, Ausztráliában és Új-Zélandon (Zubor és Vigh, 2018). Seidel 1984-ben arról számolt be, hogy 1982-ben Észak- Amerikában mindössze az 1000 borjúra vetítve, a születési arány az ET-ből mindössze egy volt. Magyarországon az embrióátültetés, kapcsolódva a nemzetközi tudományos munkássághoz, mintegy 40 éves múltról beszélhetünk. Mindenekelőtt az embrióátültetéshez kapcsolódó intézmények Üllőn, Dunavarsányban, Mosonmagyaróváron, Herceghalomban (ÁTKI) és az Állatorvostudományi Egyetemen alakultak ki (Zubor és Vigh, 2018). Az 1979-ben létrehozott és 2000-ig funkcionáló Üllői Embrióátültető Állomáson a gyakorlati ET-vel kapcsolatos kutatás-fejlesztéssel, a külföldről importált szarvasmarha- és juh embriók fogadásával és beültetésével, valamint az EÁ és más reprodukciós módszerek hazai vállalkozásokban történő bevezetéséről gondoskodott (Cseh *et al.*, 2012).

Hazánkban az első IVF-borjú születéséről 1991-ben publikáltak, későbbiekben pedig a technikának óriási szerepet tulajdonítottak a veszélyeztetett magyar szürke szarvasmarha génmegőrzésében. Magyarországon ez a biotechnológiai eljárás a mai napig nem hódít teret a mindennapos gyakorlatban. Joggal állíthatjuk, hogy az embrió-előállítás valamelyest a laboratórium falai között maradt (Vincze *et al.*, 2020).

2.3.2. Embrióátültetés jelentősége szarvasmarha fajban

A modern szaporodásbiológiai eljárások megjelenése, és egyre magasabb szinten történő alkalmazása utat nyitott a szaporodásbiológia részletesebb tanulmányozásának, kezelésének és manipulálásának mind *in vivo* és *in vitro*, ezzel javítva a reprodukciós teljesítményt a gazdasági állatfajaink esetében, amely elengedhetetlen szereppel bír a fenntarthatóság szempontjából (Choudhary *et al.*, 2016). A legfontosabb alkalmazási terület a nőivar reprodukció

képességének kiaknázása, melynek célja, hogy minél több utód legyen nyerhető egy értékes donortól (Wilmut és Rowson, 1973). Cseh és Dohy (2003) vizsgálatai szerint az ET alkalmazásának köszönhetően egy kiváló genetikával rendelkező nőivarú egyedtől akár 20-25 utód is nyerhető élete alatt. A tej- és húshozam iránti növekvő fogyasztói igényekkel párhuzamosan emelkedik a kereslet az embrióátültetésben résztvevő állatok iránt, ez eredményezi a fokozódó haszonállatok tenyésztésének lehetőségeit (Loi et al., 2016). Kinghorn et al. (2000) véleménye szerint az optimális érték az, ha a populáció 10%-át vonják ET-be. Maga az embrióátültetés, mint technika, alkalmas új tenyésztési koncepciók kidolgozására, a generációs intervallum lerövidítésére, értékes genetikai egyedektől nyert embriók importjára és exportjára, korai embriológiai és embriogenomikai kutatások elvégzésére és veszélyeztetett fajok megőrzésére (Bo és Mapletoft, 2020).

A Nemzetközi (haszonállat) Embrióátültetési Társaságnál rögzített adatközlések alapján elmondható, hogy Európában az éves szarvasmarha embrióátültetések száma meghaladja a 100 ezres értéket (URL⁸). Jelentős változások történtek 2020-ban, a különböző országokra jellemzően gyűjtött mosások, petesejtek és beültetett embriók számát tekintve. A szarvasmarha IVD és IVP embriók 2020-as összesített termelésének régiók szerinti eloszlását 1. táblázat tartalmazza. Globális szinten, összesen 361 728 IVD embrióot mostak ki, amely csökkenő tendenciát mutat a 2019-es adatokhoz képest (-6,7%). Egyetlen kivételt képez az IVD embriók tekintetében Európa, amely kismértékű növekedést mutatott (+1,3%). Az IVP embriók előállítását tekintve 2020-ban az érték 1 156 422, amely + 12,1 %-os emelkedést mutat a 2019-ben összesített adatokhoz mérve, melynek értéke 1 031 567 volt. Európában az IVP embriókat tekintve, mintegy -23,4%-os csökkenésről beszélhetünk a 2019-es évhez viszonyítva (Viana, 2021).

Régió	IVD	IVP
Afrika	2763	4977
Ázsia	0	0
Európa	126,491	47,470
Észak- Amerika	196,704	578,995
Óceánia	4,211	14,345

Dél- Amerika	31,559	500,397
Összesen 2020-ban	361,728	1,156,422
Összesen 2019-ben	387,769	1,031,567
Százalékos eloszlás	-6.7	+12.1

1. táblázat: A szarvasmarha IVD és IVP embriók 2020-as összesített termelésének régiók szerinti eloszlása (AETE, 2021)

Európában, 2021-ben a szarvasmarha embrióátültetések számáról 24 ország adott statisztikát (2. táblázat), melyből Magyarország és Szlovákia is kivétel ([URL](#)⁹).

Átültetett embriók száma						
Országok	<i>In vivo előállított</i>			<i>In vitro előállított</i>		
	Friss	Mélyhűtött hazai	Mélyhűtött idegen	Friss	Hazai mélyhűtött	Nem hazai mélyhűtött
Ausztria	1457	1869	36	0	0	0
Fehéroroszország	791	390	87	215	43	0
Belgium	495	2851	628	0	24	0
Dánia	3196	1705	0	0	0	0
Észtország	0	0	7	0	0	0
Finnország	786	1369	148	0	765	0
Franciaország	16628	14979	1638	1967	1575	151
Németország	12372	16279	0	2658	4265	0
Görögország	0	0	0	0	0	0
Olaszország	6700	1860	0	0	0	0
Lettország	7	7	4	0	0	0
Litvánia	0	0	0	0	0	0

Hollandia	3055	9301	0	4462	3477	0
Norvégia	40	1835	80	0	110	30
Lengyelország	1072	357	74	112	145	0
Portugália	148	177	28	0	0	44
Románia	46	3	6	0	0	0
Orosz Föderáció	113	5935	297	0	24	0
Szerbia	0	0	72	0	7	0
Szlovénia	31	68	0	0	0	0
Spanyolország	615	1447	304	190	438	0
Svédország	648	1093	0	0	0	0
Svájc	807	2675	450	0	0	0
Egyesült Királyság	1391	1620	1290	324	906	43
Összesen	50398	65820	5158	9928	11794	253

2. táblázat: Szarvasmarha embrióátültetés 2021-ben (AETE, 2021)

A 2021-ben az embrióátültetések száma meghaladta a 140 000-e értéket. Az alábbi országok közül Franciaország 36 938, Németország 35 574, míg Hollandia 20 295 embrióátültetést végzett. Kiemelhető még az Orosz Föderáció 6 369 körüli, Dánia 4 901 szarvasmarha embrióátültetéssel, a többi országban rögzített adatok lényegesen kevesebb értéket mutatnak. Az összes Európán belüli átültetést vizsgálva elmondható, hogy 60 326 embrió friss állapotban, míg 77 614-et mélyhűtést követően, felolvasztott állapotban hajtották végre. Az *in vitro* technológia alkalmazását az alábbi országok közölték: Fehéroroszország, Belgium, Finnország, Franciaország, Németország, Hollandia, Norvégia, Lengyelország, Portugália, Orosz Föderáció, Szerbia, Spanyolország és az Egyesült Királyság. A szarvasmarha embrió előállításról 23 ország közölt információt. Attól függően, hogy a kimosott donorok száma mennyi egy adott országban, széles skálán mozog. Kiemelkedő országok Franciaország (41

900), Németország (37 040), Hollandia (27 602). A szarvasmarha embrió előállítás technológiák szerinti megoszlását 3. táblázat tartalmazza.

Ország	Szexált embriók		Genotipizált embriók	
	In vivo	In vitro	In vivo	In vitro
Franciaország	1 387	8	1170	8
Németország	0	533	0	1
Hollandia	0	0	0	5 610
Spanyolország	0	12	0	5
Összesen	1387	553	1 170	5 624

3. táblázat: A szarvasmarha embrió-előállítás technológiák szerint (AETE, 2021)

Magyarországon, a rögzített statisztikai adatok alapján kijelenthető, hogy 2015-ben a 73 kimosott donorból 774 embriót nyertek, ebből 543 volt olyan, amely megfelelt a minőségi követelményekkel szemben. Fontos hangsúlyozni, hogy az eljárás egyre fokozott figyelmet kap a húshasznú állományokban: a 73 mosási programból 58 donor a hús- (52) és kettős (6) hasznosítású fajtákhoz. Hazai körülmények között végzett 15 tejelő-donorprogramból összesen 128 embriót sikerült kinyerni, melyből 101 volt átültethető minőségű, míg vizsgálva ezt az értéket a húshasznú egyedeknél 547-ből 379, továbbá a magyartarkára vetítve 99-ből 63. Összességében elmondható, hogy hazánkban a kinyert és átültethető minőségű embriókból 103-at szexált spermával sikerült előállítani, valamint a 607 átültetés csaknem felét friss állapotban (289), míg a másik felét (318) felolvasztást követően hajtották végre (URL¹⁰).

2.3.3. Az embrióátültetés (ET) technológiája

Az időzített ET, ovum pick up módszer és a szuperovuláció fontos szerepet játszanak a generációs intervallum csökkentésében és a szarvasmarhák genetikai javulásának fokozásában. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a szinkronizálás elengedhetetlen folyamat az ovulációhoz, ezzel elősegítve a biotechnológiai eljárások eredményességét (Das et al., 2022). Magáról az embrióátültetésről, mint eljárásról akkor beszélhetünk, ha a donor állat testéből az implantációt megelőzően az embriót kinyerjük, ezt követően megtörténik az embriók

mikroszkópos és morfológiai bírálata, majd azokat a donorral azonos ivari ciklusban lévő recipiens egyed méhébe ültetjük át.

Az embrióátültetés lépései a következők:

- a donor egyedek kiválasztása
- a donor egyedek szuperovulációs kezelése
- a recipiensek szinkronizációja
- a donorok termékenyítése
- az embriók kinyerése
- az embriók bírálata
- az embriók beültetése
- esetlegesen az embriók mélyhűtése

Az asszisztált reprodukciós eljárások hatékony technikája, az úgynevezett szuperovuláció, melynek során exogen hormonok adagolásával egyszerre több tüsző érését és ovulációját idézzük elő, amelyet időzített mesterséges termékenyítés követ. A szuperovuláció kiváltása érdekében legalkalmasabb az ECG (Equine Chorionic Gonadotropin), FSH (Follikulus Stimuláló Hormon) vagy a PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Pécsi, 2007). A keringő AMH (anti-Müllerian hormon) magas szintje eredményezi a petefészekben található antrális tüszők magasabb számú szuperovulációját (Batista et al., 2014). A PMSG kezelések hátrányaként megemlíthető, hogy hosszú a hormon felezési ideje, melynek eredménye az extra follikuláris növekedés, ennek következtében pedig megnövekedett ösztadiol-szekréciót okoz. A megnövekedett ösztadiol mennyisége a postovulációs időszakban is fennáll, ami hatással van a korai embrió fejlődésére (Wock et al., 2007).

Besenfelder et al. (2020) szerint a szuperovuláció eredményességét több tényező is befolyásolja, mint a donor kora, fajtája, szaporodási képessége, paritása, az éghajlat, a takarmányozás és az FSH – készítmények. Az elégtelen energiabevétel késleltetheti a ciklikus petefészek-működést, ezzel károsítva a tüszőérést vagy a petesejtek minőségét. Ellenkező esetben, túlzott energiabevitel és testtömeggyarapodás szintén veszélyezteti a petesejtek fejlődését *in vitro*, valamint csökken az átültethető embriók kinyerési esélye (Santos et al., 2008).

Peter (2019) szerint a legjobb eredmények akkor érhetők el, amikor a szuperovulációs kezelés után, az ivarzás első jeleit követően 12–24 órán belül két alkalommal termékenyítenek. Az első

termékenyítéssel egy időben javasolt GnRH-t is adni a sikeresebb fertilizáció érdekében (Pécsi, 2007).

Az embriók kinyerése a termékenyítést követő 7. napon következik be, napjainkban már nem „véres úton” történik, hanem minimálisan invazív módon, egyszerű gravitációs módszerrel, amely során egy speciális ballonkatétert vezetnek be a nyakcsatornán keresztül a mosandó méhszarvba és az embriókat 250-300 ml öblítő folyadékkal öblítik (Bo és Mapletoft, 2013). Shaw és Good (2000) vizsgálatai alapján elmondható, hogy egy mosás alkalmával 4–6 embrió nyerhető ki.

Az embriómosást követően kerül sor az embriók bírálatára – a minősítés során több tulajdonságot kell megítélni. Az embriók minősítéséhez szükséges tulajdonságok a következők: méret, alak, szín, szabályosság, kompaktság, tömörség, perivitellinális tér, a citoplazma minősége és a zona pellucida állapota. Az ivarzást követő 5. és 6. napra jellemző a morula fejlettség, míg a 7. napon az embriókat a korai blasztocisza osztályba soroljuk (Jahnke et al, 2014). A Nemzetközi Embrióátültető Szövetség (IETS) embriók osztályozására vonatkozó irányelvei szerint az 1. fokozatú (kiváló minőségű) embrió 85% felett tartalmaz a zona pellucidán belüli sejttömeget, a 2. fokozatnak 50%-ot kell tartalmaznia, a 3. fokozat 25%, a 4. fokozat pedig <25% (Hasler, 2000).

Bo és Mapletoft (2013) szerint a legfontosabb tényező az embrióátültetés eredményessége érdekében a megfelelő recipiens kiválasztása. A donorok és recipiensek ivarzását 24 órán belül szinkronizálni kell, különben a vemhesülési arány jóval alacsonyabb lesz. A fagyasztás elengedhetetlen eleme a krioprotektív anyagok használata. Az eljárás lényege, hogy az embriót 1,5 MOL koncentrációjú etilén-glikolos (EG) oldatban dehidratáljuk, majd fagyasztjuk. Az etilén-glikol kíméletesebb krioprotektánsnak bizonyult, mint a glicerín, EG alkalmazásakor az embriók túlélési aránya is kedvezőbb (Pécsi, 2007).

Az *in vitro* embrió-előállítás (IVP) az 1980-as évek felé bemutatott új technológiának köszönhetően vált ismertté, amelyet általában ultrahang által vezérelt petesejtfelvétel segítségével hajtanak végre (OPU, ovum pick up). Európában számos mesterséges termékenyítő központ alkalmazta az OPU-IVP gyakorlati technológiáját, mint az elsődleges eszközt a genetikailag kiváló állatok szaporítására. A módszer előnye, hogy egy kiválasztott donortól hetente petesejteket gyűjthetünk, ezáltal folyamatos embriótermelésben tartjuk (Ferré et al., 2020). Az IVF eljárás során, a maturációt követően, amely általában 24 órát vesz igénybe, következik a termékenyítés, majd a fertilizációt követően a petesejteket 6 napig

médiumban tároljuk, amíg el nem érik a blasztociszta stádiumot. Általában a tenyésztett zigóták 20-40%-a éri el a kívánt állapotot. Fontos hangsúlyozni, hogy az *in vitro* embriók különösen érzékenyek a tenyésztési körülményekre négysejtes és morula stádiumban (Gad *et al.*, 2012). Sirard *et al.* (2006) szerint az alacsony embrionális fejlődésnek a következő okai vannak: a petesejtek tökéletlen maturációja, a nem megfelelő kultivációs körülmények, melyek károsodott embrionális genom-aktivitációhoz vezetnek, vagy a DNS fragmentációját eredményezik.

Összességében elmondható, hogy az IVP táptalajokhoz puffer sóoldat (Earle-sók az M199-hez), nátrium-hidrogén-karbonát, esszenciális és nem esszenciális aminosavak, l-glutamin, foszfát, piruvát, antibiotikumok, vitaminok, EDTA, cukor (fruktóz vagy glükóz) és egyéb protektor faktorok, valamint ivarsejt/embrió teljesítmény-fokozók és tápanyagok szükségesek (Gardner, 2008).

A blasztociszta stádium elérése után az embrióátültetést az *in vivo* fejlődött blasztocisztákhoz hasonlóan hajtják végre, vagy az embriókat mélyhűtéssel tartósítják (Rizos *et al.*, 2008).

Az *in vitro* előállított embriók érzékenyebbek a mélyhűtésre, mint az *in vivo* embriók (Nedambale *et al.*, 2004). Wrenzyki (2016) szerint eltérő génexpressziós, anyagcsere-, teljesítmény- és tolerancia- különbségekkel kell számolnunk, mivel az *in vitro* környezet nem egyezik meg az *in vivo* körülményekkel.

2.4. Wagyu embrióátültetés

Du *et al.* (2014) többször végrehajtott szuperovulációs eljárásaik során vizsgálták a wagyu FSH készítményekre történő reakcióját. A donorokat 2 csoportra osztották, az egyik csoport (n=24) összesen 400 mg FSH (FOLLTROPIN, USA), míg a másik (n=16) 10 mg olyan FSH-készítményt kapott, amelyet a Kínai Tudományos Akadémia Állattani Intézete állított elő (FSH CHN). Mindkét esetben, a készítmények adagolása 4 napos ütemben történt. A két hormonforrást vizsgálva, a vemhesülési százalék közötti különbség kevés eltérést mutat (28/71, 39,4% v. 13/34, 38,2%; p=0,9), viszont a degenerált embriók alacsonyabb előfordulása a FOLLTROPIN (400 mg) készítmény hatásának köszönhető.

Egy másik tanulmányban, amelyben An *et. al* (2016) tesztelték az FSH alacsonyabb dózisának (175 mg) hatékonyságát a szuperovulációs protokollok során *in vivo* wagyu embrió- előállítása alkalmával. Kísérletük hatékonynak bizonyult, mivel tehenenként átlagosan 7,6 embriót nyertek ki egy mosással, 1,4 embrióval többet, mint egy korábbi vizsgálatban, amelyben nagyobb dózisú FSH-t (400 mg) alkalmaztak. Az állatok 60%-nál, az *in vivo* előállított embriók

átlagos száma is magasabb volt ($11,38 \pm 3,23$ embrió), az IVF embriókhoz képest ($5,23 \pm 2,28$). Ellenben, a donorok fennmaradó 40 %-nál jobb eredményeket tapasztaltak az IVF technikánál ($5 \pm 3,2$ embrió), mint *in vivo* ($2 \pm 3,6$).

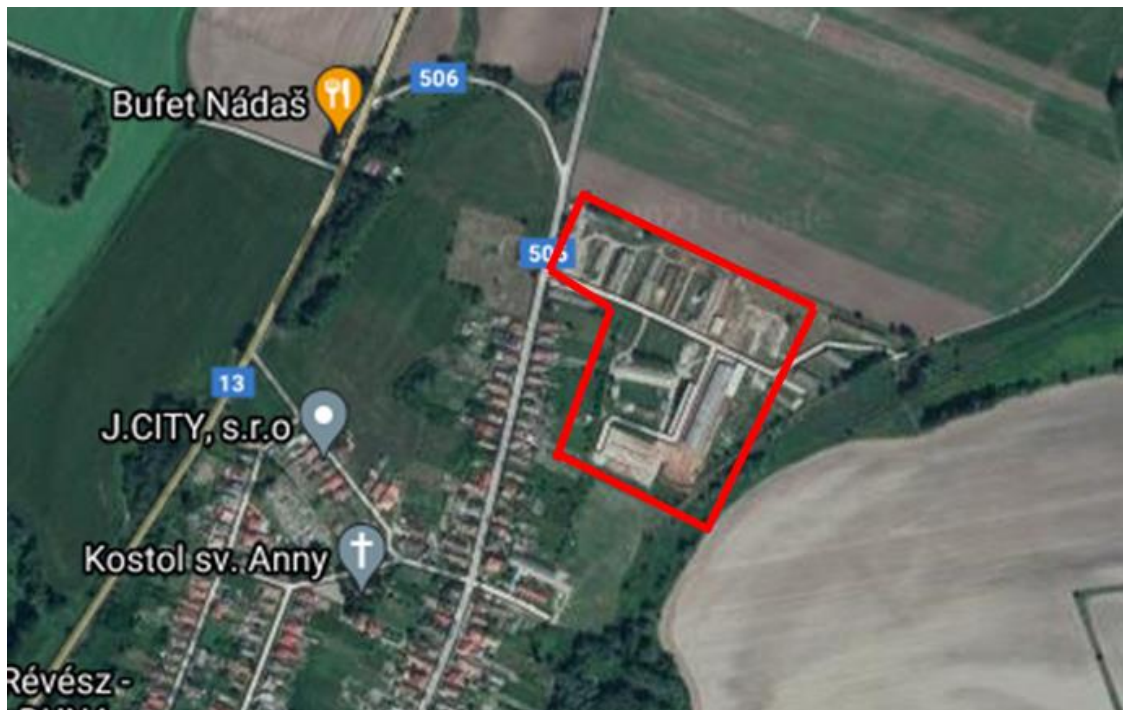
Sugimoto (2010) szerint, ezt valószínűleg a vizsgált egyedek egyéni genetikai varianciája okozza, ami alapvetően befolyásolja a szuperovuláció során alkalmazott exogen hormonokra adott válaszreakciójukat. Véleményük szerint, a wagyu szarvasmarhák GRIA 1 gén mutációi szerepet játszanak a szuperovulációs kezelések eredményességében. *Cushman et al.* (2013) is szintén vizsgálták az ionotróp glutamát receptor AMPA1 (GRIA1) előfordulást, illetve ezzel egybefüggően az antrális tüszők számát. Eredményeik alapján, az antrális tüszők, az mRNS mennyisége, a petesejtek minősége, az anti – Müllerian hormon (AMH) nem különbözött a termékenységi csoportok között ($p \geq 0,12$). Összességben elmondható, hogy a GRIA1 polimorfizmus létezik a hústípusú fajtáknál, de alapvetően nincs hatással a tüszőszámokra. *Hirayama et al.* (2019) által vizsgált tanulmányában már több befolyásoló tényezőt soroltak fel, mint a plazma anti-Müllerian hormon koncentrációja, az életkor, a szuperovulációs eljárások gyakorisága, a FSHR génmutáció, valamint az eltérő vérvonalak.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az első vizsgálat

3.1.1. A vizsgálat helyszíne

Vizsgálataimat az Agročat a.s. üszőtelepén végeztem, Medve községben, Szlovákiában, közel Magyarország határához (5. ábra). A telep fő célja, hogy olyan helyettesítésre szánt üszőket neveljen, amelyek képesek legyenek kiemelkedő tejtermelést produkálni, ezzel pótolva a selejtezett tehénállományt a Medzičilizie a.s., Nyárad községi tehenészetben. Az üszőtelep legfontosabb fejlesztése az embrióprogram bevezetése, amely a 2021-es évtől a gazdaság másik fő irányvonala.



5. ábra: Medve községi üszőtelep (Forrás: Google Maps)

A részvénytársaság tevékenysége 1993. április 22-én kezdődött, működését pedig az állattenyésztéshez kapcsolódó állati termék előállítás és a szántóföldi növénytermesztés határozza meg. A művelt szántóterületeik a Dunaszerdahelyi járásban helyezkednek el, ez számokban kifejezve 4 347 hektárt jelent, melyből körülbelül 1000 hektár elsődleges célja a minőségi tömegtakarmányok (szilázs, szenázs) előállítása.

3.1.2. A vizsgált állomány és a tartástechnológia bemutatása

A gazdaságos tejtermelés és üszőelőállítás alapját a kiváló genetikai háttérrel rendelkező, 681 db holstein-fríz tehén biztosítja. Az éves tejtermelés a részvénytársaságban mintegy 6,5 millió kg. Jelenleg, a tehenek átlagos laktációs tejtermelése 10 163 kg, napi átlagos tejtermelése 31,97 kg volt, 3,95 %-os átlagos tejszírral, 3,30 % átlagos tejfehérjével és 285 ezer szomatikus sejtszámmal.

Az üszőtelep pavilonos rendszerű, az állatokat nyitott (színszerű), mélyalmos istállókban helyezték el. A gazdaságokban kötetlen tartásmód jellemző. A tenyésztőket a felnevelés során legeltetik (6. ábra). Fontos hangsúlyoznom, hogy a tenyésztők esetében nem végeznek rendszeres kondíciópontozást, a testtömegmérésüket is mellőzik, annak ellenére, hogy a tenyésztésbevitel sarkalatos pontja.



6. ábra: Holstein-fríz üszők legeltetése (Forrás: a szerző saját felvétele)

A körmözést évente kétszer végzik. A telep brucellózistól, leukóizistól, tuberkulózistól mentes.

A takarmányozás csoportosan történik. A tenyésztőket hozzávetőleg azonos testtömegű és életkorú egyedekből álló csoportokra osztják, és monodietetikus takarmányban részesítik. A takarmánykiosztás RMH VSL 14 ECM típusú takarmánykiosztó kocsival történik, ennek

köszönhetően pedig a takarmányadag nem különül el, hanem komplett, azaz TMR (total mixed ratio) takarmányadagot juttatunk ki.

A szemes és szálas takarmányokat, az erjesztett tömegtakarmányokat és az almozáshoz szükséges szalmát a részvénytársaság növénytermesztési ágazata állítja elő. A premixeket, a tejpótló tápszert és a takarmány receptúrát pedig a Biomin s.r.o állítja elő.

3.1.3. Az embrióátültetés technológiája

A telepen alkalmazott embrióprogram elsődleges célja az volt, hogy megvalósítsák a wagyu szarvasmarhafajta tenyésztését. Az embrióprogram során mintegy 100 db fagyasztott embrió érkezett Csehországból és Németországból. A teljes eljárást megfelelő gyakorlattal rendelkező állatorvos végezte, kizárólag üszők esetében.

3.1.3.1. A recipiensek kiválasztásának szempontjai és ciklusuk szinkronizálása

Az embriók beültetése során az üszőknek az alábbi szempontoknak kellett megfelelniük: az életkorukat tekintve minimum 14 hónaposak, tömegük 360 – 380 kg, rendszeres ivarzást produkáltak, a nemi traktusok egészséges, valamint az embrió fejlettségi állapotához mérve az üszők is megfelelő ivari ciklusban voltak. Általánosan elmondható, hogy nagyobb esélye van az embrió megtapadásának üszőknél az egészséges emdometrium miatt.

A legfontosabb követelmény, hogy a donorral szinkronban kell lennie a recipiens egyednek, ezért a recipiensek előkészítését sárgatest-fázisban intramuszkuláris módon beadott, prosztaglandin kezeléssel biztosították. A recipiensek szinkronizálását 2 alkalommal beadott, 2 ml prosztaglandin (SUPERGESTRAN) analóggal végeztük el.

3.1.3.2. Az embriók beültetése

Az embriók beültetését az istállókban végeztük. Az előkészítés során a recipiens állatok nem részesültek a megszokottól eltérő, egyedi takarmányozásban. Az embriók beültetése 7 nappal az ivarzást követően történt, amelyet ultrahangos sárgatest kontroll előzött meg. A vizsgálat során az állatorvos megállapította a sárgatest minőségét és annak elhelyeződését. Az embrió beültetése abba a méhszarvba történt, amelyik oldali petefészken a sárgatest (CL, *corpus luteum*) található (7. ábra).

Minden esetben fagyasztott embriók beültetése történt. Az embriók 0,25 ml-es műszalmába töltve érkeztek, felolvasztásukat a műszalmák 15 másodpercre, 37 °C-os vízfürdőbe

helyezésével végeztük el. Ezt követően az állatorvos transzcervikális katéterrel, nem invazív módon, az ipszilaterális méhszarvba ültette be azokat.



7.ábra: A recipiensek sárgatest-elhelyeződésének megjelölése jelölőfestékekkel (Forrás: a szerző saját felvétele)

3.1.4. Vemhességellenőrzés, elletés technológiája

A korai vemhességvizsgálatot az üzemi állatorvos hajtja végre, melyhez rektális ultrahangot használ. Ennek köszönhetően kiszűrhetők az üres állatok és lehetőség van a petefészek-képletek diagnózisának feltárása. A vemhesség diagnosztizálásában az asszisztált reprodukciós eljárást követő 30. napon győződtek meg ultrahang segítségével, majd a vemhes állatok ismételt vizsgálatát a 60. napon hajtották végre.

A telepen nagycsoportos elletés jellemző. Külön kiemelném, hiszen takarmányozási szempontból is jelentőséggel bír, hogy a frissen ellett teheneket az ellést követően drench-kezelés alá vetik. A drench-készítménynek köszönhetően megelőzhető az ellés utáni időszakban fellépő anyagforgalmi- és ásványi anyagforgalmi zavarok kialakulásának esélye, valamint segít abban is, hogy a tejtermelés zavartalanul induljon, így kedvező hatással van a laktációs termelésére.

A tehenek ellését követően 6 nappal Mastitest próbát végeznek, ha ennek elbírálása negatív a méhvizsgálat eredményével együtt, a tehén a fogadócsoporthoz kerül.

A tehenészet szaporodásbiológiai protokollja alapján az ellést követő 2. – 3. napon, majd heti három alkalommal az involúciós vizsgálatokat rektális tapintással elvégzik. Az involúció után, az ellést követően kb. a 42. – 45. napon a teheneket ultrahangos vizsgálat alá vetik, attól függően, hogy a petefészekben milyen képletek láthatóak, PGF2 α vagy GnRH kezelést alkalmaznak.

3.2. A második vizsgálat

3.2.1. A vizsgálat helyszíne

A második vizsgálat sorozat helyszíne az Embriobos Kft. (Gábor major), amelyet 2018-ban családi vállalkozásként alapított meg Dr. Gyulay Gyula és Dr. Gyulay Gyuláné, Martonvásáron. A telephely innovációs tevékenysége a telepi körülmények közötti IVF embriók előállítása, valamint törzstenyészetükből a Blonde d' Aquitaine tenyészállatokat értékesítése. A társaság embrió, valamint mélyhűtött szaporítóanyag forgalmazásával is foglalkozik. Külön kiemelném, hogy az Agrárminisztérium engedélyével új hőtűrő szarvasmarhafajta előállításán is dolgoznak, amely képes alkalmazkodni a változó klímához.

3.2.2. A vizsgált állomány és a tartástechnológia bemutatása

A vizsgált állományt több fajtájú, magas genetikával rendelkező tenyészállat alkotja, mint például blonde d' Aquitaine, magyartarka, limousin, charolais, wagyu, melyek fő célja az embrióelőállítás (8. ábra). A tehenészeti telepen recipiens egyedeket is tartanak béranyaként, melyeket külföldről importált embriók beültetésére is felkínálnak.



8. ábra: Az Embriobos Kft. donor és recipiens egyedek (forrás: a szerző saját felvétele)

Az állatokat kötetlen módon tartják, a húsmarhaistállók mélyalmos rendszerűek, az állatokat egy oldalról nyitott, kifutóval ellátott szerfás épületekben helyezték el. A borjakat az anyjuk, esetleg dajka tehén neveli szoptatással. A nyári időszakban az állatokat legelőn tartják. A körmözést évente kétszer végzik.

A telep brucellózistól, leukózistól, tuberkulózistól mentes.

TMR-takarmányozást alkalmaznak, melynek fő komponense a kukoricaszilázs, lucernaszenázs, abrak, valamint ad libitum réti széna. Abrakként kukoricadara és gabonadara keveréket adnak az állatoknak.

Közel 100 hektár bérelt területen gazdálkodva termeli meg a gazdaság a szükséges takarmányt. A borjaknak négyhetes koruktól a tartózkodási helyükön borjúóvodát, valamint szénarácsot helyeznek el.

3.2.3. Az *in vivo* embrióelőállítás

A technológia lényege, hogy a donor állatokat a szuperovulációs kezelést követően mesterségesen termékenyítik, majd az embriókat a méhszarkak átmosásával kinyerik és azokat recipiens anyákba ültetik át.

3.2.3.1. A szuperovulációs kezelés

A csoport szuperovulációs programja a nemi ciklustól függ, lényeges, hogy a virágzó sárgatest időszakára kell a kezeléseket időzíteni. Mivel az FSH felezési ideje rövid, az optimális hormonszint fenntartása érdekében 4 napon át napi kettő injekció szükséges. A tehenek ellést követően 60 nappal kerülnek a programba.

Az *in vivo* embrióelőállítás során háromféle szuperovulációs protokollt alkalmaznak.

Az egyik módszer során a következő módon adagolják a hormonokat: 10. nap reggel és este FSH, 11. nap reggel és este FSH, 12. nap reggel és este FSH + PG, 13. nap reggel és este FSH. A mesterséges termékenyítés a 15. napon történik, 6-8 órával az ivarzást követően kettő vagy három alkalommal.

A másik módszer féle az alábbi módon történik: 5. nap reggel behelyezik az implantátumot (PRID® DELTA), 10. nap reggel és este FSH, 11. nap reggel és este FSH, 12. nap reggel és este FSH, 13. nap reggel FSH + PG, este pedig az implantátum eltávolítása. A mesterséges beondózás kettő, illetve három alkalommal, a 15. napon történik az ivarzást követő 6-8 órával később.

A harmadik módszer az egyszeri PMSG 2500 NE mennyiségben kijuttatott intramuszkuláris injekcióval történik.

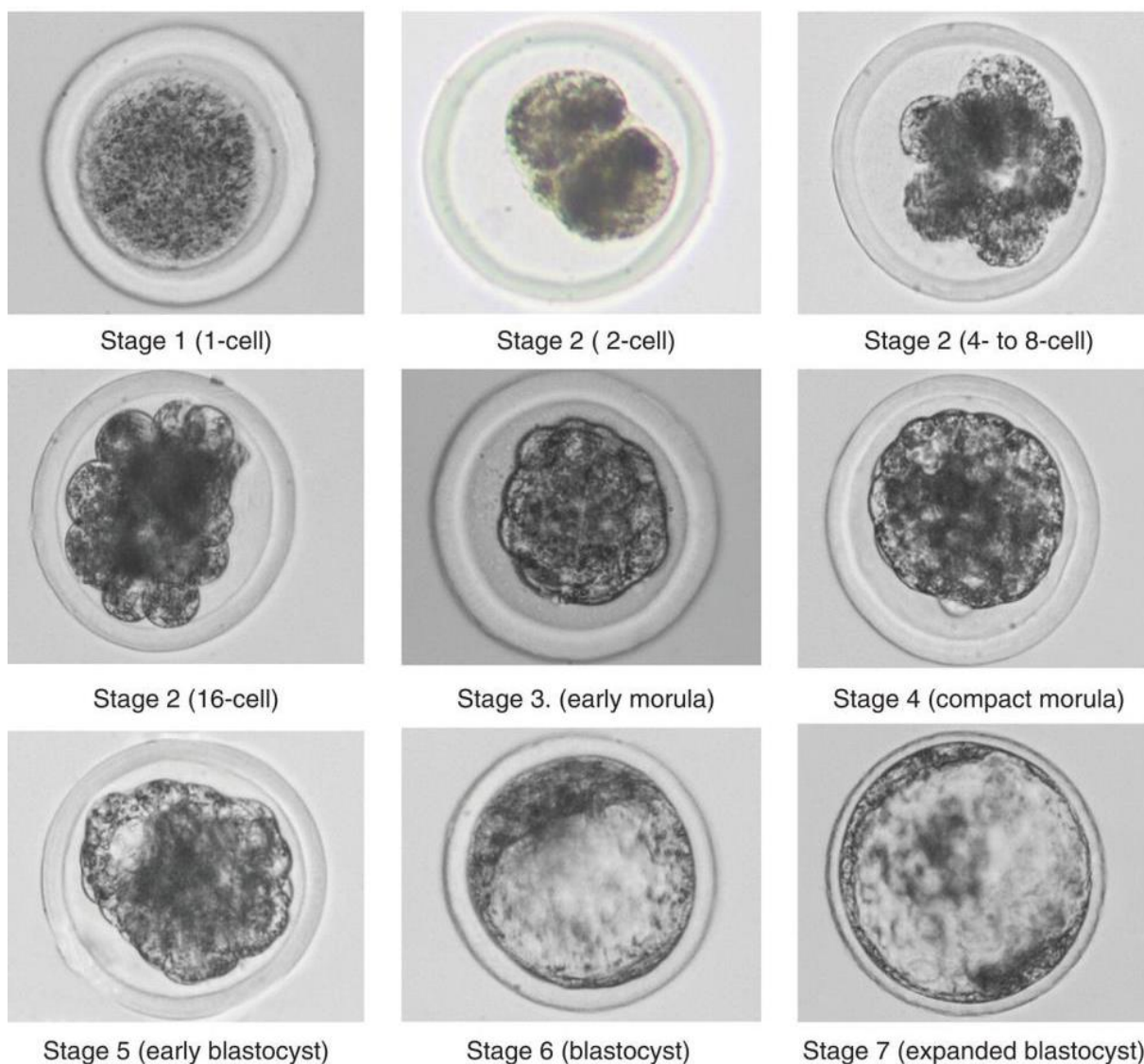
3.2.3.2. Az embriók kinyerése

Az embriók kinyerése a mesterséges termékenyítést követő 7. napon történt, amikor már az embriók nagyobb hányada a méh üregében található. Ekkor az embriók elérték a késői morula vagy korai blasztociszta stádiumot. Az embriók kimosása Foley-féle katéterrel, mandrin segítségével, sacrális régió végzett epidurális érzéstelenítés mellett történik. Az embriók kinyerését a ballonkatéteren keresztül kíméletesen beengedett mosófolyadékkal (BOVIFLUSH) végeztük, melyet 25 ml-es adagokban adagoltunk a méhszarv üregébe. A méhszarv teltségét rektálisan ellenőriztük. A folyamatot többször megismételtük, majd a mosófolyadékot egy szűrőn áramoltattuk át. Az embriószűrő lyukmérete 70 mikron, melyen a 100–110 mikron nagyságú embriók nem jutottak át.

3.2.3.3. A kinyert embriók osztályozása

A mosást követően az embriókat sztereomikroszkóppal 12x-es nagyításban kerestük a Petri-csészékbe kiöntött mosófolyadékban, majd mikropapilláris segítségével egy kisebb Petri-csészébe helyeztük át.

Az embriók vizsgálata és osztályozása a Nemzetközi Embrióátültető Szövetség (IETS) elvei alapján történt. A fejlődési stádiumot 1–8-ig kódszámokkal jelöltük, az embriók minőségét pedig 1–4-ig terjedő skálán értékeltük. Az első kategóriába a kiváló minőségű embriók tartoztak, ahol a perivitellinális tér tiszta volt, ép fénylő zona pellucidával rendelkeztek és sejtszerkezetük hibátlan volt. A másodosztályú embriók esetében már láthatóak voltak az apró sejtörmelékek a perivitellinális térben, a harmadosztályú embriókat tekintve a sejtek nagy része sérült volt, valamint jóval jelentősebb nagyságú sejtörmelék volt a perivitellinális térben, mint a másodosztályú kategóriában. A negyedik kategóriába azokat az embriókat soroltuk, amelyek jelentős mértékű degradált sejtekkel rendelkeztek (9. ábra).



9. ábra: *In vivo* előállított szarvasmarha embriók fejlődése (forrás: URL¹¹)

3.2.3.4. Az embriók mélyhűtése

Az embriókat minden esetben egyedileg, 0,25 ml ürtartalmú műszalmába töltöttük, majd 1 MOL koncentrációval rendelkező etilén–glikol oldatban dehidratáltuk és mélyhűtöttük (EFT-3002, BELTRON Instruments). A műszalmákat előhűtöttük oly módon, hogy azokat fagyasztóba tettük és a 0,5°C/min hűtési sebességet alkalmaztunk, amíg elértük –35°C-ot. Ezt követően a műszalmákat folyékony nitrogénbe (–196°C) helyeztük és tároltuk.

3.2.4. Az *in vitro* embrióelőállítás

Ahhoz, hogy megértsük magát az *in vitro* embrióelőállítás komplex folyamatát, Dr. Gyulay Gyula felhívta a figyelmemet az alábbi fogalmak jelentőségére: kinyert petesejtek *in vitro*

érlelése (*in vitro* maturation, IVM), majd ezt követően *in vitro* termékenyítése (*in vitro* fertilization, IVF), illetve a termékenyítést követő *in vitro* tenyésztése (*in vitro* culturing, IVC). Ezeket az eljárásokat alkalmazva az embriókat nevezhetjük teljes mértékben *in vitro* előállított (*in vitro* produced, IVP) embrióknak, helyesebben használva az IVMFC (*in vitro* maturation, fertilization and culture = érlelés, termékenyítés, embriók tenyésztése) embriók kifejezést.

A vizsgálatsorozatban általunk alkalmazott *in vitro* embrióelőállítás lépései a következők:

1. Petesejtek kinyerése, OPU (–1. nap)
2. Petesejtek mosása, majd érlelése (IVM), maturáció 21–24 órán át
3. *In vitro* termékenyítés, IVF (0. nap)
4. *In vitro* tenyésztés, IVC (1–7. nap)
5. Embriók bírálata az IETS elvei alapján
6. Embriófagyasztás

A kumulusz–petesejt–komplexek (COC) *in vitro* érleléséhez, termékenyítéséhez és tenyésztéséhez az IVF Bioscience Ltd. BOVINE MEDIA tápoldat sorozatát alkalmaztuk.

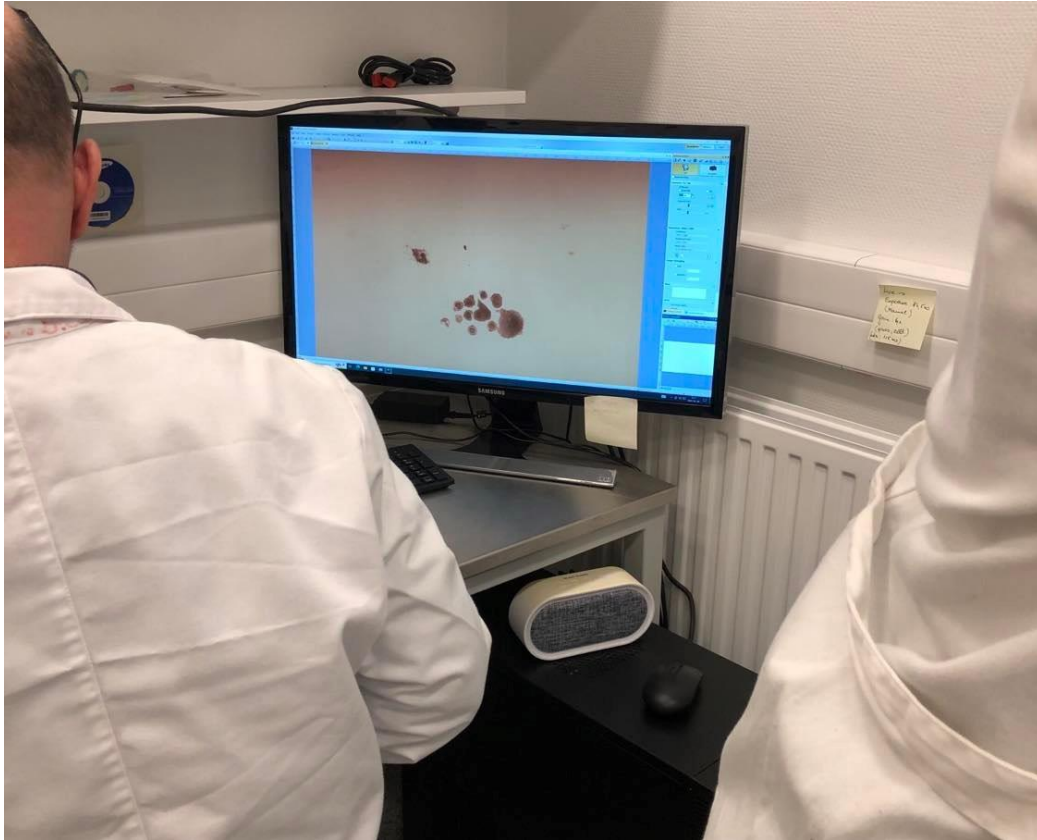
3.2.4.1. Petesejtek kinyerése

A martonvásári telepen lévő embrió–laboratóriumban történt a petesejtek 'ovum pick-up' (OPU)–módszerrel történő leszívása. A punkció végrehajtása epidurális érzéstelenítés mellett történt. A folyamat során az erre az eljárásra kialakított, a hüvelybe bevezetett transducert használtuk. A rektálisan vizsgáló kéz a petefészket a transducer végéhez közelítette, amelyből egy aspirációs tű bújik elő, melynek segítségével a tüszők leszívhatóak.

3.2.4.2. Petesejtek mosása, majd érlelése (IVM)

A további munkafolyamatokat a NAIK ÁTHK Haszonállat Embriológiai Laboratóriumában (HEL) végeztük, Dr. Bodó Szilárd, egyetemi docens vezetésével (10. ábra).

A kultiváló médiumot BSA–val, gentamicinnel, nátrium–hidrogén–karbonáttal és gonadotrop hormonokkal egészítettük ki. A petesejteket BO–IVM-ben érleltük 21–24 órán keresztül.



10. ábra: Kumulussejtekkel körülvett petesejtek (forrás: a szerző saját felvétele)

3.2.4.3. *In vitro* termékenyítés, IVF

Az általunk alkalmazott BO–SemenPrep előkészítő közegként szolgál a sperma, *in vitro* termékenyítés előtti mosásához. A fertilizáció során a petesejteket médiumba helyeztük, melynek spermium- koncentrációja $2,0 \times 10^6$ / ml.

3.2.4.4. *In vitro* tenyésztés, IVC (1–7. nap)

A fertilizációt követően az embriókat, többszöri mosást (vortex) és fertőtlenítést követően HEPES puffert tartalmazó BO–IVC médiumba helyeztük, a kultiválás 6% CO₂-t, 6% O₂-t és 88% N₂-t tartalmazó, 38,8°C hőmérsékletű termosztátban történt, relatíve magas páratartalom mellett. Az embriók ebben a médiumban fejlődnek további 6 napig. Külön kiemelném a denudálás fogalmát, mely során denudáló pipetta segítségével eltávolítjuk a petesejt kumulus sejtrétegét.

3.2.4.5. Embriók bírálata az IETS elvei alapján

Az embriók bírálata megegyezett a 3.2.3.3. fejezetben leírtakkal.

3.2.4.6. Embriófagyasztás

A 7 napos, korai blasztociszta állapotban lévő IVF – embriókat, ún. lassú fagyasztási módszerrel mélyhűtöttük. Ennek a módszernek köszönhető, hogy elég egylépcsős felolvasztást alkalmaznunk. Ez gyakorlatban pedig közvetlen, ún. direkt beültetést tesz lehetővé. A fagyasztás Freeze Control Model CL5500 segítségével történt.

4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Ahhoz, hogy ki tudjuk használni az asszisztált reprodukciós eljárások adta lehetőségeket, ismerni kell a folyamat teljes módszertanát, a különböző protokollokat, illetve az eredményességet befolyásoló tényezőket!

Ahogy korábban írtam 100 db fagyasztott, 1. osztályú embrió érkezett Csehországból (50 db), valamint Németországból (50 db). 1 db műszalma a munkafolyamat során megsérült. Az embriókhoz kapcsolódó certifikátokból nyertem ki a szükséges adatokat, amelyet a Slovenské Biologické Služby bocsátott a rendelkezésemre. A donor vagyis szarvasmarhák mosási eredményeinek adatait a 4. táblázat tartalmazza.

Donor megnevezése	Összes embrió	Degenerált embriók	Frissen beültetett	Fagyasztott embriók	Fejlettségi állapot	Származás
261969953	17	3	2	12	morula	Csehország
288969953	21	0	0	21	morula	Csehország
288969953	17	2	3	12	morula	
380675953	17	3	2	12	korai blasztociszta	Csehország
444414953	12	1	0	11	morula	Csehország
444417953	20	7	3	10	korai blasztociszta	Csehország
Aizatko	13	1	0	12	blasztociszta / morula	Németország
Aizatko	18	3	3	12	blasztociszta / morula	Németország
Isi WG029	12	1	1	10	morula/ korai blasztociszta	Németország
Isi WG029	10	0	0	10	morula/ korai blasztociszta	Németország
Yasuzana WG040	29	0	3	18	korai blasztociszta	Németország
Isi WG044	28	4	3	21	korai blasztociszta	Németország
Fukutsura WG093	13	1	2	10	blasztociszta / korai blasztociszta	Németország
Itomoritaka	13	5	1	7	blasztociszta / korai blasztociszta	Németország

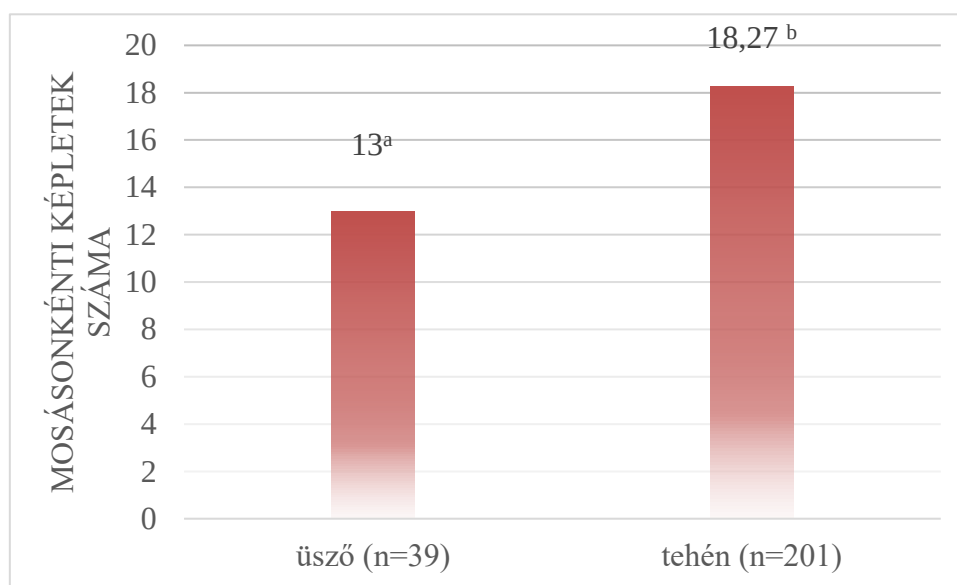
4. táblázat: A wagyu donorok mosási eredményei

4.1. A donor állat kora

Az embrióátültetésben résztvevő donor állatok tehenek és üszők voltak. A rendelkezésemre álló adatok alapján a mosásokból (n=240) az üsző donorok aránya (16,25%).

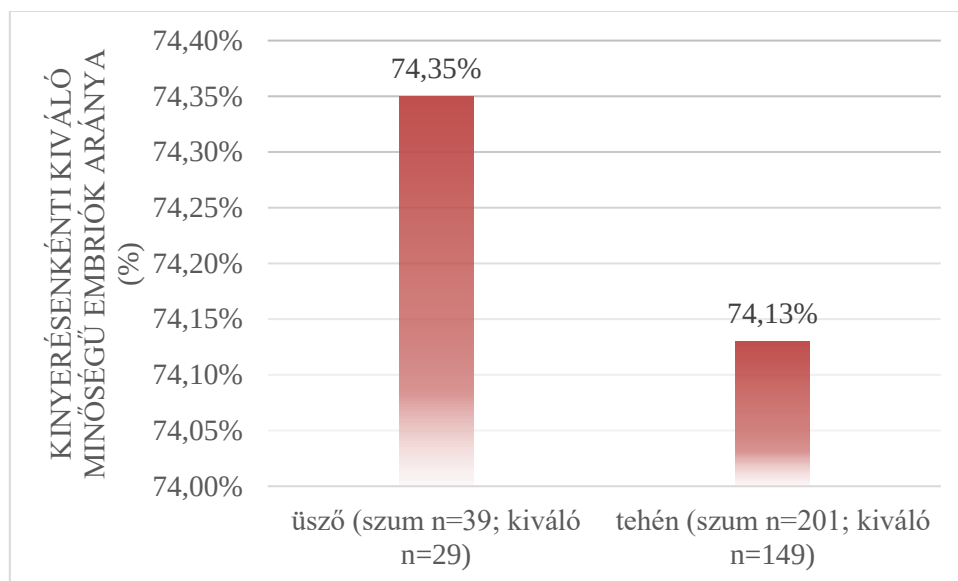
Üszőt akár ivarérettől is be lehet vonni az embrió-programokba, viszont az üsző donorokon végzett MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) eljárás kevésbé eredményes, mint tehenek esetében. Az üszők esetében az első szuperovuláltatás és embriókinyerés ideje a 10 hónapos kor, melynek következtében a vemhesített üsző az első ellését követően, nem fog az első laktációjában károsodást szenvedni (Ax *et al.*, 2005).

Az általam vizsgált eljárásokban a mosásonként kinyert embriók átlaga 17,14. Abban az esetben, ha külön vizsgáljuk az életkort, külön vetítve a tehenekre és üszőkre, jól látható, hogy a kornak statisztikailag bizonyított hatása van a mosásonkénti képletszámok elérésében ($p < 0,01$). Elemzésem során a tehenektől 18,27 ($\pm 6,10$) képletet nyertek ki mosásonként, amely 5,27-dal több embriót jelent, mint üszők esetében (11. ábra).



11. ábra: Az embriókinyerésenként nyerhető képletek száma a kor függvényében

Ennek tükrében, vizsgáltam, hogy találok-e a kimosott embriók minőségében (üsző v. tehén) valamilyen eltérést. Eredményeim arra következtettek, hogy a kimosott embriók minőségének tekintetében nem találtam szignifikáns különbséget a két csoport között ($p>0,05$) (12.ábra).



12. ábra: A kiváló minőségű embriók aránya üsző, illetve donor tehén esetében (n=240)

4.2. Szuperovulációs kezelés

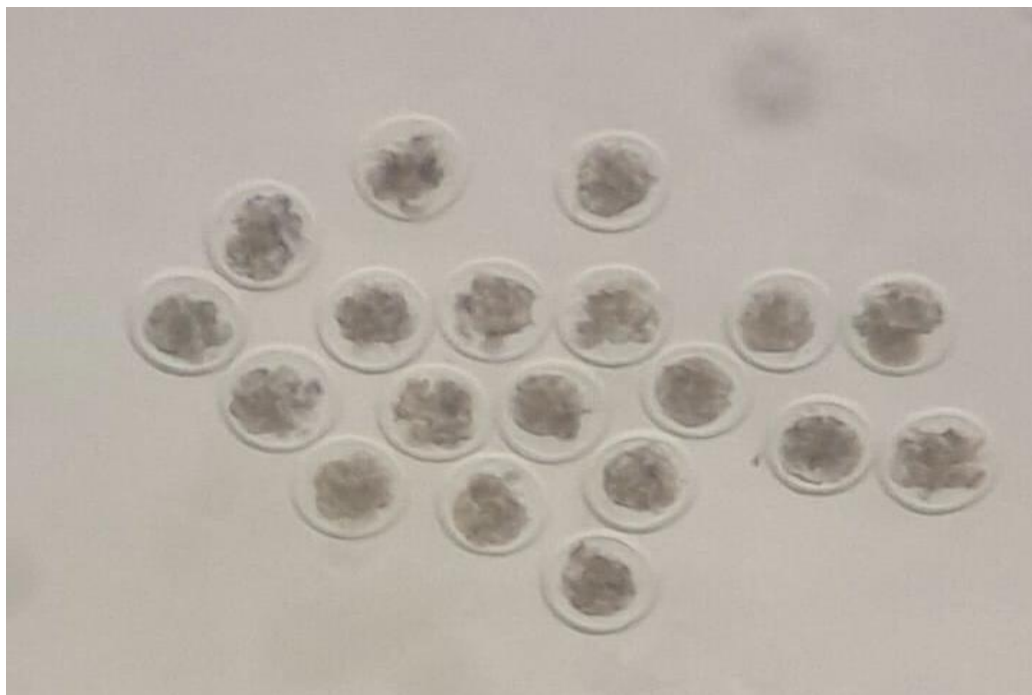
A szarvasmarhák szuperovulációjának célja, hogy a donor állat petefészken minél nagyobb számban történjen meg az ovuláció, így az *in vivo* termékenyítést követően minél nagyobb számú átültethető embriót nyerhetünk ki. A legnagyobb hátránya a szuperovulációnak, hogy kiszámíthatatlan. Kiszámíthatatlan, hiszen az állatok nagy egyedi érzékenységgel reagálnak a különböző hormonkezelésekre, ezzel gátolva az ET programok hatékonyságát és jövedelmezőségét egyaránt.

A legnagyobb probléma a wagyu fajta esetében, hogy nem sokat tudunk arról, hogy a szuperovulációs kezelésre milyen embrió-produktummal képes reagálni. Japánban a tehenek szuperovulációs kezelésében PMSG-t vagy FSH-t alkalmaznak. A PMSG-re jellemző a hosszú felezési idő, emeli az ösztrogénszintet, ezáltal pedig hátrányosan befolyásolja a méh környezetét, ami az embriók minőségi romlását eredményezi (Sugano és Shinogi, 1999).

A fajta kiszámíthatatlanságát jól bizonyítja az Embriobos Kft.-nél történő kísérletünk, amely során a wagyu tehenet 2 alkalommal PMSG-vel szuperovuláltattuk. A PMSG-vel minden esetben csak egyszer kezeltünk, mely során 2500 NE-et adtunk intramuszkulárisan. A PMSG kezelést követően, 2 nap múlva PG-t adtunk, melynek köszönhetően a sárgatest leoldódik, és

létrejön a petesejtek tömeges szuperovulációja. A PG kijuttatását követően a második nap történt a mesterséges termékenyítés, majd ezt követően a 7. napon az embriók kinyerése.

Az első embriókinyerés 2023.01.31.-én történt, mely során 19 darab embriót mostunk ki, melyek közül valamennyi morula stádiumú volt; minőségi tulajdonságuk alapján 10 darab kiváló és 9 darab gyenge minőségű volt köztük (13. ábra).



13. ábra: Wagyu szarvasmarha embriók (forrás: szerző saját felvétele)

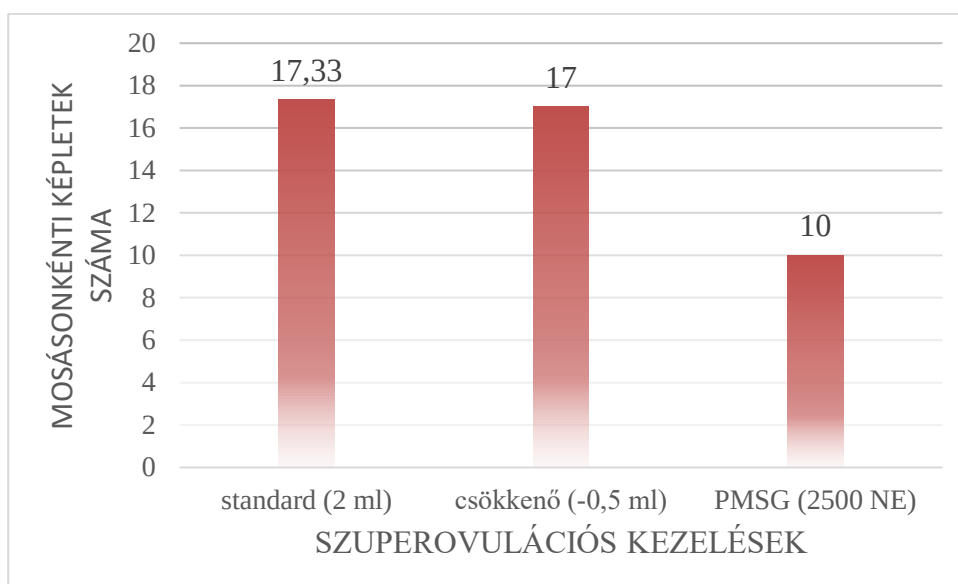
A második embriókinyerés 2023.04.01-én történt, ugyanazzal a módszerrel. Ebben az esetben csupán egy darab morula fejlettségű embriót találtunk, amely kiváló minősítéssel rendelkezett.

Jól látható, hogy a PMSG-vel történő szuperovulációs kezelés egyik esetben megfelelő embrió-produktummal szolgált, míg második alkalommal szinte eredménytelen volt.

A Csehországból vásárolt embriók a Wagyu Farm Müller telephelyéről származtak, Pardubicéből, akik több mint 10 éve elkötelezettek a wagyu ET mellett. Standard (2,5 ml) szuperovulációs kezelést alkalmaznak (1. nap: reggel és este 125 NE FSH+ 125 NE LH; 2.nap: reggel és este 125 NE FSH+ 125 NE LH; 3.nap: reggel és este 125 NE FSH+ 125 NE LH+ PG; 4.nap: reggel és este 125 NE FSH+ 125 NE) majd ezt követően 4 alkalommal inszeminálnak. A 6 mosás embrió-produktum átlaga 17,33 darab volt, melyek 75%-a kiváló minőségű, azaz fagyasztásra alkalmas.

Németországból származó embriók Marsbergből (Tierärztliche Gemeinschaftspraxis) származnak, akik csökkenő (-0,5 ml) szuperovulációs kezelést alkalmaztak (1.nap: reggel és este 150 NE FSH+ 150 NE LH; 2 nap: reggel és este 125 NE FSH+ 125 NE LH; 3. nap: reggel és este 75 NE FSH+ 75 NE LH+ PG; 4. nap: reggel és este 50 NE FSH+ 50 NE LH) az embrió-előállítás során. A 8 embriókinyerés átlaga 17, az embriók 73,5 %-a kiváló minősítéssel rendelkezett.

A szuperovulációs kezelések közötti különbségek statisztikai értékeléséhez egytényezős varianciaanalízist végeztem LSD (least significant difference) teszt segítségével. Az eltérő kezelések a mosásonként kinyert képletek számát tekintve nem különböztek szignifikáns mértékben ($p>0,05$) (14. ábra)



14. ábra: Az alkalmazott szuperovulációs kezelések és mosásonkénti képletek száma

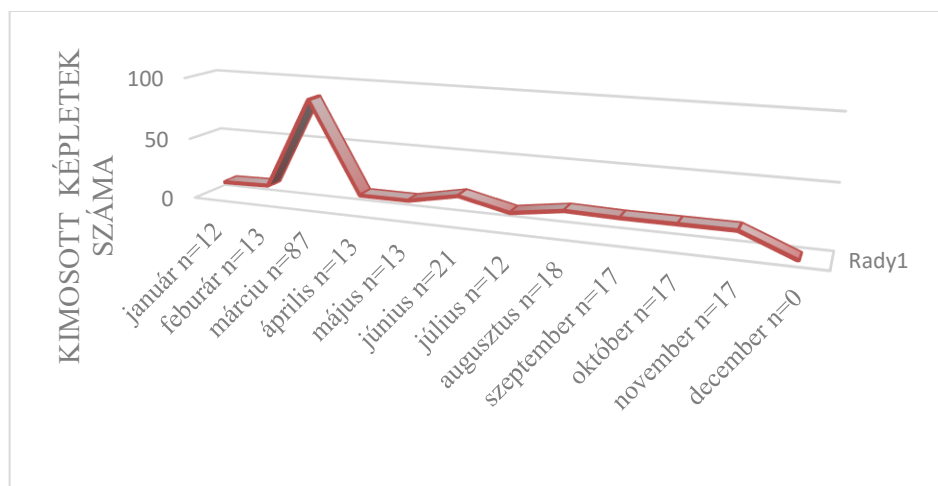
4.3. Az embriókinyerés évszak hatása

Összességében kijelenthető, hogy az évszak jelentős befolyásoló tényező a szaporodásbiológiai mutatószámok alakulásában. Telepi körülmények között a veszteségek főleg a nyári és téli hónapok során lépnek fel.

Ealy et al. (1993) szerint a korai fejlettségi állapotú embriók rendkívül érzékenyek a hőstresszre, amelyet a méh hőmérsékletének emelkedése eredményez.

A téli időszak embriókinyerések gátló tényezője sok esetben a nem megfelelő mosástechnikai eljárások alkalmazása, a nem megfelelő hőmérsékletű médiumok használata. Ebben az időszakban a legnagyobb kihívást a mosófolyadék optimális hőmérsékletének biztosítása,

valamint az embriókinyerést követően a mosófolyadékban lévő embriók optimális hőmérsékleten tartása jelenti. Az embrió-kinyerések eredményességét havi bontásban ismertetem (15. ábra).



15. ábra: Az embrió- kinyerések (n=240) eredményeinek havi megoszlása

Munkám során hasonló tendenciát kaptam, mint, *Gomes et al.* (2019), akik szintén wagyu tehenek esetében vizsgálták az évszakhatást, mint környezeti tényezőt az embriómosások eredményességében. A wagyu donor tehenek mosásonkénti életképes embriók száma és az évszak hatása között nem találtam szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).

4.4. A recipiens holstein-fríz egyedek eredményessége

Fontos megjegyeznünk, hogy az embrióátültetés egyik legfontosabb kritériuma a recipiens állomány minősége és mennyisége. Vizsgálataim során 10 embrióbeültetésből származó adatsort (n=99) elemeztem. Az embriótranszfereket 2021 és 2022 évében hajtották végre. Az eredmények statisztikai értékelését független mintás t-próbával, illetve χ^2 - próbával végeztem el az IBM SPSS Statistics for Windows v.20.0 szoftver segítségével.

4.4.1. A sárgatest helye és átmérője

Nogueira et al. (2012) szerint a sárgatest (CL) jelenléte döntő követelmény lehet a recipiens kiválasztása során. Vizsgálatuk alapján elmondható, hogy a vemhesség valószínűségét nagyban befolyásolja a CL átmérője, hiszen nagyobb vemhesülést értek el a nagyobb átmérőjű ($2,03 \pm 0,41$) sárgatesttel rendelkező recipienseknél. Ennek háttérében az áll, hogy a nagyobb méretű CL magasabb P_4 szintet tart fent, ezzel elősegítve az embriók túlélését.

Ennek okán, a recipiens egyedek esetében vizsgáltam, hogy a CL elhelyezkedése (jobb vagy bal petefészek) és átmérője milyen módon befolyásolja a vemhesülési százalékot (5. táblázat).

Az állatorvos a beültetést megelőzően feljegyezte a sárgatest helyét és annak átmérőjét, melyet két kategóriába soroltunk (>20 mm, <20 mm).

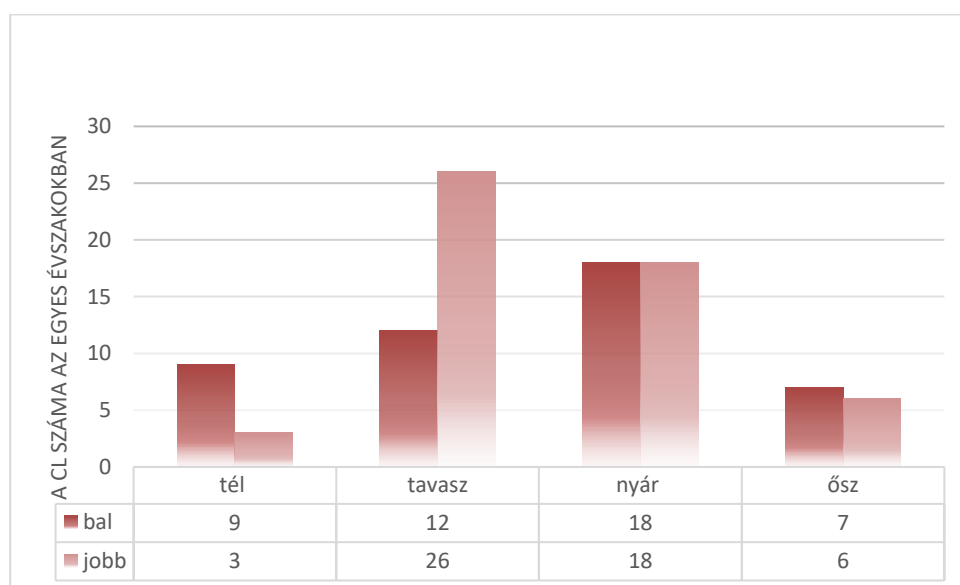
CL helye	n (egyedszám)	Vemhesülési %	CL átmérője	n (egyedszám)	Átlag (%)
Bal oldal	46	26	>20 mm	56	30
Jobb oldal	53	38	<20 mm	43	35

5. táblázat: A CL helyének és átmérőjének hatása a vemhességi százalékra

A sárgatest helyének nem volt statisztikailag igazolható szignifikáns ($p > 0,05$) hatása a vemhesülés eredményességére, ugyanakkor elmondható, hogy az embriók megtapadása a jobb oldali sárgatest esetében nagyobb (38%) százalékban fordult elő.

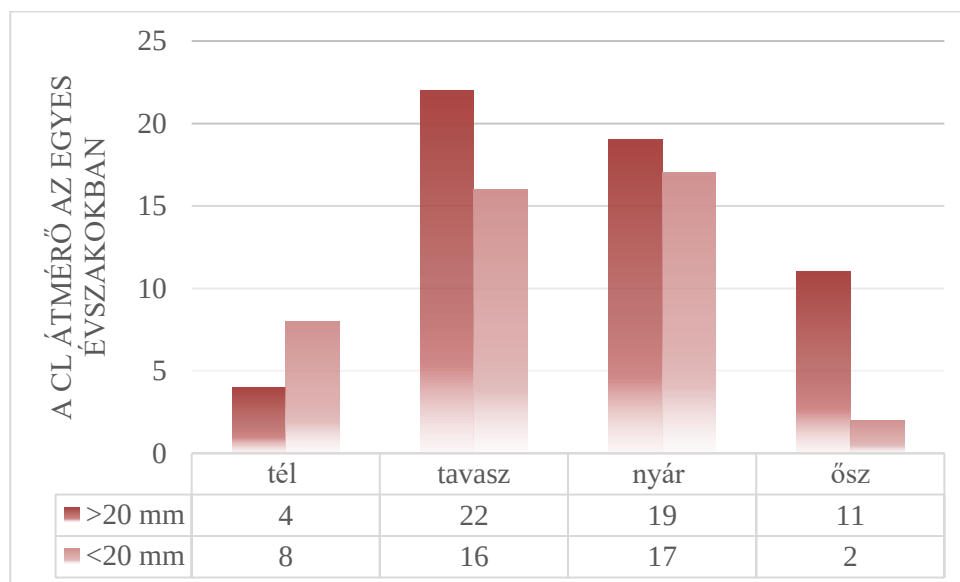
Ugyanez igaz a CL átmérőre, itt sem találtam érdemi különbséget ($p > 0,05$), viszont 5%-kal magasabb volt a vemhesülési arány a kisebb átmérővel rendelkező recipienseknél. Ellentmondásos módon, de a munkám során kapott eredmény *Baruselli et. al* (2010) feltételezésével megegyezik, mely szerint nem mutat szoros összefüggést a CL nagysága és a vemhesülési arány.

További vizsgálataimban részletesen elemeztem a CL helyének az évszakonkénti megoszlását. Összességében elmondható, hogy tavasszal a vártnál több sárgatest volt a jobb oldalon, télen viszont jóval kevesebb (16. ábra). Az elvárt és a ténylegesen megfigyelt oldal eltérései egyes évszakokban (tél, tavasz) szignifikánsak ($p < 0,01$).



16. ábra: A CL helyének a szezonális összefüggései

Ugyanezzel a próbával tanulmányoztam, hogy a CL mérete milyen összefüggésben áll az évszakokkal. Télen, a többi időszakhoz viszonyítva a kisebb, ősszel pedig a nagyobb CL átmérővel rendelkező recipiensek aránya (tendenciaszerű összefüggés, $p < 0,1$) magasabb (17. ábra).



17. ábra: A CL átmérő szezonális összefüggései

4.4.2. A recipiens kora

Az egyik célkitűzésem volt megvizsgálni, hogy a recipiens életkora hatással van-e az embriók megtapadására. Eredményeim az életkorban nem mutatnak szignifikáns eltérést ($p > 0,05$), viszont a fiatalabb állatok esetében nagyobb vemhesülési arányt értünk el (6. táblázat).

Vemhesülés	n (egyed)	Átlag	Szórás
Vemhesült	32	467,88	±18,66
Nem vemhesült	67	473,46	±13,23

6. táblázat: Az életkor hatása a vemhességi százalékra

4.4.3. Az eltérő fejlettségi állapotú embriók megtapadása

A szuperovulációs eljárások hátránya, hogy a különböző hormonkészítmények alkalmazásakor a donor állatok egyedi érzékenysége figyelhető meg, az eltérő embriószám mellett a képletek fejlődési stádiuma is változó. Az általam tanulmányozott összes mosást a 7. napon végezték el,

ezzel szemben az embriók fejlődési stádiuma között 2 napos eltérést figyeltem meg. Az összes embrió minősítése kiváló. Mint tudjuk, a morula (4.), korai blasztociszta (5.) és blasztociszta (6.) stádiumú embriók a legalkalmasabbak a mélyhűtésre, bár több szakirodalom bizonyította, hogy a morula fejlettség ellenállóbb a mélyhűtéssel szemben, mint a blasztociszta.

Megvizsgáltam, hogy a különböző fejlettségű fagyasztott embriók beültetését követően milyen szerepet játszanak a vemhesülés eredményességében. Az eredmények statisztikai elemzéséhez χ^2 próbát használtam. Elmondható, hogy a kapott eredményeim között nincs statisztikailag igazolt különbség ($p > 0,05$), ugyanakkor megjegyzem, hogy a korai blasztociszta állapotban beültetett embriók esetében volt a legjobb a vemhesülés (7. táblázat).

Stádium	Vemhesülési %	Szórás
4.	26	$\pm 0,44$
5.	39	$\pm 0,49$
6.	33	$\pm 0,48$

7. táblázat: Az eltérő fejlettségű beültetések eredményessége

4.4.4. Évszakok hatása az embrióátültetés eredményességére

Ono et al. (2016) a wagyu embriók átültetése során a recipiens minőségére és az évszakok hatására hívja fel a figyelmet a vemhesülési arány szempontjából. A recipiens teheneknél a vemhesülés aránya alacsonyabb volt ($p < 0,05$) nyári időszakban, mint tavasszal és télen. Az üszőknel azonban nem tapasztaltunk különbséget vemhesülésben az évszakkal összefüggésében.

Az egyes évszakokat, mint befolyásoló tényezőt, egytényezős varianciaanalízissel (LSD-teszt) vizsgáltam. Az évszakhatás elemzése során statisztikailag igazolható különbséget találtam ($p = 0,001$). Az évszakok közül a nyári és az őszi eredmények a legjobbak, míg tavasszal a legrosszabb a vemhesülési arány, de a téltől szignifikánsan nem különbözik (8. táblázat).

Évszak	Átlag	Szórás
Tél	0,25 ^{ab}	$\pm 0,45$
Tavaszi	0,13 ^b	$\pm 0,34$
Nyár	0,47 ^a	$\pm 0,50$
Ősz	0,49 ^a	$\pm 0,51$
Összes	0,32	$\pm 0,47$

8. táblázat: Az embrió-beültetések eredményei az egyes évszakokban (n=99)

4.5. Születési eredmények

Az első embrióátültetésből származó wagyu üszőborjú 2022. január 24.-én született meg. A 2021-ben végrehajtott embrióátültetésből a tavalyi év folyamán 4 üsző és 6 bikaborjú született, egyik bikaborjú azonban farfekvés miatt elléskor elhullott.

A 2022-ben végrehajtott embrióátültetésből az idei évben eddig 17 darab wagyu borjú született, ebből 9 db üszőborjú, valamint 8 db bikaborjú. Azonban az egyik bikaborjú 54 napos korában elhullott. A kézirat készítésekor az állatok életkora 1 hét és 15 hónap közötti.

4.6. IVF- program

A szakdolgozat elkészítése során volt alkalmam közelebbről is megismerni az *in vitro* szarvasmarha-embrióelőállítás módszerét. Annak ellenére, hogy a donor egyedek nem wagyu fajtájú állatok voltak, érdemesnek tartom közölni az Embriobos Kft. "Etyeki projekt" eddigi eredményeit, hiszen az eljárás illik a szakdolgozat által körüljárt téma, a telepi asszisztált reprodukciós eljárások közé.

A kumulusz–petesejt–komplexeket holstein-fríz tehenekből nyertük ki. Összességében 50 darab ép petesejtet sikerült kinyerünk, amelyek körül több rétegű, ép kumulusz réteg volt látható, ezek megfeleltek a további laboratóriumi tenyésztésre.

A petesejteket semleges kémhatású BO–HEPES-IVM-ben 38,8 °C mellett érleltük 21–24 órán keresztül.

A fagyasztott szexált spermát 37 °C-on 30 másodperc alatt steril vízben felolvasztottuk. Az általunk alkalmazott BO–SemenPrep előkészítő közegként szolgál a sperma, *in vitro* termékenyítés előtti mosásához, majd a spermát Percoll grádiensben centrifugáltuk. Az eljárás során az optimális cél eléréshez ismernünk kell a spermium/ml koncentrációt, amelyet mikroszkóppal vizsgáltunk. A normál műszalmának a szabvány szerint kötelezően 6–7 millió életképes spermiumsejtet kell tartalmaznia, míg az ivardeterminált műszalmában kötelezően ez a szám 2 millió. Azonban a legnagyobb probléma az ivardeterminált spermával, hogy sok esetben még az 1 milliót sem éri el az életképes sejtek száma.

A fertilizáció során a kapacitált ivarsejteket az érett petesejtekkel együtt BO-IVF médiumba helyeztük (24 óra). Másnap a petesejteket körülvevő kumuluszsejteket másfél perces vortexeléssel távolítottuk el, majd denudáló pipetta segítségével letoltuk a kumulusz sejteket.

Ezt követően HEPES puffert tartalmazó BO-IVC médiumba helyeztük, a kultiválás 6% CO₂-t, 6% O₂-t és 88% N₂-t tartalmazó, 38,8°C hőmérsékletű termosztátban történt, relatíve magas páratartalom mellett, ebben fejlődnek további 6 napig. Az embrióbírálat a 7. napon történt.

Részletes eredményeinket a 9. táblázat tartalmazza.

A termékenyítés ideje	Terméketlen petesejt	Megtermékenyült petesejt
2022.10.06.	1 db	0 db
2022. 10.06.	3 db	0 db
2022.10.24.	6 db	0 db
2022.11.16.	0 db	1 db
2023.02.27.	14 db	0 db
2023.02.27.	6 db	0 db
2023.03.27.	11 db	4 db
2023.03.27.	3 db	1 db

9. táblázat: Az *in vitro* termékenyítés eredményei

A 9 IVF-program adatait elemezve elmondható, hogy az eljárás hatásfoka alacsony, hiszen 50 petesejtből összesen 6 termékenyült, ami 12 %-os sikerességet mutat. Ezekből az *in vitro* kultiváció során 1 morula, 4 korai blasztociszta valamint 1 blasztociszta fejlődött. Minőségüket tekintve 2 db kiváló (IETS 1), 2 db jó (IETS 2) és 2 db közepes (IETS 3). A két darab kiváló minőségű IVF-embriókat ún. lassú fagyasztási módszerrel mélyhűtöttük, ami lehetővé teszi a direkt módszerrel történő embrióbeültetést. A két darab jó és két darab közepes minőségű embriókat frissen recipiensekbe ültettük, azonban vemhességet nem értünk el.

5.KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Összességében elmondható, hogy az embrióátültetés sikerességét az eljárásban résztvevő donorok és recipiensek biológiai sajátosságai nagyban befolyásolják. Joggal állíthatom, hogy a wagyu szarvasmarha fajta kiváló anyai típusú, kiváló embrió-produktummal jellemezhető. A tehén wagyu donoroktól több embrió nyerhető ki (5,27; $p < 0,01$), mint üszőktől, ellenben a kimosott embriók minőségének tekintetében nem találtam szignifikáns különbséget a két csoport között ($p > 0,05$).

Annak ellenére, hogy az embriótranszfer program nem egy új asszisztált reprodukciós eljárás, még mindig a szuperovulációs kezelés a legérzékenyebb pontja, hiszen a résztvevő donorok biológiai sajátosságát nem tudjuk befolyásolni. Munkám során lehetőségem volt vizsgálni, hogy a különböző hormonkezelésekre a wagyu donorok milyen módon reagáltak, viszont az eltérő kezelések a mosásonként kinyert képletek számát tekintve nem különböztek szignifikáns mértékben ($p > 0,05$). Mindezek mellett fontos hangsúlyoznom, hogy az FSH-val alkalmazott szuperovuláltatások rendszeres időközönként biztosabb embrió-produktummal szolgáltak, míg a PMSG rövid időn belüli alkalmazása gyengébb reakciót eredményezett. Ennek ellenére szem előtt kell tartanunk, hogy egy komplett FSH-kezelés kb. 150 000 Ft kiadással jár, míg az egyszeri PMSG egyszeri kijuttatása mindössze 5000 Ft.

A wagyu donor tehenek mosásonkénti életképes embriók száma és az évszak hatása között nem találtam szignifikáns különbséget ($p > 0,05$), ez feltehetőleg annak is köszönhető, hogy a wagyu ridegtartási körülmények között tenyésztett fajta.

A recipiens holstein-fríz üszők sárgatest (CL) helyének (jobb vagy bal petefészek) nem volt statisztikailag igazolható szignifikáns ($p > 0,05$) hatása a vemhesülés eredményességére, ugyanez igaz a CL átmérőre, ahol szintén nem találtam érdemi különbséget. Eredményeim az életkorban sem mutattak szignifikáns eltérést ($p > 0,05$).

Vizsgáltam, hogy a különböző fejlettségű fagyasztott embriók beültetését követően milyen szerepet játszanak a vemhesülés eredményességében, viszont a kapott eredményeim között nincs statisztikailag igazolt különbség ($p > 0,05$), ugyanakkor megjegyzem, hogy a korai blasztocisza állapotban beültetett embriók esetében volt a legjobb a vemhesülés.

Az évszakhatás elemzése során statisztikailag igazolható különbséget találtam ($p = 0,001$). Az évszakok közül a nyári és az őszi eredmények a legjobbak, míg tavasszal a legrosszabb a vemhesülési arány, de a téltől szignifikánsan nem különbözik.

Véleményem szerint az ET programban elért alacsony vemhesülési százalék (32%) többek között a recipiens egyedek minőségére és mennyiségére is visszavezethető. Szakmai szemmel tekintve pedig a takarmány minőségére és a nyalósó hiányára külön kitérnék, hiszen az ásványi anyagok fontos szerepet játszanak az immunfrakciókban, a növekedésben és a reprodukcióban.

A japán wagyu a világ legdrágább marhahúsát adó szarvasmarhafajta. Úgy gondolom, hogy a rendelkezésemre álló adatmennyiségből nehéz messzemenő következtetéseket levonni, hiszen európai viszonylatban is nagyon szűk körben ismert. Nem csak a hús ára kiemelkedően magas, hanem a wagyu embrióké is – egy wagyu embrió ára 600–900 € között mozog. Tehát a további embrióátültetési eljárások jövőbeni alkalmazását a felvidéki gazdaság pénzügyi helyzete nagyban befolyásolja.

Munkám során nagy örömömről szolgált, hogy valamelyest betekintheztem az *in vitro* szarvasmarha embrió-előállításba is, hiszen Magyarországon és Szlovákiában is kevesen foglalkoznak ezen technika alkalmazásával. Egyrészt ennek oka az, hogy az eljáráshoz szükséges eszközök nagyon drágák, illetve a saját vizsgálatomban is bemutatott ivardeterminált spermával történő fertilizációval nehezebb feladat az embrió-előállítás (12%). Tudjuk azt, hogy mesterséges termékenyítés szexált spermával már jól bevált módszer a holstein-fríz üszők esetében. Úgy gondolom, hogy az *in vitro* előállításban is jelentősége lehet, nemcsak tejelő állományok, hanem hústípusú állományok esetében is, hiszen vegyük példának az általam vizsgált wagyu fajtát, ahol a nőivarú egyedek húsminőség és márványozottság szempontjából jóval értékesebbek.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM JEGYZÉKE

- An, L.- Ling, P.P- Zhu, X.- Liu, Y.- Zhang, F.- Ma, X.- Xu, B.- Wang, Y.- Du, Z.- Yang, L.- Xue, F.- Bella, A.- Presicce, G. A.- Du, F. (2016): Succesful Vitrification of *in vivo* embryos collected from superovulated japanese black cattle (wagyu). *Reproduction in Domestic Animals*. 51: 255-261.
- Ax, R.L.- Armbrust, S.- Tappan, R.- Gilbert, G.- Oyarzo, J. N.- Bellin, E.- Selner, D.- McCanley, T. C. (2005): Superovulation and embryo recorvery from peripubertal Holstein heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 85 (1-2). 71-80.
- Baruselli, P.S.- Ferreira, R.M.- Sales, J.N.S.- Gimenes, L.U.- Sá Filho, M.F.- Martins, C.M. (2011): Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. 76. 1583-1593.
- Batista, E. O.S.- Guerreiro, B.M.- Freitas, B. G.- Silva, J.C. B- Vieira, L. M. - Ferreira, R. M.- Rezende, R.G.- Basso, A.C.- Lopes, R.N. V. R.- Rennó, F.P. (2016): Plasma anti- Müllerian hormone as predictive endrocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embyro produczion. *Domest. Anim. Endocrinol.* 54: 1-9.
- Besenfelder, U.- G. Brem, V.- Havlicek, V. (2020): Enviromental impact on early embryonic development in the bovine species. *Animal*. 14(S1): 103-112.
- Betteridge, KJ. (1981): An historical look at embryo transfer. *J Reprod Fertil*, 62:1-13.
- Betteridge, K.J. (2003): A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci*, 79:203-244
- Bo, G.A.- Mapletoft, R. J. (2013): Strategies for donor and recipient selection, treatment, and management. In: *Proceedings American Embryo Transfer Association*, Chamoaign, IL. 16-24.
- Bo, G.A.- Mapletoft, R.J. (2020): Super stimulation of ovarian follicles in cattle: gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150: 353–359.
- Brackett, B. G.- Bousquet D. (1982): Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 1982. 27.147-158.
- Choudharyn K.- Kavya K.- Jerome A.- Sharma R. (2016): Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*.9: 388-395.
- Cseh S.- Vass N.- Brydl E.- Jurkovics V.- Solti L.- Faigl V. (2012): Juh embrióátültetés aktuális kérdései és lehetőségei. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 2012. 61. 3. 271- 277.
- Cseh S.- Bodó Sz.- Vass N. (2019): Levél a szerkesztőséghez. A juh embrióátültetési eljárás felhasználása egy új fajta, a fehér suffolk hazai honosítása érdekében. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 141:1. 63-64.
- Csehy S.- Dohy J. (2003): Asszisztált reprodukciós technikák (art) a hazai állattenyésztési gyakorlatban. *Történeti áttekintés, Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1.3-15.

Cushman, R. A.- Miles, J. R.- Rempel, L.A.- McDaniel, T. G.- Kuehn, L.A.- Chitko-McKown, C.G.- Nonneman, D.- Echternkamp, S. E. (2013): Identification of an ionotropic glutamate receptor AMPA₁/ GRIA₁ polymorphism in crossbred beef cows differing in fertility. *J. Anim. Sci.* 91(6): 2640-6.

Das, D. N.- Paul, D.- Mondal, S. (2022): Role of biotechnology on animal breeding and genetic improvement. In: *Emerging issues climate smart livestock production*. Academic Press. 317-337.

Du, F.- Ma, X.- Xu, Wang, Y.- Li, Y.- An, Y.- Li-An, L.-Y.- Yang-Pressice, G. A. (2014): Japanese black (wagyu) cattle multiple- ovulation embryo transfer: follicle-stimulating hormone source in a case study in South China. *Reproduction, Fertility and Development*. 27(1): 163-164. 2899-2905.

Ealy, A. D.- Drost, M.- Hansen, J. P. (1993): Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows. *Journal of Dairy Science*. 76:10.

Ferré, L. B.- Kjelland M. E.- Strobec, L. B.- Hyttel, P.- Mermillod, P.- Ross, P.J. (2020): Review: Recent advances in bovine vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*. 14 (S5): 991- 1004.

Gad, A.- Hoelker, M.- Besenfelder, U.- Havlicek, V.- Cinar, U.- Rings, F.- Held, E.- Dufort, I.- Sirard, M. A.- Schellander, K.- Tesfaye, D. (2012): Molecular Mechanisms and Pathways Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and Vitro Culture Conditions. *Biology of Reproduction*. Volume 87, Issue 4. 100: 1-13.

Gardner, D. K. (2008): Dissection of culture media for embryos: The most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility and Development*. 20: 9-18.

Gotoh, T.- Olavanh, S.- Shiota, M. (2011): Relationship between myofiber type and fatty acid composition in skeletal muscles of Wagyu and Holstein cattle, In: *Proceeding of 57th International Congress of Meat Science and Technology*. 2011 August 8-12. Ghent, Belgium.

Gotoh, T.- Mishimura, T.- Kuchida, K.- Mannen, H. (2018): The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects- A review. *Asian- Australas J Anim Sci*. Vol. 31, No 7:933-950. 2018.

Gomes, G.C.- Rae, D.O.- Block, J.- Risco, C. A. (2019): Superovulation and embryo transfer in Wagyu donors and cross-bred recipients: A retrospective analysis of reproductive performance. *The AABP Proceedings*. 50. 214.

Hasler, JF. (2000): In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction* 15:47-58.

Hirayama, H.- Naito, A.- Fujii, T.- Sugimoto, M.- Takedomi, T.- Moriyasu S.- Sakai, H.- Kageyama, S. (2019): Effects of genetic background on responses to superovulation in Japanese black cattle. *Theriogenology*. 81: 3. 373-378.

Jahnke, M. J.- West, J. K.- Youngs, C.R. (2014): Evaluation of *in vivo* derived embryos. In: Hopper R. M. editor. *Bovine reproduction*. Hoboken (NJ): Wiley and Sons. 733-48.

- Kinghorn, B. P.- van der Werf, J.- Ryan, M. (2000): Animal Breeding: Use of New Technologies. Post Graduate Foundation in Veterinary Science, University of Sidney.
- Loi, P.- Toschi, P.F.- Zacchini, G.- Ptak, P.A.- Scapolo, E.- Capra, A.- Stella- Marsan, P.A.- Williams, J.L. (2016): Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. *Genet. Sel. Evol.*, 48: 53.
- Mirae, O.- Kim, E.K.- Jeon, B.I.- Yujira, T. (2016): Chemical compositions, free amino acid contents and antioxidant activities of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) beef by cut. *Meat Sci.* 119:16-21.
- Motoyama, M.- Sasaki, K.- Watanabe, A. (2016): Wagyu and the factors contributing to its beef quality: A Japanese industry overview. *Meat Science.* 120: 10–18.
- Nedambale, T.L.- Dinnyes, A.- Groen, W.- Dobrinsky, J.R.- Tian, X.C.-Yang, X. (2004): Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology.* 62: 437-449.
- Niemann, H.- Wrenzicky, C. (2018): *Animal Biotechnology*, 1. Springer, Cham. 2018.
- Nogueira, É.- Cardoso, G.S.- Marques Junior, H. R.- Dias, A. M.- Ítavo, L. C. V.- Borges, J. C. (2012): Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. *Revista Brasileira de Zootecnia. Sociedade Brasileira de Zootecnia.* 41:9. 2129-2133.
- Oka, A.- Iwaki, F.- Dohgo, T. (2002): Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black steers. *J. Anim Sci.* 80:1005-11.
- Ono, T.- Isobe, T.- Morita, Y.- Do, L. T. K.- Tanihara, F.- Taniguchi, M.- Takagi, M.- Otoi, T. (2016): Effects of parity and season on pregnancy rates after the transfer of embryos to repeat-breeder Japanese Black beef cattle. *Arch. Anim. Breed.* 59. 45–49.
- Peter, J. H. (2019): Embryo and cow factors affecting pregnancy per ET for multiple- service, lactating Holstein recipients. *Transl. Anim. Sci.* 3: 60-65.
- Pécsi T. (2007): A mesterséges termékenyítés fogalma, alkalmazásának indokai. In: Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
- Rizos, D.- Clemente, M.- Bermejo- Alvarez, P.- De La Fuente, J.- Lonergan, P.- Gutiérrez-Adán, A. (2008): Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals.* 43: 44-50.
- Santos, J.E.P.- Cerri, R.L.A.- Sartori, R.: Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology.* 2008. 69:88- 97.
- Seidel, G. E. Jr. (1984): Applications of embryo transfer and related technologies to cattle. *J. Dairy Sci.* 11. 2786- 96. p.
- Shaw, D. W.- Good, T. E. (2000): Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology.* 8(53): 1521-8.

Sirard, M.-A.- Richard, F.- Blondin, P.- Robert, C. (2006): Contribution of the oocyte to embryo quality. *Therogenology*. 65(S1): 126-136.

Sugano, M.- Shinogi, T. (1999): Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim. Reprod. Sci.* 55: 3-4. 175-181.

Sugimoto, M.- Sasaki, S.- Watanbe, T.- Nishimura, S.- Ideta, A.- Yamazaki, M.- Matsuda, K.- Yuzaki, M.- Sakimura, K.- Aoyagi, Y.- Sugimoto, Y. (2010): Ionotropic glutamate receptor AMPA 1 is associated with ovulation rate. *PLoS One*. 5 (11): e-13817.

Szabari M.- Bokor Á.- Sebestyén J.- Bakos G.- Boros N.- Simai Sz.- Sebestyén S.- Stefler J. (2008): Az embrió-átültetés hatása a holstein-fríz fajta tenyésztésére. *Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia*. 4:2.202-208.

Taniguchi, M.- Utsugi, T.- Oyama, K. (2004): Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome*. 15: 142-8.

Vincze B.- Solti L.- Volman L.- Cseh S.- Gyulay Gy. (2020): Telepi körülmények között *in vitro* előállított és fagyasztott szarvasmarha- embriók sikeres átültetése az ún. direkt transzfer technikával. 2020. 142. 665-669.

Wilmut, I.- Rowson, L. (1973): The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *J Reprod Fertil*. 1973. 33:352-3.

Wock, J.M.- Lyme, L.M.- Hockett, M. E. (2007): Effect of gonadotropin- releasing hormone compared with estradiol-17 b at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reported Fertil Dev* 2007. 1(20): 228-9.

Wrenzicky, C. (2016): In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Animal Reproduction*. 13: 279-282.

Zembayashi, M. (1994): Effects of Nutritional planes and breeds on intramuscular- lipid deposition in M. longissimus dorsi of steers. *Meat Sci*. 1994. 38: 367-74.

Zubor T.- Vigh Zs. (2018): Embrió-átültetés a genom szolgálatában. *Holstein Magazin*. 2018.2. 12-14. p.

internetes hivatkozások

URL¹: <https://truorganicbeef.com/blogs/beef-wiki/the-dark-world-of-wagyu-beef> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL²: https://www.feherkekelbelga.hu/?page_id=146 (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL³: <https://livejapan.com/en/article-a0001254/> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁴: <http://www.wagyuinternational.com/wagyu.php> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁵: <https://www.agroinform.hu/allattenyesztes/aranyat-ero-wagyu-szarvasmarha-az-alfoldon-51668-001> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁶: wagyu.org (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁷: https://www.researchgate.net/publication/326103205_The_Japanese_Wagyu_beef_industry_Current_situation_and_future_prospects_-_A_review (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁸: <https://magyarmezogazdasag.hu/2016/11/09/hazai-embriok-minosege-kivalo> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL⁹: <https://www.aete.eu/publications/statistics/> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL¹⁰: <https://magyarmezogazdasag.hu/2016/11/09/hazai-embriok-minosege-kivalo> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)

URL¹¹: <https://veteriankey.com/evaluation-of-in-vivo-derived-bovine-embryos/> (utolsó letöltés dátuma: 2023.04.04.)