Polimorfizm genu hormonu wzrostu a sekrecja hormonów somatotropowych i produkcja mleka u bydła

Renata Grochowska, Lech Zwierzchowski

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Nie tak dawno świat obiegła wiadomość, że pracownikom naukowym firmy Celera Genomics udało się zsekwencjonować zapis genetyczny jednej, anonimowej osoby. Tak naprawdę ustalono jedynie kolejność nukleotydów w tysiącach fragmentów DNA, którymi zapisane są wszystkie informacje dotyczące budowy i działania ciała jednego człowieka. „Na razie dysponujemy czymś w rodzaju góry puzzli, uzyskanej z pocięcia nici DNA należącej do jednej osoby – mówili naukowcy z Celery – teraz musimy je uporządkować". Dopiero wtedy, gdy fragmenty DNA uda się ułożyć w jeden długi łańcuch oraz poznać ich funkcje, będzie można praktycznie wykorzystać zgromadzoną wiedzę, np. do leczenia niektórych chorób.

Imponujące tempo prac w dziedzinie badania genomu ludzkiego sprzyja także wykorzystaniu najnowszych osiągnięć genetyki molekularnej w hodowli bydła. Obecne badania koncentrują się na identyfikacji genów determinujących cechy ilościowe, ważne z hodowlanego punktu widzenia, zwanych z ang. quantitative trait loci (QTL). Ich zastosowanie w programach selekcyjnych pozwala na zwiększenie dokładności selekcji poprzez dostarczenie większej ilości informacji o wartości hodolwanej zwierzęcia oraz zmniejszenie odstępu między pokoleniami, dzięki możliwości oznaczenia markerów genetycznych we wczesnym wieku osobnika niezależnie od płci.

Powszechnie stosowane są dwie strategie służące poszukiwaniu QTL. Pierwsza metoda, oparta na mapowaniu genów, polega na lokalizacji interesujących nas markerów w określonym regionie chromosomu. Badania te realizowane są w czterech etapach:

– identyfikacja obszaru chromosomu zawierającego interesujący nas QTL (10-20 cM; 1 cM = 1% crossing over),

– lokalizacja QTL w obrębie wybranego obszaru (5 cM),

– identyfikacja markerów związanych z QTL (1-2 cM),

– identyfikacja potencjalnych genów kandydatów w badanym obszarze chromosomu.

Dotychczas przeprowadzone prace wskazują na to, że QTL wpływające na wydajność i skład mleka znajdują się w różnych regionach wielu chromosomów, tj. 1, 2, 5, 6, 9, 10, 14, 16, 18, 20 i 23 [11].

W drugiej strategii poszukiwania QTL wykorzystywana jest wiedza o genetycznej kontroli procesów fizjologicznych. Na jej podstawie wybiera się i bada te geny, które przypuszczalnie mogą być włączone w określone procesy fizjologiczne (np. syntezę białka mleka), w celu wykazania, że allele danego genu wpływają na powstanie interesującego nas fenotypu (np. koagulacja mleka pod wpływem podpuszczki). W metodzie tej wykorzystywane są polimorficzne sekwencje DNA, które mogą działać bezpośrednio na ekspresję genu poprzez zmianę dojrzewania mRNA (z ang. splicing), stabilności mRNA, regulacji transkrypcji genu czy też przez zmianę kolejności aminokwasów w produkcie genu.

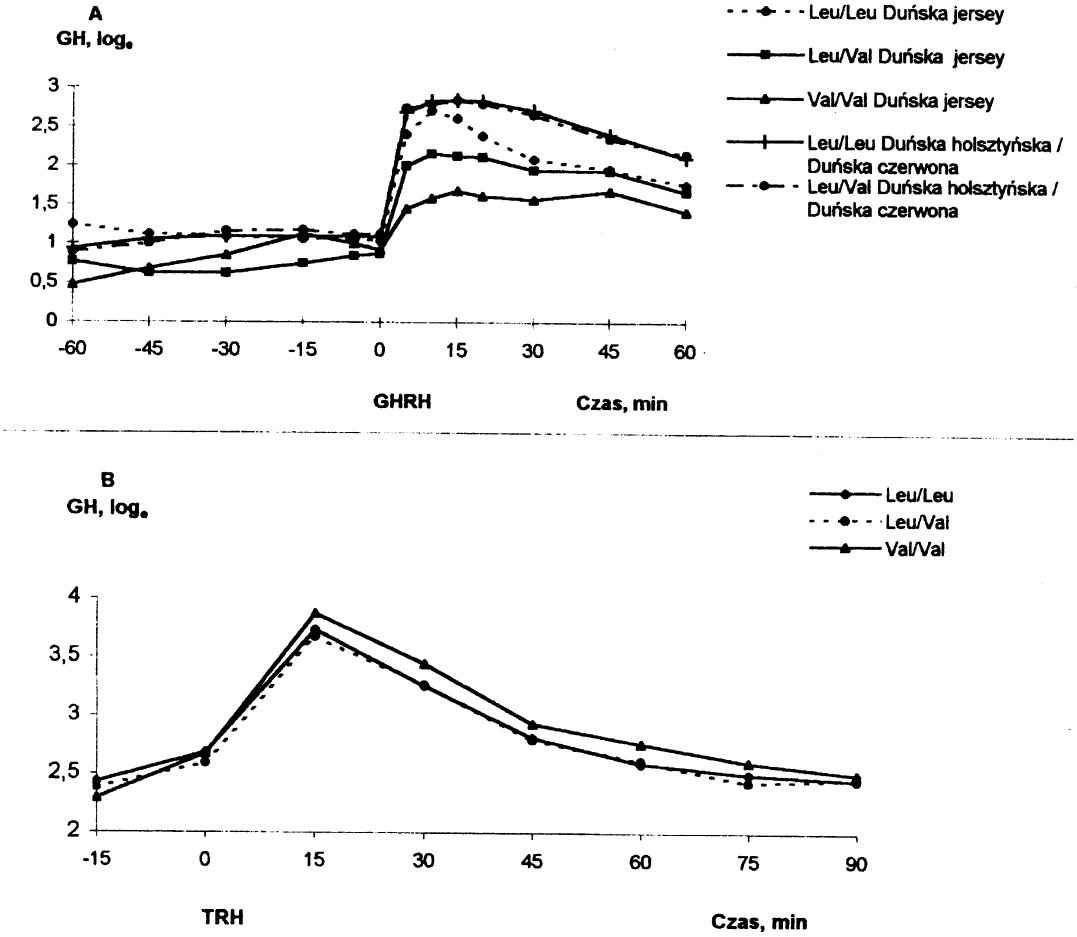
Prace wielu autorów potwierdziły kluczową rolę hormonu wzrostu (GH) w regulacji wzrostu, laktacji oraz rozwoju gruczołu mlecznego [6]. Nic więc dziwnego, że gen GH budzi ogromne zainteresowanie jako potencjalny marker zmienności genetycznej cech mlecznych między zwierzętami. Powyższe przesłanki skłoniły naukowców z IGiHZ w Jastrzębcu do podjęcia badań, w których starano się znaleźć odpowiedź na dwa pytania: czy istnieje związek między polimorfizmem genu GH (Leu/Val) a sekrecją hormonu wzrostu oraz czy istnieje zależność między wspomnianym polimorfizmem a produkcją mleka u bydła. Przedstawione w niniejszym artykule wyniki zostały opracowane we współpracy z Peterem Løvendahlem i Peterem Sørensenem z Instytutu Nauk Rolniczych w Foulum (Dania), na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w Polsce i Danii.

W badaniach uwzględniono polimorfizm genu hormonu wzrostu, charakteryzujący się obecnością dwóch wariantów genu – Leu i Val, w których zastąpienie cytozyny przez guaninę w kodonie CTG, leżącym na początku V eksonu, powoduje zamianę leucyny (Leu) na walinę (Val) w pozycji 127 białka hormonu. Prace Abdel-Meguid i wsp. [1] oraz De Vos i wsp. [4] wykazały, że aminokwas w pozycji 127 łańcucha polipeptydowego GH jest zlokalizowany w trzeciej helisie i znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie reszt aminokwasowych cząsteczki GH, biorących udział w wiązaniu hormonu z jego receptorem. Tak więc zamiana leucyny na walinę w tym miejscu cząsteczki GH może wpływać na interakcje hormonu z jego receptorem i tym samym różnicować efekt hormonu na komórki docelowe, a w konsekwencji wzrost i produkcję mleka. Według Chena i wsp. [3] mutacje zachodzące w regionie trzeciej helisy mają wpływ na sekrecję GH w transfekowanych komórkach oraz spadek tempa wzrostu u transgenicznych myszy.

W naszych badaniach wykorzystano 415 zwierząt obu płci duńskich ras mlecznych (holsztyńska czarno-biała, jersey

Tabela 1
Częstość genotypów i alleli genu hormonu wzrostu (GH) w badanej grupie bydła (w nawiasach podano częstość genotypów GH w procentach)

Wyszczególnienie	Rasa			
	duńska holsztyńska	polska czarno-biała	duńska jersey	duńska czerwona
Genotypy GH				
n	286	214	61	68
Leu/Leu	244 (85,3)	109 (51,0)	20 (32,8)	47 (69,1)
Leu/Val	42 (14,7)	77 (36,0)	22 (36,1)	21 (30,9)
Val/Val	0 (0,0)	28 (13,0)	19 (31,1)	0 (0,0)
Częstość alleli				
Leu	0,93	0,69	0,51	0,85
Val	0,07	0,31	0,49	0,15



Rys. Poziom hormonu wzrostu (GH) w jednostkach log$_e$ przed i po stymulacji (A) hormonem uwalniającym hormon wzrostu (GHRH) u duńskich ras mlecznych oraz (B) hormonem uwalniającym tyreotropinę (TRH) u polskiej rasy czarno-białej (czas 0 oznacza podanie stymulatora)

i duńska czerwona), pochodzących z programu MOET realizowanego w Danii oraz 214 jałówek i buhajów polskiej rasy czarno-białej, utrzymywanych w Zakładzie Doświadczalnym PAN w Jastrzębcu (tab. 1).

Analiza wariantów genetycznych Leu i Val została przeprowadzona przy użyciu metody PCR-RFLP. Metodyka prac polegała na wyizolowaniu DNA z krwi badanych zwierząt oraz amplifikacji fragmentu DNA (intron IV i ekson V). Powielone DNA było następnie trawione enzymem restrykcyjnym *AluI* i analizowane elektroforetycznie na żelu agarozowym. Układ tzw. fragmentów restrykcyjnych DNA na żelu pozwalał na identyfikację genotypu GH u poszczególnych zwierząt (homozygoty Leu/Leu i Val/Val lub heterozygoty Leu/Val).

Wiadomo, że hormon wzrostu wydzielany jest u ssaków z przysadki mózgowej do krwi w sposób pulsacyjny [2]. Dlatego też niektórzy badacze [8] zalecają stosowanie sztucznej stymulacji sekrecji GH, poprzez iniekcję hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH) lub hormonu uwalniającego tyreotropinę (TRH) do krwi. Dzięki temu uzyskuje się jednorazowy wyrzut hormonu wzrostu do krwi, który można opisać i zanalizować statystycznie. W badaniach duńskich wykorzystano w tym celu GHRH, natomiast w polskich – TRH. Analiza sekrecji GH została przeprowadzona na podstawie następujących parametrów GH: poziom podstawowy przed podaniem stymulatora, amplituda pulsu oraz zanik pulsu (rys. A i B). Średni wiek zwierząt, od których pobierano próby krwi do analiz, wynosił w Danii 9 miesięcy, a w Polsce

Tabela 2
Różnice między homozygotami i heterozygotami (różnice między średnimi ±Se) w obrębie locus hormonu wzrostu (GH) dla cech sekrecji GH: poziomu podstawowego, amplitudy pulsu, zaniku pulsu i poziomu insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I), oszacowane w log$_e$, u bydła ras mlecznych

Genotyp GH	Rasa						
	duńska holsztyńska		polska c.b.	duńska jersey		duńska czerwona	
	jałówki	buhaje	obie płci	jałówki	buhaje	jałówki	buhaje
Poziom podstawowy GH							
Leu/Leu : Leu/Val	0,02 ±0,11	–0,18 ±0,12	0,08 ±0,10	0,04 ±0,19	0,52 ±0,24*	0,03 ±0,20	0,05 ±0,16
Leu/Leu : Val/Val			0,12 ±0,15	0,02 ±0,21	0,26 ±0,26		
Leu/Val : Val/Val			0,04 ±0,15	–0,02 ±0,22	–0,25 ±0,20		
Amplituda pulsu GH							
Leu/Leu : Leu/Val	–0,11 ±0,15	0,20 ±0,16	0,04 ±0,09	0,25 ±0,28	0,49 ±0,31	–0,17 ±0,09	0,16 ±0,22
Leu/Leu : Val/Val			–0,25 ±0,13**	0,73 ±0,31*	1,14 ±0,33*		
Leu/Val : Val/Val			–0,30 ±0,14**	0,48 ±0,33	0,64 ±0,26*		
Zanik pulsu GH							
Leu/Leu : Leu/Val	0,97 ±3,51	6,83 ±3,45	0,17 ±0,21	5,24 ±6,48	14,33 ±7,93*	–6,04 ±6,46	–3,31 ±4,78
Leu/Leu : Val/Val			–0,08 ±0,31	10,16 ±7,25	16,32 ±7,90*		
Leu/Val : Val/Val			–0,25 ±0,31	4,92 ±7,65	1,98 ±7,28		
IGF-I							
Leu/Leu : Leu/Val			0,15 ±0,08*				
Leu/Leu : Val/Val			0,13 ±0,13				
Leu/Val : Val/Val			–0,02 ±0,13				

*P≤0,05; **P≤0,01

11 miesięcy. W doświadczeniu polskim oznaczono dodatkowo poziom insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I) we krwi badanych zwierząt, kierując się tym, że anaboliczna aktywność hormonu wzrostu realizowana jest właśnie za pośrednictwem IGF-I [6]. Oznaczenia hormonalne zostały wykonane we współpracy z zespołem Marka Snochowskiego z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt w Jabłonnie. Szczegółową metodykę badań realizowanych w Polsce przedstawiono w „Przeglądzie Hodowlanym" nr 10 z 1999 roku.

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że istnieje zależność między polimorfizmem genu GH (Leu/Val) a sekrecją hormonu wzrostu. Istotny wpływ genotypu GH na stymulowaną sekrecję GH został stwierdzony u rasy duńskiej jersey oraz polskiej czarno-białej (tab. 2). W przypadku bydła rasy jersey najwyższą amplitudę pulsu zaobserwowano u zwierząt o genotypach Leu/Leu, natomiast najniższą – u genotypów Val/Val; heterozygoty Leu/Val odznaczały się wartościami pośrednimi między homozygotami. Taki układ genotypów GH może świadczyć o kodominującym efekcie alleli Leu i Val na sekrecję hormonu wzrostu. Ze względu na brak stwierdzonych istotnych różnic między genotypami Leu/Leu i Leu/Val, nie można jednak wykluczyć dominującego efektu alleu Leu na sekrecję GH. Interesujące jest, że u polskiego bydła czarno-białego najwyższą amplitudę pulsu zaobserwowano u zwierząt o genotypach Val/Val, natomiast zbliżonymi do siebie wartościami charakteryzowały się genotypy Leu/Leu i Leu/Val (rys. B). W tym przypadku można mówić o dominującym efekcie polimorfizmu Leu/Val na sekrecję GH. Z kolei najwyższy poziom IGF-I we krwi stwierdzono u zwierząt o genotypach Leu/Leu, natomiast genotypy Leu/Val i Val/Val osiągały zbliżone wartości. Nie zaobserwowano istotnych różnic w stymulowanej sekrecji GH między bydłem o różnych genotypach GH w obrębie duńskich ras holsztyńskiej i czerwonej. Należy jednak zaznaczyć, że zidentyfikowano jedynie zwierzęta o genotypach Leu/Leu i Leu/Val (tab. 1), dlatego też trudno jest określić czy badany polimorfizm genu GH wykazuje dominujący, czy kodominujący efekt w obrębie wspomnianych ras.

Badania przeprowadzone na materiale duńskim potwierdzają wcześniejsze wyniki Lovendahla i wsp. [9], pokazujące zróżnicowanie sekrecji hormonu wzrostu między rasami mlecznymi w Danii. Jedną z hipotez wyjaśniającą te różnice jest częstość alleli Leu i Val w badanych populacjach. Bydło rasy jersey charakteryzowało się zarówno najniższą frekwencją alleu Leu (tab. 1), jak i najniższą sekrecją GH (rys. A). U bydła rasy holsztyńskiej obserwowano najwyższą frekwencję allelu Leu oraz najwyższą sekrecję GH; bydło czerwone odznaczało się wartościami zbliżonymi do rasy holsztyńskiej.

Otrzymane wyniki wydają się szczególnie interesujące w kontekście powiązania polimorfizmu genu GH z cechami produkcji mleka u bydła. Badania niektórych autorów potwierdziły, że różnice w działaniu dwóch wariantów genu GH mogą wpływać na aktywność biologiczną cząsteczki hormonu wzrostu i pośrednio na produkcję mleka. Przykładem mogą być prace Epparda i wsp. [5], którzy wykazali, że krowy holsztyńskie otrzymujące zrekombinowany GH ze zmodyfikowanym wariantem allelu Val uzyskiwały wyższą wydajność mleka w porównaniu do krów z wariantem Leu.

Tabela 3
Różnice między homozygotami i heterozygotami (różnice między średnimi ęSe) w obrębie locus hormonu wzrostu (GH) dla cech produkcji mleka u bydła ras mlecznych

Genotyp GH	Rasa			
	duńska holsztyńska	polska czarno-biała	duńska jersey	duńska czerwona
Wydajność mleka				
Leu/Leu : Leu/Val	366,1 ±254,0	–171,7 ±221,7	104,8 ±518,2	685,4 ±486,2
Leu/Leu : Val/Val		847,8 ±409,9*	–282,9 ±549,1	
Leu/Val : Val/Val		1019,5 ±411,5**	–387,7 ±616,8	
Wydajność tłuszczu				
Leu/Leu : Leu/Val	14,5 ±11,1	8,8 ±9,7	23,4 ±22,7	23,7 ±21,3
Leu/Leu : Val/Val		36,8 ±17,9*	–7,0 ±24,2	
Leu/Val : Val/Val		28,0 ±17,7*	–30,3 ±27,1	
Wydajność białka				
Leu/Leu : Leu/Val	–9,9 ±7,5	–3,2 ±6,9	12,1 ±15,3	22,6 ±14,3
Leu/Leu : Val/Val		28,1 ±13,3*	–7,6 ±16,2	
Leu/Val : Val/Val		31,2 ±13,1**	–19,7 ±18,1	

*P≤0,05; **P≤0,01

W celu określenia zależności między polimorfizmem Leu/Val a cechami produkcji mleka wykorzystano informacje o pierwszych laktacjach 1079 krów ras duńskich: holsztyńskiej czarno-białej, jersey i czerwonej oraz polskiej rasy czarno-białej. Materiał ten zawierał 182 duńskich oraz 75 polskich krów, które we wczesnym wieku miały oznaczony poziom GH i IGF-I we krwi. W analizie uwzględniono wydajność mleka, białka i tłuszczu, uzyskane podczas kontroli użytkowości mlecznej rutynowo prowadzonej w Polsce i Danii.

Stwierdzono, że zwierzęta o różnych genotypach GH różniły się istotnie pod względem badanych cech mlecznych jedynie w przypadku rasy polskiej czarno-białej (tab. 3). Najwyższe wydajności obserwowano u krów o genotypach Leu/Leu i Leu/Val, natomiast najniższe u genotypów Val/Val. Wyniki te sugerują dominujący efekt allelu Leu na cechy mleczne.

Przeprowadzone badania wydają się potwierdzać sugestie innych autorów. Lee i wsp. [7] wykazali, że krowy holsztyńskie o genotypach Val/Val uzyskiwały średnio 170 kg mleka mniej w porównaniu do krów o genotypach Leu/Leu i Leu/Val. Należy jednak podkreślić, że większość badań prowadzona jest na zbyt małej liczbie zwierząt, co zmusza do dużej ostrożności w wyciąganiu ostatecznych wniosków.

Przedstawione wyniki mogą świadczyć o współzależności polimorfizmu genu GH (Leu/Val) z poziomem hormonu wzrostu i insulinopodobnego czynnika wzrostu we krwi oraz produkcją mleka u bydła. Nasze obserwacje wskazują na dominujący efekt polimorfizmu na badane cechy. Brak jednoznacznych wyników świadczących o tym, który z alleli pełni dominującą rolę, sugerują one jednak, że inne mutacje w obrębie genu GH lub geny powiązane z polimorficznym locus GH mogą być odpowiedzialne za poziom GH i IGF-I we krwi, a w perspektywie za produkcję mleka. Geny te mogą pośred-

nio wpływać na kształtowanie wymienionych cech fenotypowych. Jest to więc wartościowa informacja potwierdzająca przydatność polimorfizmu genu GH jako markera genetycznego dla QTL.

Literatura: 1. Abdel-Meguid S.S., Shieh H.S., Smith W.W., Dayringer H.E., Violand B.N., Bentle L.A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 6434, 1987; **2. Anfinson M.S., Davis S.L., Christian E., Everson D.O.**: Proc. West. Sec., Am. Soc. Anim. Sci. 26, 175, 1975; **3. Chen W.Y., Wight D.C., Chen N.Y., Coleman T.A., Wagner T.E., Kopchick J.J.**: J. Biol. Chem. 266, 2252, 1991; **4. De Vos A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A.**: Science 225, 306, 1992; **5. Eppard P.J., Bentle L.A., Violand B.N., Ganguli S., Hintz R.L., Kung Jr. L., Krivi G.G., Lanza G.M.**: J. Endocrinol. 132, 47, 1992; **6. Gluckman P.D., Breier B.H., Davis S.R.**: J. Dairy Sci. 70, 442, 1987; **7. Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A., Murtaugh M.P., Hansen L.B., Chester-Jones H.**: Domest. Anim. Endocrinol. 13, 373, 1996; **8. Løvendahl P., Sejrsen K.**: Anim. Prod. 56, 285, 1993; **9. Løvendahl P., Liboriussen T., Jensen J., Vestergaard M., Sejrsen K.**: Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci. 44, 169, 1994; **10. Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E., Collier R.J.**: Domest. Anim. Endocrinol. 10, 325, 1993; **11. Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R.**: Domest. Anim. Endocrinol. 17, 139, 1999.

Od inseminacji do klonowania bydła

Anna Maria Duszewska

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Droga od inseminacji do klonowania obejmuje biotechniki, z których większość została już wprowadzona do hodowli bydła. W artykule zostaną przedstawione tylko najistotniejsze z nich, tzn. inseminacja, MOET, OPU-IVP-ET, tworzenie osobników transgenicznych oraz klonowanie. Dla postępu hodowlanego najważniejszą z biotechnik było sztuczne unasienianie i wprowadzenie programu MOET. OPU-IVP-ET stanowi pomost między technikami, które przyniosły największy postęp, a biotechnikami (tworzenie osobników transgenicznych czy klonowanie), o których trudno powiedzieć, że mogą przyczynić się do postępu hodowlanego, ale niewątpliwie są nowym i bardzo ważnym kierunkiem w hodowli bydła.

Pierwszą z biotechnik, która zrewolucjonizowała hodowlę bydła było sztuczne unasienianie. Odegrało ono ogromną rolę w osiągnięciu postępu hodowlanego i to zarówno w przypadku bydła mlecznego, jak i mięsnego. Wprowadzenie inseminacji zapewniło nieograniczony dostęp do wybitnych reproduktorów, a dzięki możliwości mrożenia nasienia, również zachowanie ich genów (Reklewska i Reklewski, 1997). Inseminacja doprowadziła do wyeliminowania genów letalnych z populacji oraz do zredukowania, czy wręcz do zwalczenia, chorób wenerycznych (Salisbury i wsp., 1978; Foote, 1981). Stało się to możliwe dzięki badaniom nad fizjologią nasienia, które zostały zapoczątkowane pod koniec XIX wieku w Rosji przez Ivanoff'a (1922), oraz badaniom nad jego pozyskiwaniem przy użyciu sztucznej pochwy, która została wprowadzona przez Amantea w 1914 roku (Perry, 1968). Dopiero kilkadziesiąt lat później opracowano metody przechowywania nasienia oraz jego mrożenia. Po raz pierwszy nasienie buhajów zostało zamrożone w 1952 roku (Polge i Rowson, 1952). Od tego czasu inseminacja jest powszechnie stosowaną techniką.

Kolejnym milowym krokiem w postępie hodowlanym było wprowadzenie programu MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer), opierającego się na wywoływaniu mnogich owulacji, tzw. superowulacji (MO) i przenoszeniu zarodków do biorczyń (ET). Powstanie programu MOET było możliwe dzięki osiągnięciom zespołów badaczy pracujących już w latach 30. nad cyklem płciowym, a zwłaszcza nad jego regulacją. Na podstawie tej wiedzy wyizolowano hormony płciowe, a następnie otrzymano ich analogi (Hansel i Convey, 1983). Kolejnym etapem były badania dotyczące synchronizacji rui i wywoływania superowulacji (Casida i wsp., 1943; Rowson, 1951; Foote i Onuma, 1971) oraz badania nad optymalizacją tych procesów (Elsden i wsp., 1978; Brackett i wsp., 1981). Połączenie tych technik z inseminacją pozwoliło uzyskać dużą liczbę zarodków, które początkowo izolowano poubojowo lub chirurgicznie.

W ten sposób od dawczyni, która została poddana superowulacji, następnie inseminacji i 5 dnia ubita w rzeźni, uzyskano 8-komórkowe zarodki, które przeniesiono do przygotowanych hormonalnie biorczyń. W wyniku tego, 19 grudnia 1950 urodziło się pierwsze cielę. W ciągu roku uzyskano tą techniką jeszcze dwa cielęta (Willet i wsp., 1951, 1953). W kolejnych latach wprowadzono techniki wypłukiwania zarodków z macicy (Foote i Onuma, 1971; Seidel, 1981). Zarodki przenoszono do biorczyń lub też mrożono. Po raz pierwszy potomstwo po zamrożeniu i rozmrożeniu zarodków uzyskał Wilmut w 1973 roku (Wilmut i Rowson, 1973). W następnych latach metody zamrażania i rozmrażania zostały na tyle zmodyfikowane, że wprowadzono je do szerokiej praktyki (Niemann, 1991). Obecnie program MOET jest powszechnie stosowany do oceny wartości hodowlanej.

Kolejną biotechniką jest OPU-IVP-ET. Pierwszym etapem tej złożonej techniki jest przyżyciowa izolacja oocytów poprzez punkcję pęcherzyków jajnikowych (OPU-Ovum Pick-up). Z izolowanych oocytów, w wyniku procedury zwanej umownie „produkcją zarodków *in vitro*" (IVP-in vitro production), uzyskuje się zarodki w stadium moruli bądź blastocysty. Zarodki w tym stadium są następnie przenoszone do biorczyń (ET-embryo transfer) lub są zamrażane. Wprowadzenie OPU-IVP-ET było możliwe dzięki opracowaniu metod hodowli *in vitro*, które pozwoliły na produkcję *in vitro* zarodków bydlęcych. Pierwsze uzyskane cielęta po zapłodnieniu *in vitro* pochodziły z oocytów „rzeźnianych", które przeszły proces dojrzewania w jajnikach, czyli w warunkach *in vivo* (Brackett i wsp., 1982). Dopiero kilka lat później uzyskano cielęta z oocytów, które proces dojrzewania przeszły w warunkach *in vitro* (Lu i wsp., 1987). Ogromne znaczenie miało wprowadzenie przez Pieterse i współpracowników przyżyciowego, wielokrotnego pobierania oocytów przez pochwę (OPU) od tej samej dawczyni. Autorzy ci jako pierwsi uzyskali cielę stosując OPU (Pieterse i wsp., 1988, 1991). Wprowadzenie OPU było bardzo istotnym krokiem w przyspieszeniu postępu hodowlanego. Po pierwsze