

Działalność naukowo-badawcza realizowana w Zakładach Naukowych

Zakład Hodowli Bydła

Kierownik: dr hab. Piotr Wójcik, prof. IZ PIB

Zadanie 01-10-01-11

Poprawa efektywności hodowli bydła mięsnego poprzez zwiększenie wskaźników wydajnościowych, jakości i trwałości mięsa w warunkach ograniczonej produkcji

Kierownik zadania: dr hab. Piotr Wójcik, prof. IZ PIB

Celem badań jest określenie możliwości zmiany parametrów jakościowych i fizykochemicznych mięsa wołowego pochodzącego od bydła rasy LM i mieszańców z tą rasą, poprzez modyfikowanie warunków żywieniowych i środowiskowych. Badania prowadzone są w kierunku poprawy rentowności produkcji i promowania bezpiecznej żywności o wysokich właściwościach biologicznych mięsa.

Efektem praktycznym jest opracowanie zaleceń hodowlanych, żywieniowych, warunkujących opłacalność produkcji mięsa wołowego w klasie premium, wskazanie czynników determinujących efekty ekonomiczne hodowli bydła mięsnego oraz propagowanie naturalnych metod chowu, w tym wykorzystanie użytków zielonych i ziół w poprawie jakości i bezpieczeństwa żywności.

Materiał doświadczalny stanowi bydło mięsne rasy Limousine oraz mieszańce rasy PHF, ZB i LM o udokumentowanym pochodzeniu i będące pod stałą kontrolą użytkowości. Badania prowadzone są w ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o., jak również w wytypowanych gospodarstwach indywidualnych na grupach, w liczbie nie mniej niż 15 sztuk każda. Zwierzęta są utrzymywane w zbliżonych warunkach środowiskowych z pełnym wykorzystaniem sezonu pastwiskowego.

Przez 20 dni wszystkie wytypowane zwierzęta do doświadczenia zostaną poddane okresowi przejściowemu (okres adaptacji). W okresie trwania doświadczenia wszystkie zwierzęta będą otrzymywać specjalnie opracowane dawki pokarmowe wzbogacone ziołami. Czas podawania ziół wynosi 60 dni i w tym czasie stale będzie monitorować się zmiany masy ciała, zdrowotność i żerność.

Następnie zostaną stworzone trzy grupy zwierząt:

W grupie kontrolnej K – zwierzęta będą żywione standardową dawką żywieniową dla krów mlecznych; zwierzęta z grupy doświadczalnej D1 – oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o dodatek chronionych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasy omega-3 i -6); zwierzęta z grupy doświadczalnej D2 – oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o zestaw ziół zwiększających żerność oraz poprawiających parametry mięsa wołowego. W drugim roku zwierzęta z poszczególnych grup doświadczalnych D (1-2) i K zostaną skierowane do uboju kontrolnego w wyznaczonej do tego celu rzeźni. Zakłada się, że w okresie prowadzenia badań kontrolnemu ubojowi zostaną poddane buhajki i cieliczki o wadze co najmniej 380-450 kg. Zostaną także pobrane próby z mięśnia *longissimusdorsi* w celu określenia składu chemicznego, parametrów jakości wołowiny, w tym profil kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Pobrane próby mięsa zostaną zamrożone w celu dalszych analiz.

Na każdym etapie produkcji mięsa wołowego (od obory do rzeźni) analizowane będą zagrożenia mikrobiologiczne warunkujące bezpieczeństwo żywności i wysoką jakość produktu. Pobierane próby mikrobiologiczne pochodzą będą z obory, rzeźni, jak i samego mięsa w różnych fazach jego przechowywania.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań

Zgodnie z metodyką zadania, bydło rasy limousine w poszczególnych grupach wiekowych utrzymywano w zbliżonych warunkach środowiskowych z pełnym wykorzystaniem sezonu pastwiskowego. Wszystkie zwierzęta pochodzą z obór ze stałym dostępem do okoliczności.

W roku sprawozdawczym utworzono pięć grup doświadczalnych bydła, w których prowadzono badania: I grupa – mamki (14 szt.), II grupa – jałówki 1-2 lata, III grupa – jałówki 0,5-1 rok, IV grupa – byczki rasy LM, V grupa – byczki rasy ZB.

W okresie sprawozdawczym prowadzono monitoring rozwoju somatycznego zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych. Przed rozpoczęciem każdego etapu badań w grupach rutynowo przeprowadzano kontrolę masy ciała zwierząt. W ramach realizacji I etapu badań (styczeń) przez okres 20 dni wszystkie wytypowane do doświadczenia zwierzęta zostaną poddane okresowi przejściowemu (okres adaptacji), a następnie zostanie zastosowana mieszanka ziołowa do pasz.

W tym celu opracowano mieszanki, które zostaną zastosowane w 2019 roku:

- A. mieszanka ekstraktów I
 - ekstrakt z siemienia lnianego
 - ekstrakt z pestek winogron
 - ekstrakt z kurkumy
 - ekstrakt z arcydzięgla
 - ekstrakt z czosnku
 - ekstrakt z majeranku
- B. mieszanka ekstraktów II
 - ekstrakt z gryki
 - ekstrakt z cynamonowca
 - ekstrakt z pestek grejpfruta
 - ekstrakt z pachnotki
 - ekstrakt z mięty
 - ekstrakt z kozieradki
- C. mieszanka z udziałem oleju
 - olej lniany
 - olej krokoszowy
 - olej z ostropestu/wiesiołka/awokado
 - wytlók lniany

W trakcie doświadczenia w pierwszym roku skierowano do uboju zwierzęta z grupy porównawczej, obejmującej rasę LM oraz ZB. Dokonano także dysekcji prawej półtuszy od każdej analizowanej sztuki. Wyniki odniesiono do zgromadzonej już bazy z dysekcji bydła rasy LM, której dokonano w okresie przygotowawczym do doświadczenia.

Tab. 1. Wyniki dysekcji bydła rasy LM oraz mieszańców

Nr krowy	Rasa LM	Płeć	Ocena	Ocena otł.	% wyb.	Masa brutto	Masa netto	Prawa schłodz.	Udziec bez gol.	Udziec kości
5141783744	50	buh						144,1	44,25	6,85
5185766079	50	buh	R-	2	53	264	140	70,8	26,1	3,55
5185766093	50	buh	R-	2	56	307	171	86,4	31,55	2,9
5249552600	50	buh	R	1	55	317	175	87,1	26,85	4,5
5249552594	50	buh	R-	2	55	295	162	78	24,65	3,95
5249552631	50	buh	R	2-	55	298	164	80	23,6	3,9
5249552679	50	buh	R	1+	57	306	174	86,7	25,3	4,15
5414817121	100	buh	O+	1+	54	582	312	155,6	46,9	7,6
5414817299	100	buh	O+	1+	56	675	381	191,5	56,5	8,25
56188	100	buh	R	3-	55	650	360	181,8	49,25	6,95
55938	100	buh	R-	3-	55	557	305	154,1	45,4	5,8
44646	100	jal	R	3	51	660	339	170,4	46,55	6,75
82206	100	jal	O+	3-	53	634	338	171	47,95	7,9
19306	100	jal	R	3-	52	615	321	160,2	46,35	7,15

Tab. 2. Dysekcja łopatki oraz 4 wyrębów wartościowych

Nr krowy	Łop.+gol mięso	Łop.+g kości	Gol. mięso	Gol. kość	Rozbrat mięso	Rozbrat kości	Antr. mięso	Antr. kość	Rost. mięso	Rost. kość	Polęd- wica	Pol. tł.
5141783744	17,25	6,05	2,7	2,4	7,4	2,2	6,15	1,6	4,45	1,8	3,3	0,2
5185766079	7,35	3,15			2,55	1,15	2	0,85	2,4	1,2	1,5	
5185766093	8,75	3,45			2,9	1,3	2,65	0,95	2,95	1,4	2	
5249552600	9,15	4,0	1,8	1,6	4	1,35	2,55	1,25	2,5	1,25	2,1	0,65
5249552594	8,4	3,55	1,5	1,4	3,4	1,25	3,9	1,05	1,75	0,75	1,85	0,6
5249552631	8,85	3,6	1,55	1,45	3,7	1,1	2,05	1,1	1,35	0,8	1,8	0,7
5249552679	9,7	3,85	1,8	1,45	4,25	1,35	2,55	1,25	2,15	1,3	1,9	0,5
5414817121	19	6,55	2,9	2,4	7,4	2,05	7,8	2,4	5,4	2,55	3,15	
5414817299	22,4	6,9	3,4	2,55	10,05	2,3	9,55	2,9	5,05	2,45	3,8	
56188	22,8	6,45	3,5	2,05	7,5	1,7	6,25	2,65	3,5	1,7	3,9	0,2
55938	17,88	5,2	2,55	2,05	6,5	1,5	6,95	2,2	3	2,05	3,85	0,85
44646	18,15	5,45	2,75	2	7,3	1,75	6,25	2,35	3,4	2,25	3,45	0,2
82206	19,1	5,9	2,75	2,2	5,95	1,8	5,2	2,65	3,4	3	3,1	0,3
19306	17,6	5,55	2,33	1,9	5,7	1,6	5,65	2,7	3,1	2,4	3,65	0,45

Tab. 3. Dysekcja szczegółowa udźca bydła rasy LM i mieszańców

Nr krowy	Zraz g mięso	Zraz d mięso	Myszka mięso	Ligawa mięso	Krzyżowa mięso	Pręga brutto	Pręga mięso	Pręga kość	Kości uda i gol.
5141783744						6,85	2,45	3,65	10,5
5185766079	5,15	3,95	3,2	1,45	3,2	5,25	3,1	2,15	
5185766093	6,45	5,15	4,1	1,8	3,55	6,05	3,7	2,35	
5249552600	6,8	5,1	4,5	1,95	3,7	6,05	3,9	2,15	6,65
5249552594	6,3	4,65	3,9	1,6	3,6	5,6	3,45	2,15	6,1
5249552631	5,55	4,65	3,9	1,6	3,45	5,4	3,3	2,1	6
5249552679	6,15	4,85	3,85	1,65	4,3	5,85	3,7	2,2	6,35
5414817121	11,9	8,65	6,5	2,8	6,6	5,5	2,5	3,15	

5414817299	12,95	10,05	7,3	3,95	9,1	5,55	3,4	2,15	
56188	12,65	10,45	7,5	3,75	7,95	6	2,8	3,25	9,2
55938	12,15	9,75	3,75	3,2	7,6	5,5	2,9	2,85	8,65
44646	11,7	9,85	6,9	3,95	8,4	5,35	2,7	2,7	9,4
82206	11,75	9,6	7,2	3,6	7,9	5,75	2,9	2,8	10,8
19306	11,95	9,15	7,1	3,55	7,45	5,45	2,55	2,8	9,95

Dodatkowo przeprowadzono analizy fizyko-chemiczne pobranych próbek mięsa w układzie: mięso świeże do 48 godzin, mięso po okresie dojrzewania – 7 dni, mięso po okresie dojrzewania 14 dni.

Zadanie 04-10-01-11

Szacowanie trendu genetycznego i walidacja wartości hodowlanych dla długowieczności u bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej

Kierownik zadania: prof. dr hab. Andrzej Żarnecki

Badania nad trendami genetycznymi i walidacją wartości hodowlanej dla długowieczności były wykonywane w dwóch etapach (lata 2017 i 2018).

Udział w prowadzonej przez INTERBULL międzynarodowej ocenie wartości hodowlanej buhajów wiąże się z koniecznością prowadzenia okresowej walidacji modeli wykorzystywanych w ocenie. Wartość hodowlana dla rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej pod względem długowieczności jest szacowana przy użyciu modelu proporcjonalnego hazardu Weibulla. W tym przypadku Interbull rekomenduje przeprowadzenie testów walidacyjnych wg Metody 2, która analizuje średnie odchylenia rozwiązań (tzw. pseudorekordów/*pseudo-records*) dla córek buhajów (Daughter Yield Deviation – DYD).

Ocena wartości hodowlanej dla rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej pod względem długowieczności funkcjonalnej

W Polsce wartość hodowlana dla rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej pod względem długowieczności jest szacowana metodami analizy przeżywalności.

Długowieczność funkcjonalna jest definiowana jako długość życia produkcyjnego krów-córek buhajów (LPL) poprawiona na względną 305-dniową wydajność tłuszczu i białka w obrębie stada. LPL jest obliczana jako różnica w dniach między datą ubycia krów wybrakowanych (dane „nieocenzurowane”) lub ostatniego odnotowanego próbnego udoju dla krów żyjących (dane „ocenzurowane”) a datą pierwszego wycielenia.

Stosowany w ocenie rutynowej model Weibulla (*Weibull mixed survival model*) uwzględnia stałe efekty środowiskowe, takie jak wiek pierwszego ocielenia oraz zmieniające się z czasem (time dependent): numer laktacji, stadium laktacji, względną wydajność białka i tłuszczu w obrębie stada w danym roku i sezonie wycielenia, klasy zmiany wielkości stada w kolejnych latach, losowy zmieniający się w czasie efekt stado-rok-sezon oraz addytywny genetyczny efekt ojca.

Oszacowane wartości hodowlane buhajów (uzyskane z modelu rozwiązania dla efektu ojca określające relatywne ryzyko brakowania córek) po zmianie znaku na przeciwny, tak by mniejsze ryzyko oznaczało większą wartość hodowlaną, są poddawane standaryzacji na średnią 100 i odchylenie standardowe 10, względem bazy przyjętej dla wszystkich ocenianych rutynowo cech. Oszacowane w ramach oceny rutynowej krajowe wartości hodowlane są zapisywane w formacie ustalonym przez Interbull i wprowadzane do bazy IDEA, stanowiąc podstawę oceny międzynarodowej MACE.

Metoda walidacji modelu oceny (Metoda 2 Interbull)

W przypadku stosowania w ocenie wartości hodowlanej modelu Weibulla Interbull wymaga przeprowadzania testów walidacyjnych wg tzw. Metody 2, która opiera się na analizie trendów czasowych (*time trend*) w średnich odchyleniach rozwiązań dla córek buhajów (tzw. Daughter Yield Deviation – DYD).

Na podstawie uzyskanych z modelu Weibulla rozwiązań dla krów-córek ocenionych buhajów (tzw. pseudorekordów z wagami) oblicza się wartości DYD w kolejnych latach pierwszego wycielenia córek buhajów wg wzoru:

$$DYD_{ij} = \sum_{k=1}^{N_{ij}} \frac{prec_{ijk} * waga_{ijk}}{waga_{ijk}}$$

gdzie:

DYD_{ij} – wartość DYD i-tego buhaja w j-tym roku pierwszego wycielenia jego córek,

$prec_{ijk}$ – pseudorekord oraz

$waga_{ijk}$ – waga pseudorekordu dla k-tej córki i-tego buhaja cielącej się pierwszy raz w roku j.

W ramach testu walidacyjnego wartości DYD dla podklas buhaj x rok pierwszego wycielenia córek są analizowane przy użyciu następującego modelu liniowego:

$$DYD_{ij} = BULL_i + b*j + e_{ij}$$

gdzie:

DYD_{ij} – wartość DYD i-tego buhaja w j-tym roku pierwszego wycielenia jego córek,

$BULL_i$ – stały efekt i-tego buhaja,

e_{ij} – błąd losowy.

Wynik testu walidacyjnego jest pozytywny gdy oszacowanie współczynnika b z powyższego modelu spełnia warunek:

$$|b| < 0.01 * \sigma_g$$

gdzie σ_g jest wariancją genetyczną badanej cechy.

Walidacja modelu oceny hodowlanych dla długowieczności u bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej

W pierwszym etapie badań zaimplementowano i przetestowano nową wersję pakietu używanego w rutynowej ocenie wartości hodowlanej buhajów Skit v6.1, oszacowano wartości hodowlane dla buhajów oraz pseudorekordy dla ich córek, opracowano metodę i obliczono odpowiednie wartości DYD, a następnie przeprowadzono test walidacyjny zastosowanego modelu oceny. Wyniki walidacji zostały przesłane do Interbullu i testowany model oceny uzyskał akceptację Interbull.

W związku z koniecznością cyklicznej walidacji modelu oceny wartości hodowlanej, wynikającej ze zmiany struktury populacji i występowania trendu genetycznego, w ramach drugiego etapu badań stworzono i przetestowano oprogramowanie do automatycznego wykonywania testu walidacyjnego. Oprogramowanie to, bazując na danych i wynikach z rutynowego szacowania wartości hodowlanej buhajów, przeprowadza odpowiedni test walidacyjny i przygotowuje dane z wynikami testu w postaci gotowej do przesłania do INTERBULL-u.

I. Szacowanie wartości hodowlanej buhajów i pseudorekordów dla krów-córek

Dane wyjściowe, pochodzące z systemu kontroli użytkowości SYMLEK (udostępnione do oceny rutynowej w sezonie 2016/3), obejmowały informacje o wydajnościach mleka, białka, tłuszczu, datę i miejsce (obora) próbnych udojów, datę i przyczynę brakowania krowy oraz dane identyfikacyjne i rodowodowe zwierząt. Dane te zostały poddane korekcie oraz wstępnej edycji mającej na celu poprawienie struktury. Otrzymany w wyniku zbiór obejmował 2 297 141 krów, cielących się pierwszy raz w latach od 1995 do 2016 w 21 731 oborach, będących córkami 13 165 buhajów. Liczba buhajów z uwzględnieniem rodowodów wyniosła 13863. Długość życia produkcyjnego krów córek buhajów (LPL) przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka zbioru do szacowania wartości hodowlanych (LPL – długość życia produkcyjnego krów w dniach)

	Liczba krów	LPL (dni)		
		średnia	min	max
Dane ocenzone	1 053 329	961.96	1	7515
Dane nieocenzone (wybrakowane)	1 243 812	1123.68	1	6089

W rutynowej ocenie wartości hodowlanej stosuje się pakiet oprogramowania Survival Kit w wersji 3. W ramach zadania zaimplementowano nową wersję pakietu tj. SKit v6.1, która oprócz wartości hodowlanej buhajów umożliwia uzyskanie rozwiązań (tzw. pseudorekordy i wagi) dla krów córek buhajów, które są podstawą do wyznaczenia średnich odchyleń rozwiązań dla córek buhajów (DYD). Implementacja tej wersji pakietu wymusiła niewielką zmianę modelu (stado zdefiniowano jako efekt niezależny od czasu). Skutki tej zmiany zbadano porównując wartości hodowlane (WH) buhajów oszacowane za pomocą tak zmodyfikowanego modelu z oszacowaniami uzyskanymi za pomocą modelu rutynowego (WHrut).

Tab. 2 przedstawia parametry rozkładu Weibull'a, parametr rozkładu efektu losowego hys, jakie uzyskano szacując wartości hodowlane uzyskane po zastosowaniu nowej wersji pakietu SKit 6.1.

Tab. 2. Parametry rozkładu Weibull'a oraz parametr rozkładu efektu losowego hys

	Oszacowania
parametry rozkładu Weibull'a	
ρ	2,33
λ	0,007
γ dla efektu losowego hys	2,15

Liczba buhajów ocenionych wyniosła 13 863, w tym 13 165 buhajów z córkami w 21 731 oborach. Charakterystykę oszacowań wartości hodowlanych (WH) przedstawia Tab. 3.

Tab. 3. Charakterystyka oszacowań wartości hodowlanych (WH) buhajów

	Liczba buhajów	Średnia	SD	min	max
WH	13 863	97.55	9.96	55	172
powtarzalność		0.60	0.24	0	0.99
liczba wybrakowanych córek		89.72	315.0	0	9982

Uzyskane wartości hodowlane (WH) są zgodne z oszacowaniami uzyskanymi dla tych samych danych wg modelu z oceny rutynowej (WHrut). Współczynnik korelacji WH z WHrut wyniósł 0.99. W trakcie szacowania wartości hodowlanej buhajów przy użyciu pakietu Skit 6.1 uzyskano rozwiązania (pseudorekordy i ich wagi) dla 2 297 141 krów-córek ocenionych buhajów.

II. Obliczanie DYD i walidacja

Wykorzystując oszacowania pseudorekordów dla krów obliczono wartości DYD w podklasach buhaj x rok pierwszego wycielenia córek. W tak uzyskanym zbiorze z wartościami DYD dokonano eliminacji wg wymagań INTERBULL dla procedury walidacyjnej (*TrendTest*), tj. pozostawiono dane dla 6159 buhajów urodzonych w latach 1986 – 2012 i posiadających minimum 20 córek, w co najmniej 10 stadach. Zbiór ten uzupełniono dodatkowymi informacjami wynikającymi z formatu plików wymaganych przez Interbull (file300, file302) obejmującymi m.in.: liczbę córek w poszczególnych latach wycielenia, a także oszacowaną wartość hodowlaną buhaja, powtarzalność oceny, ogólną liczbę córek buhaja, liczbę córek wybrakowanych oraz liczbę stad. Dokonano dodatkowej edycji pozostawiając lata pierwszego wycielenia córek buhajów wtedy, gdy liczba córek cielących się w danym roku wynosiła co najmniej 10 oraz pozostawiając buhaje z córkami w co najmniej 2 latach pierwszego wycielenia. Końcowy zbiór przeznaczony do przeprowadzenia walidacji dotyczył 5893 buhajów urodzonych w latach 1990 – 2012 (Tab. 4).

Tab. 4. Charakterystyka DYD w podklasach buhaj x rok pierwszego wycielenia córek dla 5893 buhajów urodzonych w latach 1990 – 2012

	N	Średnia	SD	min	max
DYD	19328	0.13	17.6	-1003.7	1907.3

Test przeprowadzono korzystając z udostępnianego przez Interbull programu *trendtest2.py*. Uzyskane oszacowanie współczynnika *b* wyniosło 0.017 i było mniejsze niż 0.01 wariancji genetycznej, która wyniosła 13.3. To oznacza że badany model oceny spełnia warunki testu walidacyjnego.

Wyniki testu zostały spakowane programem *ttzip.py* i wysłane do Interbull, który zaakceptował przeprowadzoną walidację modelu.

III. Oprogramowanie do automatycznej walidacji modelu wykorzystywanego w rutynowej ocenie wartości hodowlanej buhajów dla długowieczności

Oprogramowanie zostało napisane dla platformy Linux i zaimplementowane na serwerze *srvgeno01* w Instytucie Zootechniki PIB, na którym prowadzona jest rutynowa ocena wartości hodowlanej.

- Testowanie oprogramowania na danych w trakcie oceny rutynowej w sezonie 2018/3. Dane wyjściowe do rutynowej oceny wartości hodowlanej dla długowieczności w sezonie 2018/3, obejmowały 2 619 106 krów, cielących się pierwszy raz w latach od 1995 do 2018, będących córkami 14 790 buhajów. Liczba buhajów ocenionych wyniosła 15 581, w tym 14 790 buhajów z córkami.

Tab. 5. Charakterystyka DYD w podklasach buhaj x rok pierwszego wycielenia córek dla 6017 buhajów urodzonych w latach 1990 – 2013

	N	Średnia	SD	min	max
DYD	20133	0.011	18.8	-2152.56	1112.18

Uzyskane oszacowanie współczynnika regresji b wyniosło 0.077, co stanowi 0.0059 (czyli mniej niż 0.01) wariancji genetycznej wynoszącej 13.068. To oznacza pozytywny wynik testu walidacyjnego dla badanego modelu oceny.

- Testowanie oprogramowania na danych z sezonu 2016/3

Przetestowano oprogramowanie na danych na których prowadzono walidację modelu w sezonie 2016/3. Stwierdzono zgodność co do liczebności zbiorów pośrednich, jak i końcowego wyniku testu walidacyjnego.

Przeprowadzone testy i przygotowane oprogramowanie umożliwi przeprowadzenie obowiązkowych walidacji dla długowieczności w roku 2019 i kolejnych wynikających z kalendarza testów ustalonego przez INTERBULL.

Zadanie 04-10-02-11

Analiza zależności między cechami pokroju a przebiegiem porodu u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej

Kierownik zadania: mgr Magdalena Jakiel

Celem przeprowadzonych badań było oszacowanie korelacji genetycznych między przebiegiem porodu a takimi cechami pokroju, jak: wysokość w krzyżu, głębokość tułowia, szerokość klatki piersiowej, szerokość zadu, ustawienie zadu, postawa nóg tylnych – widok z boku, więzadło środkowe i charakter mleczny.

Zgromadzono materiał obejmujący dane dotyczące przebiegu porodu, okołoporodowej śmiertelności cieląt i wybranych cech pokroju krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Dane do badań pochodziły z systemu SYMLEK, należącego do Polskiej Federacji Hodowców Bydła i Producentów Mleka (PFHBiPM).

Do analizy wybrano 914 553 krów-pierwiastek z ocenionym przebiegiem porodu (przebieg porodu i okołoporodowa śmiertelność cieląt) oraz ocenionych pod kątem pokroju, tj. takich cech, jak: wysokość w krzyżu, głębokość tułowia, szerokość klatki piersiowej, szerokość zadu, ustawienie zadu, postawa nóg tylnych – widok z boku, więzadło środkowe wymienia i charakter mleczny.

Przebieg porodu sklasyfikowano jako: 1) samodzielny; 2) łatwy; 3) trudny, tzn. użycie znacznie większej siły niż normalnie; 4) ciężki, tzn. zabieg chirurgiczny, uszkodzenie krowy lub cielęcia, embriotomia, cesarskie cięcie. Cielęta sklasyfikowano jako żywe lub martwe (cielę urodziło się martwe lub jego śmierć nastąpiła w ciągu 24 godzin po porodzie).

Cechy pokroju, z wyjątkiem pomiaru wysokości w krzyżu, są oceniane w skali punktowej pomiędzy ekstremami biologicznymi w skali od 1 do 9. Wysokość w krzyżu podawana jest w centymetrach. W Tab. 1 podano zakresy oceny i wartości optymalne liniowych cech pokroju uwzględnionych w badaniach, a w Tab. 2. charakterystykę wybranych cech pokroju.

Tab. 1. Wartości optymalne i zakres oceny liniowych cech pokroju krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej

Cechy pokroju	Wartość optymalna (pkt.)	Zakres oceny (pkt.)	
		1	9
Głębokość tułowia	6,5	płytki	wąski
Szerokość klatki piersiowej	6,0	wąska	szeroka
Szerokość zadu	6,5	wąski	szeroki
Ustawienie zadu	5,0	uniesiony	spadzisty

Postawa nóg tylnych – widok z boku	5,0	pionowa	podsiebna
Więzadło środkowe	9,0	słabe	mocne
Charakter mleczny	7,5	ordynarny	szlachetny

Tab. 2. Charakterystyka cech pokroju 914 553 krów

Cechy pokroju	Średnia	SD ¹⁾
Wysokość w krzyżu	142,06	5,28
Głębokość tułowia	6,17	1,18
Szerokość klatki piersiowej	5,40	1,22
Szerokość zadu	5,18	1,15
Ustawienie zadu	5,53	1,22
Postawa nóg tylnych – widok z boku	5,45	1,03
Więzadło środkowe	5,82	1,40
Charakter mleczny	6,02	1,15

1) SD – odchylenie standardowe

Wybrano krowy-pierwiastki rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej cielące się w latach 2006-2017, w wieku od 18 do 48 miesięcy i utworzono zbiór złożony z 405 162 krów.

W celu oszacowania korelacji genetycznych pomiędzy przebiegiem porodu i okołoporodową śmiertelnością cieląt a cechami pokroju utworzono zbiór spełniający następujące warunki:

- buhaj ma minimum 10 córek,
- liczebność klasy stado-rok-sezon: minimum 3,
- liczebność klasy stado-rok-sezon-klasyfikator: minimum 3.

Następnie, ze względu na ograniczone możliwości obliczeniowe, wylosowano 10% ojców uzyskując zbiór z danymi o 19 450 krowach.

Komponenty (ko)wariancji oszacowano metodą największej wiarygodności (REML), stosując wielocechowy model zwierzęcia z efektem matczynym i bez efektu matczynego. Oba modele przebadano na tych samych danych. Do obliczeń użyto program *airemlf90*.

Dla przebiegu porodu oraz śmiertelności okołoporodowej cieląt w modelu uwzględniono następujące stałe efekty: stado-rok-sezon (3152 poziomy), wiek wycielenia (w miesiącach, 30 poziomów), płeć cielęcia (2 poziomy). W modelu dla cech pokroju uwzględniono regresję liniową na wiek wycielenia oraz stałe efekty stado-rok-sezon-klasyfikator (3077 poziomów) i fazy laktacji (19 poziomów).

W Tab. 3. i 4. podano charakterystykę przebiegu porodu i okołoporodowej śmiertelności cieląt, a w Tab. 5. przedstawiono charakterystykę wybranych cech pokroju.

Tab. 3. Charakterystyka przebiegu porodu 19 450 krów

Przebieg porodu	Liczba krów	
	N	%
Samodzielny	5 245	26,97
Łatwy	13 000	66,84
Trudny	1 161	5,97
Ciężki	44	0,23

Tab. 4. Charakterystyka śmiertelności okołoporodowej cieląt

Śmiertelność	Liczba krów	
	N	%
Żywe	18 164	93,39
Martwe	1 286	6,61

Tab. 5. Charakterystyka wybranych cech pokroju 19 450 krów

Cechy pokroju	Średnia	SD ¹⁾
Wysokość w krzyżu	145,01	3,99
Głębokość tułowia	6,08	1,16
Szerokość klatki piersiowej	5,54	1,15
Szerokość zadu	5,12	1,12
Ustawienie zadu	5,56	1,19
Postawa nóg tylnych – widok z boku	5,44	1,06
Więzadło środkowe	5,78	1,43
Charakter mleczny	5,99	1,10

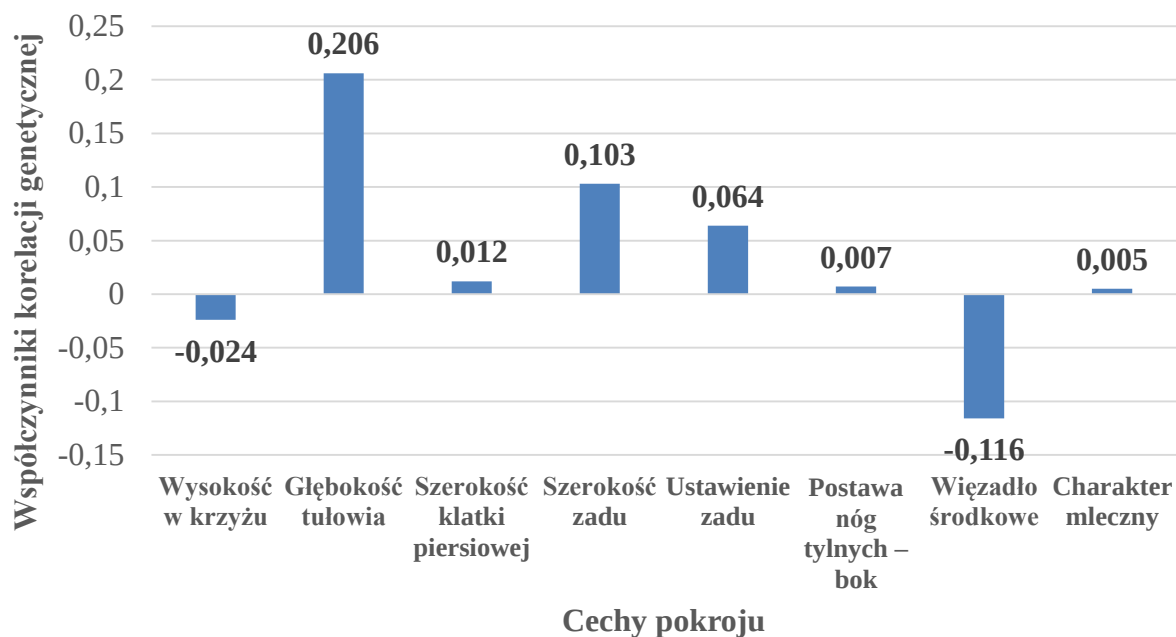
1) SD – odchylenie standardowe

Na Wykr. 1. zaprezentowano wartości współczynników korelacji genetycznej między przebiegiem porodu i okołoporodową śmiertelnością cieląt a cechami pokroju oszacowanymi na podstawie modelu bez efektu matczynego. Współczynniki korelacji genetycznej między przebiegiem porodu i cechami pokroju były niskie i wahały się od 0,005 do 0,206 (wartości bezwzględne). Najniższe współczynniki korelacji oszacowano między przebiegiem porodu i charakterem mlecznym (0,005) oraz postawą nóg tylnych – widok z boku (0,007). Najwyższe współczynniki korelacji oszacowano między przebiegiem porodu i głębokością tułowia (0,206) oraz więzadłem środkowym (-0,116). Przebieg porodu jest ujemnie skorelowany nie tylko z więzadłem środkowym (-0,116), ale również z wysokością w krzyżu (-0,024).

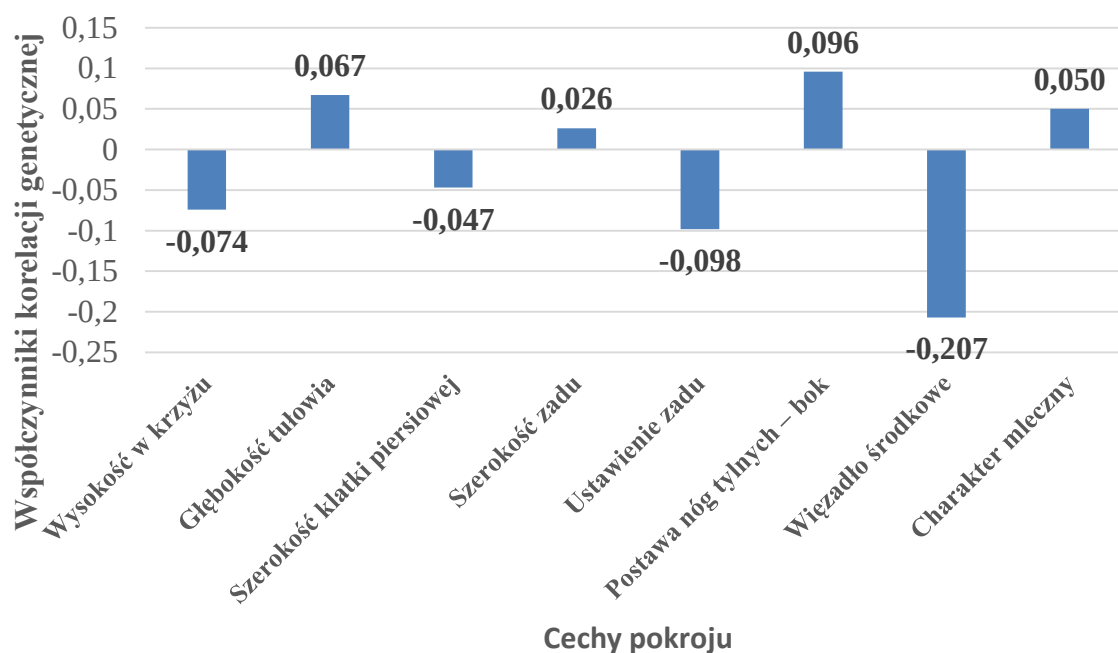
Wykr. 2. przedstawia współczynniki korelacji genetycznej między śmiertelnością okołoporodową cieląt i wybranymi cechami pokroju. Oszacowane współczynniki korelacji genetycznej były niskie i wahały się od 0,026 do 0,207 (wartości bezwzględne). Najniższą korelację genetyczną oszacowano między śmiertelnością okołoporodową cieląt i szerokością zadu (0,026) a najwyższą, ale ujemną między śmiertelnością okołoporodową cieląt i więzadłem środkowym (-0,207). Śmiertelność okołoporodowa cieląt jest ujemnie skorelowana jeszcze z trzema innymi cechami pokroju: wysokością w krzyżu (-0,074), szerokością klatki piersiowej (-0,047), ustawieniem zadu (-0,098), przy czym wymienione współczynniki korelacji są bliskie zeru.

Zdecydowano nie opisywać wyników uzyskanych za pomocą modelu zwierzęcia z efektem matczynym, ponieważ odbiegały one od wyników prezentowanych w piśmiennictwie i wymagają dalszej wnikliwej analizy.

Podsumowując, wszystkie współczynniki korelacji genetycznej między przebiegiem porodu i okołoporodową śmiertelnością cieląt a wybranymi cechami pokroju były niskie. Stwierdzono dodatnią zależność genetyczną między przebiegiem porodu a głębokością tułowia i szerokością zadu oraz ujemną zależność genetyczną między więzadłem środkowym a obiema cechami związanymi z przebiegiem porodu.



Wykr. 1. Korelacje genetyczne między przebiegiem porodu a wybranymi cechami pokroju



Wykr. 2. Korelacje genetyczne między okołoporodową śmiertelnością cieląt a wybranymi cechami pokroju

Zadanie 04-10-03-11

Wpływ ekstraktów ziołowych i bakterii probiotycznych na przyrost masy ciała oraz status zdrowotny cieląt

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Radkowska

Celem realizowanego zadania było określenie wpływu autorskiej mieszanki zawierającej ekstrakty ziołowe na kondycję, odporność oraz przyrosty masy ciała cieląt.

Doświadczenie prowadzone było na cielętach rasy holsztyno-fryzyjskiej w wieku od 1. do 60. dnia życia. Cielętom podawany jest preparat mlekozastępczy w stacji odpajania do 60. dnia życia. Dobór cieląt do doświadczenia dokonywany jest po uprzednim określeniu ilości IgG w sianie przy użyciu colostrometru. Do doświadczenia wybierano cielęta od krów, u których zawartość IgG kształtowała się na poziomie 50-80 g na litr, co pozwoliło na uzyskanie ujednoliconego pod względem odporności i możliwości adaptacji materiału doświadczalnego.

Układ doświadczenia obejmował trzy grupy doświadczalne:

- Grupa I – grupa kontrolna
- Grupa II – grupa cieląt otrzymująca preparat probiotyczny
- Grupa III – grupa cieląt otrzymująca mieszankę ekstraktów ziołowych

W trakcie badań cielęta grupy II otrzymywały preparat zawierający bakterie probiotyczne. Podawanie preparatu rozpoczęto w 2. dobie życia i trwało ono do 60. dnia życia. Preparat podawany był w dwóch dawkach po 20 ml. Cielęta grupy III otrzymywały od 2. dnia po urodzeniu autorską mieszankę ekstraktów ziołowych, mającą korzystnie wpłynąć na kondycję, odporność oraz przyrosty masy ciała. W skład mieszanki wchodziły ekstrakty: z czosnku, oregano, rozmarynu, kopru, jeżówki oraz pokrzywy. Dawka terapeutyczna dobrana została na podstawie wytycznych farmakopearnych w przeliczeniu na kg masy ciała cielęcia. Do 30. dnia życia cielęta grupy III otrzymywały dziennie 1 g mieszanki ziołowej, natomiast od 30. do 60. dnia 2 g podzielone na dwie dawki po 1 g.

Podczas doświadczenia prowadzono codzienne obserwacje zdrowotności cieląt. Pobraną krew cieląt poddano pełnej analizie morfologicznej z rozmazem oraz oznaczeniu poziomu immunoglobulin w osoczu (klas IgG, IgA oraz IgM). W celu wykrycia obecności drobno-ustrojów patogennych w 7., 30. i 60. dniu po urodzeniu pobierany był od cieląt kał. Na pobranym materiale wykonano oznaczenia mikrobiologiczne i parazytologiczne.

Dokonywano pomiarów masy ciała cieląt, w porównaniu do kontroli w grupie III stwierdzono wyższe przyrosty masy ciała o 24%, natomiast w grupie II o 30% (Tab. 1).

Wskaźniki morfologiczne krwi mieściły się w granicach norm referencyjnych, przekroczenie zaobserwowano tylko w przypadku poziomu leukocytów w grupie I w 30. dniu życia. Najkorzystniejszy poziom erytrocytów i zawartość hemoglobiny stwierdzono pod koniec badań w grupie III. Najwięcej bakterii w kale stwierdzono w pierwszym miesiącu życia co potwierdza, iż jest to newralgiczny okres w odchowcie cieląt. Zastosowane probiotyki oraz mieszanka ziołowa w większości przypadków przyniosła zadowalające efekty.

Przeprowadzone badania wykazały korzystny wpływ stosowania bakterii probiotycznych i ekstraktów ziołowych na przyrosty masy ciała cieląt, morfologię krwi oraz ograniczenie występowania niektórych szczepów bakterii i występowania parazytów.

Tab. 1. Średnie dobowe przyrosty masy ciała cieląt w okresie 60 dni (g)

Grupa	Grupa I	Grupa II	Grupa III
średnie dzienne przyrosty masy ciała (g)	410	533	508

Tab. 2. Morfologia krwi

Morfologia	Grupa I			Grupa II			Grupa III		
	do 7. dnia	w 30. dniu	w 60. dniu	do 7. dnia	w 30. dniu	w 60. dniu	do 7. dnia	w 30. dniu	w 60. dniu
Leukocyty (G/l)	10,65	13,18	9,57	11,30	10,43	11,40	10,25	9,2	11,76
Erytrocyty (T/l)	7,04	7,39	8,22	7,59	7,90	8,52	6,63	7,82	8,75
Hemoglobina (mmol/l)	5,98	5,55	6,15	6,77	6,00	6,40	5,70	5,86	6,70
Hematokryt (l/l)	0,28	0,27	0,29	0,32	0,29	0,30	0,27	0,28	0,31
MCV (fl)	40	36,33	35,50	41,67	36,17	35,32	40,77	35,8	35,80
MCH (fmol)	0,85	0,76	0,75	0,88	0,76	0,75	0,86	0,752	0,77
MCHC (mmol/l)	21,23	20,82	21,17	21,12	20,92	21,32	20,98	21,02	21,50
RDW (%)	16,75	10,83	15,33	15,43	15,83	15,08	15,87	16	44,00
Płytki krwi (G/l)	553,25	525,17	507,33	587,00	472,50	509,33	593,00	475	394,40
MPV (fl)	5,00	5,00	5,20	5,00	5,00	5,00	5,00	5,4	5,40
Rozmaz manualny wg Schillinga:									
Kwasochłonne (%)	1	1	2	1	2	2	1	5	1
Palczkowate (%)	1	1	1	1	1	1	3	1	1
Segmentowane (%)	40	44	16	56	34	32	46	22	35
Limfocyty (%)	56	52	77	40	61	63	48	70	61
Monocyty (%)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Zasadochłonne (%)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tab. 3. Badania mikrobiologiczne kału

Grupa	Czas pobrania	Bakterie ogólnie	Salmonella	Shigella	E. coli	Gronkowce	Clostridium perfringens
Grupa I	7. dzień życia	284344000	0	1243467	4393500	81767	134600
	30. dzień życia	12556667	17	187608	88000	242661	525
	60. dzień życia	8221667	167	63575	6392	81433	1778
Grupa II	7. dzień życia	112900000	0	505570	2190445	43256	212145
	30. dzień życia	70250000	0	837800	271020	115800	1500
	60. dzień życia	31135714	14	171944	67193	17486	1427
Grupa III	7. dzień życia	197054667	0	1968667	1606400	79853	649120
	30. dzień życia	22094000	0	213375	1220000	19488	1808
	60. dzień życia	35658000	0	65800	7000	51515	1804

Tab. 4. Badania parazytologiczne kału

Grupa	Czas pobrania	<i>Eimeria</i> sp. [OPG]	Strongylida [EPG]	<i>Cryptosporidium</i> sp. [+ / -]
Grupa I	7. dzień życia	0	0	-
	30. dzień życia	0	0	-
	60. dzień życia	30	3	-
Grupa II	7. dzień życia	30	7	-
	30. dzień życia	4	0	-
	60. dzień życia	10	7	-
Grupa III	7. dzień życia	20	0	-
	30. dzień życia	15	0	-
	60. dzień życia	10	3	-



Fot. 1 i 2. Grupa doświadczalna – cielęta rasy holsztyno-fryzyjskiej (I. Radkowska)

Zakład Hodowli Trzody Chlewnej Kierownik: dr hab. Mirosław Tyra, prof. IZ PIB

Zadanie 01-11-01-21

Poszukiwanie genetycznych mechanizmów zmienności u wysokoprodukcyjnych ras świń w zakresie cech użytkowych metodą RNA-SEQ

Kierownik zadania: dr hab. Mirosław Tyra, prof. IZ PIB

Celem zadania jest poszukiwanie genetycznych mechanizmów warunkowania zmienności w zakresie cech użytkowych metodą RNA-seq u świń oraz ocena możliwości ich wykorzystania w praktyce hodowlanej.

Zastosowana metoda oraz analizy statystyczne dadzą aktualnie najbardziej obiektywny obraz genetycznych mechanizmów warunkowania zmienności w obrębie analizowanych cech. Wytypowane tą drogą grupy genów poddane zostaną walidacji oraz analizie asocjacji, co da odpowiedź, czy geny te będzie można uznać za markery ważne z hodowlanego i gospodarczego punktu widzenia. Realizacja tej tematyki badawczej pozwala także na poznanie puli genowej odpowiedzialnej za warunkowanie zmienności krajowej populacji świń.

Planowane efekty naukowe i praktyczne:

- zastosowanie metody RNA-seq oraz przeprowadzone analizy statystyczne dadzą aktualnie najbardziej obiektywny obraz genetycznych mechanizmów warunkowania zmienności w obrębie analizowanych cech,
- umożliwienie pomiaru ekspresji genów w skali całego genomu, w tym dokładne określenie poziomu transkryptu genów ulegających niskiej ekspresji,
- uzyskanie przewagi w stosunku do techniki mikromacierzy cDNA poprzez wykrywanie nowych transkryptów lub izoform oraz detekcja nowych mutacji w sekwencjach kodujących,
- analiza sumarycznego oddziaływania całego spektrum genów na daną użytkowość (bardziej obiektywna niż dotychczasowe analizy wpływu pojedynczych genów),
- poznanie puli genowej odpowiedzialnej za zmienność krajowej populacji świń w zakresie analizowanych cech (ważnych z ekonomicznego, jak i konsumenckiego punktu widzenia).

Zastosowanie nowej metody analitycznej (RNA-seq) umożliwi najbardziej obiektywne poznanie genetycznych podstaw warunkujących wybrane cechy użytkowe i może posłużyć do opracowania nowoczesnych metod hodowlanych. Wykorzystanie tego narzędzia w nowoczesnej hodowli to bardziej efektywny dobór osobników do kojarzeń oparty na markerach genetycznych, znacznie przyspieszający postęp hodowlany w tym zakresie. To także nowoczesne narzędzie hodowlane w ręku Polskiego Związku Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS”, dające możliwości kreowania kierunków hodowlanych krajowej populacji zarodowej trzody chlewnej.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie

Badania wykonano na materiale pochodzącym ze Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh). Materiał do badań stanowiły loszki ras wbp, pbz. Zwierzęta utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywienie odbywało się w systemie *ad libitum* drobno granulowaną mieszanką o znanym i stałym składzie zadawaną z automatów. Ilość pobieranej paszy była ściśle kontrolowana. Pozostałe warunki utrzymania i postępowania ze zwierzętami były zgodne z dotychczasową metodyką oceny w stacjach kontroli. W okresie sprawozdawczym przekontrolowano 150 osobników wyżej wymienionych ras (64 szt. wbp i 86 szt. pbz). Łącznie, dla tych dwóch ras w ciągu dwóch lat prowadzenia doświadczenia posiadamy w bazie 572 osobniki (190 szt. wbp i 382 szt. pbz). Dla całej grupy zwierząt skompletowano dane uzyskiwane w czasie tuczu kontrolnego i dysekcji i były to następujące wskaźniki:

Dane z tuczu: przyrost dzienny w teście (od 30 kg do 100 kg), zużycie paszy w czasie testu (kg), zużycie paszy na kilogram przyrostu (kg), dzienne pobranie paszy (kg), wiek w dniu uboju (dni), ilość dni tuczu kontrolnego od 30 do 100 kg (dni).

Variable	Mean	Std Dev	Std Err	Var	Minimum	Maximum
PRZYROST	882.43	118.52	3.93	13.37	547.0	1375.0
PRZYZYC	573.14	78.32	2.53	13.63	429.0	882.0
PASZKG	2.72	0.277	0.013	8.39	1.41	4.44
PASZDZ	2.33	0.272	0.010	11.67	1.04	3.81
WIEKUB	171.56	21.23	0.742	12.41	118.00	237.00
DNITUCZU	81.34	10.12	0.368	12.44	52.00	131.00
PASZOG	183.11	22.17	0.778	12.11	100.00	319.50

Dane z dysekcji (cechy umięśnienia): wydajność rzeźna (%), masa polędwicy (kg), masa szynki zadniej (kg), masa szynki właściwej (kg), grubość mięśnia najdłuższego grzbietu (cm), szerokość oka polędwicy (cm), wysokość oka polędwicy (cm), powierzchnia oka polędwicy po planimetrowaniu obrysu (cm²), procent mięsa w wyrębach podstawowych (%), procent mięsa w tuszy (%), masy mięsa wyrębów podstawowych (kg), średnia grubość stoniny z 5 pomiarów (cm).

Var	Mean	Std Dev	Std Err	Variation	Minimum	Maximum
X1	103.51	2.412	0.103	2.33	94.00	120.0
X3	77.02	2.113	0.101	2.74	71.00	85.5
X9	7.59	0.721	0.022	9.49	5.68	10.62
X11	6.25	0.653	0.026	10.44	4.00	8.86
X18	9.42	0.634	0.023	7.73	7.18	11.78
X23	1.36	0.343	0.013	25.22	0.34	2.98
X27	55.45	7.87	0.256	14.19	38.30	85.00
X30	61.58	3.634	0.126	5.90	50.40	76.20
MWP	24.45	1.734	0.089	7.92	19.80	29.91

Licznie zgromadzony materiał odnośnie rasy pbz pozwolił na wytypowanie grup zwierząt zróżnicowanych pod względem następujących użytkowości: średniej grubości stoniny z 5 pomiarów, masy polędwicy bez stoniny i skóry oraz zużycia paszy na kilogram przyrostu. Cechy te powiązane były z gromadzonym materiałem biologicznym (odpowiednio tłuszczem podskórnym, próbkami mięśnia najdłuższego grzbietu, podwzgórzem), który poddany został analizom genetycznym. W ramach tych analiz dokonano izolacji RNA i jego oceny ilościowej i jakościowej. Następnie przygotowano biblioteki cDNA i miRNA, które także zostały poddane ocenie ilościowej i jakościowej.

W roku sprawozdawczym 2018 wszystkie przewidziane w metodyce próbki (próbki mięśnia najdłuższego grzbietu – *longissimus lumborum*, tłuszczu okrywowego oraz przysadki), pochodzące od świń rasy pbz zostały zsekwencjonowane metodą NGS – RNA-seq, a otrzymane wyniki przeanalizowano bioinformatycznie.

Zwierzęta do badań zostały wybrane z większej populacji (382 szt.) w celu uzyskania najbardziej skrajnych fenotypowo grup pod względem tych cech (Tab. powyżej). Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono w 81 jednokrotnych cyklach na platformie HiScanSQ (Illumina).

Po reakcji sekwencjonowania typu NGS próbki poddano analizie bioinformatycznej włączając analizę jakości i ilości uzyskanych surowych danych oraz porównania profilu ekspresji genów pomiędzy grupami w celu wytypowania genów o różnicowej ekspresji (DEGs). Geny o ekspresji różnicowej wytypowano za pomocą oprogramowania Deseq2 w oparciu o genom referencyjny świni domowej zamieszczony w bazie Ensembl (*Sus Scrofa* v.11.1). Mapowanie do genomu referencyjnego potwierdziło wysoką specyficzność metody. Około 90-95% uzyskanych sekwencji zostało zmapowane do genomu referencyjnego.

Analiza różnicowej ekspresji pod kątem wykorzystania paszy – przysadka

Analiza głównych składowych PCA (ang. principal component analysis, PCA) wykonana dla zsekwencjonowanych próbek przysadki potwierdziła, że próbki wytypowane w oparciu o parametr – wykorzystanie paszy na kilogram przyrostu – stanowiły dwie jednolite grupy oddalone od siebie pod względem profilu transkryptomicznego (Fig. 1).

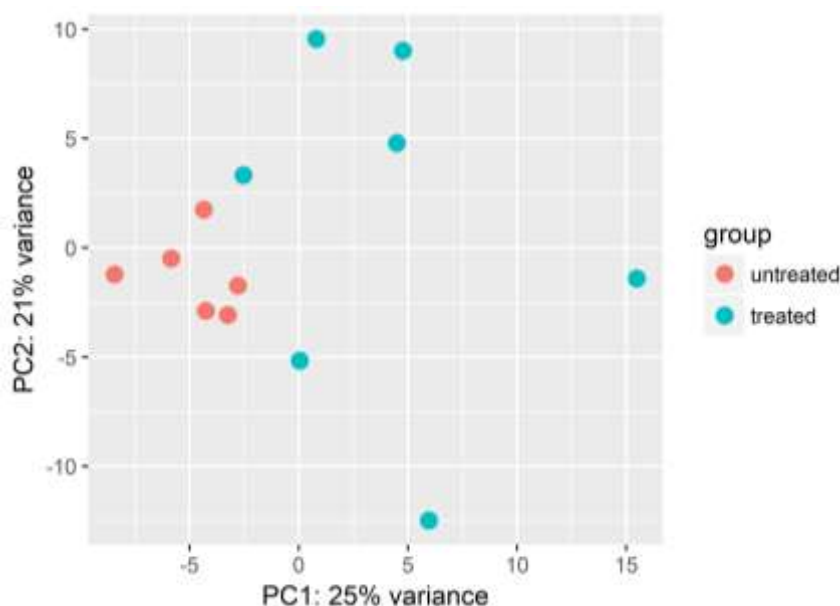


Fig. 1. Analiza PCA dla transkryptomu przysadki: świnie o wysokim (niebieskie punkty) i niskim (czerwone punkty) wykorzystaniu paszy (zużycie paszy na kilogram przyrostu kg/kg)

Zastosowanie metody RNA-seq pozwoliło na identyfikację 130 genów o różnicowej ekspresji (DEGs) między grupami świń o różnym poziomie wykorzystania paszy ($p_{adj} < 0,05$). Po wyższą grupę genów wykorzystano jako dane wejściowe do analizy szlaków molekularnych oraz procesów biologicznych, wykonaną przy użyciu oprogramowania STRING, KEGG, PANTHER oraz DAVID. Analiza wykazała, że aż 37 zidentyfikowanych genów zaangażowane jest w procesy komórkowe (ang. *cellular proces*; SP7; ELOVL2; SOX2; ELOVL2; PKP2; BMP7; GAB1). Drugą najliczniejszą grupę stanowiły geny związane z regulacją procesów metabolicznych (23 geny – SP7; ABCA9; CYP46A1; NOX3; MAP3K20; CHDH) (Fig. 3). Wykazano, że geny o różnicowej ekspresji najliczniej reprezentowały szlaki sygnałowe związane z metabolizmem, przewodnictwem impulsów poprzez synapsy oraz różnicowaniem i wzrostem komórek (Hippo signaling pathway oraz EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance).

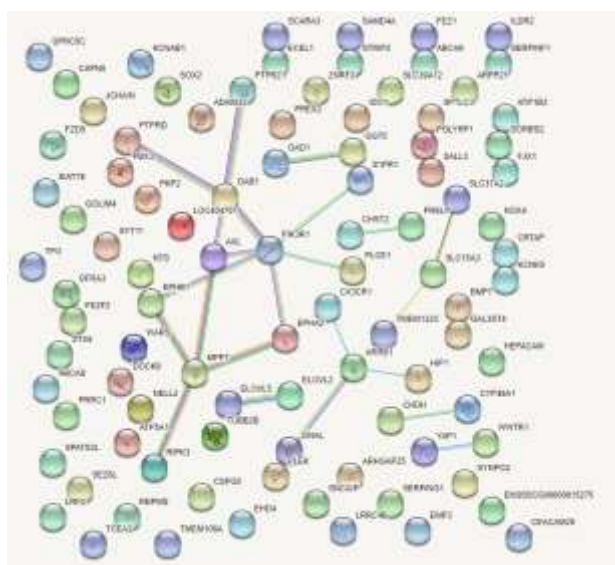


Fig. 2. Zidentyfikowane geny o różnicowej ekspresji pomiędzy wytypowanymi grupami świń (oprogramowanie - STRING: functional protein association networks, genom referencyjny Sus Scrofa 10.2)

Na podstawie analizy pełnionej funkcji biologicznej oraz zaangażowania w szlaki molekularne wybrano geny kandydujące jako potencjalnie związane z pobieraniem i wykorzystywaniem paszy:

1. PIK3R1 (PI3-Kinase Subunit P85-Alpha) – gen związany z regulacją pobierania pokarmu oraz sekrecją leptyny; prawdopodobnie gen ten odgrywa kluczową rolę w oporności na leptynę.
2. GAB1 (GRB2- Associated Binding Protein 1) – gen regulujący aktywność receptora insuliny (INSR).
3. SOX2 (transcription factor SOX-2) – białkowy produkt tego genu jest niezbędny do utrzymania komórek macierzystych w ośrodkowym układzie nerwowym, a także reguluje ekspresję genów w żółtku.
4. SYT11 (synaptotagmin 11) – gen odpowiadający za regulację zależnego od wapnia transportu błonowego w transmisji synaptycznej.
5. NTS (neurotensin) – gen koduje wspólny prekursor dla dwóch peptydów, neuromedyny N i neurotensyny. Neurotensyna jest wydzielanym tridekapeptydem, który jest szeroko rozpowszechniony w całym ośrodkowym układzie nerwowym i może działać jako neuroprzekaźnik lub neuromodulator. Może być zaangażowany w procesy związane z wahaniami poziomu dopaminy, w utrzymanie struktury i funkcji jelit oraz w regulację metabolizmu tłuszczów.

Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację genów, które mogą być związane z efektywnością wykorzystania paszy. Geny te w kolejnym etapie zostaną poddane analizie asocjacji z cechami tucznymi związanymi z efektywnością wykorzystania paszy w celu potwierdzenia ich wpływu na tą grupę cech użytkowych.

Zadanie 01-11-02-11

Poszukiwania markerów genetycznych i fenotypowych mających wpływ na poprawę wartości hodowlanej i użytkowej świń

Kierownik zadania: dr hab. Magdalena Szyndler-Nędza

Celem naukowym i praktycznym zadania jest określenie genetycznych, jak również fenotypowych markerów wczesnego szacowania potencjału rozrodczego i macicznego loch oraz określenie ich wpływu na cechy użytkowe świń.

Cel ten realizowany jest w dwóch celach szczegółowych:

1. Poszukiwanie markerów genetycznych i fenotypowych wczesnego szacowania potencjału rozrodczego loch, w ramach którego analizowany jest wpływ wybranych polimorfizmów genów związanych z budową i funkcjonowaniem układu rozrodczego na parametry morfometryczne układu rozrodczego loszek i loch i na wyniki ich użytkowości rozplodowej.
2. Poszukiwania markerów genetycznych laktogenezy loch oraz możliwości ich wykorzystania w doskonaleniu cech rozplodowych, którego celem jest poszukiwanie polimorfizmów w genach związanych z syntezą mleka, a także mogących wpływać na poziom laktozy w sianie i mleku oraz określenie ich wpływu na cechy użytkowe tych loch.

Założenia metodyczne

Badania prowadzone są dla loch ras matecznych i zachowawczych pochodzące z ferm zarodowych i produkcyjnych.

Dane do analiz statystycznych (w zależności od celu szczegółowego zadania) są zbierane na podstawie:

- pomiarów długości pochwy przy inseminacji,
- pomiarów morfometrycznych układu rozrodczego loch,
- cech użytkowości rozplodowej loch,
- zidentyfikowanego polimorfizmu wybranych genów.

Pobierany materiał biologiczny stanowić będzie:

- krew lub cebulki włosów do analiz polimorfizmów badanych genów,
- tkanki jajnika, jajowodu oraz rogu macicy.

Analizy laboratoryjne:

- identyfikacja nowych zmian polimorficznych w obrębie genów *HoxA* z wykorzystaniem urządzenia Eco Real Time PCR System (Illumina) i sekwenatora Backema Coulter,
- detekcja zmian polimorficznych w obrębie wybranych genów w reakcji PCR-RFLP,
- oszacowanie poziomu ekspresji wybranych genów metodą Real-Time PCR.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano przy pomocy programów statystycznych SAS i Statistica.

Syntetyczny opis wyników zadania

W ramach pierwszego celu szczegółowego w okresie sprawozdawczym kontynuowano pobieranie materiału biologicznego (szczecina z mieszkami włosowymi) od loch raz pbz, wbp, F1, złotnicka biała, złotnicka pstra oraz pomiary długości pochwy (VCL - Vagina Cervix Length) przy użyciu kateteru inseminacyjnego u loch przy pierwszym i kolejnych kryciach.

Kontynuowano również pomiary morfometryczne układu rozrodczego loch poddanych ubojowi oraz oznaczanie zmian polimorficznych dla mutacji genu *HOXA10* i *HOXA11*. W roku sprawozdawczym oznaczano również frekwencję genotypów genów *WNT5A*, *WNT7A* i *WNT10A*. W Tab. 1. przedstawiono analizy dotyczące frekwencji genotypów i alleli nowo zidentyfikowanych polimorfizmów genu *HOXA10* oraz dla genów *HOXA11* g.3786A>G, *WNT5A* g.605G>A, *WNT7A* g.6270A>G i *WNT10A* g.303C>T. W Tab. 2. zestawiono średnie wartości dla liczby prosiąt urodzonych i odchowanych do 21. dnia życia oraz pomiaru VCL w kolejnych miotach. Tab. 3. prezentuje średnie wyniki z pomiarów VCL wykonywanych kateterem inseminacyjnym oraz pomiarów z oceny morfometrycznej układu rozrodczego.

Tab. 1. Frekwencja genotypów i alleli genów HOXA10, HOXA11, WNT5A, WNT7A i WNT10A

Locus	Genotype			Allele		HW p-value
<i>HOXA10</i> g.45398502C>A	AA	AC	CC	A	C	0,3023
<i>HOXA10</i> g.45398508_45398509delinsCC	del/del	del/ins	ins/ins	del	ins	0,0001
<i>HOXA10</i> g.45398714C>G	GG	GC	CC	G	C	0,4390
<i>HOXA10</i> g.45398767G>A	AA	AG	GG	A	G	0,2240
<i>HOXA11</i> g.3786A>G	GG	AG	AA	G	A	0,0073
<i>WNT5A</i> g.605G>A	GG	AG	AA	G	A	0,6208

WNT10A g.303C>T	CC	CT	TT	C	T	
	0,59	0,33	0,08	0,76	0,24	0,0392
WNT7A g.6270A>G	GG	AG	AA	G	A	
	0,52	0,40	0,08	0,72	0,28	0,9624

Tab. 2. Średnie wartości dla liczby prosiąt urodzonych i odchowanych oraz pomiaru VCL w kolejnych miotach

Miot	Liczba prosiąt urodzonych (szt.)	Liczba prosiąt odchowanych (szt.)	Pomiar VCL przy kryciu (cm)
I	12,36	10,87	23,87
II	13,14	10,42	25,12
III	13,79	10,43	25,87
IV	14,18	9,46	27,45
V	13,82	9,75	28,11
VI	13,80	9,00	28,67

Tab. 3. Średnie wartości dla pomiaru VCL oraz pomiarów z oceny morfometrycznej układu rozrodczego ocenianego poubojowo

Cecha	Średnie wartości
VCL (cm)	38,21
Masa układu rozrodczego (kg)	1,96
Masa macicy (kg)	1,28
Masa jajnika prawego (kg)	0,01
Masa jajnika lewego (kg)	0,02
Długość pochwy (cm)	26,15
Długość trzonu macicy (cm)	25,92
Długość rogu prawego (cm)	117,83
Długość rogu lewego (cm)	119,73
Pojemność (ml)	2501,30

W ramach poszukiwań polimorfizmu w genach związanych z laktogenezą świń (cel drugi) na zgromadzonym materiale biologicznym przeprowadzono poszukiwania polimorfizmów w genach: receptora progesteronu *PGR*, którego wysoka ekspresja w komórkach jajnika i w jajowodzie wskazuje, że odgrywa istotną rolę w reprodukcji loch, w tym w wytwarzaniu mleka (Akison i Robker, 2012) oraz izoformy 2 enzymu dehydrogenazy 11β -hydroksysteroidowej (*HSD11 β 2*), której rolą jest ochrona receptoraminalokortykosteroidowego (MR) przed działaniem glikokortykosteroidów, co zapewnia utrzymanie prawidłowej gospodarki mineralokortykosteroidowej. Jest to najprawdopodobniej ewolucyjny mechanizm lepszej adaptacji organizmu do warunków stresowych. Badania pozwoliły na identyfikację w obrębie 2 egzonu genu *HSD11 β 2* dwóch mutacji – zmiany C>T będącej zmianą sensu (rs343355675) oraz zmiany cichej T>C (rs326322123). W locus genu *PGR* zidentyfikowano mutację T>A (rs343511161; ENS-SSCT00000016339.3:c.229T>A). Frekwencję genotypów i alleli oznaczonych polimorfizmów genów oraz P-value zgodnie z prawem Hardy'ego-Weinberga przedstawiono w Tab. 4.

Tab. 4. Frekwencja genotypów i alleli genów PGR (rs343511161), HSD11β2 mutacja cicha (rs326322123) i zmiany sensu (rs343355675) u loch ras wbp i pbz

		WBP				PBZ			
Gen	genotyp	Liczba loch	Frekwencja		H-W p-value	Liczba loch	Frekwencja		H-W p-value
		n	genotypu	alleli		n	genotypu	alleli	
PGR	AA	51	87,93	A 0,94	ns	49	75,38	A 0,87	ns
	TA	7	12,07			15	23,08		
	TT	-	-	G 0,06		1	1,54	G 0,13	
HSD11β2 cicha	CC	6	10,71	C 0,26	ns	-	-	C 0,09	ns
	TC	17	30,36			11	17,19		
	TT	33	58,93	T 0,74		53	82,81	T 0,91	
HSD11β2 Zmiany sensu	CC	53	92,98	C 0,96	ns	56	87,5	C 0,94	ns
	TC	4	7,02			8	12,5		
	TT	-	-	T 0,04		-	-	T 0,06	

Zebrane dane poddano analizie statystycznej w celu określenia wpływu zidentyfikowanych polimorfizmów genów na wydajność mleczną loch (wyd. ml). Przeprowadzono również wstępne analizy określające wpływ polimorfizmów genów na skład siary i mleka loch, a także wyniki odchowu prosiąt. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, gdzie gen był efektem głównym, a rasa efektem losowym.

Zgromadzone w ramach pierwszego i drugiego celu badawczego dane fenotypowe i genetyczne poddano wstępnej analizie statystycznej. Wykazano, że w kolejnych kryciach średnie wartości pomiaru VCL wzrastały od 23,87 cm przy kryciu pierwszym do 28,67 cm przy kryciu przed miotem VI. Na podstawie pomiarów z oceny morfometrycznej układu rozrodczego stwierdzono, że długość pomiaru VCL loch wahała się od 18 do 49 cm. Wykazano też, że analizowane polimorfizmy w genie *PGR* i *HSD11B2* (rs343355675) miały istotny wpływ jedynie na niektóre parametry siary i mleka loch, co prawdopodobnie przełożyło się na brak istotnego wpływu na wyniki odchowu prosiąt. W przypadku polimorfizmu w genie *HSD11B2* (rs326322123) stwierdzono istotny wpływ na zawartość przede wszystkim tłuszczu w siarze i w mleku z całej laktacji oraz suchej masy w mleku z całej laktacji, a także na wyniki odchowu prosiąt. Prosięta odchowywane przy lochach o genotypie *HSD11B2*^{CC} uzyskały istotnie niższą masę ciała aniżeli prosięta odchowywane przez lochy o genotypie *HSD11B2*^{TT}. Ponadto stwierdzono, że dla niektórych analizowanych cech występuje statystycznie istotna interakcja pomiędzy polimorfizmem genu a rasą, dlatego konieczne jest przeprowadzenie dalszych analiz statystycznych.

Uogólnienia potwierdzające osiągnięcie założonego celu zadania

W roku 2018 w ramach zadania kontynuowano pobieranie materiału biologicznego (szczecina z mieszkami włosowymi) od loch raz pbz, wbp, F1, złotnicka biała, złotnicka pstra oraz pomiary długości pochwy (VCL – Vagina Cervix Length) przy użyciu kateteru inseminacyjnego u loch przy pierwszym i kolejnych kryciach. Kontynuowano również pomiary morfometryczne układu rozrodczego loch poddanych ubojowi oraz wykonano oznaczanie zmian polimorficznych dla mutacji genu *HOXA10* i *HOXA11*, a także określono frekwencję genotypów genów *WNT5A*, *WNT7A* i *WNT10A*.

W efekcie prowadzonych prac związanych z laktogenezą świń zidentyfikowano w obrębie 2 egzonu genu HSD11B2 dwie mutacje – zmiany C>T będącej zmianą sensu (rs343355675) oraz zmiany cichej T>C (rs326322123). Z kolei w locus genu PGR zidentyfikowano mutację T>A (rs343511161; ENSSTCT00000016339.3:c.229T>A).

Zgromadzone w ramach pierwszego i drugiego celu badawczego dane fenotypowe i genetyczne poddano wstępnej analizie statystycznej.

Zakład Hodowli Drobiu Kierownik: dr hab. Katarzyna Połtowicz

Zadanie 01-12-01-21

Wpływ ekspresji genów FADS1, FADS2, ELOVL2 i ELOVL5 na jakość mięsa kurcząt brojlerów w zależności od sposobu żywienia i długości stosowania mieszanek paszowych wzbogaconych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe

Kierownik zadania: dr inż. Joanna Nowak

Celem zadania jest określenie związku między oznaczonym poziomem transkryptu dla genów kodujących wybrane elongazy (ELOVL2 i ELOVL5) i desaturazy (FADS1 i FADS2) kwasów tłuszczowych a profilem kwasów tłuszczowych oraz jakością mięsa kurcząt w zależności od sposobu żywienia i długości stosowania mieszanek paszowych wzbogaconych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

Nazwa etapu: Wpływ długości stosowania mieszanki paszowej wzbogaconej w wielonienasycone kwasy tłuszczowe na wskaźniki lipidowe krwi oraz skład chemiczny mięsa kurcząt.

Materiał i metody

W poprzednim roku kurczęta odchowano według metodyki, materiał doświadczalny stanowiły kurczęta brojlery linii Ross 308. W mieszkankach dla kurcząt grupy I źródłem tłuszczu był wyłącznie tój wołowy, natomiast ptaki z grupy II, III i IV od 15. dnia życia żywiono mieszankami wzbogaconymi w wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 i n-9 pochodzące z oleju lnianego. Grupa II otrzymywała mieszanki z olejem lnianym przez 2 tygodnie, grupa III przez 3 tygodnie, a grupa IV przez 4 tygodnie odchowu. Poza tym czasem kurczęta z grup doświadczalnych żywiono tak jak ptaki z grupy kontrolnej.

Bieżący etap badań obejmował oznaczenie wskaźników lipidowych (trójglicerydy, cholesterol całkowity, cholesterol we frakcji HDL i LDL). Ponadto w mięsie pozyskanym od 70 ptaków oznaczono podstawowy skład chemiczny: sucha masa, białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy oraz zawartość cholesterolu i profil wyższych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mięśniowym. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy pomocy programu *Statistica 13*.

Wyniki

35-dniowe kurczęta brojlery

Tab. 1. Wskaźniki lipidowe krwi 35-dniowych kurcząt brojlerów

Cecha (mmol/l)	Grupa			SEM
	I	II	III	
Cholesterol całkowity	3,73 a	3,56	3,37 b	0,07
HDL	3,04	3,02	2,97	0,06
LDL	1,09 A	0,97	0,81 B	0,03
Trójglicerydy	0,78 A	0,72	0,64 B	0,02

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami ab różnią się przy $P \leq 0,05$; AB przy $\leq 0,01$

Kurczęta otrzymujące w mieszankach olej lniany przez 3 tygodnie (grupa III) charakteryzowały się istotnie niższym poziomem trójglicerydów ($P \leq 0,01$) i cholesterolu całkowitego ($P \leq 0,05$) oraz cholesterolu we frakcji LDL ($P \leq 0,05$), w porównaniu z kurczętami otrzymującymi mieszankę paszową wyłącznie z dodatkiem tłuszczu zwierzęcego (grupa I; Tab. 1). Badania wykazały, że spośród ptaków żywionych mieszanką z dodatkiem tłuszczu roślinnego te, które były dłużej żywione taką mieszanką dłużej o 1 tydzień charakteryzowały się niższym poziomem wszystkich analizowanych parametrów krwi. Różnice te nie zostały jednak potwierdzone statystycznie.

Tab. 2. Skład chemiczny i zawartość cholesterolu w mięśniach piersiowych 35-dniowych kurcząt

Cecha	Grupa			SEM
	I	II	III	
Sucha masa (%)	23,37 a	24,45 b	24,51 b	0,19
Białko ogólne (%)	21,06 a	22,47 b	22,46 b	0,24
Tłuszcz surowy (%)	1,92	1,85	1,78	0,04
Popiół surowy (%)	1,13	1,14	1,14	0,01
Cholesterol (mg/g)	0,92 A	0,79 B	0,77 B	0,02

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami ab różnią się przy $P \leq 0,05$; AB przy $\leq 0,01$

Rodzaj zastosowanego tłuszczu w mieszankach paszowych miał istotny wpływ na skład chemiczny i zawartość cholesterolu w mięśniach piersiowych 35-dniowych kurcząt (Tab. 2). Istotnie wyższą zawartością wody i cholesterolu oraz niższym poziomem białka ogólnego charakteryzowały się mięśnie kurcząt żywionych paszą z dodatkiem tłuszczu zwierzęcego, w porównaniu do mięśni ptaków otrzymujących w mieszankach olej lniany (gr. I i II). Stwierdzono również tendencję do wyższego poziomu tłuszczu surowego w mięśniach kurcząt należących do grupy I ($P > 0,05$).

Badania wykazały obniżenie udziału nasyconych (SFA) i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w lipidach mięśni piersiowych kurcząt należących do grup II oraz III w porównaniu do grupy I. Olej lniany jako źródło tłuszczu w mieszance paszowej podawanej przez 3 tygodnie odchowu (gr. III) charakteryzował się najwyższą efektywnością w redukowaniu ($P \leq 0,01$) poziomu MUFA i SFA. Lipidy mięśni piersiowych kurcząt żywionych paszą z olejem lnianym zawierały istotnie więcej ($P \leq 0,01$) wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), niż lipidy mięśni kurcząt otrzymujących w mieszankach tłuszcz zwierzęcy (gr. I). Ponadto w lipidach

mięśni kurcząt żywionych paszą z dodatkiem tłuszczu roślinnego, wielonienasycone kwasy tłuszczowe występowały w korzystniejszym, niższym ($P \leq 0,01$) stosunku PUFA n-6/n-3 niż w lipidach mięśni ptaków otrzymujących w paszy tłuszcz zwierzęcy (8,87). Im dłużej kurczęta otrzymywały w mieszankach olej lniany, tym stosunek PUFA n-6/n-3 był niższy ($P \leq 0,01$). Stosunek ten w II i III grupie wynosił odpowiednio 1,44 i 0,81. W porównaniu z grupą I, w lipidach mięśni kurcząt pozostałych grup odnotowano istotny wzrost kwasu linolowego (LA) i α -linolenowego (ALA), jak również wzrost kwasów: dokozaheksaenowego (DHA) i eikozopentaenowego (EPA), a obserwowany wzrost był tym większy, im dłużej ptaki otrzymywały mieszanki z olejem lnianym. Mięśnie kurcząt należących do grupy II i III zawierały natomiast istotnie ($P \leq 0,01$) mniej γ -linolenowego (GLA) i kwasu arachidonowego (AA).

42-dniowe kurczęta brojlery

Tab. 3. Wskaźniki lipidowe krwi 42-dniowych kurcząt brojlerów

Cecha (mmol/l)	Grupa				SEM
	I	II	III	IV	
Cholesterol całkowity	3,60 a	3,41	3,28	3,07 b	0,07
HDL	2,72 a	2,61	2,50	2,37 b	0,05
LDL	0,73	0,74	0,77	0,79	0,04
Trójglicerydy	0,74 A	0,56 B	0,52 B	0,54 B	0,03

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami ab różnią się przy $P \leq 0,05$; AB przy $\leq 0,01$

Uzyskane wyniki wskazują na to, że im dłużej kurczęta były żywione mieszankami z dodatkiem oleju lnianego, tym poziom cholesterolu całkowitego i cholesterolu we frakcji HDL we krwi był niższy (Tab. 3). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie ($P > 0,05$). Wykazano natomiast we krwi kurcząt otrzymujących w mieszankach olej lniany przez 4 tygodnie (grupa IV) statystycznie istotnie niższy poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu we frakcji HDL oraz trójglicerydów, w porównaniu z kurczętami otrzymującymi mieszankę paszową wyłącznie z dodatkiem tłuszczu zwierzęcego (grupa I, przy $P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$). Ponadto kurczęta otrzymujące w mieszankach olej lniany przez 2 lub 3 tygodnie charakteryzowały się istotnie niższym poziomem trójglicerydów w zestawieniu z ptakami z grupy I ($P \leq 0,01$). Nie stwierdzono zmian w poziomie cholesterolu we frakcji LDL.

Tab. 4. Skład chemiczny i zawartość cholesterolu w mięśniach piersiowych 42-dniowych kurcząt

Cecha	Grupa				SEM
	I	II	III	IV	
Sucha masa (%)	24,04	24,40	24,31	24,25	0,14
Białko ogólne (%)	21,33 a	21,93	22,24 b	22,34 b	0,15
Tłuszcz surowy (%)	2,49 a	2,08	2,11	1,91 b	0,08
Popiół surowy (%)	1,14	1,13	1,15	1,14	0,01
Cholesterol (mg/g)	0,80 a	0,71 b	0,74	0,74	0,02

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami ab różnią się przy $P \leq 0,05$; AB przy $\leq 0,01$

Mięśnie piersiowe badanych kurcząt różniły się pod względem składu chemicznego. Istotnie wyższym udziałem białka ogólnego charakteryzowały się mięśnie kurcząt otrzymujących w mieszankach olej lniany przez 3 i 4 tygodnie (gr. III i IV), w porównaniu do mięśni ptaków żywionych paszą z dodatkiem tłuszczu zwierzęcego (gr. I; $P \leq 0,05$; Tab. 4). Mięśnie kurcząt należących do grupy I charakteryzowały się najwyższym poziomem tłuszczu surowego, a statystycznie istotne różnice wykazano jedynie w zestawieniu z grupą IV ($P \leq 0,05$). Równocześnie mięśnie kurcząt należących do grupy I charakteryzowały się najwyższym poziomem cholesterolu, a istotne różnice wykazano w zestawieniu z mięśniami ptaków, które otrzymywały w mieszankach olej lniany przez 2 tygodnie (gr. II; $P \leq 0,05$). Nie stwierdzono natomiast różnic w zawartości wody (suchej masy) i popiołu surowego.

Dane przedstawione w Tab. 8 wskazują, że lipidy mięśni piersiowych kurcząt żywionych paszą z olejem lnianym (gr. II, III i IV) zawierały istotnie mniej nasyconych (SFA) i jednonienasyconych (MUFA) kwasów tłuszczowych oraz więcej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) niż lipidy mięśni kurcząt otrzymujących w mieszankach tłuszcz zwierzęcy (gr. I; $P \leq 0,01$). Ponadto, im dłużej ptaki otrzymywały w mieszance tłuszcz roślinny, tym lipidy mięśni zawierały istotnie mniej kwasów SFA i MUFA, a więcej kwasów PUFA ($P \leq 0,05$). W lipidach mięśni kurcząt żywionych paszą z dodatkiem tłuszczu roślinnego, wielonienasycone kwasy tłuszczowe występowały w korzystniejszym, statystycznie istotnie niższym stosunku PUFA n-6/n-3, niż w lipidach mięśni ptaków otrzymujących w paszy tłuszcz zwierzęcy (7,17). Im dłużej kurczęta otrzymywały w mieszankach olej lniany, tym stosunek PUFA n-6/n-3 był niższy ($P \leq 0,01$). Stosunek ten w II, III i IV grupie wynosił odpowiednio 3,06; 1,13 i 0,71. W porównaniu z grupą I, w lipidach mięśni kurcząt pozostałych grup odnotowano istotny wzrost kwasu α -linolenowego (ALA) oraz eikozopentaenowego (EPA), a był on tym większy, im dłużej ptaki otrzymywały mieszanki z olejem lnianym ($P \leq 0,01$). Wykazano również istotny wzrost ($P \leq 0,01$) udziału kwasu dokozaheksaenowego (DHA) w lipidach mięśni piersiowych ptaków, które otrzymywały w mieszankach olej lniany, w porównaniu do ptaków otrzymujących mieszanki z tłuszczem zwierzęcym (grupa I). Mięśnie piersiowe kurcząt grup II, III i IV zawierały więcej kwasu linolowego (LA) w porównaniu do grupy I, a różnice potwierdzono statystycznie pomiędzy grupą I a IV ($P \leq 0,05$). W porównaniu z grupą I, w lipidach mięśni kurcząt pozostałych grup odnotowano istotny spadek kwasu γ -linolenowego (GLA), a był on tym większy, im dłużej ptaki otrzymywały mieszanki z olejem lnianym. Dodatkowo mięśnie piersiowe kurcząt należących do grupy III i IV zawierały istotnie mniej kwasu arachidonowego (AA) w porównaniu do grupy I ($P \leq 0,05$).

Podsumowanie

Z przeprowadzonych badań wynika, że rodzaj zastosowanego tłuszczu w mieszankach paszowych miał istotny wpływ na poziom wskaźników lipidowych we krwi oraz skład chemiczny i zawartość cholesterolu w mięśniach piersiowych 35 i 42-dniowych kurcząt brojlerów. Spośród ptaków otrzymujących w mieszankach olej lniany najlepszą wartością odżywczą mięśni piersiowych charakteryzowały się mięśnie ptaków żywionych paszą z olejem przez 3 (35-dniowe) lub 4 (42-dniowe) tygodnie odchowu. Ponadto rodzaj zastosowanego tłuszczu w mieszankach paszowych miał istotny wpływ na profil wyższych kwasów tłuszczowych w mięsie kurcząt. Wraz ze wzrostem długości podawania kurczętom paszy z olejem lnianym istotnie zwiększa się udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w mięsie drobiowym i korzystnie zawęża stosunek PUFA n-6/n-3.

W kolejnym etapie zostanie określony poziom ekspresji genów kodujących delta-5 i delta-6 desaturazę kwasów tłuszczowych (*FADS1* i *FADS2*) oraz elongazę 2 i 5 kwasów tłuszczowych (*ELOVL2* i *ELOVL5*) w wątrobie i mięśniach piersiowych kurcząt.

Zadanie 01-12-02-11

Wpływ genotypu na jakość mięsa kapłonów i pulard

Kierownik zadania: prof. dr hab. Józefa Krawczyk

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu genotypu na jakość mięsa kapłonów i pulard.

Kapłony

W ostatnich latach konsumenci w trosce o racjonalne odżywianie coraz częściej poszukują produktów wolnych od skażenia mikrobiologicznego i chemicznego, bogatych w składniki odżywcze, zwłaszcza pełnowartościowego białka oraz wyróżniających się pożądanymi cechami sensorycznymi. Dużą trudność w powiązaniu nieśnego użytkowania kur z wykorzystaniem ich dla potrzeb produkcji mięsa, sprawia wzrastająca w miarę intensyfikacji kierunku nieśnego liczba zbędnych kogutków, a rozwiązaniem tych trudności może być zabieg kastracji kogutków.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu genotypu na jakość mięsa kapłonów.

Materiał doświadczalny stanowiły mieszańce pochodzące z następujących kojarzeń:

- koguty mięsne Ross 308 oraz kury Rhode Island Red R-11 – doświadczenie I,
- koguty mięsne Ross 308 oraz kury Żółtonóżki kuropatwiane Ż-33 – doświadczenie II,
- koguty Rhode Island Red (R-11) oraz kury Żółtonóżki kuropatwiane Ż-33 – doświadczenie III.



Fot. 1. Kapłony Ross 308 x R-11



Fot. 2. Kapłon Ross 308 x Ż-3



Fot. 3. Kapłon R-11 x Ż-33

Zabieg kastracji przeprowadził lekarz weterynarii w 8. tygodniu życia, przy masie ciała ok. 600 g. Ptaki utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 szt./m². Przez cały okres odchowu i tuczu ptaki żywione były *ad libitum* mieszankami paszowymi według receptur opracowanych w Instytucie Zootechniki PIB, w których przez ostatnie 4 tygodnie tuczu wprowadzono 4% dodatek serwatki (doświadczenie I) oraz 4% dodatek mleka (doświadczenie 1-3).

W żywieniu zastosowano tryfazowy program żywienia:

- mieszanka I – tj. od 1. dnia do 7. tygodnia, mieszanka sypka o zawartości: 204 g białka i 11,92 MJ/kg,
- mieszanka II – tj. od 8. do 16. tygodnia życia, mieszanka sypka o zawartości: 184 g białka i 12,05 MJ/kg,
- mieszanka III – tj. od 17. do 20. tygodnia życia o zawartości: 165 g białka i 12,18 MJ/kg w układzie:

- mieszanka zbożowo-sojowa, granulata,
- mieszanka z 4% dodatkiem mleka, granulata.

Tuczący kapłonów/kogutów trwał do 20. tygodnia życia. Po uboju oceniono wydajność rzeźną oraz fizyko-chemiczne cechy mięsa (pH, barwę CIE L*a*b*, WHC, wyciek swobodny, straty termiczne, kruchość, a także skład chemiczny) oraz przeprowadzono ocenę sensoryczną.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największą masą ciała oraz najkorzystniejszymi parametrami jakości mięsa wyróżniły się mieszańce: Ross 308 x R-11 oraz Ross 308 x Ż-33. Zabieg kastracji kogutów, a zwłaszcza żywionych przez 4 ostatnie tygodnie tuczu paszą z 4-procentowym dodatkiem mleka wpłynął korzystnie na masę ciała, wydajność rzeźną i umięśnienie tuszek. Mięśnie piersiowe i nóg kapłonów wyróżniły się lepszą wodochłonnością i kruchością oraz oceną chemiczną i sensoryczną, w porównaniu do niekastrowanych kogutów. Mięso kapłonów może być atrakcyjnym surowcem w tradycyjnej polskiej kuchni i uzupełniać produkcję mięsa drobiowego o produkt niszowy dla konsumentów poszukujących produktów o specyficznej jakości. Ponadto zabieg kastracji może przyczynić się do zagospodarowania nadliczbowych kogutów, co ma dodatkowo aspekt ekonomiczny.

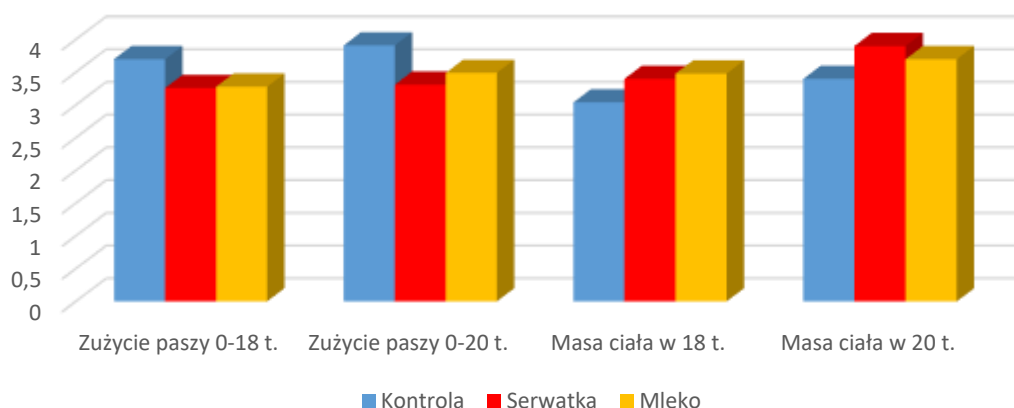
Pulardy

W 2018 roku opracowywano wyniki III etapu badań dotyczących produkcji pulard, prowadzonych w ZD IZ PIB Chorzów sp. z o.o. Celem badań była ocena wpływu żywienia w końcowym okresie odchowu oraz wieku uboju pulard na produkcyjność, wydajność rzeźną, barwę tuszek i właściwości fizykochemiczne mięsa. Badaniami objęto 78 sztuk mieszańców oznaczonych symbolem ♂Ross 308 x ♀R-11, uzyskanych ze skrzyżowania kogutów mięsnych Ross 308 z kurami nieśnymi, ogólnoużytkowymi Rhode Island Red (R-11). Ptaki podzielono na 3 grupy: kontrolną (K), żywioną mieszankami startet, grower i finiszera bez dodatku nabiału, doświadczalną (S), żywioną mieszanką finiszera z 4-procentowym dodatkiem serwatki oraz grupę doświadczalną (M) z 4-procentowym dodatkiem mleka w proszku w końcowym okresie odchowu. Zabieg sterylizacji kurek wykonano w 8. tygodniu życia. Ubój pulard przeprowadzono w 18. i 20. tygodniu życia.



Fot. 1. Pularda ♂Ross 308 x ♀R-11

Ryc. 1. Zużycie paszy (kg/1 kg przyrostu) i masa ciała (kg) pulard w 18. i 20. tygodniu życia



W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wykorzystując do produkcji pulard mieszańce kur ogólnoużytkowych z kogutami mięsnymi można skrócić okres odchowu do 18 tygodni, uzyskując równocześnie mięso o porównywalnych lub nawet lepszych cechach jakości w porównaniu do pulard ubijanych w 20. tygodniu.

Zastosowanie w ostatniej fazie żywienia pulard 4-procentowym dodatku serwatki lub mleka w proszku wpłynęło korzystnie głównie na poprawę cech sensorycznych, przy czym nie odnotowano wielu istotnych różnic w jakości mięsa między pulardami żywionymi mieszanką z dodatkiem mleka a dodatkiem serwatki, a raczej między tymi grupami a grupą kontrolną.

Zadanie 01-12-03-12

Ocena właściwości fizycznych i chemicznych jaj wybranych populacji drobiu wodnego utrzymywanego w Polsce

Kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

Celem podjętych badań była ocena bioróżnorodności drobiu wodnego na podstawie określenia fizykochemicznych cech jaj pochodzących ze stad hodowlanych, objętych programem ochrony zasobów genetycznych zwierząt oraz komercyjnych utrzymywanego w Polsce, w powiązaniu z wynikami wylęgowości.

Ptaki utrzymywane były w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach należącej do IZ PIB ZD Kołuda Wielka. Przez cały okres badawczy kaczk i gęsi żywione były do woli jednakowymi mieszankami paszowymi o znanej wartości pokarmowej, odpowiedniej dla danego okresu wzrostu. Warunki technologiczne w trakcie odchowu ptaków były zgodne z ogólnymi założeniami dla tego typu produkcji. Badania cech fizycznych i chemicznych jaj przeprowadzono w pracowni SZGDW w Dworzyskach oraz w Zakładzie Wylęgowym, gdzie przeprowadzono wylęgi.

Zgodnie z założoną metodyką jaja do badań pozyskane zostały losowo – po 30 sztuk jaj z każdej grupy doświadczalnej ptaków będących w początkowym okresie produkcji nieśnej (3-4 tygodnie nieśności).

Pośród analizowanych grup doświadczalnych kaczek jaja ptaków D-11 odznaczały się najkorzystniejszymi cechami fizycznymi. Wyróżniała je największa masa (99,96 g), najkorzystniejsze parametry białka (największa masa – 45,40 g; wysokość – 7,82 mm, JH – 83,09) i żółtka (naj-

większa masa – 36,77 g, najciemniejsze wybarwienie – 5,67 pkt). Skorupy tych jaj charakteryzowały się największą masą (17,79 g), gęstością (173,7 mg/cm²) i powierzchnią (101,9 cm²). Ponadto w białku tych jaj wykazano najmniejszą zawartość oraz aktywność enzymatyczną lizozymu ukształtowaną na poziomie 0,12% i 25577 U/ml w przypadku białka rzadkiego oraz 0,08% i 18372 U/ml w przypadku białka gęstego. Z kolei jaja kaczek komercyjnego stada Star 53 H.Y. wyróżniały się największym procentowym udziałem białka w jajach (52,62%) przy jednocześnie najmniej korzystnych jego parametrach fizycznych – najmniejszej wysokości (5,22 mm) i jednostkach Haugha (62,11). Stado ptaków LsA wyróżniało się największą ($p \leq 0,05$) ilością zapłodnionych jaj, ukształtowaną na poziomie 97,01% oraz największą ilością piskląt zdrowych z jaj nałożonych (76,14%).



Fot. 1. Para kaczek D-11



Fot. 2. Zróżnicowanie jaj kaczek pochodzących ze stad objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt



Fot. 3. Pomiar okształtowania elastycznego skorupy jaj doświadczalnych grup ptaków

W przypadku doświadczalnych stad gęsi, najcięższymi jajami (187,7 g) o największej masie żółtka (74,87 g) charakteryzowały się gęsi kubańskie (Ku). Jaja te ponadto wyróżniały się najciemniej wybarwioną skorupą (70,50% bieli) o największej jej porowatości (18,66 porów/cm²) i powierzchni (154,6 cm²). Z kolei białka jaj gęsi rypińskiej (Ry) odznaczały się najkorzystniejszymi ($p \leq 0,05$) właściwościami fizycznymi, tj.: największą wysokością (11,50 mm) oraz jednostkami Haugha (87,28). Najwyższą procentową zawartość lizozymu w białku rzadkim (0,22%) i gęstym (0,12%) i jego aktywność hydrolityczną ukształtowaną odpowiednio na poziomie 47549 i 24958 U/ml wykazano w białku jaj pochodzących ze stada rodzicielskiego mieszańców towarowych W-31. Stado gęsi słowackich (Sł) cechowało się największą ilością zapłodnionych jaj (96,83%) a romańskich (Ro) odznaczało się najmniejszą ilością piskląt niewyklutych (5,10%) oraz największą piskląt zdrowych z jaj zapłodnionych (88,96) i nałożonych (85,20%). Stwierdzono różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).



Fot. 4. Para gęsi kubańskich (Ku)



Fot. 5. Pomiar porowatości skorupy jaj doświadczalnych grup ptaków

Zadanie 01-12-04-11

Technopatie i stereotypie w aspekcie dobrostanu zwierząt gospodarskich

Kierownik zadania: prof. dr hab. Eugeniusz Herbut

Celem głównym zadania jest określenie wpływu warunków chowu na występowanie technopatii w aspekcie dobrostanu, parametrów fizjologicznych i produkcyjnych drobiu, świń oraz bydła.

Cel szczegółowy 1 „Wpływ zabiegów technologicznych i systemów utrzymania na kształtowanie się zdrowotnych i produkcyjnych wskaźników dobrostanu kur nieśnych”.

W 2018 roku przeprowadzono doświadczenie określające wpływ zabiegów technologicznych na występowanie pterofagii i poziom dobrostanu kur nieśnych. Materiał doświadczalny stanowiło 360 sztuk kur nieśnych Hy-Line, które przydzielono do 2 grup doświadczalnych: kury z przyciętym oraz bez przyciętego dzioba. Ptaki w obydwu grupach utrzymywano w systemie ściółkowym bezwybiegowym, o obsadzie 9 szt./m² i żywiono do woli standardowymi mieszankami paszowymi. Podczas doświadczenia zbierano wyniki produkcyjne ptaków, oceniano stan kończyn i upierzenia oraz wady skrócenia dziobów ptaków. Przeprowadzono także pomiary wypreparowanych kości kończyn, a także określono w nich zawartość wapnia, fosforu i popiołu. Pobrano również krew, w której oznaczono wskaźniki stresu, kościotworzenia oraz resorpcji kości, a także poziom hormonów płciowych. Przeprowadzono także obserwacje behawioralne. Zebrane wyniki opracowano statystycznie.

Kury nieśne bez przyciętego dzioba (grupa II) charakteryzowały się większym wykorzystaniem paszy na 1 jajo oraz 1 kg jaj w porównaniu z kurami z przyciętym dziobem (grupa I). Nieśność ptaków w obydwu grupach kształtowała się na podobnym poziomie. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w poziomie parametrów krwi pobranej w 24. tygodniu doświadczenia. Również zawartość wapnia i fosforu we krwi pobranej od ptaków z grupy I i II w 64. tygodniu odchowu kształtowała się na podobnym poziomie. Nie stwierdzono także statystycznie istotnych różnic w wynikach pomiaru wypreparowanych kości od kur z przyciętymi i bez przyciętymi dziobów.

Tab. 1. Poziom parametrów krwi kur nieśnych

Wyszczególnienie	Grupa		SEM
	I	II	
24. tydzień odchowu			
H:L	1,04	1,18	0,11
Fosfataza zasadowa (U/L)	443,04	390,99	31,89
Fosfor (mmol/l)	1,42	1,35	0,09
Wapń (mmol/l)	4,56	4,43	0,14
64. tydzień odchowu			
Fosfor (mmol/l)	1,48	1,40	0,10
Wapń (mmol/l)	3,98	4,17	0,21

Cel szczegółowy 2 „Wpływ pochodzenia i wielkości stadka na kształtowanie się wskaźników zdrowotnych i produkcyjnych kur różnych ras”.

Przeprowadzono doświadczenie, którego celem było określenie wpływu rasy kur na występowanie technopatii i stereotypii w aspekcie dobrostanu i produktywności. Materiał doświadczalny stanowiły kury rodzimych ras: Leghorn, Sussex oraz Rhode Island Red, w ilości 300 sztuk, które przydzielono do trzech grup doświadczalnych. Kury utrzymywano w systemie ściółkowym, bezwybiegowym o obsadzie 9 szt./m² od 16. do 64 tyg. życia na fermie drobiu w Aleksandrowicach. Kury żywiono do woli standardowymi mieszankami paszowymi sporządzonymi na bazie koncentratów. Przez cały okres odchowu ptaki miały swobodny dostęp do wody. Podczas doświadczenia zbierano wyniki produkcyjne ptaków, oceniano stan kończyn i upierzenia oraz wady skrócenia dziobów ptaków. Przeprowadzono także pomiary wypreparowanych kości kończyn, a także określono w nich zawartość wapnia, fosforu i popiołu. Pobrano również krew, w której oznaczono wskaźniki stresu, kościotworzenia oraz resorpcji kości oraz poziom hormonów płciowych. Przeprowadzono także obserwacje behawioralne. Zebrane wyniki opracowano statystycznie.

Najniższą średnią nieśnością przez cały okres odchowu oraz najmniejszą masą jaj i najgorszym wykorzystaniem paszy charakteryzowały się kury rasy Sussex, najlepsze wyniki uzyskały zaś kury rasy Leghorn. Najwyższy poziom fosforu we krwi w 64. tygodniu odchowu stwierdzono u kur rasy RIR, najniższy zaś u rasy Sussex. W 64. tygodniu kości wypreparowane od kur rasy RIR odznaczały się większą wagą, szerokością i gęstością w porównaniu z kośćmi wypreparowanymi od kur rasy Leghorn.

Tab. 2. Wyniki pomiaru kości kur w 64. tygodniu odchowu

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	Leghorn	Sussex	RIR	
Kość ramienia				
Waga (g)	4,67 A	5,14 a	5,88 Bb	0,16
Długość (mm)	79,91 a	79,03 A	82,42 Bb	0,50
Szerokość (mm)	6,32 a	6,38	6,65 b	0,06
Objętość (g/cm³)	4,50 A	5,06	5,59 B	0,16
Indeks	58,75 A	65,04	71,33 B	1,78
Kość udowa				
Waga (g)	8,94 A	10,80 B	11,58 B	0,34
Długość (mm)	85,27	89,32	88,14	1,29
Szerokość (mm)	7,67	7,88	7,92	0,14
Objętość (g/cm³)	7,42 a	8,79 b	8,64 b	0,24
Indeks	104,85 A	120,84 Ba	131,65 Bb	3,10
Kość piszczelowa				
Waga (g)	10,31A	12,23 a	13,96 Bb	0,43
Długość (mm)	123,37	127,06	127,80	0,98
Szerokość (mm)	6,17 A	6,36 A	7,34 B	0,17
Objętość (g/cm³)	9,25 Aa	10,14 b	10,64 B	0,18
Indeks	84,12 Aa	96,22 Ab	109,82 B	2,92

a, b - wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$)

A,B - wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie wysoko istotnie ($p \leq 0,01$)

Cel szczegółowy 3 „Ocena wpływu zagęszczenia obsady i materiałów absorbujących uwagę na występowanie technopatii i stereotypii u prosiąt odsadzonych w 28. dniu życia”.

Doświadczenie w ramach celu szczegółowego obejmowało obserwacje zachowania odsadzanych w 28. dniu prosiąt, masę ciała tych zwierząt oraz monitoring mikroklimatu. 14 osobników pierwszej grupy utrzymywano przez okres około 6 tygodni w kojcach o podłodze rusztowej, drugą grupę świń utrzymywano w podobnych kojcach, jednakże z wyposażeniem w postaci niewielkiej ilości słomy oraz materiałów absorbujących uwagę „zabawek”. Na podstawie 24-godzinnego monitoringu przeprowadzono analizę zachowania warchlaków. Skupiono się na aktywnych oraz biernych formach zachowania młodych świń, a także niepożądanych formach zachowań, takich jak: agresja, walki, gryzienie czy podbijanie brzuchów innych osobników (tzw. belly-nosing). Notowane były także wszelkie zmiany skórne: otarcia, zranienia, uszkodzenia oraz kulawizny.

Biorąc pod uwagę grupę utrzymywaną w kojcu z zabawkami stwierdzono, że czas spędzany aktywnie stanowił około 34%. Omawiając najważniejsze formy aktywnych zachowań; zainteresowanie wiszącymi zabawkami, słomą stanowiło 42% aktywnie spędzanego przez zwierzęta czasu, około 15% czasu zwierzęta przeznaczały na pobieranie paszy, około 4% na pobieranie wody. Interakcje z innymi osobnikami stanowiły około 21%. Zachowania agresywne, w tym najczęściej obserwowano obgryzanie okolicy uszu, szyi i karku u innych osobników w badanym okresie stanowiło około 5%. Ponadto u 5 osobników z omawianej grupy stwierdzono uszkodzenia naskórka. Masa ciała 4-tygodniowych prosiąt wynosiła średnio 6,23 kg, w 8. tygodniu była na poziomie 15,7 kg. W grupie utrzymywanej bez materiałów absorbujących uwagę zachowania aktywne stanowiły około 28%. Wśród badanych, aktywnych zachowań około 14% czasu zwierzęta przeznaczały na pobieranie paszy, około 4% na pobieranie wody. Interakcje z innymi osobnikami stanowiły około 27% aktywnie spędzanego czasu. Zachowania agresywne stanowiły około 6% zachowań aktywnych. U 7 osobników stwierdzono uszkodzenia naskórka. Masa ciała 4-tygodniowych prosiąt wynosiła średnio 6,78 kg, w 8. tygodniu była na poziomie 15,57 kg.

**Fot. 1. Kojec rusztowy z zabawkami
(D. Godyń)**



Cel szczegółowy 4 „Wpływ warunków chowu na występowanie technopatii i stereotypii u cieląt i krów mlecznych rasy simental”.

W ramach celu określano wpływ zróżnicowanych warunków utrzymania na wystąpienie stereotypii i technopatii u krów mlecznych rasy simental. Krowy mleczne utrzymywane były w trzech grupach doświadczalnych: w oborze wolnostanowiskowej, na uwięzi oraz na pastwisku. W trakcie trwania doświadczenia wykonano: obserwacje behawioralne, pobrano krew do analiz morfologicznych oraz analiz hormonalnych (kortyzol, serotonina, dopamina). Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wykazano, iż najczęściej występującym

stereotypowym zachowaniem u krów mlecznych rasy simental jest obdajanie innych krów. W zależności od systemu utrzymania występuje ono u od 1 do 3% badanych krów. Więcej przypadków takiego zachowania stwierdzono przy utrzymaniu wolnostanowiskowym. Kolejnym zaobserwowanym stereotypowym zachowaniem było rolowanie języka, zachowanie to stwierdzono u od 1,5 do 2% krów w badanym stadzie. Najwięcej tego typu zachowań stwierdzono u zwierząt utrzymywanych na uwięzi oraz w oborze wolnostanowiskowej, na pastwisku tego typu zachowań nie stwierdzono. Rolowanie języka nasilało się zwłaszcza przed okresem karmienia i występowało w powtarzających się, 3-5 minutowych cyklach. Wśród krów utrzymywanych na uwięzi zaobserwowano także lizanie rur i koryt (3% krów) oraz obcieranie się o tańcuch lub rury (4% krów). Wykonane badania morfologiczne krwi wykazały, iż wszystkie analizowane parametry mieściły się w granicach norm referencyjnych. W porównaniu do grupy kontrolnej w grupie krów wykazujących stereotypie stwierdzono nieco większe ilości leukocytów oraz mniej erytrocytów, jednak różnice te nie były statystycznie istotne. Uzyskane wyniki wskazują także, iż poprzez ograniczony zakres wstawania i kładzenia się krów na stanowiskach, dochodzi do powstawania uszkodzeń stawów oraz otarć skóry. W oborach wolnostanowiskowych komfort wstawania i kładzenia się jest większy, ponadto krowy mają możliwość swobodnego poruszania się po korytarzach co korzystnie wpływa na stan zdrowotny kończyn. Największy, korzystny wpływ na stan zdrowotny kończyn miało utrzymanie pastwiskowe, które jest naturalnym środowiskiem bytowania krów.

Fot. 2. Stereotypia – Rolowanie języka (I. Radkowska)



Zadanie 01-12-05-11

Wpływ immunostymulujących dodatków do paszy na kształtowanie się parametrów fizjologicznych i status zdrowotny kur nieśnych w chowie ekologicznym

Kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnowka-Czajka

Celem zadania jest określenie wpływu pochodzenia oraz systemu utrzymania na sprawność układu immunologicznego oraz wskaźniki fizjologiczne kur utrzymywanych zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. Ocenie podlegać będzie także wpływ immunostymulatorów na kształtowanie się odporności niosek utrzymywanych zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego.

W ramach zadania zrealizowano I etap badań, którego celem był wylęg piskląt i odchów ekologicznych kur doświadczalnych przeznaczonych do kolejnych etapów badań.

Przygotowano budynki oraz wybiegi do odchovu kur zgodnie z wymogami rolnictwa ekologicznego. Przeprowadzono także wylęg piskląt oraz odchów ekologicznych kur rasy rodzimej Zielononóżka kuropatwiana (Z-11) oraz Rhode Island Red (R-11) do dalszych etapów zadania. Kury odchowywano od 1. dnia do 16. tyg. życia na ekologicznej fermie drobiu w ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o. Ptaki żywiono półintensywnie zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. Mieszanki paszowe składały się z komponentów ekologicznych.

Podczas odchovu kontrolowano masę ciała ptaków w 1. dniu i 16. tygodniu odchovu, zużycie paszy oraz padnięcia. W 16. tygodniu życia pobrano krew od 10 kur z każdej rasy,

w której oznaczono poziom hematokrytu, hemoglobiny, erytrocytów i leukocytów. Wykonano również rozmaz krwi w celu określenia stosunku H:L (heterofilii do limfocytów).

Stwierdzono, że kury Z-11 charakteryzowały się niższą masą ciała w 1. dniu oraz 16. tygodniu odchowu w porównaniu z kurami R-11 przy $p \leq 0,01$ (Tab. 1). Obserwowano także mniejsze dzienne spożycie paszy na ptaka w przypadku rasy Z-11 (Tab. 2). W okresie od 1. dnia do 16. tygodnia odchowu odnotowano o 1,1% niższą śmiertelność w grupie kur R-11 (Tab. 3). Wykazano wyższy poziom hematokrytu i leukocytów w przypadku kur rasy R-11 przy $p \leq 0,05$ (Tab. 4). Kury rasy R-11 odznaczały się także szerszym stosunkiem H:L w porównaniu z rasą Z-11 przy $p \leq 0,01$.

Tab. 1. Masa ciała kur (g)

Wiek	Grupa		SEM
	Z-11	R-11	
1 dzień	33,84 A	36,39 B	0,48
16 tydzień	1518,60 A	1687,71 B	56,28

A, B - wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$)

Tab. 2. Spożycie paszy od 1 do 16 tygodnia życia (g)

Tygodnie odchowu	Grupa	
	Z-11	R-11
1-4	20,69	22,87
5-8	41,50	44,44
9-12	59,59	62,35
13-16	79,79	80,08

Tab. 3. Padnięcia (%)

Tygodnie odchowu	Grupa	
	Z-11	R-11
1-4	0,97	0,38
5-8	0,73	0,43
9-12	0,22	0,12
13-16	0,27	0,17
1-16	2,19	1,1

Tab. 4. Poziom parametrów krwi kur rasy Z-11 i R-11 w 16. tygodniu odchowu

Wyszczególnienie	Grupa		SEM
	Z-11	R-11	
Hematokryt (%)	28,18 a	32,60 b	1,01
Hemoglobina (g/dl)	10,20	10,61	0,25
Erytrocyty (mln/ μ l)	2,36	2,31	0,05
Leukocyty (tys./ μ l)	17,73 a	19,11 b	0,30
H:L	0,31 A	0,61 B	0,06

a, b - wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$)

A,B - wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$)

Zadanie 01-12-07-12

Badanie wpływu iniekcji *in ovo* witamin C i E na kształtowanie wskaźników wylęgowości i użytkowości gęsi

Kierownik zadania: dr hab. Ewa Gornowicz, prof. IZ PIB

Celem badań było określenie wpływu iniekcji *in ovo* dwóch dawek witaminy C, w dwóch terminach okresu embriogenezy wybranych trzech ras/rodów gęsi pochodzących od gęsi gęgawy (*Anser anser*), na kształtowanie wskaźników wylęgowości i użytkowości.

Materiałem badawczym były jaja dwóch rodów, objętych programem ochrony zasobów genetycznych zwierząt: gęś kielecka (Ki) i słowacka (Sł) oraz stada rodzicielskiego gęsi Białej Kołudzkiej® (BK). Z każdej grupy genetycznej (rasa/ród) gęsi, będących w jednakowym wieku pobrano jaja do doświadczalnej iniekcji, a następnie je inkubowano. Badania wykonano w trzech powtórzeniach. Ogółem doświadczalnej inkubacji poddano 840 jaj gęsich. Witaminę C (kwas askorbinowy AA) iniekowano w dawkach i okresach embriogenezy przedstawionych w Tab. 1.

Tab. 1. Ramowy układ doświadczenia

Grupa	Rasa/Ród gęsi	Iniekcja <i>in ovo</i>		Odchów
		dawka i dzień inkubacji	liczebność jaj	
K0	BK, Ki, Sł	bez iniekcji	3 x 40	3 x 10
K1	BK, Ki, Sł	sól fizjologiczna w 13 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
D1-C5	BK, Ki, Sł	5 mg wit. C/jajo w 13 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
D1-C10	BK, Ki, Sł	10 mg wit. C/jajo w 13 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
K2	BK, Ki, Sł	sól fizjologiczna w 20 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
D2-C5	BK, Ki, Sł	5 mg wit. C/jajo w 20 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
D2-C10	BK, Ki, Sł	10 mg wit. C/jajo w 20 dniu inkubacji	3 x 40	3 x 10
Ogółem jaj, sztuk			840	10
Ogółem ocena jakości tuszek i mięsa, sztuk				210

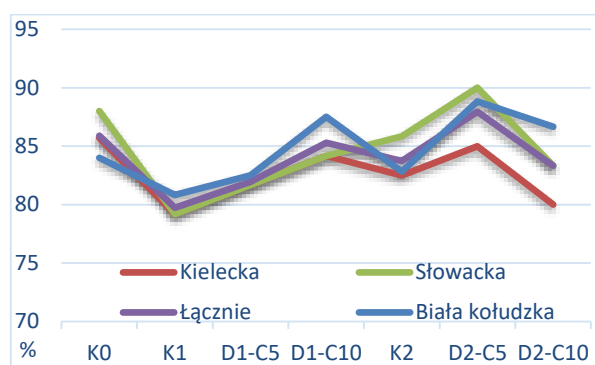


Fot. 1. i 2. Przygotowanie jaj do iniekcji i ocena wskaźników wylęgowości gęsi z poszczególnych grup doświadczalnych (R. Zwierzyński)

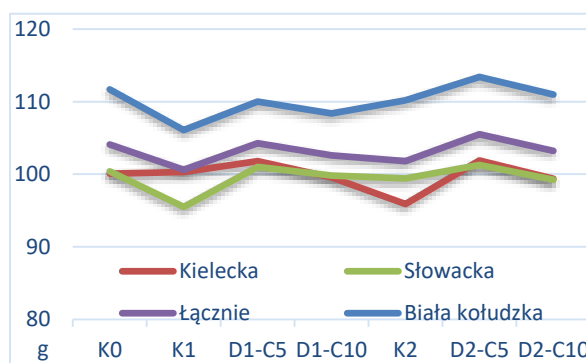
Jaja w wybranym dniu inkubacji prześwietlono w celu obrysowania krawędzi komory powietrznej, po czym po dezynfekcji przy użyciu mikrosilnika z rękawem protetycznym (SUNBURST micro-motor) nawiercono otwór w skorupie, nie przekuwając błon podskorupowych (Fot. 1). Następnie po kolejnej dezynfekcji delikatnie przy pomocy mikropipety wprowadzono do ko-

mory powietrznej świeżo przygotowany roztwór witaminy C (Acidum ascorbicum, surowiec farmaceutyczny, proszek) w odpowiedniej dawce. Otwór w skorupie zabezpieczono ciekłą parafiną, a jaja umieszczono z powrotem w aparacie wylęgowym.

Zebrano dane dotyczące wyników wylęgowości jaj (Fot. 2) i obliczono m.in.: procentowy stosunek jaj przełożonych i zarodków zamartych do jaj nałożonych oraz jaj niewylęzonych do przełożonych, procentowy stosunek piskląt kalekich i padłych do jaj przełożonych, procentowy stosunek jaj wylęzonych do nałożonych i przełożonych oraz średnią masę piskląt (Wykr. 1 i 2).



Wykr. 1. Procentowy stosunek jaj wylęzonych do jaj nałożonych w poszczególnych grupach doświadczalnych gęsi



Wykr. 2. Masa (g) piskląt wylęzonych z doświadczalnych jaj w poszczególnych grupach doświadczalnych gęsi

Gąsienią z ostatniego iniekowanego nakładu zważono indywidualnie i przeseksowano metodą japońską (przez wynicowanie steku). Wybrano po 5 samców i 5 samic z każdej grupy doświadczalnej każdej z trzech ras/rodów, łącznie po 210 gęsi i wstawiono do odchowu. Przeprowadzono 17-tygodniowy odchow gęsi (konwencjonalny tucz owsiany). Zważono ptaki po 8. i 12. tygodniu odchowu oraz przed ubojem i określono średnie wyniki masy ciała gęsi (Tab. 2). Po 12. tygodniu przeprowadzono pomiary zoometryczne podstawowych cech: długość przedramienia i grzbietu mostka oraz grubość mięśni piersiowych.

Po zakończonym odchowu gęsi ubito. Ubój i obróbka poubojowa wszystkich doświadczalnych grup gęsi przeprowadzono w określonych i takich samych warunkach technologicznych. Tuszki zważono przed schłodzeniem (tuszka ciepła) i po schłodzeniu oraz 24-godzinny przechowywaniu w chłodni (tuszka zimna). Na podstawie uzyskanych mas wyliczono wydajność rzeźną, tj. procentowy stosunek masy tuszki do masy ciała przed ubojem.

Wszystkie wyniki przeprowadzonych badań aktualnie są w trakcie obliczeń statystyki matematycznej. Po uwzględnieniu tych danych, wyniki zostaną szczegółowo omówione i opracowane. Pozwolą one określić efektywność zastosowanych dawek witaminy C oraz wskazać optymalny okres embriogenezy do przeprowadzenia iniekcji w celu uzyskania najkorzystniejszych wskaźników wylęgowości i użytkowości gęsi w poszczególnych grupach genetycznych.

Całość badań wykonywano w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, IZ PIB ZD Kołuda Wielka.

Tab. 2. Średnia (x) i odchylenie standardowe (SD) masy ciała gęsi po 8., 12. i 17. tygodniu odchovu

Grupa gęsi		Grupa						
		K0	K1	D1-C5	D1-C10	K2	D2-C5	D2-C10
Masa ciała po 8. tygodniu, g								
Biała Kołodzka®	x	4722	4589	4658	4657	4565	4675	4670
	SD	559,0	470,0	309,3	350,0	363,7	394,3	276,8
Kielecka	x	3197	3128	3216	3236	3123	3295	3342
	SD	392,6	176,3	292,0	312,1	314,7	227,1	352,3
Słowacka	x	3406	3351	3613	3496	3349	3517	3509
	SD	339,1	237,6	270,0	253,1	225,4	201,7	237,7
Łącznie	x	3775	3689	3829	3796	3679	3829	3840
	SD	439,4	334,2	290,3	307,0	305,0	287,0	293,1
Masa ciała po 12. tygodniu, g								
Biała Kołodzka®	x	6772	6573	6819	6735	6717	7132	7037
	SD	791,0	549,5	593,0	603,3	921,6	680,6	515,3
Kielecka	x	4399	4226	4415	4331	4311	4456	4526
	SD	358,6	245,1	313,3	531,3	470,8	354,0	519,3
Słowacka	x	4874	4618	4844	4730	4743	5004	4968
	SD	459,2	310,0	460,0	339,8	369,3	439,0	396,0
Łącznie	x	5348	5139	5359	5265	5257	5531	5010
	SD	558,5	405,3	469,5	500,4	628,3	511,6	480,4
Masa ciała po 17. tygodniu (przed ubojem), g								
Biała Kołodzka®	x	7314	7012	7216	7180	7227	7494	7433
	SD	903,3	555,0	968,3	720,0	527,7	707,1	523,8
Kielecka	x	4657	4499	4681	4668	4545	4674	4757
	SD	312,0	371,2	372,7	754,1	604,7	664,7	657,7
Słowacka	x	5014	4886	5022	4926	4906	5126	5108
	SD	798,4	545,7	751,1	420,5	529,2	502,6	405,0
Łącznie	x	5662	5516	5670	5592	5559	5765	5766
	SD	714,8	510,5	739,5	634,7	552,8	628,8	547,0

Zadanie 04-12-01-11

Ocena rozwoju zarodkowego piskląt oraz produktywności kurcząt w aspekcie stosowania metody *in ovo* oraz różnych zabiegów technologicznych

Kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnowka-Czajka

W bieżącym roku rozpoczęto badania w ramach zadania dotyczącego oceny rozwoju zarodkowego piskląt oraz produktywności kurcząt w aspekcie stosowania metody *in ovo* oraz różnych zabiegów technologicznych, których celem jest ocena wpływu dodatku ekstraktu pyłku pszczelego podanego *in ovo* na rozwój zarodkowy, rozwój układu pokarmowego piskląt oraz wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów.

Zrealizowano I etap badań, którego celem było określenie wpływu manipulacji techniką *in ovo* na przebieg klucia, a także ocena jakości wylęgonych piskląt oraz rozpoczęto badania w ramach etapu II, którego celem było określenie najbardziej efektywnych dawek pyłku pszczelego podanego w formie ekstraktu metodą *in ovo* na podstawie wyników wylęgowości, analizy parametrów biochemicznych krwi piskląt oraz wyników produkcyjnych kurcząt brojlerów.

Doświadczenie zrealizowano na 204 jajach wylęgowych pochodzących od 38-tygodniowego stada reprodukcyjnego brojlerów Ross 308. Jaja ważono indywidualnie, a ich średnia masa wynosiła 65,6 g (między 63,4 a 67,9 g). Jaja inkubowano zgodnie ze

standardowymi praktykami wylęgarni ($T=37,7^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}=55\%$) i automatycznie obracano co dwie godziny w inkubatorze Fest Mini IV. W 18. dniu inkubacji jaja zważono w celu oznaczenia utraty masy jaj podczas inkubacji i prześwietlono, aby wyeliminować jaja niezapłodnione i zawierające zamarte zarodki. Jaja z żywymi zarodkami podzielono losowo na cztery grupy: pierwsza kontrolna (bez manipulacji), w drugiej grupie przeprowadzono dehermetyzację skorupy, w trzeciej grupie wykonano iniekcję do komory powietrznej jaja, a w grupie czwartej przeprowadzono iniekcję do płynu owodniowego zarodka. W ramach iniekcji podano 0,5 ml 0,9% roztworu NaCl. Po przeprowadzeniu iniekcji luka została zalepiona taśmą Parafilm®, a jaja przeniesiono do koszy wylęgowych.

W 1. dniu życia pisklęta zważono. Nowowylute pisklęta oceniano na podstawie wyglądu zewnętrznego ptaków za pomocą 100-punktowej skali (Tona i in., 2003).

Nie zaobserwowano wpływu iniekcji *in ovo* na różnice w ubytku masy jaj w stosunku do jaj niepoddanych temu zabiegowi (Tab. 1). Wyjątek stanowi grupa 4., w której stwierdzono najniższy procent utraty wody (8,5%). Najniższą wylęgowość z jaj nałożonych stwierdzono w grupie 2., a najwyższą w 3. Różnica między wspomnianymi grupami wynosiła 12 p.p. Z kolei, najwyższą śmiertelność zarodków między 18. a 21. dobą inkubacji zaobserwowano w grupie kontrolnej.

Wpływ miejsca iniekcji *in ovo* na jakość piskląt jednodniowych przedstawiono w Tab. 2. Dla oceny jakości ptaków posłużono się następującymi wskaźnikami: masą ciała oraz liczbą punktów wg Tona i in. (2003). Zastosowane czynniki doświadczalne nie wpłynęły istotnie statycznie na masę ciała piskląt oraz punktację „Tona score”.

Tab. 1. Wyniki lęgu jaj i wylęgu piskląt. Doświadczenie 1.

Grupa		1	2	3	4
Liczba jaj nałożonych (szt.)		51	51	51	51
Masa jaj przed nałożeniem (g)		66,16 ± 1,11	65,36 ± 0,74	65,45 ± 1,49	65,29 ± 1,92
Masa jaj w 18. dobie inkubacji (g)		60,05 ± 1,32	59,34 ± 1,21	59,50 ± 1,71	59,74 ± 0,84
Utrata wody %		9,24	9,20	9,10	8,50
Jaja niezapłodnione	n	0	1	0	1
	%	0	2,0	0	2,0
Zarodki zamarte między E1-E18	n	6	3	4	8
	%	3,1	1,5	2,0	4,1
Zarodki zamarte między E18-E21	n	11	6	7	8
	%	5,6	3,1	3,6	4,1
Wyląg piskląt z jaj nałożonych (%)		66,7	60,78	78,4	66,7
Wyląg piskląt z jaj zapłodnionych (%)		66,7	66,0	78,4	66,0

Średnie ± SD

Tab. 2. Wpływ miejsca iniekcji *in ovo* na jakość piskląt jednodniowych. Doświadczenie 1.

Grupa	Masa ciała (g)	Tona score (pkt.)
1	49,07 ± 0,63	96,52 ± 1,14
2	48,10 ± 0,60	98,87 ± 0,51
3	49,19 ± 0,43	89,90 ± 6,35
4	47,50 ± 0,60	97,64 ± 0,67
SEM	0,32	0,71

Zadanie 04-12-03-11

Monitoring występowania miopatii mięśnia piersiowego w stadach szybko i wolno rosnących kurcząt z określeniem wpływu na wydajność poubojową oraz sensoryczną i technologiczną jakość mięsa

Kierownik zadania: dr hab. Katarzyna Połtowicz

Celem zadania jest rozpoznanie ewentualnych miopatii i wad mięsa szybko i wolno rosnących kurcząt rzeźnych, określenie fizykochemicznych i sensorycznych parametrów mięsa i skorelowanie ich występowania z pochodzeniem genetycznym ptaków, przyrostami masy ciała, umięśnieniem i budową mikroskopową mięśni.

Celem etapu była identyfikacja i charakterystyka miopatii „white stripping” („białych smug”) mięśnia piersiowego w stadach szybko i wolno rosnących kurcząt.

Materiał doświadczalny stanowiły szybko i wolno rosnące kurczęta rzeźne reprezentujące różne, dostępne w Polsce, linie genetyczne (Ross 308, Cobb500, Hubbard Flex oraz Hubbard JA 957). Pisklęta zakupiono w komercyjnym zakładzie wylęgu drobiu i odchowano w Doświadczalnej Fermie Drobiu w Aleksandrowicach. Jednodniowe, oznaczone indywidualnymi numerami pisklęta (1600 szt.) przydzielono do czterech grup (po 400 szt. w każdej) i umieszczone w przedziałach na głębokiej ściółce.

Szybko rosnące kurczęta brojlerzy odchowywano do 42. dnia życia, natomiast długość odchowu wolno rosnących kurcząt rzeźnych wynosiła 56 dni. Ptaki żywiono do woli jednakoowymi, pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi.

Na koniec doświadczenia, w 42. dniu życia (kurczęta szybko rosnące) oraz w 56. dniu życia (kurczęta wolno rosnące) wybrano do uboju (ubój A) po 40 kurcząt z grupy (kurczęta szybko rosnące) i 100 kurcząt (Hubbard JA957). W celu oceny całego stada kurcząt pod względem częstotliwości występowania badanej wady w 44. dniu odchowu (kurczęta szybko rosnące) i 58. dniu odchowu (kurczęta wolno rosnące) przeprowadzono kolejny ubój kurcząt. Łącznie w całym doświadczeniu oceniono 620 kurcząt.

W trakcie odchowu kontrolowano indywidualną masę ciała ptaków, spożycie paszy oraz liczbę ptaków padłych.

Podczas ubojów przeprowadzonych w 42. (kurczęta szybko rosnące) i 56. dniu życia (kurczęta wolno rosnące) od wszystkich ptaków pobrano krew w celu oznaczenia wybranych biochemicznych parametrów krwi: wskaźników lipidowych, białka całkowitego i glukozy. Od tych samych ptaków pobrano próbki do badań histologicznych. W ciągu 15 minut po uboju z mięśnia piersiowego, powierzchownego (*pectoralis superficialis*) pobrano wycinki, które następnie zamrożono w ciekłym azocie. Do czasu wykonania badań próbki przechowano w zamrażarce w temperaturze -80°C.

Wszystkie ubite 42-dniowe i 56-dniowe ptaki (odpowiednio kurczęta szybko rosnące i wolno rosnące) poddano ocenie wydajności poubojowej, jakości tuszki i fizykochemicznych cech mięsa. W 15 minut po uboju w mięśniu piersiowym (*pectoralis superficialis*) określono kwasowość początkową mięsa za pomocą pH-metru CyberScan10, wyposażonego w szklaną elektrodę. Badanie kwasowości powtórzono po 24-godzinym schłodzeniu tuszek w temperaturze 4°C, a tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej.

Wypreparowane mięśnie oceniono pod kątem defektu „white stripping” i przydzielono do grup w zależności od braku lub obecności wady z uwzględnieniem stopnia jej nasilenia: 0 – brak wady, I, II, III – odpowiednio: małe, średnie, duże nasilenie wady.

Mięśnie piersiowe kurcząt poddano ocenie wybranych wskaźników jakości: barwy w skali L*a*b* (Minolta CR 310), wycieku swobodnego oraz strat termicznych na podstawie ubytku masy mięśni podczas gotowania. Ponadto przy pomocy aparatu Instron 5542, wyposażonego w trójkątny nóż (Warner-Bratzler), przeprowadzono ocenę maksymalnej siły cięcia. Oceniono również wybrane parametry tekstury mięsa (TPA) na podstawie testu podwójnego ściskania.

Pobrano także próbki w celu oznaczenia podstawowego składu chemicznego mięsa: suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego, popiołu surowego, zawartości cholesterolu oraz określenia profilu wyższych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mięśniowym.

Ocenie nasilenia miopatii poddano mięśnie piersiowe wszystkich ubitych szybko i wolno rosnących ptaków.

Badania wykazały znaczne różnice w częstotliwości i nasileniu występowania wady „białych smug” w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów w zależności od ich genetycznego pochodzenia. Istotnie większą częstotliwość występowania tej miopatii stwierdzono w stadach 42-dniowych kurcząt szybko rosnących w porównaniu z 56-dniowymi wolno rosnącymi brojlerami. Omawiana wada mięśni piersiowych występowała ze zbliżoną częstotliwością w stadach wszystkich szybko rosnących kurcząt Ross 308, Hubbard Flex i Cobb 500. Mięśnie piersiowe wolne od tej wady wystąpiły zaledwie u około 12% ptaków. W większości przypadków białe smugi występowały w małym nasileniu, jednak 7,5% – 10% badanych mięśni piersiowych kurcząt należących do poszczególnych grup genetycznych przejawiało średnie nasilenie tej wady. Najkorzystniejsze wyniki pod tym względem uzyskano w grupie 56-dniowych wolno rosnących kurcząt JA 957. U ptaków tych przypadki mięśni piersiowych o niskim nasileniu wady białych smug objęły zaledwie w 15% stada, zaś 85% mięśni nie wykazywała tej wady. W mięśniach piersiowych żadnej z badanych grup genetycznych kurcząt brojlerów nie stwierdzono przypadków dużego nasilenia miopatii białych prążków.

W następnym etapie badań wyodrębnione grupy mięśni piersiowych kurcząt zostaną scharakteryzowane pod względem mikrostruktury, składu chemicznego oraz cech fizykochemicznych.

Zakład Hodowli Owiec i Kóz Kierownik: dr inż. Jan Knapik

Zadanie 01-13-01-11

Badania jakości mięsa pochodzącego od przeżuwaczy (krowy, owce, kozy) ras objętych programem ochrony zasobów genetycznych z wykorzystaniem technik olfaktometrii

Kierownik zadania: dr hab. Aldona Kawęcka

Celem badań było określenie cech jakościowych mięsa, pochodzącego od przeżuwaczy (owce, kozy, bydło) wybranych ras rodzimych, objętych programem ochrony zasobów genetycznych, ze szczególnym uwzględnieniem badania związków lotnych odpowiedzialnych za walory smakowo-zapachowe mięsa. Badania pozwolą na pełniejszą charakterystykę produktów pochodzenia zwierzęcego, a w przyszłości mogą być pomocne w ocenie autentyczności produktów tradycyjnych pochodzących od ras rodzimych.

Realizacja zadania uwzględniała trzy cele szczegółowe:

- I. Badania jakości jagnięciny pozyskiwanej od owiec rodzimych ras z wykorzystaniem technik olfaktometrii.
- II. Charakterystyka jakości mięsa kóz wybranych ras występujących w Polsce w tym objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych z wykorzystaniem technik olfaktometrii.
- III. Zależność między związkami zapachowymi, a ich percepcją w mięsie buhajów różnych ras żywionych dawką ze zwiększonym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych.

W każdym z celów zidentyfikowano i oznaczono metodą chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrem mas z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME-GC-MS), zawartość lotnych związków w mięsie po obróbce termicznej pochodzącym od owiec ras wrzosówka i świniarka, kozy karpackiej oraz bydła ras simentalskiej i polskiej czerwono-białej.

Wykonano również badania olfaktometryczne na wybranych próbkach. Do opracowania wyników wykorzystano wielowymiarowe techniki statystyczne, w tym PCA i LDA i określono zdolności klasyfikacyjne opracowanych modeli statystycznych. W mięsie wszystkich gatunków stwierdzono obecność 102 związków lotnych. Związkami występującymi w największych ilościach, łącznie, w mięsie owczym, kozim i wołowym były: hexanal, 2-pentylfuran, nonanal, octanal, heptanal, 2-ethylfuran, 3-methylbutanal, 1-octen-3-ol, benzaldehyde i acetone. Najliczniejszymi związkami lotnymi w mięsie owczym, kozim i bydła były aldehydy i węglowodory, a największą klasą pod względem zawartości substancji lotnych były aldehydy i furany. Największa zawartość związków lotnych, w tym również siarkowych była obecna w mięsie kóz (Tab. 1).

Tab. 1. Zawartość (ng/g) związków lotnych w klasach w mięsie jagniąt, koziołków i buhajków oznaczonych względem wzorca kapronianu metylu (methyl caproate); analizy metodą HS-SPME-GC-MS, kolumna ZB-5MSi

Wyszczególnienie	n	Owce	Kozy	Bydło
aldehydy	28	579.15	1253	374.64
furany	5	184.97	387.19	63.03
alkohole	15	45.83	90.85	48.6
ketony	14	24.49	69.17	38.18
węglowodory	22	20.37	13.5	7.02
zw. siarkowe/azotowe	14	20.24	38.18	17.35
kwasy karboksylowe	2	9.45	7.52	12.41
inne	2	2.15	11.2	3.11
Suma:	102	886.65	1870.6	564.34

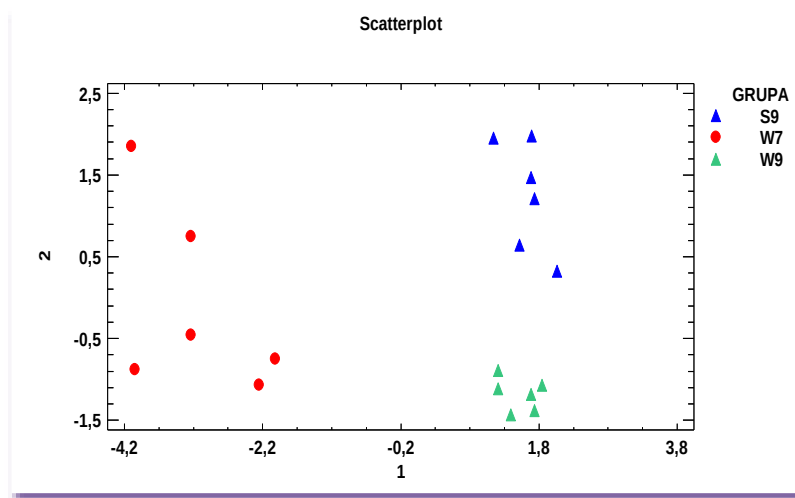


Fot. 1. Tryczki rasy wrzosówka i świniarka

W ramach celu I określono cechy jakościowe mięsa, pochodzącego od tryczków rodzimych ras wrzosówka i świniarka, utrzymywanych w systemie półintensywnego żywienia oraz w zależności terminu uboju. Rasa nie miała wpływu na wyniki tuczu tryczków i parametry rzeźne oraz cechy fizykochemiczne mięsa. Spośród ocenianych cech sensorycznych lepszą kruchością odznaczało się pieczone mięso świniarki. Mięso wrzosówek zawierało natomiast więcej kwasów wielonienasyconych (PUFA), frakcji PUFA_{n-3}. Wiek jagniąt (terminu uboju) miał wpływ na niektóre właściwości fizykochemiczne mięsa pH, jasność barwy (L*). W tłuszczu śródmięśniowym wrzosówek młodszych udział frakcji PUFA *n-3* był wyższy, zawartość izomerów CLA była wyższa w grupie wrzosówek starszych. W ocenie organoleptycznej nie stwierdzono różnic między grupami w odniesieniu do barwy pieczonego udźca, zapachu, soczystości i smaku.

W ocenie chemometrycznej określono 9 związków lotnych mięsa różnicujących grupy owiec: związkiem najlepiej opisującym różnice między rasami był 1,3-octadiene. Najbardziej

różnicującymi związkami lotnymi ze względu na wiek zwierząt były: benzaldehyde, 1,3-exadiene, 3-ethyl-2-methyl-, phenylacetaldehyde oraz (E)-2-octenal.



Rys. 1. Wykres punktowy PCA-LDA w przestrzeni dwuwymiarowej w oparciu o dane spektralne 29 związków lotnych mięsa dziewięciomiesięcznych owiec rasy świniarka (S9) i wrzosówka (W9) oraz siedmiomiesięcznych owiec rasy wrzosówka (W7). Analizę metodą HS-SPME-GC-MS, kolumna ZB-5MSi

W celu II określano jakość tusz i mięsa, pochodzącego od koziołków rodzimej rasy karpackiej, utrzymywanych w systemie półintensywnego żywienia w zależności od terminu uboju oraz w porównaniu z koziołkami rasy saaneńskiej z uwzględnieniem analizy związków lotnych. Nie stwierdzono różnic w zawartości podstawowych składników oraz witamin w zależności od terminu uboju. Mięso kozłąt młodszych zawierało więcej kwasów MUFA, natomiast starszych więcej wielonienasyconych (PUFA), w tym frakcji PUFA *n*-6. W ocenie organoleptycznej pieczonego udźca koziołków karpackich różnych grup wiekowych wyższe wartości uzyskano dla grupy zwierząt starszych. Ich mięso było ciemniejsze, bardziej aromatyczne, bardziej kruche i soczyste. Mimo wyższych wartości parametrów tuczu dla kozłąt saaneńskich, straty ubojowe były niższe w grupie kozłąt karpackich. Nie stwierdzono różnic w wydajności rzeźnej, która dla obu ras była wysoka (Tab. 2).

Tab. 2. Wyniki tuczu i parametry rzeźne

Wyszczególnienie	Rasa karpacka	Rasa saaneńska
Masa początkowa (kg)	22,85A	43,58B
Masa końcowa (kg)	30,87A	48,08B
Masa tuszy ciepłej (kg)	12,97A	20,56B
Masa tuszy zimnej (kg)	12,63A	19,66B
Straty (%)	2,7A	4,7B
Masa półtuszy prawej (kg)	5,67A	9,19B
Masa półtuszy lewej (kg)	5,91A	9,35B
Wydajność rzeźna (%)	41,9	42,8

W mięsie kozim kluczowymi związkami zapachowymi, oznaczonymi metodą chromatografii gazowej sprzężonej z olfaktometrią, były γ -caprolactone, acetylpyrrole, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine i 2 acetylthiazoline. Mięso z tusz zwierząt w wieku 10 i 12 miesięcy odróżniały: carbon disulfide, ethylbenzene, 2,3-octanedione. Mięso kozie zawierało największe ilości związków lotnych w porównaniu do pozostałych gatunków.



Fot. 2. Kozę rasy karpackiej w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o.

Tab. 3. Zawartości (ng/g, $P \leq 0.05$) 7 związków lotnych różnicujących 2 grupy wiekowe koziołków karpackich. Związki oznaczone * różnią się wysoce istotnie ($P \leq 0.01$). Analizy wykonane metodą HS-SPME-GC-MS, kolumna ZB-5MSi

Związek lotny	ng/g	ng/g
	K10	K12
acetaldehyde	20.97	12.19
carbon disulfide *	1.88	0.40
butanal	0.22	0.56
ethylbenzene *	0.08	0.18
1-acetyloxy-2-propanone	1.19	0.18
1-octen-3-ol	23.75	45.51
2,3-octanedione *	4.17	10.75

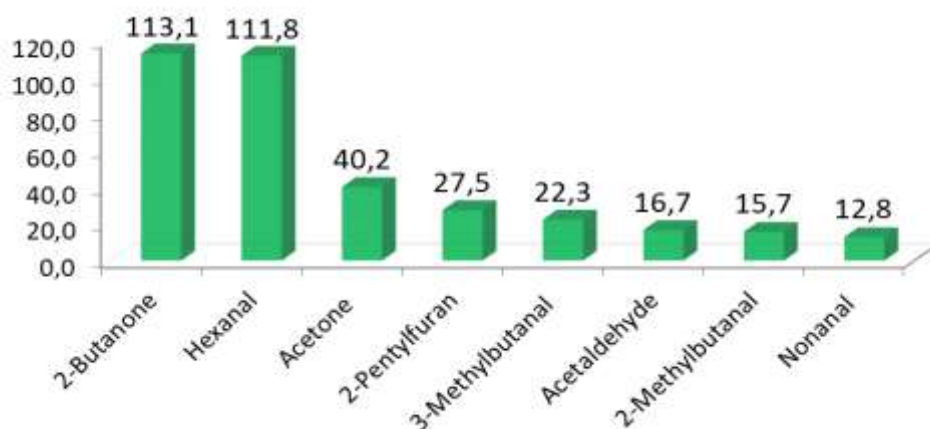
W ramach celu III określono wpływ rasy i żywienia bogatego w wielonienasycone kwasy tłuszczowe na wyniki zdolności opasowej, wartości rzeźnej i jakości mięsa buhajków z uwzględnieniem analizy lotnych substancji zapachowych i ich wpływu na ocenę sensoryczną mięsa. Stwierdzono, że buhajki rasy simentalskiej charakteryzowały się wyższą masą końcową w porównaniu do rasy polskiej czerwono-białej. Średnia waga zwierząt przed ubojem wynosiła około $631,5 \pm 15,0$ kg, a średnia waga tusz po wychłodzeniu około 352 ± 875 kg. Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w zakresie wydajności rzeźnej między badanymi rasami ani masy wyrębów wartościowych (Tab. 4). Udział wyrębów wartościowych był stosunkowo wysoki i wynosił ponad 60% niezależnie od rasy i żywienia. Nie stwierdzono różnic w pozostałych składnikach podstawowych mięsa. Profil kwasów tłuszczowych nie różnił się między rasami. Wprowadzenie do dawki pokarmowej dla buhajków makuchu Inianego spowodowało wzrost zawartości PUFA, zarówno n-6 jak i n-3 kosztem SFA oraz MUFA. Różnice statystycznie istotne odnotowano w zawartości kwasów C18:2, n-6, C18:3, n-3, dzięki czemu odnotowano korzystną tendencję stosunku kwasów rodziny n-6 do n-3, obserwowano również korzystne tendencje spadkowe w odniesieniu do indeksu aterogenności.

Tab. 4. Wskaźniki wartości rzeźnej buhajków rasy polskiej czerwono-białej oraz simentalskiej w zależności od zastosowanego żywienia

Wyszczególnienie	ZR	SM	K	D	Rasa	Żywienie
wiek w dniu uboju, d	571	561	562	567	ns	ns
waga przed ubojem, kg	616,5	646,6	626,8	638,4	ns	ns
wydajność rzeźna zimna, %	55,0	55,9	54,84	56,05	ns	ns
masa prawej półtuszy, kg	170,3	181,1	173,6	178,66	ns	ns
masa wyrębów wartościowych, kg	108,05	114,0	109,7	112,83	ns	ns

ZR – rasa polska czerwono-biała, SM – rasa simentalaska, K – dawka kontrolna, D – dawka doświadczalna z makuchem lniowym, ns – brak.

Związkami lotnymi w mięsie wołowym w kolejności od największej do najmniejszej zawartości były: 2-butanone, hexanal, acetone, 2-pentylfuran, 3-methylbutanal, acetaldehyde, 2-methylbutanal oraz nonanal (Rys. 2). Substancjami różnicującymi rasy były 5-undecene, 9-methyl i heptadecanal, natomiast w grupie gdzie zastosowano większą dawkę źródeł kwasów n-3 stwierdzono niższy udział w profilu związków zapachowych: kwasu octowego i wyższy aldehydu kaprylowego (octanal) oraz brak obecności 3-ethylooctanu.



Rys. 2. Związki lotne o największej zawartości (powyżej 10 ng/g) w stekach z grupy D (ng/g, średnie zawartości orientacyjne)

Niniejsze zadanie pozwoliło poznać skład LZO w mięsie przeżuwaczy po obróbce termicznej. W przyszłości zakłada się stworzenie profili LZO w różnych produktach pochodzenia zwierzęcego w zależności od gatunku, rasy, płci, regionu, sposób chowu i żywienia, co może także pomóc w potwierdzaniu ich autentyczności. Badania tego typu uzupełnią badania sensoryczne i ocenę jakości tych produktów.

Zadanie 01-13-03-11

Charakterystyka zróżnicowania genetycznego małej populacji na przykładzie rodzimej rasy kóz karpackich

Kierownik zadania: dr hab. Aldona Kawęcka

Niewielka liczebność populacji rodzimych ras takich jak koza karpacka stwarza zagrożenie wzrostu zinebrowania i związanych z tym niekorzystnych zmian w kondycji i produktywności zwierząt. Ze tego względu wskazane jest monitorowanie zmian przy użyciu różnych narzędzi, zarówno metod klasycznych jak i nowoczesnych technik biologii molekularnej.

Celem zadania będzie stworzenie bazy rodowodowej całej populacji kóz karpackich tak, aby możliwa była charakterystyka rasy dotycząca jej użytkowości. Równolegle do tych zadań przeprowadzona zostanie analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. Celem niniejszego projektu będzie również określenie możliwości wykorzystania polimorfizmu genów białek mleka kóz karpackich w ocenie przydatności technologicznej i dietetycznej surowca.

W roku sprawozdawczym rozpoczęto tworzenie bazy danych; obecnie trwa praca nad wypełnieniem bazy i usunięciem ewentualnych błędów. Dane te są niezbędne przy tworzeniu specjalistycznego programu (aplikacji) o nazwie roboczej „KOZY” przeznaczonej m.in. do obsługi ksiąg hodowlanych kóz karpackich oraz wspomagania prowadzonych prac hodowlanych. W ramach przygotowań do przewidzianych analiz polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych, pobrana została krew od kóz karpackich i obecnie przygotowywane są odczynniki do tych analiz. Zakupione zostały m.in. startery, niezbędne w planowanych analizach polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych zalecanych przez ISAG do kontroli pochodzenia kóz. W celu oceny możliwości produkcyjnych rodzimej rasy kóz karpackich, utrzymywane w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o. kozy poddano indywidualnej kontroli mleczności, podczas której pobrano próby mleka do analiz podstawowego składu i liczby komórek somatycznych. Dane zebrane od stada na przestrzeni laktacji pozwoliły stwierdzić, że średnia długość doju wyniosła 220 dni, podczas którego pozyskano średnio 300 litrów mleka od kozy. Wydajność tłuszczu oszacowano na 10,6 kg, a białka na 9,4 kg. Nie stwierdzono wpływu wieku kóz oraz ich produktywności na zawartość komórek somatycznych w mleku.

Utworzono listę raportów, które będą generowane z bazy danych, dotyczącej całej populacji kóz karpackich:

- użytkowość rozplodowa,
- rozkład terytorialny,
- średnia wielkość stada,
- użytkowość mleczna,
- użytkowość mięsna.

Stworzony program ma spełniać następujące funkcje:

- generowanie świadectw wpisu do ksiąg karpackich,
- wyliczanie współczynnika *inbredu*,
- dobór osobników do kojarzeń.



Fot. 1. Kozioł rasy karpackiej

Równolegle do tych zadań przeprowadzona zostanie analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. W ramach tych działań pobrana została krew od kóz karpackich i obecnie przygotowywane są odczynniki niezbędne do tych analiz. Zakupione zostały startery (Tab. 1), niezbędne w planowanych analizach polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych, zalecanych przez ISAG do kontroli pochodzenia kóz (www.isag.us/Docs/AppGenSheepGoat2017).

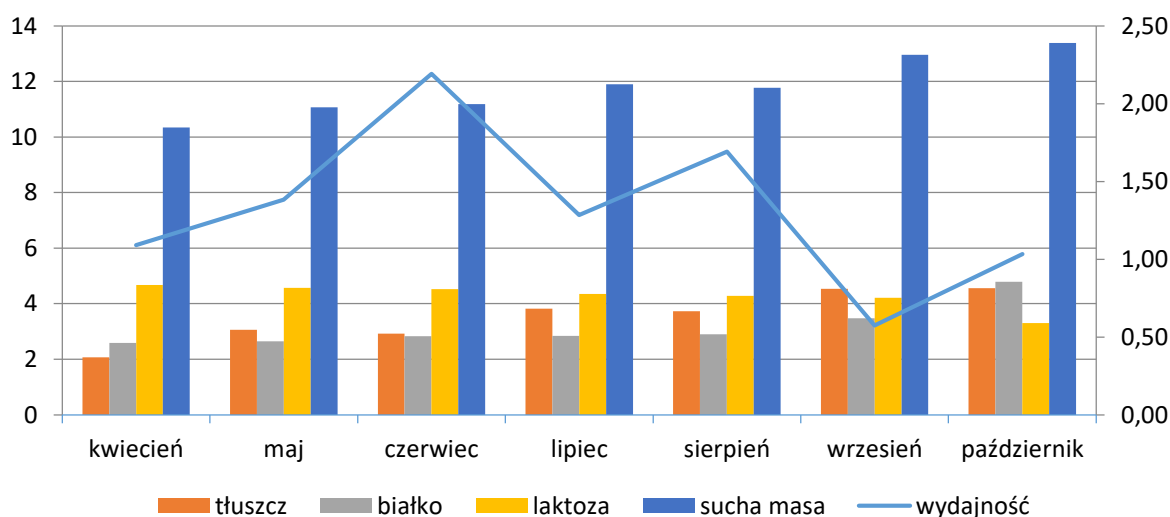
Tab. 1. Startery niezbędne w planowanych analizach polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych

ISAG caprine microsatellite (STR) panel			
Marker	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Fragment sizes in bp (samples CT 2015-16)
CSRD247	GGACTTGCCAGAACTCTGCAAT	CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	216-240
ILST5008	GAATCATGGATTTCTGGGG	TAGCAGTGAGTGAGGTTGGC	174-182
ILST519	AGGGACCTCATGTAGAAGC	ACTTTTGGACCTGTAGTGC	146-152
ILST587	AGCAGACATGATGACTCAGC	CTGCCTCTTTCTTGAGAGC	133-151
INRA005	TTCAGGCATACCTACACCACATG	AAATATTAGCCAACCTGAAAACCTGGG	115-121
INRA006	AGGAATATCTGTATCAACCGCAGTC	CTGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA	107-123
INRA023	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	TAACTACAGGGTGTAGATGAATC	195-215
INRA063	GACCACAAAGGGATTGCACAAGC	AAACACAGAAATGCTTGGAAG	171-177
MAF65	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG	CCACTCCTCTGAGAATATAACATG	117-135
MCM527	GTCCATTGCCTCAATCAATTC	AAACCACTTGACTACTCCCAAA	152-164
QARFCB20	GGAAAACCCCATATATACCTATAC	AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG	95-105
SRCRSP5	GGACTCTACCACTGAGCTACAAG	TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	163-179
SRCRSP8	TGCGGTCTGGTTCTGATTTAC	CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG	220-240
SRCRSP23	TGAACGGGTAAGATGTG	TGTTTTAATGGCTGAGTAG	77-103

W ramach celu 2. pobrano krew, która przeznaczona zostanie do badań polimorfizmu genów białek mleka. W celu oceny możliwości produkcyjnych rodzimej rasy kóz karpackich, utrzymywane w ZD IZ PIB Odrezechowa sp. z o.o. kozy poddano indywidualnej kontroli mleczności, podczas której pobrano próby mleka do analiz podstawowego składu i liczby komórek somatycznych. Zmiany zawartości podstawowych składników (%) i wydajności w czasie laktacji (l) przedstawiono na Rys. 1.



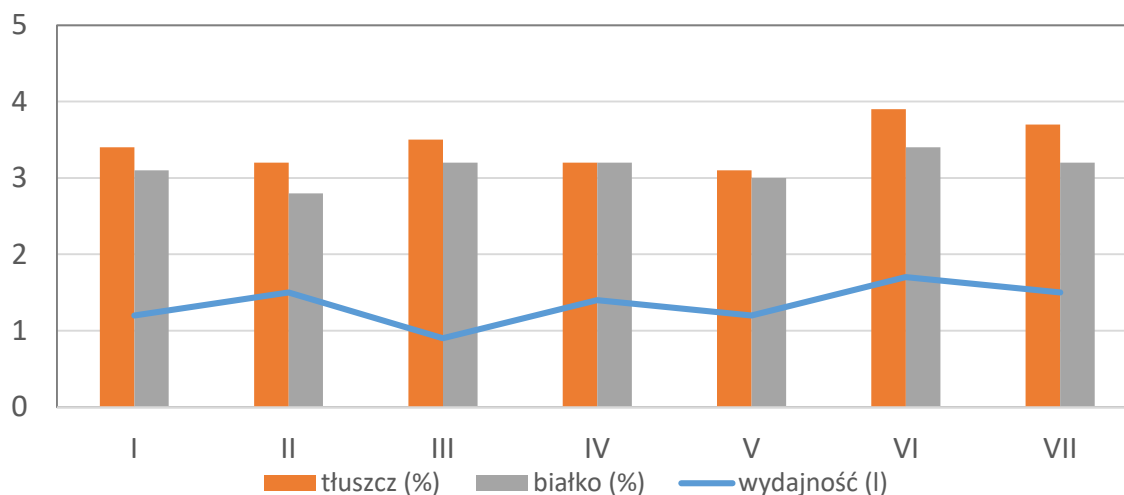
Fot. 2. Kozy karpackie



Rys. 1. Zmiany zawartości podstawowych składników (%) i wydajności w czasie laktacji (l)

Średnia długość doju w stadzie wyniosła 220 dni, podczas którego pozyskano średnio 300 litrów mleka od kozy. Wydajność tłuszczu oszacowano na 10,6 kg, a białka na 9,4 kg. Dzienna wydajność mleka wynosiła średnio 1,4 kg, o zawartości 3,4% tłuszczu i 3% białka. Najwyższą wydajnością dzienną (1,7 kg) mleka i za cały okres doju (400 kg) charakteryzowały się

kozy będące w 6 laktacji (Rys. 2). Od samic w tej laktacji uzyskano również najwyższą wydajność tłuszczu (14,6 kg) i białka (13,4 kg), a ich mleko miało najwyższą zawartość tłuszczu (3,6%) i białka (3,3%). Nie stwierdzono wpływu wieku kóz oraz ich produkcyjności na zawartość komórek somatycznych w mleku.



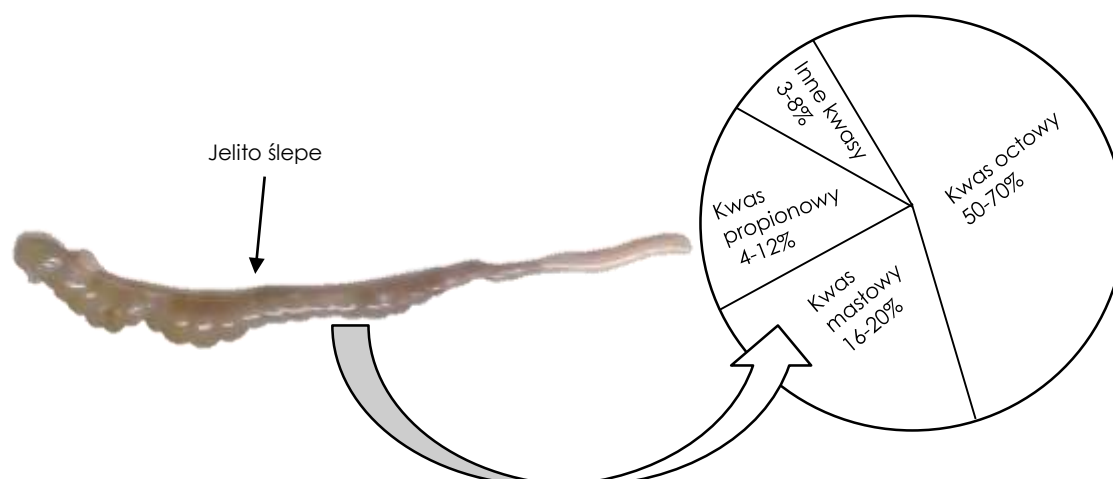
Rys. 2. Wybrane parametry użytkowości mlecznej kóz karpackich w zależności od wieku

Zakład Hodowli Drobego Inwentarza Kierownik: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Zadanie 01-14-01-11 Poprawa efektywności chowu zwierząt futerkowych Kierownik zadania: prof. dr hab. Paweł Bielański

W ramach zadania, w podzadaniu „Zmiany aktywności trawiennej żołądka i jelit w okresie wzrostu młodych królików w zależności od systemu żywienia” przeprowadzono dalsze badania mające na celu określenie zawartości lotnych kwasów tłuszczowych w jelicie ślepym i okrężnicy w zależności od skarmianej mieszanki paszowej.

W jelicie ślepym królików podczas fermentacji produkowane są lotne kwasy tłuszczowe, które są najważniejszym produktem tego procesu. Powstają głównie w wyniku rozkładu węglowodanów wchodzących w skład komórek roślinnych: celulozy, hemicelulozy, pektyn, skrobi i innych dekstranów oraz węglowodanów rozpuszczalnych, a także w wyniku bakteryjnego rozkładu białek. Lotne kwasy tłuszczowe (LKT) są ważnym źródłem energii dla królików. W wyniku fermentacji aminokwasów mogą powstawać rozgałęzione kwasy tłuszczowe jak izomastowy i izowalerianowy, a także amoniak. Oprócz lotnych kwasów tłuszczowych i amoniaku produktami fermentacji są również kwas mlekowy będący jednocześnie substratem dla bakterii wytwarzających LKT, dwutlenek węgla, metan oraz wodór. Jak stwierdzono w badaniach spośród LKT w największej ilości wytwarzane są zarówno w jelicie ślepym, jak i w okrężnicy kwasy: octowy, propionowy i masłowy, a udział procentowy ich stężeń molowych w treści jelit oraz wzajemne proporcje są zależne od rodzaju pobieranej karmy. Profil lotnych kwasów tłuszczowych u dorosłego królika zarówno w jelicie ślepym, jak i okrężnicy charakteryzuje się wyraźną przewagą octanu, mniejszą ilością maślanu i jeszcze mniejszą propionianu (Ryc. 1).



Ryc. 1. Procentowy udział lotnych kwasów tłuszczowych wytwarzanych w jelicie ślepym królika w ogólnej puli LKT

W jelicie ślepym królików w prowadzonym doświadczeniu łączna suma lotnych kwasów tłuszczowych była dwukrotnie większa niż w okrężnicy i wynosiła odpowiednio w grupach 76,5 i 35,8 $\mu\text{mol/g}$ zawartości. W zależności od skarmianej paszy w jelicie ślepym obserwowano istotne różnice pomiędzy grupami żywieniowymi: kontrolną (I) i doświadczalnymi (mieszanka paszowa natłuszczana olejem (II) i mieszanka paszowa standardowa + dodatek trawy (III)) w stężeniu kwasu octowego i kwasu masłowego. Różnice w ogólnym stężeniu SCFA wystąpiły na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy grupami I i II i a III.

W okrężnicy statystycznie potwierdzone różnice stwierdzono jedynie w stężeniu kwasu izowalerianowego pomiędzy grupami I i III a II.

Zmiany w żywieniu mogą modyfikować fermentowalną treść jelita ślepego, a w następstwie również aktywność mikroorganizmów i stabilność flory bakteryjnej. Pomiar poziomu końcowych produktów fermentacji jest wskaźnikiem jakościowym aktywności bakteryjnej w jelicie ślepym, od której zależą kondycja i zdrowie zwierzęcia. Zaburzenia trawienne i stany zapalne jelit u królików są prawie zawsze związane z zakłóceniem równowagi w wytwarzanych LKT. Biegunki okresu poodсадzeniowego powodują zmiany parametrów fermentacji u królików, takie jak zmniejszenie ogólnego stężenia LKT w jelicie ślepym, zwiększenie stosunku propianu do maślanu oraz obniżenie poziomu kwasu masłowego. Korzystne efekty w prewencji tych schorzeń uzyskuje się, stosując w żywieniu zwiększoną dawkę włókna w celu stabilizacji mikroflory jelitowej.

W ramach celu „Zmiany aktywności enzymów trawiennych w przewodzie pokarmowym nerek w różnych okresach żywieniowych” przeprowadzono ocenę parametrów jakości skór norkowych pozyskanych w III etapie badań. W etapie tym czynnikiem doświadczalnym było żywienie dawką o zróżnicowanym poziomie białka i prebiotyku oddziaływującego na rozwój flory bakteryjnej. W grupie kontrolnej zwierzęta żywiono karmą powszechnie stosowaną na fermie, bez udziału dodatków paszowych. W pierwszej grupie doświadczalnej użyto karmę z powszechnie stosowanym udziałem EM z białka i dodatkiem prebiotyku – 0,2 g/szt./dziennie, natomiast w drugiej grupie doświadczalnej karmę ze zwiększonym udziałem EM z białka i dodatkiem prebiotyku – 0,2 g/szt./dziennie. Pomiarów wybranych cech układu pokrywowego obejmowały ocenę parametrów fizycznych skór surowych, tj.: masa, długość, szerokość, powierzchnia i lekkość oraz jakość okrywy włosowej, którą przeprowadzono w 6 miejscach topograficznych skóry (kark, pas barkowy, grzbiet, pas biodrowy, bok, brzuch). Ocena okrywy

włosowej obejmowała parametry futrzarskie pozostające w ścisłym związku z ich użytkowością tj. długość, grubość i gęstość włosów puchowych i pokrywowych.

Wielkość skóry futrzarskiej, a więc jej masa i związana z tym powierzchnia oraz długość zależy m.in. od żywienia i warunków utrzymania. Z przekazanych do dalszych badań futrzarskich skór największymi parametrami wielkości charakteryzowały się futerka grupy II, przy zachowaniu dobrej lekkości skór, którą określa masa 1 dm².

Grupa	Masa skóry (g)	Długość skóry (cm)			Szerokość (cm)	Powierzchnia (dm ²)	Masa 1dm ² (g)
		całkowita	aukcyjna	ogona			
I	203,1	112,5	92,5	20,0	20,0	18,5	11,0
II	224,4	113,7	94,2	19,5	20,0	18,9	11,9
III	243,2	111,8	92,0	19,8	20,3	18,7	13,0

Pomiary cech użytkowych okrywy włosowej określają jej wygląd zewnętrzny oraz jakość. Stwierdzono, że okrywa włosowa wszystkich zwierząt charakteryzowała się wysoką gęstością włosów puchowych, osiągając w grupach doświadczalnych średnio wartość powyżej 21 tys. włosów na 1 cm².

W kolejnym celu prowadzono, także na norkach, badania nad poprawą wskaźników odchowu szczeniąt nerek poprzez optymalizację środowiska. Materiał doświadczalny stanowiło 90 kotnych samic nerek odmiany pastel, w pierwszym i drugim roku rozrodu.



Fot. 1. Klatka z wykotnikiem systemu holenderskiego z wkładem i klatka z wykotnikiem z wkładem wraz z lejkiem

W prowadzonych badaniach czynnikiem doświadczalnym były zróżnicowane domki wykotowe dla samic nerek oraz zróżnicowane ścioty zastosowane w wykotnicach, przeznaczonych dla samic i młodych nerek. Badania wykazały, że wskaźniki użytkowości rozplodowej nerek utrzymywanych w okresie wykotów i odchowu młodych w klatkach z wykotnikiem z wkładem wraz z lejkiem (grupa II) były najwyższe. Dotyczy to zmniejszenia liczby upadków jak zwiększenia średniej liczby młodych odsadzonych od samicy wykocone 5,36 szt. Z kolei najlepszym materiałem ściotowym w okresie wykotów i odchowu młodych była słoma pszenna. Dotyczyło to zmniejszenia liczby upadków w okresie odchowu i zwiększenia średniej liczby młodych odsadzonych od samicy wykocone 5,84 szt. Nieco gorsze wyniki uzyskano stosując słomę owsianą.

Zadanie 01-14-02-11

Wytworzenie polskiej linii syntetycznej królików

Kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Celem zadania było wytworzenie syntetycznych linii ojcowskich (Ch1) oraz syntetycznych linii matczyńskich (Ch2) królików w oparciu o rasę zachowawczą popielniański biały (PB) i rasę termondzki biały (TB) oraz opracowanie kryteriów selekcji tych linii w celu poprawy produktywności i ekonomiki ferm produkcyjnych.

Króliki charakteryzują się wysoką płodnością i plennością, wczesnym dojrzewaniem, szybkim tempem wzrostu, a także dobrym wykorzystaniem paszy. Ich mięso ma wysoką wartość odżywczą i doskonałe walory smakowe, zaliczane jest do mięs białych i dietetycznych. Bogate w pełnowartościowe białko, zawiera niewielką ilość zarówno tłuszczu, jak i cholesterolu, dlatego też cieszy się dużym zainteresowaniem konsumentów z bogatych społeczeństw europejskich, którzy coraz częściej sięgają po zdrowe produkty.

W Polsce nigdy nie było tradycji spożywania mięsa króliczego, jednak w ostatnich latach znajduje ono coraz szersze grono odbiorców. Dane z 2009 roku wskazują, że statystyczny Polak spożywał od 0,4 do 0,5 kg/rok mięsa króliczego, w 2017 roku jego spożycie wzrosło do 1,2 kg. Na świecie najwyższe spożycie mięsa króliczego w kg *per capita* (ok. 4,0-6,0 kg) notowane jest w regionie Morza Śródziemnego (Algieria, Cypr, Egipt, Francja, Włochy, Malta, Portugalia i Hiszpania) oraz w niektórych krajach środkowoeuropejskich (Belgia, Republika Czeska, Niemcy i Luksemburg). Oficjalne dane UE na temat konsumpcji mięsa króliczego wskazują, że jego spożycie waha się w granicach 2,8-3% wśród wszystkich spożywanych mięs, rocznie ubija się około 340 mln królików.

W trakcie wielu lat praktyki hodowlanej okazało się, że w naszym kraju do produkcji żywca króliczego najlepiej nadają się rasy średnie, zaliczane do grupy ras normalnowłosych, np.: kalifornijskie (K), nowozelandzkie białe (NB) i czerwone (NC), termondzkie białe (TB), a także nasza jedyna rodzima rasa popielniańska biała (PB). Cechami wspólnymi tych ras są: wczesne osiągnięcie dojrzałości rozplodowej, wysoka płodność i plenność, szybkie przyrosty dzienne około 28-30 g, dobre wykorzystanie paszy, wysoka wydajność rzeźna i odpowiednie cechy jakościowe tuszki. Króliki w tym typie użytkowym cechują się zwartą budową ciała, wydłużonym i walcowatym tułowiem oraz dobrze umięśnionymi nogami tylnymi. Niemniej jednak, nadal największy procent utrzymywanych w gospodarstwach zwierząt stanowią króliki bezzasowe.

W krajach UE od wielu lat produkcja mięsa króliczego oparta jest o linie syntetyczne – Altex, Genia, Jordan, Martini, Sika, Hyla, Hyla 2000, Genia, Hycle, Zica, czy ostatnio bardzo popularną linię Hyplus wyprodukowaną przez francuską firmę genetyczną Grimaud Freres. Zwierzęta tych linii cechują się: szybkim tempem wzrostu młodych (33-34 g/dzień), intensywnością rozplodu, dużą płodnością i plennością samic, skróconym okresem laktacji, bardzo krótkim okresem tuczu młodych (70-75 dni), a także znaczną wydajnością rzeźną (57-60%). Przy tworzeniu tych linii wykorzystano zjawisko heterozji, objawiające się wybujałością określonej cechy u potomstwa w porównaniu do rodziców. Osobno były tworzone linie żeńskie i osobno męskie. Pomimo, iż kombinacje stosowanych krzyżowań i udział ras jest tajemnicą firmową, strzeżoną patentem wiadomo, że przy tworzeniu samic i samców stada podstawowego krzyżuje się ze sobą kilka ras, z których każda „dokłada” do końcowego efektu coś swojego, np. zdolność do intensywnego użytkowania, wysoką plenność, mleczność, troskliwość, cechy mięsne, dobre wykorzystanie paszy, czy wreszcie dużą potencję i płodność. Firmy produkujące syntetyczne linie sprzedają na ogół tylko samice, które są następnie użytkowane rozplodowo poprzez sztuczną inseminację dostarczaniem nasieniem, a ich potomstwo przeznaczone jest w całości na tucz. Jedynie w doskonałych warunkach fermowych, właściwych dla danej linii, króliki te są

w stanie wykazać wszystkie swoje potencjalne możliwości – zdolność do intensywnego użytkowania rozplodowego (6-8 wykotów w ciągu roku), wysoką płodność i plenność (przeciętnie 8 sztuk w miocie), wysokie tempo przyrostów gwarantujące uzyskanie masy ciała 2,5-2,6 kg w 70-75 dni. Do tych właściwych warunków zaliczyć należy także odpowiednie żywienie, oparte na specjalistycznych paszach granulowanych, niestety często zawierających antybiotyki. Firmy zajmujące się wytwarzaniem linii syntetycznych gwarantują uzyskiwanie reklamowanych efektów produkcyjnych, jedynie pod warunkiem ścisłego przestrzegania przez producenta finalnego wszystkich ich zaleceń. Szczególnie dotyczy to zapewnienia zwierzętom odpowiednich warunków utrzymania, prawidłowego żywienia oraz przestrzegania norm zoohigienicznych.

Jak wiadomo, każde stado królików podlega ciągłym zmianom polegającym na różnicowaniu składu osobników poprzez ich usuwanie i zastępowanie innymi, czyli tzw. remontowi stada. Najczęstszą przyczyną usunięcia danego królika ze stada (pomijając upadki) jest spadek jego produkcyjności. Jeżeli nakłady ponoszone na utrzymanie konkretnego królika są większe od przychodów uzyskanych ze sprzedaży jego potomstwa, zachodzi konieczność wymiany go na innego, lepszego. W stadach, w których liczba zwierząt jest dostosowana do zdolności produkcyjnej fermy, procent wymiany zwierząt jest przez cały czas taki sam i możemy zaplanować ile nowych osobników będziemy potrzebowali w skali roku. Ilość ta będzie wynikała z przeciętnego czasu użytkowania poszczególnych królików. W dobrze prowadzonych fermach produkcyjnych przeciętny czas użytkowania jednej samicy waha się od jednego roku do roku i trzech miesięcy. Ekonomiczne dokonywanie zakupu królików jest uzasadnione tylko przy konieczności wprowadzenia „nowej krwi” do stada, w sytuacji kiedy wszystkie nasze zwierzęta są już ze sobą spokrewnione. W przypadku linii syntetycznych należy pamiętać, że urodzona młódzież nadaje się tylko i wyłącznie do uboju, a zwierzęta na remont stada muszą być zakupione z zewnątrz. Hodowcy podpisujący umowę z firmami oferującymi linie syntetyczne zobowiązani są do zakupu zwierząt stada podstawowego u nich, niejednokrotnie po wyższych cenach niż przy pierwszym zakupie. Bardzo często też zawarta umowa dotyczy zakupu paszy, czy nawet szczepionek. Należy pamiętać również o tym, że najlepsze efekty hodowlane i ekonomiczne uzyskuje się od zwierząt urodzonych na fermie, a proces aklimatyzacji zakupionych sztuk wynosi niejednokrotnie od 3 do 6 miesięcy. Stąd najlepszym rozwiązaniem byłoby pozostawianie na remont stada własnych sztuk. Taką właśnie możliwość chcieliśmy pozostawić hodowcom w przypadku tworzonych linii.

Duże możliwości biologiczne tego gatunku zwierząt nie oznaczają, że w chowie fermowym uzyskuje się tak znaczną liczbę królicząt od samicy. Liczba królików urodzonych i odsadzonych od samicy z miotu uzależniona jest od wielu czynników, między innymi od: rasy, zdolności produkcyjnej stada, pory roku, wieku samicy przy pierwszym kojarzeniu, terminu krycia po wykocie, długości użytkowania rozplodowego, żywienia oraz stosowanych metod rozplodu i technologii produkcji. Zależność między doбором zwierząt do stada a wynikami produkcyjnymi jest obecnie priorytetowym kierunkiem badań w krajach o wysoko rozwiniętej hodowli tego gatunku zwierząt. Jest to wynikiem zarówno kresu możliwości intensyfikacji produkcji poprzez optymalizację żywienia, jak i stosowania nowoczesnych technologii produkcji. W Polsce, jak do tej pory nie wytworzono żadnej linii syntetycznej królików, stąd hodowcy zmuszeni są sprowadzać te króliki głównie z Francji, Niemiec i Włoch, dlatego też w Instytucie Zootechniki PIB podjęto się tego typu prac.

Metodyka badań

Zadanie obejmowało istotne zagadnienia dotyczące poprawy wskaźników płodności, plenności i efektywności odchowu królików oraz poprawy umięśnienia tuszek. Materiał doświadczalny stanowiły króliki rasy popielniańskiej białej i termondzkiej białej, w ilości

80 samców i 280 samic oraz całość uzyskanego potomstwa, w ilości około 6720 sztuk w skali roku. W pierwszym etapie badań z istniejącej populacji królików rasy popielniańskiej białej i termondzkiej białej wyselekcjonowano osobniki o najlepszych parametrach produkcyjnych wg poniższego schematu.

Linia ojcowska (Ch-1):

- A. 5 samców i ich synowie (+35 samic) – selekcjonowane w kierunku maksymalnej ilości sztuk urodzonych w miocie,
- B. 5 samców i ich synowie (+35 samic) – selekcjonowane w kierunku maksymalnego tempa wzrostu całości potomstwa i osiągnięcia najwyższej masy ciała w wieku 90 dni, czyli na zakończenie okresu tuczu,
- C. 5 samców i ich synowie (+35 samic) – selekcjonowane w kierunku maksymalnej liczby sztuk urodzonych w miocie, przy jednoczesnej selekcji z miotów samców uzyskujących maksymalną masę ciała w wieku 90 dni,
- D. 5 samców i ich synowie (+35 samic) – selekcja samców do dalszej hodowli będzie dokonywana losowo (grupa kontrolna).

Linia matczyzna (Ch-2):

- A. 35 samic i ich córki – selekcjonowane w kierunku maksymalnej ilości sztuk urodzonych w miocie,
- B. 35 samic i ich córki – selekcjonowane w kierunku maksymalnego tempa wzrostu całości potomstwa i osiągnięcia najwyższej masy ciała w wieku 90 dni, czyli na zakończenie okresu tuczu,
- C. 35 samic i ich córki – selekcjonowane w kierunku maksymalnej liczby sztuk urodzonych w miocie, przy jednoczesnej selekcji z miotów samic uzyskujących maksymalną masę ciała w wieku 90 dni,
- D. 35 samic i ich córki – selekcja samic do dalszej hodowli dokonywana losowo (grupa kontrolna).

W drugim etapie doświadczenia badaniu w kierunku wybranych cech poddano potomstwo pochodzące z krzyżówek:

♂popielniański biały (PB) x ♀termondzka biała (TB)

♂termondzki biały (TB) x ♀popielniańska biała (PB)

W trzecim etapie badań oceniano potomstwo powstałych linii ojcowskiej Ch-1 i matczynej C2.

Badania prowadzono w fermie królików ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o. w latach 2016 – 2018.

W każdej z grup doświadczalnych zbierano następujące dane:

- liczba królików i masa miotu w 24 godziny po urodzeniu i w 21., 35. dniu życia,
- indywidualne masy ciała królików w wieku 70 i 90 dni,
- procent upadków w poszczególnych dniach odchowu.

Wszystkie zwierzęta objęte doświadczeniem we wszystkich trzech etapach badań pozostawały pod stałym nadzorem pracowników obsługi i służb weterynaryjnych. Króliki żywione były na wszystkich etapach badań pełnoporcjową mieszanką paszową kupowaną w firmie paszowej Cargill. Zwierzęta utrzymywano w klatkach z siatki drucianej zgodnie z wymogami ustawy dla tego gatunku.

W bieżącym roku sprawozdawczym wybrano samce i samice do kolejnego etapu badań. W celu wytworzenia osobnych linii produkcyjnych (ojcowskiej i matczynej) rozród prowadzony był w dwóch grupach, po 5 rodzin, złożonych z 5 samic i jednego samca każda.

Podobnie jak w ubiegłych latach, samice były kryte trzykrotnie w ciągu roku tym samym samcem.

W Tab. 1 przedstawiono dane dotyczące porównania średnich wyników produkcyjnych pomiędzy liniami: ojcowską Ch-1 i mateczną Ch-2. Nie stwierdzono żadnych statystycznie potwierdzonych różnic. W obydwu liniach średnia liczba urodzonych króliczków za trzy kolejne mioty samic była wysoka i wynosiła powyżej 8, w 90. dniu życia liczba królików odchowanych z miotów wynosiła dla linii ojcowskiej Ch-1 – 7,47 sztuk, a dla linii matecznej Ch-2 – 7,68 sztuk. Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi dotyczącymi obecnych na polskim rynku linii syntetycznych. Końcowa masa ciała królików uzyskana w 90. dniu życia na poziomie 2457,4 g dla linii ojcowskiej Ch-1 i 2476,1 g dla linii matecznej Ch-2 jest niestety jeszcze zbyt niska. Taką masę ciała zachodnie linie syntetyczne uzyskują w wieku 70-77 dni życia.

Tab. 1. Porównanie średnich wyników produkcyjnych grup rodzinnych ojcowskiej Ch-1 i matecznej Ch-2 w trzecim roku badań

Wyniki produkcyjne	CH-1	Ch-2
Liczebność miotu przy urodzeniu (szt.)	8,75±0,15	8,91±0,19
Masa miotu przy urodzeniu (g)	522,7±7,27	523,9±9,07
Liczebność miotu w 21. dniu (szt.)	8,36±0,12	8,57±0,17
Masa miotu w 21. dniu (g)	2764,1±39,1	2839,6±54,8
Liczebność miotu w 35. dniu (szt.)	7,93±0,12	8,16±0,15
Masa miotu w 35. dniu (g)	4739,5±71,1	4870,4±93,5
Liczebność miotu w 70. dniu (szt.)	7,67±0,10	7,87±0,15
Masa miotu w 70. dniu (g)	15802,9±227,3	16265,2±338,5
Masa 1 sztuki w 70. dniu (g)	2061,5±10,5	2076,9±28,0
Liczebność miotu w 90. dniu (szt.)	7,47±0,09	7,68±0,14
Masa miotu w 90. dniu (g)	18330,7±240,4	18975,9±344,7
Masa 1 sztuki w 90. dniu (g)	2457,4±12,3	2476,1±17,9

Wartości średnie i błąd standardowy

Wnioski końcowe

Uzyskane wyniki dotyczące ilości urodzonych i odchowanych królików w linii ojcowskiej Ch-1 i matecznej Ch-2 uzyskane w doświadczeniu pozwalają na stwierdzenie, że nowo powstałe linie charakteryzują się wysokimi wskaźnikami rozrodu porównywalnymi z liniami syntetycznymi, produkowanymi przez zachodnie firmy genetyczne.

Stosunkowo niska masa ciała królików w 90. dniu życia wskazuje na konieczność dalszych prac zmierzających do jej zwiększenia. Oprócz dalszej selekcji, pod uwagę należy również wziąć opracowanie odpowiednio zbilansowanej dawki pokarmowej.

Uzyskane linie ojcowskie Ch-1 i mateczne Ch-2 mają tą przewagę nad zachodnimi liniami syntetycznymi, że uzyskane potomstwo może być pozostawiane na remont stada, co znacznie zmniejsza koszty całej hodowli.

Zadanie 01-14-03-11

Wpływ dodatku betainy do mieszanek paszowych dla ślimaka *Helix aspersa* na strawność i produktywność

Kierownik zadania: dr hab. Maciej Ligaszewski, prof. IZ PIB

Betaina paszowa (hydrochlorek trimetyloglicyny) pozyskiwana z buraków przemysłowych pojawiła się na rynku pasz dla zwierząt gospodarskich stosunkowo niedawno i w dalszym ciągu wpływ tego dodatku paszowego na efektywność i jakość produkcji poszczególnych gatunków zwierząt użytkowych nie jest w pełni zbadana. Dotyczy to również niszowej produkcji zwierzęcej,

w tym również jadalnego ślimaka szarego (*Cornu aspersum* synonim *Helix aspersa*), którego Polska jest jednym z czołowych producentów w Europie, na poziomie 3-4 tysięcy ton rocznie.

Dlatego też, głównym celem 3-letnich badań była ocena wpływu wielkości dodatku betainy paszowej z buraków do mieszanki paszowej dla ślimaków na wyniki gospodarcze i jakość produkcji dwóch podgatunków ślimaka szarego: ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum* synonim *Helix aspersa aspersa*) i ślimaka dużego szarego (*Cornu aspersum maxima* synonim *Helix aspersa maxima*). Uzasadnieniem podjęcia badań była konieczność dalszego doskonalenia technologii produkcji ślimaków, szczególnie w praktycznie nieistniejącym w Polsce sektorze badań nad doskonaleniem mieszanek paszowych dla tego gatunku.

Jako dalszy cel podjęto również próbę stworzenia metody oceny strawności pasz dla ślimaków, z braku odpowiedniej literatury na ten temat wykorzystując na początek, poprzez analogię do badań nad paszami dla zwierząt gospodarskich, stosowaną często metodę wskaźnikową, z wykorzystaniem w charakterze wskaźnika przechodzącego w całości przez przewód pokarmowy zwierząt związku chemicznego w postaci Cr_2O_3 . Zwierzętami doświadczalnymi w przeprowadzonych badaniach (2016 – 2018) były utrzymywane od 1996 roku na terenie fermy doświadczalnej ślimaków jadalnych Instytutu Zootechniki PIB w Balicach k. Krakowa hodowlane populacje ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum* synonim *Helix aspersa aspersa*) i dużego szarego (*Cornu aspersum aspersum* synonim *Helix aspersa aspersa*). Ślimaki doświadczalne żywiono standardową, suchą, roślinną mieszanką paszową dla ślimaków o zawartości białka ogólnego 18,6%, do której w wariantach doświadczalnych dodawano tzw. betainę paszową, sprzedawaną w formie hydrochlorku trimetyloglicyny. Badania prowadzono w zależności od roku badań w warunkach ziemnych zagród szklarniowych i ziemnych zagród polowych, obsianych roślinami krzyżowymi oraz zaopatrzonych w drewniane karmniki w postaci palet i system zraszania, przy obsadach zagród wylęgiem ślimaków w średnim zagęszczeniu początkowym wynoszącym 300 osobników na 1 m². Podstawą żywienia była jednak podawana do woli mieszanka paszowa zawierająca w zależności od roku dodatek betainy w wysokości 5,0 g/kg i 2,5 g/kg i wariant kontrolny bez betainy lub 3,0 g/kg i 1,5 g/kg i wariant kontrolny. Próby ślimaków dojrzałych, po 120 osobników z każdej doświadczalnej zagrody polowej, pobierano do pomiarów ich indywidualnej masy ciała, średnicy muszli oraz wskaźników wydajności mięsnej. Pobierano też próby zbiorcze tusz ślimaków lub tusz podzielonych odrębnie na nogi i worki trzewiowe w celu dokonania analiz na zawartość podstawowych składników pokarmowych (białko, tłuszcz surowy, składniki mineralne) oraz zawartości aminokwasów i profili wyższych kwasów tłuszczowych. Na ślimakach dojrzałych zebranych z zagród ziemnych i umieszczonych w dwustronnie zamykanych kuwetach przeprowadzono doświadczenia żywieniowe, podając do woli pasze z odpowiednimi dodatkami betainy paszowej i stosując paszę kontrolną bez betainy.

Wyniki

Ślimaki z gatunku *Cornu aspersum* do osiągnięcia wieku 3-10 tygodni, żywione w warunkach laboratoryjnych paszami zawierającymi dodatki betainy w wysokości 3,0 g/kg i 1,5 g/kg paszy rosły szybciej niż ślimaki żywione wyłącznie paszą kontrolną, bez dodatku betainy; ślimaki dorosłe, dojrzewające w zagrodach ziemnych, zebrane po 12. tygodniach życia, żywione wcześniej powyższymi dodatkami betainy w paszy wykazały mniejszą ostateczną masę ciała niż ślimaki żywione paszą kontrolną, natomiast posiadały wyższe wskaźniki wydajności mięsnej, np. udział wagowy nogi w masie ciała (Tab. 1, Fot. 1). Depresyjny charakter nadmiaru betainy na organizmy zwierząt starszych, kończących swój rozwój somatyczny również wykazano w odpowiedniej literaturze. Zawartość białka w tuszach ślimaków i ich częściach w większym stopniu zależała od systemu chowu (kuweta lub zagroda polowa), niż od zawartości betainy w paszy. Niezależnie od systemu chowu, zawartość

procentowa tłuszczu surowego, wapnia i fosforu w całych tuszach oraz w samych workach trzewiowych malała wraz ze wzrostem wielkości dodatku betainy paszowej. Dla mieszanki paszowej z dodatkiem 1,5 g/kg betainy, najmniejszym z zastosowanych w badaniach dodatków tego związku do paszy, stwierdzono wyraźnie wyższą wartość zdefiniowanego w sprawozdaniu roboczego wskaźnika strawności białka, tłuszczu surowego i większości poszczególnych aminokwasów w stosunku do wariantu kontrolnego, w przeciwieństwie do dawki 3,0 g/kg, pogarszającej w głębokim stopniu przyswajalność tych składników z paszy, w stosunku do wyników z wariantu żywienia kontrolnego. Na podstawie porównania profili wyższych kwasów tłuszczowych w odchodach ślimaków stwierdzono możliwość niekorzystnego oddziaływania dodatków betainy na przyswajanie z paszy frakcji UFA, PUFA i PUFA3, przy czym im wyższy był ten dodatek (kontrola, 1,5 g/kg, 3,0 g/kg), tym ten efekt był większy. Generalnie, dodatek betainy paszowej do mieszanki dla ślimaków w ilości 1,5-3,0 g/kg wpływał na przyspieszenie tempa wzrostu ślimaków do uzyskania przez nie wieku 3-10 tygodni, natomiast u starszych, dorastających ślimaków dodatki betainy oddziaływały wprowadzając depresyjnie na końcową masę ciała, ale za to pozytywnie na jakości tuszy.

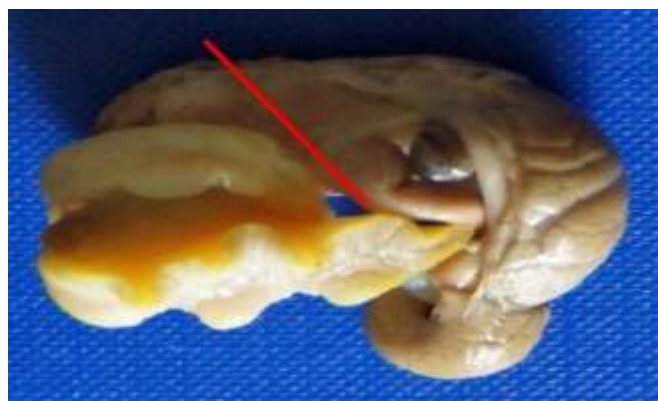
Uzyskane wyniki wskazują również, że dawka betainy w wysokości 1,5 g/kg może przyczynić się do poprawy wskaźników strawności paszy, co wymaga jednak dalszych badań.

Tab. 1. Udział nogi ślimaków (cefalopeda) w masie ciała (%)

Rok Warunki doświadczalne	Czynniki doświadczalne	Układ doświadczenia		
		Doświadczenie	Doświadczenie	Kontrola
Ślimak mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i> synonim <i>Helix aspersa aspersa</i>)				
2018	betaina w paszy (g, kg)	3,0	1,5	-
Zagrody polowe, doświadczenie 12-tygodniowe	Udział nogi w masie ciała (g, %)	39,3	38,5	38,5
2017	betaina w paszy (g, kg)	3,0	1,5	-
Warunki laboratoryjne, doświadczenie 10-tygodniowe	Udział nogi w masie ciała (g, %)	37,2 ^A	37,2 ^A	34,3 ^B
Ślimak duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i> synonim <i>Helix aspersa maxima</i>)				
2018	betaina w paszy (g, kg)	3,0	1,5	-
Zagrody polowe, doświadczenie 12-tygodniowe	Udział nogi w masie ciała (g, %)	41,2 ^A	39,8 ^B	38,9 ^B

a, b, c – różnice statystycznie istotne ($P < 0,05$) pomiędzy wariantami doświadczenia.

A, B, C – różnice statystycznie wysoko istotne ($P < 0,01$).



Fot. 1. Podział tuszy ślimaka

Po lewej stronie na Fot. 1 znajduje się noga z kołnierzem (cefalopeda) + gruczoł białkowy (cięcie technologiczne), natomiast po stronie prawej worek trzewiowy.

Zadanie 01-14-04-11

Wykorzystanie białka różnych gatunków owadów w żywieniu królików

Kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Celem zadania jest wykazanie możliwości wykorzystania w żywieniu królików bezkręgowców, jako źródła najwyższej jakości białka.

Obecnie najszerzej dostępnymi komponentami białkowymi pochodzenia roślinnego, wykorzystywanymi w żywieniu zwierząt są poekstrakcyjne śruty: sojowa, rzepakowa, słonecznikowa, a także rośliny strączkowe, gluten kukurydziany czy izolaty białka ziemniaka, których wartość odżywcza jest jednak niższa w porównaniu z białkiem pochodzenia zwierzęcego. W żywieniu królików, podobnie jak i wielu innych gatunków zwierząt gospodarskich, od momentu wprowadzenia zakazu stosowania mączek mięsno-kostnych głównym źródłem białka stała się poekstrakcyjna śruta sojowa. Na świecie aż 75% produkowanej soi przeznaczane jest na paszę dla zwierząt hodowlanych. W Europie ten procent jest jeszcze większy i wynosi około 93. W większości jest to soja importowana, a sama Polska importuje jej od 1,8 do 2,0 mln ton rocznie. Dlatego też, w przemyśle paszowym zaczyna poszukiwać się nowych materiałów paszowych mogących ograniczyć wykorzystanie poekstrakcyjnej śruty sojowej.

W ostatnim czasie coraz częściej poruszany jest temat zastosowania różnych gatunków owadów jako źródła białka i tłuszczu. W wielu krajach azjatyckich, afrykańskich, jak i Ameryki łacińskiej bezkręgowce stanowią powszechne źródło białka w mieszankach paszowych dla zwierząt gospodarskich. Dlatego rozważania na temat włączenia owadów, jako „nowego” materiału paszowego w komercyjnej produkcji pasz, jak również opracowanie zintensyfikowanych systemów chowu dla wybranych gatunków stawonogów w warunkach europejskich, wydają się być uzasadnione.

W dostępnej literaturze obecne są informacje dotyczące wykorzystania w żywieniu zwierząt gospodarskich larw *Hermetia illucens*, muchy domowej (*Musca domestica*), mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) oraz owadów należących do rzędu prostoskrzydłych (*Orthoptera*), tj. szarańczy i świerszczy. Wszystkie stadia rozwojowe tych owadów cechuje wysoka zawartość białka ogólnego o korzystnym składzie aminokwasów egzogennych oraz tłuszczu o korzystnym profilu kwasów tłuszczowych. Koncentracja białka ogólnego waha się od 40-60%. Z kolei koncentracja składników pokarmowych w organizmie owadów zależy od ich stadium rozwojowego, warunków produkcji oraz składu paszy i podłoża, na którym są utrzymywane podczas wzrostu.

Do tej pory nie były prowadzone doświadczenia z wykorzystaniem mączek z owadów w żywieniu królików, stąd prowadzone badania mają charakter innowacyjny. Produkcja mączek z bezkręgowców w Polsce rozwija się na coraz większą skalę, przewiduje się zatem, że cena tych produktów znacznie spadnie i będzie niższa niż poekstrakcyjnej soi.

Celem praktycznym prowadzonych badań jest z jednej strony, wskazanie możliwości wykorzystania w żywieniu królików mięsnych nowego materiału paszowego, jakim jest mączka z bezkręgowców, z drugiej określenie jej wpływu na walory prozdrowotne mięsa króliczego.

W bieżącym roku sprawozdawczym zakupiono suszone larwy jedwabnika morwowego, mącznika młynarka i drewnojada. Po sproszkowaniu uzyskane mączki, poddano analizie podstawowej na zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego i włókna surowego oraz aminokwasów (Tab. 1 i 2).

Tab. 1. Wyniki analiz podstawowych w suszonych larwach jedwabnika morwowego, mącznika młynarka i drewnojada

Wyszczególnienie	Jedwabnik morwowy	Mącznik młynarek	Drewnojad
Sucha masa (g/kg)	937,10	898,10	982,70
Białko ogólne (g/kg SM)	580,10	636,71	457,92
Tłuszcz surowy (g/kg SM)	202,30	239,62	424,75
Popiół surowy (g/kg SM)	46,40	45,92	25,95
Włókno surowe (g/kg SM)	32,50	68,49	54,75

Tab. 2. Zawartość aminokwasów g/kg SM w suszonych larwach jedwabnika, mącznika młynarka i drewnojada

Aminokwasy	Larwy jedwabnika	Larwy mącznika	Larwy drewnojada
Asp	54,15	48,14	36,96
The	22,69	24,10	18,50
Ser	24,15	28,70	17,89
Glu	56,34	66,70	66,91
Pro	22,58	46,84	27,74
Gly	20,91	32,92	22,24
Ala	19,91	43,00	30,13
Val	25,33	36,97	28,33
Ile	19,85	26,12	19,84
Leu	31,45	42,39	31,01
Tyr	28,56	35,71	31,64
Phe	24,02	19,48	16,13
His	11,95	15,05	11,54
Lys	30,37	32,28	25,84
Arg	25,98	32,58	26,68
Cys	7,39	6,02	3,93
Met	20,21	9,70	6,64

Na podstawie uzyskanych wyników opracowano cztery warianty dawek pokarmowych: kontrolną z 10% dodatkiem poekstrakcyjnej śruty sojowej i doświadczalne, gdzie poekstrakcyjną sojową zastąpiono mieszanką tubinu białego (5%) i poszczególnych mączek z owadów (5%). Pełnodawkowe mieszanki, którymi żywione są króliki zbilansowano tak, aby ilość białka wynosiła około 18%, a włókna około 12%.

Materiał doświadczalny stanowiły króliki rasy nowozelandzkiej białej w ilości 40 samic stada podstawowego i 112 sztuk losowo wybranego potomstwa.

Utworzono 4 grupy żywieniowe:

- Grupa I (kontrolna) – 10 samic NB żywionych granulowaną mieszanką podstawową o standardowej recepturze.
- Grupa II – 10 samic NB żywionych mieszanką z 5% udziałem mączki z larw jedwabnika morwowego.
- Grupa III – 10 samic NB żywionych mieszanką z 5% udziałem mączki z larw mącznika młynarka.
- Grupa IV – 10 samic NB żywionych mieszanką z 5% udziałem mączki z larw drewnojada.

Wszystkie samice w grupach pokryto w wieku 4,5 miesiąca życia. Urodzoną młodzież odsadzono od samic w wieku 35 dni, tworząc analogiczne grupy jak dla samic, po 28 sztuk królicząt w każdej tak, aby zwierzęta przez cały okres doświadczenia pobierały tę samą paszę. Młode króliczki w dniu odsadzenia oznakowano na uszach, zaszczepiono przeciw pomorowi chińskiemu i myksomatozie. W doświadczeniu określano: indywidualne masy ciała królicząt w wieku 35, 70 i 90 dni życia, procent upadków za cały okres tuczu, zużycie paszy na 1 kg przyrostu. Po zakończeniu odchowu doświadczalnego z każdej grupy wybrano losowo po 6 sztuk królicząt. Zwierzęta ubito i przeprowadzono analizę rzeźną. Pozyskane tuszki po wcześniejszym podzieleniu na trzy części poddano dysekcji. Próbkę pozyskanego mięsa oddano do Centralnego Laboratorium IZ PIB, w celu oznaczenia w mięśniach tylnej nogi i combra: wody wolnej, podstawowego składu chemicznego (białka, tłuszczu, popiołu), kolagenu ogólnego, mechanicznych cech tekstury, poziomu aminokwasów, wyższych kwasów tłuszczowych, TBA-RS w mięsie mrożonym po 14 i 90 dniach przechowywania, cholesterolu całkowitego oraz witamin A i E.

Zakład Hodowli Koni

Kierownik: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

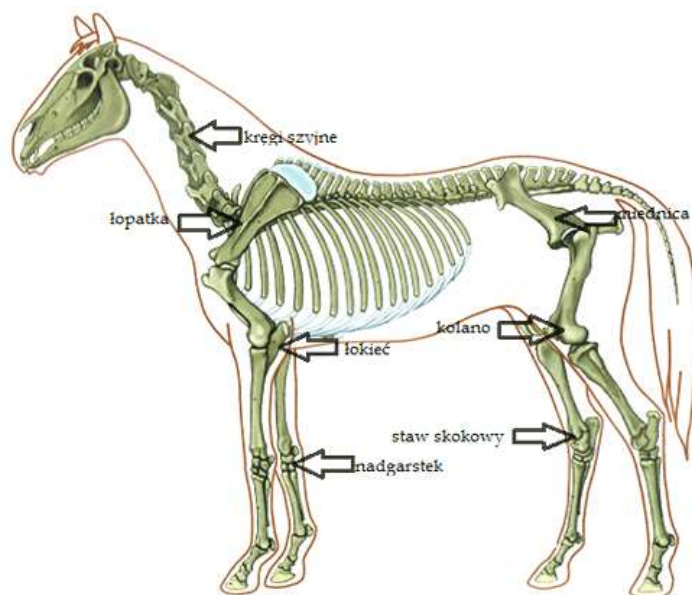
Zadanie 01-15-01-11

Opracowanie metody oceny budowy i funkcjonalności aparatu ruchowego u koni

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

W drugim roku realizacji zadania kontynuowano badania służące do wyznaczenia teoretycznej fizjologicznej osi podparcia kończyny przedniej i tylnej konia. Na podstawie wieloletnich obserwacji wysunięto tezę, że kończyna kompensując odchylenia od normy w zakresie dużych stawów dąży dystalną częścią do osiągnięcia podparcia w punkcie teoretycznym. Na przykład, przy zbliżeniu się prawego i lewego stawu skokowego do siebie, kopyta rozstawiają się na zewnątrz w okolicę punktów podparcia wyznaczonych przez oś – mimo nieprawidłowości w zakresie budowy wszystkich stawów kończyn, punkty podparcia dążą do fizjologii. Jest to warunkiem zrównoważenia kończyny i wytworzenia funkcji zastępczych.

Wykorzystując doświadczenie z pierwszego roku realizacji zadania doprecyzowano metody oraz sposób zbierania danych i przeprowadzenia doświadczenia. Po licznych próbach wybrano metodę nieinwazyjnego wyznaczania i oznakowania punktów na skórze konia zgodnie z przyjętą metodyką. Łącznie zdefiniowano 20 punktów wyznaczanych na każdym koniu podczas pomiarów. Wykonano szereg zdjęć koni z zaznaczonymi na skórze punktami odzwierciedlającymi budowę anatomiczną szkieletu konia.



W omawianym okresie sprawozdawczym wykonano również wiele rzeczywistych pomiarów koni, zgodnie z przyjętą metodyką w celu opracowania metody wyznaczania fizjologicznej osi podparcia kończyn. Wykorzystując dotychczasowe doświadczenie, rozpoczęto prace nad konstrukcją przyrządu – pozycjonera ze wskaźnikami laserowymi, umożliwiającego wykonywanie dalszych pomiarów z możliwością wykorzystania dla zwierząt różnych grup wiekowych.

Obserwacjom poddano konie w różnym wieku, w tym konie huculskie: 45 koni w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o., 35 koni w SKH Gładyszów sp. z o.o., 25 koni oraz 15 koników polskich z prywatnych hodowli. Ponieważ każdy koń dokumentowany jest w co najmniej dwóch powtórzeniach z lewego boku, przodu i tyłu łącznie otrzymano ponad 1000 zdjęć, które w dalszej kolejności będą wykorzystane do obróbki komputerowej i analizy na potrzeby wytyczonych celów i zadań zgodnie z metodyką. Analiza dotychczas zgromadzonego materiału posłuży również do wybrania odpowiedniego oprogramowania do komputerowej analizy obrazu cech ocenianych według założeń metodyki.

Przeprowadzone badania i pomiary dotyczyły w szczególności określenia następujących zależności:

- Pole powierzchni styku kopyta z podłożem (odcisk przedniego i tylnego kopyta na plastycznym podłożu – całej podeszwy wraz ze strzałką). Oznaczenie anomalii w obrębie krawędzi korowej i piętpek.
- Pole powierzchni rzutu całej podeszwy.
- Kąt ściany przedniej (grzbietowej) do podłoża – przód, tył lewa strona – kątomierz, wynik w stopniach kątowych.
- Masa konia i rozkład ciężaru na przednie i tylne kończyny pomiar za pomocą dwóch wag platformowych przy ustawieniu kończyn przednich na jednej i tylnych na drugiej. Wyniki posłużą do zdefiniowania współczynników np. rozmieszczenie ciężaru przód tył w procentach, objętość kopyta do ciężaru, pole powierzchni podeszwy/podparcia do ciężaru dla pojedynczego kopyta i całego konia.
- Pomiary kątów pomiędzy liniami poprowadzonymi przez punkty na tylnej kończynie. (Linia 1. krętarz większą część doczaszkowa i nadkłykieć boczny kości udowej, Linia 2. nadkłykieć boczny kości udowej i kostka boczna kości piszczelowej, Linia 3. kostka

boczna kości piszczelowej i dołek więzadłowy kości skokowej, Linia 4. dołek więzadłowy kości skokowej i rzut grota strzałki na krawędzi bocznej kopyta).

- Pomiar odległości między punktami na kończynach tylnych prawej i lewej (dół podkolanowy, kostka przyśrodkowa kości piszczelowej, guz piętowy, rowek między piętami).
- Kąt pomiędzy liniami poprowadzonymi przez bruzdę pośrodkową strzałek kończyn przednich i tylnych – wynik w stopniach kątowych.

Badania prowadzone są zgodnie z metodyką i będą kontynuowane na koniach różnych ras i w różnym wieku.

Zadanie 01-15-02-11

Analiza rodzaju i częstotliwości występowania wad dyskwalifikujących z hodowli konie wybranych ras rodzimych

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

Zmiana charakteru użytkowania koni związana z postępowaniem cywilizacyjnym spowodowała, że praca hodowlana jako fragment procesu ewolucyjnego zmierza bardziej drogą eksterieru i ładnego wyglądu konia niż jego zdrowia i prawidłowego funkcjonowania oraz wykorzystania zgodnie z przeznaczeniem danej rasy. Istnieje realne zagrożenie utraty podstawowych cech funkcjonalnych, jakim jest dobre zdrowie, długowieczność, płodność, a także charakter umożliwiający posiadanie i współpracę z końmi, nie tylko zaawansowanej grupie ludzi mających wysokie kwalifikacje w obchodzeniu się z koniem. W wielu opracowaniach naukowych i badawczych podejmowany jest temat oceny uzyskanych wyników, jednak nieliczne prace uwzględniają ważny kontekst analizy przyczyn i podłoża uzyskiwania niezadawalających wyników, często eliminujących konie z hodowli.

Mając na względzie ten aspekt, wydzielono cechy dotyczące wad pokroju i budowy z uwzględnieniem wad dyskwalifikujących oraz wad obniżających wartość użytkową. Kolejnym zagadnieniem są cechy rozrodcze, takie jak: płodność, żrebności, obniżona skuteczność krycia ze szczególnym zwróceniem uwagi na wady rozwojowe potomstwa. Do cech podlegających gromadzeniu i dalszej analizie należą również pomiary biometryczne oraz szczegółowa punktacja bonitacyjna w odniesieniu do zgodności z wzorcem rasowym badanej populacji.

W roku sprawozdawczym uczestniczono w przeglądach selekcyjnych stadnin koni rasy huculskiej (około 200 koni) oraz rasy śląskiej (50 koni). Brano również udział w przeglądzie hodowlanych koni zimnokrwistych (40 koni).

Uzyskany materiał dotyczy różnych grup wiekowych ocenianych koni. Po zebraniu większej liczby danych będzie można wydzielić grupy wiekowe z uwzględnieniem podziału na zakres wad i przyczyn eliminujących konie różnych ras na poszczególnych etapach selekcji.

Zadanie 04-15-01-21

Charakterystyka populacji koni sokólskich ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień rozrodu

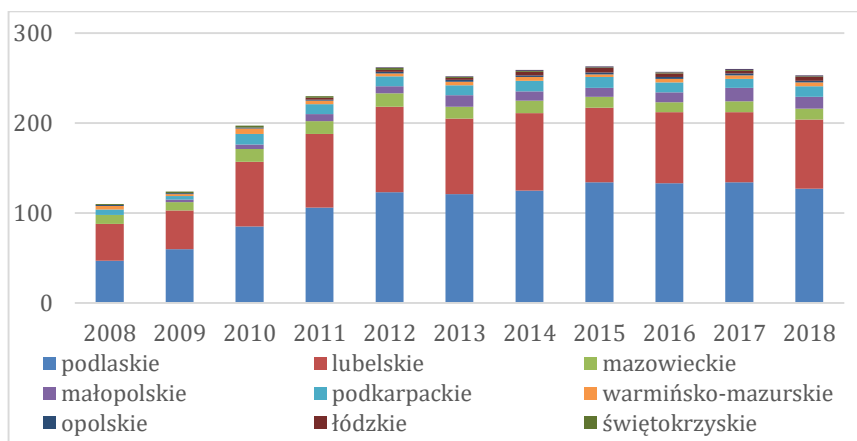
Kierownik zadania: dr inż. Grażyna Polak

Podczas 11 lat funkcjonowania programu ochrony populacji koni sokólskich wzrosła czterokrotnie. Niewątpliwym sukcesem realizacji programu była postępująca konsolidacja, a w efekcie coraz wyraźniej zarysowujący się typ konia sokólskiego. Mimo to, program ochrony napotykał szereg problemów związanych ze stosowaniem się hodowców do kryteriów selekcji. Z tego powodu dalsza realizacja programów wymagała analizy dotychczasowych dokonań, kompleksowej charakterystyki populacji i oceny wpływu czynników zewnętrznych.

Celem badań była analiza zmian fenotypowych zachodzących w chronionej populacji koni sokólskich, wyodrębnienie najważniejszych linii męskich i żeńskich, ocena parametrów

rozrodu klaczy sokólskich uczestniczących w programie ochrony, a także ocena inbrodu i spokrewnienia. Prowadzone badania miały charakter rozwojowy, a aspekt praktyczny tematu stanowiło wskazanie elementów wymagających korekty.

Warunki środowiskowe w historycznym rejonie powstania typu sokólskiego (północno-wschodnia Polska) uległy w ostatnich dziesięcioleciach widocznym zmianom klimatycznym. Średnie roczne temperatury wzrosły, a średnie opady obniżyły się. Jednocześnie w badanym okresie zasięg występowania koni sokólskich wykroczył poza region pochodzenia typu; w roku 2018 ok. 20% występowało w Małopolsce, na Mazowszu i Podkarpaciu oraz innych regionach centralnej i południowej Polski.



Rys. 1. Rozkład populacji koni sokólskich, objętych programem ochrony zasobów genetycznych w poszczególnych regionach kraju, w latach 2008 – 2018

Występowanie chronionej, lokalnej populacji poza rejonem pochodzenia może nieść za sobą konsekwencje w postaci utraty charakterystycznych cech typu sokólskiego (relatywnie lekka budowa, nieduża głowa, suchość kończyn). W celu oceny sytuacji przeprowadzono ankietę, którą objęto właścicieli stad koni sokólskich w całej Polsce. Stwierdzono, że w większości występowały one w tradycyjnych, niewielkich gospodarstwach o mieszanym kierunku produkcji rolnej. W ponad 40% przypadków hodowcami były osoby z długą praktyką, ponad 35-letnią, które utrzymywały typ ze względu na przywiązanie do tradycji rodzinnej, ale także ze względu na możliwość sprzedaży materiału hodowlanego oraz otrzymywania dopłat w ramach programu rolno-środowiskowego (rolno-środowiskowo-klimatycznego) PROW.



**Fot. 1. Klacz sokólska Gustowna z przychówkiem (klaczka Gema po Beskid).
ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. (A. Janowska)**

Analiza podstawowych średnich pomiarów biometrycznych wykazała, że hodowane obecnie konie sokólskie są bardziej masywne, niż te utrzymywane w połowie XX wieku. Może to

wynikać ze zmiany kierunku użytkowania, z roboczego na produkcję koni rzeźnych, częstego użycia ciężkich, importowanych ogierów oraz intensywnego żywienia. Pomiedzy populacjami klaczy w poszczególnych województwach występowały istotne statystycznie różnice wymiarów biometrycznych: wysokości w kłębie, obwodu klatki piersiowej, obwodu nadpęcia (Tab. 1).

Tab. 1. Zmienność podstawowych wymiarów klaczy w poszczególnych województwach

Województwo	L. klaczy	Wysokość w kłębie		Obwód klatki piersiowej		Obwód nadpęcia	
		Średnia [cm]	SD	Średnia [cm]	SD	Średnia [cm]	SD
Podlaskie	1294	157,11 ^{ab}	3,18	213,81 ^{ab}	9,43	24,68 ^{ab}	0,86
Małopolskie	33	156,85 ^{ab}	2,85	208,97 ^b	6,49	24,03 ^b	0,83
Lubelskie	550	155,74 ^b	3,2	212,02 ^{ab}	8,99	24,32 ^b	0,9
Warmińsko-Mazurskie	53	157,74 ^a	2,63	216,06 ^a	8,7	24,85 ^a	0,81
Podkarpackie	51	155,82 ^{ab}	3,42	210,02 ^b	9,42	24,37 ^{ab}	0,88
Mazowieckie	72	156,01 ^{ab}	3,63	214,24 ^{ab}	8,8	24,24 ^b	0,96

ab – średnie różnią się statystycznie wysokoistotnie ($P \leq 0,05$)

Analiza informacji związanych z rozrodem pokazała, że okres wyźrebień coraz częściej przypadają na miesiące letnie i jesienne; otrzymane wyniki wskazują, że tylko 57% klaczy wyźrebiło się od marca do końca maja, podczas kiedy w połowie XX. wieku, było to ponad 90%. Wyniki uzyskane w odniesieniu do cięż kończących się przed czasem ujawniły, że 22% były to jałowienia, a w 4% poronienia. Pozostałe straty wynikały z padnięć źrebiąt w okresie okołoporodowym. Zauważalna była również ujemna korelacja, między wiekiem klaczy, a ilością pozyskanych od niej źrebiąt.

Tab. 2. Wskaźniki rozrodu klaczy sokólskich uczestniczących w programie ochrony zasobów genetycznych

Rok	Żrebność	Wyźrebieńia	Płodność	Jałowienia	Poronienia
2008	62,4	40,6	57,6	37,6	2,1
2009	81,3	62,3	70,2	18,7	5,1
2010	75,8	57,3	61,6	24,2	4,8
2011	77,0	62,2	68,5	23,0	6
2012	78,5	65,7	69,8	21,5	6,6
2013	80,5	68,9	72,9	19,5	5,4
2014	79,9	71,3	75,1	20,1	1,7
2015	80,5	71,0	73,9	19,5	2,8
2016	82,4	75,0	78,6	17,6	3,1
Średnia	77,6	63,8	69,8	22,4	4,2

Analiza danych rodowodowych pokazała, że populacja koni sokólskich pochodziła z linii 34 reproduktorów. Największy udział posiadały ogiery ardeńskie: Rolltan 699 – urodzony w 1985 roku oraz Gustaw 2807 – urodzony w 1939 roku; oba importowane ze Szwecji. Z ich linii pochodziło 43,92% klaczy. W całej grupie były aż 23 ogiery – założycieli rasy ardeńskiej. Pozostałe klacze pochodziły z linii ogierów zimnokrwistych niemieckich (ok. 13,01%), ogierów bretońskich (ponad 10,49%). Tylko dwa, niemające większego znaczenia były w hodowli krajowej. Nie stwierdzono występowania linii pochodzących od pierwszych sprowadzonych z Francji 8 ogierów bretońskich, uważanych za protoplastów typu sokólskiego, w tym od ogiera Upas Jarboteur – urodzony w 1920 roku we Francji.

Poziom inbredu w populacji sokólskiej miał statą, niewielką tendencję wzrostową, nieprzekraczającą 0,29-0,31%. Średni współczynnik inbredu w 2018 roku wyniósł 1,69%. Procent koni zinbredowanych – 99,9%. Najwięcej osobników – 92,24% było zinbredowanych w najmniejszym stopniu poniżej 3,13%, ok. 7% w granicach 3,13-12,5%, najwyższy inbred, ponad 12,5% dotyczył zaledwie 1,23% populacji, co stanowiło 20 osobników. Należy jednak zwrócić uwagę, że występują statystycznie wysoko istotne różnice poziomu inbredu w poszczególnych województwach, co może być niebezpieczne dla województw o małej i bardzo małej liczebności, jak np. Małopolska.



Fot. 2. Ogier Palomar ur. 2011 (Elgon x Palemka). ZD IZ PIB Kołbacz (A. Janowska)

W latach 2008 – 2018 klacze uczestniczące w programie ochrony urodziły ponad 5 tys. sztuk potomstwa, z czego niecałe 20% otrzymało licencje i zostało wpisane do ksiąg hodowlanych. Brak było informacji na temat pozostałych 80%, ale można przypuszczać, że zostały sprzedane jako materiał rzeźny. Ze względu na brak poddawania młodych koni komisyjnej ocenie trudno jest określić ich wartość oraz potencjalne znaczenie dla hodowli. Dodatkowo ogiery, od których uzyskano największą liczbę potomstwa odznaczały się średnią wartością użytkową, ocenianą na podstawie bonitacji potomstwa.

Zadanie 04-15-02-11

Charakterystyka laktacji oraz określenie poziomu substancji biologicznie aktywnych w mleku klaczy

Kierownik zadania: dr inż. Grażyna Polak

W ramach realizacji zadania w okresie od stycznia do grudnia 2018 r., zgodnie z założeniami metodycznymi pozyskiwano mleko od klaczy w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. oraz w prywatnym stadzie klaczy gorącokrwistych, usytuowanym w odległości 30 km. Bezpośrednio po udoju pobrane próbki mleka były schładzane do temperatury 3-6°C, a następnie zamrażane do temperatury -20°C. Raz na miesiąc pobierano próbki (100 ml) mleka zbiorczego. Jednocześnie w ten sam sposób pobrano próbki mleka w stadzie klaczy gorącokrwistych.

Zamrożone mleko dostarczane było do laboratoriów Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, gdzie dokonywano analizy pod kątem:

- składu chemicznego i wartości energetycznej;
- profilu kwasów tłuszczowych;
- właściwości fizykochemicznych;
- profilu białek serwatkowych;
- różnicy składu mleka mrożonego i liofilizowanego.

Dodatkowo w stadzie klaczy sokólskich zbierano informacje na temat wydajności mleka, zachowania klaczy, zachowania źrebiąt, kondycji klaczy i źrebiąt.

Tab. 1. Średnia wydajność klaczy oraz średni czas udoju w 2018

Nazwa klaczy	TELIMENA (84 dni doju)	GEMA (84 dni doju)
Data wyźrebiania	07.03.2018	27.03.2018
Suma: litry mleka	śr. litrów/dzień	śr. litrów/dzień
	0,94	1,01
Suma: 163,60	79,10	84,50

Średnia wydajność klaczy w 2018 roku wyniosła ok. 82 litrów/klacz, natomiast w roku 2017 było to ok. 121 litrów/klacz. Różnica ta mogła być wynikiem bardzo wysokich temperatur w miesiącach wiosennych i letnich, przekraczających 30°C. W tym okresie wydajność klaczy spadała do niespełna 1 litra/dzień.



Fot. 1. Dój klaczy w ZD IZ PIB Kolbacz sp. z o.o.

Badanie składu mleka

Badaniom poddano dotychczas 43 próbki mleka – 33 pochodziły od klaczy sokólskich, a 10 od klaczy gorącokrwistych. Zauważono spadek zawartości tłuszczu przy jednoczesnym wzroście pozostałych składników: suchej masy, białka, laktozy i popiołu. Wzrosła również nieznacznie wartość energetyczna.

Tab. 2. Profil białek serwatkowych (średnie wartości) w 2017 i w 2018 roku

Białka serwatkowe ogółem	IMG	LF	AS	BLg	Lizozym	A-la
	% białka ogółem					
2017						
54,35	3,10	2,13	1,07	20,87	12,11	15,07
2018						
54,35	2,05	2,42	2,10	20,68	12,16	14,93

Profil kwasów tłuszczowych wykazał podobnie jak w poprzednim roku najwyższą zawartość kwasu palmitynowego – C16:0, oleinowego – C18:1, kwasu linolowego – C18:2 n-6. Zawartość ogółem białek serwatkowych była identyczna, ale zauważalny był spadek immunoglobulin (IMG), beta-laktoglobulina (BLg), alfa-laktoalbumina (A-la) oraz wzrost zawartości albuminy (AS), laktoferyny (LF), lizozymu.

Podsumowanie wyników

Prowadzenie doju 1 raz dziennie nie wpłynęło na pogorszenie dobrostanu żrebiąt. Jednak obserwacje wskazują, że ilość pozyskiwanego mleka jest silnie uzależniona od warunków środowiska i nieprzewidywalnych i niecodziennych zjawisk zachodzących w pobliżu klaczy. Wynikiem tego były gorsze wyniki doju i mniejsza ilość pozyskiwanego mleka.



Fot. 2. Roczne klacze na pastwisku w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o.

Zakład Fizjologii Żywienia

Kierownik: dr hab. Marek Pieszka, prof. IZ PIB

Zadanie 01-16-01-11

Wpływ dodatków fizjologicznie aktywnych na rozwój przewodu pokarmowego, status zdrowotny oraz wskaźniki produkcyjne prosiąt i tuczników

Kierownik zadania: prof. dr hab. Ewa Hanczakowska

Celem zadania jest opracowanie nowej strategii żywienia ciężarnych loch w celu zminimalizowania efektu IUGR wywołanego niedożywieniem płodów, poprzez zastosowanie enzymów trzustkowych oraz poprawa wskaźników produkcyjnych prosiąt poprzez dodatek koncentratów włókna lub kwasów walerianowego i enantowgo.

Cel 1

Celem badań jest poznanie wpływu kwasu walerianowego (C5) i enantowego (C7) na strukturę nabłonka jelitowego i florę mikrobiologiczną przewodu pokarmowego prosiąt, a co za tym idzie na ich zdrowotność i wskaźniki odchowu.

W bieżącym roku kontynuowano badania nad stosowaniem nieparzystych kwasów walerianowego i enantowego w żywieniu prosiąt. Wykonano analizy biochemiczne w pobranej po uboju prosiąt krwi. Krew pobrano od 6 prosiąt w 28 i od kolejnych 6 w 56. dniu życia. Analizy wykonano na automatycznym analizatorze w Zakładzie Fizjologii Żywienia Zwierząt w Aleksandrowicach.

W 28. dniu życia nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanych kwasów na poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i triacylgliceroli, przy czym jego niższy o 20% poziom w porównaniu do kontroli stwierdzono u prosiąt otrzymujących kwas kaprylowy (Tab. 1). Najniższy poziom cholesterolu LDL stwierdzono w 28. dniu w surowicy krwi prosiąt otrzymujących kwas walerianowy i kaprylowy, w porównaniu do surowicy krwi prosiąt otrzymujących kwas enantowy ($P < 0,05$). Wyższy poziom fosfatazy alkalicznej (ALP) i równocześnie wyższy poziom fosforu stwierdzono w surowicy krwi prosiąt otrzymujących maślan sodu.

Tab. 1. Wskaźniki biochemiczne surowicy krwi w 28. dniu życia prosiąt

	Kontrola	Maślan sodu	Kwas walerianowy	Kwas kapronowy	Kwas enantowy	Kwas kaprylowy
Cholestrerol						
Całkowity mg/dl	131,3	133,6	120,0	111,8	134,8	104,8
HDL, mg/dl	61,1	67,8	58,2	54,1	57,1	50,4
LDL-d, mg/dl	61,3	60,4	48,7	51,9	67,7	51,2
LDL, mg/dl	49,2 ^{ab}	49,8 ^{ab}	30,2 ^a	37,5 ^{ab}	60,7 ^b	32,6 ^a
Triacylglicerole mg/dl	105,7	80,4	126,3	102,2	86,3	109,2
ALT, U/l	38,7 ^{abc}	46,4 ^{bc}	42,8 ^{abc}	32,2 ^a	36,8 ^{ab}	50,4 ^c
AST, U/l	88,7	88,4	112,3	125,9	116,2	138,0
ALP, U/l	233,0 ^{ABab}	358,6 ^{Cc}	224,2 ^{ABab}	170,3 ^{Aa}	299,7 ^{BCbc}	182,4 ^{ABa}
Mocznik, mg/dl	22,5 ^{abc}	15,3 ^a	28,7 ^c	28,3 ^{bc}	17,4 ^{ab}	27,3 ^{bc}
Albuminy, g/dl	3,13	3,49	3,20	3,33	3,31	3,24
Białko całkowite, g/dl	5,14	5,03	4,80	4,80	4,79	5,02
Wapń, mg/dl	11,07	11,06	9,88	10,13	11,13	10,81
Fosfor, mg/dl	9,55 ^{ab}	10,24 ^b	9,89 ^{ab}	9,87 ^{ab}	8,59 ^{ab}	8,99 ^a

W 56. dniu życia poziom cholesterolu w surowicy krwi był niższy w porównaniu do 28. dnia (Tab. 2). Najniższy stwierdzono u prosiąt kontrolnych, a najwyższy u otrzymujących kwas kapronowy i kaprylowy ($P<0,05$). Cholesterol LDL był istotnie wyższy ($P<0,05$) u prosiąt otrzymujących kwas walerianowy i kaprylowy. Wysoki poziom aminotransferazy alaninowej, świadczącej o nieprawidłowym funkcjonowaniu wątroby stwierdzono u prosiąt żywionych z udziałem kwasów kapronowego i kaprylowego. Dodatek kwasu enantowego wpłynął na zwiększenie ilości albuminy i białka całkowitego w surowicy.

Tab. 2. Wskaźniki biochemiczne surowicy krwi w 56. dniu życia prosiąt

	Kontrola	Maślan sodu	Kwas walerianowy	Kwas kapronowy	Kwas enantowy	Kwas kaprylowy
Cholesterol						
Całkowity mg/dl	75,0 ^a	79,2 ^{ab}	93,8 ^{bc}	95,7 ^c	77,8 ^a	94,4 ^{bc}
HDL, mg/dl	35,3	36,9	39,9	41,2	34,7	41,1
LDL-d, mg/dl	36,3 ^a	39,4 ^{ab}	48,1 ^b	44,9 ^{ab}	37,4 ^a	45,3 ^{ab}
LDL, mg/dl	31,0 ^a	35,0 ^{ab}	43,8 ^b	41,2 ^{ab}	31,2 ^a	42,4 ^b
Triacylglicerole, mg/dl	43,0	37,8	51,2	67,0	60,0	54,6
ALT, U/l	43,7 ^{ABab}	48,0 ^{ABbc}	43,7 ^{ABab}	57,7 ^{Bc}	35,3 ^{Aa}	56,2 ^{Bc}
AST, U/l	103,4	84,3	100,3	96,9	82,5	72,3
ALP, U/l	208,5	178,2	215,8	222,2	208,8	229,8
Mocznik, mg/dl	29,7 ^c	21,8 ^{ab}	19,5 ^a	27,0 ^b	20,7 ^{ab}	23,7 ^{ab}
Albuminy, g/dl	2,97 ^A	3,02 ^A	3,09 ^A	3,03 ^A	3,59 ^B	3,17 ^A
Białko całkowite, g/dl	4,98 ^{Bbc}	4,34 ^{Aa}	4,67 ^{ABab}	4,65 ^{ABab}	5,12 ^{Bc}	4,73 ^{ABabc}
Wapń, g/dl	10,15 ^a	10,15 ^a	10,31 ^a	10,43 ^{ab}	10,95 ^b	10,71 ^{ab}
Fosfor, mg/dl	8,75	9,62	9,00	9,48	9,53	10,12
Magnez, mg/dl	2,76 ^c	2,13 ^a	2,27 ^{ab}	2,49 ^{abc}	2,42 ^{abc}	2,71 ^{bc}
Kreatynina, mg/dl	0,507	0,475	0,563	0,480	0,590	0,585

ALT – aminotransferaza alaninowa, AST – aminotransferaza asparaginowa, ALP – fosfataza alkaliczna

W bieżącym roku przekazano do laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt UP w Poznaniu próbki treści jelita czczego oraz ślepego w celu przeprowadzenia analizy mikroflory jelitowej cytochemiczną metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) pojedynczych komórek bakteryjnych. Na podstawie wykrytej w materiale genetycznym określonej sekwencji DNA identyfikowane będą komórki konkretnych grup mikroorganizmów istotnych dla statusu zdrowotnego jelit. W obecnej chwili analizy nie zostały jeszcze zakończone. W laboratorium Anchem w Katowicach przeprowadzono oznaczenie poziomu immunologicznych wskaźników krwi prosiąt (IgA, IgG, IgM, CRP). W Zakładzie Fizjologii Żywienia Zwierząt w Aleksandrowicach wykonywane są obecnie analizy histologiczne dwunastnicy i jelita czczego.

Cel 2

Celem kolejnych badań było określenie wpływu podawania enzymów pochodzenia mikrobiologicznego o profilu trzustkowym dodanych do paszy ciężarnych loch na wielkość płodów, w celu zminimalizowania IUGR wywołanego niedożywieniem płodów.

Doświadczenie wzrostowe było kontynuacją pierwszego etapu badań, gdy lochom w okresie ciąży podawano enzymy trzustkowe pochodzenia mikrobiologicznego. Urodzone prosięta odchowывano przy lochach do 28 dnia życia. Grupa K – grupa kontrolna lochy nie otrzymywały enzymów trzustkowych w okresie ciąży, Grupa E1 – grupa doświadczalna, lochy otrzymywały enzymy trzustkowe w okresie od 80 dnia ciąży do oproszenia; Grupa E2 – grupa doświadczalna, lochy otrzymywały enzymy trzustkowe w okresie od 30 dnia ciąży do oproszenia.

Tab. 3. Wskaźniki odchowu prosiąt

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe			
	Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna*	Doświadczalna 1 E1	Doświadczalna 2 E2
Liczebność prosiąt urodzonych	11,07	10,8	11,6	11,8
Liczebność prosiąt odsadzonych	9,75	9,62	10,85	10,75
Masa ciała prosiąt w dniach, kg				
w dniu urodzenia	1,48a	1,52a	1,71b	1,75b
w 28. dniu życia	6,84a	6,92a	7,92b	8,27b
w 42. dniu życia	9,20a	9,44a	11,04b	11,36b
w 70. dniu życia	19,03a	20,42a	22,87b	24,25b
Średnie przyrosty dzienne prosiąt, g				
1.-28. dzień życia	191	193 (+0,5%)	222 (+11,6%)	233 (+21,9%)
28.-42.	169a	180(+5,9%) a	223(31,9%) b	221(+31%) b
42.-70.	351a	392 (+11,6%)	423 (+20,5%) b	460 (+31%) b
1.-70.	251a	270 (7,5%) a	302 (+20,3%) b	321 (+27,8%) b
Średnie pobranie paszy, g				
1.-28. dzień życia	28	29	34	33
28.-42.	265	285	312	305
42.-70.	582	630	684	690
1.-70.	348	370 (+6,3%)	415 (+19,2%)	405 (+16,3%)

W okresie laktacji lochy z grup E1 i E2 pobierały więcej paszy w porównaniu do grup kontrolnych KN i KP, odpowiednio: 6,6 i 6,8 kg vs. 6,2 i 6,3 kg. Ubytek masy ciała loch w okresie od oproszenia do chwili odsadzenia wyniósł odpowiednio: gr. KN gr. 26,8 kg; gr. KP 27,0 gr. E1 30,8 kg; gr. E 31,5 kg.

Mioty pochodzące od loch wszystkich grup: kontrolnej (KN) i (KP) oraz doświadczalnych E1 i E2 charakteryzowały się podobną liczbą prosiąt żywo urodzonych (Tab. 3). Średnia masa prosięcia już w dniu urodzenia różniła się istotnie pomiędzy grupami kontrolnymi a doświadczalnymi ($P \leq 0,002$) i utrzymała się do końca doświadczenia, tj. do 70. dnia życia ($P \leq 0,007$).

W całym okresie odchowu prosiąt przy matce, tj. między 1. a 28. dniem życia, stwierdzono korzystny wpływ zastosowanych dodatków na przyrosty masy ciała prosiąt ($P \leq 0,038$). Po odsadzeniu w okresie pomiędzy 28. a 42. dniem życia, przyrosty masy ciała prosiąt istotnie się różniły pomiędzy grupami kontrolnymi KN i KP, a grupami doświadczalnymi E1 i E2 ($P \leq 0,034$). Za cały okres odchowu pomiędzy 1. a 70. dniem życia stwierdzono istotnie wyższe przyrosty masy ciała prosiąt w grupach doświadczalnych E1 i E2 ($P \leq 0,009$).

Analiza histologiczna wybranych odcinków przewodu pokarmowego nie wykazała żadnych zmian patologicznych oraz stanów zapalnych w analizowanych tkankach.

Dodatek do diety loch enzymów trzustkowych nie wpłynął na długość kosmków jelitowych dwunastnicy, spowodował natomiast wzrost głębokości krypt jelitowych oraz grubości błony śluzowej u zwierząt z grup doświadczalnych E1 i E2 w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej K. Grubość błony mięśniowej dwunastnicy wszystkich badanych grup różniła się istotnie statystycznie. Podobnie jak w przypadku dwunastnicy, również w początkowym odcinku jelita czczego zastosowane dodatki podawane lochom nie wpłynęły na długość kosmków jelitowych. Nie odnotowano także wpływu diety na głębokość krypt. Wykazano natomiast statystycznie istotne różnice w grubości błony śluzowej i mięśniowej we wszystkich grupach doświadczalnych ($p < 0,01$).

W białku nabłonka jelita czczego w części początkowej (prox), środkowej (mid) i końcowej (dist) oznaczono aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego: sacharazy, laktazy, maltazy, aminopeptydazy A i N oraz dipeptyloylpeptydazy IV. Stwierdzono istotnie wyższą aktywność laktazy w początkowej części jelita czczego u prosiąt grup doświadczalnych E1 i E2 w porównaniu do grupy kontrolnej K, wynoszącą odpowiednio: 32,9 i 32,00 vs. 21,80 ($p < 0,01$). W przypadku pozostałych enzymów nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami, skutkiem dużej zmienności wyników.

Po osiągnięciu przez warchlaki 70. dnia życia, do tuczu zostało wytypowane losowo po 16 sztuk z każdej grupy żywieniowej z doświadczenia nr 1 (po 8 loszek i 8 wieprzków; $n=64$). Doświadczenie zakończy się w 2019 roku.

Cel 3

Celem kolejnych badań jest ocena przydatności rozdrobnionego włókna pochodzącego z krajowych roślin włóknistych w żywieniu prosiąt i określenie wpływu na rozwój przewodu pokarmowego oraz status zdrowotny tych zwierząt w okresie około odsadzeniowym.

W laboratorium Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich przeprowadzono analizę właściwości antyoksydacyjnych włókien roślinnych, obejmującą testy DPPH i FRAP oraz określenie zawartości kwasów fenolowych. Otrzymane wyniki zamieszczono w Tab. 4. Zawartość miktotoksyn i wyniki analizy mikrobiologicznej włókien roślinnych podano w Tab. 5 i 6.

Tab. 4. Właściwości przeciwutleniające włókien roślinnych

	Włókno celulozowe	Włókno lniane	Włókno konopne
Test DPPH (% inhibicji)			
Stężenie próbki			
8 mg/ml	0	1,52	1,17
16 mg/ml	0,12	2,91	2,11
24 mg/ml	0,13	4,69	2,09
32 mg/ml	0,15	5,81	3,33
40 mg/ml	0,12	7,34	4,75
Kwasy fenolowe (mg/ml)			
Galusowy	< 0,0003	< 0,0003	< 0,0003
Gentyzynowy	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007
Syryngowy	< 0,00007	< 0,00007	< 0,00007
Synapowy	< 0,0003	< 0,0001	0,092
Kumarowy	< 0,0022	< 0,00005	< 0,00005
Ferulowy	0,0019	1,443	0,926

Tab. 5. Poziom mikotoksyn włókien roślinnych (ppb)

	Włókno celulozowe	Włókno lniane	Włókno konopne
Aflatoksyna	-	-	-
Ochratoksyna	-	-	-
Deoksyniwalenol	< 3	-	14,8
Nivalenol	-	-	< 3
Toksyna T2	-	-	< 0,6
Toksyna HT2	-	-	< 2
Zearalenon	-	-	51,5

Tab. 6. Wyniki analizy mikologicznej włókien roślinnych (jtk/g)

	Włókno celulozowe	Włókno lniane	Włókno konopne
Ogólna liczba grzybów (pleśnie + drożdże)	< 10	$3,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
Ogólna liczba pleśni	< 10	$4,7 \times 10^4$	7×10^4
Ogólna liczba drożdży	< 10	$3,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$

jtk – liczba jednostek (strzępki, zarodniki grzybów) tworzących kolonie

Przeprowadzono serię ubojów prosiąt doświadczalnych, ubijając połowę zwierząt w 28., a połowę w 56. dniu życia. Po uboju prosiąt przeprowadzono pomiar kwasowości treści kolejnych odcinków przewodu pokarmowego oraz dyssekcję, ale otrzymane wyniki nie zostały jeszcze opracowane.

W ZD IZ PIB Grodziec Śląski sp. z o.o., w trzecim kwartale 2018 roku rozpoczęła się końcowa część doświadczenia na prosiątach. Planuje się przeprowadzenie doświadczenia wzrostowego, od 1. do 84. dnia życia, na 14 miotach (po 2 mioty na grupę).

	Kontrolna (K)	dodatek włókna z lnu (DL)	dodatek włókna z konopi (DK)	Vitacel R 200
Ilość dodatku, %	bez dodatku włókna	1,5% 2 %	1,5% 2%	2%

Na podstawie wstępnych wyników można stwierdzić, że włókno uzyskane z krajowych roślin włóknistych jest materiałem paszowym niestanowiącym zagrożenia dla prosiąt pod względem sanitarnym (mikologicznym) oraz wykazuje właściwości przeciwutleniające. W treści wszystkich odcinków jelita grubego prosiąt otrzymujących włókna roślinne, poziom fenolu był

zbliżony lub niższy niż u prosiąt kontrolnych i otrzymujących obecny na rynku preparat z celulozy drzewnej. Poziom dwóch pozostałych rakotwórczych metabolitów (krezolu i indolu) w treści środkowego i końcowego odcinka jelita grubego prosiąt otrzymujących włókno lniane, szczególnie stosowane w ilości 2%, był porównywalny z grupą kontrolną i otrzymującą celulozę drzewną. Poziom amoniaku w treści jelita grubego był w grupach doświadczalnych w większości przypadków niższy niż w kontrolnej, przy czym w końcowych odcinkach poziom amoniaku u prosiąt otrzymujących włókno lniane był niższy lub porównywalny z poziomem u prosiąt otrzymujących celulozę drzewną. Na podstawie wstępnych wyników, można przypuszczać, że włókno pochodzące z lnu i konopi, zastosowane jako dodatek do paszy dla prosiąt, może być dodatkiem kształtującym status zdrowotny prosiąt i ograniczającym wydalanie substancji niepożądanych.

Do laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt UP w Poznaniu przekazano w 2018 roku próbki treści jelita ślepego oraz początkowego odcinka okrężnicy prosiąt w celu przeprowadzenia analizy mikroflory jelitowej cytochemiczną metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji „*in situ*” (FISH) pojedynczych komórek bakteryjnych. Na podstawie wykrytej w materiale genetycznym określonej sekwencji DNA identyfikowane będą komórki konkretnych grup mikroorganizmów, istotnych dla statusu zdrowotnego jelit. W obecnej chwili analizy nie zostały jeszcze zakończone.

W laboratorium Anchem w Katowicach przeprowadzono oznaczenie poziomu immunologicznych wskaźników krwi prosiąt (IgA, IgG, IgM, CRP). Opracowanie i podsumowanie otrzymanych wyników zostanie przeprowadzone w 2019 roku.

W IFiŻ PAN w Jabłonie przeprowadzono analizy treści pokarmowej jelita ślepego oraz początkowej, środkowej i końcowej części okrężnicy prosiąt. Oznaczono zawartość suchej masy, elektrolitów (Ca, Fe, Cl, Mg, P, Na, K), lotnych kwasów tłuszczowych, amoniaku oraz aktywność wybranych enzymów (fosfatazy alkalicznej i β -glukozydazy).

Zadanie 01-16-02-11

Czynniki żywieniowe warunkujące wydajność i zdrowotność zwierząt przeżuujących

Kierownik zadania: prof. dr hab. Barbara Niwińska

Cel realizowanych badań stanowi analiza możliwości poprawy wydajności produkcyjnej bydła i owiec. W ramach zadania realizowano 2 cele badawcze.

Cel badawczy nr 1 pt.: Wpływ poziomu żywienia na rozwój gruczołu mlekowego cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych

Celem badań była analiza wpływu poziomu żywienia energetyczno-białkowego preparatem mlekozastępczym (PM) w okresie wychowu od 14. do 60. dnia życia na cechy anatomiczne gruczołu mlekowego (GM) u cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych.

Metody badawcze

Doświadczenie przeprowadzono na 18 cieliczkach rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Utworzono 3 równoliczne grupy: I – kontrolną, w której cieliczki poddano ubojowi w 14. dniu życia, w pozostałych grupach cieliczki ubijano w 60. dniu życia oraz stosowano żywienie PM: w grupie II – ograniczone (dzienne dawki PM pokrywały w 80% zapotrzebowanie energetyczno-białkowe szacowane wg norm „Zalecenia Żywieniowe dla Przeżuwaczy”, 2014) i w grupie III – do woli. Cieliczki miały stały dostęp do paszy treściwej i wody. Gromadzono pomiary przyżyciowe wskaźników efektywności wychowu (obejmujących kontrolę masy i wymiarów ciała oraz pobrania pasz) oraz cotygodniowe pomiary wskaźników

hematologicznych i biochemicznych krwi. Gromadzono pomiary poubojowe wskaźników anatomicznych GM, obejmujące wymiary i masę całego narządu oraz wyodrębnionych w jego strukturze: tkanki mięszowej (zawierającej wydzielnicze komórki nabłonkowe) i tkanki zrębowej (zawierającej komórki tłuszczowe i fibroblastyczne oraz bezkomórkowe białka tkanki łącznej). Próbki tkanek przeznaczone do analiz histologicznych umieszczono w zbuforowanym roztworze formaliny, a przeznaczone do analiz ekspresji genów w ciekłym azocie a następnie w zamrażarce w temperaturze -80°C. Wykonano pomiary anatomiczne wybranych organów wewnętrznych oraz tuszy poubojowej.

Wyniki

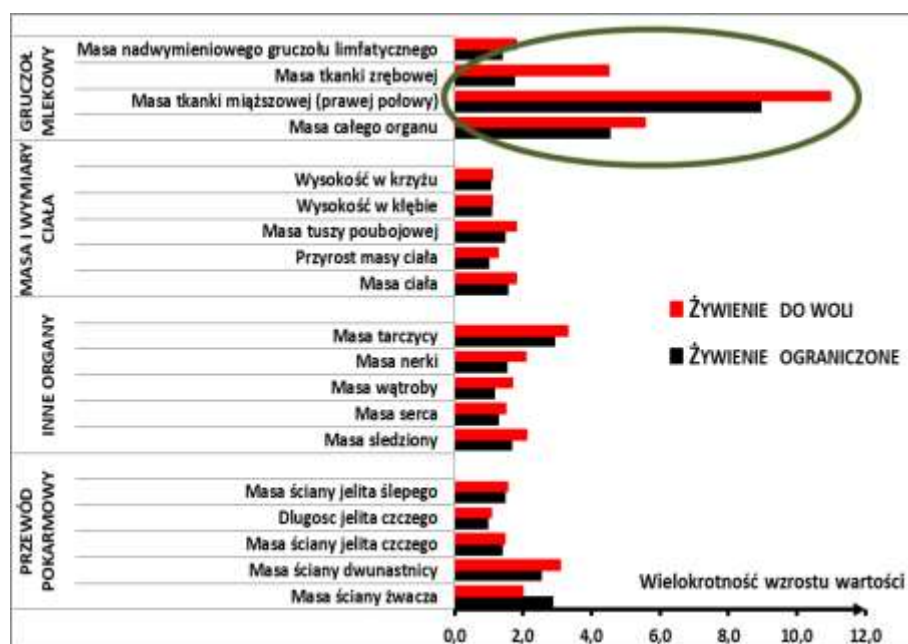
Uzyskane wyniki wskazują, że żywienie cieliczek PM „do woli” w okresie od 14. do 60. dnia życia wpłynęło na wzrost masy GM, jego tkanki mięszowej i tkanki zrębowej, w porównaniu do tych wskaźników charakteryzujących cieliczki otrzymujące dawki ograniczone (Tab. 1).



Tab. 1. Masa i przyrost masy gruczołu mlekowego, tkanki mięszowej i tkanki zrębowej u cieliczek karmionych preparatem mlekozastępczym do woli lub dawkami ograniczonymi

Wyszczególnienie		Masa (g)			Przyrost masy (g)	
		14. d. ż.	60. d. ż.		od 14. do 60. d. ż.	
Żywienie:			do woli	ograniczone	do woli	ograniczone
Gruczoł mlekowy	Masa całego organu	69,5	326,9	132,3	257,4	62,8
	Masa tkanki mięszowej	0,84	20,8	8,7	20,0	7,9
	Masa tkanki zrębowej	66,7	300,4	117,2	233,7	50,5

Uzyskane wyniki pozwalają również stwierdzić, że u cieliczek w okresie od 14. do 60. dnia życia następuje wyższe zwielokrotnienie masy GM, jego tkanki mięszowej i tkanki zrębowej w porównaniu do wzrostu masy i wymiarów ciała oraz masy wybranych organów wewnętrznych (Wykr. 1). Masa gruczołu mlekowego wzrosła 5,1-krotnie, jego tkanki mięszowej 3,1-krotnie i 9,9-krotnie tkanki zrębowej (przedstawione średnie charakteryzują obie grupy żywieniowe), a w tym okresie wielokrotność wzrostu masy ciała, wymiarów ciała oraz masy wybranych organów wewnętrznych wynosiła 1,7; 1,1 i 1,9; (odpowiednio).



Wykr. 1. Wielokrotność wzrostu wartości wybranych pomiarów anatomicznych w okresie od 14. do 60. d. ż. cieliczek uwzględniający poziom żywienia preparatem mlekozastępczym (do woli vs. ograniczony)

Przedstawione wyniki wskazują, że szybkość wzrostu GM w pierwszych 2 miesiącach życia u cieliczek ras wysokomlecznych wyprzedza wzrost całego ciała i innych organów wewnętrznych.

Cel badawczy nr 2 pt.: Wpływ formy maślanu na fermentację żwaczową, strawność i rozwój przewodu pokarmowego przeżuwaczy

Celem badań była analiza wpływu rodzaju soli kwasu masłowego na przebieg fermentacji mikrobiologicznej w żwaczu u dorosłych przeżuwaczy oraz wykorzystanie paszy i rozwój przewodu pokarmowego rosnących owiec.

Przeprowadzono 2 doświadczenia: fizjologiczne na przetokowanych krowach i wzrostowe na jagniętach-tryczkach.

Realizacja doświadczenia fizjologicznego na przetokowanych krowach.

Metody badawcze

Doświadczenie przeprowadzano w układzie powtórnego kwadratu łacińskiego na 3 krowach (rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej) z założonymi przetokami do żwacza. Krowy otrzymywały dawki pasz: kontrolną – bez dodatku soli kwasu masłowego – z dodatkiem soli sodowej kwasu masłowego (maślanu sodu) oraz – z dodatkiem trójglicerydu kwasu masłowego (tributyrynu). W 16. dniu badań pobierano próby płynu żwaczowego, w których oznaczono odczyn kwasowy, stężenia azotu amonowego i lotnych kwasów tłuszczowych. Od 19. do 21. dnia przeprowadzono metodą *in situ* inkubację próbek siana.

Stwierdzono, że w stosunku do kwasowości obserwowanej w żwaczu krów grupy kontrolnej, podanie maślanu sodu zwiększyło wartości pH o 0,12%, 1,32%, 1,42% i 1,17% po upływie 0, 2, 4 i 8 h od zadania paszy (odpowiednio), natomiast podanie tributyrinu zwiększyło o 0,33% wartość pH w godzinie 0, a w następnych godzinach obniżyło o 1,42%, 2,62% i 1,17% (Tab. 2). Zaobserwowano wzrost koncentracji azotu amonowego po upływie 0, 2, i 4 h od zadania paszy w wyniku podania maślanu sodu o 1,86%, 3,03%, 1,28% a tributyrinu o 9,32%,

12,72%, 2,56%; po upływie 8 godzin obserwowano obniżenie koncentracji o 12,3% w wyniku podania maślanu sodu i 17,6% tributyrinu.

Tab. 2. Wpływ dodatków soli kwasu masłowego na przebieg fermentacji w żwaczu

Wskaźniki przebiegu fermentacji w żwaczu	Godziny od zadania paszy (h)	Przebieg fermentacji w żwaczu krów żywionych		
		nieotrzymujących dodatku	otrzymujących dodatek	
			maślanu sodu	Tributyrynu
Odczyn kwasowy - pH	0	6.90	6.91	6.92
	2	6.47	6.55	6.38
	4	6.33	6.42	6.17
	8	6.40	6.48	6.33
Azot amonowy (mg N/ml)	0	0.115	0.117	0.126
	2	0.162	0.167	0.183
	4	0.111	0.113	0.114
	8	0.054	0.047	0.044

Realizacja doświadczenia wzrostowego na jagniętach.

Metody badawcze

27 jagnięt – tryczków rasy wrzosówka, od 10. miesiąca życia otrzymywały dawkę paszy pokrywającą potrzeby rosnących tryczków. Po 14 dniach adaptacji zwierzęta losowo przydzielano do trzech grup żywieniowych. W grupie 1. – kontrolnej tryczki nie otrzymywały dodatku soli kwasu masłowego, w pozostałych grupach otrzymywały dodatek w ilości 15 g soli kwasu masłowego w 1 kg pobranej suchej masy, w grupie 2. – dodatek maślanu sodu i w grupie 3. – dodatek tributyrinu. W celu oceny wpływu dodatków na efektywność tuczu kolekcjonowane są przyżyciowe pomiary masy ciała i pobrania pasz, w celu oceny wpływu na wskaźniki biochemiczne krwi kolekcjonowane są próbki krwi przeznaczone do analiz. Ze względu na zbyt niską masę ciała tryczków, doświadczenia wzrostowe rozpoczęto w listopadzie 2018 roku i doświadczenie będzie kontynuowane w kolejnym roku. Po ukończeniu okresu tuczu zwierzęta będą ubijane i zostanie przeprowadzona kolekcja pomiarów anatomicznych i kolekcja prób materiału biologicznego z przewodu pokarmowego do dalszych analiz chemicznych. Zostanie wykonana ocena wydajności rzeźnej.



Fot. 2. Opasane jagnię rasy wrzosówka (fot. własna)



Fot. 3. Tryczki w klatkach doświadczalnych (fot. własna)

Podsumowanie dotychczas uzyskanych wyników badań

Wykazano, że poziom żywienia energetyczno-białkowego w okresie wychowu od 14. do 60. dnia życia wpływa na tempo wzrostu gruczołu mlekowego u cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych. Żywienie do woli w tym okresie wychowu zwiększa masę gruczołu mlekowego i masę jego tkanki miększej i tkanki zrębowej w porównaniu do tych wskaźników stwierdzonych u cieliczek żywionych dawkami ograniczonymi. Stwierdzono także, że w okresie wychowu od 14. do 60. dnia życia tempo wzrostu gruczołu mlekowego, jego tkanki miększej i tkanki zrębowej jest wyższe w porównaniu do tempa wzrostu całego organizmu i wybranych organów wewnętrznych.

Stwierdzono, że przebieg fermentacji mikrobiologicznej w żwaczu u dorosłych przeżuwaczy jest modyfikowany przez dodatek soli kwasu masłowego, a efekt ten zależy od rodzaju soli. Dodatek maślanu sodu zwiększył, natomiast dodatek tributirinu obniżył odczyn kwasowy treści żwacza. Zarówno dodatek maślanu sodu jak i tributirinu wpłynął na wzrost stężenia azotu amonowego. Wyniki dotychczasowej realizacji doświadczenia wzrostowego na jagniętach nie stanowią podstawy wnioskowania.

Zadanie 01-16-03-11

Czynniki żywieniowe wpływające na wykorzystanie składników pokarmowych oraz metaboliczny i zdrowotny status intensywnie użytkowanego drobiu

Kierownik zadania: prof. dr hab. Sylwester Świątkiewicz

Zadanie dotyczy istotnych zagadnień nowoczesnej produkcji drobiarskiej – jakości skorup jaj i kośćca u wysokoprodukcyjnych kur nieśnych oraz strawności jelitowej aminokwasów nasion grochu siewnego u kurcząt. A zatem, w ramach zadania realizowane są dwa cele badawcze:

1. Ocena wpływu profilu kwasów tłuszczowych lipidów mieszanki paszowej na jakość kośćca i skorup jaj u wysokoprodukcyjnych kur nieśnych.
2. Standaryzowana strawność jelitowa aminokwasów nasion grochu siewnego u kurcząt brojlerów – wpływ wieku i dodatku paszowej proteazy.

Cel szczegółowy 1.

W okresie sprawozdawczym wykonano doświadczenie 1. na intensywnie użytkowanych kurach nieśnych (168 niosek Lohman Brown, w okresie od 25. do 60. tygodnia życia). Nioski żywiono doświadczalnymi mieszankami paszowymi zawierającymi różne źródła kwasów tłuszczowych (olej sojowy, kokosowy, rzepakowy, lniany, z lnianki siewnej, rybny, z alg). W czasie doświadczenia rejestrowano liczbę i masę zniesionych jaj oraz ilość pobranej paszy. Na tej podstawie obliczono nieśność, codzienne pobranie paszy oraz zużycie paszy w przeliczeniu na 1 kg jaj i na 1 jajo. Przeprowadzono także analizy jakości jaj, z uwzględnieniem takich cech jak: barwa i masa żółtka, jednostki Haugha, masa oraz grubość, gęstość i wytrzymałość skorupy. Wykonano również analizy profilu kwasów tłuszczowych lipidów mieszanek paszowych oraz żółtka jaj, jak również sensoryczną analizę gotowanych jaj. Po uboju niosek doświadczalnych pobrano kości piszczelowe – w celu przeprowadzenia analiz fizykochemicznych. Na podstawie wstępnie opracowanych wyników można stwierdzić, że rodzaj tłuszczu nie miał wpływu na takie parametry jakościowe jaj, jak: ich średnia masa, wysokość białka, barwa żółtka oraz grubość, gęstość i wytrzymałość skorupy, jak również wybrane wskaźniki produkcyjne niosek. Stwierdzono natomiast różnice między grupami doświadczalnymi w zakresie profilu kwasów tłuszczowych lipidów żółtka, odnotowując najkorzystniejszy wpływ w tym zakresie oleju z alg, stosowanego do natłuszczania mieszanek paszowych.

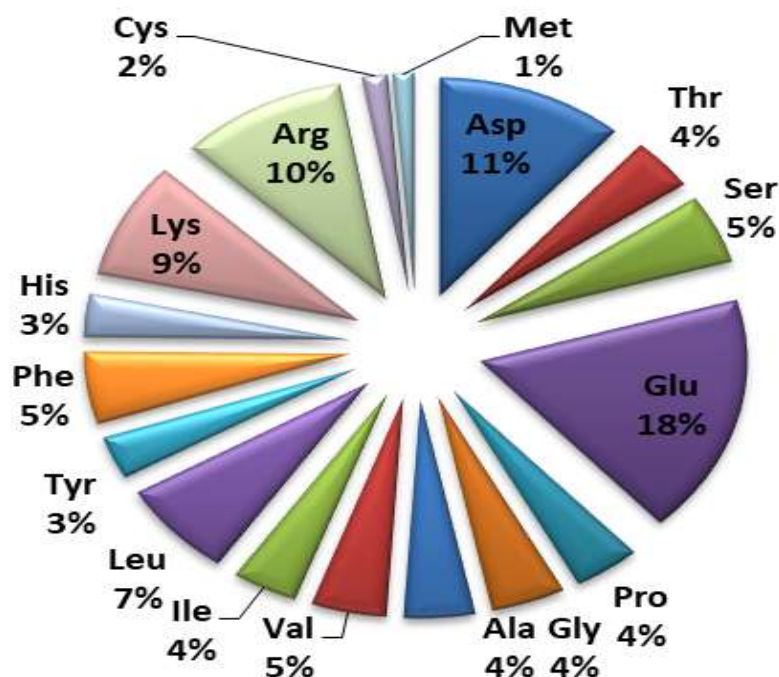


**Fot. 1. Nioski Lohman Brown w trakcie doświadczenia
(kurnik doświadczalny ZFŻ IZ PIB w Aleksandrowicach k. Balic)**

Cel szczegółowy 2.

W ramach realizacji celu szczegółowego przeprowadzono kolejny etap badań, poświęcony ocenie wpływu wieku kurcząt oraz dodatku mikrobiologicznej proteazy serynowej na jelitową strawność aminokwasów nasion grochu odmiany kolorowo kwitnącej. Do badań tego etapu wybrano groch odmiany Milwa ze zbioru 2017 – odmiana uprawiana na cele paszowe, wpisana do KRO w 2005 r. Analizy wykazały następujący podstawowy skład chemiczny partii nasion tej odmiany grochu użytej w badaniach (g/kg suchej masy): białko ogólne 250,8, tłuszcz 10,8, włókno 65,4, popiół 27,4. Oprócz tego, określona metodą kolorymetryczną zawartość tanin wynosiła 3,1 g/kg, a aktywność inhibitorów trypsyny (TIU, metoda spektrofotometryczna) wynosiła 1,6 mg/g. Udział aminokwasów w przeliczeniu na 100 g białka ogólnego ($N \times 6,25$) przedstawiono graficznie (Rys.1).

Wykonany eksperyment obejmował dwa następujące po sobie testy strawnościowe na kurczętach w wieku 14 i 28 dni, z zastosowaniem krótkookresowego żywienia ptaków dietą w której nasiona grochu stanowiły jedyne źródło białka. Dietę tę podawano w dwóch wersjach: bez dodatku lub z dodatkiem preparatu proteazy serynowej. Dla oznaczenia wielkości podstawowego przepływu jelitowego aminokwasów endogennych (tj. niepochozących z paszy, EAA) u osobników w danym wieku, w przeprowadzonym doświadczeniu utworzono dwie dodatkowe grupy ptaków żywionych dietą bezbiałkową. Wartości liczbowe EAA będą wykorzystane do standaryzacji (korekty) współczynników pozornej strawności jelitowej aminokwasów (AID) określonych pierwotnie w obu doświadczeniach (2017 i 2018) wykonanych w ramach niniejszego celu badawczego. W bieżącym okresie sprawozdawczym wykonano także kalkulacje współczynników AID aminokwasów grochu odmiany Tarchalska, użytej w poprzednim etapie badań (2017). W zależności od wieku kurcząt i obecności proteazy w diecie testowej obliczenia te wykazały wartości podane w Tabeli 1.



Rys. 1. Profil aminokwasowy białka nasion grochu odmiany

Tab. 1. Współczynniki pozornej strawności jelitowej aminokwasów grochu odm. Tarchalska

Aminokwas	Grupy doświadczalne: wiek ptaków (14 lub 28 dni), dodatek proteazy (brak lub E)			
	14	14 E	28	28 E
Lizyna	0,848	0,874	0,853	0,883
Metionina	0,720	0,751	0,735	0,790
Cystyna	0,649	0,672	0,642	0,669
Treonina	0,730	0,745	0,762	0,786
Arginina	0,850	0,903	0,860	0,880
Walina	0,784	0,798	0,794	0,806
Izoleucyna	0,760	0,781	0,781	0,774
Leucyna	0,801	0,828	0,804	0,810
Fenylalanina	0,825	0,825	0,814	0,839
Histydyna	0,832	0,837	0,831	0,832

Zadanie 01-16-04-11

**Walidacja i doskonalenie metody GC-MS oznaczania związków lotnych
jako istotnych substancji wpływających na jakość mięsa i tłuszczu gęsiego**

Kierownik zadania: dr hab. Robert Gąsior

Celem naukowym jest walidacja i doskonalenie metod służących opracowaniu charakterystyki składu chemicznego mięsa i tłuszczu Gęsi Białej Kołudzkiej®, żywionej w końcowym etapie owsem i innymi zbożami

Przeprowadzono doświadczenie na 4 grupach: gęś owsiana, pszeniczna, kukurydziana, gęś jęczmienna (łącznie 64 sztuki w układzie: 4 x 16 (8 gęsi i 8 gęsiorków = 64)).

Układ doświadczenia przedstawiono poniżej:

Doświadczenie 2018							
Żywienie: owies		Żywienie: pszenica		Żywienie: kukurydza		Żywienie: jęczmień	
Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8	Sztuk: 8
gęsiorek	gęś	gęsiorek	gęś	gęsiorek	gęś	gęsiorek	gęś

Do ukończenia 13. tygodnia życia gęsi były odchowywane i żywione jednakowo, zgodnie z systemem technologii tuczu IZ PIB ZD Kołuda Wielka. W okresie od 14. do 16. tygodnia życia ptaki żywione były do woli wyłącznie ziarnem owsa, pszenicy, kukurydzy oraz jęczmienia. Pobrano próbki pasz oraz nóg, piersi, tłuszczu sadełkowego oraz wątroby, serca i mózgi. Próbki zostały zamknięte próżniowo w woreczkach PA/PE (folia barierowa poliamid/polietylen) i przetransportowane do laboratorium w temperaturze około -78°C w „suchym lodzie” (CO₂) i przechowywano je w temp. -80°C. Oprócz analiz chemicznych określonych pasz i próbek pobranych od zwierząt (podstawówka, witaminy A i E, cholesterol, kwasy tłuszczowe, składników mineralnych, aminokwasów) wykonano w próbkach mięsa analizy związków lotnych metodą HS-SPME-GC/MS (chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrem mas z wykorzystaniem techniki ekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej), analizy olfaktometryczne wybranych próbek metodą GC-O i GC/MS (chromatografia gazowa z olfaktometrem oraz spektrometrem mas). Zhomogenizowane w ciekłym azocie próbki do analiz HS-SPME-GC/MS pieczono (170°C przez 35 min) w zamkniętych fiolkach 20 ml. Analizy wykonano na 2 kolumnach: ZB-5MSi i ZB-Wax (Phenomenex®, 30 m×0,25 mm I.D.×0,25 µm film). Fiolkę z próbką termostatowano w temperaturze 50°C przez 30 min. Czas ekspozycji włókna w fazie ponad próbką (próbka cały czas mieszana) wynosił 15 min. Próbkę podawano za pomocą automatycznego podajnika próbek COMBI PAL System (AOC-5000), a przed każdą analizą włókno było wygrzewane w temperaturze 270°C przez 1 h. Rozdział chromatograficzny prowadzono na chromatografie gazowej Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, wyposażonym w kwadrupolowy detektor MS (EI, 70 eV, 250°C) skanujący w trybie TIC w zakresie 35-450 m/z, w następujących warunkach: gaz nośny: hel (He), 1 ml/min, program temperaturowy pieca: izoterma 37°C przez 10 min, następnie wzrost temperatury do 132°C (4°C/min) i ponowny jej wzrost do 240°C (8°C/min) a następnie utrzymanie jej do końcowego czasu analizy (60 min). Próbki przed analizą chromatograficzną ustawiano naprzemiennie na chłodzonym (+1 do +3°C) podajniku próbek. Próbki do analiz olfaktometrycznych przygotowywano techniką SAFE (Solvent Assisted Flavor Evaporation). Ekstrakty (10 µl) analizowano na 2 kolumnach. Zapachy notowano na olfaktometrze OP275, a związki wykrywano za pomocą detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID i spektrometru masowego. Do pomiarów stężenia zapachowego stosowano technikę AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis).

Dotychczasowe wyniki

Efektem analiz chromatograficznych są chromatogramy. Przykładowe chromatogramy analizy olfaktometrycznej związków zapachowych w nodze gęsi, związków lotnych metodą HS-SPME-GC/MS w nodze i mózgu gęsim przedstawiono na rysunkach, kolejno: Fig.1, Fig. 2 i Fig. 3.

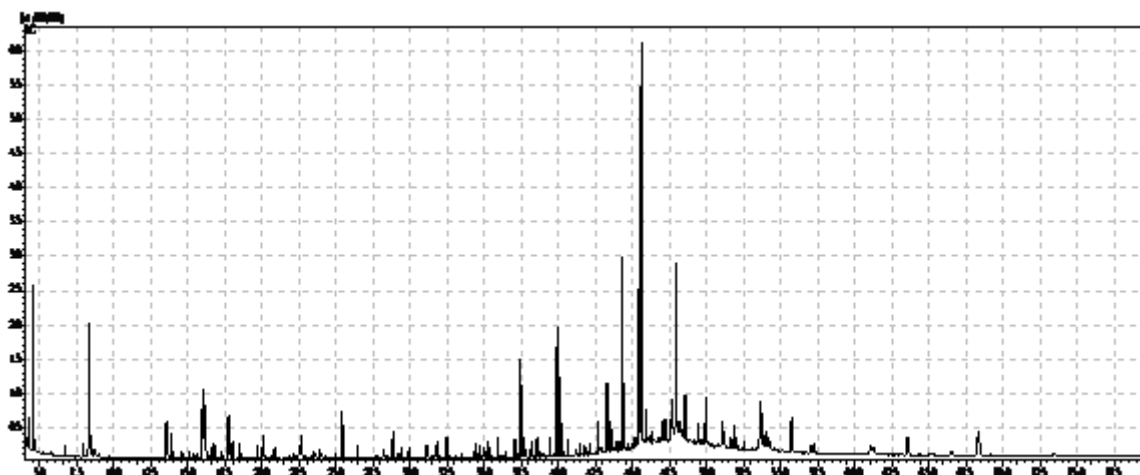


Fig. 1. Chromatogram analizy olfaktometrycznej z detekcją FID dotyczący związków lotnych w mięsie nogi gęsi po przygotowaniu próbki techniką SAFE

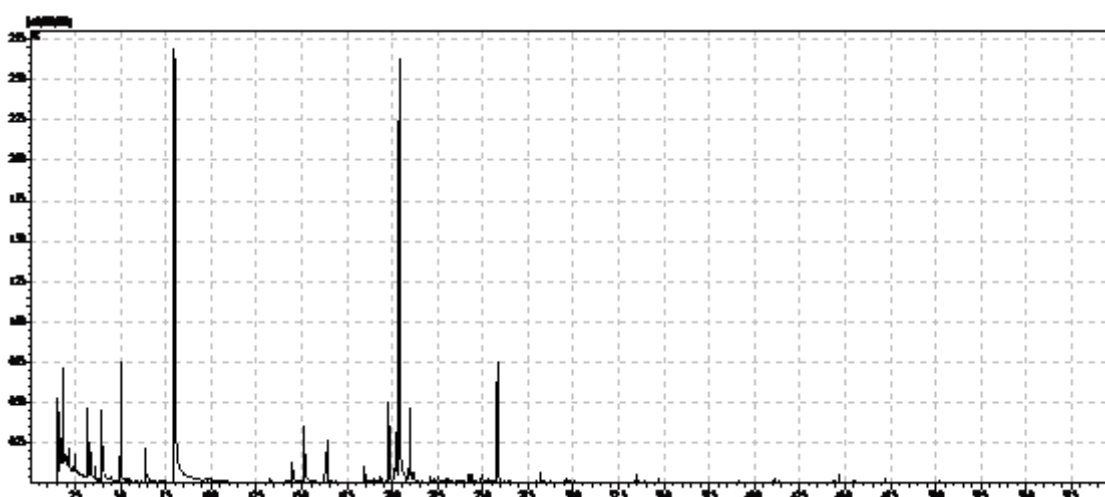


Fig. 2. Chromatogram analizy HS-SPME-GC/MS z detekcją za pomocą spektrometru mas dotyczący związków lotnych w mięsie nogi gęsi

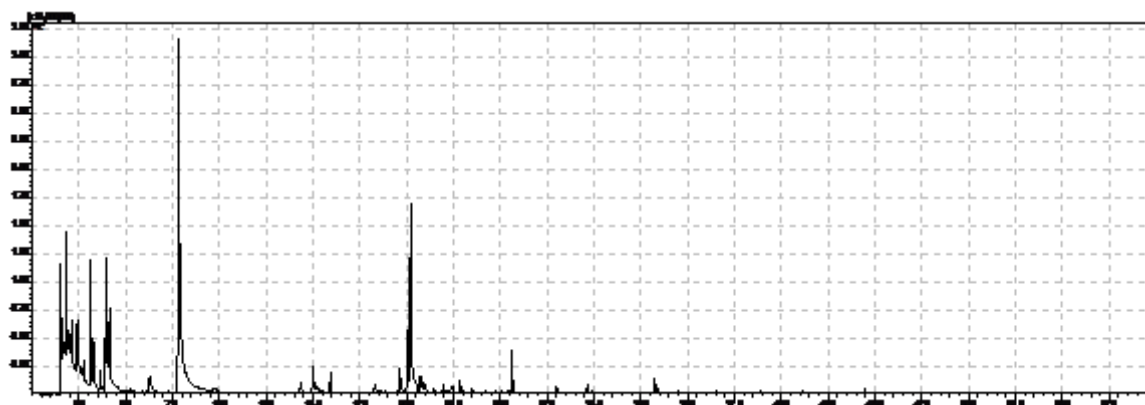


Fig. 3. Chromatogram analizy HS-SPME-GC/MS z detekcją za pomocą spektrometru mas dotyczący związków lotnych w mózgu gęsi

Zadanie 04-16-01-11

**Kształtowanie reakcji immunologicznej u cieląt za pomocą
innowacyjnych preparatów zawierających nanocząstki krzemu
oraz zmodyfikowane kultury *Lentinula edodes***

Kierownik zadania: dr Dorota Bederska-Łojewska

Celem głównym zadania była ocena dwóch złożonych preparatów NANOCALF-Si oraz Selentin na status zdrowotny cieląt m.in. odpowiedź immunologiczną oraz parametry produkcyjne.

Otrzymano innowacyjne preparaty niezbędne do doświadczeń przeprowadzonych w Instytucie Zootechniki PIB oraz w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym PIB w Puławach. Do sporządzenia preparatu NANOCALF-Si wykorzystano kwasy organiczne fumarowy, cytrynowy, jabłkowy i kwas sorbowy, które następnie poddano ochronie w matrycy trójglicerydowej. Została ona tak skonstruowana, aby uwalnianie kwasów organicznych odbywało się na całym odcinku przewodu pokarmowego. Dodatkowo preparat wzbogacono nanocząstkami krzemu. Drugi preparat otrzymano na Uniwersytecie Jagiellońskim w wyniku hodowli specjalnie zmodyfikowanych kultur *in vitro* gatunku grzyba jadalnego i leczniczego *Lentinula edodes* (shi-take), wzbogaconego w związki organiczne selenu, które następnie poddano liofilizacji.

Zakończono także pierwszy etap badań przeprowadzonych w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego PIB w Puławach. Preparaty zostały tam przebadane w aspekcie wpływu na układ immunologiczny cieląt. Materiał doświadczalny stanowiło 12 cieląt, podzielonych na 3 grupy: kontrolną, otrzymującą Selentin (3,5 g, podawany 2 x dziennie) oraz Nanocalf-Si (podawany 1 x dziennie i zawierający 18 mg proteazy, 45 mg lipazy, 3000 mg SiO₂, 250 mg kwasu fumarowego, 250 mg kwasu jabłkowego 120 mg kwasu cytrynowego, 220 mg kwasu sorbowego, 15 mg maślanu sodu). W trakcie doświadczenia, prowadzonego przez 10 tygodni, kontrolowano: masę ciała zwierząt – w odstępach tygodniowych, ilość pobranej paszy, ogólny stan zdrowotny cieląt, a także ocenie poddano wybrane parametry krwi:

1. ogólną liczbę leukocytów oraz ich skład procentowy z podziałem na odpowiednie frakcje komórkowe (leukogram) we krwi pełnej,
2. określenie sumarycznej koncentracji gammaglobulin w surowicy krwi,
3. analizę fenotypową leukocytów krwi obwodowej badane za pomocą cytometrii przepływowej,
4. oznaczanie aktywności fagocytarnej neutrofili oraz ich wybuchu tlenowego za pomocą cytometrii przepływowej,
5. badanie aktywności cytokin prozapalnych (IL-1, TNF- α , INF- γ) oraz cytokin antyzapalnych (IL-2, IL-4, IL-10) w surowicy krwi.

Śmiertelność w grupie kontrolnej wynosiła 100%, w grupie otrzymującej NANOCALF-Si 75%, natomiast w grupie otrzymującej Selentin 25%. Zestawienie statystyczne omówionych powyżej wyników jest aktualnie opracowywane przez jednostkę przeprowadzającą doświadczenie. W grupie kontrolnej oraz otrzymującej preparat na bazie liofilizatu z mycelium *L. edodes* na początku doświadczenia, a następnie co tydzień pobierano krew w celu oceny stężenia selenu w surowicy krwi. Badanie zostało przeprowadzone w Idexx Laboratories sp. z o.o. Otrzymane wyniki zestawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Poziom selenu w surowicy krwi cieląt (ug/l)

	Grupa kontrolna				Grupa otrzymująca Selentin			
Pobranie	1	2	3	4	5	6	7	8
1	35	21	16	21	14	19	42	13
2	36	27	16	26	129	163	199	205
3	39	27	15	28	141	152	181	203
4	42	30	20	31	230	196	205	273
5	47	19	25	27	158	-	159	216
6	-	31	47	23	128	-	144	143
7	-	39	-	27	169	-	175	192
8	-	43	-	34	210	-	206	216
9	-	49	-	-	161	-	165	292
10	-	60	-	-	202	-	205	215
11	-	60	-	-	257	-	305	188

Wartość referencyjna > 50 ug/l

Średnie stężenie selenu w grupie kontrolnej wynosiło 33,64 ug/l, natomiast w grupie doświadczalnej otrzymującej Selentin było o 575,47% wyższe i wynosiło 193,59 ug/l.

Wnioski

- Obydwa preparaty ograniczyły śmiertelność cieląt, NANOCALF-Si o 25%, natomiast Selentin o 75%.
- Zastosowanie Selentinu zwiększyło poziom selenu we krwi o ponad 500% w porównaniu do grupy kontrolnej.

Zadanie 04-16-02-11

Opracowanie kalibracji do badań zafałszowań pasz na podstawie analizy białka właściwego metodą bliskiej podczerwieni

Kierownik zadania: mgr inż. Wojciech Wróblewski

Celem pracy jest uzyskanie metody szybkiego i taniego kontrolowania składników paszowych na zawartość azotu niebiałkowego. Wychwytywanie i eliminacja składników paszowych fałszowanych azotem niebiałkowym wpłynie na podwyższenie wartości odżywczej pasz oraz ograniczy choroby, które mogą wywoływać dodatki fałszujące.

Przygotowano szereg próbek referencyjnych zawierających różne zawartości azotu niebiałkowego (białka niebiałkowego, wg przelicznika z zawartości azotu = 6,25). Jako matryc użyto: makuch sojowy, śrutę sojową poekstrakcyjną, mączkę rybną, preparat mlekozastępczy oraz mleko w proszku. Jako dodatków azotu niebiałkowego użyto substancji: organicznych (melamina, mocznik) oraz mineralnej (siarczan (VI) amonu). Metodą miedziową (wg Bernstein'a) oraz metodą Kjeldahl'a wyznaczono poziomy naturalnego azotu niebiałkowego w matrycach oraz poziomy azotu niebiałkowego pochodzące od sztucznych dodatków w poszczególnych mieszaninach matryca-sztuczny dodatek. Na podstawie analiz referencyjnych oraz w bliskiej podczerwieni NIRS (InfraXact™ 7500, Foss) utworzono, stosując oprogramowanie WinISI ver. 4.10, szereg kalibracji. Uzyskano kalibracje typu: global oraz local stosując następujące przekształcenia matematyczne: MPLS, SNV&Detrend oraz obróbkę widm: 1.4.4.1, 2.8.6.1, 3.10.10.1, 4.10.10.1, 3.5.5.1 i 2.6.4.1.

Stosując walidację krzyżową wykonano ocenę statystyczną wyników, w tym oszacowano niepewności.

Kalibracje do oznaczania zawartości dodatków azotu niebiałkowego NPN oraz poszczególnych substancji fałszujących w poszczególnych składnikach paszowych oraz w mleku proszku.

Wybrano sumarycznie dwadzieścia sześć kalibracji typu global pozwalających na oznaczenie: zawartości poszczególnych dodatków (substancji fałszujących azotem niebiałkowym), zawartości NPN (jako całkowitego azotu niebiałkowego obejmującego azot niebiałkowy pochodzenia naturalnego oraz azot pochodzący od sztucznego dodatku) w składnikach paszowych oraz w mleku w proszku. Wyniki przedstawiono w Tab. 1-4.

Objaśnienia do Tabel 1-4

SECV (s_{SECV} standardowy błąd walidacji krzyżowej, SECV% (SECV wyrażone jako procent względny), min (minimalne stężenie oznaczanego parametru – jest to minimalne stężenie oznaczane metodami referencyjnymi nie mniejsze niż podwojona wartość SECV, max (maksymalne stężenie oznaczanego parametru w zbiorze kalibracyjnym), $\bar{x}$ (średnie stężenie oznaczanego parametru w zbiorze kalibracyjnym), SD (standardowe odchylenie stężenia oznaczanego parametru w zbiorze kalibracyjnym), N (liczebność próbek w kalibracji), R^2 (współczynnik determinacji kalibracji), SEC (standardowy błąd kalibracji), u_{ref} (niepewność standardowa na podstawie budżetu niepewności Centralnego Laboratorium Działu Analityki Laboratoryjnej).

Tab. 1. Parametry kalibracji dla melaminy w poszczególnych składnikach paszowych. M – zawartość melaminy, NPN* – zawartość azotu niebiałkowego pochodzącego jedynie od sztucznego dodatku melaminy, NPN – całkowita zawartość azotu niebiałkowego

	M – melamina								
	makuch sojowy		mączka rybna			śr. sojowa poeks.		p. mlekozas.	
	M g/100 g	NPN g/100 g	M g/100 g	NPN* g/100 g	NPN g/100 g	M g/100 g	NPN g/100 g	M g/100 g	NPN g/100 g
min	0,40	0,37	0,30	0,20	1,80	0,91	0,54	0,30	0,37
max	6,75	4,87	7,10	4,728	6,53	8,54	6,18	6,10	4,43
śre	3,17	2,40	3,25	2,167	3,87	3,73	2,88	2,86	2,18
SD	2,11	1,44	2,31	1,539	1,57	2,82	1,90	1,96	1,34
N	24	25	23	23	24	24	25	20	21
R2	0,994	0,994	1,000	1,000	1,000	0,989	0,994	1,000	1,000
SECV	0,167	0,119	0,041	0,027	0,027	0,457	0,271	0,045	0,042
SECV %	5,251	4,960	1,272	1,237	0,697	12,253	9,412	1,556	1,910
SEC	0,162	0,110	0,023	0,015	0,014	0,295	0,145	0,023	0,020
obróbka widm	2.8.6.1		1.4.4.1			3.10.10.1		4.10.10.1	
SECV/ u_{ref}	1,0	1,0	0,3	0,2	0,1	2,4	1,9	0,3	0,4

Tab. 2. Parametry kalibracji dla melaminy w mleku w proszku (NPN – całkowita zawartość azotu niebiałkowego)

Mleko w proszku	min	max	$\bar{x}$	SD	N	R^2	SECV	SECV %	SEC	SECV/ u_{ref}	Obróbka widm
NPN g/100 g	0,21	4,79	1,71	1,82	23	1,000	0,103	6,005	0,042	1,2	1.4.4.1
melamina g/100 g	0,24	6,85	2,24	2,73	24	1,000	0,122	5,455	0,059	1,1	

Tab. 3. Parametry kalibracji dla mocznika w poszczególnych składnikach paszowych, U – zawartość mocznika, NPN – całkowita zawartość azotu niebiałkowego

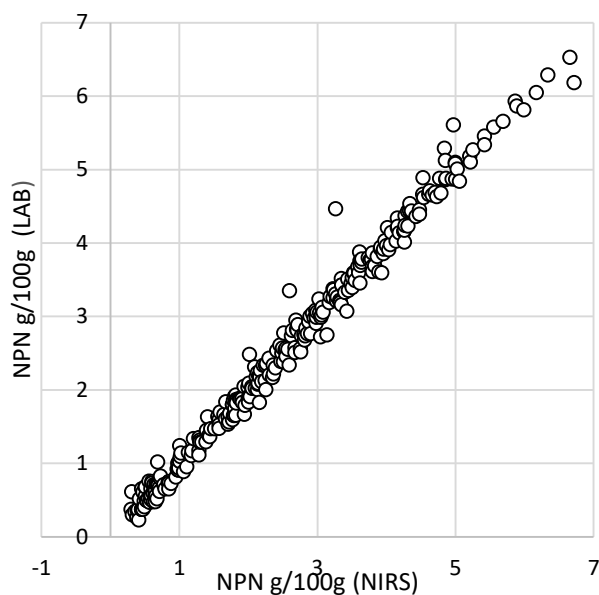
	U – mocznik							
	makuch sojowy		mączka rybna		śr. sojowa poeks.		p. mlekozas.	
	U g/100 g	NPN g/100 g	U g/100 g	NPN g/100 g	U g/100 g	NPN g/100 g	U g/100 g	NPN g/100 g
min	0,43	0,36	0,43	1,75	0,43	0,47	0,43	0,37
max	7,48	3,86	8,86	5,93	9,87	5,10	10,33	5,18
śre	3,73	2,03	3,80	3,50	4,27	2,41	4,63	2,44
SD	2,33	1,12	2,96	1,40	3,28	1,55	3,33	1,58
N	19	21	24	25	24	25	24	25
R2	1,000	0,998	0,999	0,999	0,998	0,998	1,000	1,000
SECV	0,135	0,079	0,106	0,050	0,193	0,095	0,067	0,032
SECV %	3,621	3,866	2,788	1,433	4,524	3,943	1,452	1,307
SEC	0,042	0,050	0,074	0,035	0,157	0,077	0,027	0,015
obróbka widm	3.5.5.1		4.10.10.1		3.10.10.1		1.4.4.1	
SECV/ U_{ref}	0,7	0,8	0,6	0,3	0,9	0,8	0,3	0,3

Tab. 4. Parametry kalibracji dla siarczanu (VI) amonu w poszczególnych składnikach paszowych, S – zawartość siarczanu (VI) amonu, NPN – całkowita zawartość azotu niebiałkowego

	S – siarczan (VI) amonu							
	makuch sojowy		mączka rybna		śr. sojowa poeks.		p. mlekozas.	
	S g/100 g	NPN g/100 g	S g/100 g	NPN g/100 g	S g/100 g	NPN g/100 g	S g/100 g	NPN g/100 g
min	0,94	0,34	0,94	1,53	0,94	0,61	0,94	0,56
max	16,07	3,78	14,55	4,88	16,15	3,92	18,73	4,34
śre	6,93	1,82	5,63	2,99	7,39	2,06	8,68	2,21
SD	5,38	1,16	5,25	1,11	5,25	1,11	5,92	1,25
N	24	23	24	24	23	23	24	24
R2	0,997	0,999	0,999	0,999	0,996	0,996	1,000	1,000
SECV	0,286	0,045	0,196	0,042	0,415	0,088	0,152	0,033
SECV %	4,130	2,466	3,470	1,387	5,615	4,255	1,755	1,503
SEC	0,280	0,041	0,153	0,033	0,322	0,068	0,116	0,026
obróbka widm	1.4.4.1		2.6.4.1		1.4.4.1		4.10.10.1	
SECV/ U_{ref}	0,8	0,5	0,7	0,3	1,1	0,8	0,4	0,3

Kalibracja zbiorcza do oznaczania zawartości dodatków azotu niebiałkowego w składnikach paszowych

Uniwersalną kalibrację typu global, pozwalającą na oznaczenie zawartości NPN (jako całkowitego azotu niebiałkowego, obejmującego azot niebiałkowy pochodzenia naturalnego oraz azot pochodzący od sztucznego dodatku) w dowolnych z czterech analizowanych matryc przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc. 1. Krzywa kalibracji zbiorczej na zawartość NPN (całkowitego azotu niebiałkowego) w g/100 g w składnikach paszowych. Oś odciętych – wartości przewidywane, oś rzędnych – wartości referencyjne

Podsumowanie i wnioski

Technika NIRS daje możliwość oznaczania poziomów zafałszowania azotem niebiałkowym składników paszowych, jak i oznaczania zafałszowania próbki poszczególnymi dodatkami fałszującymi. W celu zwiększania odporności kalibracji powinno się je dalej poszerzać.

Zadanie 04-16-04-11

Wykorzystanie larw owadów w żywieniu kurcząt brojlerów jako alternatywa dla śruty sojowej

Kierownik zadania: prof. dr hab. Mariusz Pietras

Obecnie całkowite zastąpienie białka soi nasionami roślin strączkowych nie jest możliwe ze względu na zawartość w nich substancji antyodżywczych, obniżających efektywność produkcji. Z drugiej strony w ostatnich latach mączki z larw owadów wskazywane są jako alternatywne źródło białka.

Celem rozpoczętych badań było określenie możliwości zastąpienia importowanej śruty sojowej w mieszance dla kurcząt brojlerów, mączką z larw mącznika młynarka, drewnojada lub poczwarek jedwabnika.

Doświadczenie przeprowadzono na 200 kogutkach brojlerach Ross-308. Do wieku trzech tygodni kurczęta odchowywano w przedziałach grupowych ze statym dostępem do wody i żywiono do woli mieszanką paszową typu starter. W wieku 21 dni ptaki przydzielono losowo do 5 grup żywieniowych po 10 sztuk w czterech powtórzeniach. Kurczęta grupy kontrolnej (I) żywiono mieszanką typu grower na bazie śruty kukurydzianej i sojowej. W grupie II, 60% soi zastąpiono nasionami łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) odmiany Baryt charakteryzującej się najniższą zawartością alkaloidów. W grupach III do V jako źródło białka zamiast soi zastosowano mączki z larw owadów odpowiednio, drewnojada, mącznika młynarka i jedwabnika morwowego.



Larwy drewnojada (*Zophobas morio*)

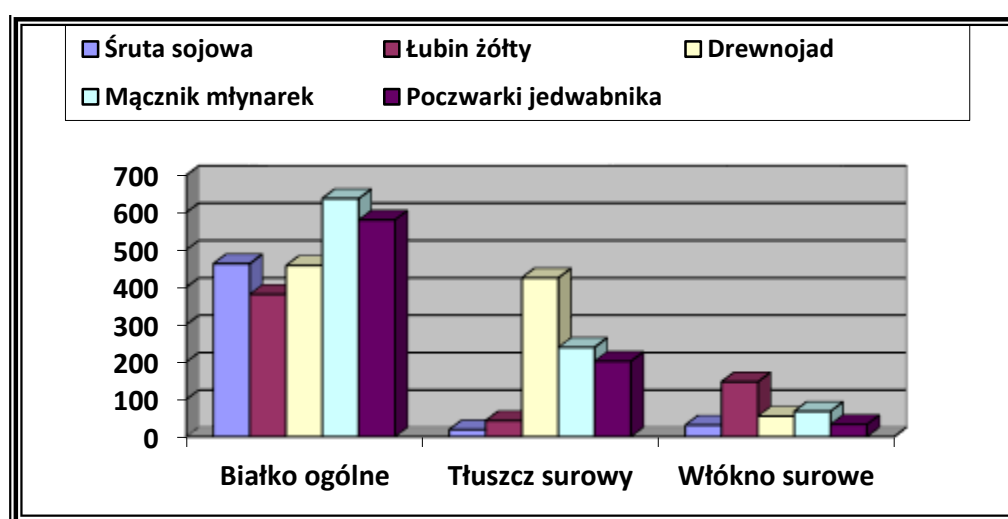


Larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*)



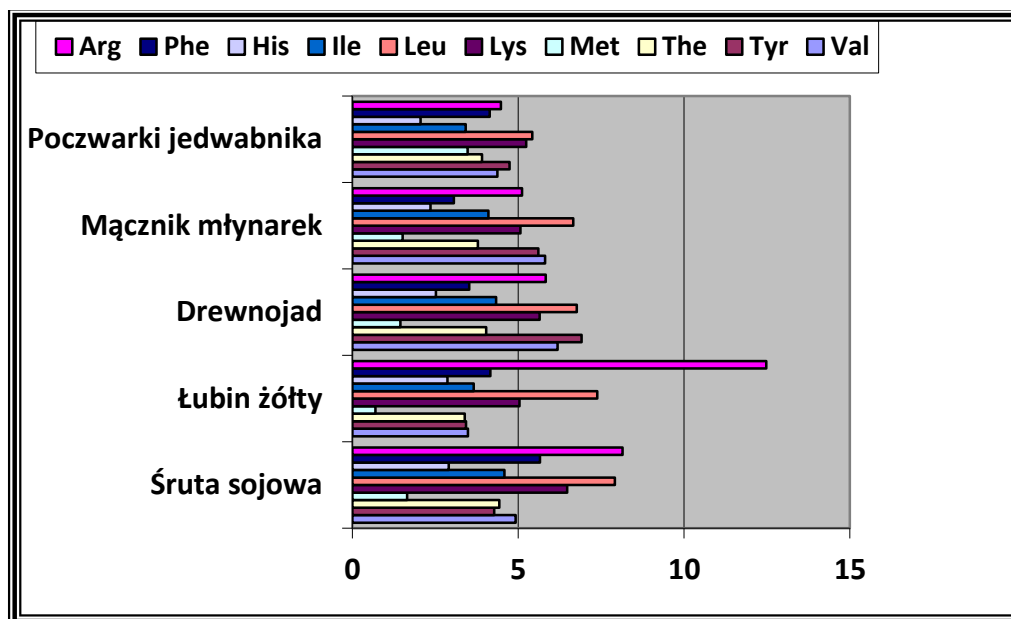
Poczwarki jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*)

Oznaczono zawartość podstawowych składników pokarmowych w mieszankach paszowych oraz mączkach z larw owadów. Zawartość białka w mączce z larw drewnojada odpowiadała zawartości tego składnika śrucie sojowej, natomiast zawartość białka w mączce z larw mącznika i poczwarek jedwabnika był wyższa odpowiednio o 38% i 25%. Mączki owadzie, zwłaszcza z larw drewnojada zawierały znacznie więcej tłuszczu surowego w porównaniu do śruty sojowej. Pod względem zawartości włókna surowego tylko mączka z poczwarek jedwabnika odpowiadała śrucie sojowej. Pozostałe komponenty, szczególnie nasiona łubinu i mączka z larw mącznika młynarka zawierały więcej włókna w kg suchej masy odpowiednio o 373% i 121% w porównaniu do zawartości tego składnika w śrucie sojowej (Rys. 1).



Rys. 1. Skład chemiczny komponentów białkowych użytych w doświadczeniu (g/kg s.m.)

Spośród aminokwasów egzogennych, mączki z larw owadów charakteryzowały się niższą zawartością argininy i fenyloalaniny w porównaniu do śruty sojowej (Rys. 2).



Rys. 2. Zawartość aminokwasów egzogennych w komponentach białkowych użytych w doświadczeniu (g/100 g białka)

Kurczęta odchowywano do wieku 42 dni przy stałym dostępie do paszy i wody. W okresie odchowu kontrolowano codziennie upadki ptaków oraz grupowo pobranie paszy w odstępach tygodniowych. Po zakończeniu okresu odchowu kogutki zważono i ubito po 8 sztuk z każdej grupy. Wydajność rzeźną obliczano jako stosunek masy tuszki do masy ciała przed ubojem. Tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej (Ziołocki i Doruchowski, 1989). W trakcie analizy pobrano i zamrożono w temperaturze -20°C próbki mięsa piersi i nóg do dalszych badań. W próbkach mięsa oznaczono zawartość suchej masy, białka surowego i tłuszczu surowego. Badania organoleptyczne jakości mięsa piersi i nóg przeprowadzono z udziałem zespołu ekspertów. Probki mięsa piersi i nóg podgrzewano do uzyskania temperatury wewnętrznej mięsa 82°C . Każdą próbkę oceniano indywidualnie w pięciostopniowej skali obejmujące smakowość, kruchość, barwę, soczystość i zapach.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań poddano analizie statystycznej wykorzystując program SAS. Istotność różnic oceniano za pomocą testu Duncana uznając różnice za statystycznie istotne przy wartości P poniżej 0,05.

Wyniki odchowu kogutków brojlerów zamieszczono w Tabeli 1. Nie stwierdzono istotnego wpływu zastąpienia śruty sojowej mączką z larw mącznika młynarka i poczwarek jedwabnika na końcową masę ciała ptaków i średnich przyrostów dziennych. Kogutki żywione mieszanką zawierającą mączkę z mącznika młynarka pobierały mniej paszy ($P \leq 0,01$) i lepiej ją wykorzystywały ($P \leq 0,05$) w porównaniu do pozostałych grup. Najgorsze efekty uzyskano przy wprowadzeniu do mieszanki mączki z larw drewnojada. Ptaki tej grupy pobierały dziennie istotnie mniej paszy ($P \leq 0,01$) i osiągnęły najniższą masę ciała ($P \leq 0,01$) w wieku 42 dni w porównaniu do pozostałych grup. Przeżywalność ptaków w okresie odchowu kształtowała się w poszczególnych grupach na zbliżonym poziomie.

Tab. 1. Wyniki produkcyjne odchovu kogutków brojlerów do wieku 42 dni

Wyszczególnienie	Grupa *					SEM
	I SBM	II SBM+LM	III LM+ZML	IV LM+TLM	V LM+BMM	
Początkowa masa ciała w 21. dniu (g)	1022,8	1035,9	1018,0	1016,6	1012,6	10,056
Końcowa masa ciała w 42. dniu (g)	2864,0A	2975,3A	2496,8B	2864,8A	2891,9A	36,162
Średni przyrost masy ciała 21 do 42 d (g/dzień)	1841,3A	1939,4A	1478,8B	1848,1A	1879,3A	35,674
Średnie pobranie paszy (g/d/szt.)	156,8A	151,5AB	119,8D	140,5C	147,8B	3,053
Wykorzystanie paszy (kg/kg)	1,74a	1,65ab	1,75a	1,59b	1,74a	0,021
Przeżywalność %	95,0	94,9	94,9	94,9	95,0	

*SBM – śruta sojowa; SBM+LM – śruta sojowa + łubin żółty; LM+ZML łubin żółty + mączka z larw drewnojada; LM+TLM łubin żółty + mączka z larw mącznika młynarka; LM+BMM – łubin żółty + mączka z poczwerek jedwabnika.

Wyniki analizy rzeźnej zamieszczono w Tab. 2. Zastąpienie 60% śruty sojowej łubinem żółtym (grupa II) nie wywarło statystycznie istotnego wpływu na badane parametry, niemniej jednak obserwowano tendencję do wzrostu masy ciała, masy tuszki i masy tłuszczu sadełkowego w wymienionej grupie. Również całkowite wyeliminowanie z mieszanki śruty sojowej i wprowadzenie na jej miejsce mączki z larw mącznika młynarka lub mączki z poczwerek jedwabnika do mieszanek paszowych nie wywarło istotnego wpływu na podstawowe parametry analizy rzeźnej. Wprowadzenie do mieszanki paszowej mączki z drewnojada (grupa III) wywarło natomiast w warunkach naszego doświadczenia negatywny na masę tuszki i wydajność rzeźną. Szczególnie uwidoczniło się to w udziale mięsa nóg i tłuszczu sadełkowego w tuszce. Również zawartość tłuszczu około żołądkowego była najniższa w porównaniu do pozostałych grup. Eliminacja śruty sojowej z mieszanek paszowych w poszczególnych grupach nie miała istotnego wpływu na względne masy wątroby i serca, obserwowano natomiast istotny wzrost ($P \leq 0,01$) masy żołądka w grupach otrzymujących mączki z owadów, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej jak i sojowo-łubinowej.

Tab. 2. Wyniki analizy rzeźnej kogutków brojlerów w wieku 42 dni

Wyszczególnienie	Grupa*					SEM
	I SBM	II SBM+LM	III LM+ZML	IV LM+TM	V LM+BMM	
Masa ciała (g)	2 785,6aAB	2 989,0aA	2 554,4bB	2 873,8aA	2 886,0aA	36,42
Masa tuszki (g)	2 143,6aA	2 255,8aA	1 900,9bB	2 187,8aA	2 204,1aA	29,49
Wydajność rzeźna (%)	76,9aA	75,5abAB	74,4bB	76,1abAB	76,4abAB	0,29
Udział w tuszce (%)						
Mięso piersiowe	30,1	28,3	31,9	28,1	28,7	1,72
Mięso nóg	21,9abAB	21,7aAB	20,3bB	22,7abAB	23,9Ba	1,64
Skóra z tłuszczem podskórnym	5,6	6,1	5,4	5,9	6,1	0,65
Tłuszcz sadełkowy	1,24abAB	1,56aA	0,97bB	1,29bAB	1,50bAB	0,24
Tłuszcz około żołądkowy	0,43AB	0,65A	0,36B	0,60AB	0,58AB	0,04
Wątroba	1,79	1,89	1,78	1,81	1,59	0,17
Żołądek	0,76aA	0,74aA	1,33bB	1,18bB	1,09bB	0,12
Serce	0,34	0,33	0,35	0,31	0,34	0,04

* oznaczenia grup jak w Tab. 1.

Zawartość suchej masy w mięsie piersi grupy kontrolnej była istotnie niższa w porównaniu do grup II, III i V (Tab. 3). Grupa otrzymująca w mieszance mączkę w larw drewnojada cechowała się istotnie wyższą ($P \leq 0,05$) zawartością białka w mięsie piersi w porównaniu do grupy kontrolnej. Takiej zależności nie wykazano w mięsie nóg. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości tłuszczu surowego w mięśniach piersi, natomiast wartość tego parametru w mięśniach nóg była istotnie niższa w grupie kontrolnej w porównaniu do wszystkich grup doświadczalnych ($P \leq 0,01$).

Tab. 3. Skład chemiczny mięsa (%)

Wyszczególnienie	Grupa*					SEM
	I SBM	II SBM+LM	III LM+ZLM	IV LM+TLM	V LM+BMM	
Mięso piersi						
Sucha masa	22,48A	24,62B	24,39B	23,32AB	23,98AB	0,218
Białko ogólne	20,39a	21,73ab	22,20b	20,62a	21,81ab	0,225
Tłuszcz surowy	1,93	2,37	2,26	2,04	2,54	0,099
Mięso nóg						
Sucha masa	22,99aA	24,79bB	24,05bcAB	23,64acA	23,72acAB	0,151
Białko ogólne	19,45	18,20	19,42	19,03	18,84	0,091
Tłuszcz surowy	3,56A	4,48B	4,39B	4,17B	4,48B	0,125

*oznaczenia grup jak w Tab. 1.

Wyniki oceny sensorycznej mięsa zamieszczono w Tab. 4. Organoleptyczna charakterystyka mięsa kogutków otrzymujących mieszanki zawierające mączki z larw owadów nie wykazała istotnych różnic w zakresie zapachu i smakowości. Obserwowana tendencja do większej soczystości i kruchości mięsa kogutków otrzymujących w dawce mączki z larw owadów może wynikać z większej zawartości tłuszczu.

Tab. 4. Wyniki oceny organoleptycznej mięsa kogutków brojlerów

Wyszczególnienie	Grupa*					SEM
	I SBM	II SBM+LM	III LM+ZLM	IV LM+TLM	V LM+BMM	
Mięśnie piersiowe						
Zapach	4,18	4,41	4,39	4,37	4,09	0,063
Soczystość	3,92	4,05	4,07	3,97	4,00	0,053
Kruchość	3,89	3,97	4,06	4,02	4,03	0,055
Smakowość	4,05	4,06	4,05	4,20	4,03	0,054
Średnia	4,01	4,12	4,14	4,14	4,04	0,061
Mięśnie udowe						
Zapach	4,05	4,09	4,09	4,16	4,21	0,032
Soczystość	3,89	4,05	4,08	4,00	4,09	0,052
Kruchość	3,97	4,06	4,11	4,08	4,17	0,044
Smakowość	4,16	4,14	4,15	4,06	4,16	0,046
Średnia	3,98	4,09	4,11	4,07	4,16	0,027

*oznaczenia grup jak w Tab. 1.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że śrutę sojową w mieszance typu grower można zastąpić mączką z larw mącznika młynarka lub mączką z poczwerek jedwabnika bez ujemnego wpływu na wyniki odchowu i jakość sensoryczną mięsa. Natomiast niekorzystny wpływ mączki z drewnojada na parametry produkcyjne, obserwowany w warunkach naszego doświadczenia wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

Zakład Systemów i Środowiska Produkcji

Kierownik: dr hab. Jacek Walczak

Z-ca kierownika: dr Wojciech Krawczyk

Zadanie 01-17-01-11

Optymalizacja zużycia energii w produkcji zwierzęcej

Kierownik zadania: dr Wojciech Krawczyk

Celem głównym zadania było określenie wielkości nakładów energii w chowie zwierząt gospodarskich, a także możliwość jej substytucji źródłami odnawialnymi z wykorzystaniem rozwiązań energooszczędnych oraz surowców rolniczych dla potrzeb kogeneracji.

Cel szczegółowy 1: Określenie wielkości nakładów energetycznych w podstawowych działach produkcji zwierzęcej.

Tab. 1. Zużycie energii elektrycznej na fermie bydła z podziałem na grupy i ciągi technologiczne oraz sezony roku wyrażone w kWh na DJP

Wyszczególnienie	Dziennie (kWh/DJP)	Rocznie (kWh/DJP)	Sezon zimowy (kWh/DJP)	Sezon wiosenny (kWh/DJP)	Sezon letni (kWh/DJP)	Sezon jesienny (kWh/DJP)
Kompresor	0,0082	3,66	1,1	1,15	0,44	0,97
Hala udojowa	0,214	87,39	27,75	18,66	22,88	18,1
Chłodnia	0,42	171,63	47,61	38,4	51,09	34,53
Oświetlenie stół paszowy	0,066	26,84	11,22	4,26	4,79	6,57
Stacja odpajania	0,35	142,11	65,83	22,96	30,49	22,83
Oświetlenie cielętnik	0,22	86,02	39,22	16,41	15,49	14,90
Ogrzewanie cielętnik	0,00	1,64	0,00	0,00	0,35	1,29
Oświetlenie jałownik	0,05	20,61	8,16	3,92	3,66	4,87
Ogrzewanie jałownik	0,00	0,458	0,45	0,00	0,00	0,008

Tab. 2. Zużycie energii elektrycznej na fermie trzody chlewnej w sektorze porodowym z podziałem na ciągi technologiczne oraz sezony roku wyrażone w kWh na DJP

Wyszczególnienie	Dziennie (kWh/DJP)	Rocznie (kWh/DJP)	Sezon zimowy (kWh/DJP)	Sezon wiosenny (kWh/DJP)	Sezon letni (kWh/DJP)	Sezon jesienny (kWh/DJP)
Nagrzewnica	0,58	210,99	109,89	48,95	3,03	49,11
Usuwanie obornika	0,0086	3,14	0,8	0,75	0,85	0,74
Promienniki	0,46	169,31	51,5	49,41	36,68	31,72
Wentylacja	0,29	105,75	19,10	19,04	38,26	29,35
Oświetlenie	0,18	65,03	22,11	13,45	9,79	19,68
Inne	0,03	10,38	3,22	2,01	3,25	1,91
Paszociąg	0,05	17,7	4,2	4,26	4,86	4,38

Tab. 3. Zużycie energii elektrycznej na fermie drobiu w sektorze utrzymania kur niosek z podziałem na ciągi technologiczne oraz sezony roku wyrażone w kWh na DJP

Wyszczególnienie	Wiosna (kWh/DJP)		Jesień (kWh/DJP)		Zima (kWh/DJP)		Suma (kWh/DJP)	
	Dziennie	Za sezon	Dziennie	Za sezon	Dziennie	Za sezon	Dziennie	Okres odchowu
Ogrzewanie i oświetlenie	0,25	17,5	2,5	52,5	3,25	345	2,25	415
Wentylacja	0,075	5	0,5	11,25	0,05	5	0,1	21,25
Zadawanie paszy	1,5	105	1,5	30,75	2	225	1,75	362,5
Inne	-	-	-	-	-	-	0,0063	1,25
Łącznie	1,83	127,5	4,5	94,5	5,3	575	4,11	800

Wnioski

1. Ogrzewanie budynków w sezonie zimowym i wentylacja w sezonie letnim, to najbardziej energochłonne procesy produkcji trzody chlewnej i drobiu.
2. Na fermach bydła mlecznego najwyższe zużycie energii występuje na etapie doju i schładzania mleka oraz na etapie odchowu cieląt z użyciem stacji odpajania.
3. Zastosowanie zalecanych w audycie energetycznym procedur, środków oraz źródeł alternatywnych może znacznie ograniczyć koszt energii konwencjonalnej.

Cel szczegółowy 2: Walidacja alternatywnych rozwiązań energetycznych w produkcji zwierzęcej.

Tab. 4. Bilans energii niezbędnej do zasilania systemu wentylacji tuczarni

Miesiąc	Zapotrzebowanie (kWh)/DJP/wentylator	Efektywny uzysk energii	
		Generator kWh	Fotoogniwo kWh
I	59,2	2340	59,5
II	61,4	2460	122,8
III	62,3	2310	237,9
IV	71,2	1376	176,5
V	110,3	870	177,5
VI	161,4	750	182,7
VII	178,3	350	89,0
VIII	194,3	380	64,2
IX	182,0	450	78,4
X	109,3	1580	168,2
XI	89,8	1920	62,8
XII	82,4	2480	45,9
Średnio	113,49	1570	122,1

Tab. 5. Bilans energii niezbędnej do zasilania systemu oświetlenia warchlakarni

Miesiąc	Zapotrzebowanie (kWh)/pomieszczenie	Efektywny uzysk energii	
		Generator kWh	Fotoogniwo kWh
I	39,1	2965	77,9
II	37,4	2932	112,1
III	36,3	2530	255,9
IV	32,6	2874	367,3
V	29,3	3446	632,6
VI	24,1	3561	775,0
VII	22,0	2981	740,4

VIII	20,3	2908	609,4
IX	39,8	2805	563,3
X	41,8	2635	359,6
XI	42,0	2500	89,1
XII	42,3	2115	65,5
Średnio	33,8	2854	387,34

Tab. 6. Bilans energii niezbędnej do zasilania systemu oświetlenia i ogrzewania pomieszczeń dla niosek

Sezon	Zapotrzebowanie (kWh)/DJP/wentylator	Efektywny uzysk energii
		Fotoogniwo kWh
Wiosna	17,5	176,2
Jesień	52,5	105,1
Zima	345	78,4
Średnio	138,3	119,9

Wnioski

1. Największą efektywnością i uniwersalnością zastosowania w produkcji energii dla potrzeb ferm bydła mlecznego i świń posiada generator wiatrowy. Jego zastosowanie uzależnione jest jednak silnie od lokalnych warunków topograficznych i pogodowych.
2. Największe nadzieje wiązać należy w przyszłości z zastosowaniem fotoogniw. Już na obecnym etapie mogą one efektywnie wspomagać konwencjonalne źródła energii nawet w zakresie kilkudziesięciu procent zapotrzebowania mocy czynnej urządzeń.

Cel szczegółowy 3: Optymalizacja procesów hydrolizy dla stabilizacji fermentacji metanowej w produkcji biogazu rolniczego w małych i średnich instalacjach.

Po wcześniejszej analizie chemicznej poszczególnych składników, skomponowano właściwe mieszanki substratowe, pod kątem stosunku C/N wynoszącego 26:1 oraz zawartości sm na poziomie 13%. Hydrolizę mieszanek przeprowadzono w oparciu o wykorzystanie mikrofermenterów zaopatrzonych w mieszadła, odpowiadające warunkom tzw. fermentacji mokrej. Mikrofermentery zaopatrzone były w mierniki przepływowe takich gazów, jak: metan, tlen, dwutlenek węgla oraz siarkowodór. Procesy hydrolizy realizowane były w aerobowych warunkach mezofilnych (20°C) z pełną kontrolą kierunku i parametrów zachodzących przemian (pH, ilość H₂, NH₃, CO₂, CH₄). Każdy z substratów był hydrolizowany kolejno przez okres 5, 10, 20 i 30 dni przy udziale 5% roztworu NaOH. Udział dodatku zasady warunkowała wielkość pH określona dla poszczególnych grup na poziomie 7, 8, 10 pH.

Tab. 7. Średnie parametry fizykochemiczne i skład produktu hydrolizy dla pH 8

Skład	Rodzaj substratu		
	GK	GD1	GD2
pH	8,1b	7,82a	8,28b
Sucha masa [%]	12,32	11,45	13,1
Sm organiczna [%s.m.]	91,63b	89,20c	92,72b
Popiół [% s.m.]	12,67bB	21,33cC	11,13fE
Azot ogólny [% s.m.]	2,32bA	3,65acA	1,2dB
ChZT [g O ₂ /g s.m.]	0,97	0,98	1,23
P og. [mg/kg s.m.]	5930abAB	7911cC	1747eD

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na największy stopień hydrolizy w przypadku zastosowania pH 10, jednak z powodu konieczności uzyskania optymalnego pH w procesie metanogenezy, rzędu 5-6 pH, taki odczyn substratu po hydrolizie, wymaga intensywnego zakwaszania, co zwiększa koszty i wydłuża czas przygotowania substratu. Optymalnym pH dla potrzeb hydrolizy okazało się stężenie jonów wodorowych na poziomie 8. Stopień hydrolizy w tym samym czasie reakcji jest tu mniejszy niż dla zastosowanego pH 10, jednak wydłużenie hydrolizy o 5 dni pozwala na uzyskanie identycznych właściwości substratu.

Zadanie 01-17-02-11

Optymalizacja warunków mikroklimatycznych w pomieszczeniach dla bydła

Kierownik zadania: dr inż. Andrzej Kaczor

Celem badań w zadaniu była poprawa warunków utrzymania cieląt i krów, a także poprawa warunków pracy obsługi poprzez zastosowanie urządzeń polepszających mikroklimat pomieszczeń.

Cielęta. Warunki mikroklimatyczne w utrzymaniu cieląt odgrywają znacznie większą rolę niż w utrzymaniu pozostałych kategorii bydła. Podstawowym problemem systemu wentylacyjnego w cielętnikach, szczególnie w tych tradycyjnych jest wymagana normatywnie duża wymiana powietrza w przeliczeniu na masę ciała cieląt, pod warunkiem jej niskiej prędkości. Celem było określenie oddziaływania wymuszonego nawiewu powietrza z rękawa wentylacyjnego na mikroklimat cielętnika, zachowanie się oraz stan zdrowotny i przyrosty masy ciała cieląt. Celem praktycznym natomiast było opracowanie sposobu montażu oraz zasad działania rękawa wentylacyjnego, a także określenie zużycia energii elektrycznej przez to urządzenie.

Grupę doświadczalną stanowił sektor cielętnika ze zwierzętami wyposażony w rękaw wentylacyjny (Fot. 1), a grupę kontrolną sektor bez rękawa. W okresie sprawozdawczym przeprowadzono badania przewidziane w metodyce, tj. badania mikroklimatyczne w cielętniku, badania etologiczne, przyrostów masy ciała i stanu zdrowotnego cieląt, a także zużycia energii przez rękaw wentylacyjny.

W ramach badań mikroklimatycznych wykonano momentalne pomiary temperatury, wilgotności względnej i prędkości ruchu powietrza oraz stężenia szkodliwych domieszek gazowych CO₂ i NH₃ w sektorze cielętnika z wyłączonym i działającym rękawem wentylacyjnym. Dodatkowo wykonano ciągłe pomiary temperatury i wilgotności względnej powietrza w poszczególnych porach roku przy pomocy aparatów S3121. Z kolei w ramach badań etologicznych przeprowadzono 24-godzinne obserwacje etologiczne na 44 cielętach po odsadzeniu (cielęta 4-miesięczne), utrzymywanych w sektorze doświadczalnym i 50 cielętach w sektorze kontrolnym. Przyrosty dobowe masy ciała cieląt zostały obliczone na podstawie masy ciała przy urodzeniu i po ukończeniu 120. dnia życia. Podobnie, w tym okresie życia odnotowano liczbę chorujących zwierząt. Pomiarów zużycia dokonano na podstawie odczytów licznika zużycia energii w zależności mocy wentylatora.

Wyniki badań mikroklimatu wykazały, że temperatura powietrza w cielętniku podczas pracy rękawa wentylacyjnego nie spadała gwałtownie, co świadczy o stopniowym napływie powietrza i właściwej jego wymianie. Zastosowanie rękawa wentylacyjnego nie wpłynęło istotnie na zwiększenie prędkości ruchu powietrza, która w otoczeniu cieląt nie przekraczała norm dla tej kategorii zwierząt. Wpływ stosowania rękawa wentylacyjnego był widoczny przy redukcji koncentracji CO₂ i NH₃ w powietrzu cielętnika, szczególnie w okresie letnim. Wyniki pomiarów mikroklimatycznych wskazują na prawidłowe funkcjonowanie rękawa wentylacyjnego w „dośtarczaniu” świeżego powietrza dla cieląt. W zależności od temperatury zewnętrznej, wystarczającą wymianę powietrza w cielętniku można uzyskać przy obrotach wynoszących od 20 do

60% maksymalnej mocy wentylatora w rękawie wentylacyjnym. Stosowanie rękawa wentylacyjnego nie wpłynęło istotnie na zachowanie się cieląt – różnice w czasie trwania poszczególnych czynności były nieistotne. Przyrosty dobowe masy ciała i stan zdrowotny cieląt w sektorze z rękawem wentylacyjnym były lepsze niż utrzymywanych w sektorze bez rękawa. Przedstawione wyniki badań wykazują, że rękaw wentylacyjny jest przydatnym rozwiązaniem w utrzymaniu cieląt i można go z powodzeniem stosować w praktyce.

Krowy. Problem niekorzystnych warunków mikroklimatycznych w odniesieniu nie tylko do krów, ale również do obsługi w sektorze doju, tj. w hali udojowej oraz w poczekalni jest powszechnie znany. Zarówno powierzchnia, jak i kubatura przypadająca na krowę jest w tych pomieszczeniach 5-krotnie mniejsza niż w oborze. W okresie letnim, przy niewielkiej kubaturze przypadającej na zwierzę, mamy często do czynienia ze stresem cieplnym u krów, który powoduje m.in. spadek produkcji mleka.

Celem badań było określenie wpływu działania wentylatora sufitowego na warunki mikroklimatyczne w hali udojowej i ograniczenie skutków stresu cieplnego u krów. Natomiast celem badań przeprowadzonych w poczekalni było określenie wpływu wentylatora sufitowego i dodatkowo urządzenia do zamgławiania powietrza na warunki mikroklimatyczne i ograniczenie skutków stresu cieplnego u krów.

Grupę doświadczalną w hali udojowej stanowiły krowy i warunki mikroklimatyczne podczas pracy wentylatora sufitowego (Fot. 2), a grupę kontrolną zwierzęta i mikroklimat z niedziałającym urządzeniem. W poczekalni grupę doświadczalną stanowiły krowy i warunki mikroklimatyczne podczas stosowania wentylatora sufitowego oraz zamgławiacza powietrza (Fot. 3), a grupę kontrolną zwierzęta i mikroklimat z wyłączonymi urządzeniami. Według założeń metodycznych w hali udojowej przeprowadzono badania: mikroklimatyczne, etologiczne i długości czasu doju krów. W ramach badań etologicznych wykonano wizualne obserwacje, w których uwzględniono nieprawidłowe czynności krów podczas doju, takie jak przestępowanie kończynami oraz trącanie i zrzucanie aparatu udojowego. Natomiast w poczekalni wykonano badania mikroklimatyczne oraz określono współdziałanie wentylatora i urządzenia do zamgławiania powietrza.

Wyniki badań w hali udojowej wykazały, że po włączeniu wentylatora sufitowego w hali udojowej nastąpiło znaczne zwiększenie prędkości ruchu powietrza od 120 do 400% w porównaniu do okresu przed użyciem tego urządzenia. Można przypuszczać, że znaczne zwiększenie prędkości ruchu powietrza obniżyło temperaturę odczuwalną u krów, a tym samym wpłynęło na ograniczenie powstawania stresu cieplnego. Wpływ wentylatora sufitowego na temperaturę i wilgotność względną powietrza, a także stężenie dwutlenku węgla i amoniaku był niewielki. Czas doju krów (dój maszynowy) podczas stosowania wentylatora sufitowego w hali udojowej był podobny jak przy wyłączonym wentylatorze. Częstotliwość wykonywania nieprawidłowych czynności przez krowy, takich jak przestępowanie kończynami oraz trącanie i zrzucanie aparatu udojowego w hali udojowej podczas pracy wentylatora była mniejsza niż przy wyłączonym. Natomiast zastosowanie urządzenia do zamgławiania powietrza w poczekalni dla krów wpłynęło istotnie na obniżenie temperatury w tym pomieszczeniu, ale przyczyniło się równocześnie do zwiększenia wilgotności powietrza. Wraz ze wzrostem temperatury zewnętrznej, efekt zamgławiania powietrza w obniżaniu temperatury w poczekalni był większy. Można wnioskować, że istotne obniżenie temperatury w poczekalni podczas stosowania urządzenia do zamgławiania powietrza wpłynęło na ograniczenie powstawania stresu cieplnego. Zamgławianie powietrza w poczekalni dla krów spowodowało obniżenie stężenia dwutlenku węgla (CO_2) i amoniaku (NH_3). Przedstawione wyniki badań wykazały, że wentylator sufitowy jest przydatnym urządzeniem do poprawy warunków mikroklimatycznych w zakresie prędkości ruchu powietrza, tym samym do ograniczania skutków stresu cieplnego i można go z powodzeniem stosować w praktyce. Natomiast urządzenie do zamgławiania powietrza jest

przydatne w poczekalniach dla krów jako dodatkowe, pomocnicze urządzenie do obniżenia temperatury podczas wystąpienia upałów.



Fot. 1. Rękaw wentylacyjny w cieletniku



Fot. 2. Wentylator sufitowy w hali udojowej



Fot. 3. Wentylator sufitowy i urządzenie do zamgławiania powietrza w poczekalni

Zadanie 01-17-03-11

Waloryzacja metod ograniczenia rozpraszania związków azotu z produkcji zwierzęcej

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Walczak

Podjęcie działań zmierzających do ograniczenia niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej staje się niezbędne wobec standardów określonych przez Unię Europejską.

Stąd celem zadania jest opracowanie oraz weryfikacja metod ograniczenia emisji lotnych związków gazowych, a także koncentracji związków biogenych z utrzymania zwierząt gospodarskich, przechowywania nawozów naturalnych i nawożenia wraz z ich krajowym monitoringiem.

Realizacja zadania obejmuje 4 cele szczegółowe, w tym:

- określenie efektywności metod redukcji rozpraszania azotu z systemów utrzymania bydła, świń i drobiu,
- wpływ rodzaju stosowanych dodatków paszowych oraz liczby faz żywienia na poziom ograniczenia wydalania azotu,
- określenie możliwości redukcji rozpraszania na drodze modyfikacji warunków przechowywania nawozów naturalnych,
- wpływ sposobu aplikacji nawozów naturalnych w trakcie nawożenia na wielkość rozpraszania azotu.

W omawianym okresie sprawozdawczym zrealizowano etap dotyczący oceny skuteczności metod ograniczania rozpraszania azotu w warunkach różnych pór roku. Badaniami objęto świnię, bydło, drób czystych ras jak i krzyżówek towarowych, utrzymywane w systemach ściółkowych i bezściółkowych. Prace dotyczyły zarówno zwierząt, jak i systemów ich utrzymania, miejsc składowania odchodów (obornik, gnojowica) oraz sposobów nawożenia. W zakresie

trzody chlewnej materiał stanowiły lochy z prosiętami, lochy prośne, warchlaki i tuczniki; ogółem w liczbie 800 sztuk. Zwierzęta z poszczególnych grup technologicznych utrzymywano przez okres odpowiadający standardowemu sposobowi postępowania z daną grupą. W obrębie bydła uwzględniono krowy mleczne i krowy zasuszone rasy czarno-białej (ok. 70% udziału krwi hf) oraz bydło opasowe. Ogółem badaniom poddano 72 krowy w trakcie laktacji i 72 krowy zasuszone oraz 144 sztuk bydła opasowego. Jeśli zaś chodzi o drób, to prace etapu obejmowały 400 kurek i kur rasy ISA Brown oraz 800 kurcząt brojlerów Cobb, utrzymywanych w trzech systemach utrzymania: na ściółce słomistej, na ściółce trocinowej (z drzew iglastych) oraz klatkowo w bateriach. Zwierzęta żywiono i utrzymywano zgodnie z obowiązującymi normami zawartymi w rozporządzeniach o minimalnych warunkach utrzymania w obiektach hodowlanych i w 6 komorach klimatycznych, z których każda wyposażona była w inny system utrzymania. Badania przeprowadzono również na 160 t odchodów (po 5 t w każdej z grup) pozyskanych od wymienionych grup technologicznych zwierząt.

W trakcie realizacji celów szczegółowych stwierdzono statystycznie istotne zróżnicowanie emisji pomiędzy okresem letnim i zimowym. Różnice powstałe w systemach utrzymania wynikały z niższej temperatury pomieszczeń oraz mniejszej wymiany powietrza w okresie zimowym. W przypadku przechowywania nawozów naturalnych okres zimowy cechował się zerową emisją w zakresie temperatur powietrza poniżej 0°C. W okresie letnim emisje te były wyższe o 30% w stosunku do okresu wiosny czy jesieni.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że chów zwierząt, zwłaszcza przy dużej skali i koncentracji produkcji, prowadzi do istotnych oddziaływań na środowisko powietrzne. Stąd konieczne jest tu wypracowanie skutecznych i możliwych do powszechnego użycia metod redukcyjnych. Pod względem koncentracji azotu w nawozach naturalnych, stwierdzono brak zagrożeń dla środowiska glebowego i wodnego nawet przy intensywnej produkcji, jednak tylko w przypadku, kiedy dawka nawozu nie przekracza 170 kg N/ha. Przebieg warunków pogodowych w różnych porach roku silnie modyfikuje emisje gazowe, wpływając na koncentrację azotu w nawozach naturalnych.

Zadanie 01-17-01-11

Określenie potencjału biogenego obornika oraz możliwość redukcji szkodliwych domieszek gazowych towarzyszących produkcji owczarskiej

Kierownik zadania: dr inż. Paweł Paraponiak

Celem badań jest określenie potencjału biogenego obornika owczego w systemie utrzymania zwierząt na głębokiej ściółce, oszacowanie wielkości emisji gazowych oraz możliwości redukcji szkodliwych domieszek gazowych na drodze zastosowania ziołowych dodatków ściółkowych oraz pełnoporcjowej mieszanki treściwej w formie granulatu.

Doświadczeniem zostały objęte stada owiec rasy owca pomorska, suffolk i świniarka, w liczebności, odpowiednio 160, 90 i 230 sztuk matek stada podstawowego. Rasy te w dość reprezentatywny sposób odzwierciedlają znaczne zróżnicowanie pod względem eksterieru, kierunku i potencjału produkcyjnego występujące w obrębie krajowego pogłowia zwierząt tego gatunku.

Zwierzęta wymienionych ras były utrzymywane całodobowo w budynkach owczarskich (z dostępem do okólników), z wyłączeniem okresu pastwiskowego (wypas 8-godzinny), na głębokiej ściółce (usuwanej 2-krotnie podczas roku, w okresie wiosennym i jesiennym – ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o., bądź tylko w okresie jesiennym – ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o.) z zachowanym podziałem na poszczególne grupy technologiczne (tryki, maciorki, jarki, tryczki, matki ciężarne i w okresie karmienia jagniąt, jagnięta po odłączeniu od matek) i wymaganą obsadą (od 0,8 – jarki do 2 m² – tryki). Zwierzęta żywione w systemie półintensywnym (suplementacja dawki

pokarmowej paszami treściwymi stosownie do zapotrzebowania danej grupy technologicznej – suffolk i owca pomorska) i ekstensywnym (świniarka), zgodnie ze standardami wynikającymi z aktualnych norm Żywienia IZ INRA. Budynki owczarni wyposażone są w wentylację grawitacyjną.

W okresie sprawozdawczym zgromadzono i przeanalizowano następujące dane pomiarowe dotyczące mikroklimatu wewnątrz owczarni:

- temperatura,
- wilgotność względna,
- ruch powietrza.

Pomiary mikroklimatyczne realizowane przy użyciu elektronicznego miernika firmy Testo-sterm, model Testo 435, w trakcie pomiarów emisji gazów.

Pomiar emisji gazowych obejmuje oznaczenie stężenia:

- amoniaku,
- dwutlenku węgla,
- tlenków azotu,
- metanu.

Przeprowadzony w pobliżu (poniżej) wywiewu kalenicowego budynków jeden raz w miesiącu (Kołbacz) lub w interwałach dwutygodniowych (Chorzelów), za pomocą sond elektrochemicznych, stanowiących autonomiczne elementy pomiarowe elektronicznego miernika gazów Multiwarn II firmy Dräger, analizatorem stężenia metanu Tiger Optics i-2000 oraz analizatorem stężenia tlenków azotu Horiba APNA-370.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż parametry mikroklimatyczne objętych doświadczeniem pomieszczeń owczarskich oraz stwierdzone stężenie domieszek gazowych we wszystkich przeprowadzonych pomiarach, choć zróżnicowane, kształtowały się na korzystnym poziomie.

Zakres temperatur zmierzonych we wszystkich obiektach, poczynając od drugiej połowy lutego 2018 roku, zawierał się w zakresie od 5°C w okresie zimowym do maksymalnie 29°C w okresie letnim.

Podczas sezonu stwierdzono dość znaczne różnice w szybkości ruchu powietrza, a najwyższe jego wartości, osiągające maksymalnie 0,9 m/s odnotowano w okresie letnim, podczas gdy w okresie zimowym analogiczne pomiary były kilkakrotnie niższe. Ma to zapewne związek z przymkniętymi kanałami nawiewnymi/wywiewnymi systemu wentylacji grawitacyjnej podczas panujących na zewnątrz niskich temperatur, celem ograniczenia nadmiernych strat ciepła z budynku owczarni.

Stwierdzono podwyższoną wilgotność powietrza w obiekcie w Chorzelowie. Natomiast w przypadku owczarni w Kołbaczu zaznaczyła się dość wyraźna tendencja: wyniki pomiarów były znacząco niższe w okresie letnim, wynosząc około 60% w porównaniu z 80% w zimie. W żadnym z pomiarów CO₂ nie stwierdzono przekroczenia zalecanego stężenia. W przeciwieństwie do powyżej omawianego parametru, jego wartości zmierzone w okresie od listopada do marca (0,07-0,16%) uznać należy za korzystne. Równocześnie były one co najmniej dwukrotnie wyższe od uzyskanych w miesiącach letnich. Wynika to zarówno ze wspomnianej, wymuszonej, mniejszej sprawności systemu wentylacyjnego, jak też z faktu, iż w okresie letnim część stada przebywała na pastwisku.

Pośród szkodliwych domieszek gazowych w pomieszczeniach dla zwierząt, najpowszechniej i w największych stężeniach występuje amoniak (NH₃). Jego stężenie było zmienne

w zależności od terminu pomiaru i we wszystkich obiektach wyniosło 0-10 ppm (najwyższe wartości występujące sporadycznie), nie wykazując równocześnie jakiegokolwiek zaznaczonej tendencji. Równocześnie nie stwierdzono obecności H_2S we wszystkich obiektach i w jakimkolwiek z okresów pomiarów. Zakres wskazań stężenia CH_4 wykazywał dość znaczną rozpiętość 10 000-49 500 ppb. W Kołbaczu odnotowano jego najniższe stężenie w powietrzu po wymianie ściółki, tj. w listopadzie i grudniu, a w pozostałych okresach wartości pomiarów były wyższe i do siebie zbliżone. W owczarni w Chorzelowie, z racji częstszej, dwukrotnej wymiany obornika, tendencja ta zaznaczyła się jeszcze w miesiącu czerwcu i lipcu.

Wartości NO_x z rzadka przekraczały 10 ppb, wynosząc z reguły 2-6 ppb, a udział NO był zazwyczaj co najmniej 2-krotnie wyższy od stężenia NO_2 . Pomiaru udziału związków azotu w powietrzu owczarni odznaczyły się największą zmiennością.

N organiczny stanowi dominującą frakcję azotu w oborniku owczym (Tab. 1). Początkowa zawartość K kształtowała się na zbliżonym poziomie, będąc równocześnie wyższą od stężenia P. Optymalna wartość współczynnika C:N, decydującego o efektywności zachodzących przemian mikrobiologicznych, powinna kształtować się na poziomie 20-30:1. W badaniach własnych wyniosła ona 22-24, jaki to poziom uznać należy za korzystny, gdyż pozwala on na uzyskanie znacznej ilości szybko przyswajalnych form azotu (Tab. 1 i 2). Zawartość suchej masy i pH zarówno na początku, jak i przed wymianą ściółki była zbliżona, odpowiednio 29,8-34,5% i 7,7-8,4%.

Największe straty wszystkich związków biogenych wystąpiły w obiektach w Kołbaczu, co można wiązać z dłuższym, rocznym okresem deponowania ściółki w owczarni.

Zwierzęta w omawianym okresie charakteryzowały się dobrą kondycją, a młodzię (trzciki) owcy pomorskiej i suffolk osiągnęły średnie przyrosty dzienne na poziomie 200 g (podczas 160-dniowego odchovu), natomiast świniaarki, ok. 110 g (okres 220-dniowy), co jest typowe dla owiec przedmiotowych ras w utrzymaniu półintensywnym.

Tab. 1. Początkowa zawartość związków biogenych w oborniku oraz początkowa zawartość suchej masy i wartość pH (N, P, K % św.m.)

Budynek	Cecha						
	N całkowity	N organiczny	P	K	C:N	s.m.	pH
Kołbacz I	1,66	1,24	0,76	1,23	22,7:1	29,8	7,8
Kołbacz II	1,52	1,31	0,91	1,07	23,4:1	31,4	8,1
Chorzelów	1,37	1,10	0,82	1,31	24,3:1	33,7	8,3

Tab. 2. Straty zawartości związków biogenych w oborniku oraz końcowa zawartość suchej masy i wartość pH (N, P, K % św.m.)

Budynek	Cecha						
	N całkowity	N organiczny	P	K	C:N	s.m.	pH
Kołbacz I	0,39	0,28	0,24	0,44	23,7:1	34,5	7,7
Kołbacz II	0,35	0,33	0,36	0,37	22,6:1	33,2	7,9
Chorzelów	0,21	0,17	0,17	0,26	23,5:1	32,7	8,4

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż parametry mikroklimatyczne objętych doświadczeniem pomieszczeń owczarskich oraz stwierdzone stężenie domieszek gazowych we wszystkich przeprowadzonych pomiarach, choć zróżnicowane, kształtują się na korzystnym poziomie. Dłuższy okres deponowania ściółki w obiekcie wiąże się ze wzrostem strat wszystkich związków biogenych w oborniku owczym.

Zadanie 04-17-01-11

Ekonomiczne uwarunkowania produkcji zwierzęcej – ocena potencjału produkcyjnego i kondycji ekonomicznej gospodarstw rodzinnych

Kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Celem głównym zadania jest określenie potencjału produkcyjno-ekonomicznego gospodarstw rodzinnych z uwzględnieniem działań prośrodowiskowych i zmian w technologiach produkcji i technikach wytwarzania produktu w ujęciu terytorialnym.

Cel ten jest realizowany poprzez:

- analizę przychodów i kosztów produkcji zwierzęcej w ujęciu terytorialnym, uwzględniającą zmiany w technologii i technikach wytwarzania w gospodarstwach rolnych,
- optymalizację produkcji zwierzęcej z uwzględnieniem działań na rzecz ochrony środowiska w gospodarstwach rodzinnych - konwencjonalnych i ekologicznych.

W roku sprawozdawczym zaplanowano etap dotyczący gromadzenia danych o produktywności, kosztach i przychodach gospodarstwa rolnego oraz dobór mierników określających poziom innowacyjności produkcji rolniczej w gospodarstwie, a także wskaźników określających stopień oddziaływania gospodarstw rolnych na środowisko naturalne.

W związku z powyższym wytypowano gospodarstwa rodzinne utrzymujące owce, bydło i świnie oraz zgromadzono dane z zakresu zasobów gospodarstw, które w przyszłości posłużą do wykonania analizy efektywności ekonomiczno-produkcyjnej i optymalizacji produkcji.

Dane źródłowe poddane analizie w 2018 w roku pochodziły z 184 gospodarstw, w tym 51 gospodarstw utrzymujących świnie, 84 gospodarstwa krowy mleczne oraz 49 utrzymujących owce.

Gospodarstwa z produkcją żywca wieprzowego

Średnia powierzchnia gospodarstw zajmujących się produkcją żywca wieprzowego wyniosła w województwie podkarpackim blisko 29 ha, natomiast w województwie podlaskim 40 ha. Powierzchnia analizowanych gospodarstw była większa niż średnia krajowa. Dominującą pozycję z uwagi na rodzaj prowadzonej działalności stanowiły grunty orne. Średnio, blisko 86% całej powierzchni gospodarstwa przypadło na tę kategorię gruntów. We wszystkich gospodarstwach większą powierzchnię stanowiły grunty własne aniżeli dzierżawione.

Średni stan loch w podkarpackich gospodarstwach wyniósł 11,75 szt., a na Podlasiu – 30,37 szt. Obsada zwierząt w przeliczeniu na 1 ha (DJP/ha) w województwie podlaskim wyniosła średnio 1,51, a na Podkarpaciu 1,00 DJP/ha.

Świnie utrzymywane były w systemie ściółkowym (84% gospodarstw) oraz na rusztach grupowo (16%). Średnia liczba miotów od lochy w roku wyniosła około 2,1 we wszystkich latach i regionach, natomiast liczba prosiąt odchowanych w miocie to 10,3 sztuk. Średnie zużycie paszy na 1 kg masy ciała wyniosło 3,01 kg (podkarpackie) i 2,87 kg (podlaskie). Najlepsze wyniki produkcyjno-hodowlane (liczba miotów w roku, zużycie paszy na kg przyrostu masy ciała) uzyskały gospodarstwa o większej skali produkcji.

Koszty bezpośrednie w przeliczeniu na 1 lochę wyniosły 5 353,88 zł (podkarpackie) oraz 5 744,72 zł (podlaskie). Stosunkowo niska wysokość kosztu spowodowana była wysokim udziałem pasz treściwych własnych w żywieniu świń. We wszystkich gospodarstwach najwyższy udział w strukturze kosztów bezpośrednich stanowiły koszty pasz. W strukturze kosztów

całkowitych produkcji dominowały koszty bezpośrednie produkcji, a w nich koszty pasz. Natomiast główną składową kosztów pośrednich gospodarstw, zajmujących się produkcją żywca wieprzowego była amortyzacja.

Przychody ogółem w przypadku gospodarstw trzodowych kształtowała wartość produkcji żywca wieprzowego, która stanowiła odpowiednio 58,5% (podkarpackie) i 80% (podlaskie). Wysokość płatności w przychodach odnotowano na wyższym poziomie w województwie podkarpackim (18,04%) aniżeli podlaskim (11,98%).

Gospodarstwa z produkcją żywca jagnięcego

Średnio przeciętna liczba matek przypadająca na 1 gospodarstwo na Podkarpaciu wyniosła 82,7 szt., blisko o połowę mniej niż na Podlasiu (162,6 szt.). Obsada zwierząt w przeliczeniu na 1 ha (DJP/ha) w województwie podlaskim wyniosła średnio 0,48, a na Podkarpaciu 0,42 DJP/ha.

W każdym z badanych obszarów z zaobserwowano duże zróżnicowanie obszarowe. Powierzchnia gospodarstw zajmujących się produkcją owczarską była większa niż średnia krajowa. Średnio największe gospodarstwa występowały w województwie podlaskim (średnio – 43,53 ha), natomiast najmniejsze w podkarpackim (średnio – 36,45 ha). Większość powierzchni gospodarstw w województwie podkarpackim obejmowały grunty orne, które stanowiły dosyć wysoki udział w strukturze użytkowania ziemi (ponad 56%). Również w tym województwie odnotowano największy odsetek ziemi dodzierżawionej przez rolników (ok. 18%). Największy udział użytków zielonych przypadł na województwo podlaskie (blisko 46%).

Owce we wszystkich obiektach utrzymywane były w systemie alkierzowo- pastwiskowym, w 97% na głębokiej ściółce. System zadawania pasz we wszystkich gospodarstwach był ręczny, dominował także ręczny system usuwania obornika. Średnie wyniki odchowu jagniąt wskazują na dobre warunki chowu. Plenność w badanych województwach była zróżnicowana i wahała się średnio od blisko 123% (podkarpackie) do ponad 132% (podlaskie). Średnia płodność owiec w całej zbiorowości gospodarstw była na wyrównanym i zadawalającym poziomie wynoszącym ok. 93%.

W strukturze kosztów całkowitych produkcji owczarskiej dominowały koszty bezpośrednie produkcji, główną składową kosztów bezpośrednich były koszty pasz (88% – podkarpackie; 82% – podlaskie), głównie pasz własnych.

Koszt całkowity produkcji w przeliczeniu na matkę wyniósł blisko 579 zł (podkarpackie) oraz 626 zł (podlaskie). Wysokość kosztów pośrednich odnotowano na zbliżonym poziomie ok. 190 zł/matkę średnio w jednym i drugim regionie. Główną jego składową było utrzymanie, remonty maszyn, urządzeń oraz budynków.

Przychody ogółem w gospodarstwach owczarskich kształtowały przede wszystkim płatności i subsydia, które stanowiły wysoki odsetek w przychodach ogółem gospodarstw (blisko 55% – podlaskie i ponad 44% – podkarpackie). Natomiast przychody z tytułu produkcji owczarskiej stanowiły odpowiednio 10% i 15%.

Gospodarstwa z produkcją mleka

Analizując powierzchnię gospodarstw zajmujących się produkcją mleka zaobserwowano w każdym badanym regionie duże zróżnicowanie obszarowe. Średnio, największe gospodarstwa występowały w województwie dolnośląskim (średnio – 86,81 ha), natomiast najmniejsze w podlaskim (średnio – 47,96 ha). W województwie podkarpackim średnia powierzchnia gospodarstwa to około 63 ha, podzielona równo pomiędzy grunty orne i użytki zielone. Również w tym województwie odnotowano największy odsetek ziemi dodzierżawionej przez rolników (ok. 36,64%). Na uwagę zasługuje fakt, że w województwie

dolnośląskim i podkarpackim powierzchnia gospodarstw zmalała w stosunku do 2017 roku, natomiast na Podlasiu wzrosła o ponad 12%.

Charakteryzując kapitał ludzki stwierdzono, że w nieco ponad 50% gospodarstw był zadeklarowany następca, którego można włączyć w proces współdecydowania i pracy, co pozwoli na łagodniejsze przejście własności i sprzyja rozwojowi gospodarstwa. Jednak dość często brak następcy wynika głównie z powodu odpływu młodzieży do miasta. A należy uznać, że jednym z ważnych czynników społecznego zrównoważenia i warunkiem prawidłowego i trwałego rozwoju gospodarstwa jest jego sukcesja. Rozwój gospodarstwa rolnego nie jest możliwy bez ciągłości gospodarowania.

Średni stan krów w analizowanych gospodarstwach wynosił 40,78 szt. wobec liczby bydła ogółem wynoszącej średnio 76,29 szt. i był on zbliżony we wszystkich analizowanych regionach. Obsada zwierząt w przeliczeniu na 1ha (DJP/ha) w województwie podlaskim i podkarpackim wyniosła średnio 0,68 i 1,38, co z punktu widzenia poprawnej gospodarki nawozowej jest działaniem wskazanym. W przypadku województwa dolnośląskiego odnotowana obsada zwierząt stanowiła średnio 1,53 DJP/ha, co jest nie spójne z zaleceniami kodeksu dobrej praktyki rolniczej.

Dokonując analizy jednostkowych kosztów bezpośrednich ustalono średni koszt produkcji mleka na poziomie 0,81 zł/l, natomiast roczny koszt utrzymania krowy wynosił 4692,40 zł/szt. W strukturze kosztów bezpośrednich pasze stanowiły aż 88,5%. Przychody ogółem w przypadku gospodarstw mlecznych kształtowała wartość produkcji mleka, która stanowiła odpowiednio 77,90% (podkarpackie), 72,66% (podlaskie) i 64,62% (dolnośląskie). Wysokość płatności w przychodach ustalono średnio na poziomie 13,64%. Trzecim elementem, mającym duży wpływ na poziom przychodów była sprzedaż nadwyżki z produkcji roślinnej wynosząca średnio 9,36%.

Działalność innowacyjna jest niezwykle ważna przy modernizacji polskiego rolnictwa, wiąże się z wprowadzaniem zmian, upowszechnianiem wszelkich nowości, udoskonaleniem stanów już istniejących, w celu zwiększenia wydajności produkcji i obniżenia jej kosztów. Niezbędne jest unowocześnienie i usprawnienie gospodarstw rolniczych jako warsztatu pracy rolnika. Wprowadzanie innowacji przyczynia się do rozwoju gospodarstw rolnych. Jest to jeden z możliwych sposobów dostosowawczych do warunków gospodarki rynkowej spowodowany chęcią uzyskania wyższych dochodów.

W obiektach wybranych do badań utrzymujących owce, świnie oraz bydło mleczne zmiany technologiczno-organizacyjne dotyczyły w głównej mierze działu produkcji roślinnej (owce, świnie), produkcji zwierzęcej (bydło mleczne) oraz ekonomiki i organizacji produkcji (świnie). W przypadku gospodarstw utrzymujących świnie odnotowano najwyższy odsetek zmian ogółem wprowadzonych w gospodarstwach.

W przypadku „innowacji” w produkcji roślinnej najwięcej działań dotyczyło wprowadzenia nowych maszyn i urządzeń do produkcji roślinnej (57 gospodarstw) oraz nowych środków ochrony roślin i nawozów (58 gospodarstw). Producenci rolni korzystają w głównej mierze z kredytów obrotowych kupując nowe środki ochrony i nawozy, gdyż zdają sobie sprawę, że ma to ogromny wpływ na plonowanie roślin (57 obiektów).

Rodzaj zmian związany z produkcją zwierzęcą w przypadku produkcji mleka dotyczył w głównej mierze poprawy dobrostanu zwierząt oraz wprowadzeniu zmian w żywieniu zwierząt poprzez zastosowanie nowych pasz treściwych i dodatków mineralnych. Powiększenie stada z własnej reprodukcji dotyczyło głównie produkcji owczarskiej.

W ekonomice i organizacji gospodarstw zmiany służyły zwiększeniu powierzchni gospodarstwa poprzez dzierżawę gruntów (39 gospodarstw) oraz zakupu ziemi (21 gospodarstw). Dzierżawą gruntów posiłowali się głównie producenci żywca wieprzowego.

Uwagę zwraca fakt, że objęci badaniami producenci jagnięciny w regionie Podlasia nie prowadzili w ogóle w gospodarstwie ewidencji kosztów i przychodów przy wykorzystaniu komputera, tak jak to miało miejsce w większości objętych badaniami gospodarstw.

Zauważyć można, iż w większości przypadków zmiany, które nie wymagały większych nakładów finansowych były inicjowane w większym zakresie.

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt Kierownik: dr hab. inż. Igor Z. Zubrzycki

Zadanie 01-18-01-21

Opracowanie i walidacja nowych metod identyfikacji zwierząt na podstawie markerów DNA

Kierownik zadania: dr hab. Anna Radko

Celem zadania było opracowanie testu DNA w oparciu o polimorfizm w obrębie genu MC1R u gatunku dzika i świni domowej, umożliwiającego identyfikację oraz różnicowanie osobników należących do rodziny świniowatych, a także doskonalenie metod badań rodowodowych koni i świń.

Zadanie obejmuje opracowanie uzupełniającego zestawu markerów STR, rekomendowanego przez ISAG do kontroli pochodzenia koni oraz opracowanie i zastosowanie metody analizy markerów mikrosatelitarnych DNA zalecanych przez ISAG do rutynowych badań rodowodowych świń.

W celu przeprowadzenia badań rozróżnienia świni domowej od dzika wykorzystano materiał genetyczny w postaci DNA wyizolowanego z tkanki ucha pobranej od 22 dzików z województw: opolskiego i śląskiego oraz z krwi od 66 świń 5 ras: polska biała zwisłoucha (pbz, n=14), wielka biała polska (wbp, n=13), złotnicka biała (złot, n=13), puławska (pul, n=10) i duroc (n=17).

Amplifikację fragmentu genu MC1R przeprowadzono przy użyciu sekwencji startowych: MC1R-F 5'-AGTGCCTGGAGGTGTCCATTCAC-3' i MC1R-R 5' CGTAGATGAGGGGGTCCAGGATAGA-3'. Produkt PCR poddano reakcji enzymatycznego trawienia z użyciem dwóch enzymów: BspHI i BstUI.

Zastosowana metoda wykazała, że obecność genotypu dzikiego (GG, E⁺/E⁺, 370nt) w próbkach rasy Duroc oraz obecność *allelu* A (c.370G>A) w pojedynczych próbach pochodzących od dzików świadczy, że analiza polimorfizmu genu MC1R nie pozwala na rozróżnienie świni domowej (*Sus scrofa domestica*) od dzika (*Sus scrofa scrofa*) w badanej populacji zwierząt.

Tab. 1. Polimorfizm fragmentu genu MC1R w badanych rasach świni domowej i dzika

Rasa	numer nukleotydu / numer sekwencji aminokwasu					
sekw. Ref.*	370	124	491	164	727/729	243
	GAC	Asp	GCG	Ala	GCA	Ala
dzik a)	GAC	Asp	GCG	Ala	GCG	Ala
dzik b)	AAC	Asn	GCG	Ala	GCG	Ala
złotnicka	AAC/GAC**	Asn	GCG	Ala	GCG	Ala
duroc	GAC/AAC**	Asp	GTG	Val	ACG	Thr
puławska	AAC	Asn	GCG	Ala	GCG	Ala
pbz	AAC	Asn	GCG	Ala	GCG	Ala
wbp	AAC	Asn	GCG	Ala	GCG	Ala

* NM_001008690

** występuje w formie homozygotycznej AA, GG i heterozygotycznej AG

Kolorem czerwonym zaznaczono mutacje zmiany sensu. Kolorem niebieskim zaznaczono mutację synonimiczną.

W ramach realizacji celu dotyczącego identyfikacji świń opracowano metodę analizy zestawu markerów mikrosatelitarnych rekomendowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) do kontroli pochodzenia świń: SW240, SW911, S0101, S0090, SW72, SW857, S0226, S0228, SW936, SW632, S0227, SW24, S0155, S0355. Poprawność opracowanej metody potwierdzono w międzynarodowym teście porównawczym organizowanym przez ISAG.

Zastosowanie metody pozwoliło na uzyskanie dobrej jakości produktów PCR i standaryzację *alleli* z poszczególnych *loci*. Opracowana technika analizy zestawu markerów posłużyła do rutynowych badań kontroli pochodzenia świń w Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB. Gromadzone w ramach badań rodowodowych dane wykorzystano do przeprowadzenia analiz statystycznych w celu określenia zmienności genetycznej badanych ras oraz oceny przydatności stosowanych markerów STR do weryfikacji rodowodów świń w Polsce.

W ramach analizowanej populacji liczącej 485 osobników, obejmującej rasy pbz (326 świń), wbp (93 osobniki) i rasy puławskiej (66 osobników) w 14 mikrosatelitarnych *loci* oznaczono 85 *alleli*. Na podstawie częstości występowania zidentyfikowanych *alleli* w poszczególnych *loci* oszacowano zmienność genetyczną badanych ras i różnice występujące między nimi oraz określono przydatność badanego zestawu STR do kontroli pochodzenia.

Przeprowadzona analiza markerów mikrosatelitarnych DNA wykazała, że markery te stanowią przydatne źródło do oceny struktury genetycznej badanych ras świń oraz do oceny przydatności wybranego zestawu STR do identyfikacji osobniczej i kontroli rodowodów.

Z analizy parametrów polimorfizmu H_o , H_e , PIC, PD oraz PE wynika, że u badanych ras w *loci* STR, zalecanych przez ISAG do kontroli pochodzenia występuje średni stopień zróżnicowania genetycznego, a u rasy puławskiej zaobserwowano ograniczoną zmienność aż w 50% badanych STR. Dlatego należy monitorować zmiany zachodzące u tych ras i przeprowadzić szersze badania na większej populacji świń w Polsce. Wydaje się również konieczne przygotowanie dodatkowego panelu markerów, który będzie można zastosować w tych przypadkach, w których zestaw rekomendowany przez ISAG byłby niewystarczający.

Zadanie 01-18-02-21

Charakterystyka metylomów tkanek i linii komórkowych gatunku *Equus caballus*

Kierownik zadania: dr hab. Tomasz Ząbek, prof. IZ PIB

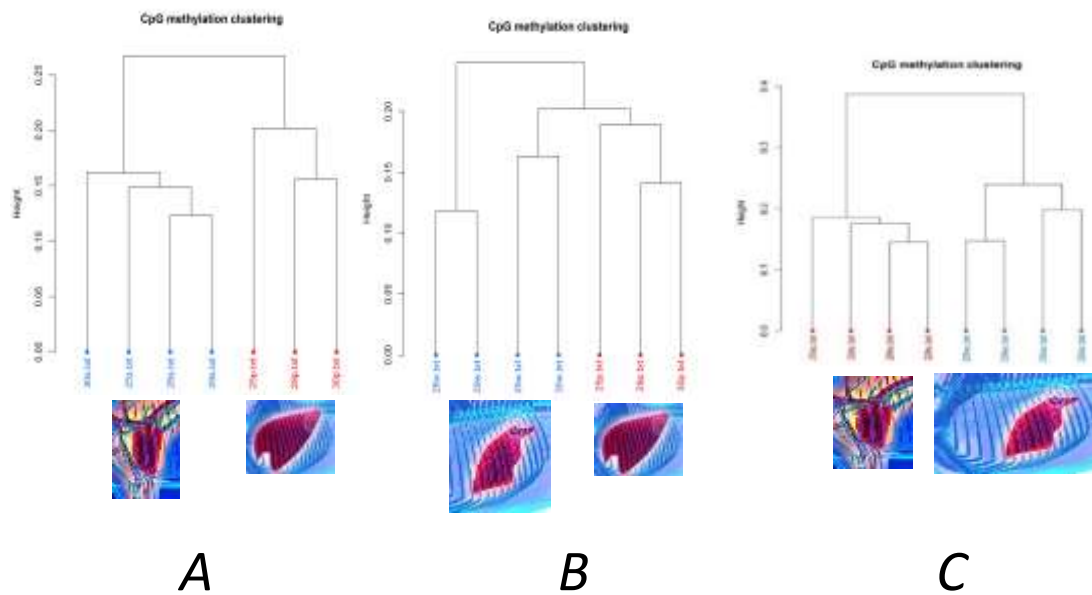
Metylacja materiału genetycznego, to chemiczna modyfikacja DNA, która ma znaczenie dla aktywności genów (metylacja DNA tzw. sekwencji regulatorowych blokuje ekspresję genów). Jest ona między innymi odpowiedzialna za prawidłowy przebieg rozwoju embrionalnego, a następnie za ustanowienie funkcjonalnych różnic na poziomie komórek i tkanek. Mechanizm, poprzez który komórki zarodka na wczesnych etapach embriogenezy nabywają cech totipotencjalnych (dających możliwość różnicowania w dowolny typ komórek i tkanek), polega na globalnym resecie wzorów metylacji genomu komórek zarodkowych, oddzielnie charakterystycznych dla genomu matczynego i ojcowskiego. Wyjątek stanowią geny piętnowane gametycznie, w przypadku których zostaje zachowany wzór monoallelicznej metylacji pochodzenia matczynego bądź ojcowskiego, blokując ich ekspresję na danym etapie rozwoju embrionalnego bądź ontogenezy.

Stworzenie mapy genomu z miejscami tkankowo-specyficznej metylacji DNA, zmieniającej aktywność genów w badanych tkankach, ułatwiłoby zrozumienie funkcji polimorficznych wariantów sekwencji DNA (obecnych w niekodujących regionach genomu), mających znaczenie dla różnorodności fenotypu cech użytkowych zwierząt hodowlanych.

Etap I: Analiza metylomów tkanek koni z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji.

Przedmiotem badań była identyfikacja różnic we wzorach metylacji DNA i ilości transkryptu w tkankach pochodzenia endodermalnego (wątroba i płuca) i mezodermalnego (mięsień sercowy) koni. Analiza metylacji w skali genomu (metoda RRBS) wykazała tkankowe różnice zgodne z pochodzeniem embrionalnym badanych tkanek (Rys. 1). Największe różnice pod względem stopnia metylacji DNA zaobserwowano pomiędzy tkankami pochodzącymi z różnych listków zarodkowych (wartość dystansu na poziomie 0,4 na Rys. 1 C).

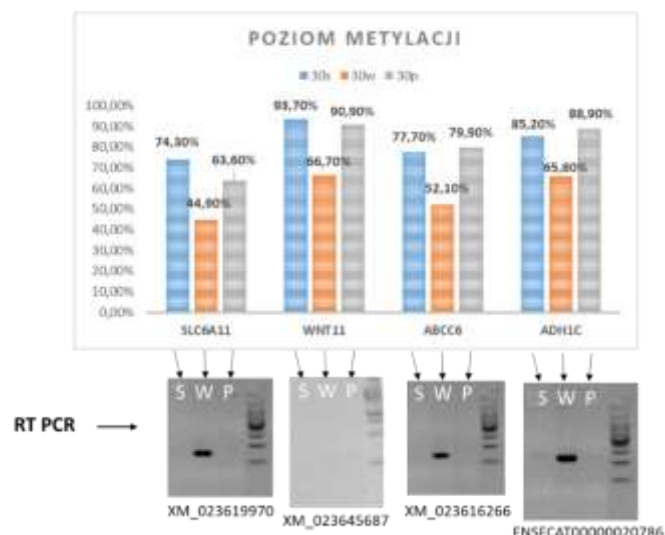
Analiza metylacji w skali genomu pozwoliła zidentyfikować 571 sekwencji DNA wykazujących tkankowo-specyficzną metylację DNA (sekwencje tDMR). 178 sekwencji tDMR było zlokalizowanych w regionach występowania 191 genów. Analiza funkcji genów związanych z sekwencjami tDMR w badanych tkankach, wskazała na ich znaczenie w ogólnych procesach biologicznych, zachodzących w całym organizmie. Na uwagę zasługują geny mające znaczenie dla własności regeneracyjnych komórek (*SSH1*, *EDNRB*) oraz funkcjonowania układu immunologicznego i krwionośnego (*PIAS4*, *IL10RA*, *VAV2*, *F2*, *EPHB2*, *PDGFRA*), a także geny mające znaczenie dla rozwoju unerwienia (neurogenezy) i przekazywania sygnałów komórkowych, w tym przekazywania bodźców nerwowych, które ma miejsce w wielu narządach i tkankach.



Rys. 1. Tkankowe różnice w metylacji DNA w skali genomu pomiędzy tkanką serca, wątroby i płuc

Analiza różnic w metylacji DNA na poziomie genomu pomiędzy tkankami o różnym pochodzeniu embrionalnym ujawniła również obecność genów wykazujących tkankowo-specyficzną ekspresję. Między innymi zaobserwowano związek pomiędzy obniżonym poziomem metylacji sekwencji tDMR z wyraźną obecnością mocnego produktu reakcji RT-PCR dla genów *SLC6A11*, *ABCC6* oraz *ADH1C*, w przypadku tkanki wątroby koni (Rys. 2). Uzyskany wynik wskazuje na znaczenie spadku metylacji (hypometylacji) zidentyfikowanych sekwencji tDMR dla aktywności tych trzech genów w wątrobie. Z kolei gen *WNT11* wydaje się być nieaktywny, bądź występuje w niewielkiej ilości transkryptu w badanym zestawie tkanek, mimo obecności obniżonej metylacji sekwencji tDMR (Rys. 2). Aktywność wymienionych genów w tkance wątroby jest zrozumiała z uwagi na znaczenie biologiczne kodowanych przez nie białek. Gen *ADH1C* koduje enzym odpowiedzialny za metabolizowanie alkoholu oraz innych szkodliwych substratów w wątrobie, analogicznie jak *SLC6A11*, którego produkt wchodzi w interakcje z aminokwasem (glutaminianem), podlegającym przemianom w wymienionym organie. Z kolei wyłączna obecność transkryptu *ABCC6* w tkance wątroby może mieć związek ze znaczeniem tego genu dla utrzymania prawidłowej struktury tzw. włókien elastynowych, ważnych dla funkcjonowania grupy organów tworzących układ pokarmowy.

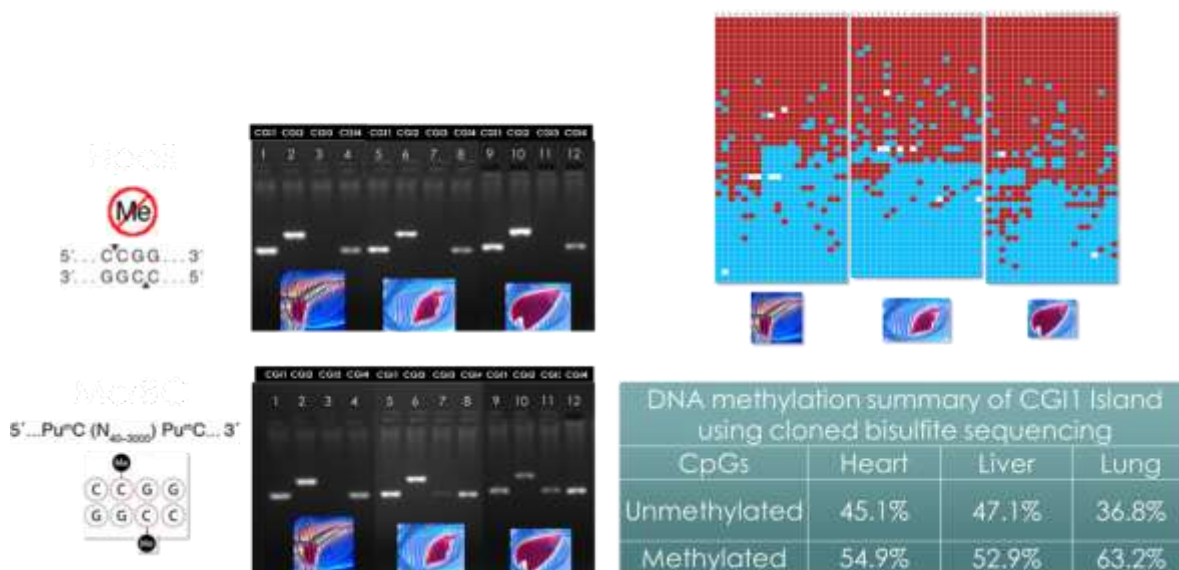
Wyjątkiem spośród badanych genów podlegających hypometylacji jest *WNT11* – kodujący jedno z wydzielniczych białek sygnałowych, które włączane są w procesy rozwojowe, odpowiadając za specjalizację komórek zarodka i wczesne etapy gastrulacji. Gen ten wydaje się być nieaktywny w badanych tkankach (brak widocznego produktu RT-PCR na Rys. 2), zawierając swoją funkcję do okresu embriogenezy.



Rys. 2. Wynik analizy metylacji metodą sekwencjonowania klonów produktu BSPCR oraz jakościowej analizy obecności produktu RT-PCR dla genu *SLC6A11*, *WNT11*, *ABCC6* oraz *ADH1C* w tkankach pochodzących od tego samego osobnika [S (mięsień sercowy), W (wątroba), P (płuco)]

Etap II: Charakterystyka miejsc monoallelicznej metylacji, które mają potencjalny związek ze zjawiskiem piętna gametycznego w genomie konia na przykładzie genu *GNAS*.

Wykonano izolację DNA i RNA z prób biologicznych, reprezentujących trzy tkanki pochodzące od czterech koni zimnokrwistych. Wyizolowane DNA poddano konwersji bisulfitowej i amplifikacji w regionie czterech wysp CpG genu *GNAS*, jako potencjalnego locus podlegającego piętnowaniu gametycznemu w genomie konia. Analiza metylacji fragmentów DNA reprezentujących wyspy CpG w locus *GNAS* (sekwencjonowanie klonów BSPCR oraz amplifikacja DNA trawionego enzymami wrażliwymi na metylację cytozyn – Rys. 3.) wykazała obecność hemimetylacji DNA (metylacji na poziomie 50%), mającej potencjalne znaczenie dla imprintingu gametycznego tego genu (Rys. 3).



Rys. 3. Analiza metylacji w locus *GNAS* w regionach czterech wysp CpG, zlokalizowanych powyżej tego genu

Wykonana w dalszej kolejności analiza sekwencji transkryptu cDNA wykazała obecność dwóch polimorficznych miejsc w sekwencji kodującej, które wykluczają obecność monoallelicznej ekspresji genu GNAS w tkankach dorosłych koni. Obecność genotypu heterozygotycznego A/G oraz C/T w sekwencji transkryptu genu GNAS w tkance serca, wątroby i płuc dorosłych koni wskazuje na bialleliczną ekspresję tego genu, nie współgrając z monoalleliczną metylacją sekwencji CpG powyżej locus GNAS (rys. 3). Uzyskany wynik wyklucza obecność efektu piętna gametycznego w locus GNAS w tkankach dorosłych koni, prawdopodobnie zawężając jego funkcję do początkowych etapów embriogenezy.

Wnioski

- Różnice metylomów analizowanych tkanek są zgodne z ich odmiennym pochodzeniem embrionalnym, wskazując na rolę tej modyfikacji chemicznej DNA w utrzymywaniu funkcjonalnej odrębności komórek i tkanek.
- Tkankowe różnice w metylacji DNA dotyczą genów zaangażowanych w szlaki molekularne charakterystyczne dla procesów biologicznych, w niewielkiej części powiązanych ze specyfiką tkankową.
- Analiza aktywności transkrypcyjnej genów związanych z występowaniem miejsc o różnicowej metylacji między tkankami pozwoliła wytypować loci podlegające tkankowo-specyficznej transkrypcji, które powiększają kolekcję genów regulowanych przez metylację DNA w genomie koni.
- Sekwencjonowanie produktów amplifikacji oraz analiza restrykcyjna trzech fragmentów DNA, pokrywających wyspy CpG powyżej locus GNAS, wykazały obecność złożonego wzoru metylacji DNA, który nie współgra z bialleliczną ekspresją GNAS w tkankach dorosłych koni.

Zadanie 01-18-03-21

Zastosowanie metod sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do identyfikacji genetycznego podłoża cech produkcyjnych świń

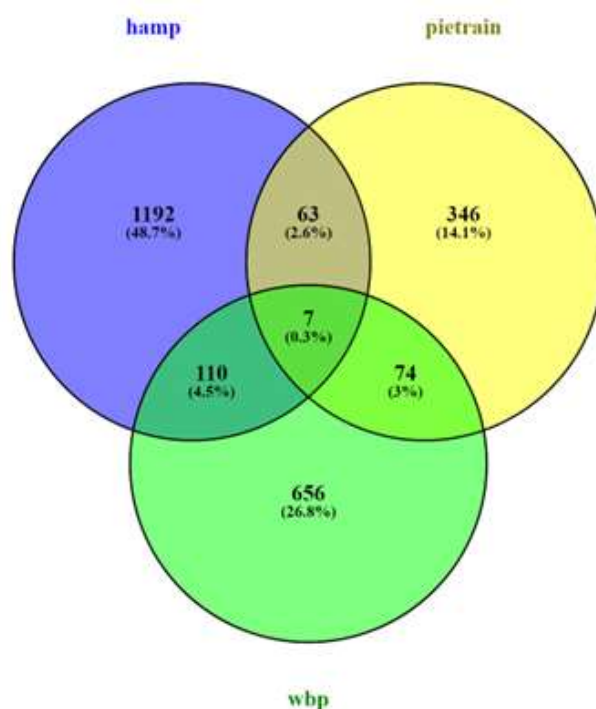
Kierownik zadania: dr hab. inż. Katarzyna Ropka-Molik

Celem zadania było poszukiwanie genetycznego podłoża cech produkcyjnych świń poprzez analizę ekspresji genów oraz mechanizmów ich regulacji.

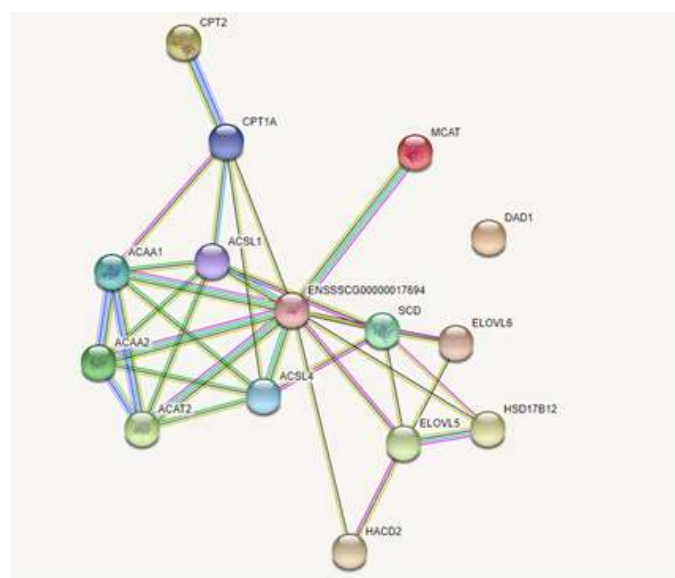
Planowane badania przeprowadzone zostały na materiale biologicznym pochodzącym od loch ras Pietrain, Hampshire i Wielkiej Białej Polskiej (wbp), pozyskany i zgromadzony w Zakładzie Hodowli Trzody Chlewnej Instytutu Zootechniki PIB. Dla każdego zwierzęcia poddanego ocenie na Stacji Kontroli Użytkowości Trzody Chlewnej (SKRUTCH) zebrano szereg cech rzeźnych i tucznych oraz cech jakości mięsa. Planowane cele szczegółowe obejmują kompleksową analizę transkryptomu, miRNA oraz degradomu w tkance mięśniowej oraz tłuszczowej pobranej od wszystkich analizowanych świń. Badania przeprowadzone zostaną z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS) na platformie HiScanSQ (Illumina). Uzyskane wyniki przeanalizowane zostaną pod kątem analizy ekspresji genów oraz miRNA, wariantów splicingowych, mutacji punktowych w regionach kodujących (cSNP) oraz identyfikacji potencjalnych genów docelowych dla miRNA.

W ramach pierwszego celu szczegółowego, obejmującego kompleksową analizę transkryptomu tkanki mięśniowej oraz tłuszczowej świń różnych ras, zidentyfikowano 627 (dla rasy Pietrain) i 416 (dla rasy Hampshire) genów o różnicowej ekspresji (DEGs) między grupami świń o różnym poziomie mięsności ($p < 0,05$). Analiza szlaków metabolicznych oraz procesów biologicznych potwierdziła, że wykryte geny uczestniczyły w regulacji procesów metabolicznych oraz we wzroście i rozwoju tkanki mięśniowej (PCOLCE, BBS2, TBX2, RBBP6; ATAF5).

Ponadto porównanie profilu transkryptomycznego tkanki tłuszczowej świń o różnym stopniu otluszczenia umożliwiło identyfikację 490 (dla rasy Pietrain), 1372 (dla rasy Hampshire) oraz 847 (dla rasy wbp) genów o różnicowej ekspresji (DEGs) między grupami świń o różnym poziomie tej cechy (Ryc. 1). Pośród najbardziej interesujących genów należących do powyższych szlaków znalazły się geny silnie związane z metabolizmem lipidów, takie jak *FASN* (kodyjący syntazę kwasów tłuszczowych), *ACACA1* oraz *ACACB* (acetylo-kokarboksylaza 1 oraz 2), *ACAA1* oraz *ACAA2* (cetyl-Coenzym A acyltransferase 1 oraz 2), *MCAT* (Transacylaza białka nośnikowego malonylo-CoA-acylowego) *ELOVL5* oraz *ELOVL6* (elongazy kwasów tłuszczowych 5 oraz 6) (Ryc. 2).



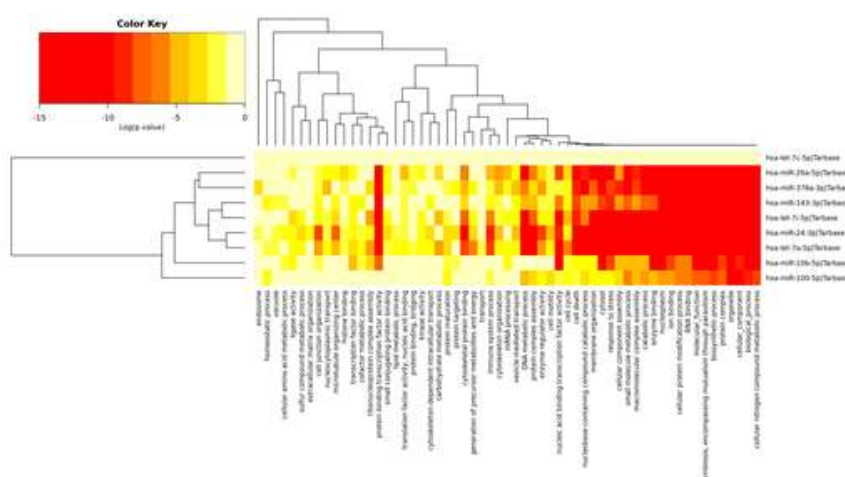
Ryc. 1. Ilości genów o różnicowej ekspresji wytypowanych w trzech badanych rasach pomiędzy zwierzętami o zróżnicowanym stopniu otluszczenia oraz 7 genów wytypowane w trzech rasach jednocześnie (oprogramowanie enny 2.1.0)



Ryc. 2. Zidentyfikowane geny o różnicowej ekspresji związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych (oprogramowanie - STRING: functional protein association networks, genom referencyjny Sus Scrofa 10.2)

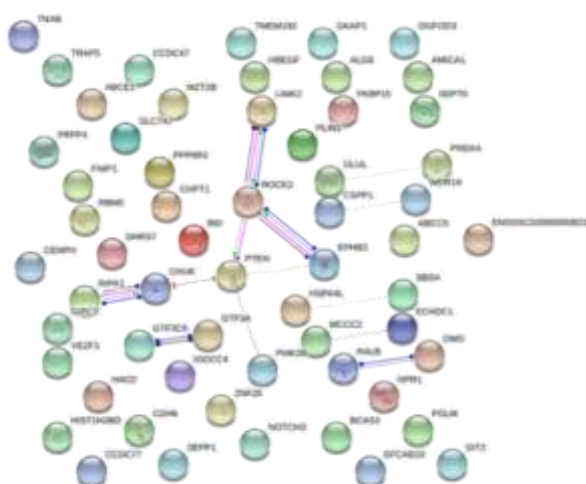
Do dalszego etapu wytypowano gen *SETD2* (metylotransferaza histonów) ora *TBX2* (T-box czynnik transkrypcyjny). W obrębie genu *SETD2* zidentyfikowano zmianę sensu ENSSCP00000012085.3: p.Thr165Ser – podstawienie tryptofanu przez serynę w pozycji 165 łańcucha aminokwasowego, natomiast w genie *TBX2* wykryto mutację ENSSCP00000021191.1:p.Ala644Val skutkującą podstawieniem Alaniny przez walinę w pozycji 644 łańcucha aminokwasowego. W przypadku analizy wpływu polimorfizmu w genie *SETD2* na cechy produkcyjne wykazano istotny związek badanej zmiany z wybranymi cechami tucznymi i rzeźnymi. Świnie homozygotyczne CC posiadały istotnie niższą masę szynki (kg) w stosunku do osobników heterozygotycznych. Z kolei, analiza wykonana dla genu *TBX2* wykazała jego istotny wpływ na cechy rzeźne: powierzchnię oka połędwicy (cm²); średnią grubość słoniny z 5 pomiarów (cm) oraz wydajnością rzeźną (%). Występowanie zależności pomiędzy polimorfizmami wytypowanych genów a cechami użytkowymi trzody chlewnej pozwoli na ewentualne zastosowanie markerów genetycznych w pracach selekcyjnych, co może prowadzić do poprawy wartości określonych cech ilościowych. Pozwoli to w przyszłości na doskonalenie metod selekcji, które mogą gwarantować uzyskanie większego postępu hodowlanego, w porównaniu z metodami dotychczas stosowanymi.

W ramach drugiego celu szczegółowego zidentyfikowano cząsteczki miRNA charakterystyczne dla tkanki mięśniowej i tłuszczowej świń, o potwierdzonym znaczeniu jako główne modulatory rozwoju mięśni (rodzina miR-30, miR-206, miR-26a i miR-133a) i tłuszczu (let-7a, miR-143, miR-24, miR-378) (Ryc. 3). Identyfikacja mikroRNA o różnicowej ekspresji pomiędzy osobnikami o skrajnych fenotypowo parametrach umięśnienia i otluszczenia pozwoliła wskazać ścieżki biologiczne i procesy kluczowe dla wzrostu mięśni, tłuszczu oraz ich funkcjonowania i metabolizmu. Identyfikacja miRNA wspólnych dla badanych ras sugeruje istnienie mechanizmów związanych z funkcjonowaniem tych tkanek u badanego gatunku, bez względu na rasę. Uzyskane wyniki, zarówno w zakresie pojedynczych mikroRNA, ich genów docelowych czy całych szlaków biologicznych stanowią nowe źródło i punkt wyjścia do poszukiwania czynników genetycznych związanych z procesami rozwoju i funkcjonowania tkanki mięśniowej i tłuszczowej świń, a co za tym idzie ważnych cech produkcyjnych. Niniejsze rezultaty wskazują zatem na mechanizmy molekularne leżące u podstaw funkcjonowania tkanki mięśniowej i tłuszczu u świń, podkreślając tym samym znaczenie i zasadność badań prowadzonych na zwierzętach gospodarskich, poszerzając stan dostępnej wiedzy oraz dając podstawy do dalszych badań.



Ryc. 3. Istotnie statystycznie szlaki GO wzbogacone w mikroRNA o różnicowej ekspresji zidentyfikowane w rasach Pietrain, Hampshire i WBP u osobników różniących się masą słoniny (DIANA-miRPath v3.0, DIANA-Lab, Ateny, Grecja)

W ramach trzeciego celu szczegółowego podjęto próbę eksperymentalnego potwierdzenia mechanizmów regulacji ekspresji przez miRNA oraz ewentualnie inne nieznanne dotąd procesy regulujące poziom transkryptu, mające podobny schemat degradacji cząsteczek mRNA w porównaniu do działania miRNA. W prowadzonych badaniach zaobserwowano wiele interesujących transkryptów które uległy rozpadowi w wyniku prawdopodobnie działania regulacji miRNA i które z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane są we wzrost i rozwój masy mięśniowej (Ryc. 4). Prowadzone badania dowodzą, że nie wszystkie zidentyfikowane miRNA dla badanych próbek związane są z rozkładem mRNA, ponieważ tylko dla około 25% zidentyfikowanych miRNA zaobserwowano degradację genów docelowych, co świadczy, że miRNA pełni rolę również na innych poziomach molekularnych wpływając na regulację ekspresji. Wiele genów, które uległy rozpadowi prawdopodobnie pod wpływem regulacji miRNA, była związana z regulacją cytoszkieletu aktyno-miozynowego w komórce. W poszczególnych badanych rasach zidentyfikowano tylko kilka zdegradowanych pod regulację miRNA genów wspólnych, co może świadczyć o innych ścieżkach regulujących procesy wzrostu tkanki mięśniowej.



Ryc. 4. Zależności pomiędzy białkami, dla których zidentyfikowano zdegradowane fragmenty transkryptów w tkance mięśniowej rozłożone w wyniku działania miRNA dla osobników o niskim poziomie mięsności

Uzyskane profile ekspresji genów w skali całego transkryptomu tkanki mięśniowej świń zostały zgłoszone do międzynarodowej bazy danych GEO – Gene Expression Omnibus NCBI i uzyskały numer akcesyjny (GSE107207; GSE109215; GSE122816).

Zadanie 04-18-01-21

Walidacja wyników ukierunkowanego sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem badań asocjacyjnych

Kierownik zadania: dr inż. Katarzyna Piórkowska

Celem badań jest ocena przydatności i walidacja wyników uzyskanych na drodze ukierunkowanego sekwencjonowania następnej generacji do typowania genów kandydujących oraz markerów selekcyjnych dla różnych cech użytkowych trzody chlewnej. Walidacja przeprowadzona jest z wykorzystaniem badań asocjacyjnych z uwzględnieniem pięciu polskich ras świń. Przeprowadzenie badań asocjacyjnych z wykorzystaniem analiz statystycznych pozwoli wyłonić potencjalne markery genetyczne dla cech użytkowych świń, co będzie można wykorzystać podczas prowadzonych prac hodowlanych w celu poprawy

wybranej cechy produkcyjnej. Umożliwi to redukcję kosztów prowadzonych prac selekcyjnych, ponieważ wykluczy z hodowli zwierzęta posiadające niekorzystne *allele*, co przyspieszy postęp hodowlany.

Założenia metodyczne

Wyniki ukierunkowanego sekwencjonowania DNA uzyskane w oparciu o technologię sekwencjonowania następnej generacji (NGS) walidowane są z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania metodą Sanger'a. Funkcjonalne zmian polimorficznych, tj. wpływające na sekwencje aminokwasową, bądź regulujące ekspresję genów są genotypowane z wykorzystaniem takich metod z zakresu biologii molekularnej jak PCR-RFLP oraz technika High Resolution Melting (HRM) wykorzystująca właściwości krzywych topnienia produktów PCR oraz wyznaczana jest dla nich frekwencja w badanych populacjach trzody chlewnej. Kolejno prowadzona jest analiza statystyczna umożliwiająca ocenę wpływu zidentyfikowanych mutacji na cechy użytkowe świń.

Syntetyczny opis wyników zadania

Mutacje zidentyfikowane w regionie chromosomu 15. świń bogatego w QTLs zostały przeanalizowane z wykorzystaniem testu LRT oraz χ^2 , wyznaczone pięć mutacji występujących w genach, które kodują białka potencjalnie związane z kształtowaniem fenotypu trzody chlewnej, tj. w genach *TNS1*, *TNP1*, *VIL1*, *ENSSSCG00000033265* (*lincRNA*) oraz *OBSL1*. Kolejno, z wykorzystaniem badań asocjacyjnych przeprowadzono ocenę ich wpływu na cechy produkcyjne świń, uwzględniając w badaniach pięć ras świń: Polska Biała Zwistoucha, Wielka Biała Polska, Puławska, Duroc oraz Pietrain (po około 100 szt. w każdej z ras). W genie *TNS1* kodującym tensynę 1 analizie poddana została jedna mutacja zmieniająca sens aminokwasowy *ENSSSCP00000026158.3:p.Ala495Thr* w pierwszym egzonie. Tensyna 1 jest zaangażowana w sieciowanie filamentów aktynowych w komórce, ponadto zawiera domenę SH2, która jest związana z transdukcją sygnału (Huaiyang et al. 2000). Następnie, w regionie powyżej genu *TNP1* oraz poniżej sekwencji *miscRNA* (*ENSSSCG00000040247*) zidentyfikowana została delekcja 16 nukleotydowa, którą także ze względu na możliwe funkcje regulacyjne poddano badaniom asocjacyjnym i ocenie wpływu na cechy produkcyjne u trzody chlewnej. Białko *TNP*, choć głównie badane w kontekście męskiej niepłodności, jednak wykazano także, że jego ekspresją w mięśniach była negatywnie skorelowana z poziomem trójglicerydów, co może mieć związek z jakością mięsa (Stewart et al. 2010). W genie *VIL1*, kodującym wilinę 1 analizie poddano mutację mającą wpływ na zmianę sekwencji aminokwasowej, mutacja ta występowała w sekwencji kodującej domenę genzolinową oraz wilinową. Wilina należy do rodziny białek regulowanych wapniem wiążących aktynę, odgrywa ona istotną rolę w nadawaniu odpowiedniego kształtu włóknom aktynowym (Tomar et al. 2009). Ostatnim genem zlokalizowanym w regionie chromosomu 15., w którym wyznaczono wiele QTLs, wziętym pod uwagę przy analizie jego wpływu na cechy produkcyjne świń był gen *OBSL1*. Badana mutacja wpływała na zmianę sensu sekwencji aminokwasowej, powodowała zamianę alaninę na serynę w pozycji 1785, sekwencji kodującej immunoglobulinopodobną domenę. Białko obskurno podobne 1 (*OBSL1*) należy do adaptorów białkowych odgrywających ważną funkcję w łączeniu cytoszkieletu komórkowego błoną komórkową (Pernigo et al. 2010).

Tab. 1. Wyniki testu LRT opisanego w publikacji (Stuczyńska i wsp. 2018), w oparciu o który wyznaczono geny oraz mutacje poddane dalszej analizie w badaniach asocjacyjnych

ID mutacji	Gen	P-value										
		AS	ADG	DFI	LEA	WE	FCL	TCL	WL	BF	WH	MP
rs693217735	<i>ENSSSCG00000033265</i> (<i>lincRNA</i>)	0.012	0.018	0.05	0.003	0.02	0.02	0.03				
rs790770289	<i>TNP1</i> - <i>ENSSSCG00000040247</i>	0.009	0.001	0.01	0.002	0.001		0.003	0.04	0.03		
rs332253419	<i>VIL1</i>		0.01	0.0003		0.008	0.006	0.006	0.04		0.03	
rs344208061	<i>ENSSSCG00000027669</i> (<i>TNS1</i>)	0.006	0.0004	0.009	0.01	0.0006	0.002	0.004	0.04	0.01		0.04
rs332398561	<i>OBSL1</i>			0.01		0.03	0.03	0.02				

AS – Age of slaughtering (wiek uboju), ADG – average daily gain (średni przyrost dzienny), DFI – daily feed intake (dzienny pobór paszy), LEA lion eye area (powierzchnia oka polędwicy), WE – water exudation (wyciek wodny z mięsa surowego), FCL – firmness cooked loin (kruchość gotowanej polędwicy), TCL – toughness cooked loin (twardość gotowanej polędwicy), WL – loin weight (waga polędwicy), BF – back fat thickness (grubość słoniny), MP – meat percentage (procentowy udział mięsa w tuszy).

Tab. 2. Mutacje wybrane do analizy asocjacyjnej

ID Number	Pozycja na SSC15	Allel referencyjny	Allel zmieniony	Lokalizacja w genie lub wpływ na białko	Gen
rs693217735	11963524-11963524	INS 31bp	-	Intron variant	<i>ENSSSCG00000033265</i> (<i>lincRNA</i>)
rs790770289	11933232-11933237	INS 16 bp	-	Intergenic region	<i>TNP1</i> - <i>ENSSSCG00000040247</i>
rs332253419	12047696	A	T	Missense variant	<i>VIL1</i>
rs344208061	11999711	C	T	Missense variant	<i>ENSSSCG00000027669</i> (<i>TNS1</i>)
rs332398561	12156143	C	A	Missense variant	<i>OBSL1</i>

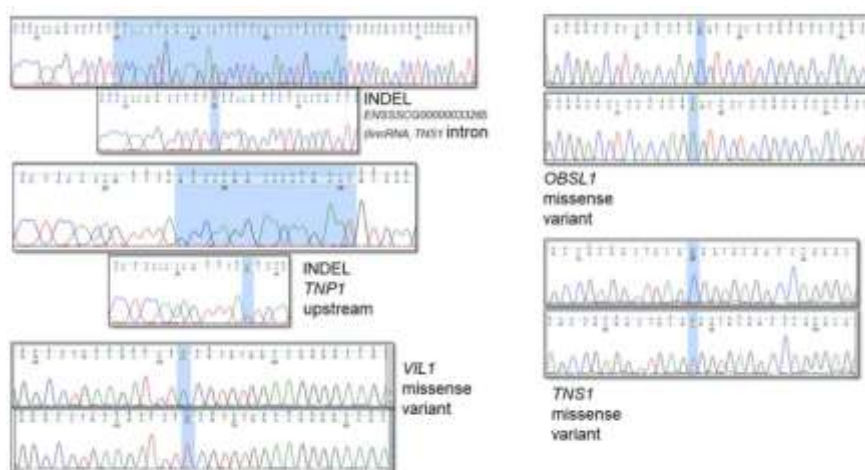


Fig. 1. Chromatogramy wygenerowane podczas sekwencjonowania fragmentów genów zawierających analizowane mutacje

Zadanie 04-18-02-11

Identyfikacja DNA przeżuwaczy w paszach metodą SOP EURL-AP

Kierownik zadania: dr Małgorzata Natonek-Wiśniewska

Celem zadania była kalibracja oraz walidacja metody identyfikacji komponentów zwierzęcych pochodzących od przeżuwaczy metodą zalecaną przez EURL-AP (European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs) w zróżnicowanych matrycach, będących składnikami karm dla zwierząt.

Badania obejmowały:

- kalibrację metody,
- sprawdzenie oraz walidację metody
- udział w teście biegłości
- omówienie uzyskanych wyników badań.

Kalibracja metody

Kalibrację plazmidem DNA wykonano w celu dostosowania metody do aparatu Real-time (StepOne Plus), na którym standardowo będzie wykonywana analiza oznaczania DNA przeżuwaczy. Działania takie miały zadanie ustalenia linii odcięcia C_T , czyli wartości granicznej, rozróżniającej wyniki dodatnie od ujemnych. Badanie wykonano w czterech powtórzeniach, a następnie stosując formularz autorstwa EURL-AP wyznaczono cykl graniczny między próbkami dodatnimi oraz negatywnymi. Fot. 1. przedstawia wykres amplifikacji i ułożenie próbek na płytce (A) oraz program umożliwiający wyznaczenie cyklu granicznego między próbkami pozytywnymi i negatywnymi (B).

Cykl graniczny wyznaczono na 33,8089 cyklu. Wszystkie próbki, których wartości C_t , czyli przecięcie prostej trescholdu z wykresem amplifikacji były niższe od podanej wartości, zostają określone jako zawierające DNA przeżuwaczy, natomiast o wartościach wyższych jako nie zawierające DNA tych gatunków.

Sprawdzenie oraz walidacja metody

Wyekstrahowano DNA z próbek referencyjnych o składzie gwarantowanym przez producenta (RM) oraz próbek o znanym składzie wyprodukowanych przez Laboratorium (RMW) (Tab. 1) o znanym składzie gatunkowym przy pomocy zestawu do izolacji DNA z żywności (Wizard), również rekomendowanego przez EURL-AP. Otrzymane DNA poddano reakcji Real-Time PCR używając starterów kompatybilnych do sekwencji flankującej region specyficzny gatunkowo dla przeżuwaczy oraz sondę kompatybilną z DNA tej grupy zwierząt. Wszystkie próbki analizowano w dwukrotnych powtórzeniach izolacji DNA. Każdy izolat DNA analizowano dodatkowo przy 10-krotnym rozcieńczeniu.

Na podstawie wartości progowej wyznaczonej podczas kalibracji określono próbki, w których znajduje się DNA przeżuwaczy. Reakcje pozytywne otrzymano dla DNA przeżuwaczy (Tab. 1), zaś dla pozostałych gatunków reakcja zachodziła zawsze powyżej cyklu granicznego.

Dla próbek dodatnich - w przypadku rozcieńczeń DNA - miejsce odcięcia thresholdu często przesunęło się o około 3 cykle, natomiast dla próbek negatywnych prawidłowość ta nie jest już taka oczywista.

Na podstawie próbek referencyjnych wyznaczono specyficzność, dokładność, czułość, wskaźnik wyników pozytywnych.

Wyznaczone wielkości specyficzności (S), dokładności (D), czułości (C) oraz wyników fałszywie pozytywnych (%FP) przyjmowały wartość: S=100%; D=100%; C=100%; %FP=0%.

Na podstawie próbek o zawartości DNA 10, 100 i 1000 razy mniejszej od próbek wyjściowych oznaczono granice wykrywalności LOD oraz wskaźnik wyników fałszywie negatywnych na tej granicy. Wielkości te przyjęły wartości: LOD=0,0002%; %FN=0%.

Udział w teście biegłości

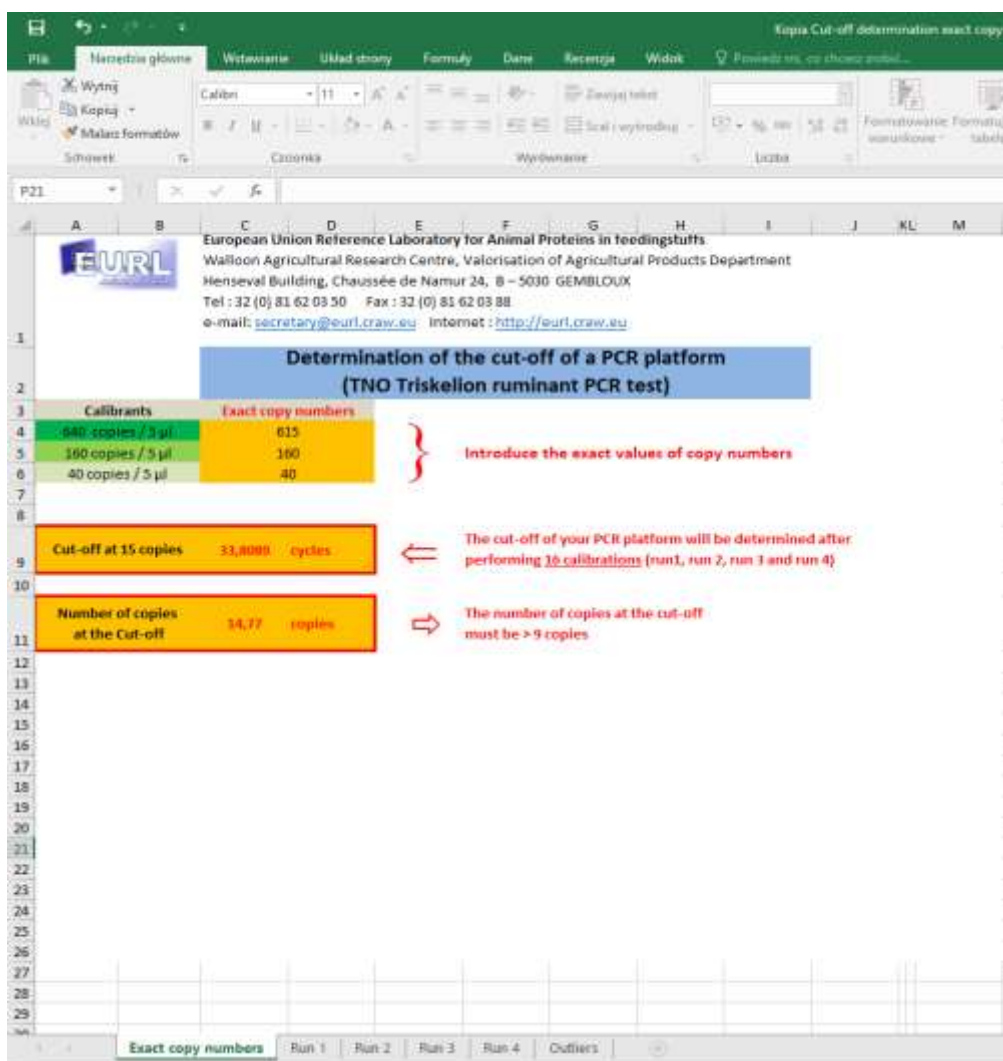
Opracowaną metodę wykorzystano w teście biegłości organizowanym przez Animal and Plant Health Agency (APHA) W ramach testu określono potencjalną zawartość DNA przeżuwaczy dla 5 próbek. Wszystkie próbki oznaczono prawidłowo. Dokładność analizy wynosiła 100%

Wnioski

1. Wynik kalibracji wskazuje, że rozgraniczenie pomiędzy próbkami pozytywnymi a negatywnymi przebiega w 33. cyklu ($cT=33,8$). Na podstawie tej wartości określono w których badanych próbkach znajduje się DNA przeżuwaczy. Wyniki, w postaci wartości progowych amplifikacji, względnego odchylenia standardowego oraz określenia występowania w próbce DNA przeżuwaczy, zebrano w Tab. 1. Ilość kopii dla cut-off wynosiła 14,77.
2. Metoda jest bardzo czuła; umożliwia identyfikację przetworzonego materiału w ilości $< 0,1\%$.
3. Metoda ta jest w 100% specyficzna gatunkowo.
4. Metodę przygotowano do akredytacji PCA.



Rys. 1. Wykres amplifikacji plazmidu. Zobrazowanie ułożenia próbek plazmidu na płycie



Rys. 2. Zrzut ekranu przedstawiający aplikację umożliwiającą obliczenie wartości cyklu różnicującej próbki pozytywne od negatywnych

Tab. 1. Wynik badania próbek RM i RMW

Rodzaj próbki	Nazwa próbki	C _T	Wynik	Wniosek
RM	bov 0,2%	21,793957	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,2% 1	21,80917	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,2% 1:10	24,877621	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,2% 1 1:10	24,124529	+	DNA przeżuwacza
RM	ovis 0.2	25,460754	+	DNA przeżuwacza
RM	ovis 0.2 1:10	28,006493	+	
RM	17/7728 bov	21,879179	+	
RM	7730 sus	35,977341	-	
RM	7730 1:10 sus	38,337921	-	
RM	gall 100%	37,023163	-	
RM	gall 100% 1:10	38,580799	-	
RM	RM neg	37,12204	-	
RM	RM neg 1:10	37,826748	-	
RMW	100% BOV MIESO	14,082058	+	DNA przeżuwacza
RMW	100% BOV MIESO 1:10	16,293495	+	DNA przeżuwacza
RMW	100% BOV MIESO 1:10	16,213453	+	DNA przeżuwacza
RMW	PLAZMA B	34,536671	-	
RMW	PLAZMA B 1:10	35,81321	-	
RMW	PLAZMA DROB	33,928441	-	
RMW	PLAZMA DROB 1:10	36,678783	-	
RM	sus 0,2%	34,68	-	
RM	sus 0,2% rozc	34,37	-	
RM	bov 0,2%	21,78	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,2% rozc	24,69	+	DNA przeżuwacza
RM	ovis 0,2%	21,01	+	DNA przeżuwacza
RM	ovis 0,2% rozc	24,46	+	DNA przeżuwacza
RM	sus 0,2%	36,27	-	
RM	sus 0,2% rozc	33,99	-	
RM	KN pasza	36,93	-	
RM	KN pasza rozc	33,96	-	
RM	KN pasza 1	35,65	-	
RMW	KP izol bov/ovis 0.1%	25,06	+	DNA przeżuwacza
RMW	DNA przeżuwaczy	22,25	+	DNA przeżuwacza
RMW	mięso bov 5ng DNA	13,179723	+	DNA przeżuwacza
RMW	mięso bov 2,5ng DNA	13,958254	+	DNA przeżuwacza
RMW	mięso ovis 5ng DNA	13,491031	+	DNA przeżuwacza
RMW	mięso ovis 2,5ng DNA	14,113948	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,2%	23,698225	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,02%	23,778664	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,002%	24,21492	+	DNA przeżuwacza
RM	bov 0,0002%	26,133232	+	DNA przeżuwacza

Zadanie 04-18-04-11

Wyznaczanie markerów mtDNA charakterystycznych dla owadów wykorzystywanych jako źródło białka w żywieniu zwierząt monogastrycznych

Kierownik zadania: dr Małgorzata Natonek-Wiśniewska

Celem badań było opracowanie czułej i specyficznej metody jakościowego oznaczania surowych i zliofilizowanych owadów.

Materiał i metody

- a) Materiał doświadczalny: mączniki, świerszcze, szarańcza, mięsa bydlęcego, wieprzowego, kurzego, indyjskiego, ryby, cytryny, banana, muchy, złotooka, pomidora, ziarna.
- b) Układ doświadczenia.

1. Opracowanie metody identyfikacji DNA mączników reakcją real-time PCR wykorzystującą startery specyficzne gatunkowo dla mączników oraz sondę Tamra.
2. Walidacja metody.

Badania obejmowały:

- wykonanie izolacji DNA zestawem Sherlock (A&A Biotechnology) wg zmodyfikowanej metodyki,
- reakcję real-time PCR,
- określenie linii odcięcia i wyznaczenie wartości ct,
- ustalenie granicy wykrywalności czyli najmniejszej ilości produktu reakcji możliwej do identyfikacji daną metodą,
- specyficzność biologiczną czyli zgodność wyniku negatywnego z rzeczywistością,
- czułość czyli zgodność wyniku pozytywnego z rzeczywistością,
- wskaźnik wyników fałszywie pozytywnych czyli udział wyników fałszywie określonych jako pozytywne,
- wskaźnik wyników fałszywie negatywnych (dla granicy wykrywalności) czyli udział wyników fałszywie negatywnych dla analizy ilości produktu równej granicy wykrywalności.

Parametry te miały wartości liczbowe wyznaczone ze wzorów:

specyficzność

$$S = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\%$$

dokładność metody

$$D = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100\%$$

czułość metody

$$C = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%$$

wskaźnik wyników fałszywie pozytywnych

$$\%FP = \frac{FP}{TN + FP} \times 100\%$$

wskaźnik wyników fałszywie negatywnych
(dla granicy wykrywalności)

$$\%FN = \frac{FN}{TP + FN} \times 100\%$$

gdzie TN oznacza ilość wyników prawdziwie negatywnych, TP – prawdziwie pozytywnych, FP – fałszywie pozytywnych, FN – fałszywie negatywnych.

Omówienie uzyskanych wyników badań w etapie sprawozdawczym

Tabele 1-3 przedstawiają wyniki, które wskazują na to, że reakcje pozytywne uzyskano jedynie dla DNA pochodzącego od mączników. Dla pozostałych gatunków nie uzyskano produktu reakcji (Tab. 1 i 2).

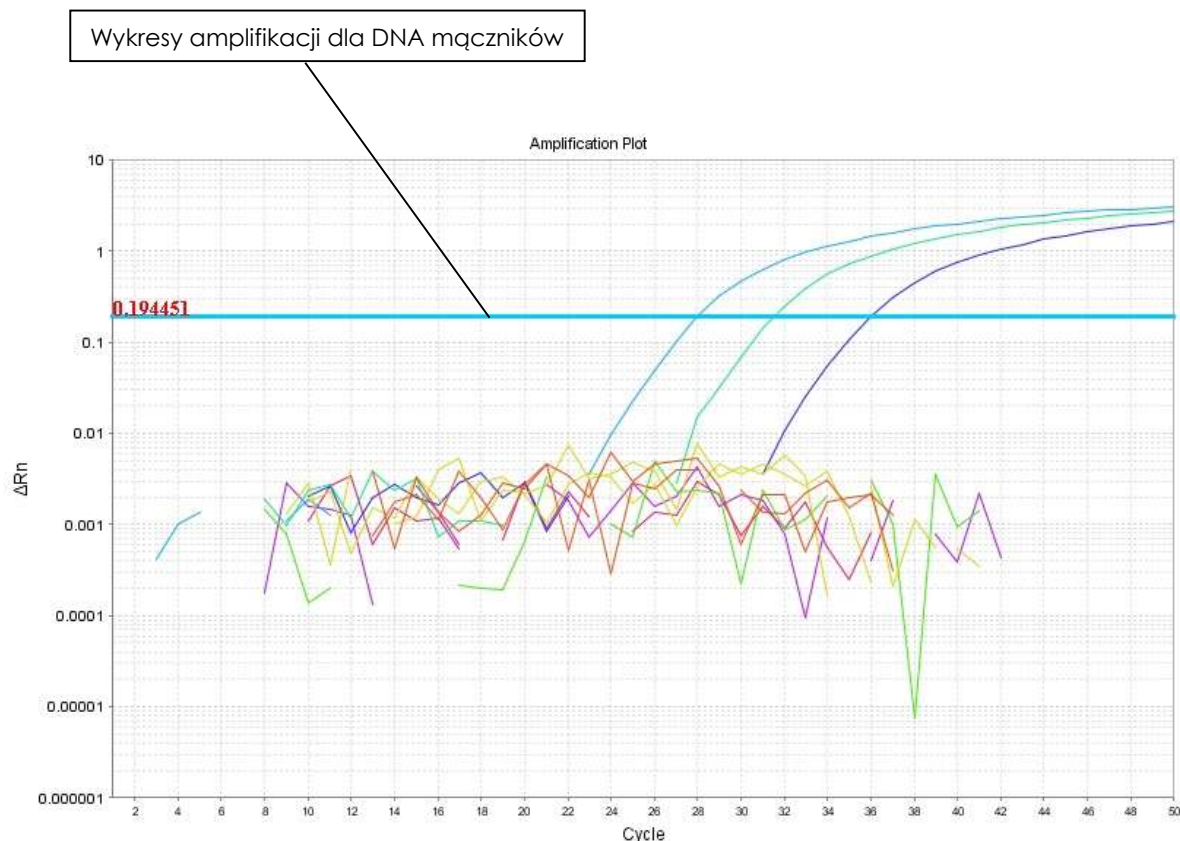
Rysunek 1. obrazuje Tab. 1 i przedstawia przykładowy wykres amplifikacji. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono specyficzność, dokładność, czułość, wskaźnik wyników pozytywnych.

Wyznaczone wielkości przyjmowały wartość: S=100%; D=100%; C=100%; %FP=0%; LOD=0,1%; %FN=0%.

Wartości C_T dla mączników są zróżnicowane, dla 100% próbek uzyskano wartości od 25,90 do 38,95 (Tab. 3). Duży zakres wyników powoduje, że do oznaczanie ilościowego należy zastosować krzywą standardową złożoną z dużej ilości mączników, aby krzywa była obciążona jak najmniejszym błędem.

Wnioski

1. Metoda jest specyficzna biologicznie,
2. Metoda jest bardzo czuła; umożliwia identyfikację przetworzonego materiału w ilości 0,1%.



Tab. 1. Specyficzność biologiczna

Próbka	Rodzaj próbki	C _T	C _T Mean
Woda	NTC	Undetermined	
Woda	NTC	Undetermined	
woda	NTC	Undetermined	
1- swierszcz samica	UNKNOWN	Undetermined	
2- swierszcz samiec	UNKNOWN	Undetermined	
mącznik 1	UNKNOWN	31,507198	31,507198
mącznik 5	UNKNOWN	27,989067	27,989067
mącznik 6	UNKNOWN	35,969166	35,969166
szarańcza 1	UNKNOWN	Undetermined	
szarańcza 2	UNKNOWN	Undetermined	

C_T – cykl w którym występuje przecięcie linii threshold z wykresem amplifikacji

C_T Mean – średnia wartość przecięcia threshold z wykresem amplifikacji

NTC – negatywna kontrola amplifikacji

Tab. 2. Specyficzność biologiczna i granica wykrywalności

Próbka	Task	C _T	C _T Mean
Woda	NTC	Undetermined	
Woda	NTC	Undetermined	
woda	NTC	Undetermined	
bov/sus	UNKNOWN	Undetermined	
bov/sus	UNKNOWN	Undetermined	
cytryna/banan	UNKNOWN	Undetermined	
cytryna/banan	UNKNOWN	Undetermined	
indyk/kura	UNKNOWN	Undetermined	
indyk/kura	UNKNOWN	Undetermined	
mucha/zotook	UNKNOWN	Undetermined	
mucha/zotook	UNKNOWN	Undetermined	
pomidor	UNKNOWN	Undetermined	
pomidor	UNKNOWN	Undetermined	
ryba	UNKNOWN	Undetermined	
ryba	UNKNOWN	Undetermined	
ziarno	UNKNOWN	Undetermined	
ziarno	UNKNOWN	Undetermined	
mącznik 25 ng	UNKNOWN	31,38	31,46
mącznik 25 ng	UNKNOWN	27,96	31,46
mącznik 25 ng	UNKNOWN	35,05	31,46
mącznik 10 ng	UNKNOWN	32,89	32,64
mącznik 10 ng	UNKNOWN	29,21	32,64
mącznik 10 ng	UNKNOWN	35,83	32,64
mącznik 1 ng	UNKNOWN	38,76	35,95
mącznik 1 ng	UNKNOWN	36,56	35,95
mącznik 1 ng	UNKNOWN	32,52	35,95
mącznik 0.1 ng	UNKNOWN	Undetermined	39,48
mącznik 0.1 ng	UNKNOWN	36,00	39,48
mącznik 0.1 ng	UNKNOWN	42,96	39,48
mącznik 0.025 ng	UNKNOWN	39,63	38,81
mącznik 0.025 ng	UNKNOWN	37,99	38,81
mącznik 0.025 ng	UNKNOWN	Undetermined	38,81

C_T – cykl, w którym występuje przecięcie linii threshold z wykresem amplifikacji

C_T Mean – średnia wartość przecięcia threshold z wykresem amplifikacji

NTC – negatywna kontrola amplifikacji

Tab. 3. Zakres amplifikacji dla 100% próbek mącznika

Target Name	Task	C _T	C _T Mean	C _T SD	Min C _T	Max C _T
woda	NTC	Undetermined				
woda	NTC	Undetermined				
woda	NTC	Undetermined				
mącznik	UNKNOWN	26,15	32,48	3,79	25,90	38,95
mącznik	UNKNOWN	33,29	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	36,24	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	38,71	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	25,97	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,22	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	36,05	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	38,30	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	25,90	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,13	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	31,80	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	38,95	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,45	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,09	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	31,70	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,41	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	32,48	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	31,82	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	29,47	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	32,45	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	35,26	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	33,23	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	32,40	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	35,46	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	33,35	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	36,54	32,48	3,79		
mącznik	UNKNOWN	35,22	32,48	3,79		

C_T – cykl, w którym występuje przecięcie linii thresholdu z wykresem amplifikacji

C_T Mean – średnia wartość przecięcia thresholdu z wykresem amplifikacji

C_T SD – odchylenie standardowe C_T

Min C_T (Max C_T min) maks. wartość przecięcia linii thresholdu z wykresem amplifikacji

NTC – negatywna kontrola amplifikacji

Zadanie 04-18-05-11

Markery genetyczne przydatne w selekcji ukierunkowanej na doskonalenie mięsności gęsi

Kierownik zadania: dr hab. Anna Kozubska-Sobocińska, prof. IZ PIB

Celem zadania jest identyfikacja polimorfizmów wybranych genów (*GH*, *GHR*, *IGF-I*, *MYOD1*, *MYOG*, *MSTN*, *MEF2* i *CAST*) u gęsi objętych programem ochrony zasobów genetycznych oraz określenie ich związku z cechami użytkowości mięsnej (wyrażonej: masą ciała, głębokością mięśnia klatki piersiowej, długością grzebienia mostka, długością przedramienia oraz tempem przyrostu masy ciała w 8., 12. oraz 95. tygodniu życia).

Planowane efekty naukowe:

- poznanie fragmentów sekwencji nukleotydowej wybranych genów i określenie przydatności zidentyfikowanych polimorfizmów SNP jako markerów DNA w selekcji ukierunkowanej na doskonalenie mięsności gęsi.
- ocena zróżnicowania genetycznego badanych ras gęsi uwzględniająca częstość genotypów i częstość *alleli*.
- zastosowanie opracowanych markerów do charakterystyki genetycznej Gęsi Białych Kołudzkich® – rasy będącej efektem selekcji w kierunku doskonalenia cech mięsnych.

Planowane efekty praktyczne:

- identyfikacja osobników pod kątem najbardziej pożądaných genotypów w badanych *loci*.
- opracowanie markerów genetycznych przydatnych w selekcji ukierunkowanej na cechy mięsności gęsi.
- weryfikacja uniwersalności ustalonych markerów w odniesieniu do gatunku, na podstawie charakterystyki genetycznej Gęsi Białych Kołudzkich® (ród W33).

W okresie sprawozdawczym przedmiotem badań było:

- zestawienie grup doświadczalnych zgodnie z założeniami przewidzianymi w metodyce zadania,
- przeprowadzenie pomiarów wybranych cech mięsności gęsi kieleckich (Ki) i Landes (LsD-01) i Gęsi Białych Kołudzkich®,
- pobranie materiału do badań molekularnych (pióra – od gęsi kieleckich (Ki), Landes (LsD-01) i Gęsi Białych Kołudzkich®,
- opracowanie metod izolacji DNA i warunków reakcji PCR,
- sekwencjonowanie wybranych genów.

W pierwszym etapie realizacji zadania, do badań wybrano dwie rasy: gęsi kieleckie oraz Landes – znacznie różniące się parametrami umięśnienia i masą ciała, o dużej zmienności wewnątrz rasowej tych cech oraz trzecią rasę Gęsi Białych Kołudzkich® doskonalonych w kierunku cech mięsności. Zestawiono sześć grup doświadczalnych z rozróżnieniem uwzględniającym czynnik płci (Tab. 1).

Tab. 1. Zestawienie grup doświadczalnych rocznych gęsi z uwzględnieniem rasy i płci

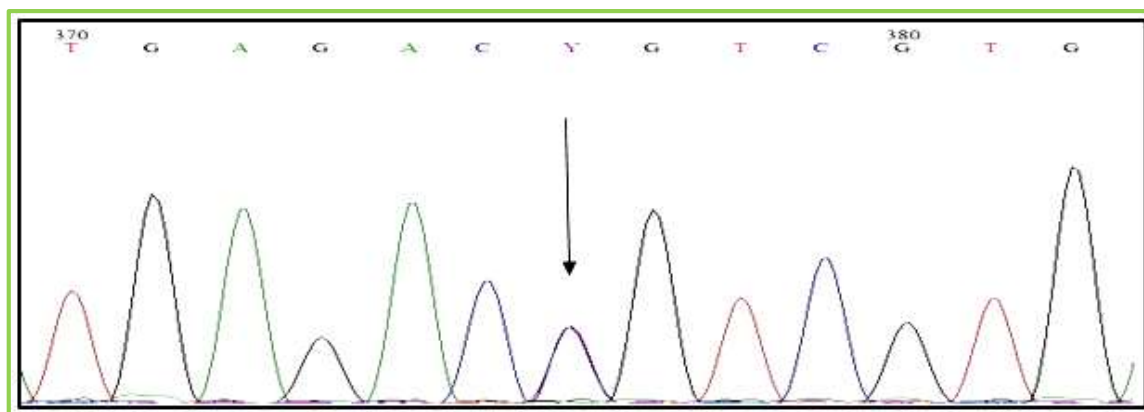
Rasa	Liczba ptaków	Samice	Samce
Gęsi kieleckie	129	98	31
Gęsi Landes	142	92	50
Gęsi Białych Kołudzkich®	130	90	40

Gęsi utrzymywane w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego Instytutu Zootechniki PIB w Dworzyskach poddawano kontroli dotyczącej cech mięsności, przeprowadzając następujące pomiary:

- masy ciała w 8. i 12. tygodniu życia,
- głębokości mięśnia piersiowego w 12. tygodniu życia (przy użyciu zagłębnika igłowego),
- długości grzebienia mostka w 12. tygodniu życia,
- długości lewego przedramienia w 12. tygodniu życia.

Kolekcjonowano także materiał do badań laboratoryjnych (w postaci piór). Rozpoczęto izolację DNA, a także zaprojektowano startery do reakcji PCR i sekwencjonowania fragmentów wybranych genów.

W ramach badań polimorfizmu genu miostatyny (*MSTN*), skoncentrowanych na analizie fragmentów zawierających eksony, otrzymane sekwencje porównano z sekwencją referencyjną opublikowaną w GenBanku Acc. NW_013185684. Analizy genu miostatyny wykazały w eksonie 3 polimorfizm (SNP) c.1231C→T, którego efektem jest występowanie dwóch *alleli* C i T (Rys. 1). Polimorfizm ten znajduje się poza regionem kodującym białko. Otrzymaną sekwencję eksonu 3 zdeponowano w GenBanku.



Rys. 1. Chromatogram fragmentu genu *MSTN*- exon3 – polimorfizm c.1231C→T

Zadanie 04-18-08-21

Analiza różnicowa poziomu metylacji RNA oraz poziomu ekspresji genów tkanek i linii komórkowych gatunku *Equus caballus*

Kierownik zadania: dr inż. Ewelina Semik-Gurgul

Celem realizacji zadania jest identyfikacja tkankowo-specyficznych wzorów ekspresji genów wybranych tkanek, wywodzących się z dwóch listków zarodkowych pochodzenia endodermalnego (wątroba i płuca) oraz próby biologiczne dwóch tkanek mezenchymalnych, wywodzących się z mezodermy (mięsień poprzecznie prążkowany serca oraz komórki chrząstki szklistej z powierzchni stawowych kończyn). Analiza transkryptomu zostanie uzupełniona o analizę poziomu metylacji RNA. Jako modyfikacja potranslacyjna, metylacja RNA odgrywa znaczącą rolę w regulacji poziomu ekspresji genów, jako jeden ze stosunkowo niedawno odkrytych i mało poznanych mechanizmów epigenetycznych. Efektem przeprowadzonych prac będzie informacja o poziomie metylacji RNA oraz o różnicach w poziomie ekspresji wytypowanych genów, wykorzystana do typowania szlaków molekularnych charakterystycznych dla fizjologii badanych tkanek i komórek. Przeprowadzone prace będą stanowiły uzupełnienie badań metylacji DNA wybranych tkanek i linii komórkowych konia domowego, wykonanych w ramach zadania pt. „Charakterystyka metylomu tkanek i linii komórkowych gatunku *Equus caballus*.” Połączone wyniki analizy metylomu, transkryptomu oraz metylacji cząsteczki RNA będą stanowiły podstawę dla badań nad molekularnym podłożem patofizjologii tkanek u konia domowego. Co więcej, w przypadku zwierząt hodowlanych będą dodatkowym źródłem wiedzy dla analiz genetycznych zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów ekspresji genomu i procesów, w wyniku których, kształtowane są dziedziczne cechy użytkowe. W ramach proponowa-

nego zagadnienia zostaną wykorzystane najnowsze metody analiz epigenetycznych uwzględniające technikę sekwencjonowania następnej generacji NGS (RNA-seq oraz 5-mC RNA Bisulfite-Seq). Jako pierwsi podjęliśmy również próbę analizy zmian w poziomie metylacji RNA wybranych tkanek u gatunku *Equus caballus*.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań

W ramach realizacji zadania pozyskano poubojowo tkanki mięśnia sercowego, płuc, wątroby oraz hodowle komórkowe chrząstki stawowej od sześciu koni w typie zimnokrwistym. Materiał zabezpieczono poprzez natychmiastowe zamrożenie w ciekłym azocie oraz konserwację z wykorzystaniem odczynnika RNA-later. Po ekwilibracji prób w RNA-later przez 24h w temperaturze 4°C, próby zamrożono w -80°C. W wyniku zdarzenia losowego, w Laboratorium Genomiki doszło do awarii zamrażarki niskotemperaturowej, a przechowywane próby uległy rozmrożeniu, co spowodowało degradację RNA w pobranych tkankach. Podjęte próby izolacji wysokocząsteczkowego RNA niezbędnego do analiz transkryptomu i metylacji RNA zakończyły się niepowodzeniem i większość z otrzymanych izolatów wykazała wskaźnik integralności RNA – RIN na poziomie niższym niż 5. Zdegradowane RNA nie może być wykorzystane w dalszych etapach analiz, w związku z czym zaplanowano kolejne pobranie prób. Najbliższy możliwy termin pozyskania tkanek przypada na styczeń 2019, stąd też wystąpiły pewne opóźnienia w realizacji zadania.

Zadanie 04-18-09-21

Wpływ suplementacji paszy witaminą D na status zdrowotny oraz procesy biologiczne zachodzące w tkankach młodych i dojrzałych szczurów (*Rattus sp.*)

Analiza genomyczna z zastosowaniem NGS (Next Generation Sequencing)

Kierownik zadania: dr hab. Maria Oczkiewicz, prof. IZ PIB

W bieżącym roku przeprowadzono doświadczenie żywieniowe na szczurach młodych. Dwanaście osobników (6 samic i 6 samców) przydzielonych zostało do trzech grup żywieniowych. Zwierzęta otrzymywały taką samą paszę różniącą się tylko zawartością witaminy D3 (grupa I – brak witaminy D3, grupa II – dawka standardowa, grupa III – dawka wysoka). W trakcie trwania doświadczenia monitorowane były przyrosty zwierząt oraz ich stan zdrowotny (Tab. 1). Nie stwierdzono różnic we wzroście pod wpływem suplementacji witaminą D3. Istotne różnice odnotowano jedynie w zależności od płci zwierzęcia (Tab. 1). Po skończonym doświadczeniu, zwierzęta zostały poddane eutanazji w specjalnym urządzeniu przeznaczonym do humanitarnego uśmiercania zwierząt laboratoryjnych zakupionym na potrzeby projektu. W trakcie sekcji od zwierząt pobrane zostały tkanki i narządy do badań genomicznych /RNA-seq, miRNA-seq, RRBS/ (wątroba, mięsień, tłuszcz, mózg, serce, nerka, narządy rozrodcze, aorta, skóra; histologicznych (preparaty mikroskopowe w celu obserwacji zmian strukturalnych tkanek i narządów) i fizyko-chemicznych (zawartość wapnia w narządach, zawartość witaminy D3 w mięśniu, łamliwość kości). Od wszystkich zwierząt pobrana została krew do badań biochemicznych i hematologicznych. Odnotowana została również masa ciała i masa głównych narządów. Uzyskane wyniki sugerują, że suplementacja witaminą D3 istotnie wpływa na masę serca (Tab. 1), jak również na parametr MCH (mean corpuscular hemoglobin, mean cell hemoglobin), który oblicza się dzieląc masę hemoglobiny w danej objętości krwi przez liczbę krwinek ($MCH = Hgb/RBC$).

Najnowsze publikacje sugerują związek pomiędzy poziomem witaminy D₃ a chorobami serca i układu krwionośnego oraz wskazują na konieczność dalszych badań w tym zakresie. W dalszych badaniach planujemy powiązać te wyniki z poziomem ekspresji genów odpowiedzialnych za procesy zachodzące w układzie krwionośnym. Obecnie przeprowadzono izolację RNA z około 100 próbek (Fig. 1) oraz utworzono biblioteki quant 3`mRNA z dla około 60 próbek (Fig. 2).

Fig. 1. Analiza uzyskanego RNA na urządzeniu Tapestation 2200

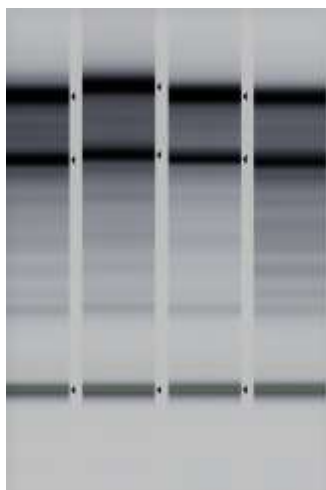
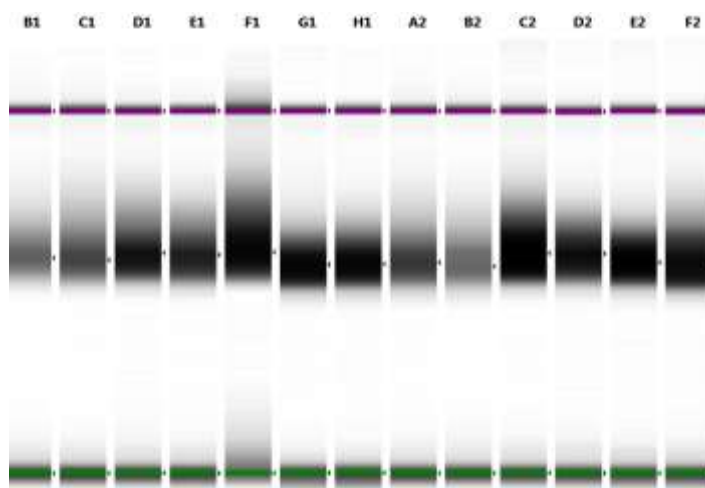


Fig. 2. Analiza utworzonych bibliotek quant 3`mRNA na urządzeniu Tapestation 2200



Tab. 1. Wskaźniki wzrostowe

Poziom wit. D ₃ (U/kg paszy)	Masa ciała końcowa (g)		Przyrosty masy ciała średnia dla grupy (g)		Przyrost masy ciała (g/szt./d)		Pobranie paszy (g/szt./d)		Wykorzystanie paszy (g/g przyrostu m.c.)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0	414,9	227,9	196,84	84,07	2,072	0,885	22,97	18,18	11,10	20,52
1000	423,3	225,2	211,75	83,69	2,229	0,881	23,27	18,67	10,42	21,09
5000	417,7	231,2	205,58	86,64	2,164	0,912	24,20	18,89	11,22	20,71
Istotność efektów głównych i interakcji										
Poziom wit. D ₃ (W):	321,42		140,45		1,479		20,58		15,81	
0	315,94		147,72		1,555		20,97		15,76	
1000	324,49		146,11		1,538		21,55		15,96	
5000										
SEM	9.239		2.739		0.048		1.216		0.318	
Wartość P	0.654		0.287		0.295		0.509		0.802	
Płeć (P):										
♂	418,63		204,72		2,16		23,48		10,91	
♀	228,10		84,80		0,89		18,58		20,77	
SEM	6.188		4.824		0.035		0.620		0.309	
Wartość P	<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001	
Interakcja W×P										
Wartość P	0.944		0.392		0.291		0.905		0.129	

Tab. 2. Średnia masa ciała (g) i względny udział masy wybranych narządów wewnętrznych w ogólnej masie ciała szczurów (%)

Poziom wlt. D ₃ (U/kg paszy)	Średnia masa ciała (g)		Udział w średniej masie ciała (%)												Mózg	Gonady	
	♂	♀	Wątroba	Serce		Nerki		Śledziona		Kończyna tylna (bez skóry)		♂	♀	♂	♀	♂	♀
				♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀						
0	414,9	227,9	2886	0,278	0,317	0,605	0,593	0,177	0,210	5,667	5,809	0,478	0,738	0,478	0,738	0,834	0,057
1000	423,3	225,2	2961	0,271	0,283	0,587	0,568	0,169	0,209	5,419	5,741	0,497	0,760	0,497	0,760	0,876	0,043
5000	417,7	231,2	3014	0,258	0,295	0,589	0,601	0,174	0,206	5,499	6,140	0,455	0,762	0,455	0,762	0,819	0,046
Istotność efektów głównych i interakcji																	
Poziom wlt. D ₃ (W):				0,297 A		0,599		0,194		5,738		0,608		0,445			
0	321,4		2,986	0,277 B		0,577		0,189		5,580		0,629		0,463			
1000	324,2		2,995	0,277 B		0,595		0,190		5,819		0,609		0,436			
5000	324,5		3,028														
SEM	7,579		0,057	0,004		0,011		0,006		0,138		0,023		0,014			
Wartość P	0,950		0,862	0,004		0,361		0,850		0,469		0,777		0,437			
Plec (P):				0,269		0,594		0,173		5,528		0,477		0,843			
♂	418,6		2,954	0,298		0,587		0,209		5,897		0,753		0,053			
♀	228,1		3,052														
SEM	6,188		0,046	0,003		0,009		0,005		0,112		0,018		0,012			
Wartość P	<0,0001		0,147	<0,0001		0,625		<0,0001		0,028		<0,0001		<0,0001			
Interakcja WxP																	
Wartość P	0,832		0,544	0,086		0,619		0,879		0,443		0,713		0,321			

Tab. 3. Parametry hematologiczne krwi szczurów

Poziom wlt. D ₃ (U/kg paszy)	WBC		LYM%		MONO%		GRA%		HGB		HTC		RBC		MCV		MCH*		MCHC		RDWC		PLT		MPV	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0	3,40	1,73	66,4	65,8	4,35	5,61	28,98	28,06	16,35	16,01	37,06	36,15	7,86	7,24	48,23	49,90	21,35	22,46	43,98	45,10	14,17	13,51	557,2	544,2	6,48	6,45
1000	3,43	2,21	67,9	65,0	4,80	5,65	27,25	29,31	16,71	16,18	38,88	35,91	8,11	7,31	47,71	49,10	20,70	22,23	43,05	44,95	14,30	13,66	577,8	547,6	6,53	6,43
5000	3,48	2,16	68,0	65,9	4,93	5,55	27,40	28,53	16,21	15,96	37,58	36,90	7,96	7,49	47,01	49,25	20,48	21,40	43,51	43,61	14,45	13,33	527,3	587,8	6,55	6,36
Istotność efektów głównych i interakcji																										
Poziom wlt. D ₃ (W):																										
0	2,56		66,10		4,98		28,52		16,18		36,60		7,55		49,06		21,90		44,54		13,84		550,7		6,46	
1000	2,82		66,50		5,22		28,28		16,45		37,40		7,71		48,40		21,46		44,00		13,98		562,7		6,48	
5000	2,82		67,00		5,24		27,96		16,09		37,24		7,72		48,13		20,94		43,56		13,89		557,5		6,45	
SEM	0,209		2,129		0,402		1,978		0,683		0,461		0,128		0,367		0,254		0,373		0,254		15,326		0,086	
Wartość P	0,608		0,956		0,879		0,980		0,286		0,448		0,579		0,200		0,038		0,198		0,927		0,855		0,978	
Plec (P):																										
♂	3,43		67,46		4,69		27,87		16,42		37,84		7,98		47,65		20,84		43,51		14,30		554,1		6,52	
♀	2,03		65,60		5,60		28,27		16,05		36,32		7,35		49,41		22,03		44,55		13,50		559,8		6,41	
SEM	0,171		1,738		0,328		1,615		0,557		0,376		0,104		0,300		0,207		0,305		0,207		12,514		0,070	
Wartość P	<0,0001		0,455		0,059		0,741		0,057		0,007		<0,0001		0,0002		0,0003		0,022		0,015		0,746		0,299	
Interakcja WxP																										
Wartość P	0,730		0,927		0,846		0,862		0,820		0,174		0,662		0,710		0,685		0,249		0,753		0,101		0,829	

*MCH (mean corpuscular hemoglobin, mean cell hemoglobin), SWH – wskaźnik średniej masy hemoglobiny w krwince czerwonej. Norma wynosi 27-31 pg.

MCH oblicza się dzieląc masę hemoglobiny w danej objętości krwi przez liczbę krwinek (MCH=Hgb/RBC).

Zadanie 04-18-11-11

Analiza proteomiczna relacji gospodarz-patogen u owiec zarażonych nicieniami żołądkowo-jelitowymi

Kierownik zadania: dr hab. inż. Igor Zubrzycki

Celem zadania jest zidentyfikowanie markerów białkowych w osoczu krwi, które towarzyszą zmianom chorobowym wywołanym przez nicienie przewodu pokarmowego.

Prezentowane badania są kombinacją badań podstawowych i stosowanych.

Badania podstawowe umożliwiają lepsze poznanie etiologii zmian chorobowych na poziomie molekularnym, tj. białkowym oraz monitorowanie jej postępu i efektywności stosowania środków farmakologicznych.

Składowa stosowana ma na celu uzyskanie szybkiego narzędzia diagnostycznego pozwalającego na zwiększenie skuteczności prewencji oraz redukcję kosztów leczenia.

Planowane efekty naukowe:

- poznanie zmian proteomu, które towarzyszą procesowi zapalnemu w osoczu krwi owiec zarażonych nicieniami,
- dyferencjalna ocena proteomu w zależności od stadium zarażenia nicieniami i podjętego leczenia.

Planowane efekty praktyczne:

- wyizolowanie markerów białkowych umożliwiających wczesne diagnozowanie stopnia zarażenia chorobami pasożytniczymi,
- opracowanie nowych metod profilaktycznych i redukujących stopień parazytozy.

W okresie sprawozdawczym przedmiotem badań było:

- zestawienie grup doświadczalnych zgodnie z założeniami przewidzianymi w metodyce zadania,
- ustalenie optymalnych metod eksperymentalnych,
- pobranie materiału do analiz molekularnych i badań koproskopowych,
- przeprowadzenie wysokorozdzielczej elektroforezy dwuwymiarowej.

W pierwszym etapie realizacji zadania kolekcjonowano materiał doświadczalny do badań molekularnych i koproskopowych.

Próby kału pobrane od owiec zostały zbadane metodą ilościową McMastera z wirowaniem (Roepstorff i Nansen, 1998), uzupełnioną o hodowlę larw w tzw. koprokulturze i oznaczenie rodzajów nicieni na podstawie morfologii larw III stadium (wykonane jednokrotnie na materiale pobranym w lipcu 2018 r., wg van Wyk i wsp. 2004).

W badaniach koproskopowych wykryto inwazje kokcydiów z rodzaju *Eimeria*, tasiemców *Moniezia* sp., nicieni żołądkowo-jelitowych z rzędu Strongylida, oraz nicieni z rodzajów: *Nematodirus*, *Capillaria* i *Strongyloides*. W badaniach larwoskopowych ustalono dominację krwiopijnego gatunku nicienia trawieńca *Haemonchus contortus*.

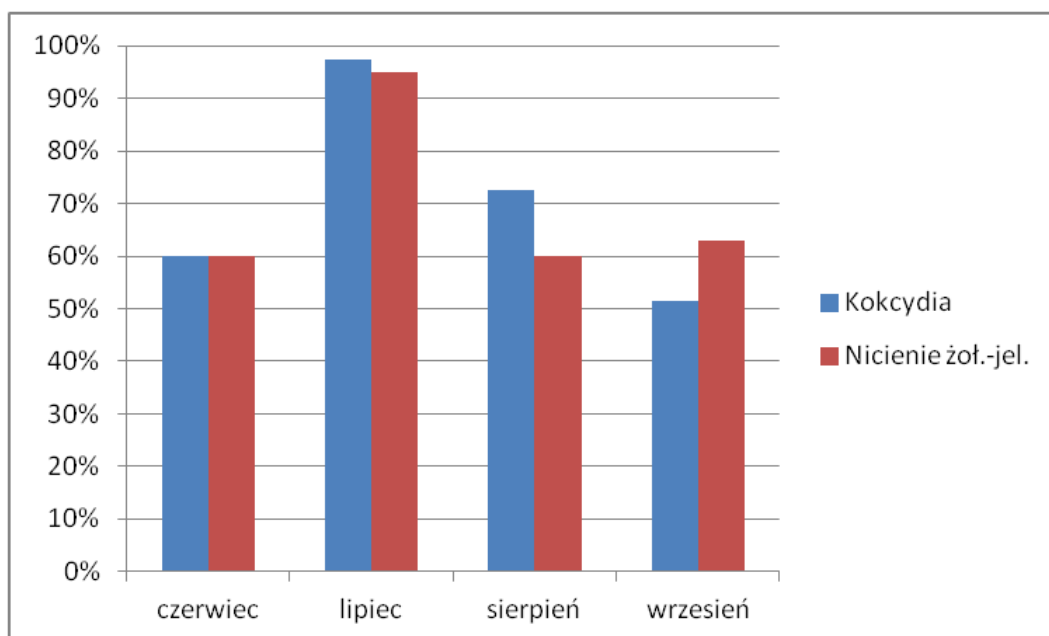
Poziom zarażenia obserwowanymi grupami pasożytów był różny w poszczególnych miesiącach badań (Tab. 1, Wyk. 1 i 2). Zarażenie kokcydiami (próg poziomu zarażenia 20 000 OPG – wg Chartier i Paraud 2012), *Nematodirus* sp., *Capillaria* sp. oraz *Strongyloides* sp. utrzymywało się na niskim poziomie w całym okresie badań.

Poziom zarażenia nicieniami żołądkowo-jelitowymi był niski w czerwcu, natomiast w pozostałych miesiącach stopniowo wzrastał, osiągając u wybranych sztuk owiec granice średniej, wysokiej i bardzo wysokiej intensywności (Wyk. 3), mierzonych według skal określonych przez Hansena i Perry'ego (1994) oraz Besier i wsp. (2017) dla inwazji mieszanych udziałem *Haemonchus contortus* [poziomy EPG: 20-200 – niski, 200-800 – średni, 800-1500 – wysoki, pow. 3000 – bardzo wysoki (wywołujący kliniczny obraz hemonkozy)].

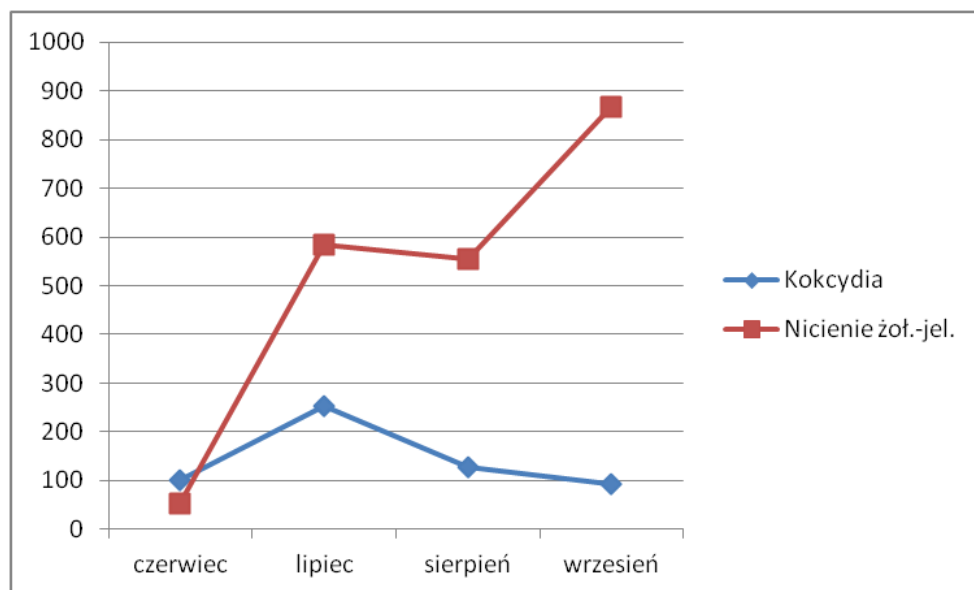
Po przeprowadzonym odrobaczaniu (lipiec) środkiem Valbazen (substancja czynna al-bendazol) zmniejszeniu uległa przede wszystkim ekstensywność zarażenia oraz nieznacznie intensywność wydalania jaj nicieni. Może to wskazywać na występowanie zjawiska lekooporności nicieni Strongylida (szczególnie *H. contortus*) w badanym stadzie (Coles i wsp. 2006) [skuteczność odrobaczania w teście FECRT = 68,59%; próg lekooporności 85%]. W wyniku tego zabiegu wyeliminowano jednak inwazję tasiemców z rodzaju *Moniezia*.

Tab. 1. Poziom zarażenia owiec pasożytami w badaniach koproskopowych [E – ekstensywność zarażenia wyrażona jako % prób pozytywnych; I – średnia intensywność wydalania oocyst/jaj pasożytów (OPG – oocyst/EPG – jaj wydalanych w jednym gramie kału) oraz zakres intensywności min.-max.]

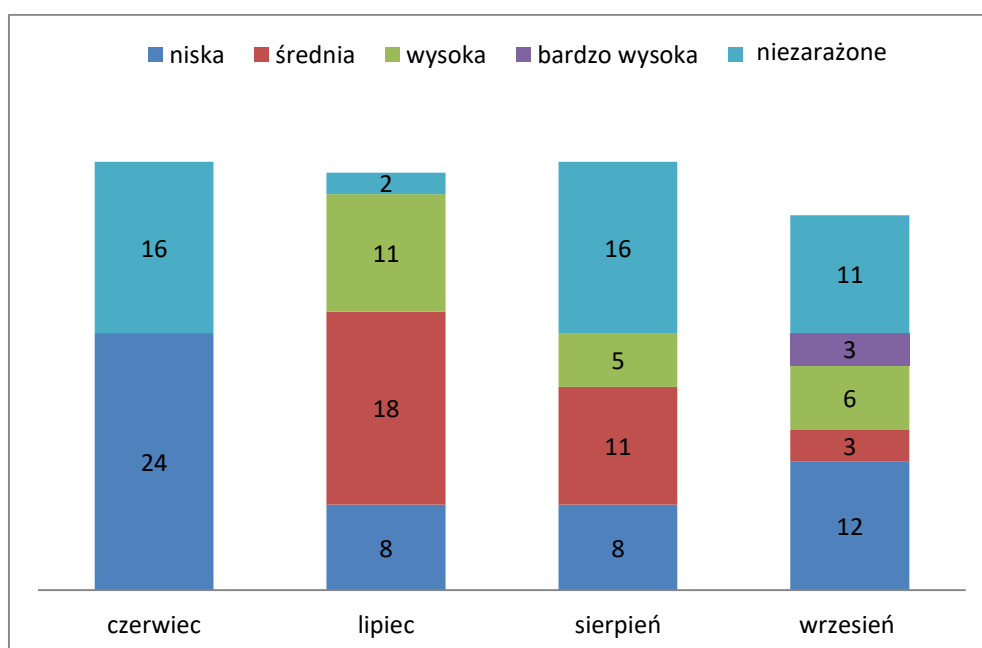
Miesiąc/grupa pasożytów		Kokcydia <i>Eimeria</i> sp.	Nicienie żołą.-jel. z rzędu Strongylida	<i>Nematodirus</i> sp.	<i>Capillaria</i> sp.	<i>Strongyloides</i> sp.	Tasiemce <i>Moniezia</i> sp.
Czerwiec	E	60,00	60,00	7,50	2,50	0,00	0,00
	I	101 (20-600)	52 (20-220)	20 -	20 -	-	
Lipiec	E	97,44	94,87	2,56	10,26	5,13	2,56
	I	252 (20-2440)	585 (20-1820)	20 -	20 -	20 -	-
Sierpień	E	72,50	60,00	2,50	17,50	2,50	0,00
	I	128 (20-760)	555 (20-2540)	20 -	23 (20-40)	20 -	-
Wrzesień	E	51,43	62,86	0,00	0,00	2,86	0,00
	I	92 (20-600)	865 (20-3760)	-	-	20 -	-



Wykr. 1. Ekstensywność zarażenia owiec kokcydiami z rodzaju *Eimeria* oraz nicieniami żołądkowo-jelitowymi z rzędu Strongylida w poszczególnych miesiącach



Wykr. 2. Dynamika średniej intensywności wydalania oocyst kokcydiów (OPG) oraz jaj nicieni żołądkowo-jelitowych (EPG)



Wykr. 3. Ocena intensywności inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u owiec w poszczególnych miesiącach

W pierwszym etapie realizacji zadania kolekcjonowano materiał do badań molekularnych oraz jakościowo-ilościowych badań koproskopowych.

W ramach analizy koproskopowej określono poziom zarażenia owiec poszczególnymi grupami pasożytów w okresie od czerwca do września, ekstensywność zarażenia owiec kokcydiami z rodzaju *Eimeria* oraz nicieniami żołądkowo-jelitowymi z rzędu Strongylida

w poszczególnych miesiącach oraz dynamikę średniej intensywności wydalania oocyst kokcydiów (OPG) i jaj nicieni żołądkowo-jelitowych (EPG). Oceniono także intensywność inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u owiec w poszczególnych miesiącach, stwierdzając (po przeprowadzonym odrobaczeniu) stopniowy wzrost zarażenia aż do bardzo wysokiej intensywności, co sugeruje wystąpienie zjawiska lekooporności nicieni *Strongylida* (szczególnie *H. contortus*) w badanym stadzie.

Zadanie 04-18-12-11

Analiza proteomiczna relacji gospodarz-patogen u bydła chorego na mastitis

Kierownik zadania: dr hab. inż. Igor Z. Zubrzycki

Badania miały na celu identyfikację biomarkerów definiujących subkliniczne i kliniczne stany zapalne, co pozwoli na pełniejsze zrozumienie reakcji patogenu w środowisku gospodarza podczas klinicznych infekcji wywołanych przez choroby pasożytnicze.

Przedmiotem zadania jest zidentyfikowanie markerów białkowych w osoczu krwi zwierząt, które towarzyszą zmianom chorobowym wywołanym przez nicienie przewodu pokarmowego.

Prezentowane badania są kompilacją badań podstawowych i aplikacyjnych. Badania podstawowe umożliwią lepsze poznanie etiologii zmian chorobowych na poziomie molekularnym tj. białkowym oraz monitorowanie jej postępu i efektywności terapii lekowej. Badania aplikacyjne pozwolą na uzyskanie szybkiego narzędzia diagnostycznego zwiększającego skuteczność prewencji oraz ograniczenie kosztów leczenia.

Planowane efekty naukowe:

- anotacja genomu pasożytów zwierząt gospodarskich,
- poznanie podstawowego proteomu pasożytów,
- poznanie zmian proteomu, które towarzyszą procesowi zapalnemu w osoczu krwi,
- dyferencjalna ocena proteomu w zależności od stadium choroby i podjętego leczenia.

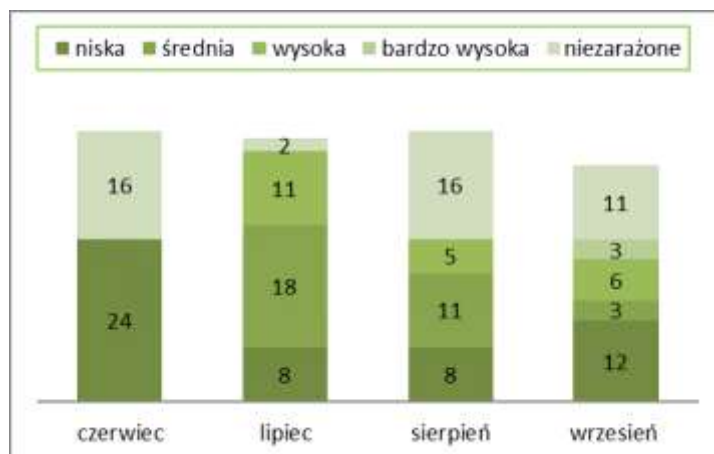
Planowane efekty praktyczne:

- anotacja genomu pasożytów i przewidywanie spektrum białkowego,
- wyizolowanie markerów białkowych pozwalających na wczesne subkliniczne diagnozowanie choroby.

Zakres początkowych badań obejmował: zestawienie grup doświadczalnych zgodnie z założeniami przewidzianymi w metodyce zadania, pobranie materiału do badań koproskopowych i analiz molekularnych oraz ustalenie optymalnych metod eksperymentalnych.

W pierwszym etapie realizacji zadania pobrano materiał doświadczalny od owiec zarażonych nicieniami (próbki krwi do analiz molekularnych i próbki kału do badań koproskopowych).

Rozpoczęto procedurę ekstrakcji gatunkowo-specyficznych próbek tkanek nicienia (*Haemonchus contortus*) dominującego w materiale koproskopowym (co zostało ustalone na podstawie jakościowej i ilościowej oceny parazytologicznej) – (Wykr. 1).



Wykr. 1. Ocena intensywności inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u owiec w poszczególnych miesiącach

Przygotowane lizaty tkankowe będą wykorzystane do wyizolowania DNA pasożyta w celu weryfikacji gatunkowej na podstawie analiz molekularnych (z użyciem odpowiednio zaprojektowanych par pimerów dla gatunków z grupy węgorzków trichostrongyloidalnych, a w szczególności dla gatunku *H. contortus*).

W ramach omawianego etapu badań skolekcjonowano materiał doświadczalny od owiec zarażonych nicieniami, niezbędny do badań koproskopowych i analiz molekularnych przewidzianych w harmonogramie omawianego zadania. Umożliwiło to rozpoczęcie procedury ekstrakcji gatunkowo-specyficznych próbek tkanek nicienia (*Hameonchus Contortus*) dominującego w materiale koproskopowym, w celu wyizolowania DNA pasożyta do weryfikacji gatunkowej na podstawie analiz molekularnych, a także sekwencjonowania genomu.

Poznanie genomu i proteomu nicieni oraz procesów zapalnych towarzyszących chorobie pasożytniczej pozwoli na zrozumienie etiologii i postępu choroby oraz określenie markerów przydatnych do wczesnego wykrywania choroby i monitorowania jej postępu.

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji **Kierownik: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB**

Zadanie 01-19-01-21

Liofilizacja jako metoda długotrwałej konserwacji nasienia knura

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

Celem badań jest wykorzystanie liofilizacji do opracowania innowacyjnej metody konserwacji nasienia knura.

W etapie sprawozdawczym prowadzono badania dotyczące: 1. stanu chromatyny plemnikowej oraz integralności błon plemników nasienia liofilizowanego w różnych rozrzedzalnikach (TRIS, HEPES-PVA i glukozowo-żółtkowym), przechowywanego w różnym czasie i różnej temperaturze; 2. stanu chromatyny plemnikowej nasienia liofilizowanego w rozrzedzalniku TRIS z dodatkiem antyoksydantów, takich jak: witamina E oraz resweratrol lub bez antyoksydantów,

przechowywanego w różnym czasie i różnej temperaturze oraz 3. wykonano próbne doświadczenia z aktywacją oocytów po zapłodnieniu metodą ICSI. ICSI liofilizowanym plemnikiem będzie wykonywane w trzecim roku realizacji zadania.

Z trzech testowanych rozrzedzalników najbardziej optymalnym do liofilizacji nasienia knura okazał się rozrzedzalnik TRIS ze względu na wysoki odsetek ruchliwych plemników po rozmrożeniu. Po rehydratacji nie obserwowano ruchliwości liofilizowanych plemników knura przechowywanych w różnym czasie i różnej temperaturze i w 3 testowanych rozrzedzalnikach. Wykazano bardzo wysoki stopień uszkodzeń błon komórkowych wynoszący średnio 96,8%, niezależnie od czasu, temperatury i zastosowanych rozrzedzalników do przechowywania liofilizatów.

Stwierdzono brak istotnych różnic statystycznych w stopniu uszkodzenia chromatyny w plemnikach liofilizowanych, przechowywanych w temperaturze +4, -20 i -80°C niezależnie od czasu ich przechowywania dla wszystkich analizowanych rozrzedzalników.

Wykazano różnice statystycznie istotne ($P < 0.05$) w uszkodzeniach chromatyny plemników liofilizowanych w rozrzedzalniku TRIS, przechowywanych przez okres 90 dni w temperaturze +20°C w porównaniu do przechowywanych w pozostałych temperaturach (+4, -20 i -80°C), jak również wykazano statystycznie istotne różnice między pozostałymi rozrzedzalnikami, również w temp. +20°C. Ponadto wykazano statystycznie istotne różnice ($P < 0,05$) w uszkodzeniach chromatyny plemników liofilizowanych w rozrzedzalniku TRIS, przechowywanych przez okres 30 dni w temperaturze +20°C w porównaniu do przechowywanych w TL-HEPES-PVA.

W ramach przygotowania do przyszłorocznych doświadczeń wykonano próbne doświadczenia z aktywacją oocytów po zapłodnieniu metodą ICSI. Uzyskane wyniki są obiecujące. Odnotowano wzrost liczby zarodków rozwijających się do stadium blastocysty po zastosowaniu aktywacji.



Fot. 1. Liofilizator



Fot. 2. Pracownik Zakładu mgr Iwona Rajska w trakcie wykonywania procedury ICSI (ang. IntraCyttoplasmic Sperm Injection)

Zadanie 01-19-02-11

Zastosowanie hydrofilowych i hydrofobowych przeciwutleniaczy w kriokonserwacji nasienia knura

Kierownik zadania: dr Monika Trzcńska

Celem zadania było określenie wpływu dodatku przeciwutleniaczy do rozcieńczalnika mroźniowego na jakość nasienia knura. Ponadto zastosowanie markerów apoptotycznych i chemiluminescencyjnych do oceny nasienia pozwoliło na określenie jego wartości

biologicznej oraz wyznaczenie nowych kryteriów selekcji knurów do kriokonserwacji. W celu określenia zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono próby biologiczne polegające na inseminacji loszek w ZD IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o.

Założenia metodyczne:

1. Ocena kriokonserwowanego nasienia knura przy zastosowaniu markerów apoptycznych i chemiluminescencyjnych.
2. Ocena *in vivo* kriokonserwowanego nasienia knura.

Syntetyczny opis wyników zadania.

W ramach realizacji prac w 2018 roku przeprowadzono kriokonserwację nasienia 15 knurów w rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowo-glicerolowyn z dodatkiem 2 mM butylowanego hydroksytoluenu (BHT) lub 2 mM resweratrolu. Wyboru antyoksydantów i ich stężeń dokonano na podstawie wyników uzyskanych podczas realizacji zadania w 2017 roku. Badaniami objęto nasienie pochodzące ze Stacji Eksploatacji Knurów i Pasieki Zarodowej w Czerminie (Oddział MCB Krasne sp. z o.o.). Od każdego knura do badań przeznaczono od 3 do 5 ejakulatów. Nasienie po pobraniu (frakcja gęsta) transportowano do Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB. Ocenę ruchliwości oraz koncentracji przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA. Każdy z ejakulatów został zamrożony według metody własnej (patent nr 228192). Rozcieńczone i schłodzone nasienie o koncentracji plemników 250×10^6 konfekcjonowano w słomkach IMV o objętości 0,5 ml, zamrażano w parach ciekłego azotu (temperatura ok. -120°C), a następnie przenoszono do kontenera z ciekłym azotem (temperatura ok. -197°C).

Nasienie świeże i po procedurze kriokonserwacji oceniano na podstawie ruchliwości markerów apoptycznych analizowanych przy użyciu cytometrii przepływowej i/lub mikroskopii fluorescencyjnej oraz chemiluminescencyjnego pomiaru uszkodzeń oksydacyjnych plemników. Nasienie świeże oceniano po 2,5 godzinach od pobrania, po wcześniejszym rozrzedzeniu w stosunku 1:1 w rozcieńczalniku *Biosolvens Plus*. Ocenę jakości kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono po rozmrożeniu słomek w łaźni wodnej w temperaturze 37°C i po 10-15 minutowej inkubacji w rozcieńczalniku.

Zastosowano następujące metody oceny:

- a) komputerowo wspomagana analiza nasienia z wykorzystaniem analizatora S.C.A,
- b) ocena zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników przy zastosowaniu fluorochromu YO-PRO-1,
- c) wykrywanie translokacji fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej plemników i aktywności kaspazy-3,
- d) ocena fragmentacji DNA plemników przy użyciu metody TUNEL,
- e) ocena mitochondrialnego potencjału transbłonowego przy zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego JC-1,
- f) badanie uszkodzeń oksydacyjnych plemników metodą chemiluminescencyjną.

Na podstawie uzyskanych wyników oceny jakości nasienia knurów przed i po procedurze kriokonserwacji ustalono nowe kryteria selekcji knurów do procedury kriokonserwacji zapewniające wysoką jakość po rozmrożeniu.

Nasienie świeże powinno spełniać poniższe kryteria:

- średni odsetek plemników apoptycznych na poziomie $\leq 10\%$,
- średni odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym na poziomie $\geq 70\%$.

Nasienie po rozmrożeniu powinno charakteryzować się wysoką krioopornością na poziomie co najmniej 70% (całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu/całkowita ruchliwość plemników w nasieniu świeżym x100%).

Spośród zamrożonych ejakulatów pochodzących od 15 knurów różnych ras, nasienie 11 knurów spełniało w/w kryteria selekcyjne. Nasienie pochodzące od 6 knurów wykazujących najwyższą kriooporność po rozmrożeniu przeznaczone zostało do wykonania prób biologicznych. W 2018 roku 20 synchronizowanych loszek przeznaczono do inseminacji chirurgicznej oraz 21 loszek do inseminacji standardowej mrożonym nasieniem.

Uzyskane wyniki oceny jakości nasienia wytypowanego do inseminacji loszek przedstawiono w Tab. 1. Dane dotyczące skuteczności inseminacji loszek kriokonserwowanym nasieniem przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 1. Ocena kriokonserwowanego nasienia knurów przeznaczonego do inseminacji loszek

Nr knura /liczba ejakulatów	Modyfikacja rozcieńczal- nika	Ruchliwość plemników	YO-PRO-1/PI	Dual Apoptosis Assay Kit	JC-1	TUNEL	Uszkodzenia oksydacyjne plemników
		ruch postępowy (%)	plemniki apopto- tyczne (%)	plemniki żywe (%)	plemniki z wysokim ΔY_m (%)	TUNEL ⁺ (%)	Peak max
I/3	LEYG+BHT	79,7±1,5	6,2±2,5	70,0±3,6	77,0±2,6	1,3±0,6	0,05±0,03 ^a
	LEYG+ R	75,7±1,2	7,8±2,8	71,3±2,1	73,3±1,5	2,0±1,0	7,3±0,9 ^b
II/4	LEYG+BHT	78,5±2,4	6,9±0,5	74,5±2,1	76,0±2,9	2,2±1,2	0,06±0,02 ^a
	LEYG+ R	73,2±2,7	8,0±0,9	71,5±2,4	70,7±2,5	2,5±1,0	5,7±0,8 ^b
III/3	LEYG+BHT	80,7±2,1	5,7±1,5	76,3±1,5	77,3±3,0	2,3±1,5	0,03±0,02 ^a
IV/4	LEYG+BHT	80,0±1,8	5,8±1,0	74,7±3,6	76,2±2,7	1,7±0,5	0,05±0,03 ^a
	LEYG+ R	75,5±1,3	7,2±0,9	70,7±0,9	72,2±2,2	1,2±0,5	8,3±0,4 ^b
V/5	LEYG+BHT	79,2±1,3	6,3±1,0	74,4±1,5	76,2±3,3	2,4±1,1	0,04±0,03 ^a
VI/3	LEYG+BHT	74,7±1,5	6,4±1,4	70,7±3,8	70,7±2,5	1,3±0,6	0,05±0,02 ^a

a, b p≤0,05, test t-Studenta

Wyjaśnienie skrótów: ΔY_m – transbłonowy potencjał mitochondrialny, TUNEL⁺ – plemniki wykazujące fragmentację DNA, Peak max – maksymalne natężenie luminescencji w trakcie pomiaru, LEYG + BHT – rozcieńczalnik żółtkowo-laktozowo-glicerolowy z dodatkiem 2 mM butylowanego hydroksytoluenu, LEYG+ R – rozcieńczalnik żółtkowo-laktozowo-glicerolowy z dodatkiem 2 mM resweratrolu.

Tab. 2. Wyniki inseminacji loszek kriokonserwowanym nasieniem knurów

Rozcieńczalnik mrożeniowy	LEYG+BHT			
Numer knura	Knur III		Knur IV	
Rodzaj inseminacji	chirurgiczna	standardowa	chirurgiczna	standardowa
Liczba inseminowanych loszek	10	11	10	10
Liczba ciężarnych loch w 25. dniu po inseminacji – skuteczność inseminacji (%)	8/10(80,0)	8/11 (73,0)	7/10 (70,0)	10/10 (100)
Wskaźnik wyproseni (%)	6/8 (75,0)	*	6/7 (86,0)	*
Liczba żywych prosiąt w miocie (średnia liczba prosiąt/loszka)	62 (10,3)	*	65 (10,8)	*

* brak danych z Zakładu Doświadczalnego IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu zadania

Określono wpływ dodatku przeciwutleniaczy do rozcieńczalnika mrozeniowego na jakość nasienia knura. Zastosowano markery apoptotyczne i chemiluminescencyjne do oceny nasienia co pozwoliło na określenie jego wartości biologicznej oraz wyznaczenie nowych kryteriów selekcji knurów do kriokonserwacji. Przeprowadzono próby biologiczne w celu kreślenia zdolności zapładniających kriokonserwowanego nasienia knura.

Zadanie 01-19-03-22

Zbadanie możliwości wykorzystania pierwotnych komórek płciowych kaczki do modyfikacji genomu kaczek z wykorzystaniem CRISPR/Cas9

Kierownik zadania: dr hab. Mirosław Lisowski

Celem badań jest wykorzystanie CRISPR/Cas9 do dezaktywacji (nokautu) genu miostatyny u kaczek, a w 2018 roku było opracowanie metody izolacji pierwotnych komórek płciowych z krwi 2,5-3-dniowych zarodków (stadia 13-17 Hamburger'a i Hamilton'a) oraz utworzenie konstrukcji modyfikującej w technologii CRISPR/Cas9 w celu uzyskania kaczek z wyłączoną aktywnością genu miostatyny (*MSTN*).

Jednym z podstawowych problemów w produkcji ptaków transgenicznych jest pozyskanie i wykorzystanie wektorów. Mogą nimi być pierwotne komórki płciowe (ang. primordial germ cells - PGCs), które są jedynymi komórkami zdolnymi do przekazywania informacji zapisanej w materiale genetycznym „z pokolenia na pokolenie”. PGCs mogą być izolowane, hodowane *in vitro* i genetycznie modyfikowane z zachowaniem potencjału tworzenia linii płciowych. Wykazano, że PGCs mogą być przenoszone z jednego zarodka do drugiego i tworzyć funkcjonalne komórki płciowe w zarodku biorcy. Biorąc pod uwagę powyższe, wyizolowano za pomocą szklanej mikropipety pierwotne komórki płciowe z krwiobiegu zarodków dawców, a następnie wprowadzono je do krwiobiegu zarodków biorców. Wadą metody izolacji PGCs z krwi zarodkowej jest trudność wykonania zabiegu oraz bardzo mała liczba uzyskanych PGCs, co znacznie ogranicza zastosowanie tej metody izolacji. Z uwagi na te ograniczenia, bardziej celowym wydaje się wykorzystanie metody izolacji PGCs z gonad 5-7-dniowych zarodków kaczek.

W celu uzyskania kaczek z wyłączoną aktywnością genu miostatyny (*MSTN*) zastosowano technologię CRISPR/Cas9. Pierwszym etapem tworzenia konstrukcji modyfikującej w tym systemie była analiza bioinformatyczna, umożliwiająca wytypowanie najlepszych miejsc docelowych w obrębie genu *MSTN* kaczki. Do tego wykorzystano bazę danych: <http://crispr.mit.edu/> oraz baza dostępna na platformie: <https://benchling.com/>. Tak wskazane miejsca posłużyły do wytypowania komplementarnych gRNA – oligonukleotydów o długości 20 nt, które po połączeniu się z białkiem Cas9 umożliwiają hydrolizę DNA w zaprojektowanych w ten sposób miejscach w obrębie docelowego genu. Oligonukleotydy zostały zamówione w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN. Następnie przeprowadzona została hybrydyzacja zaprojektowanych gRNA i ich wklonowanie do konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 trzeciej generacji (pX459 #Addgene).

Zadanie 01-19-04-21

Zastosowanie nukleofekcji do uzyskania potencjalnie transgenicznych mezenchymalnych komórek macierzystych oraz potencjalnie transgenicznych zarodków, płodów i/lub potomstwa klonalnego u świń

Kierownik zadania: dr hab. Marcin Samiec, prof. IZ PIB

Celem zadania jest weryfikacja żywotności i potencjału proliferacyjnego *in vitro* szpikopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych (BM-MSCs) w celu określenia ich późniejszej przydatności do zabiegów transformacji genetycznej metodą nukleofekcji. Określenie kompetencji jąder komórek BM-MSCs do pokierowania rozwojem *in vivo* nietransgenicznych zarodków świni uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego.

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników

W pierwszym etapie realizacji niniejszego zadania badawczego wyprowadzono hodowle pierwotne i linie klonalne mezenchymalnych komórek macierzystych (BM-MSCs), wyizolowanych ze szpiku kostnego czerwonego, który pobrano z jamy szpikowej talerza kości biodrowej trzech 3-miesięcznych loszek. Konfluentne hodowle pierwotne lub linie klonalne komórek BM-MSCs były zamrażone lub pasażowane w celu dalszego namnożenia (podwojenia lub zwielokrotnienia) danej subpopulacji komórkowej w warunkach *ex vivo*. Uzyskane subpopulacje komórkowe były wysiewane w naczyniach hodowlanych, wypełnionych podstawową pożywką Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM). Pożywka ta była wzbogacona dodatkowo 10% surowicy płodów bydlęcych (FBS), 5 ng/mL rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF), 2 mM mieszaniny aminokwasów endogennych (NEAA), 2 mM L-glutaminy, 0,36 mM pirogronianu sodu oraz 1% mieszaniny antybiotyków i mykostatyków (AAS). Przed wykorzystaniem jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania, rozmrożone subpopulacje komórek BM-MSCs poddawano zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji. W wyniku pokrycia gęstą, pojedynczą warstwą całej dostępnej powierzchni dna butelki hodowlanej, przylegające ściśle zarówno do siebie, jak i do substratu komórki BM-MSCs podlegały inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu przez 24-48 godzin. W tych warunkach cykl mitotyczny komórek BM-MSCs był sztucznie synchronizowany w fazach G1/G0. Do klonowania somatycznego były użyte komórki pochodzące z hodowli pierwotnych lub z wczesnych linii klonalnych (po 1 pasażu). W kolejnych miesiącach realizacji zadania badawczego będą przeprowadzone zabiegi nukleofekcji w celu transformacji genetycznej komórek BM-MSCs. Ponadto, oceniana będzie efektywność nukleofekcji modulowanych i niemodulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs, stopień ekspresji reporterowego białka eGFP w transfekowanych komórkach BM-MSCs oraz weryfikowana będzie efektywność uzyskiwania potencjalnie transgenicznych zarodków klonalnych świń. Rezerwy genetyczne utworzone w postaci hodowli pierwotnych i linii (szczepów) komórek BM-MSCs zostały zabezpieczone poprzez ich kriokonserwację.

Źródłem oocytów były jajniki loszek i loch uzyskiwane w lokalnej rzeźni. Niedojrzałe oocyty świni były pozyskiwane metodą aspiracji z antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-6 mm. Wyselekcjonowane do dojrzewania mejozytycznego *in vitro* (IVM) oocyty w stadium pęcherzyka zarodkowego były hodowane w grupach liczących 50-60 sztuk, w 500 µL pożywki TCM 199 uzupełnionej 10% surowicy płodów bydlęcych (FBS), 10% płynu wyizolowanego z antralnych pęcherzyków jajnikowych świni (pFF), mieszaniną aminokwasów egzogennych i endogennych (2% EAA oraz 1% NEAA), a także 62,5 ng/mL rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF), 30 ng/mL rekombinowanego epidermalnego czynnika wzrostowego człowieka (rhEGF), 1 mM/L cyklicznego dibutyryloadenozynomonofosforanu (dwumaślan cAMP; db-cAMP), 0,2 IU/mL ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG)

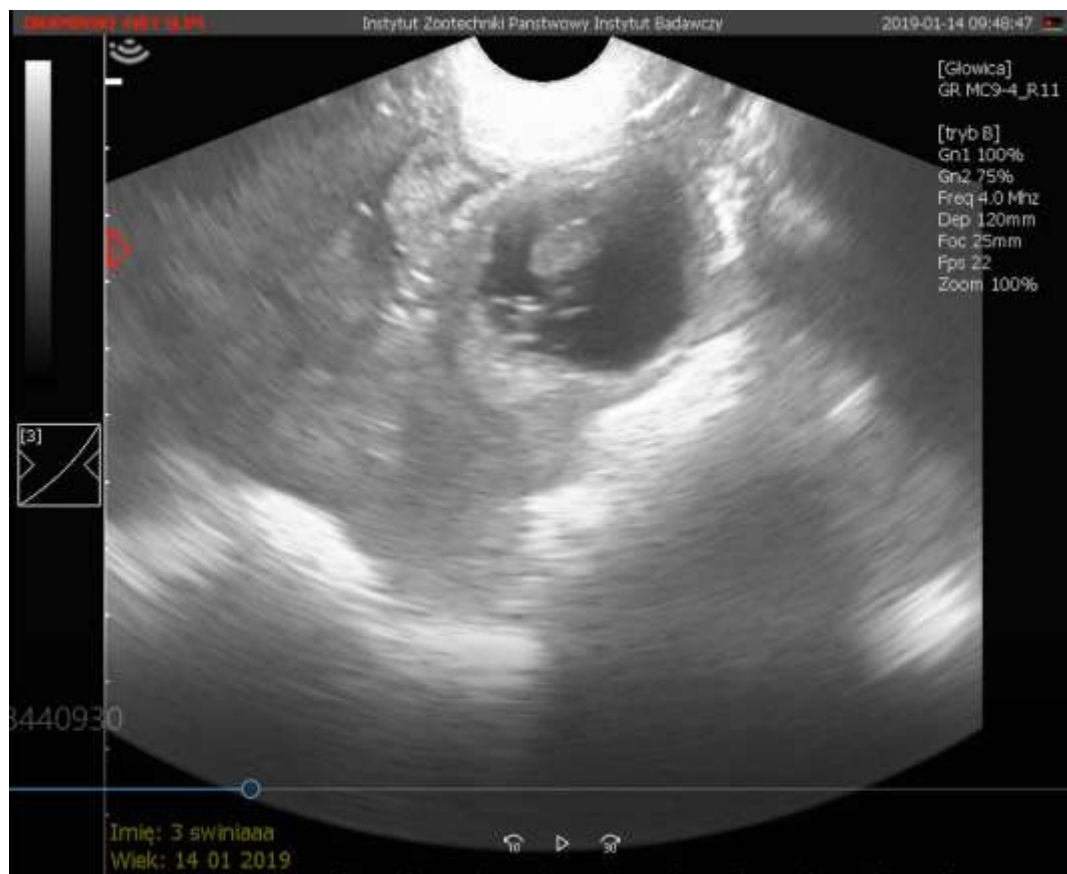
oraz 10 mIU/mL hormonu folikulotropowego świni (pFSH). Po około 20-21 godzinach, oocyty były przenoszone do tej samej pożywki hodowlanej, lecz pozbawionej db-cAMP oraz hMG i pFSH. W tych warunkach fizykochemicznych oocyty były hodowane *in vitro* przez kolejne 22-23 godziny, aż do czasu osiągnięcia dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej w stadium metafazy II. podziału mejotycznego. Dojrzałe *in vitro* oocyty, z wyraźnie wyodrębnionymi ciałkami kierunkowymi I. rzędu i jednolicie granulowaną cytoplazmą, nie wykazującą zmian nekrotycznych lub apoptotycznych, stanowiły źródło biorców dla jąder komórek BM-MSCs w klonowaniu somatycznym świń. Ogółem, do zabiegu klonowania wyselekcjonowano 312 (94.3%) dojrzałych *in vitro* oocytów spośród 331 oocytów zakwalifikowanych do IVM.

Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego oocyty były enukleowane przy zastosowaniu metody mikrochirurgicznej, wspomaganej chemicznie (z użyciem demekolcyny, a następnie cytochalazyny B). E nukleowane oocyty świni były rekonstruowane z jąder komórkowych mezenchymalnych komórek macierzystych, uprzednio podlegających inhibicji kontaktowej ich aktywności proliferacyjnej. Do sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów był zastosowany protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A). W protokole tym, impulsy prądu stałego, które indukowały fuzję kompleksów ooplast-komórka somatyczna, były równocześnie bodźcami inicjującymi aktywację rekonstruowanych oocytów. Elektroporacja błon plazmatycznych enukleowanych oocytów oraz komórek MSC była przeprowadzana w izotonicznym roztworze dielektryku o podwyższonym do 1 mM/L stężeniu jonów Ca^{2+} , z użyciem dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 120 V/mm i czasie trwania 60 μs każdy. Uzyskane w wyniku F/A cybrydy klonalne były inkubowane przez 2-3 godziny w pożywce NCSU-23 uzupełnionej 5 $\mu\text{g/mL}$ cytochalazyny B, 0,8% albuminy surowicy bydlęcej (frakcja V; BSA-V) oraz mieszaniną aminokwasów egzogen-nych i endogennych (2% EAA oraz 1% NEAA). Bezpośrednio po inkubacji w obecności cytochalazyny B, zarodki klonalne w stadium 1-blastomerowym były transferowane chirurgicznie do dróg rozrodczych (jajowodów) zsynchronizowanych hormonalnie loch biorczyń. Do jajowodów 4 samic-biorczyń transferowano łącznie 296 (94.9%) efektywnie zrekonstruowanych zarodków klonalnych spośród 312 dojrzałych *in vitro* oocytów poddanych enukleacji, rekonstrukcji z jąder komórek BM-MSCs, sztucznej aktywacji, a następnie działaniu cytochalazyny B. Średnia liczba zarodków przeniesionych do jednej biorczyń wynosiła 74. W około 30-35-tym dniu po transferze zarodków klonalnych będą przeprowadzane badania ultrasonograficzne (USG) loch-biorczyń w celu potwierdzenia lub wykluczenia ciąży. U ciężarnych loch-biorczyń badania USG będą powtarzane w odstępach 15-dniowych w celu weryfikacji tempa rozwoju płodu/płodów klonalnych lub oceny stopnia resorpcji pęcherzy płodowych.

Podsumowanie i wnioski:

1. Wyprowadzone hodowle pierwotne i wczesne linie klonalne komórek BM-MSCs charakteryzowały się wysoką zdolnością adhezji do polistyrenowych substratów i wysoką aktywnością proliferacyjną (uwarunkowaną szybką kinetyką podziałów mitotycznych i szybkim tempem osiągania całkowitej konfluencji), a także wysoką jakością morfologiczną oraz przeżywalnością komórek w następstwie mrożenia/rozmrzania i w warunkach zahamowania kontaktowego ich podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji. Wszystkie te cechy determinują *a priori* relatywnie wysoką przydatność wyprowadzonych linii komórek BM-MSCs pod kątem ich późniejszego wykorzystania do zabiegów transformacji genetycznej przy zastosowaniu metody nukleofekcji.
2. Przydatność wyprowadzonych hodowli pierwotnych i linii komórek BM-MSCs do klonowania somatycznego świń była/jest weryfikowana w oparciu o ocenę kompetencji jąder tych komórek do pokierowania przed- i poimplantacyjnym rozwojem nietransgenicznym

zarodków klonalnych, transferowanych chirurgicznie do dróg rozrodczych 4 samic-biorczyń. Wyniki badań USG 4 loch-biorczyń zarodków potwierdziły obecność pęcherzy płodowych w rogach macicy 2 biorczyń, co wskazuje na odsetek ciężarnych loch utrzymujący się na poziomie 50% w okresie przypadającym między 30-tym a 35-tym dniem po transferze zarodków klonalnych do jajowodów samic-biorczyń (Fot. 1).



Fot. 1. Ultrasonogram potwierdzający obecność płodu klonalnego w macicy ciężarnej lochy-biorczyny nr MSC/3 (diagnostyka USG przeprowadzona w 35. dniu po transferze zarodków klonalnych do dróg rozrodczych samicy-biorczyny)

Zadanie 04-19-09-21

Jakościowa i funkcjonalna analiza mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych poubojowo ze szpiku kostnego świni, krowy i konia

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

Celem niniejszego zadania badawczego będzie ustalenie dopuszczalnego czasu i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej u świni i konia, z których izolowane będą MSC. Ponadto planuje się opracowanie warunków kriokonserwacji heterogennych komórek (MSC i HSC) wyizolowanych ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej pobranych poubojowo i przyżyciowo (kontrola) u świni i poubojowo u konia oraz ocenę funkcjonalną uzyskanych MSC po uboju zostanie przeprowadzona poprzez ich odróżnicowanie w iPSC. Dodatkowo opracowana zostanie izolacja MSC ze szpiku pobranego od krowy. Ocena funkcjonalna uzyskanych MSC po uboju zostanie przeprowadzona poprzez odróżnicowanie świńskich MSC w iPSC.

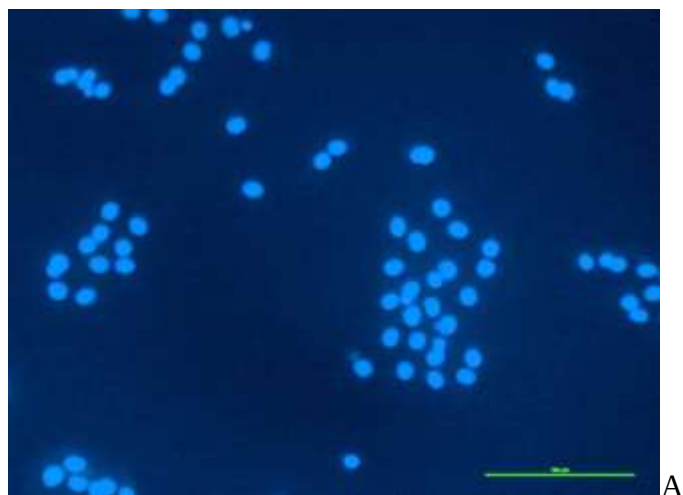
Przeprowadzono doświadczenia obejmujące:

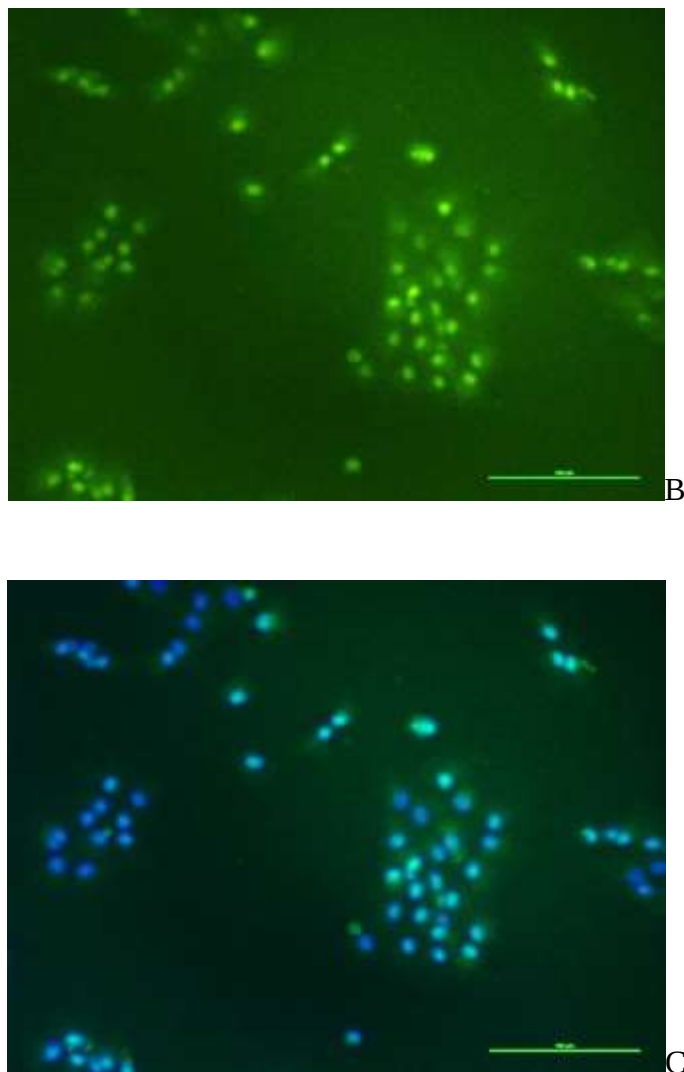
1. pobieranie poubojowo szpiku od a) konia, b) świni, c) krowy,
2. izolację komórek MSC świni ze szpiku,
3. wyprowadzenie linii pierwotnej MSC i hodowla *in vitro*,
4. potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC na poziomie białek przy użyciu cytometrii przepływowej i immunocytochemii,
5. kriokonserwację MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranych poubojowo i przyżyciowo świni i poubojowo konia,
6. lipofekcję MSC z użyciem egzogennych cząsteczek DNA kodujących białka SOX2, KLF4, Oct4 i c-myc, przy wykorzystaniu technologii CRISPR/Cas9 – usługa UP Poznań,
7. odróżnicowanie MSC w kierunku komórek iPSC.

Nie wykonano potwierdzenia pluripotentnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC na poziomie białek przy użyciu cytometrii przepływowej- SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 z uwagi na niepomyślne odróżnicowanie w iPSC.

Podsumowanie wyników

- Ustalono dopuszczalny czas i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego u świni, konia i krowy z których izolowane będą MSC.
- Opracowano izolację MSC ze szpiku pobranego od krowy.
- Opracowano warunki kriokonserwacji MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranych poubojowo i przyżyciowo (kontrola).
- Przeprowadzono ocenę funkcjonalną uzyskanych MSC po uboju poprzez odróżnicowanie świńskich MSC w iPSC – ocena zakończona niepowodzeniem.





Fot. 1. Ekspresja markera CD105 komórek mezenchymalnych świni (powiększenie: 400x)
3A) wybarwienie DAPI, 3B) barwienie przeciwciałem anti-CD105, 3C) po nałożeniu obrazów

Zadanie 01-19-06-11

Wpływ parametrów jakościowych nasienia seksowanego na płodność inseminowanych jałówek i krów mlecznych

Kierownik zadania: dr hab. Piotr Gogol, prof. IZ PIB

Celem pracy jest lepsze poznanie strukturalnych i metabolicznych zmian odpowiedzialnych za spadek jakości nasienia seksowanego oraz określenie zależności pomiędzy badanymi parametrami jakości nasienia seksowanego a płodnością inseminowanych samic.

Założenia metodyczne

Badania prowadzone są na dostępnym komercyjnie nasieniu seksowanym buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Wykonuje się badanie podstawowych cech nasienia, takich jak koncentracja plemników i ruchliwość z uwzględnieniem szczegółowych parametrów kinetycznych (system CASA). Jednocześnie przy wykorzystaniu technik mikroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej i luminometrii ocenia się zmiany apoptotyczne, stres oksydacyjny, aktywność metaboliczną oraz stan chromatyny plemników. W celu określenia zdolności zapładniającej seksowanego nasienia przeprowadzone są inseminacje jałówek i krów.

Syntetyczny opis wyników

W okresie sprawozdawczym zakupiono do badań seksowane i nieseksowane nasienie buhajów rasy holsteińsko-fryzyskiej. Nasienie seksowane pochodziło od 20 buhajów (22 ejakulatory), natomiast nasienie nieseksowane od 17 buhajów (18 ejakulatów). Oceniono 19 ejakulatów nasienia seksowanego oraz 7 ejakulatów nasienia nieseksowanego. Wyniki dotychczas przeprowadzonych analiz zamieszczono w tabeli 1 i 2. W celu oceny zdolności zapłodniającej nasienia seksowanego przeprowadzono inseminację 750 jałówek i krów. Z tego 680 inseminacji przeprowadzono w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o., a 70 inseminacji w ZD IZ PIB Chorzów sp. z o.o. Nasieniem nieseksowanym zainseminowano 934 krowy w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. Po minimum 35 dniach od zabiegu inseminacji przeprowadzano badanie USG na ciążę. Wstępne wyniki (na podstawie już wykonanych badań USG) wskazują, że wskaźnik zaciężeń dla nasienia seksowanego waha się od 13,6% do 73,3% (Tab. 3), natomiast dla nasienia nieseksowanego od 2,2% do 40,0% (Tab. 4).

Na obecnym etapie badań jest za wcześnie na podsumowanie wyników.

Tab. 1. Parametry jakościowe nasienia seksowanego

Lp.	Buhaj (nr ejakulatu)	Błony komórkowe			SCSA	CASA
		żywe	zamierające	martwe	uszkodzona chromatyna	ruch postępowy mln/ml
1	ALLSTAR 449 (18109)	49,72%	8,67%	41,61%	2,37%	-
2	BAYLABOY 285	45,88%	5,85%	48,27%	2,24%	-
3	BLACKGOLD 094	16,69%	30,00%	53,31%	4,99%	-
4	GREENWAY 17306	34,32%	6,88%	58,80%	4,02%	-
5	GREENWAY 17356	46,84%	9,89%	43,27%	1,98%	7,41
6	HONDO 246	46,57%	6,22%	47,21%	4,55%	-
7	JEEPSON 16292	48,78%	8,23%	42,99%	5,11%	-
8	LUKSUS 022	69,00%	7,51%	23,48%	3,07%	4,55
9	LUNDY 707	38,21%	11,32%	50,48%	2,33%	-
10	MALDEVES 228	61,26%	9,75%	28,98%	2,24%	3,16
11	MALDEVES 230	52,67%	6,04%	41,29%	2,39%	3,31
12	MAYFLOWER 621	65,37%	12,35%	22,28%	5,83%	4,19
13	MEGABIT 331	44,24%	8,93%	46,83%	3,32%	2,14
14	MISSOURI 462	63,62%	8,24%	28,14%	2,77%	6,08
15	MOZILA 18053	56,05%	7,60%	36,35%	2,99%	2,07
16	PHARO 975	54,20%	8,65%	37,14%	2,43%	5,20
17	SUTTON 757	54,50%	8,72%	36,78%	1,93%	3,76
18	TENPIN 293	27,21%	2,83%	69,91%	2,09%	-
19	WINDMILL 610	69,62%	6,76%	23,62%	1,56%	-

Tab. 2. Parametry jakościowe nasienia nieseksowanego

Lp.	Buhaj	Błony komórkowe			SCSA	CASA
		żywe	zamierające	martwe	uszkodzona chromatyna	ruch postępowy mln/ml
1	Davis	63,89%	8,15%	27,96%	2,45%	64,17
2	Konga	70,46%	10,46%	19,08%	1,31%	59,06
3	Declic	32,36%	10,26%	57,38%	0,71%	46,97
4	Luxe	56,17%	14,45%	29,37%	1,49%	67,17
5	Mr Rosco	37,38%	12,86%	49,76%	1,22%	66,76
6	Alvin	-	-	-	1,77%	27,62
7	Mantle	-	-	-	2,89%	-

Tab. 3. Wskaźniki zacieleń uzyskane dla nasienia seksowanego

Lp.	Nazwa buhaja (nr ejakulatu)	Liczba samic inseminowanych	Wskaźnik zacieleń (%)
1	Mozilla sex	30	43,0
2	Mayfower sex	31	29,0
3	Luksus sex	22	13,6
4	Pharo sex	60	46,7
5	Megabit sex	21	33,3
6	Maldives sex (228)	112	43,2
7	Maldives sex (230)	-	-
8	Missouri sex	97	51,6
9	Sutton sex	52	37,3
10	Greenway (356)	35	25,7
11	Hondo sex	46	21,7
12	Baylaboy sex	24	62,5
13	All star sex (109)	19	36,8
14	Tenpin sex	46	26,7
15	Lundy sex	21	57,0
16	Windmill sex	26	23,1
17	Greenway (306) C	-	-
18	Blackgold C	25	60,0
19	All Star sex (109) C	23	30,0
20	Jeepson C	22	73,3
21	Landview sex	31	38,7
22	Soltan SEX	-	-
23	Casino SEX	7	71,4

Tab. 4. Wskaźniki zacieleń uzyskane dla nasienia nieseksowanego

Lp.	Nazwa buhaja (nr ejakulatu)	Liczba samic inseminowanych	Wskaźnik zacieleń (%)
1	Davis	221	25,2
2	Alvin	43	14,0
3	Luxe	44	36,4
4	Mr Rosco	21	33,3
5	Declic	47	30,4
6	Konga	44	20,5
7	Mantle	79	11,5
8	DANCO TRYT	46	28,9
9	ETOS	45	2,2
10	BRODIE	95	26,6
11	ARTIST	26	15,4
12	JABARI	46	19,1
13	LYODER	60	27,0
14	LOCKSTAR	47	27,7
16	LANTON (012)	45	23,3
17	FISKO	25	40,0

Zadanie 01-19-07-11
Wykorzystanie kriokonserwacji nasienia w programie hodowlanym Gęsi Białej Kołudzkiej®
Kierownik zadania: dr hab. Mirosław Lisowski

Celem zadania jest ochrona puli genowej Gęsi Białej Kołudzkiej® *ex situ* oraz wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia w celu poprawy efektywności zapłodnienia Gęsi Białej Kołudzkiej®.

W IZ PIB ZD Kołuda Wielka, należącym do Instytutu Zootechniki PIB utrzymywane są dwa czyste rasy gęsi (W-11 i W-33), tworzące zestaw handlowy Gęś Biała Kołudzka®. Zestaw ten jest jedynym w Polsce i jednym z nielicznych w Europie i na świecie zestawów przeznaczonych do produkcji mieszańców towarowych gęsi.

W bieżącym roku opracowano (przystosowywano) metodę zamrażania nasienia gęsiorów w parach azotu. W tym celu nasienie po pobraniu i ocenie koncentracji plemników poddawano procesowi kriokonserwacji.

W pierwszym etapie zostało ono rozrzedzone rozcieńczalnikami w stosunku 2:1, następnie schłodzone do temperatury 4°C (przez 15 minut). W kolejnym etapie dodawano DMF – Dime-tyloformamid (do stężenia końcowego 6%) i przeprowadzono ekwilibrację przez 5 minut w temperaturze 4°C. Tak przygotowaną mieszaninę umieszczono w słomkach nad lustrem ciekłego azotu i schłodzono do temperatury -140°C. Następnie słomki przenoszono do ciekłego azotu. W trakcie badań zastosowano dwie wysokości, na których umieszczano słomki nad lustrem ciekłego azotu – 10 i 20 mm. Nie wykazano istotnego wpływu wysokości na jakiej umieszczano słomki na procent plemników żywych po rozmrożeniu. W obu przypadkach stwierdzono około 80 procentową przeżywalność plemników gęsi.

Ze względu na to, iż część badań wykonywana może być tylko w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji w Balicach, konieczne było opracowanie metody schładzania nasienia gęsiorów do temperatury umożliwiającej transport nasienia przez około

6-7 godzin. W tym celu wykorzystano termocykler PTC-100 (Programmable Thermal Controller) firmy MJ Research, Inc. Pobrane i ocenione pod kątem liczebności plemników nasienie, rozcieńczano w stosunku 1:1 i 1:2 rozcieńczalnikiem. Tak przygotowane nasienie schładzano do temperatury 21°C, 17°C i 4°C. Nie wykazano wpływu ilości rozcieńczalnika na procent plemników żywych schładzanych przez 7 godzin. Stwierdzono natomiast wpływ temperatury. I tak, największą przeżywalność plemników wykazano w przypadku utrzymywania rozcieńczonego nasienia w temperaturach 21°C i 17°C – około 80%. W temperaturze 4°C przeżywalność nasienia była około 25-30% niższa.

Zadanie 04-19-01-21

Wyprowadzenie linii podwójnie transgenicznych świń dla genów nGal x MCPIP

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Jura, prof. IZ PIB

Celem badawczym zadania było uzyskanie podwójnie transgenicznych świń nGal x MCPIP. Przeprowadzenie badań przesiewowych na obecność PERV. Ustalenie profilu metylacyjnego dla genu MCPIP.

W ramach przeprowadzonych prac wykonano badania przesiewowe na obecność świńskich retrowirusów z grup A, B, i C u stawki wybranych osobników transgenicznych z ekspresją genów MCPIP – 14 osobników oraz 16 osobników z grupy kontrolnej. Ekspresję badano na poziomie DNA i RNA. W oparciu o uzyskane wyniki wybrano 8 transgenicznych osobników MCPIP, u których stwierdzono śladowe wyniki obecności DNA i RNA PERV podgrup B i C. Bazując na wcześniej uzyskanych wynikach badań przesiewowych na obecność PERV wybrano 6 osobników transgenicznych dla nGal, u których odnotowano obecność PERV z podgrup B i C. Wystandaryzowano reakcję PCR, ustalając procedurę weryfikacji DNA na obecność transgenów nGal i MCPIP, którą zastosowano do screeningu potencjalnie transgenicznych prosiąt uzyskanych w rezultacie przeprowadzonego planu kojarzeń. W ostatecznym planie kojarzeń uwzględniono 5 świń transgenicznych dla nGal : 3 lochy – 427, 336, 338 i 2 knury – 467 homozygota, 339 oraz 3 świny transgeniczne dla genu MCPIP: 2 lochy 94, 95 i knura 39. W rezultacie przeprowadzonych kojarzeń uzyskano 54 potencjalnie transgeniczne prosięta. Od prosiąt pobrano wycinki tkanki usznej i przekazano do analiz molekularnych mających na celu zbadanie ekspresji genów nGal i MCPIP u uzyskanych prosiąt. Analizy molekularne wykazały, że 16 z 54 prosiąt jest transgenicznych dla genu nGal. U żadnego z wyprodukowanych prosiąt nie stwierdzono ekspresji genu MCPIP. Od osobników transgenicznych dla nGal pobrano próbki krwi, na których wykonano analizy poziomu ekspresji wirusów PERV. Ekspresję badano na poziomie DNA i RNA. Przeprowadzone analizy wykazały śladowe ilości lub brak retrowirusów PERV z podgrup B i C. Przyczyną braku transmisji genu MCPIP mogło być jego wbudowanie się w odcinek telomerowy. Osobniki wyjściowe pokolenia F0 zostały uzyskane poprzez standardową mikroiniekcję DNA. W omawianych pracach wykorzystano osobniki F2. Prawdopodobieństwo utraty transgenu w kolejnym pokoleniu wielokrotnie więc wzrosło. Osobniki nGal pokolenia F0 uzyskano stosując technologie palca cynkowego – ZFN. Knock-out uzyskany tą technologią powoduje, że modyfikacja genetyczna jest trwała i odziedziczalna. Występowanie świńskich retrowirusów z podgrup B i C u uzyskanych prosiąt kształtowało się na poziomie normalnej zmienności dla analizowanych świń, co mogło być spowodowane brakiem ekspresji genu MCPIP. Ponieważ nie uzyskano podwójnie transgenicznych osobników dla MCPIP i nGal, nie można było zweryfikować przyjętej tezy, jak również nie udało się ustalić profilu metylacyjnego dla genu MCPIP. Uzyskano natomiast osobniki nGal – z knock-out genu 1,3 galaktozylotransferazy, które stanowią cenny materiał badawczy. Są między innymi wykorzystywane w badaniach z zakresu medycyny regeneracyjnej i stanowią materiał pozwalający na utrzymanie linii transgenicznych świń.

Zadanie 04-19-02-21

Modyfikacja hodowli *in vitro* zarodków świni uzyskanych pozaustrojowo

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

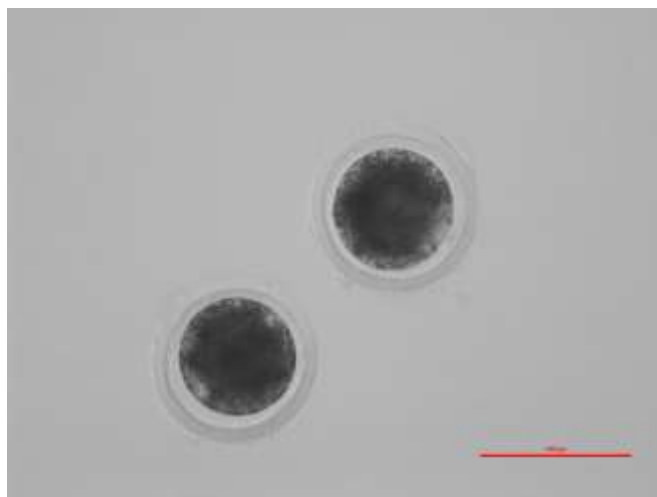
Celem badań jest rozwój technologii pozaustrojowego uzyskiwania zarodków świni a zwłaszcza poprawa efektywności hodowli *in vitro* zarodków uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro*.

W pierwszym etapie badań ustalano optymalną koncentrację antyoksydantów, takich jak: resweratrol, kwas askorbinowy (witamina C) lub tokoferol (witamina E) jako dodatków do hodowli zarodków świni. Materiał doświadczalny stanowiły niedojrzałe oocyty świni uzyskiwane z jajników loch po uboju. Oocyty poddawano dojrzewaniu *in vitro* do stadium metafazy II a następnie zapładniano *in vitro* metodą standardową. Uzyskane potencjalne zygoty hodowano *in vitro* w pożywce standardowej NCSU-23 z dodatkiem różnych koncentracji resweratrolu (grupa dośw. 1), witaminy C (grupa dośw. 2), witaminy E (grupa dośw. 3) lub bez dodatku tych związków (grupa kontrolna).

Ponieważ przeprowadzone próby suplementacji pożywki resweratrolem oraz witaminą E nie dały pozytywnych rezultatów, w drugim etapie badań do hodowli zygot świni zastosowano optymalną koncentrację tylko jednego antyoksydantu, tj. witaminy C w ilości 10 lub 20 µg, jako suplementu do pożywki NCSU-23. Potencjał rozwojowy zygot określano na podstawie odsetka zarodków dzielących się oraz odsetka morul i blastocyst. Uzyskane zarodki poddawano kompleksowej ocenie jakości obejmującej morfologię, tempo rozwoju, całkowitą liczbę komórek w blastocystach, liczbę komórek apoptotycznych oraz poziom aktywnych form tlenu.

Optymalnym wariantem hodowli potencjalnych zygot uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* okazał się dodatek do pożywki NCSU-23 antyoksydantu w postaci 20 µg witaminy C. W tak zmodyfikowanej pożywce do hodowli zarodków świni odsetek uzyskanych blastocyst był najwyższy (51,3%) i statystycznie różnił się ($P < 0.01$) od wyników uzyskanych po hodowli zarodków w standardowych warunkach. Tempo rozwoju zarodków hodowanych w obecności 20 µg witaminy C było nieco wyższe w porównaniu do kontroli, jednak nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Blastocysty wyprodukowane w wyniku hodowli z witaminą C zawierały nieco wyższą całkowitą liczbę komórek oraz niższą liczbę komórek apoptotycznych w porównaniu do blastocyst hodowanych bez tego dodatku, jednak nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono statystycznie istotnie niższy poziom reaktywnych form tlenu w blastocystach hodowanych w obecności witaminy C 20 µg/ml w porównaniu do blastocyst rozwijających się w medium bez tego antyoksydantu.

Przeprowadzone badania dotyczące modyfikacji warunków hodowli zarodków świni uzyskanych pozaustrojowo wykazały, że dodatek do pożywki antyoksydantu w postaci witaminy C stwarza najlepsze warunki hodowli. Proponowana modyfikacja może stać się elementem nowej, bardziej wydajnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania zarodków świni.



Fot. 1. Oocyty świni po dojrzewaniu *in vitro*. Pod osłonką przejrzystą w przestrzeni okołozótkowej widoczne ciała kierunkowe świadczące o osiągnięciu stadium Metafazy II



Fot. 2. Blastocysta świni – DNA pojedynczych blastomerów wybarwione na niebiesko DAPI

Zadanie 04-19-03-21

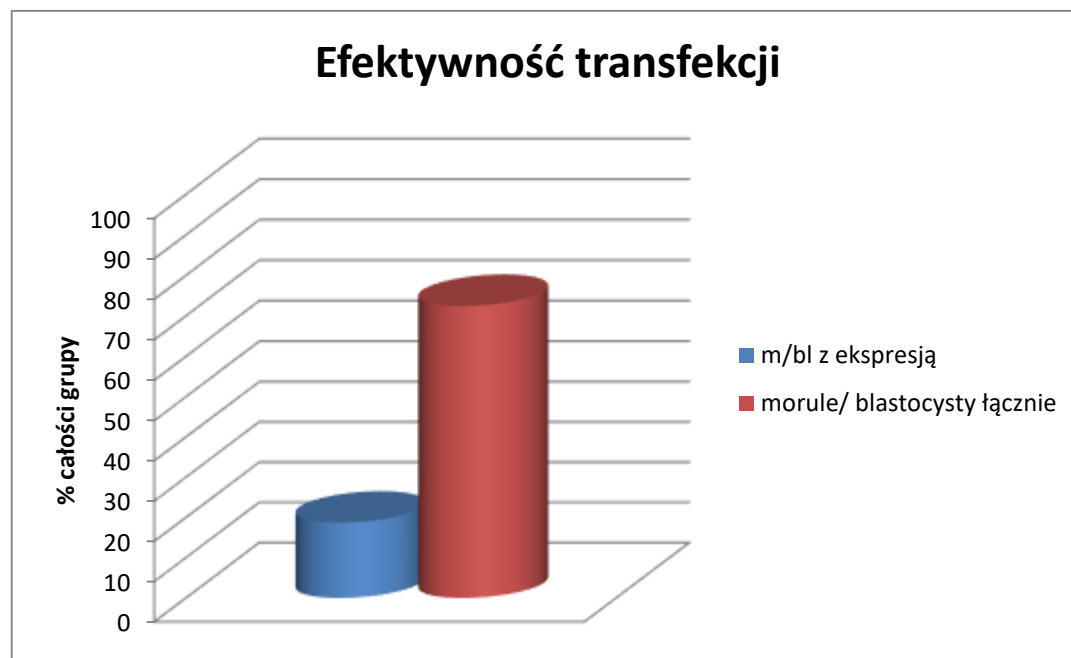
***Opracowanie metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek
– badanie *in vitro****

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Jura, prof. IZ PIB

Celem badawczym zadania jest opracowanie nowej metody transfekcji zygot, która będzie umożliwiała wielokierunkową modyfikację genotypu biorcy. Celem zrealizowanego etapu było ustalenie efektywności transfekcji zygot królika przy zastosowaniu kompleksu nanokarier/DNA – badania *in vitro* oraz kontynuacja badań nad wpływem nieorganicznych nanocząstek – Gold- PEI (polyethylenimine nanoparticles 10nm- spheres) na rozwój zygot królika hodowanych *in vitro*.

W ramach przeprowadzonych prac zabiegowi synchronizacji i superowulacji poddano 46 samic królika (rasa Nowozelandzki Biały), od których uzyskano 515 zapłodnionych komórek jajowych (zygot). 337 zygot poddano transfekcji kompleksem nanokarier/DNA w stosunku 50 ng/ μ l:25ng/ μ l (2:1). Optymalny stosunek mieszaniny nanokarier/DNA ustalono przeprowadzając analizę retardacyjną mieszanin o różnych stężeniach na żelu agarozowym. 178 zygot stanowiło grupę kontrolną – zygoty niemanipulowane. Przed transfekcją (wprowadzeniem kompleksu nanokarier/DNA do przestrzeni okołozótkowej), przygotowywano świeże rozcieńczenia nanokariera w ddH₂O, który poddawano sonifikacji – 1 min/maksymalne natężenie, 4 min/średnie natężenie, w celu dyspersji i rozluźnienia wiązań tak, aby uzyskać jego stężenie 50 ng/ μ l. Następnie dodawano DNA w postaci konstruktów reporterowych RFP o stężeniu 25 ng/ μ l. Mieszaninę nanokarier/DNA o objętości 100 μ l inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut w celu związania kompleksu. Po inkubacji napętniano pipety iniekcyjne, które umieszczano w temperaturze 4°C. Kompleks nanokarier/DNA wprowadzano do przestrzeni okołozótkowej zygot. Po zabiegu transfekcji, zygoty umieszczano w pożywce do hodowli i hodowano przez 7 dni w inkubatorze – 39°C, 5%CO₂. Tempo rozwoju sprawdzano po 48:72 i 156 godzinach od rozpoczęcia hodowli *in vitro*. Zygoty z grupy kontrolnej (niemanipulowane) przechowywano w temperaturze pokojowej, przez okres wykonywania transfekcji, a następnie razem z grupą doświadczalną przenoszono do hodowli stosując identyczną procedurę.

Na podstawie analizy retardacyjnej ustalono, że pełne wiązanie pomiędzy nanocząstkami złota z wypustkami PEI a DNA następuje przy stosunku stężeń 50 ng/ μ l:25 ng/ μ l. Do ustalenia efektywności transfekcji zygot królika przy zastosowaniu kompleksu nanokarier/DNA zastosowano taki wariant stężeń. Z 337 zygot poddanych transfekcji, w wyniku hodowli uzyskano 244 zarodki w stadium moruli/blastocysty (72,4%) z czego 63 (18,7%) zarodki wykazały ekspresję białka RFP. Ze 178 zygot grupy kontrolnej (niemanipulowane) stadium moruli blastocysty osiągnęło 138 zarodków (77,5%).



Wykr. 1. Odsetek zarodków w stadium moruli/blastocysty z ekspresją RFP w odniesieniu do ogólnej liczby zarodków w stadium moruli/blastocysty uzyskanych po transfekcji

Zadanie 04-19-04-21

Zdolność MSC pozyskiwanych poubojowo ze szpiku kostnego transgenicznych świń i nietransgenicznych owiec i koni do różnicowania w adipocyty, osteoblasty i chondrocyty

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

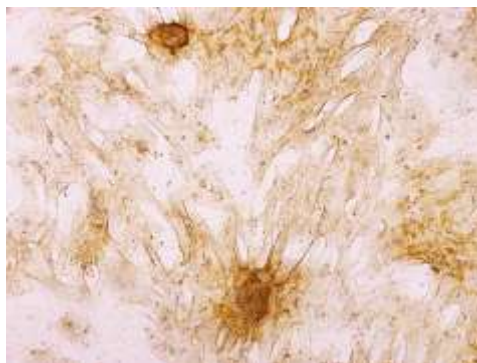
Celem niniejszego zadania badawczego jest wykazanie czy możliwe jest uzyskanie prawidłowych morfologicznie i funkcjonalnie mezenchymalnych komórek macierzystych, które izolowane są ze szpiku kostnego aspirowanego od zwierząt po uboju. Ponadto celem jest wyprowadzenie stabilnych linii MSC od transgenicznej świni oraz nietransgenicznej owcy i konia. Linie te zostaną ocenione morfologicznie, molekularnie oraz funkcjonalnie. Potwierdzone linie MSC świńskie, końskie i owcze będą mrożone i magazynowane.

W trakcie realizacji etapu zadania:

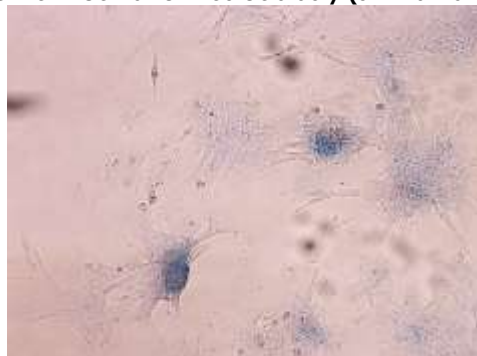
- Pobrano poubojowo szpik kostny i wyizolowano komórki MSC od: 3 osobników nietransgenicznej świni przyżyciowo (kontrola do transgeny GGTA1 po uboju); 13 osobników koni po uboju; 4 tryków i 2 owiec po uboju.
- Wyprowadzono linie pierwotne MSC świni, owcy i konia i hodowano *in vitro* do pełnej konfluencji.
- Morfologicznie potwierdzono mezenchymalny charakter wyprowadzonych linii komórek MSC (obecność w hodowli charakterystycznych kolonii). Nie wykonano oceny ekspresji markerów metodą cytometrii przepływowej. Przetestowano nowo zakupione przeciwciała na antygeny komórkowe (markery) komórek konia (FC-flow cytometry).
- Oceniono markery powierzchniowe pozytywne i negatywne MSCs konia metodą qPCR,
- Zamrożono linie MSC wyizolowane ze szpiku kostnego pobranego poubojowo od świni, owcy i konia. Zbankowano następujące liczby kriopróbek: świnka – 19 próbek, koń – 18 próbek, owca – 27 próbek (w tym 3 próbki owce, 24 próbki tryki).
- Różnicowano MSC świni, owcy i konia w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty, stosując 4 różne pożywki celem wyboru najbardziej optymalnej dla każdego gatunku. Różnicowanie wykonano na 5 koniach, 2 owcach (samiec i samica) oraz 3 świniach (2 osobniki nietransgeniczne i 1 transgeniczna).
- Wykonano następujące barwienia po różnicowaniu komórek zamiast planowanej analizy PCR:
 - w kierunku osteoblastów: von Kossa i/lub Alizarin Red,
 - w kierunku chondrocytów: Alcian Blue,
 - w kierunku adipocytów: Oil Red O.
- Różnicowanie MSC świni transgenicznej w:
 - adipocyty – brak różnicowania
 - osteoblasty – zakończone sukcesem
 - chondrocyty – zakończone sukcesem
- Różnicowanie MSC świni nietransgenicznej (kontrola) w:
 - adipocyty – brak różnicowania
 - osteoblasty – zakończone sukcesem
 - chondrocyty – zakończone sukcesem
- Różnicowanie MSC konia w:
 - adipocyty – zakończone sukcesem
 - osteoblasty – zakończone sukcesem
 - chondrocyty – zakończone sukcesem

- Różnicowanie MSC owcy w:
 - adipocyty – brak różnicowania
 - osteoblasty – brak różnicowania
 - chondrocyty – brak różnicowania

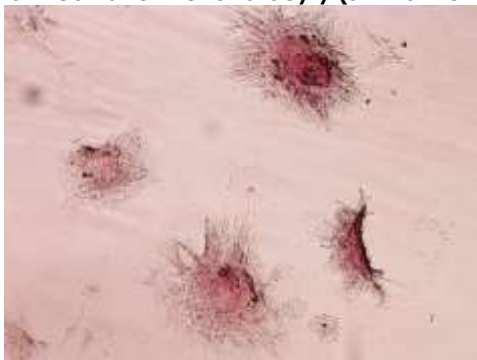
Poniżej przedstawiono przykładowe zdjęcia barwień u poszczególnych gatunków:



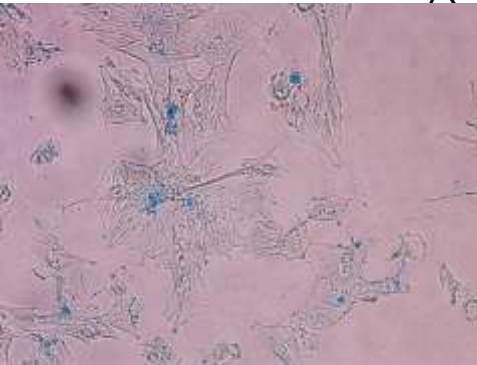
Fot. 1. MSC zróżnicowane w osteoblasty (świnia transgeniczna)



Fot. 2. MSC zróżnicowane w chondrocyty (świnia nietransgeniczna)



Fot. 3. MSC zróżnicowane w osteoblasty (koń)



Fot. 4. MSC zróżnicowane w chondrocyty (koń)

Zadanie 04-19-06-11

Tworzenie rezerwy nasienia buhaja o potwierdzonej zdolności zapładniającej dla potrzeb nauki i praktyki

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

Celem głównym zadania było pozyskanie nasienia najądrzowego buhaja o wysokiej zdolności zapładniającej, które wykorzystywane będzie w pracach badawczo-rozwojowych z zakresu pozaustrojowej produkcji zarodków bydłych.

Pozyskano jądra od 7 sztuk buhajów. Do mrożenia zakwalifikowano nasienie od czterech sztuk. Dla nasienia od dwóch buhajów przeprowadzono próbę mrożenia w dwóch rozrzedzalnikach. Nasienie mrożone w Bioxcellu wykazało mniejszy odsetek plemników ruchliwych niż nasienie zamrożone w rozrzedzalniku cytrynianowo-fruktozowo-żółtkowym. Po rozmrożeniu do zapłodnienia zakwalifikowano nasienie pochodzące od 16-miesięcznego buhaja rasy HO. Testowane nasienie spełniało wymagany próg podziałów zarodkowych na poziomie powyżej 70% jednak uzyskane liczby blastocyst odbiegają od oczekiwanych. Testowane nasienie jest statystycznie istotnie gorsze ($P < 0,01$; test χ^2) od dotychczas używanego (kontrolnego).

Kolejne próby mrożenia nasienia najądrzowego wykonano na materiale pozyskanym od ośmiu buhajów. Plemniki po nacięciu powierzchni ogona najądrzy aspirowano za pomocą pipety do rozrzedzalnika cytrynianowo (2,9%) – fruktozowo (1,25 g/100 ml) – żółtkowego (20%). Po aspiracji plemników do mrożenia zakwalifikowano 5 próbek. Kryterium kwalifikacji była ruchliwość plemników powyżej 60%. Zamrożone nasienie przenoszono do kontenerów z ciekłym azotem na co najmniej 20 godz. W dniu następnym nasienie rozmrażano w łaźni wodnej o temp. 37°C i oceniano mikroskopowo. Wykazano ruchliwość po rozmrożeniu od 20 do 40%. Ruch plemników podrażniony (drgający). Zaobserwowano liczne krople protoplazmatyczne na wijkach i inne zmiany morfologiczne takie jak luźne główki, pętelki na wijkach czy efekt Daga. Nasienie nie kwalifikowało się do prób IVF.

Nie uzyskano nasienia zdolnego do wykorzystania w pracach z zakresu IVF/IVP dla potrzeb badawczo-rozwojowych i dla potrzeb praktyki. Liczba eksperymentów wynika z dostępności materiału. Wcześniejsze doświadczenia pokazały, że nie przynosi oczekiwanych rezultatów pobieranie nasienia od buhajów które wcześniej nie były wykorzystywane w tym celu. Dlatego eksperymenty uwarunkowane są ubojami buhajów, które pochodzą ze stacji unasienniania zwierząt.

W ramach tego zadania kilkakrotnie wykonano procedurę pozyskiwania zarodków *in vitro* u bydła celem uzysku blastocyst do prób mrożenia. Opanowanie techniki mrożenia stało się naglące z uwagi na powołanie zespołu do pozyskiwania zarodków bydła. Wykonano 6 doświadczeń IVF/IVC na materiale rzeźnym i 1 doświadczenie na zarodkach wytlukanych od 1 jałówki. Zamrożono w pożywce komercyjnej 13 zarodków natomiast 25 blastocyst ekspandujących poddano witrifikacji stosując metodykę jak dla blastocyst świni. Po rozmrożeniu uzyskano 22 blastocysty które włożono do hodowli *in vitro*. Po 48 godz. hodowli 9 (40,9%) blastocyst osiągnęło stadium ekspandującej blastocysty lub wylęzło się.

Zadanie 04-19-07-21

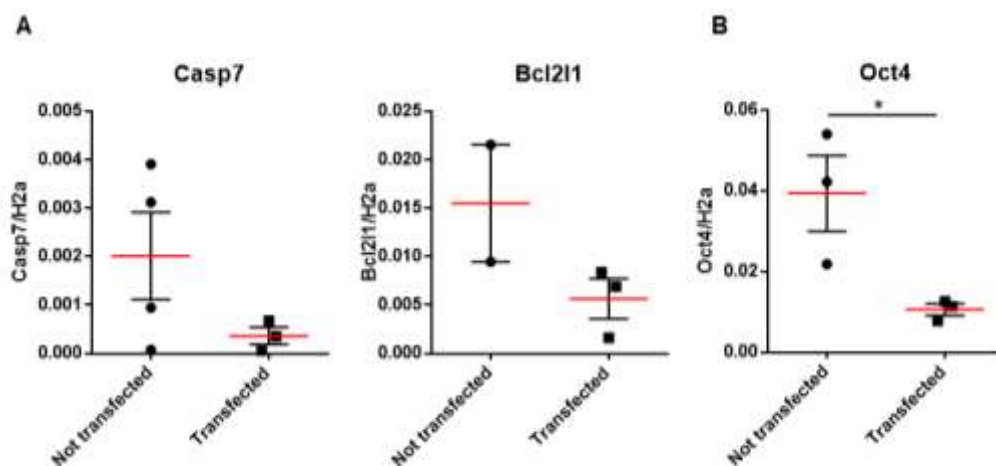
Wpływ transfekcji z zastosowaniem nanocząstek i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój w zarodkach królika

Kierownik zadania: mgr inż. Natalia Dzięgieł

Celem pracy jest zbadanie wpływu transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek na potencjał rozwojowy transgenicznych zarodków królika uzyskanych *in vitro* oraz ustalenie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) zastosowanego jako czynnik wspomagający efektywność transfekcji poprzez analizę poziomu ekspresji genów związanych z procesami apoptozy oraz z rozwojem zarodkowym przy wykorzystaniu metody RT-qPCR.

W bieżącym roku zrealizowano etap: Oznaczenie poziomu transkryptów genów CASP7, BAX, BCLXL, OCT4 oraz SOX2 przy pomocy techniki RT-qPCR blastocyst po iniekcji nanocząstek oraz z grupy kontrolnej. W ramach prac od 43 samic królika rasy Nowozelandzkiej Białej poddanych superowulacji uzyskano łącznie 515 zygot. 337 zostało poddanych mikroiniekcji do przestrzeni około żółtkowej kompleksem nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (PEI) połączonych z DNA (wektor pmaxRed-N zawierający gen kodujący białko fluorescencyjne w stosunku 2:1 (stężenia 50:25 ng/μl). Pozostałe 178 zygot nie było poddawane manipulacji. Zarodki po transfekcji oraz niemanipulowane były hodowane *in vitro* przez 6 dni. Po zakończonej hodowli oceniano stopień rozwoju zarodków. Zarodki po transfekcji były oceniane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Do analizy przeznaczono 103 zarodki po transfekcji, które osiągnęły stadium moruli lub blastocysty (grupa A). 53 manipulowane zarodki wykazały ekspresję transgenu – obecność białka fluorescencyjnego (grupa B). Ze 178 zygot niepoddawanych manipulacji uzyskano 106 zarodków w stadium moruli lub blastocysty (grupa kontrolna). Zarodki te zostały zamrożone w ciekłym azocie i następnie poddane analizie ekspresji genów – Casp7, Bax, Bcl11, Oct4, Sox2. Z zarodków wyizolowano RNA przy użyciu odczynnika TRI-Reagent (Biolab) zgodnie z instrukcją podaną od producenta. Następnie, mRNA poddano odwrotnej transkrypcji do cDNA z odwrotną transkryptazą MMLV-RT (Promega) i Random Hexamers (EurX). Reakcję RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu SYBR Green PCR Master Mix (A&A Biotechnology) i amplifikatora QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher). Dane analizowano przy użyciu oprogramowania QuantStudio™ Design & Analysis Software (Thermo Fisher). Wszystkie wartości znormalizowano względem kontroli wewnętrznej H2a. Wartości ekspresji genów obliczono stosując metodę $2^{-\Delta Ct}$.

W analizowanych grupach A (zarodki poddane transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek) i B (zarodki poddane transfekcji, wykazujące ekspresję transgenu) stwierdzono obniżony poziom ekspresji Casp7, Bcl211 oraz Oct4 w stosunku do grupy kontrolnej (zarodki niemanipulowane). W grupie zarodków po transfekcji (grupa A) oraz w grupie zarodków z ekspresją transgenu (grupa B) odnotowano statystycznie istotną różnicę dla genu Oct4, którego poziom ekspresji był niższy w stosunku do grupy kontrolnej (ANOVA, $P < 0,05$) (Ryc. 1).



Ryc. 1. Analiza ekspresji genów w zarodkach poddanych transfekcji plazmidem pmax-FP-RED-N z wykorzystaniem nanocząstek metodą Q-RT-PCR. Poziom ekspresji genów zaangażowanych w procesy apoptotyczne (A) oraz proces różnicowania zarodkowego (B). Poziom ekspresji badanych genów znormalizowano względem kontroli referencyjnej (H2a) a wyniki przedstawiono jako $2^{-\Delta Ct}$.

Uzyskane wyniki wskazują na statystycznie istotny wpływ transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek na ekspresję genu Oct4. Transfekcja z wykorzystaniem nanocząstek nie wpływa na ekspresję pozostałych badanych genów.