

Zakłady Naukowe

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.

Efekt praktyczny

Opracowanie dla praktyki zaleceń hodowlanych i 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.

Metodyka zadania

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 utrzymywane są w zbliżonych warunkach środowiskowych z pełnym wykorzystaniem sezonu pastwiskowego.

Przez okres 20 dni wszystkie wytypowane do doświadczenia zwierzęta zostaną poddane okresowi przejściowemu (adaptacji). Zwierzęta będą otrzymywać specjalnie opracowane dawki pokarmowe wzbogacone ziołami. Czas podawania ziół wynosi 30 dni, preparatów olejowych 60 dni. W tym czasie stale będą monitorowane zmiany masy ciała, zdrowotność i żerność.

Zostaną utworzone 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 omega-6). Zwierzęta z grupy doświadczalnej D2 – oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o zestaw ziół zwiększających żerność oraz 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 *longissimus dorsi* 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 pochodzić będą z obory, rzeźni, jak i samego mięsa w różnych fazach jego przechowywania.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań

Zgodnie z metodyką tematu, 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 okólników.

W pierwszym roku badań utworzono 5 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 badanych grupach rutynowo przeprowadzano kontrolę masy ciała zwierząt. W ramach realizacji I etapu badań (styczeń), przez okres 20 dni, wszystkie wytypowane zwierzęta do doświadczenia zostaną poddane okresowi przejściowemu (adaptacji), a następnie zostanie zastosowana mieszanka ziołowa do pasz.

Mieszanki, które zostały 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,
- ekstrakt z pietruszki,
- ekstrakt z rozmarynu.

B. mieszanka z udziałem oleju:

- olej lniany,
- olej krokoszowy,
- wyłok lniany.

W pierwszym roku badań, w trakcie doświadczenia skierowano do uboju zwierzęta z grupy porównawczej, obejmującej rasę LM oraz ZB. W drugim roku, spośród zwierząt doświadczalnych utworzono 2 grupy, których dawka pokarmowa została wzbogacona dodatkami ziołowymi – mieszanką ziołową nr 1 (grupa D2-Z1) oraz mieszanką olejową (D1). Mieszankę ziołową podawano przez 30 dni, a dodatek z olejami przez ostatnie 60 dni przed ubojem. Zwierzęta po zakończeniu opasu i uzyskaniu odpowiedniej masy ubojowej zostały skierowane do uboju. Dokonano także dysekcji prawej półtuszy od każdej analizowanej sztuki. Wyniki odniesiono do już zgromadzonej bazy z dysekcji bydła rasy LM oraz ubojów bydła z grupy kontrolnej, które dokonano w pierwszym roku, w okresie przygotowawczym do doświadczenia.

Tab. 1. Wyniki dysekcji bydła rasy LM oraz mieszańców – grupa kontrolna

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

Tab. 2. Dysekcja łopatki oraz 4 wyrębów wartościowych – grupa kontrolna

nr krowy	łop.+gol. mięso	łop.+gol. kości	gol. mięso	gol. kość	rozbrat. mięso	rozbrat. kości	antr. mięso	antr. kość	rost. mięso	rost. kość	połędw.	połędw. tłuszcz
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 – grupa kontrolna

nr krowy	zrazowa górna mięso	zrazowa dolna 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

Tab. 4. Wyniki dysekcji bydła rasy LM oraz mieszańców – grupy doświadczalne

nr krowy	rasa LM	płeć	ocena	ocena ott.	% wydaność rzeźna	masa brutto	masa netto	prawa schłodz.	udziec bez gol.	udziec kości
D2-z1-mieszanka ziołowa 1										
5299019429	100	krowa	O	1	53,6	500	268	132,00	37,94	6,54
5336756201	100	krowa	O	1-	50,18	550	276	134,20	43,4	10,9
5414817169	100	jałówka	O+	1+	53,45	550	294	147,00	38,82	6,08
5407110192	100	jałówka	O	1	50,75	400	203	100,50	34,2	5,32
5337544975	100	krowa	R	1+	57,86	580	335,6	165,20	41,99	7,28
D1-olej + wytlaki										
5278558604	100	krowa	O-	1	50,98	510	260	127,80	31,15	7,68
5407110024	100	krowa	O-	1+	53,67	490	263	130,20	31,54	7,42

Tab. 5. Dysekcja łopatki oraz 4 wyrębów wartościowych – grupy doświadczalne

nr krowy	łop+gol. mięso	łop+gol. kości	gol. mięso	gol. kość	rozbrat. mięso	rozbrat. kości	antr. mięso	antr. kość	rost. mięso	rost. kość	połędw. tłuszcz	połędw. tłuszcz
D2-z1-mieszanka ziołowa 1												
5299019429	16,16	5,42	2,40	1,51	3,44	2,40	8,72	6,00	4,66	1,04	3,34	0,54
5336756201	16,44	5,48	2,30	1,60	3,80	2,50	7,92	5,35	3,90	2,50	3,20	0,54
5414817169	12,82	5,66	2,30	1,46	4,14	1,64	8,84	6,12	4,35	1,60	3,74	0,48
5407110192	11,46	3,82	1,62	1,40	2,82	1,28	6,30	4,36	2,68	1,12	2,70	0,40
5337544975	16,22	5,40	2,80	1,74	5,60	1,50	11,58	6,38	5,58	1,68	3,54	0,16
D1-olej + wytlaki												
5278558604	14,06	7,58	1,98	1,52	4,08	1,80	9,06	4,98	2,64	2,00	2,60	0,16
5407110024	9,48	5,34	1,98	1,50	3,92	1,66	8,58	3,40	2,52	1,98	2,48	0,14

Tab. 6. Dysekcja szczegółowa udźca bydła rasy LM i mieszańców – grupy doświadczalne

nr krowy	zrazowa górna mięso	zrazowa dolna mięso	myszka mięso	ligawa mięso	krzyżowa mięso	pręga brutto	pręga mięso	pręga kość	kości, uda i gol.
D2-z1-mieszanka ziołowa 1									
5299019429	9,54	5,85	6,6	2,32	5,76	5,6	2,2	3,05	9,59
5336756201	9,6	7,4	7	2,95		4,57	4,57	2,25	13,15
5414817169	9,2	7,49	5,14	2,58	9,14	5,25	2,25	2,85	8,93
5407110192	7,54	6,04	5,32	2,54	5,38	4,34	1,74	2,6	7,92
5337544975	11,72	7,88	6,84	3,67	3,53	12,39	8,52	3,68	7,28
D1-olej + wytlaki									
5278558604	6,74	4,78	4,34	2,07	3,96	6,01	2,21	3,88	7,68
5407110024	6,36	4,54	4,82	1,8	3,94	6,36	2,3	3,72	7,42

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

Dojrzewanie prowadzono klasyczną metodą „na mokro” z wykorzystaniem chłodziarki. Wyniki odnoszono do uzyskanych w pierwszym roku danych, pochodzących od zwierząt z grupy porównawczej K.

W trzecim roku badań zostanie dokończona faza badawcza – opas z wykorzystaniem mieszanki ziołowej (mieszanka ziołowa 2).

Oprócz badań laboratoryjnych (analiza profilu kwasów tłuszczowych, zawartości witaminy E i cholesterolu), przeprowadzono wstępne badania jakości mięsa wołowego, przy zastosowaniu techniki dojrzewania mięsa „na sucho”, z wykorzystaniem specjalistycznej szafy do sezonowania mięsa z możliwością kontroli temperatury i wilgotności. Po zakończonym okresie dojrzewania mięsa, do obróbki cieplnej zastosowano metodę „sous-vide”, w ramach której mięso zapakowane próżniowo przygotowywano w łaźni wodnej ze stałą temperaturą na poziomie 55°C.

Zadanie 04-10-03-11

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

Kierownik zadania: dr hab. Iwona Radkowska

Celem realizowanego zadania było określenie wpływu preparatu probiotycznego oraz autorskich mieszanek zawierających 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 do 60. dnia życia był podawany preparat mlekozastępczy w stacji odpajania. 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 powyżej 100 g na litr, co pozwoliło na uzyskanie ujednoliconego pod względem odporności i możliwości adaptacji materiału doświadczalnego.

Układ doświadczenia obejmował sześć grup doświadczalnych:

- Grupa I – grupa kontrolna.
- Grupa II – cielęta otrzymujące preparat probiotyczny.
- Grupa III – cielęta otrzymujące mieszankę ekstraktów ziołowych nr 1.
- Grupa IV – cielęta otrzymujące mieszankę ekstraktów ziołowych nr 2.
- Grupa V – cielęta otrzymujące mieszankę ekstraktów ziołowych nr 3.
- Grupa VI – cielęta otrzymujące mieszankę ekstraktów ziołowych nr 4.

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 grup III-VI otrzymywały od 2. dnia po urodzeniu autorskie mieszanki zawierające ekstrakty ziołowe, mające korzystnie wpłynąć na kondycję, odporność oraz przyrosty masy ciała. Dawka terapeutyczna dobrana została na podstawie wytycznych farmakopealnych 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 drobnoustrojów patogennych w 7., 30. i 60. dniu po urodzeniu pobierany był od cieląt kał. Na tym materiale wykonano oznaczenia mikrobiologiczne i parazytologiczne.

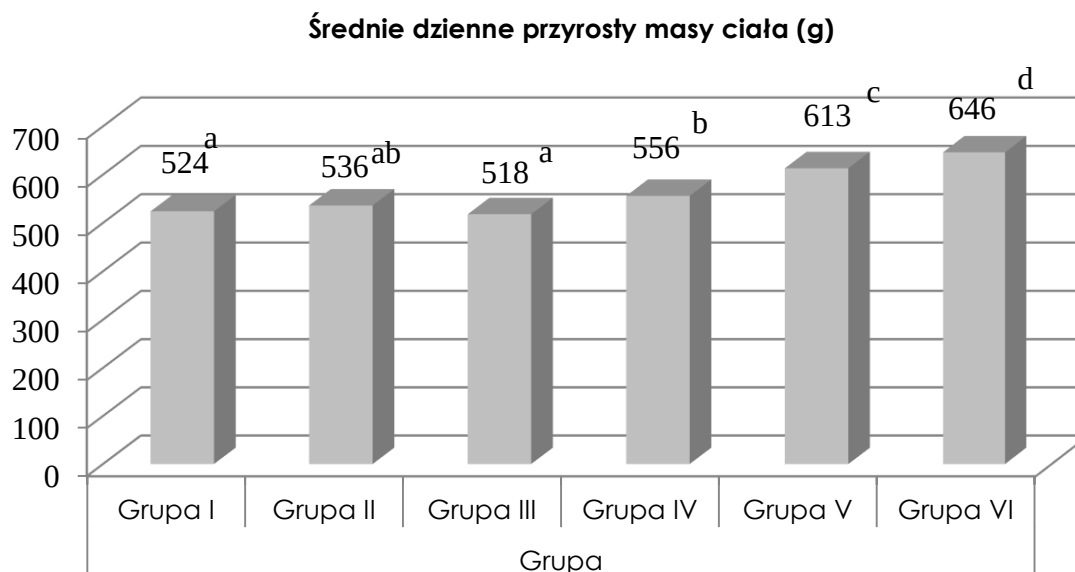
Skład mieszanek oraz dawka terapeutyczna dobrana została na podstawie wytycznych farmakopealnych i Europejskiego Urzędu do Spraw Bezpieczeństwa Żywności w przeliczeniu na kg masy ciała cielęcia.

Tab. 1. Charakterystyka mieszanek wykorzystanych w doświadczeniu

	Mieszanka Z1	Mieszanka Z2	Mieszanka Z3	Mieszanka Z4
Substancje czynne	Organiczne związki siarki, garbniki, taniny, terpeny, flawonoidy, kwasy fenolowe, glikozydy fenolowe, fitoncydy, witaminy, biopierwiastki	Saponiny, flawonoidy, sole mineralne, glikozydy flawonowe, alkaloidy, fenole, glukotropeoliny, enzymy, polisacharydy, kwasy fenolowe, sterole, śluzu, witaminy, biopierwiastki	Flawonoidy, fitosterole, saponiny, terpeny, diterpeny, triterpeny, aldehyd cynamonowy, garbniki, taniny, glikozydy, kwasy, pektyny, enzymy, śluzu	Laktony, kumaryny, kwasy, żywice, flawony, sitosterole, inulina, glikozydy, enzymy, witaminy, ksantofil, kurkuminoide, kwas ferulowy, garbniki, pektyny, enzymy, sole, fenolokwasy, allina, tokoferole, naringeniny, limonoidy
Działanie	Mieszanka działa: · stymulująco na układ odpornościowy, · pobudzająco na makrofagi i aktywność limfocytów T, · odkażająco, · przeciwbakteryjnie, · przeciwwirusowo, · przeciwzapalnie, · pierwotniakobójczo, detoksykująco, · lekko moczopędnie, wiatropędnie, żółciopędnie, · rozkurczowo na układ pokarmowy, · uspokajająco.	Mieszanka działa: · bakteriostatycznie, · przeciwbiegunkowo, · odkażająco, · przeciwwgorączkowo, · pierwotniakobójczo, · przeciwwirusowo, · przeciwbakteryjnie, · przeciwpasożytniczo, · przeciwzapalnie, · przeciwbólowo, · uspokajająco, · wzmacniająco, · lipotropowo, · moczopędnie, · oczyszczająco, · stymulująco, · odżywczo.	Mieszanka działa: · antyseptycznie, · antybakteryjnie, · przeciwprzerwotniakowo, · bakteriostatycznie (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>), · hamująco na rozwój drożdżaków, · przeciwpleśniowo (<i>Aspergillus fumigatus</i>), · przeciwzapalnie, · moczopędnie, · regulująco na trawienie, · przeciwbiegunkowo, · przeciwalergicznie, · powlekająco na układ trawienny.	Mieszanka działa: · przeciwłękowo, · uspokajająco, · antybakteryjnie, · pierwotniakobójczo, · przeciwroztoczowo, · fungistycznie, · pobudzająco na wydzielanie soków trawiennych, · przeciwskurczowo, · antyalergicznie, · antyoksydacyjnie, · poprawiająco na krążenie i wchłanianie składników pokarmowych, · wykrztuśnie, · prebiotycznie, · moczopędnie, · tonizująco przeciwzakażenie · przeciwozbrękowo, · przeciwrakowo, · przeciwwirusowo, · pobudzająco na apetyt, · odkażająco, · wspomagająco na wątrobę, · hipolipolitycznie, · odtruwająco, · wiatropędnie, · rozgrzewająco, · przeciwzapalnie, · hamująco na agregację trombocytów.
Wskazania	W dawce profilaktycznej zapobiega i wspomaga leczenie nieżytów układu pokarmowego i oddechowego o różnej etiologii, w biegunkach o różnej etiologii, w stanach osłabienia i stresie.	W dawce profilaktycznej zapobiega i wspomaga leczenie nieżytów układu pokarmowego i oddechowego o różnej etiologii, biegunki, zapalenia płuc i oskrzeli, zakażeń pasożytniczych, wspomaga trawienie.	W dawce profilaktycznej zapobiega i wspomaga leczenie nieżytów układu pokarmowego i oddechowego o różnej etiologii, biegunki, zakażeń pasożytniczych, osłabienie, alergie.	W dawce profilaktycznej zapobiega i wspomaga leczenie nieżytów układu pokarmowego i oddechowego o różnej etiologii, biegunek o różnej etiologii, zakażeń pasożytniczych, bakteryjnych i wirusowych, wspomaga trawienie.

W trakcie doświadczenia dokonywano pomiarów masy ciała cieląt. Najwyższe przyrosty stwierdzono w grupie V i VI (Wyk. 1). Wskaźniki morfologiczne krwi mieściły się w granicach norm referencyjnych, przekroczenie norm zaobserwowano tylko w przypadku poziomu leukocytów w grupie I w 30. dniu życia. Najwięcej bakterii w kale stwierdzono w 1. miesiącu życia, co potwierdza, iż jest to newralgiczny okres w odchowie cieląt. Zastosowane probiotyki oraz mieszanka ziołowa w większości przypadków przyniosła zadowalające efekty. W żadnej z badanych prób nie stwierdzono oocyst *Cryptosporidium* sp. W badanym materiale stwierdzono jedynie jaja nicieni żołądkowo-jelitowych z rzędu *Strongylida* (ekstensywność inwazji 4,23%, średnia intensywność 27 [20–40] EPG). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że poziom zarażenia nicieniami z rodzaju *Strongylida* jest bardzo niski.

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



a, b, c, d – różnice istotne ($p \leq 0,05$).

Przeprowadzone analizy wskazują, iż zastosowanie probiotyków oraz mieszanek ziół pozytywnie wpłynęło na przyrosty masy ciała cieląt, a także parametry fizjologiczne i zdrowotnościowe. Najkorzystniejsze efekty przyniosło zastosowanie mieszanek w grupach V i VI.

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 było 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 dają aktualnie najbardziej obiektywny obraz genetycznych mechanizmów warunkowania zmienności w obrębie analizowanych cech. Wytypowane tą drogą grupy genów poddane zostają 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.

Efekty naukowe i praktyczne

- Zastosowanie metody RNA-seq oraz przeprowadzone analizy statystyczne dają 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) umożliwia najbardziej obiektywne poznanie genetycznych podstaw warunkujących wybrane cechy użytkowe i służy 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 „POLSUS”, dające możliwości kreowania kierunków hodowlanych krajowej populacji zarodowej trzody chlewnej.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań

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. Żywnienie odbywało się w systemie *ad libitum* drobną 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 129 osobników wyżej wymienionych ras (53 szt. wbp i 76 szt. pbz). Łącznie dla tych 2 ras z dwu lat prowadzenia doświadczenia posiadamy w bazie 702 osobniki (243 szt. wbp i 458 szt. pbz). Dla całej grupy zwierząt skompletowano dane uzyskiwane w czasie tuczu kontrolnego i dysekcji i były to wskaźniki tuczne, rzeźne i jakości mięsa.

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 transkryptomowego. Zastosowanie metody RNA-seq pozwoliło na wstępną identyfikację 130 genów o różnicowej ekspresji (DEGs) między grupami świń o różnym poziomie wykorzystania paszy.

Powyższą 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).

Na podstawie analizy pełnionej funkcji biologicznej oraz zaangażowania w szlaki molekularne wybrano geny kandydujące jako potencjalne, 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 żołądku.
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 neuroprzekaznik lub neuromodulator. Może być zaangażowany w procesy związane z wahaniami poziomu dopaminy, w utrzymanie struktury i funkcji jelit oraz w regulację metabolizmu tłuszczów.

Wytypowane geny przeanalizowano pod kątem poszukiwania polimorfizmów w sekwencjach kodujących oraz regionach 3' i 5' UTR, co pozwoliło na identyfikację mutacji zamieszczonych w poniższej tabeli.

Tab. 1. Zidentyfikowane polimorfizmy

Polimorfizm; lokalizacja	Rodzaj polimorfizmu	Nr akcesyjny	Lokalizacja	Efekt
PIK3R1 ENSSCG00000016958				
A/G; 16:46434848	5 prime UTR variant	rs710001948	egzon, 5'UTR	Potencjalny wpływ na ekspresję genu.
A/C; 16:46434887	5 prime UTR variant	rs694227585	egzon, 5'UTR	Potencjalny wpływ na ekspresję genu.
G/A; 16:46446820	mutacja cicha	rs340298552	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
A/G; 16:46446862	mutacja cicha	rs318773364	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
T/C; 16:46495573	mutacja cicha	rs333434581	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
A/G; 16:46496141	zmiana sensu	rs331708297	egzon	Zamiana aminokwasów – T na A.
G/C; 16:46522085	3 prime UTR variant	rs1108218439	egzon, 3' UTR	Potencjalny wpływ na stabilność i lokalizację transkryptu.
GAB1 ENSSCG00000009048				
T/C; 8:84284458	mutacja cicha	rs337362220	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
T/C; 8:84286382	zmiana sensu	rs344569044	egzon	Zamiana aminokwasów – M na V.
C/T; 8:84291394	mutacja cicha	rs326269530	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
G/C; 8:84291486	zmiana sensu	rs320717554	egzon	Zamiana aminokwasów – P na A.
C/T; 8:84304194	mutacja cicha	rs707301474	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
G/C; 8:84291486	zmiana sensu	rs320717554	egzon	Zamiana aminokwasów – P na A.
SOX2 ENSSCG000000037485				
C/T; 13:119668922	mutacja cicha	rs333497709	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
SYT11 ENSSCG00000006506				
G/A; 4:94155309	mutacja cicha	rs339268126	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
G/A; 4:94154700	mutacja cicha	rs337884730	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
C/T; 4:94154535	mutacja cicha	rs319942794	egzon	Brak zmiany sekw. aminokwasowej.
T/C; 4:94142257	3 prime UTR variant	rs326866047	egzon, 3' UTR	Potencjalny wpływ na stabilność i lokalizację transkryptu.

W przypadku genu NTS nie znaleziono żadnych mutacji w dostępnych bazach. Ze względu na potencjalnie największy wpływ wykrytych mutacji, do dalszego etapu wybrano 2 mutacje w genach: PIK3R1 i GAB1. Przeprowadzono dla tych zmian analizy genetyczne na szerokim materiale badawczym zgromadzonym w stacjach kontroli SKURTC. Z uwagi na to, że głównym założeniem badań było poszukiwanie genetycznych mechanizmów efektywności

paszy (jej konwersji), dalsze prace będą miały na celu dokończenie analiz w tym zakresie, po wytypowaniu kolejnych genów kandydatów potencjalnie warunkujących tą grupę cech.

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 było określenie genetycznych jak również fenotypowych markerów wczesnego szacowania potencjału rozrodczego i matczyne go loch oraz określenie ich wpływu na cechy użytkowe świń.

Poszukiwanie markerów genetycznych i fenotypowych wczesnego szacowania potencjału rozrodczego loch, w ramach którego analizowany był 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 (1. cel szczegółowy).

Założenia metodyczne

Badania prowadzone były dla loch ras matczyne go i zachowawczych pochodzących z ferm zarodowych i produkcyjnych.

Dane do analiz statystycznych były zbierane na podstawie:

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

Pobierany materiał biologiczny stanowiła krew lub cebulki włosów do analiz polimorfizmów badanych genów, tkanki jajnika, jajowodu oraz rogu macicy.

Poszukiwania markerów genetycznych laktogenezy loch oraz możliwości ich wykorzystania w doskonaleniu cech rozplodowych, którego celem było 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 (2. cel szczegółowy).

Założenia metodyczne

W ramach badania zebrano materiał doświadczalny (krew i mleko) od loch ras wbp i pbz utrzymywanych w ZD IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o. Na podstawie posiadanych danych (masy ciała prosiąt w dniu urodzenia i w 21. dniu ich życia) oszacowano dodatkowy wskaźnik określający parametry reprodukcyjne loch, tj. wydajność mleczną loch.

Analizy laboratoryjne w zależności od celu szczegółowego:

- 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.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykonano przy pomocy programów statystycznych SAS i Statistica.



(Fot. ZD IZ PIB Żemiki Wielkie sp. z o.o.)



(Fot. M. Szyndler-Nęcza)

Wyniki – 1. cel szczegółowy

Wykazano brak zależności pomiędzy pomiarami VCL przy kolejnym kryciu a cechami rozplodowymi w kolejnych miotach dla loch ras wbp, pbz i mieszańców F1. W przypadku ras złotnickiej białej i złotnickiej pstrej stwierdzono wyższe możliwości przewidywania liczebności miotów na podstawie pomiarów VCL, zwłaszcza w miotach od 1 do 8. Oszacowane korelacje pomiędzy pomiarami VCL mierzonymi przy pierwszym kryciu, a wartościami cech rozplodowych w kolejnych miotach, niejednoznacznie wskazują na związek między tymi cechami. W wyższym stopniu można przewidywać wzrost liczebności miotów u ras złotnickiej białej i złotnickiej pstrej niż u ras wbp, pbz i mieszańców F1. Analiza zależności pomiędzy pomiarami VCL a pomiarami morfometrycznymi układu rozrodczego loch wykazała możliwość zwiększenia masy i pojemności macicy na drodze selekcji w kierunku wzrostu długości VCL.

Analizowane grupy rasowe (wbp, pbz, mieszańce F1 – złotnicka biała, złotnicka pstra – Danbred) różniły się pod względem frekwencji genotypów i *alleli* poszczególnych mutacji genów. Wykazano brak równowagi Hardy'ego-Weinberga dla niektórych mutacji analizowanych genów dla grup rasowych wbp, pbz, mieszańców F1 i Danbred, co mogło być spowodowane długotrwałą selekcją na cechy produkcyjne. Dla ras złotnicka biała i złotnicka pstra, należących do rezerwy genetycznej, nie stwierdzono odstępstw od prawa Hardy'ego-Weinberga. Analiza wpływu polimorfizmu mutacji badanych genów na cechy związane z liczebnością miotu loch ras wbp, pbz i mieszańców F1 wykazała jedynie statystycznie wysoko istotne i istotne różnice dla mutacji *HOXA10* g.45398714C>G w liczbie prosiąt urodzonych ogółem i żywo (CG>CC; $P \leq 0,05$) oraz dla *WNT10A* g.303C>T w liczbie prosiąt urodzonych ogółem i liczbie prosiąt martwo urodzonych (CC>CT; $P \leq 0,01$). Ponadto, dla mutacji genu *HOXA11* g.3786A>G stwierdzono wysoko istotne różnice w pomiarach długości VCL pomiędzy lochami o różnych genotypach (AG>AA i GG; $P \leq 0,01$), jak również dla mutacji genów *HOXA11* g.3786A>G, *HOXA10* g.45398767G>A, *WNT5A* g.605G>A dla wieku pierwszego oproszenia (odpowiednio: AA>AG; AA>GG; AG i GG>AA; $P \leq 0,05$). Jednak statystycznie nieistotne wartości współczynników korelacji Spearmana nie potwierdziły związku pomiędzy polimorfizmem analizowanych genów a cechami rozplodowymi.

W rasach złotnickiej białej i złotnickiej pstrej wpływ na liczbę prosiąt urodzonych ogółem stwierdzono w przypadku polimorfizmu genów w locus *HOXA11* g.3786A>G (AA i GG>AG; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398502C>A (CC>AA; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398508 _4539 8509 delinsCC (del/ins>ins/ins; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398714C>G (CG>GG; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398767G>A (GG>AA i AG; $P \leq 0,01$, $P \leq 0,05$), natomiast na liczbę prosiąt żywo urodzonych znaczący wpływ

miały mutacje w locus *WNT10A* g.303C>T (CC, CT>TT; $P \leq 0,01$, $P \leq 0,05$), *HOXA11* g.3786A>G (AA i GG>AG; $P \leq 0,05$), *HOXA10* g.45398508_45398509delinsCC (del/ins>ins/ins; $P \leq 0,05$), *HOXA10* g.45398767G>A (GG>AA; $P \leq 0,05$) i *WNT10A* g.303C>T (CC>TT; $P \leq 0,05$), a na długość VCL mutacje w locus *HOXA10* g.45398508_45398509delinsCC (del/ins>ins/ins; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398767G>A (GG>AA; $P \leq 0,05$) i *WNT10A* g.303C>T (CC, TT>CT; $P \leq 0,01$). Dla większości polimorfizmów tych genów stwierdzono istotne zależności z powyższymi cechami (od $r_s = 0,190993$ do $-0,296278$; $P \leq 0,05$). Dla loch ras rodzimych wykazano ponadto wpływ niektórych analizowanych polimorfizmów na liczbę loszek urodzonych w miocie, liczbę prosiąt martwo urodzonych i długości ciąży.

Dla świń Danbred stwierdzono jedynie statystycznie istotne różnice dla liczby prosiąt żywo urodzonych w miocie w przypadku polimorfizmu w locus genu *HOXA10* g.45398502C>A (AA, CC>AC; $P \leq 0,01$), *HOXA10* g.45398767G>A (GG, AA>AG; $P \leq 0,05$) i *WNT7A* g.6270A>G (GG>AA; $P \leq 0,01$) oraz dla liczby prosiąt martwo urodzonych w przypadku mutacji *WNT5A* g.605G>A (AA>AG, GG; $P \leq 0,01$). Jednak oszacowane współczynniki korelacji Spearmana wykazały brak statystycznie istotnych zależności pomiędzy polimorfizmem analizowanych genów a cechami rozplodowymi.

Przeprowadzona analiza statystyczna oraz oszacowane współczynniki korelacji nie wykazały wpływu analizowanych polimorfizmów genów na długość VCL oraz pomiary morfometryczne narządów rozrodczych, z wyjątkiem mutacji *HOXA11* g.3786A>G, która miała istotny wpływ na długość rogu lewego macicy oraz polimorfizmu w locus *WNT10A* g.303C>T mającego istotny wpływ na masę całego układu rozrodczego (macica, pochwa, więzadło, jajowody i jajniki) oraz masę macicy z jajnikami (odpowiednio: $r_s = 0,220212$ i $r_s = 0,191316$; $P \leq 0,05$).



(Fot. M. Gamoń)

Wyniki – 2. cel szczegółowy

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że analizowana grupa loch rasy wbp i pbz cechowała się podobną wydajnością mleczną. Wydajność mleczna tych loch była zależna przede wszystkim od liczby prosiąt urodzonych i kolejnej laktacji.

Analizując wpływ zawartości poszczególnych składników w sianie, w laktacji drugiej loch, na masę ciała odchowywanych prosiąt wykazano, że zawartość tłuszczu, białka i suchej masy w sianie nie miała istotnego wpływu na zmiany masy ciała odchowywanych prosiąt, ani na zmiany masy miotu w kolejnych tygodniach laktacji. Jedynie w przypadku zawartości laktozy wykazano, że lochy produkujące sianę o najmniejszej zawartości laktozy (do 0,42% – grupa 1) odchowały do 14. dnia laktacji prosięta o 0,41 kg większej masie w porównaniu do prosiąt karmionych przez lochy produkujące sianę bogatą w laktozę (powyżej 2,04% – grupa 3 – $P \geq 0,05$). Wynik ten został potwierdzony w przypadku loch odchowujących prosięta w ciągu trzech cykli reprodukcyjnych.

Z kolei, analizując wpływ wybranych polimorfizmów genów na skład siary i mleka loch ras matecznych oraz na wyniki odchowu prosiąt w drugiej laktacji wykazano, że zidentyfikowane mutacje w locus genów *B4GATL1*, *INSR* i mutacja cicha w genie *HSD11B2* miały istotny wpływ na zawartość składników siary i mleku oraz na wyniki odchowu prosiąt w czasie 21-dniowej laktacji. Lochy o genotypie *B4GATL1GG* w porównaniu do loch o genotypie *AA* produkowały w kolejnych dniach laktacji siarę i mleko istotnie uboższe w laktozę. Prosięta karmione przez lochy *AA* były w 21. dniu życia lżejsze od prosiąt pochodzących od loch o genotypie *AG* i *GG* o 0,3 kg. W przypadku polimorfizmu w genie *INSR* wykazano, że lochy posiadające w swym genotypie *allele C* genu *INSR* (*INSR^{CC}* i *INSR^{CT}*) w porównaniu do osobników o genotypie *INSR^{TT}* produkowały siarę o większej zawartości tłuszczu oraz mleko w 7. i 14. dniu laktacji o istotnie mniejszej zawartości laktozy. Prosięta pochodzące od loch o genotypie *CC* i *CT* w 21. dniu życia były cięższe od prosiąt karmionych przez lochy o genotypie *TT* o odpowiednio 0,36 kg ($P > 0,05$) i 0,38 kg ($P \leq 0,05$). W przypadku mutacji cichej w genie *HSD11B2* (*rs326322123*), lochy o genotypie *HSD11B2^{CC}*, w porównaniu do loch o genotypach *TC* i *TT*, produkowały siarę o istotnie niższej zawartości tłuszczu, jednak w mleku tych loch w całej laktacji zawartość tłuszczu oraz suchej masy była istotnie wyższa. Miot odchowywany przy lochach o genotypie *HSD11B2^{CC}* uzyskał istotnie niższą masę ciała w 21. dniu życia o 5,22 kg ($P \leq 0,05$), aniżeli miot odchowywany przez lochy o genotypie *HSD11B2^{TT}*. W przypadku pozostałych analizowanych mutacji w genach *GH*, *PGR* i mutacji zmiany sensu w genie *HSD11B2* (*rs343355675*) nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu tych polimorfizmów na przyrosty masy ciała prosiąt w czasie 21-dniowej laktacji.

Określono wpływ łącznego oddziaływania polimorfizmów genów o największym efekcie (*HSD11B2/B4GATL1/INSR*) na zawartość poszczególnych składników siary, mleka i zmiany masy ciała prosiąt ssących. Wykazano, że siara loch posiadających w swym genotypie *allele TT/GG/CC* tych genów (grupa 5), w porównaniu do siary pozostałych loch, cechowała się najniższą zawartością laktozy oraz największą zawartością białka oraz suchej masy. W przypadku składu mleka z całej laktacji stwierdzono, że lochy z grupy 5 produkowały mleko o największej zawartości białka i najmniejszej zawartości laktozy ($P \leq 0,05$). W efekcie, prosięta odchowywane przez lochy z grupy 5, w porównaniu do pozostałych prosiąt, uzyskały największą masę ciała w 7., 14. i 21. dniu życia.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań mogą zostać wykorzystane w praktyce hodowlanej. Wyniki badań 1. celu szczegółowego sugerują, że selekcja loszek w kierunku zwiększenia długości VCL przyczyni się do zwiększenia masy i pojemności macicy loch, czyli czynników potencjalnie związanych z przeżywalnością zarodków i tym samym wielkością miotów. Przeprowadzone badania wykazały również większą możliwość przewidywania liczebności miotów na podstawie pomiarów VCL oraz większy wpływ niektórych polimorfizmów analizowanych mutacji genów *HOXA10*, *HOXA11*, *WNT10A*, *WNT7A* i *WNT5A* na cechy związane z rozrodem u świń ras złotnickiej białej i złotnickiej pstrej, niż u ras wbp, pbz czy Danbred. Na podstawie uzyskanych wyników nie można natomiast polecić badanych mutacji, jako markerów genetycznych dla cech związanych z pomiarami morfometrycznymi narządów rozrodczych.

Kontrola składu siary (2. cel szczegółowy) w kierunku zawartości laktozy w pierwszej godzinie po porodzie może być pomocnym narzędziem w diagnostyce przyczyn słabszego wzrostu prosiąt w czasie odchowu do 7. dnia życia. Wskaźnik ten może być wykorzystany do wczesnego określenia wartości matczynej loch i wyników odchowywanych przez nie prosiąt w danej laktacji. Wykorzystanie wyników identyfikacji polimorfizmów genu *B4GATL1*, *INSR* i mutacji ci-

chej w genie *HSD11B2* u młodych loszek hodowlanych, tj. pozostawienie w hodowli samic o genotypie *B4GATL1^{GG}INSR^{CC}* i *HSD11B2^{TT}*, które w warunkach umożliwiających ujawnienie się ich potencjału genetycznego będą bardzo dobrze odchowywać prosięta, przyczyni się do zwiększenia postępu hodowlanego w użytkowości rozplodowej, w szczególności w odchowie prosiąt pochodzących z licznych miotów.

Zadanie 04-11-02-11

Rewitalizacja linii 990. Utworzenie stada prarodzicielskiego syntetycznej linii świń z wykorzystaniem osiągnięć biologii molekularnej oraz opracowanie założeń programu hodowlanego

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

Celem prowadzonych badań jest wytypowanie w obrębie linii 990, przy współudziale metod hodowlanych wspomaganych wynikami genetyki molekularnej, subpopulacji zwierząt i próby utworzenia na tej podstawie stada prarodzicielskiego nowo tworzonej linii hodowlanej świń o podwyższonych parametrach użytkowych (zarówno tucznych, rzeźnych, jak i związanych z efektywnością wykorzystania paszy) w stosunku do aktualnej populacji.

Realizacja celu poprzez:

- opracowanie płytki SNP PigOpenArray dedykowanej do wykorzystania w selekcji trzody chlewnej,
- analizę populacji świń linii 990 pod kątem możliwości wyodrębnienia nowej linii rodzicielskiej o podwyższonej użytkowości (ocenę zinebrowania, różnice selekcyjne pomiędzy typowym stadem prarodzicielskim a całą populacją, ocenę możliwości uzyskania wysokiego postępu hodowlanego zrealizowanego).

Płytki SNP PigOpenArray zostanie zaprojektowana tak, aby mogła zawierać dedykowany, unikalny zestaw sond i starterów dla każdego z około 60 genów (polimorfizmów) warunkujących cechy ważne z punktu widzenia hodowlanego i ekonomicznego. Zestaw uwzględnionych na płycie selekcyjnej genów będzie opracowany w oparciu o wcześniejsze analizy i eksperymenty przeprowadzone w Instytucie Zootechniki PIB jak również geny, których istotny wpływ na cechy został opisany w literaturze (takie, jak: *RYR1*, *IGF2*, *MC4R*).

Efekty naukowe i praktyczne

Płytki SNP PigOpenArray zostanie zaprojektowana tak, aby mogła zawierać dedykowany panel około 60 genów (polimorfizmów), warunkujących cechy ważne z punktu widzenia hodowlanego i ekonomicznego (tempo wzrostu, efektywność wykorzystania paszy, mięsność tuszy). Zestaw uwzględnionych na płycie selekcyjnej genów zostanie opracowany w oparciu o wcześniejsze analizy i eksperymenty przeprowadzone w Instytucie Zootechniki PIB, które polegały na wytypowaniu genów kandydujących, związanych z cechami użytkowymi trzody chlewnej. Do panelu zostaną również włączone geny takie, jak gen *RYR1*, *IGF2* czy *MC4R*, których istotny wpływ na cechy został opisany w literaturze. Na podstawie zebranych informacji zostanie zaprojektowana płytka typu OpenArray®, zawierająca unikalny zestaw sond i starterów dla każdego z analizowanych 60 polimorfizmów. Analiza SNP na płycie typu TaqMan Genotyping OpenArray® umożliwi jednoczesną analizę 60 polimorfizmów dla każdego badanego osobnika.

Elementem badań będzie też wytypowanie zwierząt prezentujących wysoki i niski poziom wybranych, istotnych cech produkcyjnych i poddanie ich materiału genetycznego genotypowaniu z wykorzystaniem PorcineSNP60 v2 Genotyping BeadChip (Illumina). Dzięki temu wytypowane zostaną SNP o dużym efekcie, w oparciu o analizę mikromacierzową i genomową (GWAS). Otrzymane wyniki frekwencji poszczególnych *alleli* zestawione zostaną z parametrami użytkowości tucznej, rzeźnej oraz z jakością mięsa. Pozwoli to na wytypowanie najbardziej korzystnego z punktu widzenia hodowli układu *alleli*, związanego z poziomem wybranych cech produkcyjnych. Taka informacja zostanie wykorzystana do opracowania ostatecznej wersji panelu PigOpenArray, z uwzględnieniem nowych i wykluczeniem wcześniej uwzględnionych SNP o najmniejszym efekcie. Efektem ostatecznym będzie złożenie wniosku patentowego dla tak przygotowanego panelu selekcyjnego pod roboczą nazwą PigOpenArray. Zostanie również przeprowadzona ocena możliwości wyodrębnienia stada prarodzicielskiego dla nowej linii zwierząt o podwyższonych parametrach dla wybranych cech produkcyjnych. Analizą tą objęta będzie populacja zwierząt linii 990. Prowadzone badania dotyczyć będą wielu cech użytkowych (zarówno tucznych, rzeźnych, jak i związanych z efektywnością wykorzystania paszy) i będą zawierały ocenę zimbredowania, różnice selekcyjne pomiędzy stadem prarodzicielskim a całą populacją linii 990, ocenę możliwości uzyskania wysokiego postępu hodowlanego zrealizowanego, opracowanie progów hodowlanych dla kandydatów do stada prarodzicielskiego nowej linii. Analizy te będą podstawą do podjęcia decyzji hodowlanych, mających na celu wyodrębnienie zwierząt stanowiących trzon nowo tworzonej linii hodowlanej świń o podwyższonych parametrach użytkowych.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie

Wszystkie badania będą wykonane na zwierzętach linii 990. Na podstawie analiz oceny przyżyciowej i danych rodowodowych typowane zostały mioty, z których po dwie loszki trafiły do oceny stacyjnej. Zwierzęta na stacjach utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywienie będzie się odbywało 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.

Systematycznie, w miarę napływu nowych sztuk zwierząt do stacji kontroli, w czasie kontroli jak również po uboju zwierząt, przy masie ciała 120 kg oraz dysekcji, od każdej sztuki kolekcjonowane były dane odnośnie następujących cech użytkowych:

- Dane z tuczu: przyrost dzienny w teście (30-100 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).
- Dane z dysekcji (cechy umięśnienia i otluszczenia): 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 (cm²), procent mięsa w wyrębach podstawowych (%), procent mięsa w tuszy (%), masy mięsa wyrębów podstawowych (kg), grubość słoniny nad łopatką (cm), grubość słoniny na grzbiecie (cm), grubość słoniny na krzyżu I (cm), grubość słoniny na krzyżu II (cm), grubość słoniny na krzyżu III (cm), średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm), grubość słoniny w punkcie C1 (cm), grubość słoniny w punkcie K1 (cm).
- Dane o jakości mięsa (dotyczące pomiarów): odczynu pH najdłuższego grzbietu 45 min. po uboju, odczynu pH najdłuższego grzbietu 24 godz. po uboju, wodochłonność mięsa, barwy mięsa – parametr L, barwy mięsa – parametr a, barwy mięsa – parametr b, zawartości tłuszczu śródmięśniowego w polędwicy IMF (%).

Od wszystkich osobników kończących ocenę stacyjną pobierany był materiał biologiczny, niezbędny do analiz genetycznych (mięsień najdłuższy grzbietu, stonina grzbietowa, podwzgórze, żołądek), zgodnie z opracowaną procedurą. Ponadto z bazy materiału genetycznego (archiwalnego) wytypowano 900 osobników Linii 990, które ukończyły ocenę stacyjną w latach 2007-2016. Wytypowany materiał biologiczny został poddany izolacji DNA, a następnie rozpoczęto pierwszą część genotypowania (na materiale archiwalnym) z wykorzystaniem opracowanego panelu PigOpenArray.

W tym celu, na podstawie danych literaturowych i wyników własnych, wytypowano panel genów dla cech użytkowości rzeźnej i tucznej. Geny te, to: RYR1, IGF2, MC4R, FABP3, LEPR, LEP, POU1F1, GHRH, GH1, CAST, PECR, ALDH3A2, PLA2G12A, MYOM1, ATGL, CTSB, CSTB, CTSD, CTSF, PLCD4, FN1, PNKD, VIL1, TNS1, OBSL1, CAPN1, TACC2, TBX2, SETD2, MTTP, MARCH4, GHRL, GHRL, SRFBP1, GPI, CYTH2, FABP3P2, EGF, CYB5R1, C9H11orf1, MYO18B, XIRP1, GNAS, GGA, CAST, FADS1, LDHA, LIMK1, PVALB, ACOX3, GPAT3, SCD, FASN, ACACA, PRL, POMC, PIK3R1, GAB1. Tak uzyskane dane oraz dane pozyskane ze stacji kontroli będą w późniejszych etapach podstawą do analiz asocjacyjnych. Będą też wykorzystane do dalszych analiz, służących ustaleniu progów selekcyjnych dla osobników stanowiących grupę prarodzicielską nowej linii wysokoprodukcyjnej.

Zakład Hodowli Drobiu

Kierownik: dr hab. Katarzyna Połtowicz, prof. IZ PIB

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 hab. Katarzyna Połtowicz, prof. IZ PIB

Celem zadania było 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.

Materiał doświadczalny stanowiły kurczęta brojlery linii Ross308. Pisklęta zostały wylęzione w komercyjnym zakładzie wylęgu drobiu z jaj pozyskanych z wybranej fermy rodzicielskiej. Jednodniowe, seksowane i oznaczone indywidualnymi numerami pisklęta (kogutki) przydzielono losowo do 4 grup żywieniowych. Ptaki umieszczono w przedziałach na głębokiej ściółce i odchowano w optymalnych warunkach środowiskowych do 42. dnia życia. We wszystkich grupach kurczęta żywiono do woli pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi starter, grower i finisher o takiej samej recepturze, ale różniącymi się źródłem tłuszczu. W mieszankach 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 pochodzące z oleju lnianego (Tab. 1). 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 II-III żywiono tak, jak ptaki z grupy I.

Tab. 1. Harmonogram żywienia kurcząt

dni	GRUPA			
	I	II	III	IV
0-7	tój wołowy			
8-14				
15-21	tój wołowy	olej lniany	olej lniany	olej lniany
22-28	tój wołowy	olej lniany	olej lniany	olej lniany
29-35	tój wołowy	tój wołowy	olej lniany	olej lniany
36-42	tój wołowy	tój wołowy	tój wołowy	olej lniany

Do oceny jakości tuszki i mięsa wybrano 35-dniowe i 42-dniowe kurczęta. Podczas uboju pobrano od kurcząt krew w celu oznaczenia wskaźników lipidowych (trójglicerydy, cholesterol całkowity, cholesterol we frakcji HDL i LDL). W pobranych przy uboju próbkach wątroby i mięśni wykonano analizę ekspresji genów kodujących elongazy 2 i 5 kwasów tłuszczowych (*ELOVL2* i *ELOVL5*) oraz delta-5 i delta-6 desaturaze kwasów tłuszczowych (*FADS1* i *FADS2*). W 15. minucie po uboju określono kwasowość mięśni piersiowych przy pomocy pH-metru CyberScan10, wyposażonego w szklaną elektrodę do badania pH mięsa. Pomiar kwasowości mięsa powtórzono po 24-godzinnym schłodzeniu tuszek w temperaturze +4°C. Przeprowadzono analizę rzeźną kurcząt. Wypreparowane mięśnie piersiowe oceniono pod względem: barwy (CIE, L*a*b*), wycieku swobodnego (24 h i 48 h), strat po rozmrożeniu i strat termicznych. Mięśnie piersiowe kurcząt poddano ocenie parametrów tekstury (TPA) i siły cięcia (Warner-Bratzler) przy pomocy aparatu Instron 5542. Ponadto, mięśnie piersiowe zostały poddane ocenie sensorycznej oraz oznaczono ich podstawowy skład chemiczny: sucha masa, białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy, a także zawartość cholesterolu i profil wyższych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mięśniowym. Przeprowadzono również analizy składu chemicznego oraz profilu wyższych kwasów tłuszczowych paszy. Uzyskane wyniki zweryfikowano statystycznie przy pomocy programu Statistica 13.

Stwierdzono wpływ rodzaju tłuszczu w paszy na ekspresję genu *ELOVL2* w mięśniach piersiowych 35-dniowych ptaków, a także na poziom transkryptu genów *FADS1*, *FADS2* i *ELOVL5* w mięśniach piersiowych oraz *ELOVL2* i *ELOVL5* w wątrobie 42-dniowych kurcząt. Badania potwierdziły wpływ ekspresji tych genów na profil kwasów tłuszczowych w lipidach mięśni piersiowych, zwłaszcza kwasu α -linolenowego (ALA), eikozopentaenowego (EPA) oraz sumy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, a także wskazały na obecność dodatkowego czynnika – wieku kurcząt, który może wpływać na poziom ekspresji genów w mięśniach piersiowych.

Rodzaj zastosowanego tłuszczu (tój wołowy lub olej lniany) w mieszankach paszowych miał istotny wpływ na wskaźniki lipidowe krwi, masę ciała, jakość tuszki i mięsa, skład chemiczny i stabilność oksydacyjną mięsa, a przede wszystkim na profil kwasów tłuszczowych lipidów mięśni piersiowych, zwłaszcza na zawartość kwasów: α -linolenowego (ALA), eikozopentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego. Wpływ ten zależał od długości stosowania mieszanek paszowych wzbogaconych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3.

Wraz z wydłużaniem podawania kurczętom paszy z olejem lnianym, istotnie zwiększył się udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w mięsie drobiowym i korzystnie zawęził stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) z rodziny n-6 do PUFA n-3.

Wyniki badań wskazują, że stosunek w PUFA n-6/n-3 może być z powodzeniem zmodyfikowany do osiągnięcia rekomendowanych wartości (poniżej 4), gdy ptaki są żywione przez 2 tygodnie (od 2. do 3. tygodnia odchowu) mieszankami paszowymi zawierającymi 4,8% oleju lnianego. Dodatkowo zabieg ten istotnie poprawił profil kwasów tłuszczowych – obserwowano istotny wzrost zawartości kwasów eikozopentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA) w mięsie bez pogorszenia jego smaku, zapachu oraz innych cech jakościowych.

Do dalszego wzrostu zawartości kwasu EPA w lipidach mięśni piersiowych oraz obniżania n-6/n-3 PUFA do wartości blisko 1, kurczęta mogą być żywione paszą z olejem lnianym 1 tydzień dłużej, lecz zabieg ten nie przyczynił się do zwiększenia zawartości kwasu DHA w mięsie.

Stosowanie w mieszankach paszowych oleju lnianego przez 4 tygodnie obniżyło n-6/n-3 PUFA do wartości 0,7 i przyczyniło się do wzrostu zawartości kwasu EPA, bez zmiany zawartości kwasu DHA w mięśniach 42-dniowych, istotnego obniżenia masy ciała kurcząt, wzrostu odtuszczenia tuszek, pogorszenia jakości sensorycznej (smak, zapach, wygląd ogólny) i statusu oksydacyjnego mięsa. Mięso tych ptaków było bardziej kruche, charakteryzowało się lepszą wartością odżywczą oraz mniejszymi stratami na skutek schładzania, gotowania oraz mrożenia.

Wyniki badań wykazały, że dłuższe podawanie oleju lnianego zwiększyło liniowo zawartość długołańcuchowych kwasów tłuszczowych n-3 w mięśniach piersiowych 42-dniowych kurcząt brojlerów, natomiast największą ekspresję genów *FADS1*, *FADS2* i *ELOVL2* zaobserwowano w mięśniach kurcząt, które otrzymywały olej lniany przez 3 tygodnie.

Wydaje się więc, że dłuższe spożycie oleju lnianego (4 tygodnie) zmniejsza ekspresję tych genów, które biorą udział w syntezie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, chociaż poziom transkryptu tych genów jest nadal znacząco wysoki. Może być to spowodowane tym, że kurczęta mają ograniczoną zdolność do spożytkowania dostarczonych w paszy długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych lub ich zapotrzebowanie na te kwasy nie jest aż tak duże, stąd dłuższe spożywanie paszy z olejem lnianym może powodować obniżenie ekspresji tych genów. Powyższa tezę mogą potwierdzać zwiększająca się ilość kwasu EPA w lipidach mięśni wraz z długością podawania mieszanki paszowej z olejem lnianym przy utrzymującym się poziomie kwasu DHA.

Zadanie 01-12-04-11

Technopatie i stereotypie w aspekcie dobrostanu zwierząt gospodarskich

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Skomorucha

W ramach zadania zrealizowano cztery doświadczenia, z których celem pierwszego było określenie wpływu wielkości stadka i systemu odchowu na występowanie stereotypii i technopatii, a także rozwój układu kostnego kur nieśnych. Materiał doświadczalny stanowiło 641 sztuk kur nieśnych Hy-Line, które przydzielono do 4 grup doświadczalnych. W grupie I i II kury nieśne odchowywano w baterii klatek wzbogaconych (750 cm²/kurę) i odpowiednio małym i dużym stadku. W grupach III i IV kury nieśne utrzymywano na ściółce (9 kur/1m²) i również odpowiednio w małym i dużym stadku. Podczas doświadczenia zbierano wyniki produkcyjne ptaków, oceniano stan kończyn i upierzenia oraz wygląd 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. System odchowu i interakcja czynników doświadczalnych miała wpływ na wyniki produkcyjne kur nieśnych Hy-Line. System utrzymania miał również niewielki wpływ na wskaźniki morfometryczne kości w 64. tygodniu doświadczenia. Wielkość stada miała jedynie wpływ na spożycie i wykorzystanie paszy przez ptaki doświadczalne.

Tab. 1. Wskaźniki morfometryczne kości w 64. tygodniu odchowu kur nieśnych Hy-Line

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	System odch. (A)	Stadko (B)	AxB
	klatki		ściółka					
	Małe stadko	Duże stadko	Małe stadko	Duże stadko				
	Kość ramienia							
Masa kości(g)	5,45	5,66	6,27	6,06	0,21	NS	NS	NS
Długość (mm)	79,96	79,58	81,42	81,45	0,38	≤0,05	NS	NS
Szerokość (mm)	6,54	6,52	6,57	6,26	0,07	NS	NS	NS
Objętość (g/cm³)	6,03	5,88	6,78	6,11	0,19	NS	NS	NS
Indeks	68,11	70,84	76,83	74,26	2,32	NS	NS	NS
	Kość udowa							
Masa kości (g)	9,75	11,05	11,37	11,11	0,31	NS	NS	NS
Długość (mm)	87,01	87,08	89,43	88,64	0,54	NS	NS	NS
Szerokość (mm)	8,05	8,15	7,83	8,04	0,07	NS	NS	NS
Objętość (g/cm³)	8,79	8,92	9,43	9,71	0,16	≤0,05	NS	NS
Indeks	120,24	126,53	126,81	125,21	1,84	NS	NS	NS
	Kość piszczelowa							
Masa kości (g)	12,67	13,35	14,00	13,38	0,24	NS	NS	NS
Długość (mm)	121,96	122,06	124,76	125,29	0,68	≤0,05	NS	NS
Szerokość (mm)	7,26 b	7,79 Aa	7,31b	7,06 B	0,09	≤0,05	NS	≤0,01
Objętość (g/cm³)	11,40	10,93	11,36	11,64	0,17	NS	NS	NS
Indeks	103,84	107,87	111,97	107,39	1,58	NS	NS	NS

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 wysoce istotnie ($p \leq 0,01$).

Celem doświadczenia drugiego było określenie wpływu rasy kur oraz wielkości stada na występowanie technopatii i stereotypii.

Materiał doświadczalny stanowiły kury rodzimych ras: Leghorn oraz Sussex w ilości 252 sztuki, które przydzielono do 4 grup doświadczalnych. W grupach I i II odchowywano kury rasy rodzimej Sussex odpowiednio w małym i dużym stadku, natomiast w grupach III i IV utrzymywano kury rasy rodzimej Leghorn, także odpowiednio w małym i dużym stadku. Ptaki w grupach utrzymywano w systemie ściółkowym bezwybiegowym o obsadzie 9 sztuk/m² i żywiono do woli standardowymi mieszankami paszowymi. Podczas doświadczenia zbierano wyniki produkcyjne ptaków, oceniano stan kończyn i upierzenia oraz wygląd 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 obserwacje behawioralne. Zebrane wyniki opracowano statystycznie. Kury rasy Leghorn odznaczały się lepszymi wynikami produkcyjnymi, ale słabszymi kośćmi w 64. tygodniu odchowu, o czym świadczy m. in. niższy wskaźnik IS w porównaniu z kurami rasy Sussex. Wielkość stadka miała niewielki wpływ na parametry produkcyjne kur. Nie stwierdzono wpływu tego czynnika doświadczalnego na wskaźniki morfometryczne kości. Rasa oraz wielkość stada nie miały wpływu na poziom mineralizacji kości oraz rozmaz białokrwinkowy.

Tab. 2. Wskaźniki morfometryczne kości w 64. tygodniu odchowu kur ras rodzimych

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	Rasa (A)	Stadko (B)	AxB
	Sussex		Leghorn					
	Małe stadko	Duże stadko	Małe stadko	Duże stadko				
	Kość ramienia							
Masa kości(g)	5,80	5,99	4,75	5,19	0,19	≤0,05	NS	NS
Długość (mm)	77,76	77,71	80,88	80,95	0,57	≤0,01	NS	NS
Szerokość (mm)	6,32	6,58	6,27	6,17	0,06	≤0,05	NS	NS
Objętość (g/cm³)	6,14	6,00	5,64	5,29	0,17	NS	NS	NS
Indeks	74,59	77,04	58,63	64,23	2,42	≤0,01	NS	NS
	Kość udowa							
Masa kości (g)	9,95	9,70	9,33	9,23	0,24	NS	NS	NS
Długość (mm)	85,73	85,86	87,85	88,40	0,56	≤0,05	NS	NS
Szerokość (mm)	7,59	7,67	7,52	7,23	0,09	NS	NS	NS
Objętość (g/cm³)	8,00	8,57	7,96	7,43	0,15	≤0,05	NS	NS
Indeks	115,97	119,56	105,76	104,40	1,96	≤0,01	NS	NS
	Kość piszczelowa							
Masa kości (g)	11,58	12,06	11,05	11,19	0,31	NS	NS	NS
Długość (mm)	123,30	123,76	125,69	127,77	0,80	≤0,05	NS	NS
Szerokość (mm)	6,16	6,45	6,18	6,20	0,07	NS	NS	NS
Objętość (g/cm³)	9,07	9,083	8,64	8,93	0,20	NS	NS	NS
Indeks	93,81	97,43 a	89,74	86,36 b	1,52	≤0,05	NS	≤0,05

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

W trzecim doświadczeniu określano wpływ zróżnicowanych warunków utrzymania na wystąpienie stereotypii i technopatii u krów mlecznych i cieląt rasy simental. Cielęta w doświadczeniu utrzymywane były w kojach grupowych, indywidualnych oraz budkach, natomiast krowy mleczne w oborze wolnostanowiskowej, na uwięzi i na pastwisku. W trakcie trwania doświadczenia wykonano: obserwacje behawioralne, pobrano krew do analiz morfologicznych oraz analiz hormonalnych (kortyzol, serotonina, dopamina). Stwierdzono, iż większość zachowań stereotypowych i przeorientowanych, zarówno u krów jak i cieląt, nasila się w porze karmienia. U cieląt pierwsze tego typu zachowania występowały średnio na pół godziny przed czasem karmienia. Samo karmienie cieląt, które trwało ok. 2-3 minuty, nie zaspokajało potrzeby ssania u cieląt, dlatego pojawiały się zachowania przeorientowane w postaci wzajemnego obsysania, ssania i lizania rurek oraz innych elementów wyposażenia. W badaniach stwierdzono, iż wydłużenie czasu karmienia cieląt do 5-7 minut znacznie ogranicza występowanie tych zachowań oraz skraca czas ich trwania. W pierwszym okresie odchowu stwierdzono istotne różnice w kształtowaniu się parametrów morfologicznych krwi u cieląt. Najczęściej występującymi stereotypiami u krów mlecznych były stereotypie oralne: rolowanie języka, walcowanie, gryzienie rur i łańcuchów oraz obdajanie innych krów. Rolowanie języka, stwierdzono u 1,5% krów w badanym stadzie. Zachowania tego typu stwierdzono u zwierząt utrzymywanych na uwięzi oraz w oborze wolnostanowiskowej, natomiast na pastwisku zachowań tych nie stwierdzono. U krów trzymanyh na uwięzi stwierdzono największy odsetek zwierząt z widocznymi zewnętrznymi uszkodzeniami kończyn, najmniejszy w utrzymaniu pastwiskowym. Wykonane badania morfologiczne krwi wykazały, iż wszystkie analizowane parametry mieściły się w granicach norm referencyjnych.

W doświadczeniu czwartym oceniano z kolei wpływ zagęszczenia obsady i materiałów absorbujących uwagę na występowanie technopatii i stereotypii u prosiąt odsadzanych w 28. i 35. dniu życia. Realizacja doświadczenia, przeprowadzona od stycznia do grudnia,

obejmowała: obserwacje zachowania odsadzanych w 28. i 35. dniu prosiąt, masę ciała tych zwierząt oraz monitoring mikroklimatu.

Tab. 3. Schemat doświadczenia

Prosięta odsadzane w 28. dniu życia				
Rodzaj kojca	Kojec rusztowy standardowy	Kojec rusztowy wzbogacony	Kojec rusztowy standardowy	Kojec rusztowy wzbogacony
Obsada/kojec	14 szt.	14 szt.	10 szt.	10 szt.
Prosięta odsadzane w 35. dniu życia				
Obsada/kojec	14 szt.	14 szt.	10 szt.	10 szt.

Zwierzęta utrzymywane w środowisku ubogim w bodźce charakteryzowały się niższą aktywnością. U zwierząt starszych, odsadzanych w 35. dniu, utrzymywanych w kojach standardowych stwierdzono najwięcej uszkodzeń skóry spośród badanych grup zwierząt. Były to głównie ślady walk – otarcia naskórka, lekkie rany. Uszkodzenia te dotyczyły 90% zwierząt utrzymywanych w tym systemie. Nie odnotowano poważnych uszkodzeń uszu i ogonów u badanych zwierząt. Rany i zadrapania obserwowano głównie w okolicach przedniej części ciała (uszys, szyja, obręcz barkowa).

Tab. 4. Średnia masa ciała prosiąt odsadzanych w 28. i 35. dniu życia

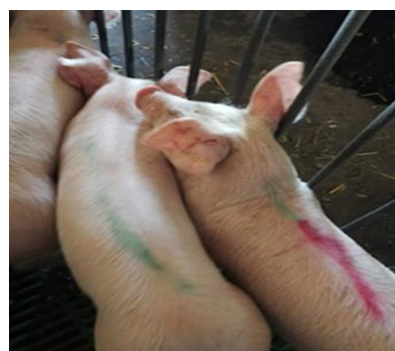
Grupa	28. dzień życia	4 tygodnie po odsadzeniu	35. dzień życia	4 tygodnie po odsadzeniu
14 szt./ kojec standardowy	6,8 kg	15,9 kg	8,9 kg	20,9 kg
10 szt./ kojec standardowy	7,0 kg	16,3 kg	9,0 kg	21,2 kg
14 szt./kojec wzbogacony	7,0 kg	16,7kg	8,9 kg	21,5 kg
10 szt./kojec wzbogacony	6,7 kg	16,1 kg	9,7 kg	21,9 kg

Fot. 1. Wzbogacenie kojców rusztowych



(Fot. D. Godyń)

Fot. 2. Uszkodzenia skóry na uszach prosiąt



(Fot. D. Godyń)

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 badań było określenie wpływu dodatku do paszy mieszanki ziół o działaniu immunostymulującym (gr. II) oraz kwasu askorbinowego (gr. III) na status zdrowotny kur rasy zielononóżka kuropatwiana (Z-11) w chowie ekologicznym.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta rasy rodzimej pochodzące od kur nieśnych ekologicznych, zielononóżka kuropatwiana w ogólnej liczbie 252 sztuk. Ptaki były utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. W każdej grupie doświadczalnej

na 10 kur niosek przypadają 1 kogut. Jaja do lęgów doświadczalnych (po 100 szt. z każdej grupy) zebrano w 34. tygodniu życia kur, a następnie co 4 tygodnie odbywało się kolekcjonowanie jaj wylęgowych. Podczas doświadczenia kontrolowano wyniki produkcyjne kur Z-11, zdrowotność niosek (m.in. parametry biochemiczne i morfologiczne krwi) oraz jakość jaj. Ponadto przeprowadzono ocenę lęgów doświadczalnych, a także określono wartość biologiczną piskląt. Różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi w nieśności jaj, liczbie jaj/nioskę/dzień, liczbie jaj/nioskę/okres oraz kg jaj/nioskę stwierdzono w okresie od 29. do 32. tygodnia doświadczenia. W tym okresie odnotowano również niższe spożycie paszy/ptaka/dzień w grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną przy $p \leq 0,01$. Niższe spożycie także w okresie 37.-40. tydzień odchowu przy $p \leq 0,05$. Przeprowadzona ocena jaj wykazała statystycznie istotne różnice w większości cech dotyczących jakości skorupy jaja. Barwa skorupy jaja była najciemniejsza w grupie I i statystycznie istotna w porównaniu z pozostałymi grupami ($p \leq 0,05$). Średnia masa skorupy wahała się od 5,97 g – gr. II do 6,36 g – gr. III ($p \leq 0,05$) przy średniej gęstości skorupy wynoszącej od 80,81 mg/cm² w grupie II do 85,63 mg/cm² w grupie III ($p \leq 0,01$). Najcięższe jaja znosiły kury z grupy III ($p \leq 0,01$). Ptaki otrzymujące do paszy dodatek kwasu askorbinowego charakteryzowały się większym poziomem hematokrytu w porównaniu z drugą grupą doświadczalną przy $p \leq 0,05$ oraz większym poziomem leukocytów w porównaniu z pozostałymi dwoma grupami przy $p \leq 0,01$.

W związku z tym, że szereg próbek pobranych w trakcie realizacji doświadczenia nadal podlega badaniu, zestawione wyniki nie są kompletne i nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Wstępnie można stwierdzić, że dodatek mieszanki ziołowej podawanej kurom Z-11 obniżył spożycie paszy przy równoczesnej poprawie nieśności, piskląta pochodzące od tych kur charakteryzowały się największym udziałem woreczka żółtkowego w 1. dniu życia i najszybszym tempem jego resorpcji. Wzrost wartości biologicznej piskląt pochodzących od kur żywionych paszą wzbogaconą w zioła wpłynął na wyższą masę ciała tych ptaków w 14. dniu życia. Natomiast dodatek do paszy kwasu askorbinowego wpłynął korzystnie na spożycie paszy, ponadto jaja pochodzące od tych kur cechowały się najwyższą masą i najlepszą wylęgowością z jaj zapłodnionych, średnio wyższą o ok. 3% w stosunku do jaj od certyfikowanych kur Z-11, żywionych standardową paszą ekologiczną.

Tab. 1. Jakość jaj kur rasy żółtonóżka kuropatwiana w 34. tygodniu życia

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	I	II	III	
Barwa skorupy (%)	60,75 a	64,35 b	63,90 b	0,598
Masa jaja (g)	55,15 AB	53,11 A	57,25 B	0,629
Wysokość białka (mm)	7,45	7,79	8,04	0,129
Jednostki Haugha (JH)	87,17	89,91	90,09	0,706
Plamy krwawe (%)	0,05	0,00	0,00	0,0167
Plamy mięsne (%)	0,00	0,05	0,00	0,167
Kolor żółtka (pkt)	6,50	6,25	6,55	0,158
Masa żółtka (g)	17,45	16,83	16,87	0,160
Grubość skorupy (μm)	0,304	0,301	0,302	0,003
Masa skorupy (g)	6,07 a	5,97 Aa	6,36 Bb	0,060
Gęstość skorupy mg/cm ²)	81,71 A	80,81 A	85,63 B	0,621
Indeks kształtu (%)	74,47 a	76,87 b	76,31 ab	0,453
Wytrzymałość (N)	45,23	47,16	46,85	1,299

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 ($p \leq 0,01$).

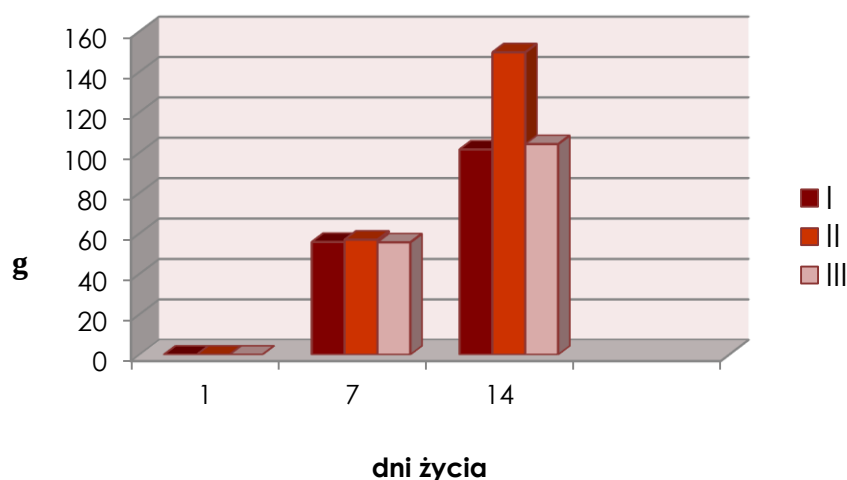
Tab. 2. Wyniki analizy krwi kur niosek Z-11

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	I	II	III	
Hematokryt (%)	28,14	27,14 a	31,29 b	0,79
Hemoglobina (g/dl)	10,30	9,47	10,39	0,23
Erytrocyty (mln/ μ l)	2,35	2,27	2,30	0,05
Leukocyty (tys./ μ l)	17,72 A	18,49 A	20,10 B	0,32
H:L	0,30	0,33	0,31	0,03

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 ($p \leq 0,01$).

Ryc. 1. Masa ciała piskląt Z-11

**Zadanie 01-12-07-12**

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

Kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

Celem badań było określenie wpływu iniekcji *in ovo* różnych dawek witaminy E w określonych terminach okresu embriogenezy wybranych trzech ras/rodów gęsi na kształtowanie wskaźników wylęgowości i użytkowości.

Stada ptaków, od których pobrane zostały jaja do iniekcji *in ovo*, utrzymywane były w jednakowych warunkach środowiskowo-żywieniowych. Wszystkie jaja doświadczalne były lęzone w jednym zakładzie wylęgowym. Gąsięta przeznaczone do eksperymentalnego odchovu utrzymywane były w jednakowych warunkach i żywione paszami o jednakowej wartości pokarmowej, odpowiedniej dla danego okresu wzrostu.

Zgodnie z założoną metodyką, materiałem badawczym w realizowanym zadaniu były jaja stad rodzicielskich trzech ras/rodów gęsi: gęś Biała Kołudzka®, gęś kielecka i słowacka. Z każdej grupy genetycznej (rasa/ród) gęsi będących w jednakowym wieku pobrano jaja do doświadczalnej inkubacji (3 powtórzenia). Ogółem, doświadczalnej inkubacji poddano 840 jaj gęsich.

W okresie kwiecień-czerwiec iniekowano witaminę E (*Tocopheroli acetat*, 300 j.m./ml, Witaminum E HASCO-LEK, Wrocław) w następujących dawkach/grupach:

1. kontrolna – nie poddana iniekcji (K0)* (40 jaj) x3 rasy/rody,

2. kontrolna pozytywna 1 (K1) – iniekcja soli fizjologicznej (40 jaj) w 13. dniu inkubacji x3 rasy/rody,
3. doświadczalna 1 (D1-E15) – iniekcja witaminy E w dawce 15 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (40 jaj) x3 rasy/rody,
4. doświadczalna 2 (D1-E30) – iniekcja witaminy E w dawce 30 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (40 jaj) x3 rasy/rody,
5. kontrolna pozytywna 2 (K2) – iniekcja soli fizjologicznej (40 jaj) w 20. dniu inkubacji x3 rasy/rody,
6. doświadczalna 3 (D2-E15) – iniekcja witaminy E w dawce 15 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (40 jaj) x3 rasy/rody,
7. doświadczalna 4 (D2-E30) – iniekcja witaminy E w dawce 30 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (40 jaj) x3 rasy/rody.

* - jaj nie poddano iniekcji, ale wyjęto z aparatu na czas, średnio 30 minut, w jakim przebywały na zewnątrz aparatu wylęgowego jaja iniekowane jednej grupy genetycznej.

Fot. 1. Jaja gęsie – oznaczone i przygotowane do iniekcji



Fot. 2. Przygotowanie do iniekcji – nawiercanie otworu w skorupie



Fot. 3. Iniekcja do komory powietrznej świeżo przygotowanego roztworu wit. E



Fot. 4. Jednodniowe gąsienki



Iniekcja przeprowadzana była w trzech powtórzeniach, którymi były trzy kolejne nakłady jaj do aparatów wylęgowych. Przed iniekcją jaja ważono indywidualnie.

Gąsienki z ostatniego iniekowanego nakładu, tj. na początku czerwca ważono indywidualnie i przeseksowano metodą japońską (przez wynicowanie steku). Wybrano po 5 samców i 5 samic z każdej grupy doświadczalnej (1-7), każdej z 3 ras/rodów danego gatunku drobiu wodnego, łącznie po 210 gęsi i wstawiono do odchowu, którego celem było określenie wpływu iniekcji *in ovo* witaminą E na wskaźniki użytkowości i wartości rzeźnej doświadczalnych grup ptaków.

Przeprowadzono 17-tygodniowy odchow gęsi (konwencjonalny tucz owsiany). Wszystkie wskaźniki użytkowości określono z uwzględnieniem płci ptaków. Zważono ptaki po 8. i 12. tygodniu odchowu oraz przed ubojem. Po 12. tygodniu przeprowadzono pomiary zoometryczne podstawowych cech: długość przedramienia i grzbietu mostka oraz grubość mięśni piersiowych. Po zakończonym odchowie gęsi ubito.

Nazajutrz, tj. po 24 h w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono uproszczoną dysekcję wg metodyki zamieszczonej w pracy Zioteckiego i Doruchowskiego (1989). Przeprowadzono ponadto pomiary cech fizycznych mięsa. Dokonano oceny stężenia jonów wodorowych w mięśniach piersiowych i nóg, pomiaru barwy (mięśnie piersiowe, nóg, skóra) w systemie CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, 1986) przy użyciu elektronicznego kolorymetru tróchromatycznego Minolta Chroma Meter C580 i zdolności utrzymania wody własnej mięsa wg metody Grau'a i Hamm'a (1952), zmodyfikowanej przez Pohja i Niinivaara (1957).

Masa jaj w obrębie grup genetycznych była wyrównana, natomiast różniła się między tymi grupami ptaków. Najcięższe jaja wykazano dla gęsi Białej Kołudzkiej® (174,6-177,1 g), a najlżejsze dla gęsi kieleckiej (152,0-155,1 g). Najniższy stosunek jaj wylęzonych do nałożonych, analizując łącznie 3 grupy genetyczne gęsi, wykazano dla grupy kontrolnej, w której nie przeprowadzano iniekcji (K0) i wynosił on 87,00%. Natomiast wskaźnik ten najwyższą wartość (95,56%) przybrał w grupie iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 20. dniu inkubacji. Największą różnicę w wartościach omawianego parametru zanotowano dla gęsi Białej Kołudzkiej®. Tu wskaźnik ten kształtował się na poziomie: w grupie kontrolnej K0 – bez iniekcji 83,50%, w grupie kontrolnej K2 – iniekcja soli fizjologicznej w 20. dniu inkubacji) 100% i w grupie D2-E15 – iniekcja 15 mg wit. E w 13. dniu inkubacji) 96,67%. Średnio najwięcej zarodków zamartwych w stosunku do jaj nałożonych stwierdzono w grupie gęsi bez iniekcji jaj (K0) – 4,67%. W pozostałych grupach parametr ten wynosił od 0,83% (grupy iniekowane w 20. dniu inkubacji zarówno solą fizjologiczną, jak i obydwoma dawkami wit. E) do 2,80% (iniekcja wit. E dawką 30 mg w 13. dniu inkubacji).

W stosunku do jaj nałożonych, najwięcej jaj (100%) przełożono do komory klujnikowej z grupy D1-E15 (13. dzień inkubacji dawką 15 mg wit. E) i K2 (20. dzień inkubacji solą fizjologiczną). Łącznie z 3 grup genetycznych najwięcej jaj (96,33%) wylężono w stosunku do jaj przełożonych w grupie iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 20. dniu inkubacji (D2-E15). Nie stwierdzono występowania piskląt kalekich w grupie kontrolnej K0 (bez iniekcji), K1 (iniekcja soli fizjologicznej w 13 dniu inkubacji) i D2-E30 (iniekcja 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji).

Masa piskląt związana była z genetycznym pochodzeniem ptaków, najcięższe pisklęta wylężono w grupie gęsi Białej Kołudzkiej® (od 118,1 D2-E30 do 124,2 g K1), natomiast najlżejsze w grupie gęsi słowackiej (od 99,14 K0 do 107,3 g D2-E30). Analizując dane średnie dla 2 grup genetycznych gęsi, można stwierdzić, że najlżejsze pisklęta (104,0 g) pochodziły z grupy K0, tj. nie iniekowanej. Natomiast z grup iniekowanych masa gąsiąt była wyższa (od 3,1 g K2 – iniekcja solą fizjologiczną w 20. dniu inkubacji do 4,8 g D1-E15, tj. iniekcja dawką 15 mg wit. E w 13. dniu inkubacji).

W ocenie łącznej, ptaki pochodzące ze stada hodowlanego gęsi Białej Kołudzkiej® uzyskały największą masę ciała po 8-tygodniowym (4722 g grupa kontrolna K0 – bez iniekcji) i 12-tygodniowym odchowcie (6335 g grupa kontrolna K1 – iniekcja soli fizjologicznej w 13. dniu inkubacji). Natomiast masa ciała gęsi przed ubojem w ocenie łącznej kształtowała się w przedziale od 5305 g (grupa D2-E30 – iniekcja 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji) do 5432 g (grupa kontrolna K1 – iniekcja soli fizjologicznej w 13. dniu inkubacji). Przeprowadzone w 12. tygodniu pomiary zoometryczne dowiodły, iż gęsi Białe Kołudzkie® wyróżniały się najdłuższym przedramieniem (21,06 cm – grupa D1-E30), grzbietem mostka (16,47 cm – grupa K0) oraz największą grubością mięśni piersiowych (2,50 cm – grupa K0), wobec pozostałych grup doświadczalnych ptaków. Najniższe wartości w/w parametrów wykazano w grupie gęsi kieleckich: bez iniekcji jaj (K0 – dł. przedramienia 18,53 cm) i w grupie iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 20. dniu inkubacji (D2-E15 – 14,39 cm dł. grzbietu mostka i 1,85 cm grubość m. piersiowych).

Masa ciała ptaków, w tym tuszek, warunkowana była ich pochodzeniem genetycznym. Najcięższymi ptakami wybranymi do uboju były gęsi Białe Kołudzkie®, których średnia masa

wyniosła 6857 g, a najlżejszymi gęsi kieleckie (4400 g). W ocenie łącznej średnia masa ciał ptaków kształtowała się na wyrównanym poziomie, osiągając średnio największą masę 5483 g w grupie K1 (iniekcja solą fizjologiczną w 13. dniu inkubacji), a najmniejszą 5300 g w grupie D2-E30 (iniekcja 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji).

Największą wydajnością rzeźną zarówno tuszki ciepłej, jak i schłodzonej, cechowały się gęsi Białe Kołudzkie® z grupy K0, tj. nie iniekowanej, która wynosiła odpowiednio 69,23% i 68,40%. W ocenie łącznej natomiast wskaźnik ten osiągnął najwyższą wartość w grupie iniekowanej dawką 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji (66,74% tuszka ciepła i 65,60% tuszka schłodzona), a najniższą w grupie iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 13. dniu inkubacji (64,98% – tuszka ciepła i 64,14 % – tuszka schłodzona).

Łączna ocena masy mięśni wykazała największy ich udział w grupie kontrolnej K1 (iniekcja solą fizjologiczną w 13. dniu inkubacji), tj. 617,3 g (mięśnie piersiowe), 474,0 g (mięśnie nóg) i 1091 g (mięśnie ogółem). Odwrotną zależność odnotowano w przypadku grupy iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 13. dniu inkubacji, gdzie stwierdzono łącznie najmniejszy udział mięśni piersiowych (582,1 g) i mięśni ogółem (1035 g). W grupie D2-E30 (iniekcja 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji) zanotowano najmniejszy udział mięśni nóg (448,0 g).

Analogicznie jak w przypadku udziału mięśni, również udział poszczególnych elementów rosołowych był największy w grupie kontrolnej K, gdzie w 13. dniu inkubacji przeprowadzono iniekcję solą fizjologiczną. W ocenie łącznej masa szyi zawierała się w przedziale od 172,0 g (D1-E15) do 187,5 g (K1), a skrzydeł od 496,8 g (D2-E30) do 519,6 g (K1). Łączna masa szkieletu wybranych grup genetycznych gęsi była największa w grupie doświadczalnej iniekowanej 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji i wyniosła 768,2 g

Zgodnie z uwarunkowaniami genetycznymi gęsi Białe Kołudzkie® zawierały znacząco więcej tłuszczu sadełkowego i skóry z tłuszczem podskórnym, średnio odpowiednio o 170,6 g i 646,5 g wobec gęsi kieleckich oraz średnio o 125,6 g i 502,0 g wobec gęsi słowackich. W ocenie łącznej, z grupy nie iniekowanej (K0) pochodziły ptaki o największej zawartości tłuszczu sadełkowego (188,3 g), a największy udział skóry z tłuszczem podskórnym cechował gęsi z grupy iniekowanej 30 mg wit. E w 20. dniu inkubacji (D2-E30).

Wartość pH mięśni piersiowych w obrębie poszczególnych grup doświadczalnych gęsi była wyrównana i w ocenie łącznej mieściła się w przedziale od 5,72 (K2) do 5,83 (K1). Również w przypadku parametru zdolności utrzymywania wody własnej (WHC) różnica między danymi grupami doświadczalnymi ptaków wyniosła zaledwie 1,67%. Grupa kontrolna K2 (iniekcja soli fizjologicznej w 20. dniu inkubacji) wyróżniała ptaki – o najciemniejszej barwie mięśni piersiowych (L*30,50), a grupa kontrolna nie iniekowana K0 – o najjaśniejszej (L*32,46). Mięśnie nóg pochodzące z grupy doświadczalnej gęsi iniekowanej dawką 15 mg wit. E w 13. dniu inkubacji (D1-E15) w ocenie łącznej cechowały się najniższą wartością pH (6,14) i najciemniejszą barwą (L*33,92). Zdolność utrzymywania wody własnej w obrębie grup genetycznych i doświadczalnych była wyrównana i w ocenie łącznej mieściła się w granicach od 22,73 (K2) do 24,24% (D2-E15).

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

Celem badań 2. etapu było określenie najbardziej efektywnych dawek pyłku pszczelego w formie ekstraktu metodą *in ovo* na podstawie wyników wylęgowości, analizy parametrów biochemicznych krwi piskląt oraz wyników produkcyjnych kurcząt brojlerów.

Rozpoczęto badania w ramach 3. etapu, którego celem jest określenie wpływu suplementacji ekstraktem z pyłku pszczelego i roztworem węglowodanowym metodą *in ovo* na status energetyczny, rozwój układu pokarmowego u piskląt oraz wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów, przy standardowym oraz opóźnionym dostępie do paszy.

Doświadczenia przeprowadzono przy użyciu 1740 jaj wylęgowych Ross 308, pochodzących od komercyjnego stada rodzicielskiego kur mięsnych w wieku 38 tygodni (+/- 2 tygodnie). Jaja ważono indywidualnie, a średnia masa wynosiła 62,3 g (między 60,0 a 64,5 g). Jaja inkubowano zgodnie ze standardowymi praktykami wylęgarni w aparacie lęgowym typu HEKA 1500 w Zakładzie Hodowli Drobiu Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach. Wszystkie jaja wyeliminowane podczas świetlenia w 7. i 18. dobie inkubacji zostały objęte oceną, podczas której określano fazę rozwojową zarodków. Jaja pozostałe po wylęgu objęto analizą embriopatologiczną na podstawie ułożenia zarodka w jajku, wad rozwojowych oraz deformacji (Tulett – Aviagen, 2009). W 18. dniu inkubacji jaja zważono i prześwietlono, aby wyeliminować jaja niezapłodnione i zawierające zamarte zarodki. Jaja z żywymi zarodkami podzielono losowo na pięć grup: I – grupa kontrolna (sól fizjologiczna), II, III i IV – grupy z różnymi stężeniami ekstraktu pyłku pszczelego (1,5%, 2,5% i 5,0%). Do ostatniej grupy V podano roztwór węglowodanowy.

Wylęzione pisklęta odchowywano na ściółce z trocin zgodnie z zaleceniami firmy Ross. Ptaki miały stały dostęp do wody i paszy. Wszystkie grupy żywiono tymi samymi mieszankami, stosując tryfazowy program żywienia: starter, grower i finisz. Oceniono wylęgowość oraz jakość nowo wyklutych piskląt, ponadto wykonano analizy biochemiczne i hematologiczne krwi jednodniowych piskląt. W 42. dniu życia kurcząt przeprowadzono uproszczoną analizę rzeźną. Na podstawie uzyskanych wyników, dla każdej z w/w cech zostały obliczone: wartości średnie oraz błąd standardowy średniej (SEM). Ponadto dane opracowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji, a istotności różnic między średnimi określano przy pomocy testu Duncana. Do analiz statystycznych wykorzystano program statystyczny Statistica (wersja 13.0). Testowanie poprzedzono zbadaniem normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. W wyniku badania stwierdzono, że analizowane dane podlegają rozkładowi normalnemu.

Najniższą wylęgowość odnotowano w grupie IV, a najwyższą w grupie II. Różnica pomiędzy wspomnianymi grupami wynosiła 33,3% przy $P \leq 0,05$. Dla oceny jakości ptaków posłużono się następującymi wskaźnikami: masa ciała, liczba punktów wg Tona i in. (2003) oraz długość piskląt. Pisklęta z grupy II i V charakteryzowały się najwyższą masą ciała ($P \leq 0,05$). Zastosowane czynniki doświadczalne nie wpłynęły istotnie statycznie na sumę punktów „Tona score” ($P \geq 0,05$).

Kolejnym badanym parametrem jakościowym była długość piskląt oznaczona poprzez pomiar długości od czubka dzioba do końca środkowego palca nogi. Pisklęta z grupy kontrolnej cechowały się najniższą długością ciała, natomiast pisklęta z grupy II były dłuższe średnio o 0,4 cm. Różnice te zostały potwierdzone statystycznie przy $P \leq 0,05$. Doświadczalne podanie 5,0% ekstraktu pyłku pszczelego do rozwijającego się zarodka wpłynęło istotnie ($P \leq 0,05$) na zwiększenie wartości białka ogólnego i kwasu moczowego. W przypadku cholesterolu HDL zaobserwowano najwyższe wartości w grupie I i IV (średnio 4,25 mmol/L), a najniższe w grupie II i III (średnio 3,38 mmol/L) przy $P \leq 0,05$. We wszystkich grupach, w których zastosowano iniekcje *in ovo* zaobserwowano istotnie statystycznie niższy poziom białka ogólnego, cholesterolu, cholesterolu HDL i cholesterolu LDL, a także kwasu moczowego we krwi w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez iniekcji). Analogiczne wyniki otrzymano w przypadku kwasu moczowego w 42. dniu życia. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi w zakresie aktywności AlaT i AspaT. Stwierdzono wpływ iniekcji *in ovo* na wydajność rzeźną ptaków, zarówno z podrobami jak i bez podrobów. Wyższą wydajność rzeźną z podrobami osiągnęły ptaki z grupy III (78,82%) w porównaniu do kurcząt z grupy I (77,60%) przy $P \leq 0,05$. W przypadku wydajności rzeźnej bez podrobów, analogicznie najniższą wartość zaobserwowano u kurcząt

z grupy kontrolnej, a najwyższą w grupie iniekowanej pyłkiem pszczelim w stężeniu 2,5 oraz 5,0% ($P \leq 0,05$). Z kolei największym udziałem podrobów charakteryzowały się kurczęta z grupy kontrolnej.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że iniekcja *in ovo* ekstraktu pyłku pszczelego w 18. dobie rozwoju embrionalnego wpłynęła istotnie na wylęgowość brojlerów. Podawanie wysokich dawek ekstraktu pyłku pszczelego (5,0%) oraz roztworu węglowodanów istotnie obniża poziom wylęgowości. Uzyskanie wysokiej jakości piskląt jednodniowych jest możliwe dzięki iniekcji *in ovo*. W przeprowadzonym doświadczeniu odnotowano korzystne działanie dawki 1,5% ekstraktu pyłku pszczelego podawanego *in ovo* na masę ciała oraz długość piskląt jednodniowych.

Tab. 1. Wylęgowość z jaj nałożonych (%)

Parametr	Dawki pyłku pszczelego (%)				Roztwór węglowodanowy	SEM
	0	1,5	2,5	5,0		
Wylęgowość (%)	83,33 ^{ab}	91,67 ^a	83,33 ^{ab}	58,33 ^b	67,08 ^{ab}	4,02

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

Tab. 2. Masa ciała kurcząt podczas odchowu

Wiek (dni)	Dawki pyłku pszczelego (%)				Roztwór węglowodanowy	SEM
	0	1,5	2,5	5,0		
7	126,98 ^{ab}	133,05 ^a	131,40 ^a	123,77 ^{ab}	118,57 ^b	0,89
21	789,06	848,59	774,33	741,06	728,78	36,83
35	2305,55	2324,30	2235,40	2312,37	2403,00	14,60
42	2818,82	2587,65	2760,56	2011,77	2439,36	152,51

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

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, prof. IZ PIB

Celem zadania jest określenie częstotliwości występowania i stopnia nasilenia miopatii i wad mięsa u szybko i wolno rosnących kurcząt rzeźnych oraz zbadanie fizykochemicznych i sensorycznych właściwości obarczonego wadami mięsa, a także skorelowanie uzyskanych wyników z genetycznym pochodzeniem ptaków, przyrostami masy ciała, umięśnieniem oraz budową mikroskopową mięśni.

Celem etapu było określenie wpływu miopatii *white stripping* (białych smug) na sensoryczne i technologiczne cechy mięsa kurcząt.

Materiał doświadczalny stanowiły szybko rosnące kurczęta rzeźne, pochodzące po rodzicach z różnych stad reprodukcyjnych. Pisklęta zakupiono w komercyjnym zakładzie wylęgu drobiu i odchowano w Doświadczalnej Fermie Drobiu w Aleksandrowicach. Jednodniowe, oznaczone indywidualnymi numerami pisklęta przydzielono do dwóch grup i umieszczone w przedziałach na głębokiej ściółce. Kurczęta odchowywano do 42. dnia życia i żywiono do woli jednakowymi, pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi. W trakcie odchowu kontrolowano indywidualną masę ciała ptaków, spożycie paszy oraz liczbę ptaków padłych. Na koniec doświadczenia, w 42. dniu życia, wybrano do uboju po 50 kurcząt z każdej grupy (o rów-

nym udziale obu płci). W celu oceny całego stada kurcząt pod względem częstotliwości występowania badanej wady, w 44. dniu odchowu przeprowadzono kolejny ubój, podczas którego oceniono około 420 kurcząt.

Podczas ubojów przeprowadzonych w 42. dniu życia 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. Wszystkie ubite 42-dniowe kurczęta poddano ocenie wydajności poubojowej, jakości tuszki i fizykochemicznych cech mięsa. W 15 min. 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 piersiowe oceniono pod kątem defektu *white stripping* i przydzielono je do grup w zależności od braku lub obecności wady z uwzględnieniem stopnia jej nasilenia: grupa I – mięśnie normalne – brak wady, grupa II, III i IV – odpowiednio wady o małym, średnim i dużym nasileniu. Mięśnie 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. Podczas analizy rzeźnej pobrano także próbki w celu określenia podstawowego składu chemicznego mięsa: suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego, popiołu surowego, zawartości cholesterolu oraz określenia profilu wyższych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mięśniowym.

Badania wykazały pewne różnice w częstotliwości i nasileniu występowania wady „białych smug” w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów w zależności od ich płci oraz genetycznego pochodzenia. Wyodrębnione grupy mięśni piersiowych kurcząt różniły się istotnie składem chemicznym. Najwyższą zawartością białka ogólnego charakteryzowały się mięśnie zakwalifikowane jako normalne (grupa I), przy czym różnice pomiędzy nimi a innymi grupami potwierdzono jedynie w przypadku mięśni o największym nasileniu białych prążków (grupa IV, $P \leq 0,01$). Równocześnie, mięśnie z grupy IV charakteryzowały się najwyższą zawartością tłuszczu surowego z różnicami potwierdzonymi statystycznie pomiędzy nimi a grupami I i II. Wraz z nasilaniem się wady białych smug malał udział popiołu surowego, nie zaobserwowano natomiast różnic w zawartości wody (suchej masy). Analiza profilu wyższych kwasów tłuszczowych wykazała, że lipidy mięśni piersiowych z grupy IV zawierały mniej nasyconych (SFA) oraz więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) w porównaniu z pozostałymi grupami. Ponadto wielonienasycone kwasy tłuszczowe lipidów mięśni w tej grupie wykazywały najkorzystniejszy, najniższy stosunek PUFA n-6/n-3 w porównaniu do lipidów mięśni grup I, II i III. Stwierdzono także tendencję do wzrostu zawartości kwasu α -linolenowego (ALA) w tłuszczu mięśniowym mięsa z piersi kurcząt wraz z nasilaniem się omawianego defektu.

Wyniki badań wskazują, że intensywność białych prążków nie miała istotnego wpływu na większość parametrów technologicznych mięsa takich, jak pH, barwa czy wielkość wycieku swobodnego. Istotne różnice pomiędzy grupami dotyczyły jedynie strat termicznych wzrastających wraz z nasilaniem się wady.

Badania wykazały, że stopień nasilenia białych prążków w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów wpływa na profil kwasów tłuszczowych i skład chemiczny mięsa, dlatego też mięso obarczone tą wadą różni się pod względem wartości odżywczej od mięsa normalnego. Równocześnie, obecność białych prążków nie miała wpływu na technologiczne cechy mięsa.

Zakład Hodowli Owiec i Kóz

Kierownik: dr inż. Jan Knapik

Zadanie 01-13-03-11

Charakterystyka zróżnicowania genetycznego małej populacji na przykładzie rodzimej rasy kóz karpackich

Kierownik zadania: dr hab. Aldona Kawęcka

Fot. 1. Kozy karpackie



Fot. M. Pasternak

Realizacja zadania uwzględnia analizę struktury genetycznej populacji o małej liczebności na przykładzie kóz karpackich oraz problematykę wykorzystania polimorfizmu białek mleka koziego w ocenie przydatności technologicznej i dietetycznej surowca.

W okresie sprawozdawczym została utworzona i przygotowana aplikacja bazodanowa dla kóz rasy karpackiej, która umożliwi widok zakładkowy z podziałem na moduły (logowania, zwierząt, hodowców i raportów). Ponadto pozwala ona na wyświetlanie informacji o zwierzętach z filtrowaniem, edycję i dodawanie nowych zwierząt i hodowców oraz generowanie „Świadectwa wpisu do ksiąg” wraz z eksportem do pliku word oraz pdf. Uaktualniona baza danych zawiera informacje o 330 kozach i 72 kozłach. Przygotowano do pobierania listę opracowywanych raportów. Będą one generowane z bazy danych, a dotyczą całej populacji kóz karpackich.

Równolegle do tych zadań przeprowadzono wstępną analizę polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. W ramach działań pobrano krew od dorosłych kóz karpackich (samice i samce) w stadach objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Liczebność kóz karpackich objętych programem przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Liczebność kóz karpackich objętych programem ochrony

Województwo	lubelskie	małopolskie	podkarpackie	śląskie
liczba stad	1	11	2	3
liczba kóz	7	104	31	31
liczba kozłów	1	13	5	6

Wykorzystując zakupione startery, zalecane przez ISAG do kontroli pochodzenia kóz, przeprowadzono wstępne analizy. W obrębie wybranych 14 markerów mikrosatelitarnych, zidentyfikowano łącznie 66 *alleli*; od 2 do 7 *alleli* w danym locus. Najwięcej *alleli* (7) zaobserwowano w locus INRA006 o długościach od 109 do 123 pz. Uzyskane dane wykorzystane zostaną do analizy statystycznej i posłużą do oszacowania parametrów struktury genetycznej populacji kóz karpackich, m.in. heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej, indeksu stopnia polimorfizmu, itp.

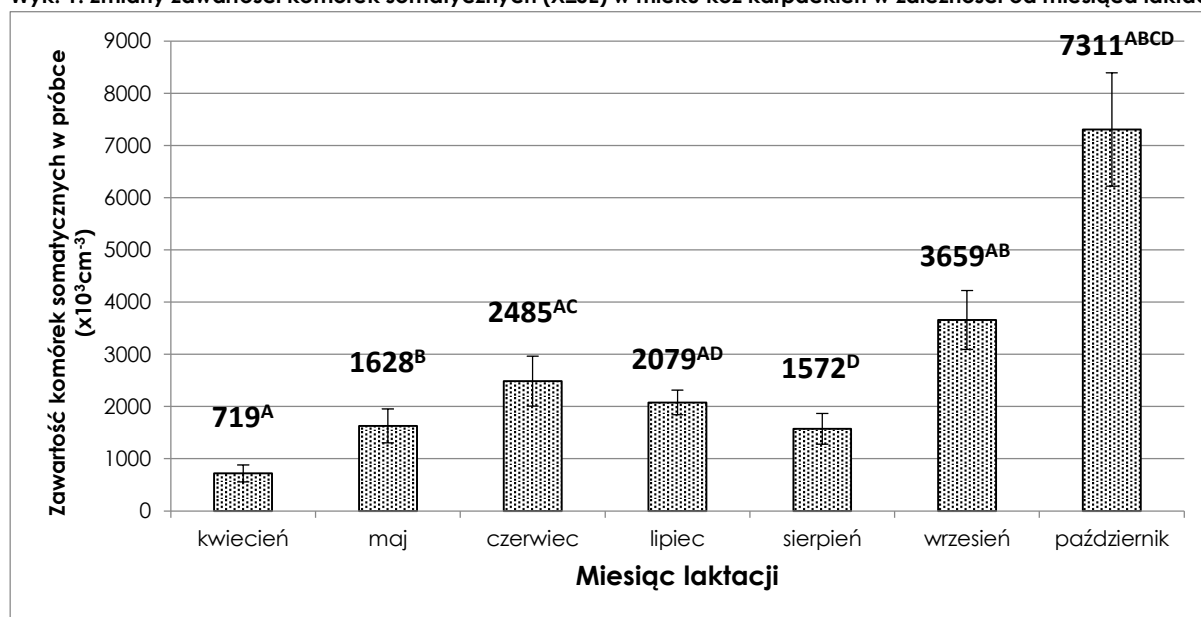
Tab. 2. Allele zidentyfikowane w analizowanych loci

Lp.	Marker	Liczba alleli	Allele (pz)
1.	SRCRSP23	6	83, 85, 97, 99, 101, 105, 107
2.	ILSTS87	4	135, 141, 147, 149
3.	INRA063	3	175, 177, 179
4.	SRCRSP8	4	222, 224, 230, 242
5.	OARFCB20	3	95, 97, 99
6.	MCM527	2	154, 166
7.	MAF65	4	119, 123, 133, 135
8.	CSRD247	5	222, 234, 236, 238, 246
9.	INRA006	7	109, 113, 115, 117, 119, 121, 123
10.	ILSTS19	6	142, 144, 148, 150, 152, 154
11.	ILSTS008	3	170, 174, 178
12.	INRA005	2	119, 121
13.	SRCRSP5	4	165, 171, 173, 175
14.	INRA023	3	201, 203, 205, 209, 215, 217

W ramach oceny polimorfizmu genów białek mleka koziego przewiduje się identyfikację genów kazein. Kazeinę reprezentują 4 frakcje: α S1-kazeina (CSN1S1), α S2-kazeina (CSN1S2), β -kazeina (CSN2), k-kazeina (CSN3). Frakcje te są kodowane przez pojedyncze geny zlokalizowane na chromosomie 6. Polimorfizm białek mleka jest jednym z czynników, który wpływa na zawartość podstawowych składników mleka, a także na jego przydatność technologiczną.

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. Zawartość komórek somatycznych w mleku kóz karpackich w ciągu 7 miesięcy doju była zróżnicowana i kształtowała się na poziomie od $719 \times 10^3 \text{ cm}^{-3}$ w kwietniu do $7311 \times 10^3 \text{ cm}^{-3}$ w październiku (Wyk. 1).

Najwyższą zawartość stwierdzono w ostatnim miesiącu laktacji (październik) – odnotowane w tym miesiącu średnie wartości były od 2 do 10-krotnie wyższe, w porównaniu do uzyskanych w pozostałych okresach obserwacji. Różnice pomiędzy LKS w ostatnim miesiącu laktacji, a pozostałymi okresami okazały się statystycznie istotne ($P \leq 0,01$).

Wyk. 1. Zmiany zawartości komórek somatycznych ($X \pm SE$) w mleku kóz karpackich w zależności od miesiąca laktacji

a, b – $p \leq 0,05$.

A, B – $p \leq 0,01$ – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami różnią się statystycznie istotnie.

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

Zadanie 01-14-04-11

Wykorzystanie białka różnych gatunków owadów w żywieniu królików

Kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

W ostatnim czasie coraz częściej poruszany jest temat zastosowania w żywieniu zwierząt mączek z 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 bieżącym roku sprawozdawczym rozpoczęto badania na młodzieży królików rasy nowozelandzkiej białej w wieku od 35. do 90. dnia życia. Zwierzęta podzielono na 4 grupy: kontrolną (K) i trzy doświadczalne. Żywiono je pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi standardową (K) oraz z 4% dodatkiem mączek z owadów jedwabnika morwowego (D1), mącznika młynarka (D2) i drewnojada (D3).

Masa ciała wszystkich króliczków w 35. dniu życia była wyrównana, natomiast od 56. dnia obserwowano istotne różnice pomiędzy grupą D2 a pozostałymi. Najniższą masę ciała we wszystkich dniach odchowu osiągnęły króliki z grupy D3, różnica ta została potwierdzona statystycznie w stosunku do wszystkich pozostałych grup (Tab. 1).

Tab. 1. Masa ciała w 35., 56., 70. i 90. dniu życia króliczków (g) (n=28)

Masa ciała	Grupa				p value
	K	D1	D2	D3	
w 35. dniu życia	778,3±9,600	782,5±6,642	773,3±7,212	780,2±8,124	0,717
w 56. dniu życia	1248,3±34,22 ^a	1272,1±22,95 ^a	1380,8±24,69 ^b	1232±24,51 ^a	0,004
w 70. dniu życia	1818,3±35,89 ^a	1883,3±10,32 ^{ab}	1954,1±35,30 ^b	1732,8±24,21 ^c	0,010
w 90. dniu życia	2352,1±26,73 ^a	2575,0±12,52 ^b	2563,7±20,54 ^b	2254,6±22,41 ^c	<0,001

Wartości oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie a, b, c – p≤0,05.

W miesiącu kwietniu przeprowadzono uboje młodych królików (wiek 90 dni). Tkanę mięśniową pochodzącą z combra oraz tylnej nogi, a także treść jelita ślepego poddano analizie.

W tkance mięśniowej oznaczono poziom:

- a) TBA-RS w mięsie mrożonym po 14 i 90 dniach przechowywania w zamrażarce (-20°C),
- b) cholesterolu całkowitego,
- c) witamin A i E,
- d) kolagenu,
- e) białka, tłuszczu.

Wszystkie badania wykonano w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB wg standardowych procedur.

Analiza podstawowa mięśni combra i tylnej nogi nie wykazała statystycznie potwierdzonych różnic w ilości białka ogólnego i popiołu surowego. Istotne różnice stwierdzono w mięśniach combra pomiędzy grupą K a pozostałymi w ilości suchej masy i tłuszczu surowego. W mięśniach tylnej nogi istotne różnice w zawartości suchej masy dotyczyły grupy D2 i D3, a w przypadku tłuszczu surowego grupy K i D3 oraz D2 i D3 (Tab. 2).

Tab. 2. Analiza podstawowa w mięśniach combra (C) i tylnej nogi (T) (%) (n=10)

Wyszczególnienie	Grupa				P value
	K	D1	D2	D3	
Białko ogólne (C)	22,86±0,44	23,40±0,36	23,24±0,32	23,54±0,34	0,606
Białko ogólne (T)	22,02±0,19	21,68±0,08	21,72±0,29	22,14±0,38	0,543
Sucha masa (C)	29,20±0,86 ^a	26,61±0,20 ^b	27,30±0,28 ^b	26,54±0,26 ^b	0,003
Sucha masa (T)	26,89±0,22 ^{ab}	26,09±0,24 ^{ab}	27,18±0,48 ^a	25,82±0,47 ^b	0,059
Tłuszcz surowy (C)	5,561±1,20 ^a	1,983±0,23 ^b	2,925±0,37 ^b	2,130±0,26 ^b	0,003
Tłuszcz surowy (T)	4,308±0,22 ^a	3,193±0,25 ^{ab}	4,552±0,46 ^a	2,993±0,53 ^b	0,023
Popiół surowy (C)	1,140±0,01	1,161±0,01	1,138±0,01	1,145±0,01	0,440
Popiół surowy (T)	1,115±0,001	1,138±0,01	1,111±0,01	1,155±0,01	0,122

Wartości oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie a, b – $p \leq 0,05$.

Najwyższy poziom cholesterolu stwierdzono w grupie D3 w mięśniach tylnej nogi. Wartość ta różniła się istotnie w stosunku do grupy kontrolnej. W tłuszczu combra najwięcej cholesterolu było w grupie D1 najmniej w grupie D3 (Tab. 3).

Najniższe wartości TBA-RS po 14 dniach zamrażalniczego przechowywania mięsa combra stwierdzono w grupie D3, pomiędzy tą grupą a pozostałymi różnice były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Po 90 dniach przechowywania mięśni combra nie stwierdzono statystycznie potwierdzonych różnic.

W mięśniach tylnej nogi wartości TBA-RS po 14 dniach przechowywania różniły się pomiędzy grupami K a D2 i D3, natomiast po 90 dniach pomiędzy grupą K a D1. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami w zawartości kolagenu zarówno w mięśniu combra, jak i mięśniach tylnych nóg.

Poziom witaminy A w mięśniu combra był porównywalny w grupach, natomiast w mięśniach tylnej nogi najwyższy poziom stwierdzono w grupie kontrolnej, najniższy w grupie D3. Pośród tych grupami wystąpiła istotność na poziomie $p \leq 0,05$. Poziom witaminy E był zbliżony i niepotwierdzony statystycznie we wszystkich grupach i wszystkich mięśniach.

Tab. 3. Poziom cholesterolu całkowitego (mg/g), witaminy A i E ($\mu\text{g/g}$), kolagenu (g/100g) oraz stopień oksydacji tłuszczu po 14 i 90 dniach przechowywania mięsa (mg aldehydu malonowego/kg próby) w mięśniach tylnej nogi (T) i combra (C) (n=10)

Wyszczególnienie	Grupa				p value
	K	D1	D2	D3	
Cholesterol (T)	0,583±0,07 ^b	0,631±0,03 ^{ab}	0,618±0,02 ^{ab}	0,653±0,08 ^a	0,137
Cholesterol (C)	0,604±0,02 ^{ab}	0,625±0,02 ^a	0,583±0,01 ^{ab}	0,564±0,01 ^b	0,104
TBA-RS 14 dni (C)	0,392±0,02 ^a	0,426±0,02 ^a	0,353±0,02 ^a	0,269±0,03 ^b	0,001
TBA-RS 90 dni (C)	0,742±0,09	0,778±0,06	0,684±0,08	0,626±0,04	0,449
TBA-RS 14 dni (T)	0,390±0,03 ^a	0,338±0,02 ^{ab}	0,307±0,01 ^b	0,292±0,02 ^b	0,012
TBA-RS 90 dni (T)	0,567±0,09 ^a	0,394±0,03 ^b	0,401±0,02 ^{ab}	0,407±0,04 ^{ab}	0,098
Kolagen (C)	0,621±0,06	0,560±0,04	0,649±0,06	0,572±0,03	0,594
Kolagen (T)	0,695±0,05	0,740±0,03	0,773±0,04	0,816±0,05	0,330
Witamina A (C)	0,208±0,04	0,150±0,03	0,152±0,01	0,187±0,00	0,261
Witamina A (T)	0,145±0,04 ^a	0,090±0,00 ^{ab}	0,086±0,01 ^{ab}	0,072±0,01 ^b	0,118
Witamina E (C)	5,250±0,83	3,923±0,52	4,358±0,17	4,665±0,21	0,336
Witamina E (T)	4,193±0,67	3,023±0,12	3,316±0,29	3,310±0,23	0,207

Wartości oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie a, b – $p \leq 0,05$.

W treści jelita ślepego oznaczono poziom lotnych kwasów tłuszczowych (Tab. 4). Pomiedzy badanymi grupami wystąpiły istotne różnice ($p \leq 0,05$) w zawartości kwasu propionowego pomiędzy grupą K a D3, masłowego, izowalerianowego i walerianowego pomiędzy grupą K a wszystkimi doświadczalnymi.

Tab. 4. Lotne kwasy tłuszczowe w próbkach treści jelita ślepego ($\mu\text{mol/g}$) ($n=10$)

Lotne kwasy tłuszczowe	Grupa				P value
	K	D1	D2	D3	
octowy	60,97 $\pm$ 8,95	50,30 $\pm$ 3,25	46,07 $\pm$ 7,40	40,84 $\pm$ 4,26	0,182
propionowy	5,379 $\pm$ 0,55 ^a	4,084 $\pm$ 0,28 ^{ab}	3,867 $\pm$ 0,59 ^{ab}	3,220 $\pm$ 0,46 ^b	0,037
izomasłowy	0,215 $\pm$ 0,03	0,164 $\pm$ 0,01	0,217 $\pm$ 0,04	0,146 $\pm$ 0,01	0,142
masłowy	22,75 $\pm$ 3,85 ^a	13,33 $\pm$ 1,06 ^b	10,14 $\pm$ 2,12 ^b	7,79 $\pm$ 1,69 ^b	0,001
izowalerianowy	0,438 $\pm$ 0,04 ^a	0,294 $\pm$ 0,02 ^b	0,309 $\pm$ 0,05 ^b	0,207 $\pm$ 0,02 ^b	0,004
walerianowy	1,291 $\pm$ 0,105 ^a	0,808 $\pm$ 0,05 ^b	0,694 $\pm$ 0,06 ^{bc}	0,501 $\pm$ 0,06 ^c	0,000

Wartości oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie.

a, b, c – $p \leq 0,05$.

Zadanie 04-14-02-11

Opracowanie nowego typu klatek dla królików utrzymywanych w warunkach podwyższonego dobrostanu

Kierownik zadania: prof. dr hab. Paweł Bielański

Głównym celem prowadzonych badań jest przetestowanie standardowych oraz opracowanie nowych typów klatek dla utrzymywania stada podstawowego oraz rosnącej młodzieży w warunkach podwyższonego dobrostanu, przy zapewnieniu opłacalności tej gałęzi produkcji.

W ramach prowadzonych badań zostanie opracowana technologia chowu dostosowana do nowych wymogów UE, zapewniających królikom możliwość dostępu do wybiegów i terenów zielonych. W etapie pierwszym utworzono następujące grupy doświadczalne.

Grupy doświadczalne (kojec):

Grupa 0. – kojec o wymiarach 60x80 cm (6 samic).

Grupa 1. – kojec o wymiarach 60x80 cm i dostawioną wewnątrz skrzynką wykotową (6 samic).

Grupa 2. – kojec o wymiarach 120x80 cm bez skrzynki wykotowej (6 samic).

Grupa 3. – kojec o wymiarach 120x80 cm i dostawioną wewnątrz skrzynką wykotową (6 samic).

Grupy doświadczalne (klatki):

Grupa 0. – klatka o wymiarach 60x80 cm (6 samic).

Grupa 1. – klatka o wymiarach 60x80 cm i dostawioną wewnątrz skrzynką wykotową (6 samic).

Grupa 2. – klatka o wymiarach 120x80 cm bez skrzynki wykotowej (6 samic).

Grupa 3. – klatka o wymiarach 120x80 cm i dostawioną wewnątrz skrzynką wykotową (6 samic).

Grupy doświadczalne (system parkowy):

Grupa 0. – budka z wybiegiem o pow. 2 m² bez wykotnika (6 samic).

Grupa 1. – budka z wybiegiem o pow. 2 m² z wstawianym wykotnikiem (6 samic).

Grupa 2. – kojec ziemny z wybiegiem (6 samic).

Grupa 3. – kojec ziemny z wybiegiem i wstawianym wykotnikiem (6 samic).

Najlepsze wyniki odchowu i wzrostu młodych królików uzyskano w grupach doświadczalnych przebywających w klatkach i kojcach. Zdecydowanie niższe wskaźniki użytkowości tuczej uzyskano dla zwierząt odchowywanych w systemie parkowym. Wstępne wyniki analizy rzeźnej wykazują najwyższą wydajność rzeźną dla tuszek królików utrzymywanych w klatkach i kojcach. W trakcie doświadczenia przeprowadzono testy behawioralne, wykazujące największy odsetek królików ufnych w grupach przebywających w kojcach i klatkach. Pobrano również

próbki do badań ekspresji wybranych genów (receptory CCR2 oraz CXCR1, IL1B, IL8, PTGS2, TNFalfa, tgf beta, IL6, IL10, IL12) typu prozapalnego na urządzeniu Real-Time PCR.

Fot. 1. Różne systemy utrzymania królików doświadczalnych



Zadanie 04-14-03-11

Wartość odżywcza mięsa oraz przyswajalność wapnia z muszli jadalnych ślimaków *Cornu aspersum* i *Helix pomatia* w doświadczeniach na szczurach

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

Celem badań była ocena parametrów wartości odżywczej mięsa ślimaków hodowlanych z gatunku *Cornu aspersum* (*Cornu asp. maxima* i *Cornu asp. aspersum*) oraz ślimaka winniczka (*Helix pomatia* L.), w różnym wieku i z różnych warunków hodowlanych. Winniczki w wieku 2+ i powyżej zostały pobrane z populacji naturalnej, a dojrzałe ślimaki szare (*Cornu aspersum*) z polowych zagród hodowlanych (obsady 300 szt. wylęgu/m²) były w wieku 1+ i 2+.

Metodą badań były klasyczne doświadczenia żywieniowe na szczurach, którym podawano w formie diety doświadczalnej zliofilizowane nogi ślimaków lub worki trzewiowe, w zależności od grupy doświadczalnej.

Wyniki

Tab. 1. Wartość pokarmowa białka gotowanego mięsa ślimaków (worki trzewiowe)

Gatunek ślimaka/wiek	BV	TD	NPU
Ślimak mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i> 1+	61,48 ^a	90,71 ^B	55,77
Ślimak mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i> 2+	59,53 ^a	92,78 ^A	55,23
Ślimak winniczek (<i>Helix pomatia</i> L.) 2+	67,40 ^{ab}	93,73 ^A	63,17
Ślimak winniczek (<i>Helix pomatia</i> L.) powyżej 2+	67,91 ^{ab}	89,82 ^B	60,99
Ślimak duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>) 1+	71,93 ^b	87,30 ^C	62,79

a, b, c – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p<0,05.

A,B,C – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p<0,01.

Tab. 2. Wartość pokarmowa białka gotowanego mięsa ślimaków (nogi)

Gatunek ślimaka/wiek	BV	TD	NPU
Ślimak mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i> 1+	62,50 ^{Aa}	91,87 ^B	57,42 ^A
Ślimak mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i> 2+	59,44 ^{Aa}	94,10 ^{BC}	55,93 ^A
Ślimak winniczek (<i>Helix pomatia</i> L.) 2+	73,08 ^{Bc}	94,67 ^C	69,18 ^B
Ślimak winniczek (<i>Helix pomatia</i> L.) powyżej 2+	67,19 ^{ABb}	94,80 ^C	63,69 ^B
Ślimak duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>) 1+	67,13 ^{ABb}	89,28 ^A	59,93 ^A

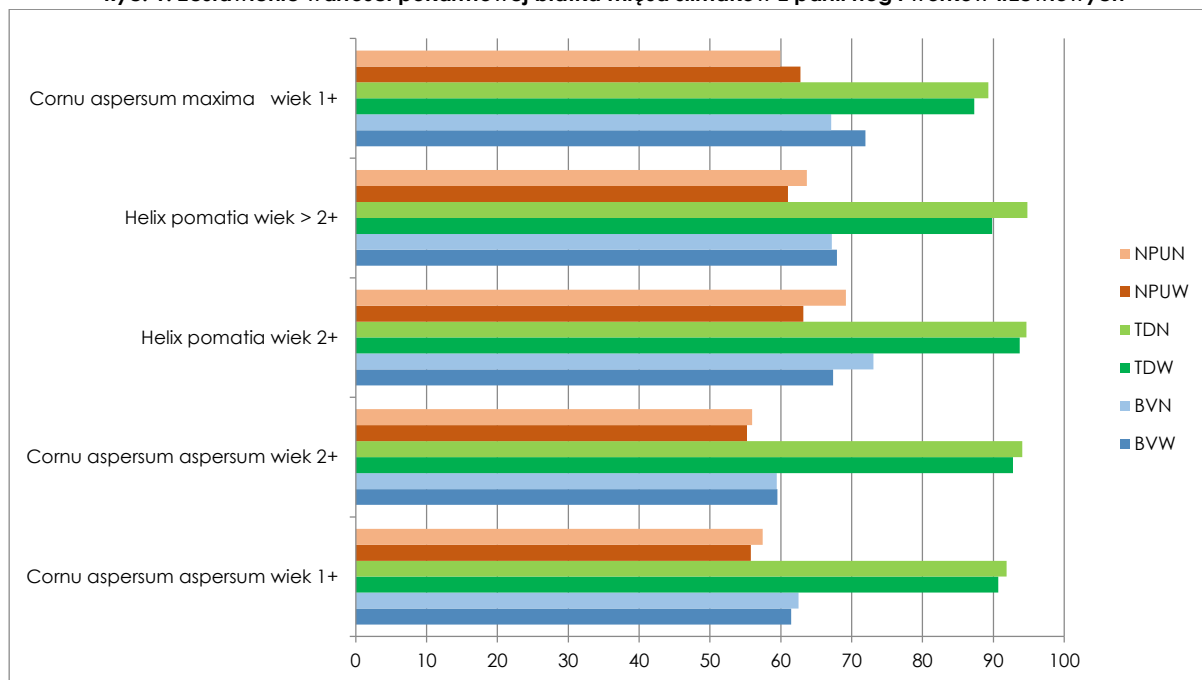
a, b, c – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p<0,05.

A, B, C – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p<0,01.

Legenda do Tab. 1. i 2.

BV – wartość biologiczną białka worka trzewiowego, nogi; TD – strawność rzeczywista białka worka trzewiowego, nogi; NPU – wykorzystanie białka netto jako iloczyn BV i TD, wyrażony w %.

Ryc. 1. Zestawienie wartości pokarmowej białka mięsa ślimaków z partii nóg i worków trzewiowych



Legenda:

BVW; BVN – wartość biologiczną białka worka trzewiowego, nogi; TDW; TDN – strawność rzeczywista białka worka trzewiowego, nogi; NPUW/NPUN – wykorzystanie białka netto jako iloczyn BV i TD, wyrażony w %.

Tab. 3. Wyniki biometryczne oraz wydajność mięsna ślimaków z gatunku *Cornu aspersum*

	<i>Cornu aspersum aspersum</i>	<i>Cornu aspersum maxima</i>
Masa ciała (g)	8,38A	15,75B
Średnica muszli (m)	26,2 A	32,7B
Współczynnik kondycji	0,46	0,45
Masa tuszy (g)	6,45A	12,0B
Masa nogi (g)	3,6A	6,4B
Masa worka trzewiowego (g)	2,9A	5,6B
Masa muszli (g)	1,9A	3,7B
Stosunek masy tuszy do masy ciała (%)	76,9	76,3
Stosunek masy nogi do masy ciała (%)	42,9	40,8
Stosunek masy nogi do masy tuszy (%)	56,0	53,5

Podsumowanie

Gotowane, zliofilizowane mięso z partii nogi ślimaka winniczka (*Helix pomatia* L.) zarówno w wieku 2+ , jak i winniczków starszych, posiadało w sposób statystycznie istotny wyższą wartość pokarmową, wyrażoną przez wskaźnik wykorzystania białka netto NPU w porównaniu ze ślimakiem małym szarym (*Cornu aspersum aspersum*) (zarówno w wieku 1+ i 2+) oraz dużym szarym (*Cornu aspersum maxima*) w wieku 1+, przy ekstensywnym systemie produkcji. Prowadzona jest analiza laboratoryjna i obliczeniowa dla pozostałych parametrów wartości odżywczej mięsa ślimaków, a także absorpcji wapnia muszli.

Zakład Hodowli Koni

Kierownik: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

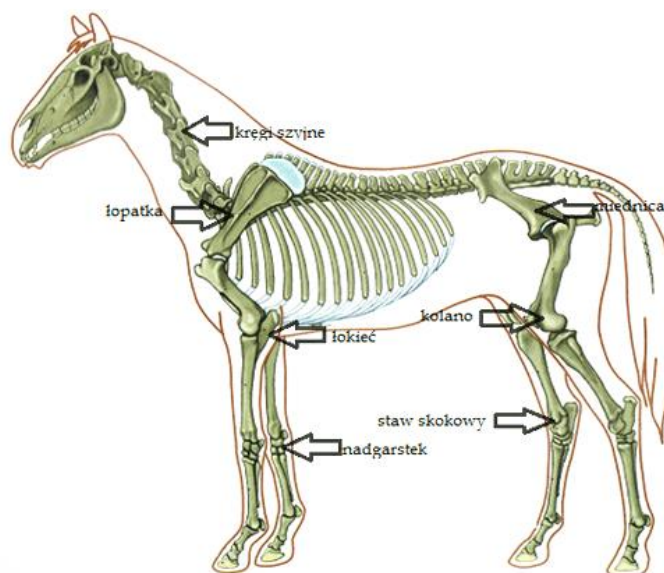
Zadanie 01-15-01-11

Opracowanie metody oceny budowy i funkcjonalności aparatu ruchowego koni

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

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. Przykładowo, 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. Kontynuowano badania służące do wyznaczenia teoretycznej fizjologicznej osi podparcia kończyny przedniej i tylnej konia.

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

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 piętek.
- 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.
- Pomiar 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.

Obserwacjom poddano konie różnych ras i w różnym wieku, w tym konie huculskie: 40 koni w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o., 35 koni w SKH Gładyszów, 45 koni z prywatnych hodowli oraz 30 koników polskich z prywatnych hodowli. Zbierany materiał dotyczył również koni utrzymywanych w różnych warunkach środowiskowych: stajennych, stajennych z dostępem do wybiegów, wolnowybiegowych i tabunowych. 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 posłużyła do wypracowania metody szczegółowej komputerowej obróbki uzyskanych zdjęć w celu oceny cech określonych według założeń metodyki.

Zadanie 01-15-02-11

Analiza wad i przyczyn eliminujących konie z hodowli w wybranych populacjach ras rodzimych

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

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. Zmiana charakteru użytkowania koni związana z postępem 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.

Mając na względzie ten aspekt, w metodzie zadania wydzielono cechy dotyczące wad pokroju i budowy z uwzględnieniem wad dyskwalifikujących oraz wad obniżających wartość użytkową. Kolejnym analizowanym zagadnieniem były cechy rozrodcze takie, jak: płodność,

żrebnosć, 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 celu pozyskania danych zgodnych z metodą uczestniczo w przeglądach selekcyjnych stadnin koni państwowych i prywatnych rasy huculskiej (około 250 szt.), koni rasy konik polski (100 szt.) oraz rasy śląskiej (50 szt.). Brano również udział w kwalifikacji ogierów oraz próbach dzielności wymienionych ras. Zebrane dane gromadzono z uwzględnieniem różnych grup wiekowych ocenianych koni.

Zadanie 04-15-02-11

Charakterystyka laktacji oraz określenie poziomu substancji biologicznie aktywnych w mleku klaczy

Kierownik zadania: dr inż. Grażyna Polak

Wzrastające na świecie zainteresowanie mlekiem klaczy jako produktem o wysokiej wartości odżywczej i unikalnym składzie daje możliwość wykorzystania rodzimych ras do podnoszenia opłacalności ich chowu i hodowli. Dodatkowo, mleko klaczy ma zbliżony skład do ludzkiego, jest produktem antyalergicznym, a także może być stosowane w leczeniu i profilaktyce chorób przewodu pokarmowego i skóry. Klacze zimnokrwiste są zdolne do produkcji ponad 25 litrów mleka dziennie, a klacze gorącokrwiste ponad 15 litrów. Konie zimnokrwiste cechują się łagodnym charakterem i mniejszą pobudliwością niż konie gorącokrwiste, co pozwala na łatwiejszą obsługę i zmniejsza niebezpieczeństwo urazów personelu obsługującego.

Podobnie jak w latach ubiegłych, w ramach tematu badawczego, pobierane były próbki mleka w stadzie klaczy zimnokrwistych i gorącokrwistych (stado należące do firmy Genactiv). Przeprowadzono analizę pod kątem składu, profilu kwasów tłuszczowych, właściwości fizykochemicznych, profilu białek serwatkowych, różnicy składu mleka mrożonego i liofilizowanego. Zbierano także informacje na temat żywienia, utrzymania, zdrowia i zachowania klaczy oraz źrebiąt zimnokrwistych. Otrzymane informacje zostały wprowadzone do bazy danych.

W stadzie klaczy sokólskich w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. mleko pozyskiwano raz dziennie (pomiędzy 12. a 13. godziną), mierzono jego objętość od każdej klaczy. Bezpośrednio potem pobrane próbki były schładzane i zamrażane do -20°C. Przed dojem źrebięta były odsadzane od matek na ok. 3-4 godziny. Raz na miesiąc pobierano próbki (100 ml) do badań. Zamrożone próbki były przekazywane do laboratorium Polskiego Towarzystwa Technologii Spożywczych, gdzie dokonywano analiz. Dodatkowo zbierano informacje na temat wydajności, zachowania i kondycji, zarówno klaczy jak i źrebiąt.

Łącznie uzyskano 435 litrów mleka. Średnia dzienna wydajność od jednej klaczy wahała się w granicach od 1,3 do 3,0 litrów.

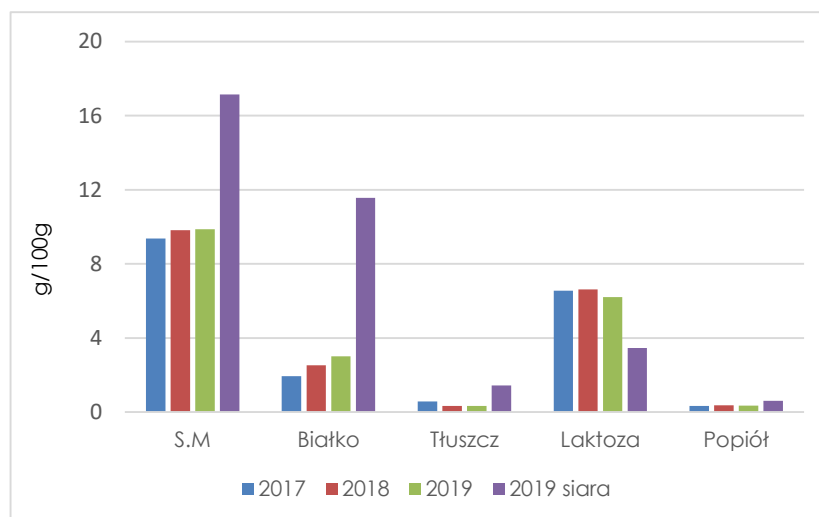
Tab. 1. Średnia wydajność klaczy oraz średni czas udoju

Imię klaczy	PASZKA, ur. 2009	TELIMENA, ur. 2012	PERŁA, ur. 2013	PANNA COTTA, ur. 2015
Data wyżrebienia	17.03.2019	25.03.2019	27.06.2019	14.06.2019
Liczba dni doju	59	59	56	56
Litrów/dzień	1,7	1,3	3,0	1,6
Suma: litry mleka	99,3	74,8	170	90,9

Badaniom laboratoryjnym poddano 44 próbki, w tym 21 od klaczy gorącokrwistych i 23 od klaczy zimnokrwistych sokólskich. 18 próbek zostało zliofilizowanych i ich skład był porównywany

ze składem z analogicznej próbki mleka z tego samego doju. Wszystkie próbki zostały przebadane pod kątem składu podstawowego: zawartości suchej masy i składników odżywczych, profilu kwasów tłuszczowych i właściwości fizykochemicznych (Fig. 1).

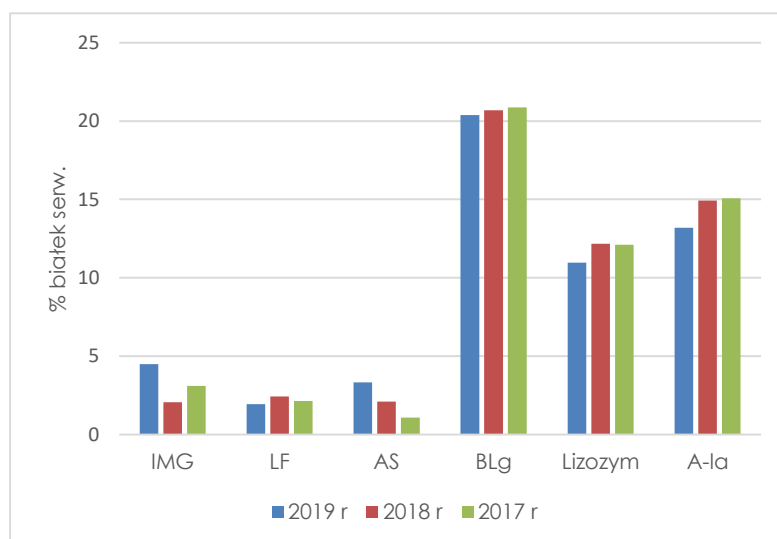
Fig. 1. Zawartość składników podstawowych w mleku kłaczy w latach 2017-2019



Badania składu podstawowego wykazały wyższą średnią zawartość białka w stosunku do lat poprzednich, nieznacznie wzrosła zawartość suchej masy, a spadła zawartość laktozy. Pozostałe składniki mleka były na podobnym poziomie. Zgodnie z oczekiwaniami, w siarze prawie 3-krotnie wyższa była zawartość białka i tłuszczu, 2-krotnie suchej masy i popiołu, natomiast niższa była zawartość laktozy.

Skład białek serwatkowych wykazał niższy poziom beta-laktoglobulina (BLg), alfa-laktoalbumina (A-la), laktoferyny (LF), lizozymu w stosunku do lat poprzednich, natomiast zawartość immunoglobulin (IMG) i albuminy (AS) był wyższy (Fig. 2).

Fig. 2. Zawartość białek serwatkowych w mleku kłaczy w latach 2017-2019



Podobnie jak w wynikach analizy mleka nieliofilizowanego, w liofilizacie siary zawartość białek serwatkowych była znacznie wyższa, a albuminy wzrosła prawie 10-krotnie. Spadła natomiast zawartość beta-laktoglobulina (BLg), alfa-laktoalbumina (A-la) i lizozymu (Tab. 5).

Zawartość kwasów tłuszczowych

Profil kwasów tłuszczowych wykazał najwyższą zawartość kwasów: palmitynowego 16:0, oleinowego 18:1n-9 i linolowego C18:2 n-6. Dodatkowo, w stosunku do lat poprzednich wyższa była zawartość kwasu α -linolenowego.

Podsumowanie wyników

Stwierdzono, że rezultaty doju były znacznie lepsze niż w 2018 roku w odniesieniu do średniej wydajności klaczy, odpowiednio 1,65 i 0,95 l/dzień. Zawartości poszczególnych składników były porównywalne, z tym że zgodnie z oczekiwaniami, siara zawierała znacznie więcej białka niż mleko. Zauważono znaczące wahania dziennego uzysku mleka w kolejnych latach, co mogło być związane ze zmianami warunków środowiskowych – różnicy temperatur w miesiącach letnich, ilości opadów i dostępności świeżej paszy. W 2017 roku w województwie zachodniopomorskim w miesiącach wiosennych i letnich występowały obfite opady, a średnia temperatura kształtowała się na poziomie 24°C, w 2018 roku temperatury przekraczały 30°C (średnio 27°C). Dodatkowo, ze względu na suszę klacze nie miały dostępu do pastwiska. W tym okresie wydajność klaczy spadała do niespełna 0,5 litra/dzień. Natomiast w 2019 roku średnie temperatury były niższe, ok. 22°C, a dostęp do nowego pastwiska zapewnił odpowiednią ilość zielonej paszy. Może to wskazywać na to, że wydajność mleczna koni sokólskich jest uzależniona od warunków środowiskowych.

Fot. 1. Dój klaczy.
ZD IZ PIB Kołbacz



(Fot. G. Polak)

Fot. 2. Kubki udojowe.
ZD IZ PIB Kołbacz



(Fot. G. Polak)

Fot. 3. Aparat udojowy.
ZD IZ PIB Kołbacz



(Fot. G. Polak)

Fot. 4. Żrebaki sokólskie.
ZD IZ PIB Kołbacz



(Fot. A. Janowska)

Fot. 5. Żreback sokólski.
ZD IZ PIB Kołbacz



(Fot. G. Polak)

Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
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: dr hab. Małgorzata Świątkiewicz, prof. IZ PIB

Celem trzyletniego cyklu badań było zaprojektowanie i ocena dodatków do pasz, które zapewnią optymalne warunki rozwoju prosiąt.

Wybrane do badań dodatki, to:

- enzymy pochodzenia mikrobiologicznego o profilu enzymów trzustkowych (lipaza, amylaza, proteaza), stosowane prenatalnie poprzez dodatek do paszy loch w określonym okresie ciąży lub w 3. tygodniu życia prosiąt,
- średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchu (kwas walerianowy i entanowy) podawane prosiętom do paszy,
- włókno z krajowych roślin włóknistych (len i konopie) podawane prosiętom do paszy.

Badania określające wpływ enzymów pochodzenia mikrobiologicznego o profilu trzustkowym dodanych do paszy ciężarnych loch na wielkość płodów, w celu zminimalizowania IUGR wywołanego niedożywieniem płodów – założenia i wyniki (dr hab. Marek Pieszka, prof. IZ PIB).

Wewnątrzmaciczne opóźnienie wzrostu, definiowane jako osłabiony wzrost i rozwój płodów ssaków lub ich organów w czasie ciąży (IUGR), stanowi poważny problem w produkcji trzody chlewnej. Ograniczenie wzrostu płodowego obniża przeżywalność noworodków, hamuje rozwój postnatalny i efektywność wykorzystania paszy przez świnię, negatywnie wpływa na budowę ciała i jakość mięsa, trwale osłabia zdrowie i obniża wyniki produkcyjne trzody chlewnej. U prosiąt „IUGR” odnotowuje się szereg zmian, np. zmieniony udział typów włókien mięśniowych, większa zawartość tłuszczu śródmięśniowego, mniejsza synteza białka oraz mniejsza masa mięśni, gorsze wykorzystywanie paszy i przyrosty. Przeprowadzone badania polegały na opracowaniu strategii żywienia loch w okresie ciąży, polegającej na podawaniu w okresie prenatalnym mieszaniny enzymów grzybowych o profilu trzustkowym (lipaza, amylaza i proteaza) w dwóch okresach między 1. a 115. dniem ciąży (grupa D2) i oraz w okresie między 80. a 115. dniem ciąży (grupa D1) i porównanie z grupami loch nie otrzymujących takiego dodatku (kontrola negatywna i kontrola pozytywna). Zastosowanie dodatku enzymów spowodowało istotne skrócenie ciąży, miało istotny wpływ na zwiększenie liczby prosiąt żywo urodzonych i odsadzonych oraz wzrost prosiąt po okresie odsadzenia do 70. dnia życia. W tym okresie, najkorzystniejsze parametry wzrostu stwierdzono w grupie D2 oraz w kontroli pozytywnej KP (gdzie prosięta w 3. tygodniu życia dostawały mieszaninę enzymów trzustkowych), obserwowano istotnie wyższe przyrosty masy ciała oraz pobranie paszy w porównaniu do kontroli negatywnej KN i doświadczalnej D1. Prosięta z grupy D2 charakteryzowały się istotnie lepszym współczynnikiem FCR w porównaniu do pozostałych grup żywieniowych. Obraz histologiczny potwierdził u zwierząt z grupy doświadczalnej D2 i kontroli pozytywnej (KP) istotnie grubszy nabłonek i ściany mięśniówki jelit. Stwierdzono także istotnie wyższą aktywność enzymu rąbka

szczoteczki laktozy w grupach doświadczalnych (D1 i D2) w porównaniu do grupy kontroli negatywnej (KN). Część druga badań dotyczyła sprawdzenia jak podawanie lochom w okresie ciąży enzymów trzustkowych wpłynie na parametry tuczne i rzeźne oraz wybrane cechy jakości wieprzowiny. Spośród odchowanych prosiąt z czterech grup żywieniowych wybrano losowo po 16 sztuk. W pierwszym okresie tuczu (do 80 kg masy ciała) nie stwierdzono istotnego różnicowania w przyrostach masy ciała. W drugim okresie tuczu zaznaczyły się istotne różnice w przyrostach masy ciała zwierząt. Najniższe przyrosty stwierdzono w grupie D1 i były one istotnie niższe w porównaniu do zwierząt z grupy KP i grupy D2. Wyższe przyrosty masy ciała w grupie KP i D2 spowodowały skrócenie okresu tuczu w porównaniu do grupy KN i D1. Wykorzystanie paszy w okresie całego tuczu świń od masy ok. 25 kg do masy ok. 120 kg było niższe w grupie KP i D2 w porównaniu do grupy KP i D2. Zawartość mięsa w tuszy była wyrównana we wszystkich grupach i wahała się w zakresie 57,0-58,4%, nie było różnic w średniej grubości słoniny. Wartość pH mięsa, mierzona w 45. min. po uboju i po 24-godzinny schłodzeniu tusz, również nie różniła się między grupami. W grupie kontrolnej negatywnej (KN) stwierdzono istotnie jaśniejszą barwę w porównaniu do grupy doświadczalnej D2. Podsumowując drugą część badań można stwierdzić, że zastosowanie enzymów grzybowych o profilu trzustkowym przez cały okres ciąży lub w 3. tygodniu życia prosiąt wpłynęło korzystnie na parametry tuczne oraz jakość kulinarną i technologiczną wieprzowiny, a co najważniejsze skróciło okres tuczu o około 7-10 dni.

Wpływ kwasów tłuszczowych o łańcuchu C₄-C₇ na wyniki odchowu, florę bakteryjną i strukturę przewodu pokarmowego prosiąt – założenia i wyniki (prof. dr hab. Ewa Hanczakowska).

Odsadzenie jest niezwykle newralgicznym momentem w odchowie prosiąt. W tym okresie ich przewód pokarmowy i system immunologiczny nie są jeszcze w pełni rozwinięte, są więc narażone na szkodliwy wpływ mikroorganizmów, powodujących zaburzenia trawienia i przyswajania składników pokarmowych. Adaptacja prosiąt do nowych, stresujących warunków jest związana z obniżonym spożyciem paszy, przejściowym niedożywieniem i zahamowaniem wzrostu, występowaniem biegunki. Dotychczas zapobiegano tym problemom stosując antybiotykowe promotory wzrostu, jednak od paru lat jest to zabronione przez UE. Pojawia się więc konieczność znalezienia innych środków chroniących prosięta w okresie około odsadzeniowym. W podjętych badaniach założono, że kwasy walerianowy i enantowy poprawią strukturę nabłonka jelita cienkiego prosiąt, zmienią skład flory bakteryjnej treści jelit, ograniczając liczebność bakterii patogennych, co przyczyni się do poprawy wskaźników odchowu i zdrowotnych, a tym samym korzystnie wpłynie na produkcję prosiąt. Do badań użyto 120 prosiąt rasy wielka biała polska, obejmując okres od urodzenia do 84. dnia życia. Po urodzeniu prosiąt każdy miot losowo przydzielano do jednej z 6 grup, które były żywione taką samą standardową sypką mieszaną paszową, uzupełnioną maślanem sodu (jako kontrola pozytywna) lub badanymi kwasami (walerianowy, enantowy, kapronowy, kaprylowy) w ilości 0,3%. W celu pobrania próbek krwi, tkanek i treści pokarmowej jelit, w każdej grupie uśmiercono 12 prosiąt w 28. oraz 56. dniu życia. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono, że maślan sodu oraz kwas walerianowy korzystnie wpłynęły na wskaźniki produkcyjne prosiąt, poprawiając przyrosty masy ciała i wykorzystanie paszy. Dodatek kwasu walerianowego i kapronowego do paszy dla prosiąt ssących wpłynął na zwiększenie masy jelita cienkiego, natomiast u prosiąt odsadzonych korzystniejszy okazał się kwas enantowy. Wzrost wielkości jelita grubego prosiąt starszych stymulował kwas kapronowy. Badane kwasy, a szczególnie kwas kaprylowy i walerianowy, wpłynęły na wzrost poziomu przeciwciał typu IgG we krwi prosiąt. U prosiąt 28-dniowych wszystkie badane kwasy zwiększyły zawartość LKT w treści jelita cienkiego, a kwas enantowy i kaprylowy oraz maślan

sodu przyczyniły się do wzrostu LKT w treści jelita ślepego. Maślan sodu i kwas walerianowy korzystnie wpłynęły na poziom kwasu masłowego w treści jelita cienkiego, a kwas walerianowy, kaprylowy i maślan sodu zwiększyły zawartość kwasu masłowego w treści jelita ślepego. U prosiąt starszych 56-dniowych wszystkie badane kwasy zwiększyły ilość LKT w treści jelita cienkiego. W treści jelita ślepego nie stwierdzono wzrostu ogólnej ilości LKT, ale u prosiąt otrzymujących maślan sodu zawartość kwasu masłowego była wyższa. Badane kwasy przyczyniły się do zwiększenia liczebności bakterii rodzaju *Bacteroides*+*Prevotella*, które w większości należą do mikroorganizmów komensalnych lub probiotycznych, a ponadto ograniczyły rozwój niepożądanych bakterii rodzaju *Clostridium*. Kwas kaprylowy zwiększał liczebność bakterii rodzaju *Lactobacillus* w treści jelit prosiąt starszych, 56-dniowych. Podsumowując, przeprowadzone badania można stwierdzić, że badane kwasy o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchu, walerianowy (C5) i enantowy (C7), wykazują prozdrowotne cechy tzw. zakwaszaczy, korzystnie wpływając na środowisko i rozwój przewodu pokarmowego, a przez to także na wskaźniki produkcyjne prosiąt.

Wpływ preparatów z włókna lnu i konopi na rozwój przewodu pokarmowego, status zdrowotny oraz wskaźniki produkcyjne prosiąt – założenia i wyniki (dr hab. Małgorzata Świątkiewicz, prof. IZ PIB).

W produkcji trzody chlewnej największe straty, wynikające z padnięć zwierząt, stanowiące ponad 80% wszystkich strat świń w czasie cyklu odchowu, notuje się w okresie od urodzenia do odsadzenia od lochy. Prosięta odłączone od matki, zwykle około 28-dnia życia, nie mają w pełni zakończonego fizjologicznego rozwoju układu pokarmowego, obejmującego zarówno nieukształtowane struktury nabłonka jelit, niedorozwój funkcji wydzielniczej i efektywności enzymów trawiennych, jak i niedobór pożądanej flory bakteryjnej, głównie bakterii kwasu mlekowego. Wszystko to przyczynia się do częstego występowania biegunek, pojawiających się po odsadzeniu prosiąt, których źródłem jest duża ilość niestrawionej w jelicie cienkim paszy, która przesuwa się zbyt wolno i zalega w jelicie grubym, stanowiąc pożywkę dla bakterii patogennych. Tak więc, w okresie okołoodsadzeniowym straty przynoszą nie tylko sztuki padłe, ale także zwierzęta z pozornie łagodnymi objawami, gdyż przebyte, nawet bezobjawowo, schorzenia zaburzają środowisko mikrobiologiczne jelit, a powstałe w tym okresie uszkodzenia błony śluzowej i degeneracja kosmków jelitowych wymagają długiego okresu odnowy lub pozostają nieodwracalne, powodując charłactwo zwierząt. W podjętych badaniach stosowano włókno pochodzące z lnu lub konopi, które charakteryzuje się dużym udziałem celulozy (60-70%) oraz ligniny (5-8%) oraz zawiera hemicelulozę (20%), pektyny (1,3-2%), tłuszcze i woski (1%), co sprawia, że ich skład jest bardziej złożony niż skład dostępnego na rynku preparatu z celulozy drzewnej. Założono, że ich odmienna podatność na fermentację korzystnie wpłynie na rozwój i funkcjonowanie przewodu pokarmowego, a tym samym na wskaźniki odchowu prosiąt. Doświadczenie przeprowadzono na 238 prosiętach rasy wielka biała polska, obejmując okres od urodzenia do 84. dnia życia. Po urodzeniu prosiąt każdy miot losowo przydzielano do jednej z 7 grup, które były żywione izobiałkowymi i izoenergetycznymi mieszankami, różniącymi się jedynie rodzajem włókna (celuloza drzewna – kontrola pozytywna, len, konopie) lub ilością włókna (1,5 lub 2,0%). W celu pobrania próbek krwi, tkanek i treści pokarmowej jelit, w każdej grupie uśmiercono 12 prosiąt w 28. oraz 56. dniu życia. Otrzymane wyniki analizy składu włókna, właściwości antyutleniających oraz czystości mykotoksykologicznej potwierdziły możliwość stosowania włókna z krajowych roślin włóknistych (lnu i konopi) jako dodatku do paszy dla prosiąt. Dodatek każdego rodzaju włókna do paszy korzystnie wpłynął na wskaźniki produkcyjne prosiąt, poprawiając przyrosty masy ciała i zmniejszając zużycie paszy, przy czym najkorzystniejsze wyniki uzyskały prosięta otrzymujące 1,5% dodatek włókna lnianego. U prosiąt otrzymujących

dodatek włókna do paszy w ilości 2% obserwowano dłuższe jelito cienkie, w stosunku do masy ciała, niż w pozostałych grupach, co może przyczyniać się do zwiększenia powierzchni trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Dodatek do paszy każdego z zastosowanych w doświadczeniu rodzajów włókna przyczynił się do zwiększenia długości kosmków jelita cienkiego. Obserwowano korzystny wpływ dodatku włókna na poziom hemoglobiny, jej stężenie w krwinkach i objętość krwinek czerwonych (prosięta młodsze) oraz na ilość czerwonych krwinek i ich objętość (prosięta starsze). Dodatek włókna lnianego i konopnego wpłynął na wzrost poziomu przeciwciał typu IgA oraz IgG, ale wpływ ten był zależny od wieku prosiąt. Dodatek włókna do paszy w niewielkim stopniu przyczynił się do zwiększenia koncentracji LKT, w tym kwasu masłowego, w jelicie cienkim prosiąt starszych, przy czym najkorzystniejsze wyniki obserwowano w przypadku włókna konopnego. W jelicie grubym obserwowano korzystny wpływ dodatku 2% włókna konopnego na wzrost ilości LKT w kolejnych odcinkach (w porównaniu do kontrolnego włókna drzewnego) oraz korzystny wpływ dodatku 2% włókna konopnego i lnianego na stabilizację poziomu LKT w kolejnych odcinkach jelita (w porównaniu z grupą kontrolną). Włókno lniane i konopne przyczyniło się do obniżenia w treści jelita grubego poziomu amoniaku oraz potencjalnie toksycznych i karcynogennych metabolitów (fenol, indol, krezol), ale efektywność tych dodatków była zróżnicowana w zależności od odcinka jelita. Nie potwierdzono prebiotycznego wpływu badanego włókna na wzrost liczebności bakterii LAB w jelicie grubym, ale stwierdzono, że włókno jako źródło energii stymulowało wzrost liczebności bakterii symbiotycznych, co przełożyło się na większą produkcję LKT. Podsumowując można stwierdzić, że włókno pochodzące z krajowych roślin włókniстых (lnu i konopi) posiada właściwości i potencjał skłaniające do stosowania go jako prozdrowotnego dodatku paszowego dla prosiąt, a ich działanie jest porównywalne lub lepsze niż dostępnego na rynku włókna drzewnego. Potwierdzenie wyników pierwszej serii badań oraz szczegółowe opracowanie stosowania włókna roślin włókniстых w praktyce wymaga dalszych badań.

Uogólniając wyniki całego cyklu zakończonych badań można stwierdzić, że:

1. Zastosowanie enzymów mikrobiologicznych o profilu trzustkowym przez cały okres ciąży lub w 3. tygodniu życia prosiąt wpływa korzystnie na liczbę żywourodzonych prosiąt, wskaźników odchowu, rozwój ich przewodu pokarmowego i aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego oraz jakość kulinarną i technologiczną wieprzowiny.
2. Kwasy MCFA o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchu, walerianowy (C5) i enantowy (C7), wykazują prozdrowotne cechy tzw. zakwaszaczy, korzystnie wpływają na środowisko i rozwój przewodu pokarmowego, a przez to także na wskaźniki produkcyjne prosiąt.
3. Włókno pochodzące z krajowych roślin włókniстых (lnu i konopi) posiada właściwości i potencjał skłaniające do stosowania go jako prozdrowotnego dodatku paszowego dla prosiąt, a ich działanie na produktywność i status zdrowotny prosiąt jest porównywalne lub lepsze niż dostępnego na rynku celulozowego włókna drzewnego.

Uzyskane wyniki mogą stać się przyczynkiem do opracowania dodatku do paszy dla prosiąt, wspomagającego rozwój przewodu pokarmowego i poprawiającego efektywność odchowu prosiąt oraz wykazującego działanie prozdrowotne. Dodatek taki oraz sposób jego dawkowania może być w przyszłości przedmiotem patentu lub zastrzeżenia „know-how” oraz upowszechnienia, z przeznaczeniem dla hodowców trzody chlewnej i producentów pasz. Ponadto atutem badań może być wskazanie innowacyjnego sposobu wykorzystania krajowych roślin włókniстых.



(Fot. Marek Pieszka)

Zadanie 01-16-02-11

Czynniki żywieniowe warunkujące wydajność i zdrowotność zwierząt przeżuwających

Kierownik zadania: prof. dr hab. Barbara Niwińska

W realizacji badań w zakresie zadania badawczego jako cel przyjęto analizę możliwości wykorzystania takich czynników żywieniowych, jak poziom żywienia lub dodatek kwasu masego w poprawie efektywności produkcyjnej bydła i owiec. Zrealizowano 2 cele badawcze.

Wpływ poziomu żywienia na rozwój gruczołu mlekowego cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych (1. cel szczegółowy).

Celem badań jest odpowiedź na pytanie czy poziom żywienia preparatem mlekozastępczym (PM), w okresie wychowu od 14. do 60. dnia życia (dż.), jest czynnikiem regulującym rozwój gruczołu mlekowego (GM) cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych.

Metody badawcze

Doświadczenie przeprowadzono na 18 cieliszkach rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej (PHF-HO). Utworzono 3 równoliczne grupy: I - kontrolną, w której cieliszki ubijano w 14. dż., w pozostałych grupach od 14. dż. do dnia uboju (ok. 60. dż.) stosowano żywienie PM: w grupie II - ograniczone (pokrycie 66% zapotrzebowania na składniki pokarmowe obliczonego wg zasad zawartych w *Normach żywienia bydła mlecznego* (NRC 2001) i w grupie III - do woli. Cieliszki miały stały dostęp do paszy treściwej i wody.

Kolekcjonowano:

- pomiary przyżyciowe – wskaźniki efektywności wychowu (kontrola masy i wymiarów ciała, zużycia składników pokarmowych na przyrost masy ciała),
- pomiary poubojowe – masy anatomiczne całego MG, tkanki parenchymatycznej (PAR), tkanki wyściółki tłuszczowej (MFP), innych wydzielonych organów, poubojowe masy ciała,

- wyniki analiz chemicznych pasz i wybranych tkanek, koncentracji wskaźników hematologicznych, biochemicznych i hormonalnych krwi oraz histomorfometrycznych wybranych tkanek.

Wyniki

Grupy doświadczalne cieliczek były jednorodne pod względem genotypu oraz wydajności matek ($P \leq 0,9$). W grupie III żywionej do woli PM dzienny przyrost masy ciała cieliczek od 14. dż do uboju wynosił średnio 298 g/d i był wyższy 1,2-krotnie w porównaniu do przyrostu masy ciała cieliczek grupy II - żywionej dawkami ograniczonymi. Żywienie cieliczek PM do woli zwiększyło masy GM, PAR, MFP (2,5-krotnie) oraz serca, wątroby, śledziony, nerek oraz ściany żwaczki (1,1-krotnie) w porównaniu do tych wskaźników charakteryzujących cieliczki otrzymujące dawki ograniczone (Tab. 1).

Tab. 1. Porównanie średnich mas ciała, tusz poubojowych, GM, PAR, MFP oraz innych wydzielonych organów cieliczek w grupach doświadczalnych w dniu uboju

Wyszczególnienie		Grupy			P^1		
		I kontrolna	Żywienie PM		I*II	I*III	II*III
Ubój	Wiek, d	14,7	61,2	63,0	**	**	ns
	Masa ciała, kg	43,6	65,3	74,1	**	**	*
	tuszy poubojowej, kg	21,9	35,2	40,9	**	**	*
Masy	MG, g	83,2	132,3	326,9	**	**	**
	Prawa połowa MG, g	41,3	66,6	163,6	*	**	**
	PAR z prawej połowy MG, g	0,3	4,4	10,4	**	**	**
	MFP z prawej połowy MG, g	41,4	58,6	150,2	*	**	**
	Innych organów						
	Śledziona, g	143,4	210,0	265,6	**	**	ns
	Serce, g	345,8	448,6	528,4	**	**	*
	Wątroba, g	1231	1396	2019	ns	**	**
	Nerki, g	215,6	300,0	413,2	**	**	**
	Tarczycyca, g	80,2	159,9	168,8	**	**	ns
	Ściana żwaczki-czepca, g	327	1010	707	**	**	*
	Dwunastnicy, g	49,5	72,8	88,9	*	*	ns
	Jelita czczego, g	1303	1808	1915	**	**	ns
	Jelita ślepego, g	58,3	88,4	94,3	**	**	ns

¹ Wpływ statystyczny czynnika oznaczono jako: istotny* ($0,01 > P \leq 0,05$), wysoko istotny** ($P \leq 0,01$) oraz nieistotny ns ($P > 0,05$).

Stwierdzono, że w składzie chemicznym PAR koncentracja białka ogólnego (BO) nie zależała od wieku i poziomu żywienia PM, koncentracja tłuszczu surowego (TS) nie zależała od poziomu żywienia PM ($P > 0,05$), natomiast ilości zgromadzonych BO i TS były wyższe u cieliczek karmionych do woli, w porównaniu do ilości zgromadzonych w PAR u cieliczek otrzymujących dawki ograniczone ($P \leq 0,05$), (Tab. 2). Natomiast w składzie chemicznym MFP obserwowano, że koncentracja i ilość zgromadzonego BO i koncentracja TS była podobna u cieliczek żywionych dawkami ograniczonymi PM w 14 dż. i w 60. dż. ($P \leq 0,05$), jednak zgromadzone ilości BO i TS były wyższe u cieliczek karmionych do woli w porównaniu do ilości zgromadzonych u tych otrzymujących dawki ograniczone ($P \leq 0,01$).

Tab. 2. Porównanie średnich zawartość białka ogólnego i tłuszczu surowego w tkankach GM cieliczek w grupach doświadczalnych

Wyszczególnienie			Grupy			P ¹		
			I kontrolna	Żywnienie PM				
Tkanka MG	Składnik chemiczny			II ograniczone	III do woli	I*II	I*III	II*III
PAR	Białko ogólne	Koncentracja, mg/m	44,4	38,9	38,6	ns	ns	ns
		Ilość całkowita, mg	13,9	169,7	403,8	**	**	**
	Tłuszcz surowy	Koncentracja, mg/m	-	111,6	106,6	-	-	ns
		Ilość całkowita, mg	-	487,2	1110,8	-	-	**
MFP	Białko ogólne	Koncentracja, mg/m	13,3	11,6	11,1	ns	*	ns
		Ilość całkowita, mg	564,5	675,5	1632,5	ns	**	**
	Tłuszcz surowy	Koncentracja, mg/m	416,0	478,4	663,2	ns	**	**
		Ilość całkowita, mg	16432	27837	100980	*	**	**

¹ Wpływ statystyczny czynnika oznaczono jako: istotny* (0,01>P≤0,05), wysoko istotny** (P≤0,01) oraz jako nieistotny ns (P>0,05).

Uzyskane wyniki stanowią podstawę dla poniższych wniosków.

W okresie wychowu od 14. do 60. dz. cieliczek rasy PHF-HO:

- Poziom żywienia pójtem z preparatu mlekozastępczego (PM) kształtuje wzrost masy i zmienia skład chemiczny tkanek gruczołu mlekowego.
- Żywnienie do woli PM o zawartości około 20% białka ogólnego, 19% tłuszczu surowego i 4,53 Mcal energii metabolicznej w 1 kg suchej masy, w porównaniu do żywienia ograniczonego (pokrywającego w 66% zapotrzebowanie na energię metaboliczną cieliczek ras mlecznych)
 - zwiększyło masę gruczołu mlekowego (2,5-krotnie), masę tkanki parenchymatycznej (2,4-krotnie) oraz masę wyściółki tłuszczowej (2,6-krotnie),
 - nie wpłynęło na koncentrację białka ogólnego oraz tłuszczu surowego, natomiast zwiększyło ilości tych składników chemicznych zgromadzonych w PAR,
 - zwiększyło koncentrację tłuszczu surowego oraz ilości zgromadzonych białka ogólnego i tłuszczu surowego w MFP.
- Wzrost gruczołu mlekowego jest *allometryczny* (wyższy) w porównaniu do wzrostu masy i wymiarów ciała, masy śledziony, serca, wątroby, nerek, ścian żwacza-czepca, dwunastnicy, jelita czczego i ślepego.

Wpływ formy masłanu na fermentację żwaczową, strawność i rozwój przewodu pokarmowego przeżuwaczy – cel 2.

Celem badań jest wyjaśnienie czy rodzaj soli kwasu masłowego wprowadzonej, jako dodatek do paszy wpływa na przebieg fermentacji mikrobiologicznej w żwaczu oraz wykorzystanie paszy przez dorosłe zwierzęta przeżuwające, na rozwój przewodu pokarmowego i efektywność tuczu tryczków.

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

Doświadczenie I

Metody badawcze

W układzie kwadratu łacińskiego badania przeprowadzano na 3 krowach rasy PHF-HO z założonymi przetokami do żwacza. Krowy otrzymywały dawki pasz: kontrolną K bez dodatku soli

kwasu masłowego, z dodatkiem maślanu sodu (MS) lub z dodatkiem tributyrinu (TB). Od 19. do 21. dnia żywienia dawką doświadczalną przeprowadzono inkubację próbek siana metodą *in situ*.

Kolekcjonowano:

- próby płynu żwaczowego,
- pomiary odczynu kwasowego, stężenia azotu amonowego i lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) w treści żwacza,
- pomiary ubytku składników pokarmowych z próbek.

Wyniki

Wprowadzenie dodatków zmieniło przebieg fermentacji w żwaczu. W porównaniu do grupy K dodatek MS po upływie 0, 2, 4 i 8 h zwiększył wartości pH oraz po upływie 0, 2, i 4 h od zadania paszy koncentrację azotu amonowego. Dodatek TB w godzinie 0 zwiększył wartość pH oraz w godzinach 0, 2, i 4 h od zadania paszy koncentrację azotu amonowego.

Doświadczenie II

Metody badawcze

24 tryczki rasy wrzosówka (w wieku 10 m-cy) przydzielano do 3 grup żywieniowych: I (kontrolna) – do dawki pokarmowej nie włączono dodatku soli masłowych, w pozostałych grupach wprowadzono dodatek w ilości 15 g jonu kwasu masłowego w 1 kg suchej masy, w grupie II – w postaci dodatku MS i w grupie III – dodatku TB.

Kolekcjonowano:

- pomiary przyżyciowe – wskaźniki efektywności tuczu,
- pomiary poubojowe – poubojową masę ciała, masy anatomicznie wydzielonych organów,
- wyniki analiz chemicznych pasz i wybranych tkanek, koncentracji LKT w treści wybranych odcinków przewodu pokarmowego, koncentracji wskaźników biochemicznych krwi oraz histomorfometrycznych wybranych tkanek.

Wyniki

Tryczki w grupach doświadczalnych charakteryzowały podobne wskaźniki efektywności tuczu ($P>0,05$). Dodatki MS i TB podwyższyły koncentrację kwasu masłowego w płynie żwaczowym, koncentracja kwasu masłowego była wyższa u tryczków otrzymujących dodatek TB w porównaniu do koncentracji u tryczków otrzymujących dodatek MS (Tab. 3).

Tab. 3. Porównanie średnich koncentracji LKT w treści żwacza i dwunastnicy u tryczków z grup doświadczalnych

Wyszczególnienie		Grupa			P ¹
		Kontrola	Dodatek		
			MS	TB	
Treść żwacza	Kwas octowy, µmol/g	87.7	97.3	79.5	ns
	Kwas propionowy, µmol/g	16.1	17.2	15.3	ns
	Kwas masłowy, µmol/g	10.9 ^{aA}	15.4 ^{bB}	14.9 ^{bAB}	**
Treść dwunastnicy	Kwas octowy, µmol/g	3.96	3.59	4.17	ns
	Kwas propionowy, µmol/g	0.82	0.59	0.70	ns
	Kwas masłowy, µmol/g	0.26	0.18	0.42	ns

¹ Wpływ statystyczny czynnika oznaczono jako wysoko istotny** ($P\leq 0,01$) oraz jako nieistotny ns ($P>0,05$).

Dodatki MS i TB podwyższyły koncentrację beta-hydroksymaślanu (BHBT), nie wpłynęły na stężenie glukozy i wolnych niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) we krwi trzczków (Tab. 4).

Tab. 4. Porównanie średnich koncentracji wybranych wskaźników biochemicznych we krwi trzczków z grup doświadczalnych

Wyszczególnienie	Grupa			P ¹
	Kontrolna	Dodatek		
		MS	TB	
Glukoza, mg/dL	67.1	67.9	64.9	ns
BHBT, mg/dL	0.57 ^{bB}	0.81 ^{aAB}	0.91 ^{aA}	**
NEFA, mol/L	0.02	0.02	0.04	ns

¹ Wpływ statystyczny czynnika oznaczono jako wysoko istotny** (P≤0,01) oraz jako nieistotny ns (P>0,05).

Dodatki nie wpłynęły na masę tuszy poubojowej oraz masy wyszczególnionych odcinków przewodu pokarmowego z wyjątkiem masy ścian trawieńca, która była najwyższa u trzczków otrzymujących dodatek TB (Tab. 5).

Tab. 5. Porównanie średnich mas tusz ubojowych oraz wybranych odcinków przewodu pokarmowego trzczków z grup doświadczalnych

doswiadczalnych

Wyszczególnienie		Grupa			P ¹
		Kontrolna	Zastosowany dodatek		
			MS	TB	
Masa	Tuszy poubojowej, kg	7,38	7,21	7,06	ns
	Ścian żwacza-czepca, kg	0.069	0.065	0.069	ns
	Ścian ksiąg, kg	0.006	0.006	0.006	ns
	Ścian trawieńca, kg	0.017 ^b	0.017 ^b	0.023 ^a	*
	Ścian dwunastnicy, kg	0.004	0.004	0.004	ns
	Ścian jelita czczego, kg	0.057	0.059	0.063	ns
	Ścian jelita biodrowego, kg	0.002	0.003	0.002	ns

¹ Wpływ statystyczny czynnika oznaczono jako istotny* (P≤0,05) oraz jako nieistotny ns (P>0,05).

Uzyskane wyniki stanowią podstawę dla poniższych wniosków.

Wprowadzenie do dawki pokarmowej dodatku kwasu masłowego w formie soli nieorganicznej (maślanu sodu) lub soli organicznej (tributirinu sodu) w ilości dostarczającej 15 g jonu kwasu masłowego dziennie wpłynęło:

1. u dorosłych krów na przebieg fermentacji w treści żwacza,
2. u opasanych trzczków na wzrost koncentracji BHBT, dodatek tributirinu sodu zwiększył masę ścian trawieńca.

Podsumowanie uzyskanych wyników badań

Poziom żywienia energetyczno-białkowego w okresie wychowu od 14. do 60. dnia życia jest czynnikiem modulującym wzrost i skład chemiczny gruczołu mlekowego cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych. W tym okresie wychowu wzrost masy gruczołu mlekowego, tkanki parenchymatycznej i tkanki wyściółki tłuszczowej gruczołu jest wyższy w porównaniu do wzrostu masy i wymiarów ciała oraz masy innych organów (śledzonej, serca, wątroby, nerek, tarczycy i ścian przewodu pokarmowego).

Wprowadzenie do dawki pokarmowej dodatku kwasu masłowego w formie soli nieorganicznej (maślanu sodu) lub soli organicznej (tributirinu sodu) modyfikuje przebieg fermentacji mikrobiologicznej w żwaczu u dorosłych i młodych przeżuwaczy. Zastosowane

dotatki oraz stwierdzona modyfikacja fermentacji w żwaczu nie wpływają na efektywność tuczu tryczków.

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. W ramach zadania realizowane są dwa cele badawcze.

Efektywność różnych źródeł kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem jakości skorup jaj i kośćca w żywieniu kur nieśnych (1. cel szczegółowy).

Zgodnie z metodyką badań w okresie sprawozdawczym opracowano wyniki doświadczenia 1., wykonanego 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. Nie stwierdzono wpływu zastosowanego czynnika doświadczalnego (różne źródła kwasów tłuszczowych) na wskaźniki produkcyjne niosek oraz jakość treści i skorupy jaj. Zastosowane źródło kwasów tłuszczowych w diecie istotnie oddziaływało natomiast na profil kwasów żółtkowych lipidów żółtka jaj. Tak więc, najkorzystniejsze rezultaty w tym zakresie, z punktu widzenia wartości prozdrowotnej jaj, odnotowano przy stosowaniu oleju z alg, którego wprowadzenie do paszy istotnie zwiększało poziom kwasu eikozapentaenowego (EPA) i dokosaheksaenowego (DHA). Dodatek oleju z alg do diety wpływał jednak negatywnie na sensoryczne parametry gotowanych jaj. Odnotowano natomiast pozytywny wpływ wielonienasyconych źródeł kwasów tłuszczowych (olej z alg, olej lniany) na niektóre parametry biomechaniczne, charakteryzujące jakość kości długich u niosek. Podsumowując wyniki doświadczenia 1., można stwierdzić, że wprowadzenie oleju z alg do mieszanki paszowej dla niosek jest efektywnym sposobem wzbogacenia jaj w wielonienasycone kwasy tłuszczowe z szeregu n-3 (PUFA n-3), jak również może korzystnie wpływać na mineralizację kośćca ptaków. Istnieje jednak potrzeba prowadzenia dalszych badań na określenie optymalnego poziomu tego oleju w mieszance paszowej, przy którym to poziomie negatywny efekt oleju z alg na sensoryczne parametry jaj nie będzie widoczny.

W okresie sprawozdawczym rozpoczęto również realizację doświadczenia 2., którego celem była optymalizacja poziomu źródeł wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (olej lniany, olej rybny, olej z alg) w mieszance dla kur nieśnych. Miejsce wykonania badań jest ferma doświadczalna należąca do Instytutu Zootechniki PIB, zlokalizowana w Aleksandrowicach. Kury żywiono izobiałkowymi i izoenergetycznymi doświadczalnymi mieszankami paszowymi, w skład których wchodziły śruty zbożowe, poekstrakcyjna śruta sojowa, dodatki mineralne i aminokwasowe, premiks witaminowo-mineralny oraz odpowiedni dodatek tłuszczu paszowego (źródło kwasów tłuszczowych).

Standaryzowana strawność jelitowa aminokwasów nasion grochu siewnego u kurcząt brojlerów – wpływ wieku i dodatku paszowej proteazy (2. cel szczegółowy).

W ramach realizacji tego celu przeprowadzono trzeci etap badań dotyczących nasion grochu siewnego odmiany białokwiatowej Tarchalska oraz odmiany barwnie kwitnącej Milwa, poświęcony ocenie wpływu wieku kurcząt oraz dodatku mikrobiologicznej proteazy na jeli-

tową strawność aminokwasów po standaryzacji współczynników strawności pozornej na wielkość przepływu (strat) aminokwasów endogennych, tj. nie pochodzących z paszy (EA). Z wykorzystaniem techniki żywienia dietą bezbiałkową (PFD), ilościową ocenę przepływu jelitowego EA wykonano na łącznie 120 kurczętach rozmieszczonych losowo w 6 klatkach stanowiących powtórzenia w obrębie każdej grupy wiekowej, przy liczebności 12 osobników dla wieku 14 dni oraz 8 osobników dla wieku 28 dni. W pięciodniowych okresach adaptacyjnych poprzedzających procedury poubojowej kolekcji treści jelitowej ptaki otrzymywały dietę PFD do woli. Po zliofilizowaniu, w pobranym materiale oznaczona była zawartość aminokwasów, suchej masy oraz chromu dodanego (z Cr_2O_3). Komplet tych danych analitycznych był podstawą do obliczeń wielkości przepływu endogennego poszczególnych aminokwasów (EA) w przeliczeniu na jednostkę pobrania suchej masy. Wyniki przedmiotowych obliczeń przedstawiono w Tabeli 1. Oznaczone w poprzednich etapach realizacji niniejszego celu szczegółowego współczynniki pozornej strawności jelitowej (PSJ) aminokwasów nasion grochu testowanych odmian przeliczono na wartość strawności standaryzowanej. Kalkulacje standaryzowanych współczynników strawności jelitowej aminokwasów (SSJ) wykonano według wzoru: $\text{SSJ} = \text{PSJ} + (\text{EA} / \text{zawartość aminokwasu w diecie, mg/kg SM})$. Rezultaty tych kalkulacji dla wybranej grupy aminokwasów zestawiono w Tabeli 2.

Wstępnie opracowane wyniki niniejszego etapu badań wskazują na: (1) znacząco wyższy jelitowy przepływ endogennych AA u młodszych (dwutygodniowych) kurcząt, (2) ogólnie wyższą standaryzowaną strawność aminokwasów w przypadku białokwiatowej odmiany grochu (w tym metioniny i cysteiny) oraz (3) istotną poprawę standaryzowanej strawności jelitowej aminokwasów przy obecności proteazy w diecie. Dodatek tego enzymu może niwelować różnice w strawności jelitowej niektórych aminokwasów spowodowane różnym wiekiem ptaków.

Tab. 1. Uśrednione ($n = 6$) wartości jelitowego przepływu (strat) poszczególnych aminokwasów endogennych u kurcząt w wieku 14 i 28 dni

Aminokwas	Wiek ptaków			
	14 dni		28 dni	
	mg/kg pobranej SM (±SD)			
Asp	385	±36	296	±20
Thr	352	±26	334	±39
Ser	289	±14	233	±19
Glu	490	±55	379	±66
Pro	280	±20	255	±24
Gly	266	±34	210	±24
Ala	276	±33	194	±25
Val	300	±38	230	±28
Ile	259	±34	234	±27
Leu	330	±20	285	±37
Tyr	232	±17	205	±12
Phe	263	±37	199	±19
His	108	±4	89	±8
Lys	251	±15	174	±20
Arg	271	±41	181	±25
Cys	118	±6	126	±9
Met	77	±5	73	±7
łącznie 17 AA	4545	±279	3696	±355

Tab. 2. Standaryzowana wartość współczynników strawności jelitowej aminokwasów badanych nasion grochu w zależności od wieku kurcząt brojlerów oraz obecności proteazy w diecie

Aminokwas	Grupy: wiek kurcząt (14 lub 28 dni), dodatek proteazy (+E)				Wartość P
	14	14 +E	28	28 +E	
	Groch odmiany Tarchalska (białokwiatowy)				
Treonina	0,777 b	0,794 ab	0,806 a	0,832 a	0,002
Lizyna	0,866 b	0,893 a	0,866 b	0,896 a	0,001
Arginina	0,867 c	0,919 a	0,871 c	0,891 b	<0,000
Cysteina	0,790 ab	0,806 ab	0,775 b	0,824 a	0,041
Metionina	0,858	0,863	0,858	0,881	0,753
Średnio 17 AA	0,833 b	0,848 ab	0,836 b	0,851 a	0,047
	Groch odmiany Milwa (różowokwiatowy)				
Treonina	0,780 b	0,829 ab	0,818 ab	0,872 a	0,016
Lizyna	0,828 c	0,860 b	0,865 b	0,898 a	0,047
Arginina	0,863 b	0,885 ab	0,898 ab	0,930 a	0,024
Cysteina	0,696	0,722	0,693	0,723	0,292
Metionina	0,757	0,787	0,770	0,825	0,176
Średnio 17 AA	0,794 b	0,826 ab	0,820 ab	0,863 a	0,014

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 badań jest doskonalenie metod służących opracowaniu charakterystyki składu chemicznego mięsa i tłuszczu Gęsi Białej Kołudzkiej®, żywionej w końcowym etapie owsem, a w celach porównawczych – również pszenicą.

Niniejsze zadanie jest wynikiem polityki ukierunkowanej na poszerzanie zakresu technik i analiz wykonywanych w Centralnym Laboratorium. Coraz bardziej powszechna świadomość ekologiczna konsumentów wzmacnia coraz większą tendencję do spożywania naturalnych produktów spożywczych, wyróżniających się pod względem cech zarówno prozdrowotnych, jak i kulinarnych. Wielkotowarowa produkcja zwierzęca przyczyniła się do zubożenia żywności pod względem smaku i aromatu, co w opinii wielu konsumentów, nie jest zjawiskiem pożądanym. Stąd zapewne wynika wzrost zainteresowania żywnościowymi produktami pochodzącymi od zwierząt ras rodzimych, w tym od Gęsi Białej Kołudzkiej®, która od 2001 roku jest opatrzona zastrzeżonym w Urzędzie Patentowym znakiem towarowym słowno-graficznym, której właścicielem jest Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy.

Gęś Biała Kołudzka® – polski produkt

Gęś Biała Kołudzka® jest genotypem, który został stworzony dzięki pracom hodowlanym prowadzonym od 1962 roku w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym w IZ PIB ZD Kołudzie Wielkiej. Jest ona ceniona za granicą, a szczególnie w Niemczech, gdzie skutecznie konkuruje z gęsiami sprowadzanymi z Węgier. Mięso gęsie, głównie to pochodzące z Polski, jest eksportowane do Niemiec w ilości od 18. do 20. tysięcy ton rocznie. Również w samej Polsce, spożycie mięsa gęsiego dynamicznie rośnie. W ciągu 15 lat wzrosło ono z poziomu

kilkuset do, obecnie, kilku tysięcy ton rocznie. Ze względu na dobro narodowe, jakim jest wyhodowana w IZ PIB ZD Kołudzie Wielkiej Gęś Biała Kołudzka®, wydaje się szczególnie wskazanym wspieranie zarówno jej produkcji, jak i konsumpcji produktów, głównie mięsa od niej pochodzącego, poprzez popularyzację jego składu chemicznego i cech smakowo-zapachowych. Wobec tego, Centralne Laboratorium podjęło się zadania rozwijania metod dotyczących oznaczania związków lotnych, które decydują o walorach kulinarnych mięsa i innych produktów pochodzenia zwierzęcego. Niniejsze zadanie dotyczy wykorzystania do charakterystyki produktów Gęsi Białej Kołudzkiej® chromatograficznej metody do analizy związków lotnych, w oparciu o technikę HS-SPME-GC/MS (chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas i z zastosowaniem techniki izolacji składników próbki za pomocą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej, ang. Headspace Solid Phase Microextraction), dodatkowo poszerzonej o metodę oznaczania kluczowych związków zapachowych w mięsie w oparciu o technikę GC-O (chromatografia gazowa połączona z olfaktometrią, ang. Gas Chromatography-Olfactometry). W tym drugim przypadku, próbka była przygotowana techniką ewaporacji związków lotnych, wspomagana rozpuszczalnikiem (SAFE, ang. Solvent Assisted Flavor Evaporation). Intensywność zapachu w próbce mięsa badano techniką AEDA (ang. Aroma Extract Dilution Analysis), wykonując analizę olfaktometryczną kolejnych rozcieńczeń roztworów próbki. Wykonane zostały również inne wybrane analizy chemiczne.

Badania poszerzono również o inne wybrane analizy chemiczne, które wykonano w Centralnym Laboratorium stosując metody odpowiednio sprawdzone i scharakteryzowane pod kątem przydatności do wyznaczonych celów. Postępowano według zasad utrzymania systemu jakości, zgodnie z normą akredytacyjną PN-ISO/IEC 17025.

Wyniki

Badania zostały wykonywane w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach na 160 Gęsiach Białych Kołudzkich® (80 gęsi i 80 gęsiorów), z czego do uboju wybrano 80 ptaków. Gęsi w końcowej fazie tuczu żywione były pełnym ziarnem owsa (40 ptaków) i pszenicy (40 ptaków). Wykonano analizę rzeźną, w tym związków lotnych, walidację metody HS-SPME-GC/MS, oraz analizę olfaktometryczną. Badania poszerzono również o inne analizy chemiczne. Tucz owsiany dał produkt bogatszy w witaminę E we wszystkich badanych tkankach, natomiast w witaminę A bogatszy był tłuszcz satełkowy. Tucz gęsi owsem był korzystniejszy od tuczu pszenicą (wartości większe dla produktów pochodzących od gęsi żywionej owsem) pod względem: UFA, PUFA, PUFA-3, UFA/SFA i PUFA/SFA, natomiast tucz pszenicą dawał produkt o lepszym stosunku PUFA n-6/n-3 (wartości mniejsze dla produktów pochodzących od gęsi żywionej pszenicą, Tabele 3.2 a i 3.2 b).

Tab. 3.2 a. Skład kwasów tłuszczowych (profil %) w mięśniach nóg Gęsi Białej Kotuldzkiej®

Wyszczególnienie	Żywnienie (ż)		Plec (p)		Rok (r)		Błąd std.		Istotność czynników głównych i interakcji									
	owies	pszenica	męska	żeńska	dośw. I	dośw. II	SEM	n	wartość P					wartość P interakcji				
									ż	p	r	ż x p	ż x r	p x r	ż x p x r			
C12:0	0,026	0,017	0,022	0,021	0,011	0,032	0,0017	78	0,0000	0,4857	0,0000	0,4857	0,0005	0,4140	0,2913			
C14:0	0,321	0,311	0,307	0,325	0,315	0,317	0,0036	80	0,1751	0,0163	0,7053	0,2647	0,8287	0,0813	0,5149			
C16:0	20,0	20,7	20,1	20,6	21,0	19,7	0,13	80	0,0021	0,0135	0,0000	0,6637	0,0715	0,1419	0,9436			
C16:1	3,36	4,03	3,55	3,83	3,95	3,43	0,067	80	0,0000	0,0024	0,0000	0,0834	0,1582	0,8360	0,6467			
C18:0	5,57	5,74	5,68	5,63	6,06	5,25	0,070	80	0,1543	0,6465	0,0000	0,9124	0,6023	0,2858	0,6318			
C18:1	44,2	48,6	46,4	46,4	47,3	45,5	0,32	80	0,0000	0,9415	0,0000	0,9650	0,6556	0,4244	0,3362			
C18:2	18,8	13,9	16,4	16,3	14,7	18,0	0,34	80	0,0000	0,4213	0,0000	0,3878	0,8397	0,4503	0,8609			
C18:3	0,034	0,025	0,027	0,033	0,025	0,034	0,0013	80	0,0002	0,0064	0,0002	0,1879	0,2844	0,6302	0,7458			
C18:3	1,39	1,33	1,35	1,37	1,01	1,71	0,044	80	0,1365	0,7089	0,0000	0,8816	0,5761	0,1522	0,6073			
C20:0	0,051	0,048	0,049	0,050	0,053	0,046	0,0007	80	0,0222	0,1016	0,0000	0,5305	0,0105	0,0212	0,8241			
C20:1	0,573	0,512	0,541	0,544	0,564	0,521	0,0067	80	0,0000	0,7838	0,0001	0,6800	0,0431	0,8948	0,7687			
C20:4	5,37	4,60	5,27	4,70	4,74	5,23	0,142	80	0,0051	0,0382	0,0712	0,7611	0,3301	0,7883	0,2125			
C22:1	0,027	0,025	0,026	0,025	0,026	0,025	0,0006	80	0,1268	0,5035	0,2792	0,4060	0,0182	0,2713	0,5627			
EPA	0,028	0,040	0,036	0,033	0,031	0,037	0,0015	80	0,0000	0,2772	0,0243	0,0030	0,6435	0,6323	0,4806			
DHA	0,199	0,169	0,186	0,183	0,207	0,161	0,0081	80	0,0589	0,8394	0,0043	0,6962	0,7952	0,5543	0,1699			
SFA	26,0	26,8	26,2	26,6	27,5	25,3	0,16	80	0,0003	0,0230	0,0000	0,6486	0,1571	0,0300	0,7813			
UFA	74,0	73,2	73,8	73,4	72,5	74,7	0,16	80	0,0003	0,0230	0,0000	0,6486	0,1571	0,0300	0,7813			
MUFA	47,6	52,6	50,0	50,2	51,2	49,0	0,36	80	0,0000	0,5297	0,0000	0,6621	0,8872	0,4436	0,3804			
PUFA	26,4	20,6	23,8	23,1	21,3	25,7	0,45	80	0,0000	0,0830	0,0000	0,5163	0,5737	0,7353	0,4727			
PUFA n-6	24,2	18,6	21,7	21,0	19,5	23,2	0,42	80	0,0000	0,0575	0,0000	0,4796	0,5597	0,8171	0,4325			
PUFA n-3	1,62	1,54	1,57	1,58	1,24	1,91	0,044	80	0,1065	0,8440	0,0000	0,8710	0,6788	0,3138	0,9694			
DFA	79,6	79,0	79,5	79,0	78,6	79,9	0,13	80	0,0039	0,0127	0,0000	0,6085	0,0922	0,1169	0,9946			
UFA/SFA	2,84	2,75	2,82	2,76	2,65	2,94	0,022	79	0,0009	0,0441	0,0000	0,3764	0,0926	0,0418	0,8439			
MUFA/SFA	1,83	1,97	1,91	1,89	1,87	1,94	0,014	80	0,0000	0,2679	0,0034	0,9801	0,2553	0,0476	0,4497			
PUFA/SFA	1,02	0,777	0,920	0,876	0,779	1,02	0,021	80	0,0000	0,0176	0,0000	0,6034	0,7927	0,1832	0,6682			
PUFA n-6/n-3	15,5	12,5	14,3	13,7	15,8	12,3	0,33	79	0,0000	0,1782	0,0000	0,5952	0,0452	0,1987	0,7797			

SFA- nasycone kwasy tłuszczowe

UFA- nienasycone kwasy tłuszczowe

MUFA- jednonienasycone kwasy tłuszczowe

PUFA- wielonienasycone kwasy tłuszczowe

PUFA n-6- kwasy omega-6

PUFA n-3- kwasy omega-3

DFA- pożądane kwasy tłuszczowe (C18:0+UFA)

Tabela 3.2 b. Skład kwasów tłuszczowych (profil %) w tłuszczu sadełkowym Gęsi Białej Kotulskiej®

Wyszczególnienie	Żywnienie (ż)		Piec (p)		Rok (r)		Błąd std.		Istotność czynników głównych i interakcji									
	owies	pszenica	męska	żeńską	dośw. I	dośw. II	SEM	n	wartość P					wartość P interakcji				
									ż	p	r	ż x p	ż x r	p x r	ż x p x r			
C12:0	0,027	0,024	0,023	0,028	0,022	0,029	0,0012	80	0,0858	0,0434	0,0019	0,6423	0,0083	0,1419	0,8570			
C14:0	0,587	0,559	0,549	0,597	0,577	0,569	0,0079	80	0,0699	0,0025	0,5874	0,1010	0,8757	0,0950	0,8478			
C16:0	27,5	27,8	27,3	27,9	28,5	26,8	0,17	80	0,1839	0,0373	0,0000	0,1589	0,1850	0,0253	0,7855			
C16:1	2,00	2,41	2,09	2,32	0,95	3,46	0,144	80	0,0000	0,0004	0,0000	0,0396	0,0090	0,0026	0,2037			
C18:0	5,81	6,29	6,01	6,09	6,47	5,64	0,077	80	0,0001	0,4990	0,0000	0,5545	0,8186	0,4320	0,4600			
C18:1	49,0	53,3	51,4	50,9	52,5	49,8	0,32	80	0,0000	0,1815	0,0000	0,5890	0,3000	0,2409	0,4090			
C18:2	13,6	8,33	11,2	10,7	9,63	12,3	0,34	80	0,0000	0,0101	0,0000	0,0122	0,3093	0,1020	0,0421			
□ C18:3	0,042	0,026	0,031	0,037	0,040	0,028	0,0015	80	0,0000	0,0097	0,0000	0,7216	0,5350	0,3715	0,2520			
C18:3	0,923	0,824	0,913	0,833	0,647	1,10	0,0289	80	0,0003	0,0033	0,0000	0,8788	0,6145	0,0010	0,7610			
C20:0	0,026	0,021	0,023	0,024	0,042	0,005	0,0022	80	0,0006	0,4876	0,0000	0,3629	0,2857	0,3406	0,7611			
C20:1	0,245	0,187	0,212	0,219	0,432	0,000	0,0246	80	0,0000	0,3612	0,0000	0,8632	0,0000	0,3612	0,8632			
C20:4	0,200	0,157	0,168	0,190	0,126	0,232	0,0076	80	0,0000	0,0072	0,0000	0,1059	0,2179	0,0025	0,6513			
SFA	33,9	34,7	34,0	34,7	35,6	33,0	0,21	80	0,0049	0,0127	0,0000	0,0862	0,1796	0,0531	0,9807			
UFA	66,1	65,3	66,0	65,3	64,4	67,0	0,21	80	0,0049	0,0127	0,0000	0,0862	0,1796	0,0531	0,9807			
MUFA	51,0	55,7	53,5	53,3	53,5	53,3	0,30	80	0,0000	0,5222	0,5186	0,8965	0,1031	0,5580	0,2620			
PUFA	15,1	9,5	12,6	12,0	10,9	13,7	0,36	80	0,0000	0,0117	0,0000	0,0285	0,5194	0,0690	0,0798			
PUFA n-6	13,9	8,51	11,4	11,0	9,80	12,6	0,35	80	0,0000	0,0154	0,0000	0,0149	0,3416	0,1375	0,0461			
PUFA n-3	0,932	0,831	0,921	0,842	0,655	1,11	0,0290	80	0,0003	0,0035	0,0000	0,9139	0,6414	0,0009	0,7540			
DFA	71,9	71,6	72,0	71,4	70,8	72,6	0,17	80	0,2491	0,0270	0,0000	0,1425	0,2147	0,0253	0,7763			
UFA/SFA	1,94	1,89	1,94	1,89	1,81	2,02	0,016	79	0,0173	0,0280	0,0000	0,0139	0,0630	0,0875	0,4205			
MUFA/SFA	1,51	1,61	1,58	1,54	1,50	1,62	0,013	80	0,0000	0,0543	0,0000	0,2590	0,1099	0,1047	0,7177			
PUFA/SFA	0,447	0,278	0,374	0,351	0,308	0,417	0,0118	80	0,0000	0,0023	0,0000	0,0318	0,3044	0,0135	0,1751			
PUFA n-6/n-3	15,6	10,7	13,0	13,3	14,9	11,4	0,38	80	0,0000	0,2504	0,0000	0,1689	0,0002	0,0017	0,0308			

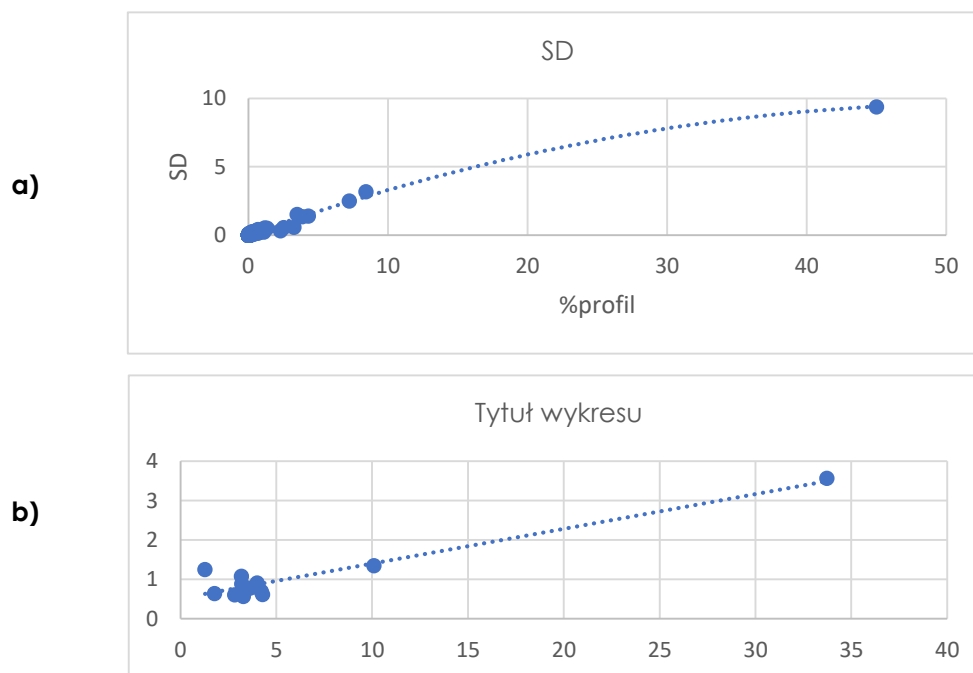
Oznaczenia jak w Tabeli 1.

Walidacja analizy lotnych związków – metoda HS-SPME-GC/MS:

- Granica oznaczalności wynosiła 9 000 jednostek pól powierzchni chromatografu.
- Zakres oznaczania związków lotnych wynosił od 0,003 do 45,02 (%profil, mięso nóg) i od 0,006 do 33,72 (tłuszcz sadełkowy). Zależność odchylenia standardowego od udziału % danego związku lotnego w profilu przedstawiono na Ryc. 1. Odpowiednio w 3 zakresach (% profil): 0,003 - 0,10 , 0,11 - 1,00 i 1,01 - 45,02, SD wynosiły 0,013, 0,16 i 1,73.
- Wyróżniono 13 głównych lotnych substancji w mięsie nóg, których udział % w profilu był większy niż 1%: heksanal (45,0%), 2-pentylofuran (8,4%), 2,2,4,6,6-pentametyloheptan (7,2%), heptanal (4,3%), nonanal (3,9%), oktanal (3,5%), 1-okten-3-ol (3,3%), pentanol (2,5%), pentanal (2,3%), 2-etylofuran (1,3%), 2-heptanon (1,2%), heptan (1,1%) i 2,3-okanodion (1,0%). Wśród nich 5 stanowiły aldehydy (59,0%), 2 furany (9,8%), 2 węglowodory (8,4%), 2 alkohole (5,8%) i 2 ketony (2,2%). Łączny udział tych związków wynosił 85,2%.
- Wyróżniono 13 głównych lotnych substancji w tłuszczu sadełkowym, których udział % w profilu był większy niż 1%: heksanal (33,7%), 2,2,4,6,6-pentametyloheptan (10,3%), pentanal (10,1%), heptanal (4,3%), 3-etylocyklopentanon (4,2%), nonanal (4,0%), pentanol (3,6%), aceton (3,3%), oktanal (3,2%), 3-metylobutanal (3,2%), 2-pentylofuran (2,8%), acetaldehyd (1,8%), 3-metylo-2-pentanon (1,3%). Wśród nich było 7 aldehydów (60,2%), 1 węglowodór (10,3%), 3 ketony (8,8%), 1 alkohol (3,6%) i 1 furan (2,8%). Łączny udział tych związków wynosił 85,7%.

W celu zapewnienia większej dokładności analizy zapewniono chłodzenie (około +1 do +3 °C) stojaka automatycznego podajnika próbek tak, by w próbkach oczekujących na analizę ograniczyć niekorzystne reakcje chemiczne związane z rozkładem próbek. Z kolei, w celu wyeliminowania niepożądanego zmienności, na skutek zużywających się wraz z upływem czasu elementów układu chromatograficznego (starzenie się kolumny i włókna SPME, fluktuacje czułości detektora masowego MS), zapewniono takie ustawienie ich kolejności na stojaku podajnika, by wszystkie grupy żywieniowe i podgrupy (ptecz w obrębie grupy) były analizowane naprzemiennie.

Ryc. 1. Zależność odchylenia standardowego od udziału % związku lotnego w profilu substancji lotnych w mięsie nóg (a) i tłuszczu sadełkowym (b) Gęsi Białej Kołudzkiej®



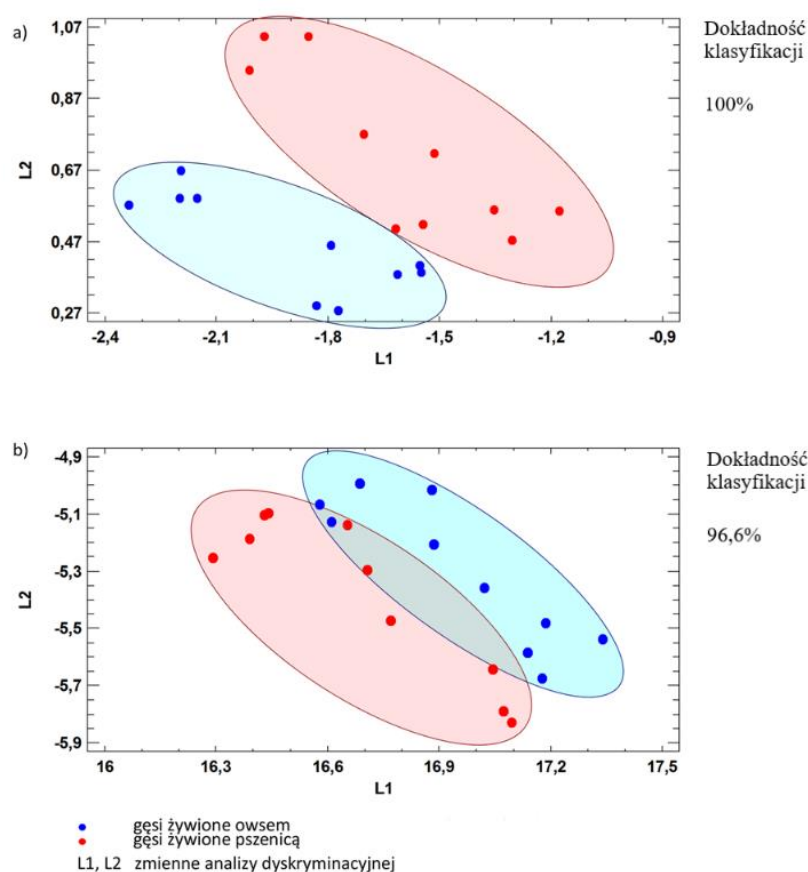
Identyfikacja związków lotnych

Spośród zidentyfikowanych 211 substancji lotnych, najwięcej obserwowano węglowodórów (56), a następnie aldehydów (41), alkoholi (34), ketonów (24), związków siarkowych (21), estrów (14), kwasów tłuszczowych (10), związków azotowych (6), a najmniej związków heterocyklicznych zawierających tlen (4) oraz jeden eter.

Modele klasyfikacyjne różnicujące gęś żywioną owsem i pszenicą w końcowym etapie tuczu

W celu graficznego przedstawienia różnic pomiędzy dwoma sposobami żywienia wykorzystano analizy lotnych związków w mięsie nóg techniką HS-SPME-GC/MS. Zastosowano podejście analizy niecelowanej typu „fingerprinting” (odcisk palca), w oparciu o widma masowe analizowanych próbek. Model klasyfikacyjny oparty na widmach masowych PCA-LDA, odróżniający grupę gęsi żywionej owsem od grupy żywionej pszenicą, wykazywał się wysoką zdolnością predykcyjną (96,6% – gęsi, 100% – gęsiorki). Przedstawiono go na Ryc. 2. Dokładności klasyfikacji do grup żywieniowych (owies vs. pszenica) obliczone na podstawie analizy głównych składowych i analizy dyskryminacyjnej były większe niż 95%. Mimo, że wartość dla samic była nieco niższa, to obie wartości należy uznać za dobre.

Ryc. 2. Wykresy punktowe F-Ratio-PCA-LDA w układzie dwóch głównych składowych L1 i L2, w oparciu o analizę lotnych związków metodą HS-SPME-GC/MS w mięsie Gęsi Białej Kołudzkiej®, dla dwóch grup: gęsiorków (a) i gęsi (b) żywionych owsem i pszenicą w końcowej fazie tuczu. Każdy punkt jest średnią z dwóch wyników



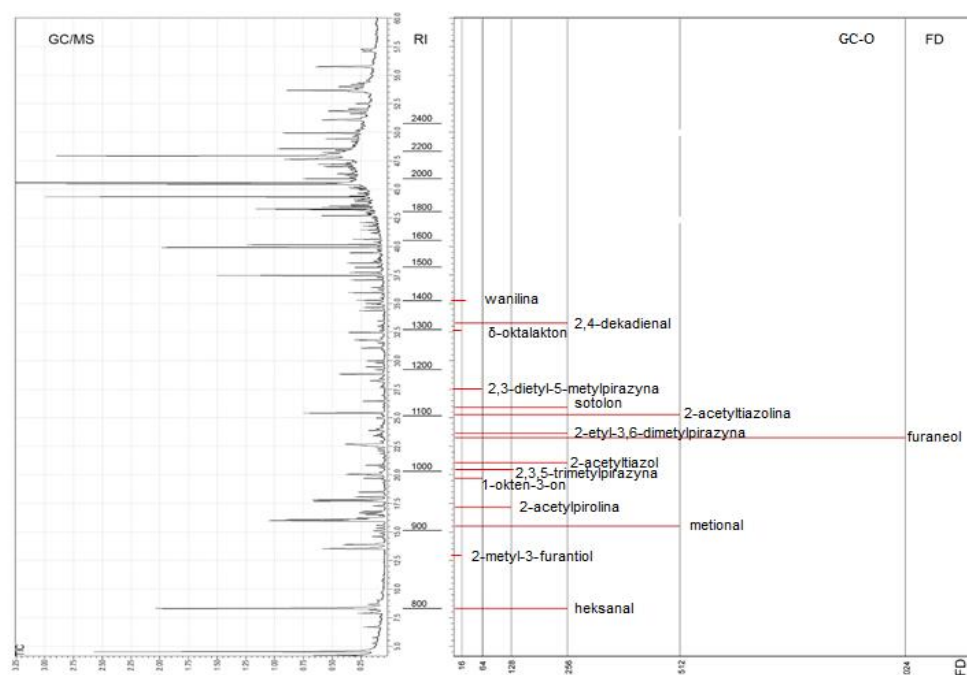
Analiza kluczowych związków zapachowych – metoda GC-O/MS

W mięsie zidentyfikowano 15 najbardziej aktywnych zapachowo substancji. Wartości FD tych substancji mieściły się w zakresie od 16 (2-metylo-3-furantiol i δ -oktalaktonu) do 1024 (furaneol, Ryc. 3). Podstawowymi prekursorami lotnych związków są aminokwasy i cukry oraz produkty reakcji pomiędzy nimi, a także kwasy tłuszczowe. Część tego typu substancji

może powstawać również z polifenoli, czego przykładem może być obecna w mięsie gęsim wanilina. Największy wpływ na aromat pieczonego mięsa gęsi kołudzkiej miały furaneol, metional i 2-acetylotiazolina o progu wyczuwalności T (stężenie w wodzie): 31, 0,2 i 1 ppb, odpowiednio. Prekursorem pierwszej substancji są cukry, drugiej metionina (rozkładająca się do metionalu w wyniku degradacji Streckera), a trzecia jest produktem reakcji Maillarda zachodzących pomiędzy cukrami a aminokwasami. Również silny wpływ na wrażenia zapachowe wywierały powstałe w reakcjach Maillarda: heterocykliczne związki zawierające azot i siarkę (2-acetylotiazol, T=10 ppb i 2-etylo-3,6-dimetylopirazyna, T=0,4 ppb) oraz sotolon (T=0,001 ppb), a także 2 aldehydy heksanal (T=4,5 ppb) i 2,4-dekadienal (T=0,2 ppb), których prekursorami są kwasy tłuszczowe. Wyraźnie wyczuwalne nuty pieczeniowe pochodziły, również od powstających w reakcjach Maillarda, 2-acetylopyroliny (T=0,1 ppb), 2,3,5-trimetylopirazyny (T=400 ppb), 2,3-dietylo-5-metylopirazyny (T=0,5 ppb) oraz od powstałego w wyniku oksydacji kwasów tłuszczowych 1-okten-3-onu (T=0,05 ppb) i powstałej z polifenoli, słodko-pachnącej waniliny (T=20 ppb). Natomiast najmniejszą wartością współczynnika rozcieńczenia zapachu charakteryzował się następny związek Maillarda: 2-metylo-3-furantiol (T=0,007 ppb) oraz powstały z rozkładu kwasów tłuszczowych δ -oktalakton (T=100 ppb).

Współczynnik FD głównie jest zależny od zawartości związku lotnego i jego progu wyczuwalności T, dlatego przypisana niektórym substancjom wysoka wartość współczynnika rozcieńczenia zapachu FD nie zawsze wskazuje na niską wartość T. Tak jest na przykład w przypadku furaneolu, związku o relatywnie słabej wyczuwalności (dosyć wysoki próg wyczuwania zapachu) a najwyższym współczynnikiem FD. Z kolei, w innym skrajnym przypadku występuje sytuacja odwrotna – związki o bardzo dobrej wyczuwalności – jak 2-metylo-3-furantiol i 1-okten-3-on – charakteryzują się niskimi wartościami FD, co wskazuje na bardzo małą ich zawartość w próbce.

Ryc. 3. Chromatogram (z lewej) i aromagram po ekstrakcji kluczowych związków zapachowych metodą SAFE z mięsa nogi gęsiorków Gęsi Białej Kołudzkiej®



heksanal – świeża trawa; **2-metylo-3-furantiol** – mięso, witamina B; **metional** – pieczony ziemniak; **2-acetylopyrolina** – popcorn prażony; **1-okten-3-on** – grzyby; **2,3,5-trimetylopirazyna** – pieczeń; **2-acetyltiazol** – prażony popcorn; **furaneol** – wata cukrowa; **2-etylo-3,6-dimetylopirazyna** – pieczeń; **2-acetylotiazolina** – popcorn; **sotolon** – vegeta, maggi, lubczyk; **2,3-dietylo-5-metylopirazyna** – pieczeń, ziemisty; **δ -oktalakton** – słodki; **2,4-dekadienal** – tłuszcz, trawa; **wanilina** – wanilia.

Podsumowanie i wnioski

Granica oznaczalności metody oznaczania związków lotnych metodą HS-SPME-GC/MS wynosiła 9000 (pole powierzchni). W trzech zakresach oznaczania (% profil): 0,003-0,10; 0,11-1,00 i 1,01-45,02, odchylenia standardowe wynosiły od 0,013 do 1,73 (% profil).

Dominującymi związkami lotnymi w mięśniach nóg były: pentanal, heksanal, heptanal, oktanal, nonanal, 3-metylobutanal, acetaldehyd, 2-etylofuran, 2-pentylofuran, 2,2,4,6,6-pentametyloheptan, heptan, 1-okten-3-ol, pentanol oraz: aceton, 3-metylo-2-pentanon, 2-heptanon i 2,3-okanodion. Łączny ich udział przekraczał w mięsie i tłuszczu sadełkowym 85%.

Tucz owsiany dał produkt bogatszy w witaminę E we wszystkich badanych tkankach, natomiast w witaminę A bogatszy był tłuszcz sadełkowy. Mięśnie nóg gęsiorków zawierały więcej białka, ale były uboższe w witaminę E.

Tucz gęsi owsem był korzystniejszy od tuczu pszenicą pod względem większości parametrów związanych z zawartością kwasów nienasyconych, w szczególności: UFA, PUFA, PUFA-3, UFA/SFA i PUFA/SFA. Wartości te były istotnie większe w przypadku tuczu owsem. Tucz gęsi pszenicą okazał się być bardziej korzystny od tuczu owsem, ze względu na lepszy stosunek kwasów omega-6/omega-3 (PUFA n-6/n-3). Wartości te były istotnie mniejsze w przypadku tuczu pszenicą.

Na podstawie analizy kluczowych związków zapachowych zidentyfikowano 15 najbardziej aktywnych zapachowo substancji określając ich stężenie zapachowe za pomocą współczynnika rozcieńczenia zapachu. Wyniki tej analizy dodatkowo opisują jakość mięsa gęsi kotudzkiej i są elementem oceny kulinarnej.

Przedstawiony w wersjach dla gęsiorków i gęsi model klasyfikacyjny, oparty na widmach masowych analizowanych próbek, wykazywał się wysoką, powyżej 95%, zdolnością predykcyjną. Model ten wraz z wynikami innych analiz może służyć jako element charakteryzujący gęś owsianą odróżniającą ją od gęsi żywionej w końcowej fazie tuczu ziarnem pszenicy.

Przedstawione wyniki analizy reżnej i badań chemicznych, w tym związków lotnych, z jednoczesnym wykorzystaniem wielowymiarowych technik statystycznych, w sposób kompleksowy charakteryzują jakość mięsa i tłuszczu Gęsi Białej Kotudzkiej®.

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 badań była ocena dwóch złożonych preparatów NANOCALF-Si oraz Selentin na status zdrowotny oraz parametry produkcyjne cieląt.

Początkowy okres odchowu cieląt cechuje się licznymi zagrożeniami dla ich zdrowia i życia. Mimo stosowania wielu zabiegów o charakterze zootechniczno-weterynaryjnym straty w ich odchowie są wysokie i wahają się w zależności gospodarstwa od 4 do 30%.

W doświadczeniu wykorzystano dwa preparaty o synergistycznym działaniu zarówno przeciwbakteryjnym, jak i immunostymulującym. Pierwszy z nich – NANOCALF-Si w swoim składzie zawierał: enzymy grzybowe o profilu trzustkowym, chronione cząsteczki kwasów fumarowego, jabłkowego, cytrynowego, sorbowego, a także maślan sodu. Związki te wykazują silne działanie przeciwbakteryjne oraz stymulujące nabłonek jelitowy. Drugi opracowany preparat składał się ze specjalnie zmodyfikowanych kultur *in vitro* gatunku grzyba leczniczego *Lentinula edodes* (shitake), wzbogaconego w związki organiczne selenu. Jego zadaniem było wywołać efekt stymulacji układu odpornościowego oraz działać jako prebiotyk u zwierząt hodowlanych.

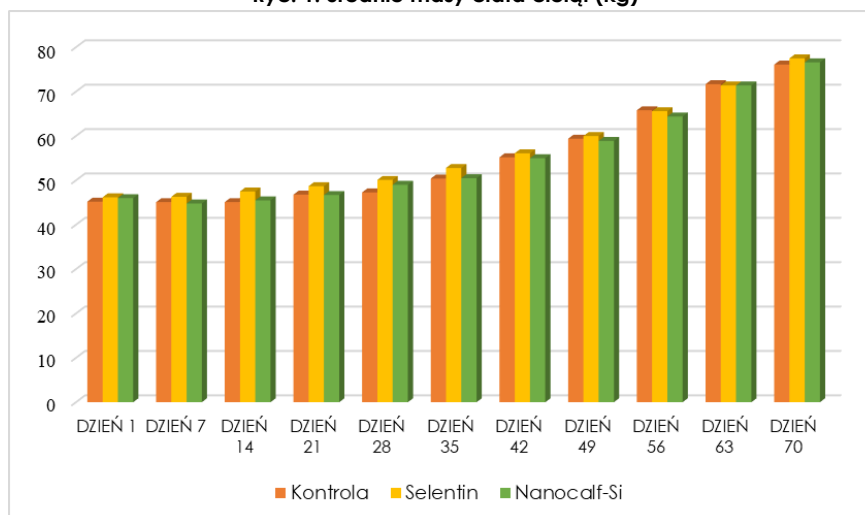
Przeprowadzono doświadczenie żywieniowe na 18 cielętach, mieszańcach ras cb x Hf (50-75% genów Hf) odsadzonych w momencie zakończenia pojenia siałą (4. dzień życia). Zwierzęta w miarę urodzeń zostały przydzielone do 3 grup doświadczalnych. Każda grupa liczyła po 6 cieląt, które były utrzymywane w kojach indywidualnych. W momencie rozpoczęcia doświadczenia zwierzęta były ważone. Kolejne ważenia masy ciała odbywały się w odstępach 7-dniowych. Cielęta należące do gr. 1 były traktowane jako grupa kontrolna (bez dodatku preparatów doświadczalnych). Grupy doświadczalne otrzymywały paszę o tym samym składzie i w tej samej ilości, lecz z dodatkiem preparatu NAOCALF-Si oraz SELENTIN. Preparaty były podawane od 10. do 70. dnia życia w postaci rozpuszczonej w wodzie, mleku oraz w preparacie mlekozastępczym. Podczas doświadczenia odnotowywano w karcie zdrowia liczbę dni z biegunką, jej przebieg, określano stan zdrowotny zwierząt. Na początku doświadczenia (10 dnia życia) oraz w 35., 70. i 120. dniu życia pobierano krew z żyły szyjnej zewnętrznej w celu określenia wskaźników morfologicznych (hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba czerwonych i białych krwinek), biochemicznych krwi oraz stężenia selenu.

W trakcie doświadczenia gromadzono następujące dane:

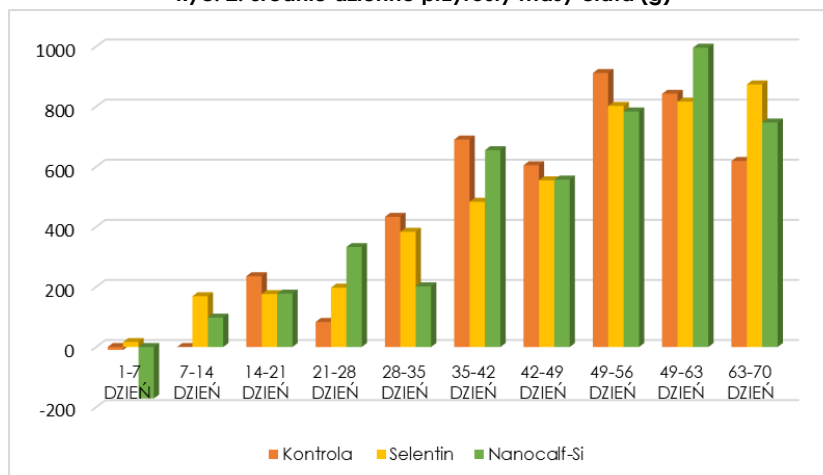
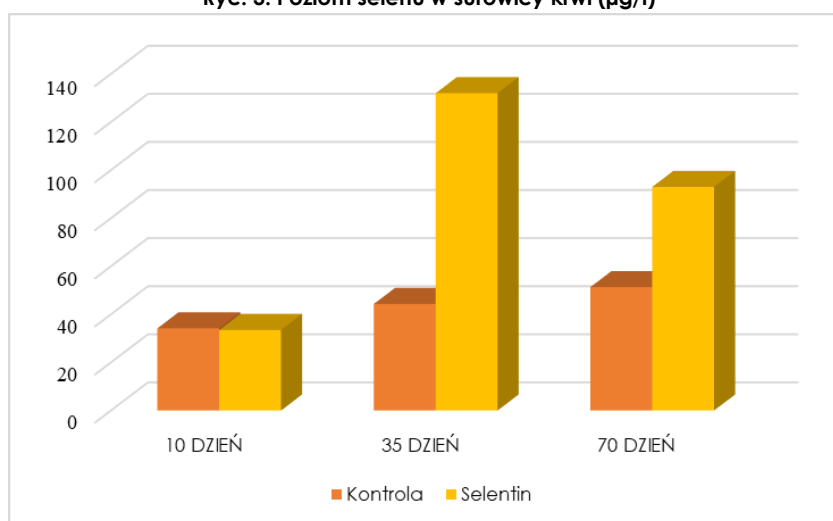
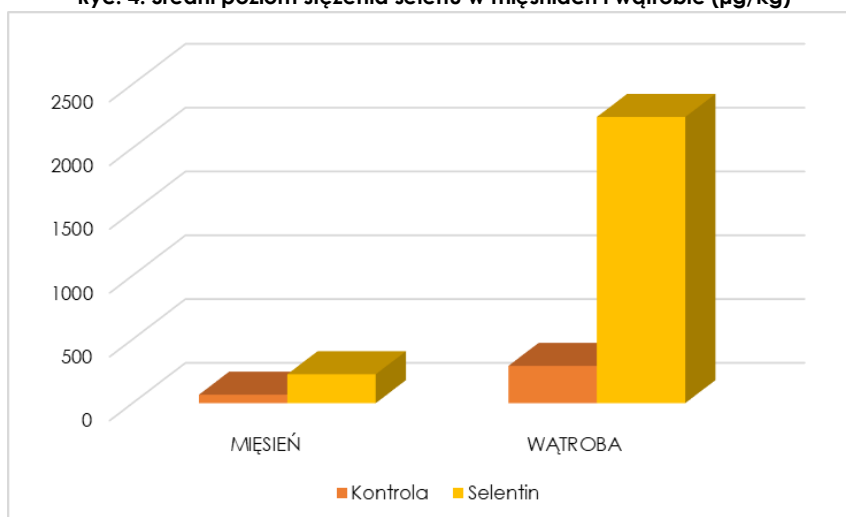
- wskaźniki zootechniczne (masy ciała, przyrosty masy ciała, pobranie paszy oraz zużycie paszy na kg przyrostu masy ciała),
- krew do analiz morfologicznych oraz biochemicznych pobierano w 10., 35., 70. i 120. dniu życia,
- w 70. dniu życia poddano eutanazji 3 osobniki z każdej grupy w celu pobrania fragmentów jelit oraz żwacza. Pobrano także fragment wątroby oraz mięśni celem określenia stężenia poziomu selenu.

Średnie masy ciała cieląt w dniu urodzenia były wyrównane, nie różniły się pomiędzy grupami i wynosiły odpowiednio: grupa kontrolna – 45,2; Selentin – 46,2; Nanocalf-Si – 46,0 (Ryc. 1). W późniejszym okresie życia, aż do 70. dnia, różnic statystycznych nie odnotowano. W poszczególnych okresach odchowu nie zaobserwowano również różnic w średnich dziennych przyrostach masy ciała (Ryc. 2). W okresie odchowu od 1.-53. dnia życia w żadnej z grup nie wystąpiły różnice w średnim, dziennym spożyciu paszy oraz współczynniku wykorzystania paszy. W grupie otrzymującej preparat Selentin stężenie selenu zarówno w surowicy krwi (Ryc. 3), mięśniach oraz wątrobie uległo znacznemu podwyższeniu - $P < 0,0001$ (Ryc. 4). W grupie kontrolnej w 35. dniu życia wynosiło ono 44,33 $\mu\text{g/l}$, natomiast w grupie otrzymującej Selentin – 132,00 $\mu\text{g/l}$.

Ryc. 1. Średnie masy ciała cieląt (kg)



Ryc. 2. Średnie dzienne przyrosty masy ciała (g)

Ryc. 3. Poziom selenu w surowicy krwi ($\mu\text{g/l}$)Ryc. 4. Średni poziom stężenia selenu w mięśniach i wątrobie ($\mu\text{g/kg}$)

Zastosowane preparaty nie zwiększyły masy ciała cieląt, jednak w ostatnich dwóch tygodniach odnotowano tendencję do większych przyrostów masy ciała zarówno w grupie cieląt otrzymujących preparat Nanocalf-Si jak i Selentin. Dodatkowo preparat Selentin zwiększył istotnie poziom selenu w surowicy krwi, mięśniach i wątrobie.

Zadanie 04-16-04-11

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

Kierownik zadania: prof. dr hab. Mariusz Pietras

Celem badań było określenie wpływu całkowitego zastąpienia śruty sojowej w mieszance sojowo-łubinowej mączką z poczwerek jedwabnika morwowego lub mączką z larw mącznika młynarka na rozwój przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów, funkcję wątroby oraz wskaźniki lipidowe i hormonalne krwi. Badania przeprowadzono łącznie na 252 seksowanych kurczętach brojlerach Ross 308, pozyskanych z komercyjnego zakładu wylęgowego odchowywanych na ściółce w standardowych warunkach środowiskowych, ze stałym dostępem do paszy i wody. Po zakończeniu pierwszego okresu odchowu kurczęta przydzielono do 4 grup po 24 ptaki (4 powtórzenia po 6 szt. – 3 kurki i 3 kogutki). Grupy kontrolne żywiono mieszanką kukurydziano-sojową (SBM) i kukurydziano-sojowo-łubinową (SBM+LL). W mieszankach doświadczalnych soję zastąpiono mączką z poczwerek jedwabnika – grupa LL+BM i mączką z larw mącznika młynarka – grupa LL+TM. Określono wskaźniki rozwój przewodu pokarmowego i funkcji wątroby. Pozorną strawność jelitową suchej masy, białka ogólnego i tłuszczu surowego oznaczono na 144 kurczętach podzielonych na 4 grupy, w 6 powtórzeniach po 6 ptaków w każdym powtórzeniu. 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.

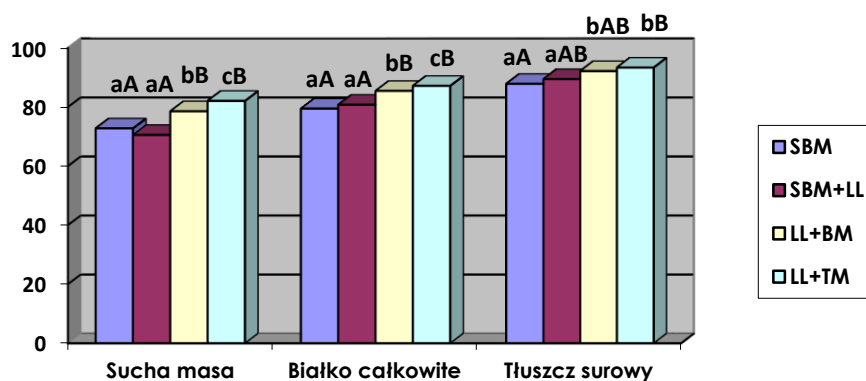
Nie stwierdzono istotnego wpływu zastąpienia śruty sojowej mączką z poczwerek jedwabnika i larw mącznika młynarka na wyniki produkcyjne w stosunku do grupy kontrolnej (Tab. 1).

Tab. 1. Wyniki odchowu kurcząt brojlerów w okresie od 22. do 42. dnia życia

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	P-value
	I SBM	II SBM+LM	III LL+BM	IV LL+TM		
Masa ciała w 21. dniu (g)	845,5	894,3	836,3	893,2	14,242	0,2207
Masa ciała w 42. dniu (g)	2921,2	2897,0	2919,7	3002,8	29,569	0,3862
Przyrost masy ciała od 22. do 42. dnia (g/dzień)	98,9	96,3	99,21	100,4	1,390	0,6602
Zużycie paszy (kg/kg przyrostu)	1,54	1,57	1,48	1,47	0,027	0,5148
Przeżywalność od 22. do 42. dnia (%)	97,22	100,00	100,00	100,00	-	-

Zastąpienie w 60% śruty sojowej nasionami łubinu żółtego (grupa SBM+LL) nie miało istotnego wpływu na pozorną strawność jelitową białka ogólnego i tłuszczu surowego, zawartych w mieszance paszowej (Rys. 1). Natomiast całkowite wyeliminowanie śruty sojowej z mieszanek i zastąpienie jej mączkami z owadów (grupy LL+BM i LL+TM) istotnie zwiększyło współczynniki pozornej strawności jelitowej tych składników ($P < 0,01$).

Rys. 1. Współczynniki pozornej strawności jelitowej suchej masy, białka ogólnego i tłuszczu surowego (%)



Wpływ zastosowanych czynników doświadczalnych na masę przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów przedstawiono w Tab. 2. Zastąpienie w 60% śruty sojowej nasionami łubinów żółtego (grupa SBM+LL) istotnie zwiększyło względną masę dwunastnicy ($P<0,05$), jelita czczego ($P<0,01$) oraz jelit ślepych ($P<0,01$) nie wywierając wpływu na względną masę żołądków, jelita krętego i końcowego. Całkowite wyeliminowanie śruty sojowej z mieszanek i zastąpienie jej mączką z poczwerek jedwabnika (LL+BM) istotnie zwiększyło względną masę żołądka mięśniowego ($P<0,01$) i jelita czczego ($P<0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej (SBM).

Tab. 2. Wpływ mączek z owadów na masę przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów w 42. dniu życia

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	P-value
	I SBM	II SBM+LM	III LM+BMM	IV LM+TML		
Względna masa (g/kg masy ciała)						
Żołądek gruczolowy	2,41	2,27	2,31	2,43	0,062	0,7506
Żołądek mięśniowy	7,06A	7,35A	10,75B	12,33B	0,494	<0,0001
Dwunastnica	3,28a	4,06b	3,66ab	3,26a	0,123	0,0395
Jelito czcze	5,96A	7,33B	7,27B	5,54A	0,215	0,0004
Jelito kręte	4,74	4,79	4,80	4,82	0,131	0,1290
Jelita ślepe	2,09A	2,84B	2,69AB	2,14A	0,101	0,0032
Jelito końcowe	2,18	2,23	1,82	1,85	0,083	0,1243
Jelito cienkie ¹	13,97AB	16,17C	15,74BC	12,62A	0,361	0,0001
Jelito ogółem ²	18,24AB	21,24C	20,26BC	16,61A	0,474	0,0004

1. Jelito cienkie = dwunastnica jelito czcze + jelito kręte.

2. Jelita ogółem = jelito cienkie + jelita ślepe + jelito końcowe.

a, b; A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie, odpowiednio przy ($P\leq 0,05$) i ($P\leq 0,01$).

Zastąpienie śruty sojowej mączką z larw mącznika młynarka (LL+TM) istotnie zwiększyło względną masę żołądka mięśniowego ($P<0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej (SBM). Względna długość jelita czczego i jelit ślepych (tab. 3) kurcząt żywionych mieszanką, zawierającą mączkę z poczwerek jedwabnika (LL+BM) była zbliżona do wartości obserwowanych w grupie sojowo-łubinowej (SBM+LL) natomiast istotnie wyższa ($P<0,01$) w porównaniu do grup kontrolnej (SBM) i otrzymującej w diecie mączkę z larw mącznika młynarka (LM+LL+TM).

Tab. 3. Wpływ mączek z owadów na długość przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów w 42. dniu życia

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	P-value
	I SBM	II SBM+LM	III LM+BMM	IV LM+TML		
Względna długość cm/kg masy ciała						
Dwunastnica	0,97	0,98	1,05	1,08	0,021	0,1298
Jelito czcze	23,81A	26,23AB	28,38B	24,31A	0,564	0,0085
Jelito kręte	24,54	27,32	26,05	25,86	0,686	0,1336
Jelita ślepe	12,14A	13,40AB	14,68B	12,77A	0,264	0,0015
Jelito końcowe	5,84	5,89	5,95	6,23	0,127	0,6724
Jelito cienkie ¹	49,32A	54,53B	55,48B	51,25AB	1,182	0,0044
Jelita ogółem ²	67,24A	73,82B	76,11B	70,25AB	1,361	0,0016

1. Jelito cienkie = dwunastnica + jelito czcze + jelito kręte; 2. Jelita ogółem = jelito cienkie + jelita ślepe + jelito końcowe.

a, b; A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie, odpowiednio przy ($P\leq 0,05$) i ($P\leq 0,01$).

Badania wskaźników biochemicznych krwi kurcząt (Tab. 4) nie wykazały statystycznie istotnych różnic w zawartości glukozy i trójglicerydów między grupami. Stwierdzono natomiast istotnie niższy poziom białka całkowitego ($P<0,05$), cholesterolu całkowitego ($P<0,01$) oraz jego frakcji HDL i LDL ($P<0,01$) w grupie ptaków otrzymujących w diecie mączkę z poczwerek jedwabnika (LL+BM).

Tab. 4. Wpływ mączek z owadów wskaźniki biochemiczne plazmy krwi kurcząt brojlerów w 42. dniu życia

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	P-value
	I SBM	II SBM+LM	III LM+BMM	IV LM+TML		
Białko całk. (g/dl)	3,17a	3,04ab	2,69b	3,04ab	0,0577	0,0177
Glukoza (mg/dl)	243,25	263,63	255,50	244,63	4,1811	0,2712
Cholesterol całkowity (mg/dl)	118,75A	120,00A	91,25B	105,75AB	2,7229	0,0070
Trójglicerydy (mg/dl)	38,88	46,63	38,25	33,00	2,3085	0,2214
HDL (mg/dl)	74,34AB	79,15A	67,88B	74,94AB	2,7215	0,0013
LDL (mg/dl)	23,64A	22,03AB	16,44B	18,66AB	0,9356	0,0020

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie, odpowiednio przy ($P \leq 0,01$).

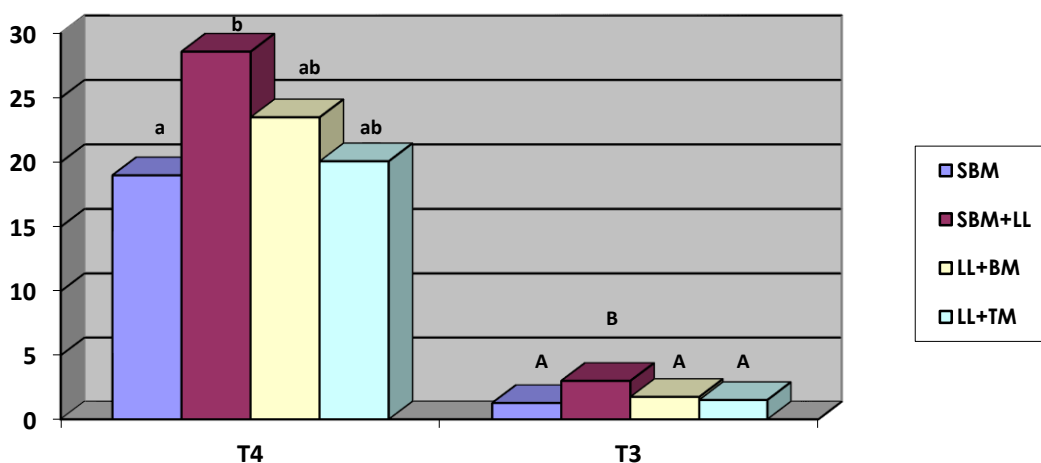
W Tabeli 5. przedstawiono wyniki pomiaru masy wątroby oraz aktywność enzymów wątrobowych we krwi kurcząt. Względna masa wątroby ptaków otrzymujących w diecie mączkę z poczwarek jedwabnika (LL+BM) była statystycznie istotnie niższa ($P < 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej (SBM). W pozostałych grupach wartości tego parametru były zbliżone, a obserwowane różnice nie wykazywały istotności statystycznej. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości aminotransferazy asparaginowej (AST). Kurczęta żywione mieszanką sojowo-tubiniową (SBM+LL) charakteryzowały się istotnie niższą zawartością fosfatazy alkalicznej ($P < 0,01$), natomiast wprowadzenie do mieszanki mączki z larw mącznika młynarka istotnie obniżyło wartość ALT ($P < 0,01$), w porównaniu do grup żywionych mieszankami z udziałem soi.

Tab. 5. Wpływ mączek z owadów na masę wątroby i aktywność enzymów wątrobowych w plazmie krwi kurcząt brojlerów w 42. dniu życia

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	P-value
	I SBM	II SBM+LM	III LM+BMM	IV LM+TML		
Masa wątroby (g/kg)	18,09a	16,79ab	16,26b	18,29a	0,3226	0,0410
ALP ¹ (U/l)	263,01A	151,90B	176,74AB	167,79AB	14,0932	0,0016
AST ² (U/l)	231,18	207,44	209,68	237,36	10,7952	0,7084
ALT ³ (U/l)	10,63A	11,38A	8,00AB	5,50B	0,6761	0,0036

a, b; A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie, odpowiednio przy ($P \leq 0,05$) i ($P \leq 0,01$).
ALP¹ – fosfataza alkaliczna; AST² – aminotransferaza asparaginowa; ALT³ – aminotransferaza alaninowa.

Wyniki oznaczeń zawartości hormonów tarczycy we krwi kurcząt zamieszczono na Rysunku 2.

Rys. 2. Wpływ mączek z owadów na zawartość hormonów tarczycy w plazmie krwi kurcząt brojlerów w 42. dniu życia

Zastąpienie w 60% śruty sojowej nasionami łubinów żółtych (grupa SBM+LL) istotnie zwiększyło poziom tyroksyny ($P < 0,05$), trójiodotyroniny ($P < 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej SBM). Całkowite wyeliminowanie śruty sojowej z mieszanek i zastąpienie jej mączką z poczwerek jedwabnika (LM+BMM) lub larw mącznika młynarka (LL+TM) obniżyło wartości badanych parametrów do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastąpienie śruty sojowej w mieszance sojowo-łubinowej mączkami z poczwerek jedwabnika lub larw mącznika młynarka nie wywiera istotnego wpływu na parametry odchovu kurcząt brojlerów, poprawia strawność składników pokarmowych, zwiększa długość przewodu pokarmowego i warunkuje wskaźniki lipidowe, enzymatyczne i hormonalne krwi.

Zakład Systemów i Środowiska Produkcji Kierownik: dr hab. Jacek Walczak

Zadanie 01-17-03-11

Waloryzacja metod ograniczenia rozpraszania związków azotu z produkcji zwierzęcej

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Walczak

Wobec przyjętych na poziomie ONZ oraz UE porozumień i zobowiązań międzynarodowych, krajowe rolnictwo, w tym produkcja zwierzęca, staje dziś przed koniecznością podjęcia konkretnych, ewidencjonowanych działań mitygujących w praktyce produkcyjnej.

Dotyczą one w pierwszej kolejności rozpraszania związków biogennych, ale również emisji gazowych, tak amoniaku jak i GHG. Stąd 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 określenia skuteczności zintegrowanych metod redukcji rozpraszania azotu. Prace prowadzone były w środowisku komór klimatycznych i tuneli aerodynamicznych. Jako czynniki doświadczalne zastosowane były między innymi: utrzymywanie niosek w systemie z podsuszaniem pomiotu, utrzymanie bydła w systemie podtóg ryflowych i z częstym usuwaniem obornika, utrzymywanie świń w systemie częściowo rusztowym z biofiltrami, żywienie wielofazowe fazowe, dodatki enzymatyczne, pastwiskowanie, przykrycie obornika folią, kompostowanie obornika, separacja gnojowicy, fermentacja metanowa, zakwaszanie gnojowicy, redlicowy system dogłębowej aplikacji gnojowicy.

Badaniami objęto świnię, bydło, drób czystych ras jak i krzyżówek towarowych, utrzymywane w systemach ściółkowych i beźściółkowych. 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 idzie 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), klatkowo w bateriach. Zwierzęta żywiono i utrzymywane 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 grupami kontrolnymi a doświadczalnymi w każdym przypadku. Różnice powstałe w grupach doświadczalnych wynikały z niższej emisji podtlenku azotu i amoniaku na skutek ograniczenia czynników fizykochemicznych sprzyjających emisji (np. temperatura, pH, powierzchnia emisji, itp.)

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że chów zwierząt, zwłaszcza przy dużej skali i koncentracji produkcji, prowadzi do istotnych oddziaływań na środowisko glebowe i powietrzne. Badane metody redukcji rozpraszania w 20-30% redukowały uwalnianie gazowych form azotu, głównie w postaci amoniaku i ditlenku azotu. Największe znaczenie dla emisji pierwszego z wymienionych gazów miało ograniczenie efektywności działania ureazy, zawartej w moczu zwierząt. Dal metod aplikacji 30% redukcję emisji uzyskiwano poprzez szybkie wymieszanie lub wchłonięcie nawozu naturalnego przez glebę. Przebieg warunków pogodowych w różnych porach roku silnie modyfikuje emisje gazowe (temperatura, opady), wpływając na koncentrację azotu w nawozach naturalnych i ilość uwalnianego z nich amoniaku.

Zadanie 01-17-04-11

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 ziółowych 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 szt. 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.

Dwukrotnie w tygodniu, przeprowadzono oprysk podłogi owczarni (ściółki) wraz z jej ścianami (do wysokości ok. 1 m) wodnym roztworem fermentowanego ekstraktu ziołowego (FHE), w stężeniu około 100 ml/1l wody. Budynki owczarni wyposażone są w wentylację grawitacyjną.

W okresie sprawozdawczym zgromadzono i przeanalizowano dane pomiarowe dotyczące mikroklimatu wewnątrz owczarni: temperaturę, wilgotność względną oraz 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 i metanu.

Przeprowadzony w pobliżu (poniżej) wywiewu kalenicowego budynków, jeden raz w miesiącu, 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.

Podczas sezonu stwierdzono dość znaczne różnice w szybkości ruchu powietrza, a najwyższe jego wartości, osiągające maksymalnie 0,8 m/s odnotowano w okresie letnim, podczas gdy w okresie zimowym analogiczne pomiary były kilkukrotnie niższe (0,05-0,3 m/s). Zapewne ma związek z przymknięciem kanałów nawiewnych i wywiewnych 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 55-65% w porównaniu z 80% w zimie.

W żadnym z pomiarów CO₂ nie stwierdzono przekroczenia jego zalecanego stężenia. W przeciwieństwie do powyżej omawianego parametru, jego wartości zmierzone w okresie od listopada do marca (0,07-0,15%) uznać należy za korzystne. 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.

Spośród 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 0-7 ppm (najwyższe wartości występowały sporadycznie), nie wykazując równocześnie jakiegokolwiek zaznaczonej tendencji. Równocześnie, nie stwierdzono obecności H₂S we wszystkich obiektach i w jakimkolwiek z okresów pomiarów.

Zakres wskazań stężenia CH₄ wykazywał dość znaczną rozpiętość 7500-36000 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.

Wartość NO_x uzyskiwała najwyższy poziom 10 ppb, wynosząc z reguły 2-6 ppb, a udział NO był zazwyczaj co najmniej 2-krotnie wyższy od stężenia NO_2 . Pomiar zawartości 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 23-27, 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: 30,7-34,3% i 7,6-8,3%.

Wzrost strat wszystkich związków biogenych występujący w obiektach w Kołbaczu można wiązać z dłuższym, rocznym okresem deponowania ściółki w owczarni.

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	1,78	1,43	0,90	1,33	23,5:1	32,3	7,7
Kołbacz II	1,69	1,45	0,78	1,21	24,7:1	30,7	8,3
Chorzelów	1,51	1,32	0,86	1,17	22,8:1	32,7	8,0

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	0,26	0,18	0,29	0,42	25,8:1	33,9	7,6
Kołbacz II	0,28	0,20	0,25	0,36	26,7:1	32,8	8,1
Chorzelów	0,16	0,05	0,16	0,22	24,4:1	34,3	8,1

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.

W porównaniu z wynikami uzyskanymi w I etapie realizacji zadania, zastosowany oprysk ściółki roztworem ekstraktu ziołowego skutkował niższym stopniem emisji towarzyszących produkcji owczarskiej domieszek gazowych – metanu i amoniaku do środowiska.

Zadanie 04-17-01-11

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

Kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Cel główny, którego zadaniem jest określenie potencjału produkcyjno-ekonomicznego gospodarstw rodzinnych z uwzględnieniem działań prośrodowiskowych i zmian w technologiach produkcji i technikach wytwarzania produktu w ujęciu terytorialnym jest realizowany poprzez analizę przychodów i kosztów produkcji zwierzęcej w ujęciu terytorialnym, uwzględniając zmiany w technologii i technikach wytwarzania w gospodarstwach rolnych oraz optymalizację produkcji zwierzęcej z uwzględnieniem działań na rzecz ochrony środowiska w gospodarstwach rodzinnych.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań

W związku z realizacją etapu badań pn. *Gromadzenie danych o produktywności, kosztach i przychodach gospodarstwa konwencjonalnego. Obliczanie struktury kosztów oraz dochodowości gospodarstw rodzinnych. Analiza wskaźników określających stopień oddziaływania gospodarstw rolnych na środowisko naturalne* wytypowano gospodarstwa rodzinne, utrzymujące owce, bydło i świnie; zgromadzono dane z zakresu zasobów gospodarstw, które w przyszłości posłużą do wykonania analizy efektywności ekonomiczno-produkcyjnej i optymalizacji produkcji. Ponadto, poddano analizie dane źródłowe pochodzące z 210 gospodarstw, w tym: z 60 gospodarstw utrzymujących świnie, 90 gospodarstw utrzymujących krowy mleczne oraz 60 gospodarstw utrzymujących owce.

Gospodarstwa z produkcją żywca wieprzowego

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 (Tab. 1).

Tab. 1. Koszty produkcji w gospodarstwach utrzymujących świnie

Województwo	Podkarpackie	Podlaskie
Koszty bezpośrednie (zł)	63 112,98	179 685,54
Koszty bezpośrednie /lochę (zł)	5 353,88	5 744,72
Koszty pośrednie (zł)	36 594,97	63 924,40
Koszty pośrednie /lochę (zł)	3 088,37	2 414,76
Koszty całkowite (zł)	99 707,94	243 609,94
Koszty całkowite /lochę (zł)	8 442,25	8 159,48

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 (Tab. 2) 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%).

Tab. 2. Struktura przychodów gospodarstw utrzymujących świnie (%)

Wyszczególnienie	Podkarpackie	Podlaskie
Wartość sprzedaży żywca	58,55	80,15
Płatności	18,04	11,98
Sprzedaż produkcji	13,19	3,47
Przychody z udziałów w spółdzielni	0,01	0,00
Zwrot podatku	1,54	0,47
Zwrot podatku akcyzowego	1,01	0,71
Źródła dochodu spoza gospodarstwa	4,38	1,11
Niezarobkowe źródła dochodu	3,29	2,1

Gospodarstwa z produkcją żywca jagnięcego

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 579,00 zł (podkarpackie) oraz 626,00 zł (podlaskie). Wysokość kosztów pośrednich odnotowano na zbliżonym poziomie ok. 190,00 zł/matkę, średnio w jednym i drugim regionie. Główną jego składową było utrzymanie, remonty maszyn, urządzeń oraz budynków (Tab. 3).

Tab. 3. Koszty produkcji w gospodarstwach utrzymujących owce

Wyszczególnienie	Podkarpackie	Podlaskie
Koszty bezpośrednie /matkę (zł)	388,42	433,68
Koszty pośrednie /matkę (zł)	190,57	192,16
Koszty całkowite /matkę (zł)	578,99	625,84

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% (Tab. 4).

Tab. 4. Struktura przychodów gospodarstw utrzymujących owce (%)

Województwo	Podkarpackie	Podlaskie
Sprzedaż produkcji roślinnej (%)	5,4	0,00
Przychody z produkcji owczarskiej (%)	15,27	9,96
Przychody z produkcji zwierzęcej (%)	9,02	25,58
Przychody z udziałów w spółdzielni (%)	0,07	0,02
Zwrot podatku (%)	1,75	1,15
Źródła dochodu spoza gospodarstwa (%)	14,67	6,32
Niezarobkowe źródła dochodu (%)	9,39	2,21
Płatności ogółem (%)	44,42	54,76

Gospodarstwa z produkcją mleka

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% (Tab. 5).

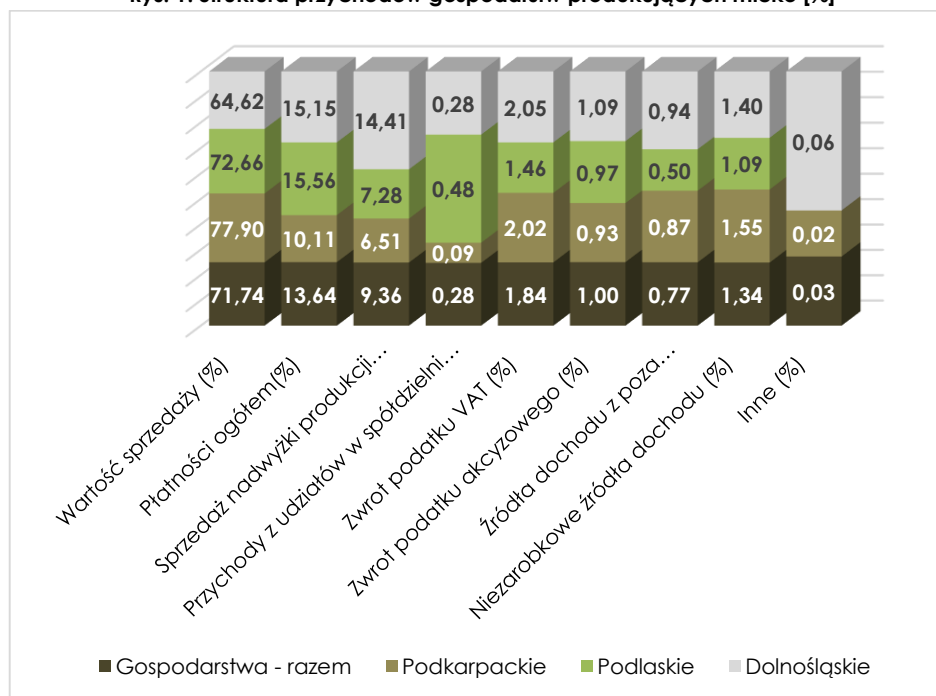
Tab. 5. Jednostkowe koszty bezpośrednie produkcji mleka oraz ich struktura

Województwo	Gospodarstwa - razem	Podkarpackie	Podlaskie	Dolnośląskie
Koszty pasz na 1 l mleka (zł/l)	0,72	0,77	0,57	0,81
Koszty bezpośrednie na 1 l mleka (zł/l)	0,81	0,84	0,67	0,90
Koszty bezpośrednie na 1 krowę (zł/l)	4 692,94	4 648,50	4 626,91	4 794,28

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% (Rys. 1).

Rys. 1. Struktura przychodów gospodarstw produkujących mleko [%]



Zmiany wprowadzone w gospodarstwach rolnych

W wybranych do badań obiektach, utrzymujących owce, świnię oraz bydło mleczne zmiany technologiczno-organizacyjne dotyczyły w głównej mierze działu produkcji roślinnej (owce, świnię), produkcji zwierzęcej (bydło mleczne) oraz ekonomiki i organizacji produkcji (świnię). W gospodarstwach utrzymujących świnię odnotowano najwyższy odsetek zmian ogółem wprowadzonych w gospodarstwach (Tab. 6).

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, korzystając w głównej mierze z kredytów obrotowych kupowali nowe środki ochrony i nawozy, gdyż zdają sobie sprawę, że ma to ogromny wpływ na plonowanie roślin. Pomimo trudności finansowych na uwagę zasługują działania związane z zakupem maszyn oraz urządzeń do produkcji roślinnej (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.

Tab. 6. Rodzaj innowacji wprowadzonych w gospodarstwach z produkcją zwierzęcą

Województwo	Tak/Nie	Dział produkcji roślinnej (%)	Dział produkcji zwierzęcej (%)	Ekonomika i organizacja produkcji (%)
Rodzaj innowacji wprowadzonych w gospodarstwie (owce)				
Średnio	tak	62,00	56,00	50,00
	nie	38,00	44,00	50,00
Podkarpackie	tak	63,33	66,67	66,67
	nie	36,67	33,33	33,33

c.d. Tab. 6.

Podlaskie	tak	60,00	40,00	25,00
	nie	40,00	60,00	75,00
Rodzaj innowacji wprowadzonych w gospodarstwie (świnie)				
Średnio	tak	79,25	69,81	67,92
	nie	20,75	30,19	32,08
Podkarpackie	tak	70,37	62,96	51,85
	nie	29,63	37,04	48,15
Podlaskie	tak	88,46	76,92	84,62
	nie	11,54	23,08	15,38
Rodzaj innowacji wprowadzonych w gospodarstwie (bydło mleczne)				
Średnio	tak	64,41	76,27	62,71
	nie	35,59	23,73	37,29
Podkarpackie	tak	80,00	80,00	76,67
	nie	20,00	20,00	23,33
Podlaskie	tak	48,28	72,41	48,28
	nie	51,72	27,59	51,72

W ekonomice i organizacji gospodarstw zmiany dotyczyły przede wszystkim zwiększenia powierzchni gospodarstwa poprzez dzierżawę gruntów (39 gospodarstw) oraz zakup ziemi (21 gospodarstw). Dzierżawą gruntów posilkowali się głównie producenci żywca wieprzowego.

Na uwagę zasługuje 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 oraz pomysłowości były inicjowane w większym zakresie.

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt
Kierownik: dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ PIB

Zadanie 01-18-01-21

Opracowanie i walidacja nowych metod identyfikacji zwierząt na podstawie markerów DNA

Kierownik zadania: dr hab. Anna Radko, prof. IZ PIB

Celem prac badawczych było rozszerzenie badań rodowodowych koni o uzupełniający zestaw piętnastu markerów STR rekomendowany przez ISAG. Badania te obejmowały zwalidowanie metody analizy markerów mikrosatelitarnych DNA koni, polimorfizm badanych markerów mikrosatelitarnych DNA był przeprowadzony w populacji koni objętych kontrolą pochodzenia w Instytucie Zootechniki PIB. Celem badań było zaprojektowanie reakcji multiplex oraz walidacja zestawu 15 mikrosatelitarnych loci oraz określenie przydatności proponowanego zestawu STR w kontroli pochodzenia koni wybranych ras. Opracowany panel dodatkowy znajduje zastosowanie w rozstrzyganiu kwestii spornych w przypadkach domniemanego rodzicielstwa dla pojedynczego locus, weryfikacji wyników spornych lub niepewnych względem zestawu podstawowego STR.

Założenia metodyczne

Zootechniczna dokumentacja hodowlana, stanowiąca podstawę doboru zwierząt jako rodziców następnych pokoleń jest gwarancją uzyskania postępu hodowlanego. W celu jej weryfikacji prowadzi się identyfikację zwierząt i analizę rodowodów potomka i jego rodziców, w oparciu o polimorfizm wybranych markerów genetycznych.

Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG – *International Society for Animal Genetics*) zaleciło od lat dziewięćdziesiątych, aby kontrola pochodzenia zwierząt hodowlanych była prowadzona m.in. w oparciu o analizę polimorfizmu DNA. Markery mikrosatelitarne analizowane są z zastosowaniem reakcji PCR oraz rozdziatu elektroforetycznego w sekwencjatorze kapilarnym. Duża ilość oznaczonych w genomach zwierząt sekwencji mikrosatelitarnych oraz stosunkowo szybka i efektywna technika ich analizy spowodowała, że obecnie stanowią one najliczniejszą grupę markerów, stosowanych zarówno w badaniu struktury i zmienności genetycznej różnych populacji, jak również w kontroli pochodzenia koni. Zastosowanie STR do weryfikacji pochodzenia ze względu na wysoki polimorfizm i czułą technikę analizy tych markerów pozwala na uzyskanie często wyższego niż 99,9% prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica.

Ostatnie raporty grupy roboczej oraz szereg publikacji wykazały konieczność stosowania panelu uzupełniającego w przypadkach spornych, wątpliwych lub na przykład dla ras zimbabwskich bądź małych populacji.

Syntetyczny opis wyników zadania

W Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB podjęto się opracowania i zwalidowania metody analizy markerów mikrosatelitarnych DNA, wchodzących w skład zestawu uzupełniającego do kontroli pochodzenia koni oraz standaryzacji wyników próbkami referencyjnymi, co zagwarantuje uzyskanie rzetelnych i wiarygodnych rezultatów. Standaryzacja zgodna z zaleceniami ISAG pozwala na zachowania uniwersalności badań rodowodowych koni w Polsce, co ma istotne znaczenie dla prowadzenia krajowej hodowli, a także przy imporcie i eksporcie zwierząt.

Zaprojektowany zestaw stanowi narzędzie pomocnicze do rozwiązywania kwestii spornych w przypadkach domniemanego pochodzenia po jednym rodzicu lub parze rodzicielskiej w przypadkach rutynowych weryfikacji kontroli pochodzenia, gdy decyzja za pomocą zestawu podstawowego nie może być podjęta w sposób jednoznaczny. Użycie zestawu uzupełniającego 15 mikrosatelitarnych *loci* w tych przypadkach zwiększa prawdopodobieństwo wykluczenia i podnosi wiarygodność testów kontroli pochodzenia.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu zadania

Zaprojektowany zestaw stanowi nową metodę badawczą w laboratorium – narzędzie pomocnicze do rozwiązywania kwestii spornych w przypadkach domniemanego pochodzenia po jednym rodzicu lub parze rodzicielskiej w przypadkach rutynowych weryfikacji kontroli pochodzenia, gdy decyzja za pomocą zestawu podstawowego nie może być podjęta w sposób jednoznaczny. Użycie zestawu uzupełniającego 15 mikrosatelitarnych *loci* w tych przypadkach zwiększa prawdopodobieństwo wykluczenia i podnosi wiarygodność testów kontroli pochodzenia. Co za tym idzie, zmniejsza ryzyko wystąpienia fałszywie pozytywnych wyników w przypadku analiz trudnych, minimalizuje ryzyko pomyłki eksperta przy opiniowaniu poprzez zwiększenie siły dyskryminacji poprzez zastosowanie dwu zestawów markerów w w/w przypadkach.

Zadanie 04-18-01-21

Walidacja wyników ukierunkowanego sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem badań asocjacyjnych

Kierownik zadania: dr hab. 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 zmiany polimorficzne, 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

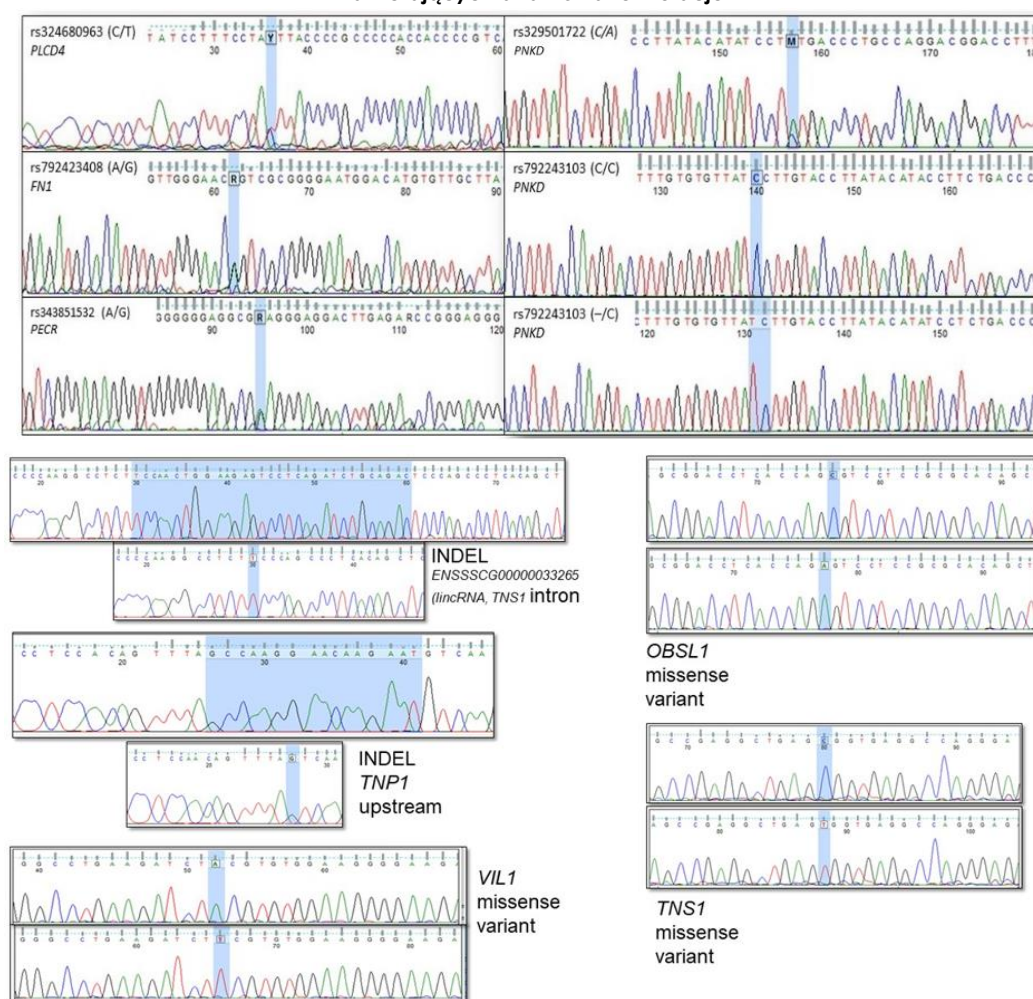
Mutacje zidentyfikowane w regionie chromosomu 15 świń, bogatego w QTLs zostały przeanalizowane z wykorzystaniem testu LRT oraz χ^2 , wyznaczone pięć mutacji występujących w genach, które kodują białka potencjalnie związane z kształtowaniem fenotypu trzody chlewnej, tj. w genach *PLCD4*, *PECR*, *FN1*, *PNKD*, *TNS1*, *TNP1*, *VIL1*, *ENSSSCG00000033265* (*lin-cRNA*) 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 *PLCD4*, który koduje fosfolipazę 4, prawdopodobnie zaangażowaną w szlak sygnałowy leptyny regulujący uczucie głodu i sytości, analizowano mutacje w sekwencji promotorowej genu. Nie zaobserwowano jednak większego wpływu tej mutacji na cechy produkcyjne świń. W genie *PECR*, który koduje peroksysomalna trans-2-enoyl-CoA reduktazę zaangażowaną w wydłużanie łańcuchów oraz biosyntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, analizując mutacje w sekwencji promotorowej zaobserwowano jej istotny wpływ na masę połówicy w rasie Duroc i wbp, gdzie różnice pomiędzy osobnikami o różnym genotypie wynosiły odpowiednio 340 g i 240 g. W genie *FN*, kodującym fibronektynę 1 ocenie poddana została mutacja zmieniająca sens aminokwasowy. Fibronektyna 1 jest typowana jako gen kandydujący dla cech związanych z mięsnością m.in. u bydła, gdzie obserwowano obniżoną ekspresję genu *FN1* u osobników charakteryzujących się podwójnym umięśnieniem (Cassar-Malek i in. 2007). Ponadto jest zaangażowana w wiązanie do powierzchni komórki cząsteczek kolagenu,

fibryny oraz aktyny, które stanowią integralną część macierzy pozakomórkowej oraz cytoszkieletu komórkowego. Badania asocjacyjne wykazały wpływ badanej w genie *FN1* mutacji na cechy tuczne w rasie Duroc oraz cechy związane z kolorem mięsa w rasie puławska. W genie *PNKD*, w którym analizie poddano dwie mutacje: typu *frameshift* czyli zmieniająca ramkę odczytu oraz drugą wpływającą na sens sekwencji aminokwasowej. Gen *PNKD* koduje hydrolazę, która współdziała z białkami MAPK3, ENO3, MYL12B, ILK i UBC, które kolejno zaangażowane są w regenerację i proliferację komórek mięśniowych. Obie badane mutacje wykazały wpływ na cechy związane z parametrami tekstury wieprzowiny, gdzie najwyższe różnice między osobnikami o innych genotypach zaobserwowano w rasie puławska. W genie *TNS1* kodującym tensynę 1 analizie poddana została 1 mutacja, zmieniająca sens aminokwasowy ENSSSCP 0000 00 26158.3: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). Kolejno, 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 *TNP1*, choć głównie badane w kontekście męskiej niepłodności, jednak wykazano także, że jego ekspresję 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 i powodowała zamianę - alaninę na serynę w pozycji 1785, sekwencji kodującej immunoglobulino podobną domenę. Białko obskurno podobne 1 (*OBSL1*) należy do adaptorów białkowych, odgrywających ważną funkcję w łączeniu cytoszkieletu komórkowego z błoną komórkową (Pernigo et al. 2010).

Tab. 1. Mutacje wybrane do analizy asocjacyjnej

ID Number	Pozycja na SSC15	Allel referencyjny	Allel zmieniony	Lokalizacja w genie lub wpływ na białko	Gen
rs693217735	119635224-119635254	INS 31bp	-	Intron variant	ENSSSCG00000033265 (<i>lincRNA</i>)
rs790770289	119332342-119332357	INS 16 bp	-	Intergenic region	<i>TNP1</i> - ENSSSCG00000040247
rs332253419	120476956	A	T	Missense variant	<i>VIL1</i>
rs344208061	119997161	C	T	Missense variant	ENSSSCG00000027669 (<i>TNS1</i>)
rs332398561	121561483	C	A	Missense variant	<i>OBSL1</i>
rs693217735	119635224-119635254	INS 31bp	-	Intron variant	ENSSSCG00000033265 (<i>lincRNA</i>)
rs790770289	119332342-119332357	INS 16bp	-	Intergenic region	<i>TNP1</i> - ENSSSCG00000040247
rs332253419	120476956	A	T	Missense variant	<i>VIL1</i>
rs344208061	119997161	C	T	Missense variant	ENSSSCG00000027669 (<i>TNS1</i>)
rs332398561	121561483	C	A	Missense variant	<i>OBSL1</i>

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



Zadanie 04-18-04-21

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 ilościowego oznaczania surowych i zliofilizowanych owadów. Etap obejmował opracowanie metod ilościowej identyfikacji mącznika młynarka oraz jakościowo-ilościowego oznaczania owadów bez względu na gatunek

Materiał i metody

1. Materiał doświadczalny:

- mączniki, świerszcze (kubański, bananowy), drewnojad, szarańcza wędrowna, karaczan argentyński,
- mięsa bydlęcego, wieprzowego, kurzego, indyczego, ryby, cytryny, banana, muchy, zło-
took, pomidora, ziarna,
- przetworzone produkty zawierające w swoim składzie owady różnych gatunków.

2. Układ doświadczenia:

- a. opracowanie metody oznaczania ilościowego DNA mączników. Badania wykonano wg 7 krzywych standardowych, których DNA pochodziło od różnych osobników lub mieszaniny tych osobników,
- b. opracowanie metody oznaczania jakościowo-ilościowego DNA owadów. W obu przypadkach stosowano reakcje real-time PCR wykorzystującą startery specyficzne gatunkowo oraz sondę Tamra,
- c. walidacja metody.

Badania obejmowały:

- a. wykonanie izolacji DNA zestawem Sherlock (A&A Biotechnology) wg zmodyfikowanej metody,
- b. reakcję real-time PCR,
- c. określenie linii odcięcia i wyznaczenie wartości C_t ,
- d. ustalenie specyficzności biologicznej czyli zgodność wyniku negatywnego z rzeczywistością,
- e. czułości czyli zgodność wyniku pozytywnego z rzeczywistością.

Metoda jest specyficzna gatunkowo, żadne reakcje krzyżowe nie dały produktu reakcji (np. świerszcz kubański, bananowy lub karaczan argentyński) lub wartość stężenia wynosiła 0,00 (np. drewnojad). Tylko w nielicznych przypadkach wartości te mieściły się w zakresie (0,00-0,12), lecz za każdym razem reakcja zachodziła później niż KN (kontrola negatywna). Taki wynik świadczy, że nie każda krzywa standardowa nadaje się do wyznaczania ilościowego.

Dla komercyjnych produktów przetworzonych, brak mącznika młynarka w produkcie był zgodny z deklaracją producenta. We wszystkich tego typu próbkach, zawartość tego gatunku była oznaczona jako 0,00 lub miała wartość niewielką – poniżej 1% – co może sugerować artefakt na linii produkcyjnej.

W przypadku próbek pozytywnych wyniki we wszystkich przypadkach były zgodne z deklaracją producenta w sensie jakościowym. Natomiast oznaczona ilość mączników znacznie odbiegała od deklaracji. Do oznaczania ilościowego najlepiej sprawdzają się krzywe II, IV i VI. Tylko w tych przypadkach, rząd wielkości ilości deklarowanej i oznaczonej był taki sam. Dla pozostałych krzywych dokładność oznaczenia była zbyt niska. Dla czystych mączników była bardzo wysoka, niejednokrotnie powyżej 100%, dla mniejszej zawartości mącznika najlepsze dopasowanie było przy zastosowaniu krzywych jak poprzednio IV i VI. Różnice między deklaracją producenta a otrzymanymi wynikami jest uzależniona nie tylko od faktycznych różnic, ale również od dużych różnic między reaktywnością poszczególnych osobników.

Wnioski

1. Metoda jest specyficzna biologicznie. Dokładność metody wynosi 100%. Przesunięcie (Y-inter) jest między 32-39. Wszystkie krzywe standardowe są liniowe: slope - 3,31-3,58, R^2 : 0,98-1. Efektywność reakcji: 96-101%.
2. Oznaczania ilościowe są możliwe, chociaż obarczone dużym błędem.

Tab. 2. Krzywe standardowe

Numer krzywej	Parametry
I	<u>Target:</u> macznik WING (1) <u>Slope:</u> -3.687 <u>Y-Inter:</u> 37.865 <u>R²:</u> 1 <u>Eff%:</u> 86.75
II	<u>Target:</u> macznik WING (2) <u>Slope:</u> -3.38 <u>Y-Inter:</u> 32.998 <u>R²:</u> 1 <u>Eff%:</u> 97.64
III	<u>Target:</u> macznik WING (3) <u>Slope:</u> -3.312 <u>Y-Inter:</u> 39.84 <u>R²:</u> 0.984 <u>Eff%:</u> 100.437
IV	<u>Target:</u> krzywa3-macznik WING <u>Slope:</u> -3.334 <u>Y-Inter:</u> 38.678 <u>R²:</u> 0.996 <u>Eff%:</u> 99.511
V	<u>Target:</u> krzywa2-macznik WING <u>Slope:</u> -3.406 <u>Y-Inter:</u> 36.445 <u>R²:</u> 0.999 <u>Eff%:</u> 96.611
VII	<u>Target:</u> krzywa1-macznik WING <u>Slope:</u> -3.582 <u>Y-Inter:</u> 33.606 <u>R²:</u> 0.998 <u>Eff%:</u> 90.201
VII	<u>Target:</u> macznik WING <u>Slope:</u> -3.34 <u>Y-Inter:</u> 38.054 <u>R²:</u> 0.506 <u>Eff%:</u> 99.243

Zadanie 04-18-05-11

Markery genetyczne przydatne w selekcji ukierunkowanej na doskonalenie mięsności gęsi

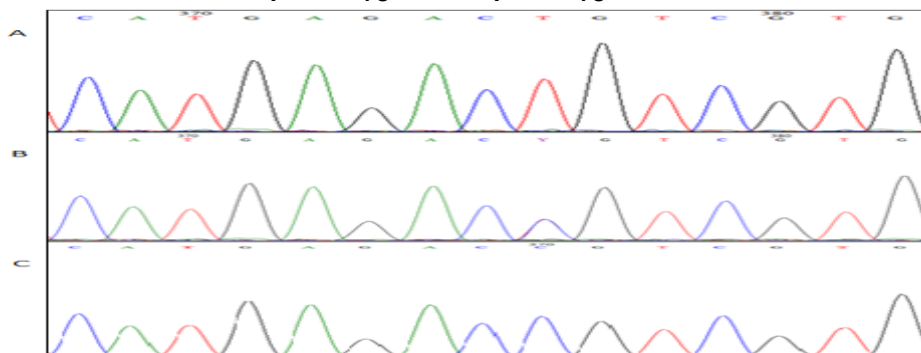
Kierownik zadania: dr hab. Anna Kozubska-Sobocińska, prof. IZ PIB

Celem zadania była identyfikacja polimorfizmu w *loci* wybranych genów związanych z mięsnością gęsi oraz określenie związku wariantów polimorficznych z cechami użytkowości mięsnej (wyrażonej: masą ciała, głębokością mięśnia klatki piersiowej, długością grzebienia mostka, długością przedramienia oraz tempem przyrostu masy ciała, a kontrolowanej w 8., 12. oraz 95. tygodniu życia).

Do badań wybrano trzy rasy gęsi: gęś kielecką, Landes oraz gęś Biała Kołudzka®, z których dwie (kielecka i Landes) znacznie różnią się parametrami umięśnienia i masą ciała oraz charakteryzują się dużą zmiennością wewnątrz rasową tych cech, natomiast trzecia rasa – Gęś Biała Kołudzka® jest selekcyjonowana w kierunku doskonalenia cech mięsnych.

W ramach badań polimorfizmu genów warunkujących umięśnienie oraz jakość mięsa, analizie poddano gen miostyliny (MSTN), w którym nie wykazano mutacji w eksonie 1. i 2., natomiast zidentyfikowano mutację c.1231C>T w eksonie 3., której efektem jest występowanie dwóch *alleli* C i T (Ryc. 1). Polimorfizm ten znajduje się poza regionem kodującym białko, 3 pz za CDS w rejonie 3'UTR, a region ten odpowiedzialny jest za kontrolę translacji. Otrzymaną sekwencję eksonu 3. zdeponowano w GenBanku.

Ryc. 1. Chromatorgram fragmentu genu *MSTN*- ekson 3. – polimorfizm c.1231C→T. A) Homozygota TT, B) Heterozygota C/T, C) Homozygota CC

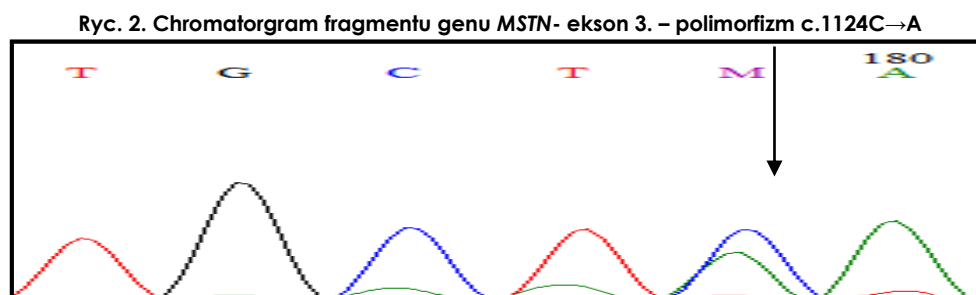


U badanych ras gęsi określono częstość *alleli* i genotypów determinowanych mutacją c.1231C→T w eksonie 3. genu miostatyny (Tab. 1).

Tab. 1. Częstość *alleli* i genotypów z polimorfizmem c.1231C→T w eksonie 3. genu *MSTN* u gęsi rasy Landes, kielecka i Biała Kołudzka®. HWE- Hardy Weinberg Equilibrium

Rasa/liczba osobników	Genotyp / liczba osobników			Allele		HWE
	CC	CT	TT	C	T	
Landes/137	0.292/40	0.496/68	0.212/29	0.54	0.46	0.39
kielecka/109	0.248/27	0.458/50	0.294/32	0.477	0.523	0.99
kołudzka/94	0,415/39	0,51/48	0,075/7	0,67	0,33	0,13

W analizach sekwencji zidentyfikowano kolejny polimorfizm w genie miostatyny, również w eksonie 3. c.1124 C→A. (Ryc. 2). Wykryty SNP w tym genie nie został poddany analizie ze względu na małą liczbę osobników o takim genotypie.



Kolejne analizy dotyczyły genu hormonu wzrostu (GH) i ujawniły w eksonie 2. polimorfizm SNP c.128C→T, który powodował zamianę aminokwasu waliny na alaninę. Polimorfizm ten wystąpił u gęsi kieleckich i Landes w formie homozygotycznej TT^{GH}.

W toku dalszych badań, zidentyfikowano dwa polimorfizmy g.240108A>G oraz g.240247 A>G. Polimorfizm ten wystąpił u dwóch gęsi kieleckich.

Analizie poddano również 6. i 7. ekson genu kalpastatyny CAST, lecz nie zidentyfikowano w tych fragmentach żadnych mutacji typu SNP.

W kolejnej części doświadczenia, pomiary użyteczności mięsnej rejestrowane u gęsi rasy kieleckiej i Landes pogrupowano uwzględniając czynnik genotypu i płci. Tak uporządkowane dane wykorzystano do badań asocjacji między poszczególnymi genotypami a cechami produkcyjnymi (Tab. 2, Ryc. 3).

Tab. 2. Średnie wyniki pomiarów masy ciała w 95 tygodniu życia przy uwzględnieniu genotypu, płci, rasy u gęsi Landes i kieleckich

Genotyp	Płeć	Rasa	Masa ciała w wieku 95 tyg. (g)	std	Liczba osobników	Min. (g)	Maks. (g)
CC	F	kielecka	4445,83	288,96	24	3935	5070
CC	F	Landes	6152,07	697,30	29	4260	7945
CC	M	kielecka	4905,00	747,51	3	4160	5655
CC	M	Landes	5775,91	450,91	11	5145	6425
CT	F	kielecka	4580,91	518,87	33	3555	5695
CT	F	Landes	6345,31	624,74	49	5340	8260
CT	M	kielecka	4672,65	405,46	17	3940	5400
CT	M	Landes	5968,16	469,31	19	5275	6870
TT	F	kielecka	4489,00	383,24	25	3890	5265
TT	F	Landes	6190,68	972,97	22	4445	9085
TT	M	kielecka	4658,57	466,57	7	4250	5625
TT	M	Landes	6236,43	721,51	7	5520	7430

Asocjacje pomiędzy analizowanymi cechami a zidentyfikowanym polimorfizmem SNP szacowano przy użyciu modelu GLM i testu wielokrotnego Duncana. Różnice między rasami, z uwzględnieniem płci i genotypu, określano zgodnie z modelem:

$Y_{ijkl} = a_i + b_j + c_k$, gdzie: a_i = rasa (i = kielecka, Landes), b_j = płeć (j = samiec, samica), c_k = genotyp (k = CC, CT, TT).

Równowagę Hardy'ego-Weinberga oszacowano za pomocą kalkulatora Court Lab - HW Michael H. Court (2005-2008).

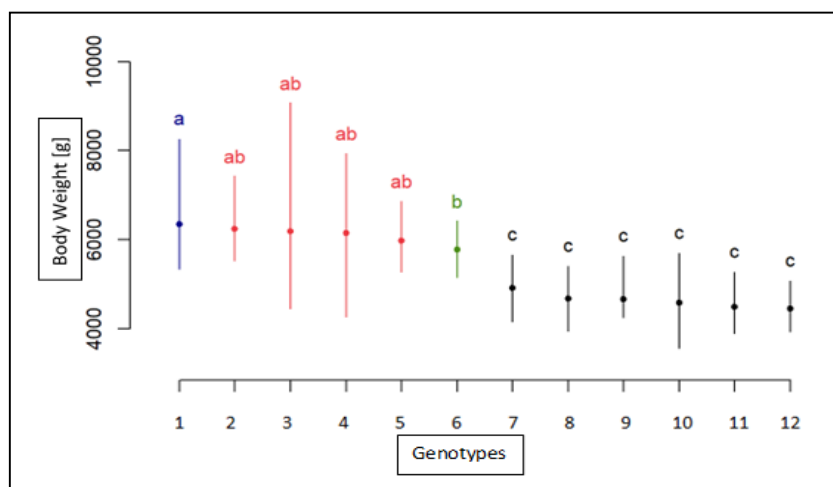
Analizy asocjacyjne, dotyczące wpływu mutacji c.1231C>T SNP w genie *MSTN* na oceniane przyżyciowo cechy użytkowości mięsnej, przeprowadzone w stadach gęsi Landes i kieleckiej, wykazały istotne różnice ($P \leq 0.05$) pomiędzy rasami. Różnice te wynikają ze specyfiki obu ras, natomiast w obrębie każdej rasy zauważono także wyraźną zmienność związaną z płcią. Nie wykazano jednak związku między konkretnym genotypem a pomiarem masy ciała w 8. tygodniu życia.

W wieku 12 tygodni najwyższe wartości masy ciała wykazano u gęsiórow Landes, a najniższe odnotowano u gęsi kieleckich (samic). Te dwie grupy różniły się na poziomie statystycznej istotności ($p < 0.05$). W obu grupach nie stwierdzono jednak związku między masą ciała w wieku 12 tygodni a genotypem w *locus MSTN*.

Analizując wyniki masy ciała w 95. tygodniu (Tab. 9, Rys. 8) zauważono statystycznie istotną różnicę pomiędzy rasami Landes i kielecką ($p < 0.05$), jak również pomiędzy samicami Landes o genotypie CT^{MSTN} a samcami tej rasy o genotypie CC^{MSTN} ($p < 0.05$). Wykazano, że gęsiory rasy kieleckiej o genotypie CC^{MSTN} oraz gęsi rasy Landes o genotypie TT^{MSTN} w wieku 95 tygodni osiągały większą masę ciała, co wynikało z wielkości przyrostów dobowych (Tab. 2, Ryc. 3).

Polimorfizm c.1231C>T SNP w genie *MSTN* został powiązany także z długością skrzydła w 12. tygodniu. Samce gęsi rasy Landes o genotypach TT^{MSTN} i CT^{MSTN} cechowały się dłuższym skrzydłem od samców Landes o genotypie CC^{MSTN} .

Ryc. 3. Statystyczna charakterystyka asocjacji polimorfizmu c.1231C>T z masą ciała w wieku 95 tygodni u obu ras gęsi: 1 – CC (samice) kielecka; 2 – CC (samice) Landes; 3 – CC (samce) kielecka; 4 – CC (samce) Landes; 5 – CT (samice) kielecka; 6 – CT (samice) Landes; 7 – CT (samce) kielecka; 8 – CT (samce) Landes; 9 – TT (samice) kielecka; 10 – TT (samice) Landes; 11 TT (samce) kielecka; 12 – TT(samce) Landes. Genotypy o różnych, górnych wskaźnikach, wykazują znaczne różnice między grupami (np. a, b p≤0,05)



Polimorfizm w *locus MSTN* może być jednym z istotnych czynników dla poprawy cech mięsnych u badanych ras gęsi, dlatego też aby dokładniej oszacować wpływ identyfikowanych mutacji na mięsność, niezbędne jest prowadzenie dalszych badań na większych populacjach rodzimych ras gęsi oraz przy uwzględnieniu większej liczby parametrów określających użytkowość mięsną. Stosowne wydaje się uwzględnienie w ocenie użytkowości nie tylko cech oceny przyżyciowej, ale również parametrów oceny poubojowej dotyczącej jakości tuszki i mięsa gęsi, oceny proteomicznej mięśni czy też analizy ekspresji badanych genów w różnych tkankach. Zastosowanie tak precyzyjnych mierników określających zarówno cechy jakościowe, jak i ilościowe umożliwi rzetelne poszukiwanie asocjacji z konkretnymi genotypami.

Wyniki otrzymane w prezentowanym zadaniu potwierdzają potrzebę analizy wykrytych już polimorfizmów u kolejnych ras gęsi oraz próbę ich asocjacji z cechami produkcyjnymi.

Opracowanie pakietu markerów genetycznych, przydatnych w selekcji ukierunkowanej na doskonalenie mięsności gęsi wymaga uwzględnienia w analizach asocjacyjnych kolejnych genów, których wpływ na cechy użytkowości mięsnej został już potwierdzony u innych gatunków zwierząt.

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 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 mezodermi (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 ogrywa 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. Co więcej, w przypadku zwierząt hodowlanych będą dodatkowym źródłem wiedzy dla analiz genetycznych zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów ekspresji genu i procesów, w wyniku których kształtowane są dziedziczne cechy użytkowe.

W ramach realizacji zadania pozyskano poubojowo tkanki mięśnia sercowego, płuc, wątroby oraz 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 24 h 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 doprowadziło do degradacji RNA w pobranych tkankach. Podjęte próby izolacji wysokocząsteczkowego RNA niezbędnego do analiz transkryptomu i metylacji RNA zakończyły się niepowodzeniem, większość z otrzymanych izolatów wykazała wskaźnik integralności RNA-RIN na poziomie niższym niż 5. Zdegradowane RNA nie mogło być wykorzystane w dalszych etapach analiz, w związku z czym zaplanowano kolejne pobranie prób. W 2019 roku pozyskano nowe próby tkanki mięśnia sercowego, płuc, wątroby od 10 koni w typie zimnokrwistym. Nie udało się uzyskać tkanki chrząstnej. Z pobranego materiału wyizolowano całkowite RNA oraz RNA wraz z frakcją mikroRNA z wykorzystaniem metody Chomczyńskiego (trizolową) oraz komercyjnych zestawów PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) i Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) (wskaźnik integralności RNA (RIN) w zakresie od 6,9 do 8,9). Dodatkowo przeprowadzono izolację DNA (Sherlock AX - A&A Biotechnology), a uzyskane próby końskiego DNA poddano konwersji bisulfitowej z zastosowaniem zestawu EpiTect Bisulfite Kit firmy Qiagen. Procedurę przeprowadzono według zaleceń producenta. Do analizy transkryptomu tkanki wątroby, serca oraz płuc wytypowano 4 osobniki, dla których uzyskano izolaty RNA charakteryzujące się wskaźnikiem RIN powyżej 7. Biblioteki cDNA przygotowano z użyciem komercyjnego zestawu firmy Illumina, TruSeq RNA Sample Prep Kit v2, zgodnie z zaleceniami producenta. Próby RNA posłużyły również do przygotowania bibliotek dedykowanych do analiz poziomu metylacji RNA. W tym celu wykorzystano komercyjny zestaw EpiNext 5-mC RNA Bisulfite-Seq Kit (EpiGenetek). Mimo zastosowania izolatów RNA uzyskanych różnymi metodami izolacji, dodatkowego doczyszczania RNA na kulkach magnetycznych RNeasy Clean XP (Beckman Coulter) oraz zastosowania modyfikacji metodycznych, z 12 planowanych bibliotek udało się uzyskać pięć. Dlatego podjęto decyzję o przygotowaniu dodatkowych bibliotek typu RRBS, w celu określenia tkankowo-specyficznych wzorów metylacji DNA. W tym celu wykorzystano komercyjny zestaw Ovation® RRBS Methyl-Seq System 1-16 (NuGen). Ocenę jakościową uzyskanych bibliotek cDNA, RRBS oraz 5-mC RNA, przeprowadzono z użyciem aparatu TapeStation, natomiast ocenę ilościową wykonano metodą fluorymetryczną na aparacie Qubit. Biblioteki doprowadzono do koncentracji 4 nM i połączono w 3 pule w zależności od sekwencji przyłączonego indexu i typu bibliotek. Sekwencjonowanie bibliotek cDNA oraz 5-mC RNA przeprowadzono na urządzeniu HiSeq 4000 (Illumina), stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 150 nukleotydów. Biblioteki typu RRBS zsekwencjonowano z dodatkiem kontrolnego DNA (PhiX) na urządzeniu NextSeq 500 również stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 75 nukleotydów. Parametry sekwencjonowania uwzględniały automatyczne mapowanie odczytów pochodzących z DNA wirusa PhiX, w celu kontroli jakości otrzymywanych wyników w czasie rzeczywistym. Otrzymane po sekwencjonowaniu następnej generacji dane, poddano obróbce bioinformatycznej. W pierwszym etapie analizy odczyty poddano ocenie jakościowej z wykorzystaniem oprogramowania FastQC. Niskiej jakości sekwencje i fragmenty odczytów, zawierające sekwencje adapterów, poddano filtrowaniu, z wykorzystaniem oprogramowania Flexbar w przypadku bibliotek cDNA i 5-mC RNA oraz oprogramowania TRIM GALORE w przypadku bibliotek RRBS, który dodatkowo usunął również miejsca cięcia enzymu MspI. Po filtrowaniu, odczyty

zmapowano względem genomu referencyjnego konia (EquCab3.0) z wykorzystaniem programowania BSMAP (biblioteki RRBS) oraz TOPHAT (biblioteki cDNA).

W kolejnym etapie analizy, otrzymane wyniki wykorzystane będą do identyfikacji regionów o różnicowym poziomie metylacji DNA i RNA oraz genów o różnicowej ekspresji, pomiędzy trzema grupami tkanek: sercem, płucem i wątrobą.

Tab. 1. Dane sekwencyjne uzyskane z sekwencjonowania bibliotek cDNA

Próbka*	Liczba surowych odczytów	Liczba odczytów po filtrowaniu	Procent zgodnego dopasowania (%)	Liczba zmapowanych odczytów
27p	28154628	27876904	77.2	10904947
27s	71984234	71103730	84.4	30143078
27w	39003374	38586508	79.8	15555932
30p	46390992	46073230	81.7	18934467
30s	43216734	42899122	74.9	16187739
30w	53314756	52668726	78.7	20916543
32p	69630116	69216228	83.0	28823659
32s	20916112	20463708	75.8	7833313
32w	42153108	41946430	82.1	17286141
34p	60150054	59606266	80.1	24065592
34s	72876508	71819382	76.9	27782097
34w	13366172	12983470	77.5	5076382

Tab. 2. Dane sekwencyjne uzyskane z sekwencjonowania bibliotek RRBS

Próbka*	Liczba surowych odczytów	Odczyty usunięte z powodu długości krótszej niż 36 pb	Liczba analizowanych par zasad	Liczba par zasad po „trimingu”
27p	26898305	2124394	2,037,893,967	1,655,049,942
27s	23451239	723479	1,777,424,667	1,591,872,372
27w	23410197	790522	1,774,127,847	1,576,956,823
30p	29381134	2462053	2,226,313,135	1,810,950,912
30s	24076001	1244676	1,824,695,475	1,566,390,043
30w	14253844	441113	1,081,321,121	932,741,611
32p	13789781	951476	1,045,039,834	865,740,167
32s	14275834	468613	1,082,005,461	963,765,446
32w	15138643	392124	1,110,401,320	982,411,355
34p	13222617	491513	1,002,240,984	892,466,975
34s	10393079	327700	787,650,222	709,453,130
34w	16940855	1091735	1,283,737,088	1,080,019,140

Tab. 3. Dane sekwencyjne uzyskane z sekwencjonowania bibliotek 5-mC RNA Bisulfite-Seq

Próbka	Liczba surowych odczytów	Średnie % Q30	Liczba odczytów po filtrowaniu
32s	140 974 451	41,12	131 785 546
32p	37 622 791	31,01	36 965 458
32w	105 559 094	36,76	103 546 821
34s	118 324 926	38,74	116 254 454
34w	109 507 194	37,61	106 658 214

*oznaczenie tkanek: s- serce, p-płuco, w-wątroba.

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 genomiczna z zastosowaniem NGS (Next Generation Sequencing)

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

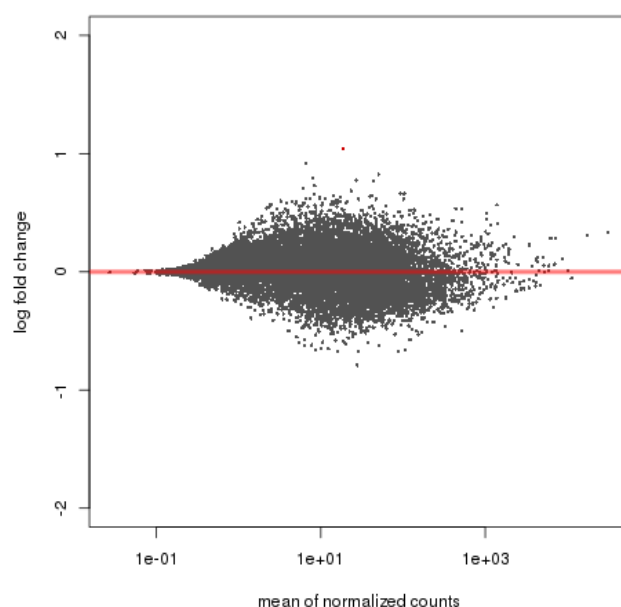
W 2019 roku przeprowadzono analizy zawartości witaminy D we krwi szczurów młodych, otrzymujących różne dawki witaminy D w paszy. Suplementacja okazała się skuteczna. Średnia zawartość witaminy D we krwi szczurów, otrzymujących najwyższą dawkę witaminy D (5000 j/Kg paszy) wynosiło 48 ng/ml, dawkę standardową (1000 j/kg paszy) – 26 ng/ml, a w grupie nieotrzymującej witaminy D wynosiło 13 ng/ml. Wartości te nie różniły się w zależności od płci zwierząt. Jednocześnie, badania biochemiczne krwi wykazały istotne różnice w zawartości cholesterolu całkowitego w zależności od dawki u samców. U osobników męskich, otrzymujących dawkę standardową i wysoką witaminy D, obserwowano wzrost zawartości cholesterolu całkowitego we krwi, w porównaniu do osobników, które nie otrzymywały witaminy D w paszy (Tab. 1).

Tab. 1. Wpływ suplementacji witaminą D na zawartość lipoprotein w serum młodych szczurów

Item	TC (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)		LDL-C (mg/dL)		TG (mg/dL)		HDL-C/ TC		HDL-C/ TG	
Vitamin D ₃ level, IU/kg	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0	69,0	54,6	38,1	28,5	30,9	26,1	58,1	68,0	0,55	0,51	0,68	0,45
1000	77,5	52,0	39,9	26,1	37,5	25,8	80,0	70,6	0,51	0,50	0,52	0,41
5000	75,0	53,3	37,8	28,0	37,2	25,3	76,6	71,8	0,49	0,51	0,50	0,40
Main effect means												
Vitamin D ₃ level (V):												
0	61,8		33,3		28,5		63,0		0,53		0,56	
1000	64,6		33,0		31,7		75,3		0,51		0,47	
5000	64,1		32,9		31,2		74,2		0,51		0,45	
SEM	2,87		2,08		1,531		6,16		0,018		0,049	
P value	0,841		0,871		0,296		0,141		0,513		0,238	
Sex (S):												
♂	73,8		38,6		35,2		71,6		0,52		0,57	
♀	53,3		27,5		25,7		70,1		0,51		0,42	
SEM	2,353		1,705		1,250		3,830		0,015		0,040	
P value	<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,791		0,691		0,014	
V×S, P value	0,025		0,441		0,191		0,033		0,616		0,565	

Zakończono przygotowywanie bibliotek do sekwencjonowania NGS oraz zsekwencjonowano próbki pochodzące z wątroby młodych szczurów. Wyniki uzyskane z tego sekwencjonowania sugerują niewielki wpływ suplementacji witaminą D na poziom ekspresji genów wątrobie jeśli chodzi o wielkość zmiany (fold change) (Fig. 1), jednak wydaje się być on istotny jeśli chodzi o liczbę genów z konkretnych ścieżek metabolicznych.

Fig. 1. Wykres zależności zmiany poziomu ekspresji genów od ilości znormalizowanych odczytów po analizie NGS



Analiza bioinformatyczna wykazała, że różnice w poziomie ekspresji pojedynczych genów pomiędzy grupami o różnych dawkach witaminy D były zbyt małe, aby osiągnąć próg istotności statystycznej ($p_{\text{adjusted}} > 0,05$). Niemniej jednak, analiza całych profili transkryptomicznych, oparta na nawet niewielkich zmianach ekspresji genów należących do tych samych szlaków metabolicznych (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) wykazała szereg zmienionych procesów biologicznych i szlaków metabolicznych w wątrobie (Fig. 2 i 3).

Fig. 2. Szlaki metaboliczne zmienione u osobników otrzymujących w diecie wysoką dawkę witaminy D, po analizie GSEA, na podstawie bazy KEGG

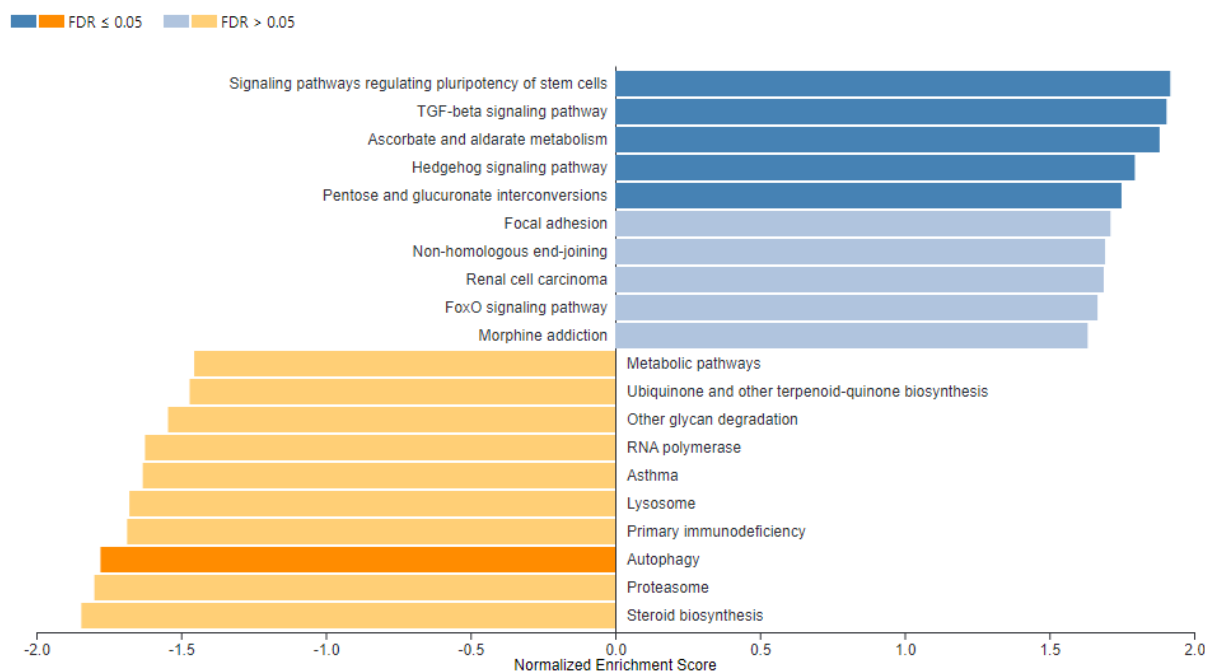
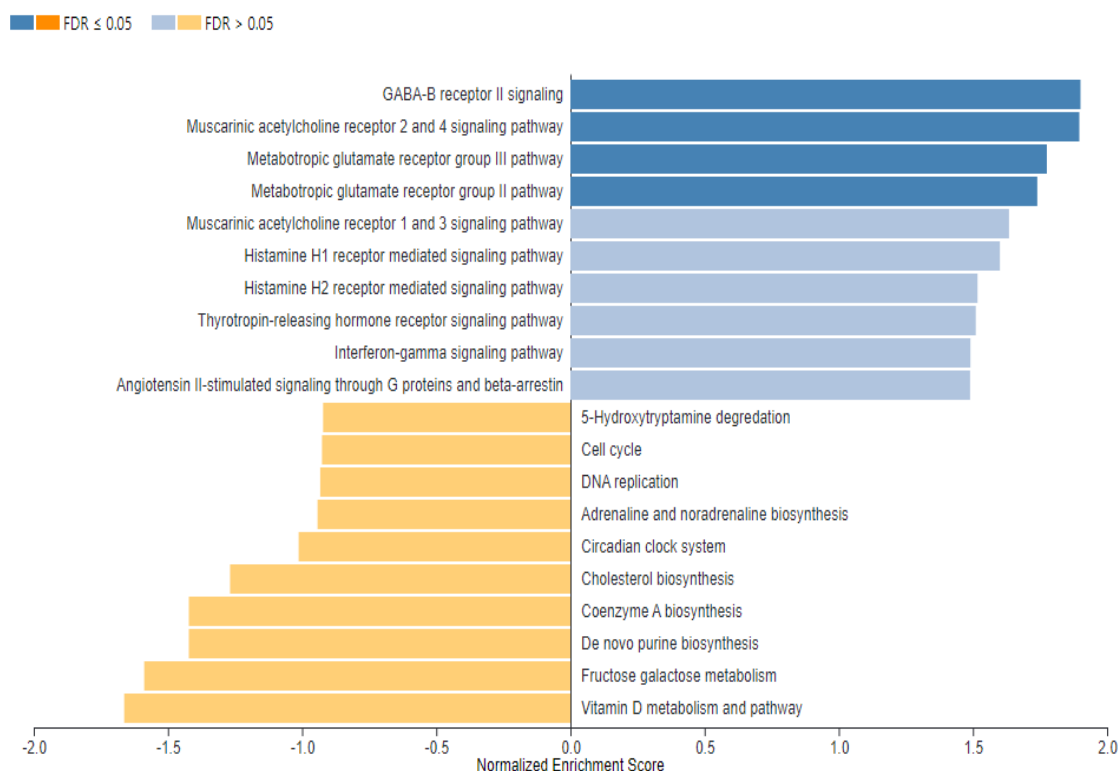


Fig. 3. Szlaki metaboliczne zmienione u osobników otrzymujących w diecie wysoką dawkę witaminy D, po analizie GSEA, na podstawie bazy Panther



Zaobserwowano między innymi aktywację „TGF beta signaling pathway” oraz GABA-B receptor II signaling pathway” oraz inaktywację „vitamin D metabolism and pathway” and „cholesterol biosynthesis”. Jednocześnie zaobserwowano istotne różnice w ekspresji genów pomiędzy samcami a samicami, a także zróżnicowanie odpowiedzi na suplementację w zależności od płci. Ze względu na zaskakująco słaby wpływ suplementacji witaminą D na profil transkryptomyczny przeprowadzono dodatkowe analizy metodą qPCR, która obecnie uważana jest za najbardziej dokładną metodę oceny ekspresji genów. Do analizy wybrano geny bezpośrednio zaangażowane w przemiany metaboliczne witaminy D oraz jej receptor: *VDR*, *CYP2R1*, *CYP27B*. Stwierdzono, że suplementacja witaminą D wpływa w niewielkim stopniu na ekspresję tych genów, a jeśli tak, to jest to wpływ zależny od płci, tzn. efekt suplementacji widoczny był jedynie u samców. Z kolei, zaobserwowano bardzo silny efekt płci na ekspresję *VDR* w wątrobie i *CYP27B1* w nerce. Samce charakteryzowały się około 10-krotnie niższą ekspresją genu *VDR* w wątrobie i około 5-krotnie niższą ekspresją genu *CYP27B1* w nerce niż samice. Sugeruje to odmienny przebieg metabolizmu witaminy D w organizmie samców i samic i może tłumaczyć odmienną odpowiedź na suplementację witaminą D, w zależności od płci.

Zakończono również część żywieniową doświadczenia II, przeprowadzonego na dorosłych szczurach. Po okresie suplementacji witaminą D, szczury poddane zostały anestezji i pobrano z nich narządy i organy do analiz. Z części materiału wyizolowano już RNA i przygotowano biblioteki do sekwencjonowania (NGS). Analiza zawartości witaminy D we krwi pokazała, że suplementacja była skuteczna. U osobników otrzymujących wysoką dawkę witaminy D (5000 j/kg paszy) wynosiła średnio 62 ng/ml, u osobników otrzymujących dawkę standardową (1000 j/kg paszy) wynosiła 44 ng/ml, a w grupie bez suplementacji wynosiła 25 ng/ml. Podobnie jak w przypadku osobników młodych, zaobserwowano istotne różnice w zawartości cholesterolu we krwi (Tab. 2). U samców otrzymujących dawkę standardową zawartość cholesterolu była istotnie wyższa niż u pozostałych grup. Podobnej zależności nie stwierdzono u samic.

Tab. 2. Parametry biochemiczne krwi u szczurów dojrziałych

Poziom wit. D3 (U/kg paszy)	Glukoza (mg/dl)		TC (mg/dl)		HDL (mg/dl)		LDL (mg/dl)		TG (mg/dl)		ALT (U/L)		AST (U/L)		ALP (U/L)		TP (g/dl)		Alb (g/dl)		Mocznik (mg/dl)		Kreatynina (mg/dl)		Kwas moczowy (mg/dl)		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
0																											
100	297	188	73,16	86,33	52,86	62,50	20,30	18,83	83,33	149,5	48,50	30,00	136,03	101,01	96,00	83,00	6,53	7,27	3,96	4,71	40,20	30,56	0,708	0,546	3,10	2,38	
0	290	155	86,66	81,50	64,18	63,75	24,31	17,75	109,00	109,66	51,66	34,00	179,21	107,86	109,00	72,66	7,11	7,43	4,26	4,68	35,40	30,28	0,610	0,548	3,96	1,93	
500	223	147	71,83	67,33	53,93	51,48	17,90	15,85	110,16	110,66	52,83	34,50	151,03	120,63	77,83	98,00	6,82	6,67	4,06	4,12	29,56	29,36	0,590	0,510	4,25	1,94	
0																											
Istość efektów głównych i interakcji																											
Poziom wit. D3 (W): 0 1000 5000	243		77,25 ^{ab}		57,68 ^{ab}		19,56		116,41		39,25		118,52		89,50		6,90		4,34		35,38		0,627		2,74		
	222		85,00 ^b		63,96 ^b		21,03		109,33		42,83		143,54		90,83		7,27		4,47		32,84		0,579		2,95		
	185		69,58 ^a		52,70 ^a		16,87		110,41		43,66		135,83		87,91		6,74		4,09		29,46		0,550		3,09		
	0,057		0,026		0,030		0,113		0,970		0,830		0,546		0,988		0,193		0,140		0,128		0,057		0,883		
Płeć (P): ♂ ♀	270,27		77,83		56,99		20,83		100,83		51,00		155,42		94,27		6,82		4,09		35,05		0,636		3,77		
	163,66		76,72		59,24		17,47		123,27		32,83		109,83		84,55		7,12		4,50		30,07		0,535		2,08		
Wartość P	<0,001		0,802		0,498		0,043		0,387		0,006		0,021		0,543		0,213		0,012		0,039		<0,001		0,006		
SEM																											
Interakcja WxP	0,456		0,334		0,288		0,371		0,289		0,998		0,627		0,353		0,316		0,203		0,265		0,248		0,497		
Wartość P																											

Zadanie 04-18-13-21

Analiza proteomiczna mięsa wieprzowego i wołowego w odniesieniu do jego parametrów jakości

Kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Celem zadania jest identyfikacja różnic w profilu białkowym pomiędzy próbkami mięsa pochodzącymi od świń ras charakteryzujących się różną jakością mięsa (puławska, wbp lub pbz), a także pomiędzy próbkami mięsa pochodzącymi od bydła ras Limousine, mieszańców PHF, ZB oraz analiza ich związków z parametrami jakości mięsa.

Etap realizacji badań

Pozyskanie próbek mięsa oraz ich ocena jakościowa. Optymalizacja metod badawczych – wstępne analizy proteomiczne.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie

W pierwszym etapie realizacji zadania pt. „Analiza proteomiczna mięsa wieprzowego i wołowego w odniesieniu do jego parametrów jakości” pozyskano materiał w postaci fragmentów tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu – *Longissimus dorsi* pobrane od dwóch ras świń: puławska (10 sztuk) oraz polska biała zwistoucha (10 sztuk) w okresach: 45 min. po uboju, 24 h oraz 48 h po uboju.

Próbki mięsa zostały poddane ocenie stacyjnej wg metodyki, a analiza parametrów jakości mięsa wieprzowego obejmowała:

- wodochłonność mięsa,
- parametry barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$:
- intensywność barwy mięsa:
 - a - wysycenie barwy mięsa w odcieniu czerwieni,
 - b - wysycenie barwy mięsa w odcieniu żółtym,
 - L - jasność,
- pH mięsa,
- zawartość tłuszczu śródmięśniowego [%],
- analiza parametrów tekstury (test siły cięcia Warner-Bratzler i profilowa analiza tekstury (ang. TPA – Texture Profile Analysis),
- analiza przewodnictwa mięsa.

Wyniki z analiz parametrów jakości mięsa wołowego zostały zebrane i skatalogowane. Próbki zostały zabezpieczone i przygotowane do analiz proteomicznych. Pobrano również materiał w postaci fragmentów tkanki pobranej z mięśnia najdłuższego grzbietu – *Longissimus dorsi* od 4 sztuk bydła w okresach 48 h po uboju, 5 dniach oraz 10 dniach. Próbki zabezpieczono i przygotowano do dalszych analiz proteomicznych.

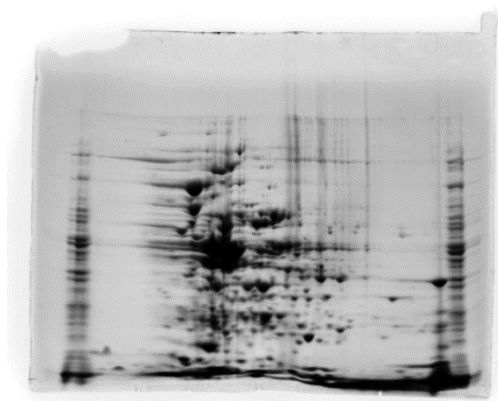
Ocena jakości mięsa uwzględniała pomiar pH:

- analiza tekstury metodą WBS oraz TPA,
- pomiar barwy mięsa (L^* , b^* , a^*),
- ubytki masy w czasie obróbki cieplnej,
- ocena organoleptyczna mięsa po obróbce cieplnej.

Wyniki z analiz parametrów jakości mięsa wołowego zostały zebrane i skatalogowane. Próbkę została zabezpieczona i przygotowana do analiz proteomicznych. Stworzono i wyposażono pracownię proteomiki. Zostały również przeprowadzone wstępne analizy proteomiczne, mające na celu opracowanie metodyki, jak również jej zoptymalizowanie w celu otrzymania wiarygodnych wyników.

Przeprowadzono izolację białek przy użyciu RIPA buffer oraz Tissue Extraction Reagent I. Obie metody dają możliwość wyizolowania wszystkich białek występujących w tkance, stąd niezbędne jest ich porównanie w celu wytypowania metody, dającej najlepszą jakość wyizolowanych białek, jak również największe ich stężenie. Wykonano pierwsze rozdziały 2D w celu optymalizacji metody.

Fot. 1. Zdjęcie żelu 2D wybarwionego barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250



Zadanie 04-18-14-21

Charakterystyka epigenetyczna genomu komórek chrzęstnych gatunku *E. caballus* w warunkach *in vitro* związanych z procesami starzenia

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

Celem pracy była analiza metylacji genomu komórek chrzęstnych, pochodzących z różnych pasażów komórkowych, której wyniki będą odzwierciedleniem epigenetycznych zmian towarzyszących starzeniu się chondrocytów w warunkach *in vitro*.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie

Wykonano porównawczą analizę metylacji DNA w skali genomu pomiędzy wczesnymi i późnymi pasażami komórek chrzęstnych, pozyskanych z wycinków powierzchni stawu pęcinowego koni. Linie chondrocytów wyprowadzono w poprzednim projekcie w warunkach jednowarstwowej hodowli 2D. Przygotowano biblioteki RRBS (matryca genomowego DNA trawionego enzymem MspI, poddanego konwersji bisulfitowej), które poddano sekwencjonowaniu w skali genomu na aparacie Nextseq 550 (Illumina). Bioinformatyczna analiza odczytów sekwencjonowania bibliotek RRBS wykazała obecność 3760 miejsc o różnicowej metylacji (DMS) pomiędzy wczesnymi i późnymi liniami chondrocytów, spośród których 1454 DMS były obecne w regionach kodujących genomu konia. Spadek metylacji na wcześniejszym etapie hodowli chondrocytów w warunkach *in vitro* zaobserwowano w miejscach DMS związanych z występowaniem 597 genów, natomiast wzrost metylacji w przypadku DMS związanych z 772 jednostkami transkrypcyjnymi. Geny związane z występowaniem miejsc o różnicowej metylacji w analizowanym układzie biologicznym, są głównie zaangażowane w procesy kontaktu, migracji

i przylegania komórek, procesy apoptozy oraz procesy zmian typowych dla komórek fibroblastycznych. Część z tych genów związana jest również z procesami różnicowania chondrocytów oraz rozwoju chrząstki stawowej.

Podsumowanie wyników

Wstępna obserwacja zmian na poziomie metylacji DNA w skali genomu w analizowanym układzie jednowarstwowej hodowli komórek chrzęstnych, wykazała obecność różnic w profilu metylacji DNA między wczesnymi i późnymi pasażami chondrocytów, które mogą mieć znaczenie funkcjonalne dla aktywności genów zaangażowanych w procesy różnicowania komórek chrzęstnych w warunkach *in vitro*.

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji p.o. Kierownika: prof. dr hab. Zdzisław Smorąg

Zadanie 01-19-01-21

Liofilizacja jako metoda długotrwałej konserwacji nasienia knura

Kierownik zadania: dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB

Celem badań było wykorzystanie liofilizacji do opracowania innowacyjnej metody konserwacji nasienia knura.

W 1. etapie poszukiwane były czynniki wpływające na efektywność procesu liofilizacji takie, jak: skład, pH i ciśnienie osmotyczne medium do liofilizacji nasienia, temperatura i czas hydratacji próbki nasienia oraz warunki przechowywania liofilizatu. Zastosowano takie media, jak: TRIS, TL-HEPES-PVA i glukozowo żółtkowy.

W 2. etapie przeprowadzono rehydratację liofilizowanego nasienia i oceniano ruchliwość pod mikroskopem. Uważa się, że nasienie poddane liofilizacji i rehydratacji z reguły nie wykazuje cech ruchliwości, czyli w konwencjonalnym rozumieniu plemniki takie uważa się za martwe. W związku z tym, oprócz ruchliwości badano takie parametry, jak: stan chromatyny plemnikowej nasienia liofilizowanego w różnych mediach z dodatkiem lub bez antyoksydantów oraz przechowywanego w różnym czasie i różnej temperaturze.

W 3. etapie liofilizowane nasienie knura użyto do zapłodnienia *in vitro* metodą iniekcji plemnika do cytoplazmy oocyta (ICSI), celem oceny zdolności do zapłodnienia nasienia liofilizowanego w zmodyfikowanych mediach oraz przechowywanego w różnym czasie i różnej temperaturze. Uzyskane zygoty hodowano *in vitro* do stadium blastocysty, a uzyskane zarodki poddano kompleksowej ocenie jakości.

Założenia metodyczne

Nasienie wyselekcjonowanych knurów zamrażano w 3 różnych rozrzedzalnikach: TRIS, HEPES-PVA i glukozowo-żółtkowym. Liofilizację prowadzono przez 18 godzin w laboratoryjnym liofilizatorze, w temperaturze -20°C , pod zmniejszonym ciśnieniem wynoszącym 0,037 mBara. Próbkę liofilizowanego nasienia przechowywano w temperaturze $+20$, $+4$, -20 lub -80°C przez 7, 30, 90 lub 180 dni. Po tym czasie liofilizowane nasienie poddawano rehydratacji i oceniano jego ruchliwość pod mikroskopem oraz badano integralność błon plemników oraz stan chromatyny plemnikowej przy użyciu cytometru przepływowego. Uzyskane średnie wyniki uszkodzeń chromatyny nasienia liofilizowanego w 3 różnych rozrzedzalnikach, w zależności od czasu

i temperatury przechowywania, podano analizie statystycznej. Użyto testu Shapiro-Wilka, aby sprawdzić typ rozkładu jaki prezentują dane. Wynik testu potwierdził, że rozkład danych nie jest normalny, w związku z tym dalej korzystano z testu U Manna Whitneya.

Syntetyczny opis wyników

Warunkiem kwalifikacji nasienia do mrożenia była ruchliwość na poziomie min. 90%. Przed mrożeniem oceniono ejakulaty od 6 knurów, z których do liofilizacji wybrano 2. Wyniki stopnia uszkodzeń chromatyny w plemnikach knura 1 i 2 liofilizowanych w rozrzedzalnikach TL-HEPES-PVA, TRIS i glukozowo-żółtkowym przechowywanych w różnym czasie i różnej temperaturze są następujące:

Knur 1.

Najlepsze wyniki uzyskano dla rozrzedzalnika Tyrode-Hepes-PVA. Czynniki temperatury +20°C odstawał istotnie od 3 innych temperatur praktycznie w każdej badanej grupie. Istotne różnice dla czynnika czasu zaobserwowano w grupie 7 dni dla temperatury +20°C. Nasienie knura 1 najlepiej mrozić w temp. +4°C bądź -20°C (brak różnic statystycznych) na okres 30 dni.

Knur 2.

Najlepsze wyniki uzyskano dla rozrzedzalnika Tyrode-Hepes-PVA. Czynniki temperatura +20°C odstawał istotnie od 3 innych temperatur praktycznie w każdej badanej grupie. Biorąc pod uwagę parametr czasu, najlepsze wyniki zaobserwowano dla 90 dni. Nasienie knura 2 najlepiej mrozić w każdej temperaturze oprócz +20°C i na okres 90 dni.

Po rozmrożeniu próbek nasienia zamrożonego w 3 badanych rozrzedzalnikach powtórnie dokonywano oceny ruchliwości. Na podstawie wyników ruchliwości do drugiego etapu, czyli do liofilizacji z dodatkiem antyoksydantów, wybrano rozcieńczalnik TRIS ze względu na wysoce istotnie wyższy ($P < 0,001$) odsetek plemników ruchliwych.

Nasienie zamrażano w rozrzedzalniku TRIS z dodatkiem antyoksydantów (resweratrol i wit. E) lub bez (kontrola,) po czym poddawano je liofilizacji. Uzyskane liofilizaty przechowywano przez 7, 30, 90 lub 180 dni w temp. +20, +4, -20 i -80°C. Po rehydratacji nasienie poddawano ocenie ruchliwości pod mikroskopem oraz ocenie uszkodzeń chromatyny (metodą SCSA) za pomocą cytometru przepływowego.

Po poddaniu wyników uszkodzeń chromatyny analizie statystycznej otrzymano następujące informacje:

Liofilizowane nasienie knura 1:

- dla czasu przechowywania 7 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturach +20 oraz -80°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze 4°C (negatywny wpływ resweratrolu względem kontroli) oraz w temperaturze -20°C (negatywny wpływ resweratrolu i witaminy E względem kontroli),
- dla czasu przechowywania 30 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturze -80°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze 20°C (negatywny wpływ resweratrolu względem kontroli), w temperaturze 4°C (negatywny wpływ resweratrolu i witaminy E względem kontroli) oraz w temperaturze -20°C (negatywny wpływ resweratrolu względem kontroli i witaminy E),
- dla czasu przechowywania 90 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturach +20°C oraz -80°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze 4°C (negatywny wpływ resweratrolu względem kontroli) oraz w temperaturze -20°C (pozytywny wpływ witaminy E względem resweratrolu).

Liofilizowane nasienie knura 2:

- dla czasu przechowywania 7 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturach +4°C, -20°C oraz -80°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze 20°C (pozytywny wpływ resveratrolu względem kontroli),
- dla czasu przechowywania 30 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturach +4°C, -20°C oraz -80°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze 20°C. (pozytywny wpływ resveratrolu względem witaminy E),
- dla czasu przechowywania 90 dni zaobserwowano brak różnic w temperaturach +20°C, +4°C oraz -20°C, natomiast istotne statystycznie różnice stwierdzono w temperaturze -80°C (pozytywny wpływ witaminy E względem kontroli).

We wszystkich omawianych przypadkach, gdzie zaobserwowano różnice statystyczne, średnie uszkodzenia chromatyny nie przekraczają 4%.

Reasumując, trudno wnioskować o zasadności stosowania antyoksydantów dla danej temperatury czy czasu przechowywania gdyż diametralnie różne wyniki dla nasienia knura 1 i knura 2 świadczą o zdecydowanie osobniczej podatności nasienia na mrożenie czy liofilizację.

Wyniki oceny zdolności do zapłodnienia nasienia liofilizowanego

Porównaliśmy zdolność do zapłodnienia nasieniem świeżym knura dwoma technikami: ICSI oraz klasycznym zapłodnieniem w kropli (IVF). W klasycznym zapłodnieniu nie aktywujemy oocytów, w przeciwieństwie do zapłodnienia ICSI. Co ciekawe, nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku otrzymanych blastocyst tymi dwoma technikami. Porównaliśmy również efektywność zapłodnienia techniką ICSI nasieniem świeżym i rozmrożonym po liofilizacji, i co ciekawe, wykazano brak różnic statystycznych w odsetku uzyskanych blastocyst. W sytuacji, gdy porównano nasienie świeże z liofilizowanym przez 30 dni i 90 dni osobno również nie uzyskano różnic statystycznych w odsetku uzyskanych blastocyst. Uzyskano tylko różnice w obrębie nasienia liofilizowanego o różnym czasie przechowywania. Zdecydowano się na takie podejście z uwagi na wykazane statystycznie istotne różnice w uzysku blastocyst między oocytami świni zapłodnionymi metodą ICSI nasieniem liofilizowanym w TRIS-Hepes-PVA knura nr 1 i przechowywanym 30 lub 90 dni, w temp. 4°C. Badając poziom apoptozy i liczbę jąder komórkowych w blastocystach ekspandujących uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI nasieniem liofilizowanym i przechowywanym 30 lub 90 dni, w temp. 4°C wykazano wysoce statystycznie istotne różnice w liczbie jąder apoptotycznych na blastocystę.

Podsumowanie

- 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.
- Trudno wnioskować o zasadności stosowania antyoksydantów dla danej temperatury czy czasu przechowywania, gdyż diametralnie różne wyniki dla nasienia knura 1 i knura 2 świadczą o zdecydowanie osobniczej podatności nasienia na mrożenie czy liofilizację.
- Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku otrzymanych blastocyst techniką ICSI i klasycznym IVF.
- Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku otrzymanych blastocyst z zapłodnienia techniką ICSI nasieniem świeżym i rozmrożonym po liofilizacji w ujęciu całościowym (30 i 90 dni razem), jak i osobno - nasienie świeże z liofilizowanym przez 30 dni i 90 dni. Uzyskano tylko różnice w obrębie nasienia liofilizowanego o różnym czasie przechowywania.
- Wykazano wysoce statystycznie istotne różnice w liczbie jąder apoptotycznych w blastocystach ekspandujących uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI nasieniem liofilizowanym i przechowywanym 30 lub 90 dni, w temp. 4°C.

Zadanie 01-19-02-11

Zastosowanie hydrofilowych i hydrofobowych przeciwutleniaczy w kriokonserwacji nasienia knura

Kierownik zadania: dr Monika Trzcńska

Celem badań było określenie wpływu dodatku hydrofilowych i hydrofobowych przeciwutleniaczy do rozcieńczalnika mrożeniowego na jakość i zdolności zapładniające plemników knura.

Na potrzeby realizacji zadania przeprowadzono mrożenie nasienia w rozcieńczalniku z dodatkiem butylowanego hydroksytoluenu o stężeniu 1 mM oraz rozcieńczalniku z dodatkiem 2 mM resweratrolu. Do kriokonserwacji przeznaczono nasienie pochodzące od 8 knurów (4-5 ejakulatów/knur), które wykorzystano do zabiegów inseminacyjnych.

Ocena jakości mrożonego nasienia knura w rozcieńczalniku z dodatkiem 1 mM butylowanego hydroksytoluenu wykazała:

- kriooporność ejakulatów $78,8\% \pm 4,6$,
- średni odsetek plemników ruchliwych na poziomie $76,4\% \pm 4,8$,
- średni odsetek plemników żywych ocenianych przy zastosowaniu Dual Apoptosis Assay Kit $77,4\% \pm 5,3$,
- średni odsetek plemników apoptotycznych ocenianych YO-PRO1/PI wynoszący $6,9\% \pm 2,1$,
- średni odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym $77,7\% \pm 3,9$.

Ocena jakości mrożonego nasienia knura w rozcieńczalniku z dodatkiem 2mM resweratrolu wykazała:

- kriooporność ejakulatów $72,4\% \pm 4,2$,

- średni odsetek plemników ruchliwych na poziomie $72,1\% \pm 4,7$,
- średni odsetek plemników żywych ocenianych przy zastosowaniu Dual Apoptosis Assay Kit $72,8 \pm 3,2$,
- średni odsetek plemników apoptotycznych ocenianych YO-PRO1/PI wynoszący $8,9\% \pm 1,5$,
- średni odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym $71,4\% \pm 3,7$.

W celu określenia zdolności zapładniających kriokonserwowanego nasienia knura przeprowadzono próby biologiczne polegające na inseminacji 39 loszek różnych ras. Loszki inseminowano standardową metodą za pomocą katetera inseminacyjnego poza szyjkę macicy. Inseminację przeprowadzano u loszek z objawami rui 3-krotnie, w odstępach 12-godzinnych. Wyniki inseminacji przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Wyniki inseminacji loszek nasieniem knura mrożonym w rozcieńczalniku z dodatkiem 1 mM butylowanego hydroksytoluenu (BHT) lub 2 mM resweratrolu (R)

	LEYG+BHT	LEYG+R
Rodzaj inseminacji	standardowa	
Liczba inseminowanych loszek	19	20
Liczba ciężarnych loch w 25 dniu po inseminacji – skuteczność inseminacji (%)	19/19 (100%)	16/20 (80,0%)
Wskaźnik wyproszeń (%)	18/19 (94,7%)	15/16 (93,7%)
Liczba żywych prosiąt w miocie (średnia liczba prosiąt/loszka)	222 (12,3)	255 (10,2)

Na zdjęciach widoczne urodzone prosięta po standardowej inseminacji kriokonserwowanym nasieniem knura.



(Fot. 1. M. Bryła)



(Fot. 2. M. Bryła)

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 zadania było wykorzystanie CRISPR/Cas9 do dezaktywacji (nokautu) genu miostatyny u kaczek. Dodatkowym celem było opracowanie metody izolacji pierwotnych komórek płciowych z będących we wczesnej fazie rozwoju zarodków kaczek.

Modyfikacja genomu przy użyciu systemu CRISPR/Cas9 jest precyzyjna ze względu na możliwość zaprojektowania gRNA (z ang. guide RNA), które tworzy kompleks z białkiem Cas9. GRNA składa się z połączonych ze sobą tracrRNA i fragmentu crRNA, które odpowiadają za stabilne związanie z nukleazą Cas9 oraz wolnego crRNA, które na zasadzie komplementarności łączy się z rozpoznanym fragmentem kwasu nukleinowego.

Ze względu na małą liczbę pozyskiwanych PGCs, zdecydowano się na optymalizację hodowli i selekcji modyfikowanych komórek w oparciu o komórki blastodermalne, pozyskane z tarczki zarodkowych jaj kaczek. Komórki te, stosunkowo liczne w tarczce zarodkowej (40-60 tys.) stosunkowo łatwo wyizolować.

W celu izolacji komórek blastodermalnych jaja kaczki przechowywano przez 6 dni w temperaturze pokojowej. BCs pozyskano z tarczki zarodkowych jaj. Zawartość jaj przelano na plastikowy separator do żółtek. Po oddzieleniu kuli żółtkowej od białka, na zlokalizowaną tarczkę nakładano pierścień wycięty z bibuły. Po odcięciu błony witelinowej wokół krawędzi zewnętrznej pierścienia, tarczkę zarodkową zdejmowano i oczyszczano z resztek żółtka. Następnie komórki wymywano strumieniem 1 ml PBS $-Ca^{++}-Mg^{++}$, przenosząc je do probówek i wirowano 5-6 min. Po wirowaniu pobrano 0,5 ml komórek i dodano 0,5 ml PBS, ponownie wirowano przez 3 min./3000 obrotów rpm.

W końcowej fazie badań opracowano etapy hodowli i selekcji komórek zarodkowych ptaków (BCs) w celu modyfikacji w systemie CRISPR/Cas9 (założono wykorzystanie 3 plazmidów – trzy miejsca modyfikacji genu miostatyny): izolacja i hodowla komórek blastodermalnych, lipofekcja (zamiana pożywki pełnej na OptiMEM – dodanie połowy pożywki pełnej), zmiana medium na selekcyjne po 24 godzinach – puromycyna, selekcja – 48 godzin, zmiana medium na pełne po 48 godzinach, w zależności od ilości komórek (wymagana jest odpowiednia konfluencja) – hodowla przy zmianie medium 2 razy w tygodniu.

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 było określenie przydatności szpikopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych (BM-MSCs) do zabiegów transformacji genetycznej metodami nukleofekcji. Ocena efektywności metod nukleofekcji modulowanych i niemodulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs. Weryfikacja zdolności jąder nienukleofekowanych i modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs do pokierowania rozwojem in vivo nietransgenicznych zarodków świni uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego. Weryfikacja zdolności jąder modulowanych epigenetycznie, a następnie nukleofekowanych komórek BM-MSCs do pokierowania rozwojem in vivo potencjalnie transgenicznych zarodków świni uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego.

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników

W drugim 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 jednej 8-miesięcznej lochy oraz pięciu 3-miesięcznych loszek. Rezerwy genetyczne, utworzone w postaci konfluentnych hodowli pierwotnych i klonalnych linii komórek BM-MSCs, zostały zabezpieczone poprzez kriokonserwację lub namnażane poprzez ich pasażowanie, w celu podwojenia lub zwielokrotnienia danej subpopulacji komórkowej w warunkach *in vitro*. Wczesne linie klonalne komórek BM-MSCs, które uzyskano w następstwie pasażowania subpopulacji komórkowych, stanowiących hodowle pierwotne były oceniane pod kątem ich przydatności w kierunku przeprowadzenia zabiegów transformacji genetycznej, przy wykorzystaniu różnych wariantów programowych nukleofekcji (program U-23: wysoka efektywność transfekcji lub program P-22: wysoka przeżywalność komórek). W okresie przypadającym na 24 godziny przed zabiegiem nukleofekcji, jednokrotnie pasażowane subpopulacje komórek BM-MSCs były poddawane modulacji epigenetycznej przy wykorzystaniu 50 nM trichostatyny A (TSA - niespecyficzny inhibitor deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej). Grupę kontrolną stanowiły adekwatne subpopulacje komórek BM-MSCs, które nie podlegały TSA-zależnej modulacji epigenetycznej. Do zabiegów nukleofekcji komórek BM-MSCs użyto komercyjnej konstrukcji genowej *pmaxGFP* (Amaxa Biosystems, Lonza Bioscience), warunkującej ogólnoustrojową ekspresję transgenu kodującego białko intensywnej zieleni fluorescencyjnej (eGFP), wyizolowane ze skorupiaka (widłonoga) *Potellina species*. Konstrukcje genowe, których struktura bazuje na sekwencji kodującej reporterowego transgenu eGFP, były inkorporowane do komórek BM-MSCs przy zastosowaniu jednego z dwóch wariantów programowych nukleofekcji (U-23 lub P-22). Strategia nukleofekcji stanowi kombinację lipofekcji z elektroporacją, która – za pośrednictwem nośników liposomowych – umożliwia wspomaganą impulsami prądu zmiennego transdukcję konstrukcji genowej bezpośrednio do jądra komórki somatycznej. W celu przeprowadzenia procedury nukleofekcji, wczesne linie klonalne komórek BM-MSCs namnażano *in vitro* w powlekanych kolagenem typu I butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² do osiągnięcia 90% stanu subkonfluencji (ostatni pasaż 2 dni przed zabiegiem transfekcji). Uzyskana po trypsynizacji, zawiesina pojedynczych komórek BM-MSCs (o gęstości 0,5-1 × 10⁶/próbkę) była poddana ultrawiwaniu ($\epsilon=200 \times g$; $t=10$ minut; temperatura pokojowa). Po dekantacji supernatantu, do osadu komórkowego były dodane: 100 μ L mieszaniny nukleofekcyjnej i 2 μ g zlinearyzowanej konstrukcji genowej w 4 μ L zbuforowanego roztworu Tris (o koncentracji 0,5 μ g/ μ L wektora *pmaxGFP* w 10 mM buforu Tris; pH 8,0). Następnie, próbki komórek, zdeponowane w specjalnych kuwetach do elektroporacji, były umieszczane w komorze nukleofektora (Amaxa Biosystems), w której generowano przepływ impulsów prądu zmiennego zgodnie z parametrami zakodowanymi w ramach wariantów programowych U-23 lub P-22, warunkujących odpowiednio: wysoką efektywność transfekcji lub wysoką przeżywalność komórek. Po zabiegu nukleofekcji, komórki BM-MSCs były przepłukiwane pożywką DMEM wraz z uzupełnieniami, a następnie hodowane *in vitro* w powlekanych kolagenem typu I butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm². Hodowla transformantów komórkowych była kontynuowana przez kolejne 6 dni w celu osiągnięcia 95-100% stanu konfluencji, który jest niezbędny do efektywnej kriokonserwacji nukleofekowanych subpopulacji komórek BM-MSCs. Kriokonserwowane próbki transfekowanych komórek BM-MSCs były rozmrażane i poddawane krótkotrwałej hodowli do ich odpowiedniego przygotowania (tj. synchronizacji cyklu mitotycznego w stadiach G1/G0) na potrzeby eksperymentów ukierunkowanych na uzyskiwanie potencjalnie transgenicznych zarodków świni techniką klonowania somatycznego. Efektywność nukleofekcji modulowanych i niemodulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs była weryfikowana

w oparciu o biochemiluminescencyjną ocenę przyżyciową indeksu ekspresji białka eGFP (tzw. indeksu reporterowego) w transfekowanych subpopulacjach komórek BM-MSCs. Przyżyciowa detekcja aktywności transkrypcyjnej oraz translacyjnej reporterowego transgenu eGFP, która została potwierdzona w hodowanych *in vitro* komórkach BM-MSCs po upływie 48 godzin od przeprowadzenia ich nukleofekcji pozwoliła na oszacowanie wartości indeksu reporterowego, czyli procentowego udziału komórek emitujących zieloną biochemiluminescencję w trzech reprezentatywnych próbkach losowo wyselekcjonowanych spośród każdej z analizowanych subpopulacji komórkowych.

Indeks reporterowy został oszacowany na poziomie:

1. 94,7% (216 komórek eGFP-pozytywnych spośród 228 analizowanych komórek) – w subpopulacjach modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs, poddanych następnie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego U-23;
2. 94,6% (210 komórek eGFP-pozytywnych spośród 222 analizowanych komórek) – w subpopulacjach epigenetycznie niemodulowanych komórek BM-MSCs, poddanych następnie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego U-23;
3. 54,0% (107 komórek eGFP-pozytywnych spośród 198 analizowanych komórek) – w subpopulacjach epigenetycznie modulowanych komórek BM-MSCs, poddanych następnie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego P-22;
4. 48,4% (93 komórki eGFP-pozytywne spośród 192 analizowanych komórek) – w subpopulacjach epigenetycznie niemodulowanych komórek BM-MSCs, poddanych następnie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego P-22.

Przed wykorzystaniem jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania, rozmrożone subpopulacje nietransfekowanych komórek BM-MSCs, które poddawano zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, były jednocześnie inkubowane przez 24 godziny w pożywce uzupełnionej dodatkiem syntetycznego analogu endogennych inhibitorów deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej (HDACs) – 50 nM TSA. Z kolei, nukleofekowane komórki, które podlegały 24-godzinnej TSA-zależnej modulacji epigenetycznej bezpośrednio przed zabiegiem transfekcji, były poddawane jedynie 24-godzinnemu zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych, przed ich użyciem jako dawców jąder w klonowaniu somatycznym. W wyniku pokrycia gęstą, pojedynczą warstwą całej dostępnej powierzchni dna butelki lub szalki hodowlanej, przylegające ściśle zarówno do siebie, jak i do polistyrenowego lub kolagenowego substratu nienukleofekowane lub nukleofekowane komórki BM-MSCs podlegały 24-godzinnej inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu. W tych warunkach cykl mitotyczny komórek BM-MSCs był sztucznie synchronizowany w fazach G1/G0. Do klonowania somatycznego były użyte nietransfekowane lub transfekowane komórki pochodzące z wczesnych linii klonalnych. Źródło biorców dla jąder nienukleofekowanych lub nukleofekowanych komórek BM-MSCs stanowiły dojrzałe *in vitro* oocyty loszek lub loch. Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego oocyty były enukleowane przy zastosowaniu metody mikrochirurgicznej, wspomaganej chemicznie. E nukleowane oocyty świni były rekonstruowane z jąder nietransfekowanych i modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs lub z jąder modulowanych epigenetycznie, a następnie nukleofekowanych komórek BM-MSCs. Do sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów był zastosowany protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A). Uzyskane w wyniku F/A cybrydy klonalne były inkubowane przez 2-3 godziny w pożywce NCSU-23 uzupełnionej cytochalazyną B. Bezpośrednio po inkubacji w obecności cytochalazyny B, zarodki klonalne w stadium 1-blastomerowym były transferowane chirurgicznie do dróg rozrodczych (jajowodów) zsynchronizowanych hormonalnie loch-biorczyń. Ogółem, do zabiegów klonowania somatycznego wyselekcjonowano

1014 (95,0%) dojrzałych *ex vivo* oocytów spośród 1067 oocytów zakwalifikowanych do dojrzewania mejotycznego *in vitro* (IVM). W pierwszej serii eksperymentów ukierunkowanych na uzyskiwanie nietransgeniczných zarodków klonalnych świni z oocytów zrekonstruowanych z jąder nietransfekowanych komórek BM-MSCs poddanych TSA-zależnej modulacji epigenetycznej, do zabiegów klonowania zaklasyfikowano 665 (95,5%) dojrzałych *in vitro* oocytów spośród 696 oocytów zakwalifikowanych do IVM. Do jajowodów 8 samic-biorczyń transferowano łącznie 624 (93,8%) efektywnie zrekonstruowanych zarodków klonalnych spośród 665 dojrzałych *in vitro* oocytów poddanych enukleacji, rekonstrukcji z jąder komórek BM-MSCs, sztucznej aktywacji, a następnie działaniu cytochalazyny B. Średnia liczba zarodków chirurgicznie przeniesionych do jednej biorczyny wynosiła 78. Z kolei, w drugiej serii eksperymentów ukierunkowanych na uzyskiwanie potencjalnie transgeniczných zarodków klonalnych świni z oocytów zrekonstruowanych z jąder nukleofekowanych komórek BM-MSCs, uprzednio poddanych TSA-zależnej modulacji epigenetycznej, do zabiegów klonowania zaklasyfikowano 349 (94,1%) dojrzałych *in vitro* oocytów spośród 371 oocytów zakwalifikowanych do IVM. Do jajowodów 5 loch-biorczyń transferowano łącznie 323 (92,6%) efektywnie zrekonstruowanych zarodków klonalnych spośród 349 dojrzałych *in vitro* oocytów poddanych enukleacji, rekonstrukcji z jąder komórek BM-MSCs, sztucznej aktywacji, a następnie działaniu cytochalazyny B. Średnia liczba zarodków chirurgicznie przeniesionych do jednej biorczyny wynosiła 64,6. W około 30-35-tym dniu po transferze zarodków klonalnych były przeprowadzane badania ultrasonograficzne (USG) loch-biorczyń w celu potwierdzenia lub wykluczenia ciąży. U ciężarnych loch-biorczyń, badania USG były/będą powtarzane w odstępach 15-dniowych, w celu weryfikacji tempa rozwoju 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 lub kolagenowych 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 warunkują relatywnie wysoką przydatność wyprowadzonych linii komórek BM-MSCs pod kątem ich wykorzystania do zabiegów transformacji genetycznej przy zastosowaniu różnych wariantów programowych metody nukleofekcji.
2. Zastosowanie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego U-23 skutkowało zdecydowanie wyższą efektywnością transgenizacji *in vitro* modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs mierzoną wielkością indeksu reporterowego (94,7%^A) w porównaniu do efektywności oszacowanej dla komórek nukleofekowanych z użyciem wariantu programowego P-22 (54,0%^B). Podobnie, zastosowanie nukleofekcji z użyciem wariantu programowego U-23 skutkowało znacznie wyższą efektywnością transgenizacji niemodulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs mierzoną wielkością indeksu reporterowego (94,6%^A) w odniesieniu do efektywności oszacowanej dla komórek nukleofekowanych z użyciem wariantu programowego P-22 (48,4%^B). W obydwu przypadkach, poziom istotności międzygrupowych różnic statystycznych okazał się być bardzo wysoki (^{A,B} $P < 0.001$; test χ^2). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnego wpływu TSA-zależnej modulacji epigenetycznej na efektywność transgenizacji ocenianą przyżyciowo w oparciu o procentowy udział eGFP-pozytywnych komórek zarówno w analizowanych subpopulacjach komórek BM-MSCs, które poddano nukleofekcji przy wykorzystaniu programu U-23 (94,7% vs. 94,6% w grupie kontrolnej), jak

Ryc. 2. Ultrasonogramy potwierdzające obecność licznych ploidów klonalnych w macicy ciężarnej lochy-biorczyni nr MSC/9 (diagnostyka USG przeprowadzona między 30-tym a 45-tym dniem po transferze nietransgenicznym zarodków klonalnych do dróg rozrodczych samicy-biorczyni)



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 przeprowadzane są inseminacje jałówek i krów.

Syntetyczny opis wyników

W okresie sprawozdawczym zakupiono do badań seksowane (61 słomek) i nieseksowane (72 słomki) nasienie buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Nasienie seksowane pochodziło od 13 buhajów, natomiast nasienie nieseksowane od 12 buhajów.

Nasienie przeznaczone do oceny plemników *in vitro* zostało przewiezione do laboratorium ZBRK Instytutu Zootechniki PIB w Balicach, gdzie wykonano przewidziane metodyką analizy. Wyniki dotychczas przeprowadzonych analiz dla nasienia seksowanego zamieszczono w Tabeli 1 i 2.

W celu oceny zdolności zapładniającej nasienia seksowanego przeprowadzono inseminację 653 jałówek i krów. Z tego, 507 inseminacji przeprowadzono w ZD IZ Kołbacz sp. z o.o., a 146 inseminacji w ZD IZ PIB Chorzełów sp. z o.o. Nasieniem nieseksowanym zainseminowano 1099 krów w Kołbaczu. Po 35 dniach od zabiegu inseminacji przeprowadzano badanie USG na ciążę. Wyniki uzyskane na podstawie dotychczas wykonanych badań USG wskazują, że wskaźnik zacieleń dla nasienia seksowanego waha się od 10,7% do 85,7% (Tab. 3), natomiast dla nasienia nieseksowanego od 2,2% do 45,2%.

Tab. 1. Parametry jakościowe nasienia seksowanego (ruch i ATP)

Lp.	Buhaj	Ruch postępowy (mln w dawce)	Ruch szybki (mln w dawce)	Prędkość ruchu (VCL)	ATP (spadek po inkub. 37°C/3h)
1.	Mozilla sex	1,22	1,07	112,06	-86,7
2.	Mayfower sex	1,26	1,19	109,25	-57,8
3.	Luksus sex	1,15	1,04	109,25	-70,8
4.	Pharo sex 18043	1,03	0,97	104,68	-63,8
5.	Megabit sex 18109	0,98	0,82	94,91	-65,8
6.	Megabit sex 17331	0,96	0,82	96,17	-51,8
7.	Maldives sex 117228	0,91	0,82	98,42	-73,8
8.	Maldives sex 117230	1,13	0,98	94,83	-60,7
9.	Missouri sex	-	-	-	-65,8
10.	Sutton sex 17068	2,32	2,11	117,78	-82,7
11.	Sutton sex 17079	2,57	2,31	108,03	-82,2
12.	Greenway 17356	-	-	-	-72,4
13.	Hondo sex	1,67	1,49	97,52	-62,0
14.	Baylaboy sex	0,68	0,61	100,33	-75,3
15.	All Star sex 18109	0,72	0,61	98,96	-59,7
16.	Tenpin sex	1,28	0,96	107,85	-58,6
17.	Lundy sex	0,97	0,87	93,22	-82,4
18.	Windmill sex	1,28	1,21	104,59	-91,6
19.	Landview sex	1,28	1,14	98,07	-97,9
20.	Soltan sex	1,13	1,07	105,26	-84,5
21.	Casino sex	1,05	0,95	105,37	-63,7
22.	Francisco sex	3,01	2,17	86,92	-70,2
23.	Surprise sex	0,78	0,69	88,63	-75,1
24.	Dreamweaver sex	2,97	2,20	82,22	-58,6
25.	Supersire sex	-	-	-	-77,6
26.	Eternal sex	1,89	1,70	91,53	-68,4
27.	Captain sex	0,99	0,87	92,10	-82,4
28.	Corsair sex	2,41	2,18	94,58	-77,5
29.	Abro sex	1,25	1,10	90,23	-62,6
30.	Pharo sex 18325	0,84	0,77	104,86	-59,9
31.	All Star sex 18109 (Chorzów)	0,96	0,83	97,72	-59,5
32.	Black Gold sex 118094 (Chorzów)	-	-	-	-52,8
33.	Greenway sex 17306 (Chorzów)	-	-	-	-85,0
34.	Jeepson sex 16292 (Chorzów)	0,91	0,80	99,09	-70,2

Tab. 2. Parametry jakościowe nasienia seksowanego (apoptoza, błony komórkowe, chromatyna)

Lp.	Buhaj	Plemniki apoptotyczne	Błony komórkowe			Uszkodzona chromatyna
			żywe	martwe	zamier.	
1.	Mozilla sex	16,96%	42,87%	38,78%	18,34%	1,05%
2.	Mayfower sex					
3.	Luksus sex	15,10%	35,62%	26,80%	37,58%	1,02%
4.	Pharo sex 18043	49,55%	34,26%	53,14%	12,60%	0,62%
5.	Megabit sex 18109					
6.	Megabit sex 17331					
7.	Maldives sex 117228					
8.	Maldives sex 117230					
9.	Missouri sex					
10.	Sutton sex 17068	53,12%	44,41%	39,34%	16,25%	0,32%
11.	Sutton sex 17079	13,34%	35,23%	21,17%	43,60%	0,59%
12.	Greenway 17356					
13.	Hondo sex					
14.	Baylaboy sex					
15.	All Star sex 18109	53,06%	25,45%	34,41%	40,14%	0,47%
16.	Tenpin sex					
17.	Lundy sex					
18.	Windmill sex					
19.	Landview sex	61,62%	55,70%	37,76%	6,54%	0,89%
20.	Soltan sex	17,42%	44,11%	35,29%	20,60%	1,01%
21.	Casino sex	16,86%	38,81%	30,96%	30,23%	0,54%
22.	Francisco sex					
23.	Surprise sex					
24.	Dreamweaver sex					
25.	Supersire sex					
26.	Eternal sex	6,95%	40,84%	42,65%	16,52%	0,48%
27.	Captain sex	12,62%	52,84%	27,14%	20,03%	0,44%
28.	Corsair sex	9,50%	49,68%	28,13%	22,19%	0,37%
29.	Abro sex	17,80%	18,69%	25,38%	55,93%	0,55%
30.	Pharo sex 18325	16,95%	11,74%	43,89%	44,37%	0,48%
31.	All Star sex 18109 (Chorzaków)					
32.	Black Gold sex 118094 (Chorzaków)					
33.	Greenway sex 17306 (Chorzaków)					
34.	Jeepson sex 16292 (Chorzaków)	13,50%	40,73%	50,35%	8,92%	0,94%

Tab. 3. Wskaźniki zacieleń uzyskane dla nasienia seksowanego

Lp.	Buhaj	Liczba samic inseminowanych	Wskaźnik zacieleń (%)
1.	Mozilla sex	30	43,3
2.	Mayfower sex	31	29,0
3.	Luksus sex	28	10,7
4.	Pharo sex 18043	36	47,2
5.	Megabit sex 18109	20	35,0
6.	Megabit sex 17331	7	85,7
7.	Maldives sex 117228	56	44,6
8.	Maldives sex 117230	55	41,8
9.	Missouri sex	96	51,6
10.	Sutton sex 17068	18	44,4
11.	Sutton sex 17079	46	41,3
12.	Greenway 17356	35	25,7
13.	Hondo sex	46	26,1
14.	Baylaboy sex	24	62,5
15.	All Star sex 18109	21	38,1
16.	Tenpin sex	44	25,0
17.	Lundy sex	20	55,0
18.	Windmill sex	26	23,1
19.	Landview sex	36	36,1
20.	Soltan sex	44	70,5
21.	Casino sex	54	75,0
22.	Francisco sex	54	38,9
23.	Surprise sex	34	17,7
24.	Dreamweaver sex	43	20,9
25.	Supersire sex	44	56,8
26.	Eternal sex	44	50,0
27.	Captain sex	43	25,6
28.	Corsair sex	69	42,0
29.	Abro sex	43	72,1
30.	Pharo sex 18325	40	65,0
31.	All Star sex 18109 (Chorzaków)	63	39,7
32.	Black Gold sex 118094 (Chorzaków)	63	55,6
33.	Greenway sex 17306 (Chorzaków)	17	35,3
34.	Jeepson sex 16292 (Chorzaków)	73	49,3

Zadanie 01-19-07-11*Wykorzystanie kriokonserwacji nasienia w programie hodowlanym Gęsi Białej Kołudzkiej®***Kierownik zadania: dr hab. Mirosław Lisowski**

Celem zadania była ochrona puli genowej Gęsi Białej Kołudzkiej® *ex situ* oraz wykorzystanie zamrożonego nasienia, w celu poprawy efektywności zapłodnienia Gęsi Białej Kołudzkiej®.

Gęsi Białe Kołudzkie® są obecnie najbardziej rozpowszechnionymi gęsiami w kraju. W wyniku pracy hodowlanej wytworzono dwa rasy hodowlane tych gęsi: ród mateczny W-11 i ród ojcowski W-33, produkując dla potrzeb towarowych nie tylko ptaki czystorodowe W-11, ale również mieszańce W-31.

W bieżącym roku zastosowano wcześniej opracowaną metodę zamrażania nasienia gęsiorów w parach azotu. Materiał doświadczalny stanowiło nasienie pozyskane od 10 gęsiorów z rasy matecznej W-11. Nasienie po pobraniu i ocenie koncentracji plemników poddawano procesowi kriokonserwacji. Zostało ono rozrzedzone rozcieńczalnikami w stosunku 2:1 (rozcieńczalnik: cytrynian potasu, glutaminan sodu, sodowy fosforan 2-zasadowy, sodowy fosforan 1-zasadowy, glukoza, D-fruktoza, inozytol, siarczan protaminy, poliwinylny pyrrolidonu), następnie schłodzone do temperatury 4°C (przez 15 minut).

W kolejnym etapie, dodawano DMF – Dimetyloformamid (do stężenia końcowego 6%) i przeprowadzono ekwilibrację przez 5 minut w temperaturze 4°C. Tak przygotowaną mieszaninę umieszczono w słómkach – 2 cm nad lustrem ciekłego azotu i schłodzono do temperatury -140°C. Następnie, słomki przenoszono do ciekłego azotu. Po rozmrożeniu stwierdzono około 80% przeżywalność plemników gęsi, pochodzących od samców z rasy W-11.

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 było opracowanie nowej metody transfekcji zygot królika z wykorzystaniem kompleksu nanokarier/DNA, która będzie umożliwiała wielokierunkową modyfikację genotypu biorcy.

Do opracowania metody transfekcji zygot królika zastosowano sferyczne nanocząstki złota o średnicy 10 nm, z modyfikacją powierzchniową PEI (polietyloiminina), wersja produktu BioPure (do aplikacji biologicznych) – producent: Nanocomposix (USA) – AuPEI oraz konstrukcję genową reporterową – pmaxFP-Red-N.

Założenia metodyczne

W ramach przeprowadzonych prac zabiegowi synchronizacji i superowulacji poddano 165 samic królika (rasa Nowozelandzki Biały), od których uzyskano łącznie 2056 zapłodnionych komórek jajowych (zygot).

Pierwszy etap badań pozwolił na ustalenie optymalnej koncentracji nanokariera (nośnika), badając jego wpływ na rozwój zygot po iniekcji do stadium blastocysty. Jako nośnik wybrano sferyczne nanocząstki złota o średnicy 10 nm, z modyfikacją powierzchniową PEI (polietyloiminina), wersja produktu BioPure (do aplikacji biologicznych) – producent: Nanocomposix (USA).

W celu sprawdzenia wpływu nanokariera na potencjał rozwojowy zygot, wprowadzano go do przestrzeni okołozótkowej, stosując technikę mikroiniekcji. Dla porównania wpływu nanokariera na potencjał rozwojowy zygot, prowadzono hodowlę kontrolną zygot niemanipulowanych. Przed wprowadzeniem 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. Następnie, nanokarier wprowadzano do przestrzeni okołozótkowej zygot. Po zabiegu zygoty umieszczano w pożywce do hodowli i hodowano przez 6 dni w inkubatorze 38°C: 5%CO₂. Tempo rozwoju sprawdzano po 48, 72 i 120 godzinach od rozpoczęcia hodowli *in vitro*.

Zygoty podzielono na 5 grup doświadczalnych:

1. Kontrola – zygoty niemanipulowane – 87 zygot
2. Gr. 1 – zygoty poddane mikroiniekcji nanokarierem o stężeniu 5ng/μl – 42 zygoty
3. Gr. 2 - zygoty poddane mikroiniekcji nanokarierem o stężeniu 25ng/μl – 62 zygoty
4. Gr. 3 - zygoty poddane mikroiniekcji nanokarierem o stężeniu 50ng/μl – 67 zygot
5. Gr. 4 - zygoty poddane mikroiniekcji nanokarierem o stężeniu 100ng/μl – 227 zygot.

Kolejny etap badań stanowiło ustalenie optymalnej mieszaniny transfekcyjnej. W tym celu przygotowany został referencyjny konstrukt genowy pmaxFP-Red-N. Konstrukt zawierał czerwone białko fluorescencyjne emitujące barwę przy długości 488 – 520 nm. Konstrukt został przygotowany przez mgr inż. Natalię Dzięgiel (zadanie 07-2.12.7 FBW), którego stężenie wyniosło 531,2 ng/μl. Stężenie uzyskanego DNA zmierzono za pomocą mikrospektrofotometru Nano-Drop. Współczynnik absorpcji 1,94 – przy zastosowanych do pomiaru długościach fal – 260 i 280 nm. W celu ustalenia optymalnej mieszaniny transfekcyjnej, kompleks nano/DNA (AuPEI/pmaxFP-Red-N). Optymalny stosunek mieszaniny nanokarier/DNA ustalono przeprowadzając analizę retardacyjną mieszanin o różnych stężeniach na żelu agarozowym. Jako optymalny wybrano wariant kompleksu nanokarier/DNA w stosunku 50 ng/μl:25 ng/μl (2:1) (Fot. 1).

Mieszanina taka była stosowana w kolejnych etapach badań, w celu sprawdzenia efektywności transfekcji zygot królika z zastosowaniem kompleksu AuPEI/pmaxFP-Red-N.

W ramach przeprowadzonych prac transfekcji kompleksem nanokarier/DNA (AuPEI/pmaxFP-Red-N) poddano 337 zygot królika. Przed transfekcją (wprowadzeniem kompleksu nanokarier/DNA do przestrzeni okołozótkowej), przygotowywano świeże rozcieńczenia nanokariera w ddH₂O, który poddawano sonifikacji – 1 min./maks. natężenie, 4 min./średnie natężenie, w celu dyspersji i rozluźnienia wiązań tak, aby uzyskać jego stężenie 50 ng/μl. Następnie, dodawano DNA w postaci konstrukt reporterowego o stężeniu 25 ng/μl. Mieszaninę nanokarier/DNA o objętości 100 μl inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. w celu związania kompleksu. Po inkubacji napełniano 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 6 dni w inkubatorze – 38°C, 5%CO₂. Tempo rozwoju sprawdzano po 48, 72 i 120 godzinach od rozpoczęcia hodowli *in vitro*. Po zakończeniu hodowli przeprowadzano ocenę morfologiczną oraz inspekcję pod mikroskopem fluorescencyjnym. Zarodki w stadium blastocysty wykazujące fluorescencję konfekcjonowano. Stanowiły one materiał do realizacji zadania badawczego, związanego z analizą ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój we wczesnym etapie zarodkowym. Zygoty z grupy kontrolnej (niemanipulowane) 265 zygot, przechowywano w temperaturze pokojowej przez okres wykonywania transfekcji, a następnie razem z grupą doświadczalną przenoszono do hodowli stosując identyczną procedurę.

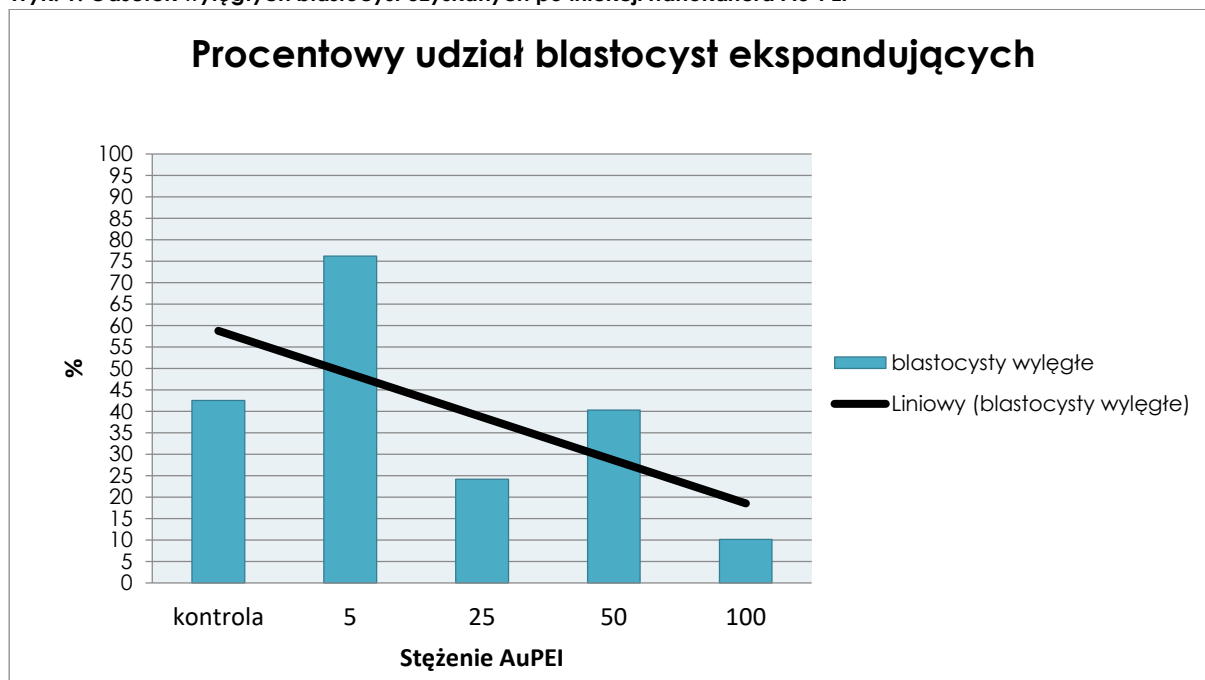
Kolejny etap badań stanowiło sprawdzenie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego HHP na efektywność procesu transfekcji. Z danych literaturowych wynika, że HHP wpływa korzystnie na rozwój niemanipulowanych i manipulowanych gamet. Brak jest doniesień o stosowaniu HHP w przypadku zygot królika, poddawanych procesowi transfekcji. Pozytywne wyniki stosowania HHP w odniesieniu do manipulowanych gamet, stanowiły przesłankę do wypróbowania tej procedury w procesie opracowywania nowatorskiej metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek. W tym celu utworzono dwie grupy kontrolne (zygoty niemanipulowane) i dwie doświadczalne (poddane transfekcji kompleksem AuPEI/pmaxFP-Red-N), w których zastosowano dwa różne ciśnienia 20 i 40 MPa. Ciśnienia dobrano w oparciu o dane literaturowe oraz o pozytywne wyniki stymulacji potencjału rozwojowego gamet przed procesem kriokonserwacji w badaniach prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji. 315 zygot, stanowiących grupę kontrolną 20 MPa (ciśnienie 20 MPa) oraz 337 zygot, stanowiących grupę kontrolną 40 MPa (ciśnienie 40 MPa) poddano wpływowi HHP przez 1 godzinę. Następnie zygoty umieszczano w hodowli pozaustrojowej na okres 6 dni, stosując identyczną procedurę hodowli jak w przypadku pozostałych grup. Po hodowli oceniano procent zarodków w stadium moruli i blastocysty. Zarodki konfekcjonowano. Dwie kolejne grupy stanowiły zygoty, które poddano działaniu 20 i 40 MPa HHP przed zabiegiem transfekcji. 297 zygot poddano ciśnieniu 20 MPa oraz 278 zygot 40 MPa – następnie na zygotach przeprowadzono proces transfekcji kompleksem AuPEI/pmaxFP-Red-N w stosunku 2:1 50 ng/μl:25 ng/μl). Zygoty grup kontrolnych i doświadczalnych hodowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Oceniano odsetek morul i blastocyst. Zarodki uzyskane z zygot poddanych HHP i transfekcji oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Blastocysty, u których stwierdzono sygnał fluorescencji konfekcjonowano.

Syntetyczny opis wyników zadania

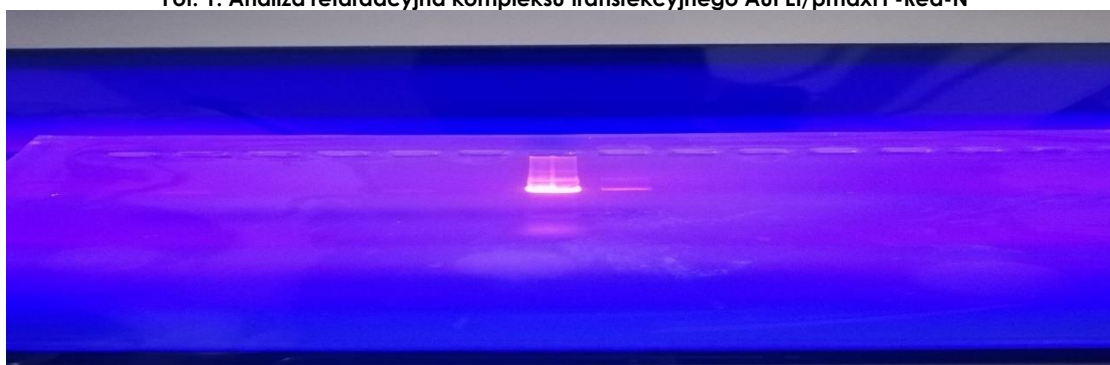
W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenie nanokariera w ilości 100 ng/μl wpływa niekorzystnie na potencjał rozwojowy manipulowanych zygot, redukując odsetek możliwych do uzyskania wylęgłych blastocyst z 40% do 10%. Badania jednoznacznie wykazały, że stężenie nanokariera w granicach 25-50 ng/μl nie wpływa niekorzystnie na rozwój manipulowanych zygot. Do badań nad opracowaniem metody transfekcji wybrano stężenie 50 ng/μl, niepowodujące drastycznego obniżenia odsetka uzyskiwanych w hodowli *in vitro* blastocyst (Wyk. 1). Analiza retardacyjna wykazała, że optymalne wiązanie w kompleksie AuPEI/pmaxFP-Red-N zachodzi przy zmieszaniu składników w ilości 50 ng/μl:25 ng/μl – stosunek 2:1 (Fot. 1). Efektywność transfekcji z zastosowaniem kompleksu AuPEI/pmaxFP-Red-N wyniosła 18,7% (Tab. 1). Opracowana metoda transfekcji zygot królika z wykorzystaniem nanocząstek AuPEI jest 4-krotnie wydajniejsza w odniesieniu do standardowej metody mikroiniekcji DNA (Wyk. 2, Tab. 1, Fot. 2). Zastosowanie HHP o wartości 40 MPa przed hodowlą *in vitro* niemanipulowanych zygot królika wpłynęło korzystnie na odsetek uzyskiwanych zarodków w stadium blastocysty – ok. 73% (Tab. 1).

Zastosowanie HHP przed procesem transfekcji zygot królika, z wykorzystaniem nanocząstek AuPEI, obniżyło o ok. 5% ilość możliwych do uzyskania transgenicznych zarodków w stadium blastocysty (Tab. 1).

Wyk. 1. Odsetek wylętych blastocyst uzyskanych po iniekcji nanokariera Au-PEI



Fot. 1. Analiza retardacyjna kompleksu transfekcyjnego AuPEI/pmaxFP-Red-N



Wyk. 2. Odsetek zarodków w stadium moruli/blastocysty z ekspresją pmaxFP-Red-N w odniesieniu do ogólnej liczby zarodków w stadium moruli/blastocysty uzyskanych po transfekcji



Tab. 1. Efektywność transfekcji oraz wpływ HHP na rozwój *in vitro* manipulowanych i niemanipulowanych zygot królika

Grupa	L. zygot	L. blastocyst	% blastocyst	L. blastocyst z ekspresją	% blastocyst z ekspresją
Transfekcja	337	150	44,51	63	18,69
20 MPa kontrola	315	206	65,39	-	-
40 MPa kontrola	337	246	72,99	-	-
20 MPa transfekcja	297	94	31,64	40	13,46
40 MPa transfekcja	278	64	23,02	38	13,66
Kontrola niemanipulowana	352	108	40,75	-	-

Fot. 2. Blastocysty królika uzyskane w hodowli *in vitro* z zygot po transfekcji kompleksem pmaxFP-Red-N

Opracowana metoda transfekcji może być stosowana jako metoda alternatywna do uzyskiwania transgenicznych królików.

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 było wykazanie czy możliwe jest uzyskanie prawidłowych morfologicznie i funkcjonalnie mezenchymalnych komórek macierzystych, które izolowano ze szpiku kostnego aspirowanego od zwierząt po uboju.

Ponadto, celem było wyprowadzenie stabilnych linii MSC od transgenicznej świni oraz nietransgenicznej owcy i konia. Linie te oceniono morfologicznie, molekularnie oraz funkcjonalnie. Potwierdzone linie MSC świńskie, końskie i owcze mrożono i bankowano.

Założenia metodyczne

Szpik pozyskiwano od 3 gatunków zwierząt:

- świń ze znokautowanym genem GGTA1 z zastosowaniem technologii Zinc Finger Nuclease (ZNF) po uboju oraz świń nietransgenicznych,
- owiec po uboju,
- koni po uboju.

Stosowano następujące metody badawcze:

- pobranie szpiku – (Opiela i in., 2016),
- izolacja MSC ze szpiku – (Opiela i in., 2016),
- wyprowadzenie i hodowla *in vitro* MSC – (Opiela i in., 2016).
- analiza cytometryczna poziomu ekspresji markerów pozytywnych CD90, CD73, CD105 oraz negatywnych CD31, CD34 (stosowanych u świni i owcy),

- mrożenie MSC,
- różnicowanie MSC w adipocyty, osteoblasty i chondrocyty w 5 różnych pożywkach – wybór najlepszej pożywki.
- Barwienie celem potwierdzenia kierunku różnicowania:
 - w kierunku osteoblastów: von Kossa i/lub Alizarin Red
 - w kierunku chondrocytów: Alcian Blue
 - w kierunku adipocytów: Oil Red O

Podsumowanie wyników

- Wyprowadzono linie pierwotne MSC i hodowano *in vitro* komórki świni transgenicznej, świni nietransgenicznej, nietransgenicznej owcy i konia.
- Oceniono markery pozytywne i negatywne przy wykorzystaniu cytometru przepływowego komórek MSC wyprowadzonych ze szpiku. Komórki świni i owcy wyszły prawidłowo dla markerów negatywnych CD13 i CD34 oraz świni dla markeru CD90. Dla pozostałych markerów wyniki są poniżej wymaganych norm aby komórki uznać za mezenchymalne. Wynik ten najprawdopodobniej wynika z zastosowania niespecyficznego dla tych gatunków przeciwciała. Dla świni odnotowano w przeszłości negatywne wyniki dla CD 73 i CD105- po wykonaniu barwień histochemicznych okazało się, że MSC były pozytywne dla obu markerów w prawie 100%. Również w analizie western-blot dla MSC świni wspomniane markery dały wynik pozytywny (Gurgul et al., 2018).
- W przypadku konia uzyskane wyniki świadczą o mezenchymalnym charakterze komórek.
- Mrożenie MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranych poubojowo od ww. gatunków wykonano wg protokołu stosowanego dla komórek somatycznych. Znaczne obniżenie jakości morfologicznej komórek po rozmrożeniu wskazuje, że protokoły mrożenia winny być dostosowane do komórek mezenchymalnych.
- Wyniki różnicowania w kierunku osteoblastów, adipocytów i chondrocytów u 3 gatunków zwierząt – podsumowanie.

Różnicowane komórki MSC w:	Konia	Owca	Świnia	
			transgeniczna	nietransgeniczna
osteoblasty	+	+	+	+
adipocyty	+	+	-	+
chondrocyty	+	+	+	+
kontrola	-	-	-	-

- Wybrano najskuteczniejsze pożywki do różnicowania dla każdej linii komórkowej i każdego i gatunku zwierząt.

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 Dzięgiel

Celem pracy było zbadanie wpływu transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek na potencjał rozwojowy transgenicznych zarodków królika uzyskanych *in vitro* oraz ustalenie wpływu wyso-

kiego 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 z grupy doświadczalnej II (podgrupa A i B) oraz grupy III (podgrupa A i B): blastocysty po iniekcji nanocząstek poddawane działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego przed oraz po transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek oraz z grupy kontrolnej”.

W ramach przeprowadzonych prac analizowano poziom ekspresji Casp7, Bax, Bcl11, Oct4, Sox2 u 897 zarodków królika w stadium blastocysty.

Zarodki należały do następujących grup badawczych:

1. Zarodki uzyskane z zygot poddanych mikroiniekcji do przestrzeni okołozótkowej kompleksu sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (PEI) oraz DNA – wektora pmaxRed-N, zawierającego gen kodujący białko fluorescencyjne w stosunku stężenia 50:25 ng/μl (2:1), z których wyodrębniono zarodki wykazujące ekspresję transgenu (grupa Mi +) oraz zarodki, u których nie wykazano ekspresji białka pmaxRed (grupa Mi -) – 106 szt.
2. Zarodki uzyskane z zygot poddanych mikroiniekcji do przestrzeni okołozótkowej kompleksu sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (PEI) oraz DNA i wektora pmaxRed-N, zawierającego gen kodujący białko fluorescencyjne w stosunku stężenia 50:25 ng/μl (2:1) oraz działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w wartościach 20 i 40 MPa – grupa C20+Mi 134 oraz grupa C40+Mi 102 zarodki.
3. Zarodki uzyskane z zygot niemanipulowanych, poddawanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w wartościach 20 oraz 40 MPa – grupa C20 - 206 szt. i grupa C40 - 246 szt.
4. Grupę kontrolną stanowiły 103 zarodki uzyskane z zygot niemanipulowanych.

Zygoty z grup doświadczalnych oraz z grupy kontrolnej były hodowane *in vitro* przez 6 dni. Zarodki po hodowli *in vitro*, ocenione jako blastocysty, zostały zamrożone w ciekłym azocie w pulach liczących od 9 do 17 sztuk, a następnie poddane analizie ekspresji genów: Casp7, Bax, Bcl11, Oct4, Sox2. Analizy przeprowadzono na wyizolowanym z nich mRNA, przy użyciu odczynnika TRI-Reagent (Biolab), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Wyizolowany mRNA poddano odwrotnej transkrypcji do cDNA z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy MMLV-RT (Promega) i Random Hexamers (EurX). Reakcję RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu SYBR Green PCR Master Mix (A&A Biotechnology) i urządzenia 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 $2^{-\Delta Ct}$. Występujące istotne oraz wysoce istotne różnice w ekspresji badanych genów przedstawiono w tabelach 1, 2 i 3.

Tab. 1. Poziom ekspresji wybranych genów w blastocystach królika – grupa kontrolna oraz grupy poddane działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) o wartości 20 MPa (C20) oraz 40 MPa (C40)

Geny \ grupa	Kontrola		C20		C40		SEM
	x	SE	x	SE	x	SE	
OCT4	0,52 ^{Bb}	0,16	6,93 ^A	0,98	4,84 ^a	0,60	0,58
BCL2	0,11 ^B	0,02	0,70 ^A	0,03	0,71 ^A	0,06	0,04
CASP7	0,01 ^B	0,004	0,11 ^A	0,01	0,11 ^A	0,01	0,004

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 wysoce istotnie ($P \leq 0,01$).

Tab. 2. Poziom ekspresji wybranych genów w blastocystach królika – grupa kontrolna oraz grupy poddane działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego o wartościach 20 i 40 MPa oraz mikroiniekcji kompleksu AuPEI/DNA (grupy C20+MI oraz C40+MI)

Geny \ grupa	Kontrola		C20+MI		C40+MI		SEM
	x	SE	x	SE	x	SE	
OCT4	0,52	0,16	4,48	2,69	4,09	1,49	0,83
BCL2	0,11 ^b	0,02	0,37	0,23	0,65 ^a	0,14	0,10
CASP7	0,01 ^B	0,004	0,15 ^A	0,05	0,12 ^A	0,02	0,02

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 wysoce istotnie ($P \leq 0,01$).

Tab. 3. Poziom ekspresji wybranych genów w blastocystach królika – grupa kontrolna oraz grupy zarodków poddanych mikroiniekcji kompleksu AuPEI/DNA: zarodki ze stwierdzoną ekspresją transgenu (MI+) oraz zarodki, u których nie wykazano ekspresji transgenu (MI-)

Geny \ grupa	Kontrola		M-		M+		SEM
	x	SE	x	SE	x	SE	
OCT4	0,52	0,16	0,20	0,19	0,14	0,11	0,10
BCL2	0,11	0,02	0,26	0,24	0,04	0,02	0,08
CASP7	0,01	0,004	0,13	0,12	0,003	0,001	0,04

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 wysoce istotnie ($P \leq 0,01$).

Otrzymane rezultaty poddano analizie statystycznej przy użyciu pakietu STATISTICA 13. Ogólnej charakterystyki dokonano przy użyciu wybranych parametrów statystycznych: średniej arytmetycznej i średniego błędu standardowego (SEM). Na podstawie wyników testu Shapiro-Wilka odrzucono hipotezę o normalności rozkładu dla niektórych zmiennych. Do zweryfikowania hipotezy o braku różnic statystycznych użyto testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. W pozostałych zmiennych spełniających założenia o normalności rozkładu przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA popartą testem post-hoc Tukeya.

W rezultacie przeprowadzonych analiz statystycznych, nie zanotowano statystycznie istotnego wpływu transfekcji kompleksem Au-PEI/DNA na ekspresję badanych genów (grupy Mi+ i Mi-) w odniesieniu do kontroli. Wykazano natomiast wpływ działania wysokiego ciśnienia HHP na ekspresję genów zarówno z grupy czynników transkrypcyjnych istotnych dla rozwoju zarodka (OCT4), jak i regulujących procesy apoptozy – CASP7 oraz BCL2, których poziom był wyższy niż w grupie kontrolnej. Zwiększona ekspresja genu OCT4, obecna w grupach zarodków poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego może być związana ze zmianami w szlakach proliferacji i różnicowania komórek. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) przed mikroiniekcją kompleksu Au-PEI/DNA spowodowało wysoce istotne różnice w ekspresji genów związanych z regulacją procesu apoptozy, w tym wpływ na ekspresję genu kaspazy 7, należącej do grupy kaspaz wykonawczych. Wyższy poziom ekspresji genów, związanych z regulacją apoptozy w tych grupach, może świadczyć o indukowaniu procesów apoptozy w komórkach zarodka poprzez zastosowanie działania wysokiego ciśnienia oraz mikroiniekcji kompleksu nanocząski DNA. W przypadku SOX2 oraz BAX nie stwierdzono wpływu mikroiniekcji kompleksu Au-PEI/DNA i HHP na ekspresję tych genów.

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 jest ustalenie dopuszczalnego czasu i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej u świni i konia, z których izolowane są 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.

Założenia metodyczne

- pobieranie poubojowo szpiku od a) konia, b) świni, c) krowy,
- pobieranie przyżyciowo szpiku od świni,
- izolacja komórek MSC świni, krowy i konia ze szpiku,
- izolacja ASC świni i konia z tkanki tłuszczowej,
- wyprowadzenie linii pierwotnej MSC i ASC i hodowla *in vitro*,
- potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC i ASC
- kriokonserwacja MSC i ASC.

Podsumowanie wyników

- Ustalono dopuszczalny czas i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego u świni, konia i krowy z których izolowane będą MSC.
- Opracowano izolacje ASC z tkanki tłuszczowej świni i konia.
- Częściowo dokonano analizy markerów w wyprowadzonych liniach komórkowych.
- Zbankowano wyizolowane linie komórkowe od 3 gatunków zwierząt, w sumie świnią – 76 kriofiolek, koń – 28 kriofiolek i krowa – 3 kriofiolki.

Zadanie 04-19-10-21

Uzyskanie transgenicznych świń z knock-out (KO) genu miostatyny (MSTN)

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Jura, prof. IZ PIB

Celem zadania jest uzyskanie transgenicznych świń z knock-outem (KO) genu miostatyny (MSTN), czego wypadkową będzie spowodowanie zwiększenia masy mięśni szkieletowych (hipermuskulatura). Aby zminimalizować niekorzystny efekt KO MSTN na rozwój zarodkowy, zastosowane zostaną dwa warianty metodyczne. Wariant pierwszy obejmował będzie uzyskanie transgenicznych świń z KO MSTN w sposób klasyczny – tzn. wektor nokautujący wytworzony w technologii CRISPR/Cas9 spowoduje KO genu miostatyny na etapie zarodkowym. Wariant drugi będzie polegał na użyciu do transfekcji zygot świńskich wektora CRISPR/Cas 9 KO MSTN z systemem opierającym się na rekombinazie Cre indukowanej tamoksyfenem. Pozwoli to na zaplanowane i sterowane włączenie-uruchomienie KO po odsadzeniu prosiąt. Dwuwariantowość proponowanego podejścia spowodowana jest faktem, że tego typu badania są pionierskie i brakuje szerszego udokumentowania w literaturze. Ponadto system Cre nie był do tej pory stosowany u gatunków zwierząt hodowlanych, jedynie u myszy. Efektem zadania będzie uzyskanie transgenicznych świń, które po wykonaniu oceny cech użytkowych będą materiałem wyjściowym do wyprowadzenia nowej linii świń. Linia świń z KO genu MSTN stanowić będzie

unikatowy materiał badawczy do badań molekularnych z zakresu genomiki, proteomiki, badań żywieniowych, hodowlanych, jak również dla badań biomedycznych.

Założenia metodyczne

Zgodnie z przyjętymi założeniami metodycznymi przygotowano 1 wariant konstrukcji genowej – tzn. wektor nokautujący wytworzony w technologii CRISPR/Cas9 powodujący KO genu miostatyny na etapie zarodkowym. Do inseminacji samic dawczyń zygot do transfekcji użyto nasienia wyselekcjonowanych knurów niespokrewnionych z lochami dawczyniami. Kryterium wyboru nasienia do inseminacji była wartość hodowlana knura, przewyższającą średnią dla populacji danej rasy. Przygotowanie dawczyń i biorczyń zygot przeprowadzono według wypracowanych schematów postępowania. Zygoty do transfekcji uzyskiwano metodą chirurgiczną od superowulowanych loszek dawczyń. Przed transfekcją zygoty oceniano morfologicznie i wirowano w celu uwidocznienia przedjądrzy. Wyselekcjonowane zygoty transfekowano wprowadzając do jednego z przedjądrzy konstrukcję genową KO MSTN I w technologii CRISPR/Cas 9 III generacji. Po zabiegu transfekcji ponownie oceniano morfologię zygot. Transfekowane zygoty wprowadzano chirurgicznie do jajowodów zsynchronizowanych loch biorczyń. Od biorczyń pobierano włosy, które konfekcjonowano i przekazano do Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt w celu oznaczenie genotypów dla genów SETD2, TBX2, IGF2 i RYR 1. Badania na prośność przeprowadzono po 35 dniach od transferu.

Syntetyczny opis wyników zadania

Zgodnie z przyjętym harmonogramem do zadania, w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu, została opracowana, przetestowana na komórkach somatycznych *in vitro* i przygotowana do transfekcji konstrukcja genowa KO MSTN I w technologii CRISPR/cas9. Konstrukcja genowa KO MSTN I była dostarczana bezpośrednio przed planowaną transfekcją w stężeniu 4 ng/ μ l.

W ramach przeprowadzonych prac ZD IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o. przygotował 30 zsynchronizowanych i superowulowanych samic-dawczyń. Inseminację dawczyń zygot przeprowadzono nasieniem wyselekcjonowanych knurów. Przygotowanych zostało jednocześnie 25 zsynchronizowanych biorczyń zygot po transfekcji. Od superowulowanych dawczyń uzyskano 364 zygoty. Zapłodnione komórki jajowe poddano transfekcji konstrukcją genową KO MSTN I o stężeniu 4 ng/ μ l. Konstrukcję genową KO MSTN I wprowadzono do jednego z przedjądrzy, uprzednio wyselekcjonowanych zygot. W celu uwidocznienia przedjądrzy, przed zabiegiem transfekcji, zygoty wirowano przez 5 minut z siłą 14000 g. Zabieg transfekcji wykonano na 330 zygotach. Transfekowane zygoty poddano ocenie morfologicznej. Do transferu wyselekcjonowano 311 zygot. Zygoty wprowadzono do jajowodów 9 zsynchronizowanych biorczyń. Po 35 dniach od transferu przeprowadzono badanie na prośność. Stwierdzono 4 prośne lochy. Prośność została potwierdzona w 56. dniu od wykonania transferu. Od biorczyń pobrano włosy w celu wykonania analiz genów SETD2, TBX2, IGF2 i RYR 1, które zostały przeprowadzone w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB.

W rezultacie przeprowadzonych prac uzyskano 4 prośne lochy biorczyń. Wykonano również analizy wybranych genów u loch biorczyń.