

Zakłady Naukowe

Zakład Hodowli Bydła
p.o. Kierownika: 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 było określenie możliwości zmiany parametrów jakościowych i fizyko-chemicznych mięsa wołowego pochodzącego od bydła rasy LM i mieszańców z tą rasą, poprzez modyfikowanie warunków żywieniowych i środowiskowych. Badania prowadzono 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. Propagowanie naturalnych metod chowu, w tym wykorzystanie użytków zielonych i ziół w poprawie jakości i bezpieczeństwa żywności.

Metodyka zadania:

Materiał doświadczalny stanowiło bydło mięsne rasy Limousine oraz mieszańce rasy PHF, ZB i LM o udokumentowanym pochodzeniu i będące pod stałą kontrolą użytkowości. Badania prowadzono w ZD IZ PIB Chorzeliów sp. z o.o.

Zwierzęta były utrzymywane w zbliżonych warunkach środowiskowych z pełnym wykorzystaniem sezonu pastwiskowego, stale uczestniczyły w 3-letnim cyklu produkcyjnym, wg metody opracowanej przez Dobickiego (2007), opartym o dwa sezony (cykle produkcyjne) wycieleń, tj. zimowy (I-II) i wiosenny (III-IV). Przez okres 20 dni wszystkie zwierzęta wytypowane do doświadczenia poddano okresowi przejściowemu (okres adaptacji). W czasie doświadczenia, przed rozpoczęciem kolejnego etapu, we wszystkich badanych grupach rutynowo prowadzono kontrolę masy ciała zwierząt. Losowo z każdej grupy wybrano zwierzęta do uboju i rozbioru prawej półtuszy (4-5 sztuk).

W trakcie doświadczenia wszystkie zwierzęta otrzymywały specjalnie opracowane dawki pokarmowe wzbogacone dodatkami ziółowymi lub olejowymi. Czas podawania dodatku ziół wynosił – 30 dni, natomiast preparatów olejowych – 60 dni. Stale monitorowano zmiany masy ciała, zdrowotność.

W ramach doświadczenia utworzono cztery grupy zwierząt: w grupie kontrolnej – **K** – zwierzęta żywiono standardową dawką żywieniową dla krów mlecznych; z grupy doświadczalnej – **D1** – oprócz pastwiska żywiono dawką wzbogaconą o dodatek chronionych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (oleje tłoczone na zimno oraz wytlók lniany); z grupy doświadczalnej – **D2** – oprócz pastwiska żywiono dawką wzbogaconą o zestaw ziół potencjalnie kształtujących parametry mięsa wołowego (**Z1** oraz **Z2**).

Skład mieszanki Z1: ekstrakt z siemienia lnianego, ekstrakt z pestek winogron, ekstrakt z kurkumy, ekstrakt z arcydzięgla, ekstrakt z czosnku, ekstrakt z majeranku.

Skład mieszanki Z2: ekstrakt z gryki, ekstrakt z cynamonowca, ekstrakt z pestek grejpfruta, ekstrakt z pachnotki, ekstrakt z mięty, ekstrakt z kozieradki.

Mieszanka z udziałem oleju – grupa **D**: olej lniany, olej krokoszowy, wyłtok lniany.

W drugim roku, zwierzęta z poszczególnych grup doświadczalnych D(1-2) i K, zostały skierowane do uboju kontrolnego w wyznaczonej do tego celu rzeźni. Założono, że w okresie prowadzenia badań, kontrolnemu ubojowi zostaną poddane buhajki i cieliczki o wadze co najmniej 380-450 kg.

Podczas ubojów doświadczalnych pobrano próby z mięśnia *longissimus dorsi* w celu określenia parametrów fizycznych, parametrów jakości wołowiny, w tym profilu kwasów tłuszczowych, witaminy E i cholesterolu. Mięso poddawano dojrzewaniu „na mokro”, w układzie a) mięso po pobraniu – 48 h, b) okres dojrzewania – 7 dni, c) okres dojrzewania – 14 dni. W okresie kondycjonowania mięsa próbki przechowywano zapakowane próżniowo w lodówce. Na każdym etapie produkcji mięsa wołowego (od obory do rzeźni) analizowano zagrożenia mikrobiologiczne warunkujące bezpieczeństwo żywności i wysoką jakość produktu. W tym celu pobierano próby mikrobiologiczne.

W trakcie trwania doświadczenia, w pierwszym roku, skierowano do uboju zwierzęta z grupy kontrolnej obejmującej rasę LM oraz ZB. W drugim roku badań spośród zwierząt doświadczalnych utworzono 2 grupy, których dawka pokarmowa została wzbogacona dodatkami ziołowymi – mieszanką ziołową nr 1 (grupa D2-Z1) oraz mieszanką olejową (D1). W trzecim roku zaś 1 grupę doświadczalną, której dawka pokarmowa została wzbogacona dodatkami ziołowymi – mieszanką ziołową nr 2 (grupa D2-Z2). Dodatki podawano w oborze przy wieczornym zadawaniu paszy. Mieszanki ziołowe podawano 30 dni, a dodatek z olejami stosowano przez ostatnie 60 dni przed ubojem.

Po zakończonych dwóch sezonach pastwiskowych zwierzęta losowo kierowano do uboju, a prawe półtusze poddano szczegółowej dysekcji.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań:

Zgodnie z metodyką prawe półtusze zwierząt zostały zważone i poddane szczegółowej dysekcji pod kątem wagi poszczególnych wyrębów kulinarnych. Wszystkie analizowane grupy uzyskały ocenę umięśnienia na poziomie klasy R i O, za wyjątkiem jednej w klasie U, natomiast ocena odtuszczenia w większości dominowała w ocenie 1. (Tab. 1.). Poza trzema osobnikami (47-49%) stwierdzono brak wyraźnych różnic pomiędzy grupami w poziomie wydajności rzeźnej, która wynosiła od 50% do 58%. Średnio najwyższą ocenę uzyskały grupa K kontrolna i D2Z1 – na poziomie 53%, najniższą grupa D2Z1 – 49%. Ze względu na ekstensywny system utrzymania bydła wyniki wydajności także były znacznie poniżej znanej z literatury średniej dla rasy LM. Najwyższy udział udźca w półtuszy stwierdzono w grupie K (41,84 kg), co stanowiło 29,8% masy prawej półtuszy. Najniższy uzysk wagi udźca stwierdzono w grupie D1 (32,19 kg), co stanowiło 25,9% wagi prawej półtuszy. Średni udział kości udźca kształtował się od 5,9 kg do 7,22 kg i stanowił 4,25% do 5,34% masy półtuszy.

Tab. 1. Wyniki dysekcji bydła rasy LM oraz mieszańców – grupy doświadczalne.

Nr krowy	Rasa LRM	Płeć	Ocena umięśnienia	Ocena otluszczenia /pkt/	Wydajność rzeźna /%/	Masa brutto /kg/	Masa netto /kg/	Półtusza prawa schłodzona /kg/	Udział bez gołeni /kg/	Udział kości udźca /kg/
K – grupa kontrolna										
5407110048	100	♂	O+	2-	50	420	268	104,4	26,22	4,80
5407109684	100	♂	R-	2-	51	550	276	139,8	41,78	6,20
5407110031	50	♂	R	2-	53	568	294	149,9	48,36	6,75
5407110017	50	♂	U-	2-	58	575	203	165,9	51,01	6,09
D2-Z1 – mieszanka zielowa 1										
5299019429	100	♀	O	1	53	500	268	132,0	37,94	6,54
5336756201	100	♀	O	1-	50	550	276	134,2	43,40	10,9
5414817169	100	♀	O+	1+	53	550	294	147,0	38,82	6,08
5407110192	100	♀	O	1	51	400	203	100,5	34,20	5,32
5337544975	100	♀	R	1+	58	580	335,6	165,2	41,99	7,28
D1 – oleje+wytloki										
5278558604	100	♀	O-	1	51	510	260	127,8	31,15	7,68
5407110024	100	♀	O-	1+	54	490	263	130,2	31,54	7,42
5353889678	100	♀	O	1+	53	505	267	133,5	36,30	5,98
5402679458	100	♂	O	1-	49	447	216	106,9	31,24	5,66
5402679090	100	♂	R-	1-	48	430	205	103,5	30,72	4,40
D2-Z2 – mieszanka zielowa 2										
5402679373	100	♂	O	1+	48	530	255	127,8	31,87	4,76
5357453264	100	♂	O+	1-	50	568	280	141,0	43,97	7,17
5357454087	100	♂	O+	1-	51	550	278	139,5	35,72	6,75
5357454063	100	♂	O	1+	47	490	231	116,2	30,45	5,28

Szczegółowa dysekcja udźca wykazała, że najwyższy udział zrazowej górnej występował w grupie D1Z1 – 9,52 kg, co stanowiło 7,05% masy półtuszy prawej (Tab. 2.). Najniższy udział stwierdzono w grupie D1 – 7,89 (6,57%). Średni udział zrazowej dolnej w półtuszy stanowił od 4,18% – w grupie D1 do 4,71% – w grupie K, co przełożyło się odpowiednio na 5,02 kg i 6,60 kg.

Wykazano, że udział myszki oraz ligawy był najwyższy w grupie K, a najniższy w grupie D1. Wyręb myszka stanowił od 4,30% masy półtuszy – w grupie D1 do 5,30% – w grupie K, natomiast ligawa od 1,61% – w grupie D2Z2 do 2,10% – w grupie K. W przypadku wyrębu uda-krzyżowa stwierdzono, że najwyższy udział był w grupie K – 4,57% (6,40 kg), a najniższy w grupie D1 – 3,67 (4,41 kg). Najwyższy udział kości stwierdzono u zwierząt z grupy D2Z1 oraz D2Z2 – na poziomie 9 kg – co stanowiło 6,9% masy tuszy. Pozostałe pomiary prezentuje Tab. 2.

Tab. 2. Dysekcja szczegółowa udźca bydła rasy LM i mieszańców – grupy doświadczalne.

Nr krowy	Zrazowa górną mięso /kg/	Zrazowa dolna mięso /kg/	Myszka mięso /kg/	Ligawa mięso /kg/	Krzyżowa mięso /kg/	Pręga brutto /kg/	Pręga mięso /kg/	Pręga kość /kg/	Kości uda i goleni /kg/
K – grupa kontrolna									
5407110017	11,26	8,50	9,33	3,88	7,44	5,91	2,88	3,03	10,02
5407110031	10,02	7,57	6,66	3,22	5,53	6,14	2,47	3,27	10,02
5407110048	7,74	4,43	6,12	2,12	5,40	4,09	1,89	2,20	7,00
5407109684	8,82	5,89	7,60	2,58	7,22	5,22	2,41	2,81	9,01
D2-Z1 – mieszanka ziółowa 1									
5299019429	9,54	5,85	6,60	2,32	5,76	5,60	2,2	3,05	9,59
5336756201	9,60	7,40	7,00	2,95		4,57	4,57	2,25	13,15
5414817169	9,20	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	2,60	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	1,80	3,94	6,36	2,30	3,72	7,42
5353889678	9,10	6,38	5,58	2,38	4,78	7,30	3,92	2,68	8,66
5402679458	8,12	4,94	5,40	2,14	4,58	6,68	3,58	2,70	8,36
5402679090	9,12	4,46	5,70	1,56	4,78	6,66	3,60	2,52	6,92
D2-Z2 – mieszanka ziółowa 2									
5402679373	7,18	4,88	4,68	1,70	4,39	6,58	3,08	2,73	7,49
5357453264	10,95	7,40	7,56	2,62	7,40	10,15	5,74	3,88	11,06
5357454087	11,18	7,69	7,38	2,73	6,88	10,62	6,06	4,05	10,49
5357454063	6,91	4,64	5,39	1,38	3,64	5,40	2,67	2,13	7,42

Udział mięsa łopatki oraz goleni kształtował się średnio od 12,45 kg (D1) do 16,85 kg w grupie K, co stanowiło od 10,37% do 12,03% wagi półtuszy. Największy udział mięsa w goleniu stwierdzono w grupie K, co stanowiło 1,4% masy półtuszy. W obrębie wyrębów wartościowych stwierdzono, że udział mięsa w rozbratlu najwyższy był w grupie kontrolnej K – 5,76 kg (4,11% masy półtuszy), natomiast najniższy w grupie D2Z1 z dodatkiem mieszanki 1 na poziomie 3,96 kg (2,93% półtuszy). Średnio, najwięcej mięsa w antrykocie, uzyskano w grupie D2Z1 (8,67 kg), natomiast najmniej w grupie K (5,72 kg). Udział ich względem masy półtuszy kształtował się od 4,08% do 6,42%. W przypadku rostbifu, najwyższy uzysk charakteryzował grupę K (5,08 kg), co stanowiło 3,62% masy półtuszy, najmniej natomiast w grupie D1 – na poziomie 2,95 kg, co stanowiło 2,45% masy półtuszy. W przypadku polędwicy największy uzysk stwierdzono w grupie D2Z2 z dodatkiem mieszanki ziółowej 1 na poziomie średnim 3,30 kg, natomiast najmniej w grupie D1 z dodatkiem olejów – 2,50 kg. Względem masy półtuszy, to jednak w grupie K uzyskano najmniejszy udział polędwicy – 1,92%.

Zmiany poubojowe następujące w mięsie wołowym pod względem pH przebiegały w sposób typowy dla mięsa tego gatunku. Kwasowość mięsa po 48 godzinach od uboju wahała się średnio od 5,52 – w grupie z dodatkiem ziółowym 1 (D2-Z1) do 5,81 – w pozostałych grupach doświadczalnych. Świadczy to o właściwym przebiegu procesu zakwaszania mięsa po uboju, który powinien zo-

stać osiągnięty po 24 godzinach. Utrzymanie tego poziomu kwasowości przez dalsze okresy kondycjonowania mięsa, z powolnym wzrostem, świadczy o właściwym przebiegu procesu dojrzewania mięsa, niskiej wodorotlenności i dobrej trwałości mięsa, a jednocześnie braku znamion wady DFD.

W grupie doświadczalnej D1, otrzymującej dodatek olejów z wyłtokami lnianymi stwierdzono po 7 dniach dojrzewania najwyższy poziom pH (6,08), po 14 dniach poziom pH (6,14) był również najwyższy spośród wszystkich grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej. Może to świadczyć o pogarszającej się trwałości i jakości mięsa wraz ze wzrastającą wodorotlennością.

Tab. 3. Zmiany pH mięsa w zależności od dodatku paszowego oraz długości okresu dojrzewania.

Grupa doświadczalna	48 h	7 dni	14 dni
K – grupa kontrolna			
10048	bd	5,81	5,96
11031	bd	5,70	6,08
9684	bd	5,73	5,98
10017	bd	5,63	6,09
X		5,72	6,03
grupa doświadczalna – D2-Z1 (mieszanka ziołowa 1)			
19429	5,62	6,13	6,09
56201	5,44	5,97	5,98
17169	5,74	6,02	5,96
10192	5,70	6,01	6,08
44975	5,61	6,03	5,89
X	5,62	6,03	6,00
grupa doświadczalna – D1(oleje+wyłtoki lniane)			
10024	5,75	6,12	6,18
58604	5,87	5,98	6,20
9678	5,84	5,99	6,15
9458	5,91	6,01	6,07
9090	5,7	6,3	6,12
X	5,81	6,08	6,14
grupa doświadczalna – D2-Z2 (mieszanka ziołowa 2)			
7937	5,91	6,09	6,03
3264	5,84	5,91	5,94
5408	5,67	5,92	5,99
5406	5,83	6,05	6,07
X	5,81	5,99	6,01

W próbkach mięsa analizowano profil wyższych kwasów tłuszczowych w przeliczeniu g/100 g wszystkich oznaczonych kwasów tłuszczowych, w zależności od czasu dojrzewania mięsa pobranego z MLD oraz z mięsa pochodzącego z polędwicy dla poszczególnych grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej. Spośród oznaczonych poziomów kwasów na podkreślenie zasługuje szczególnie zróżnicowany poziom wielu kwasów tłuszczowych, tak nasyconych jak i nienasyconych, w mięsie pochodzącym od grupy kontrolnej oraz grupy doświadczalnej żywionej z dodatkiem mieszanki ziołowej 2 w stosunku do pozostałych grup. Pośród oznaczonych kwasów nasyconych w mięsie pochodzącym z grup D2-Z1 oraz D1 stwierdzono wyższy poziom kwasu laurynowego (c12), mirystynowego (c14) oraz palmitynowego (c16). W mięsie wszystkich grup doświadczalnych poziom tych kwasów zmniejszał się wraz z kolejnymi okresami

dojrzwiania, poziom kwasu arachidowego (c20) i behenowego (c22) nie różnił się, niezależnie od grupy doświadczalnej oraz czasu dojrzwiania mięsa. Z kolei poziom kwasu stearynowego był niższy w mięsie pochodzącym z grup D2-Z1 oraz D1. Podobną zależność, tj. podobieństwo poziomu kwasów w mięsie pochodzącym z grupy kontrolnej i grupy żywionej dodatkiem mieszanki ziółowej 2 stwierdzono pod względem udziału kwasów nienasyconych, np. w przypadku kwasów jednonienasyconych palmitoleinowego (c16-1) oraz oleinowego (c18-1). Poziom kwasów gamma-linolenowego (g18-3) oraz erukowego (c22-1) był zbliżony w mięsie wszystkich grup, niezależnie od grupy doświadczalnej oraz czasu dojrzwiania mięsa. Poziom kwasów wielonienasyconych, takich jak: linolowy (c18-2), α -linolenowy (c18-3), arachidonowy (c20-4) był wyższy w mięsie pochodzącym od grupy D2-Z2 oraz kontrolnej. Udział sprzężonego kwasu linolowego (CLA) w najcenniejszej konfiguracji c9-t11 był największy w mięsie pochodzącym od zwierząt żywionych z dodatkiem mieszanki ziółowej 1 oraz dodatkiem olejów z wyłtokami lnia-nymi, w konfiguracji t10-c12 oraz c9-c11 oznaczalną zawartość stwierdzono w mięsie D2-Z1, natomiast w konfiguracji wiązań podwójnych t9-t11 najwyższy udział stwierdzono w grupie D2-Z2. Również w mięsie pochodzącym z tej grupy stwierdzono najwyższy udział kwasu eikozapanteonowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA). Sumarycznie udział kwasów nasyconych (SFA) był zbliżony w mięsie wszystkich grup, najwyższy stwierdzono w grupie D2-Z2 w mięsie dojrzewającym 7 dni, podobnie udział kwasów nienasyconych (UFA). Najwyższy poziom kwasów jednonienasyconych (MUFA) stwierdzono w mięsie z grupy D1 oraz D2-Z1, zaś PUFA (wielonienasyconych) stwierdzono zależność odwrotną. Zliczając udział kwasów PUFA-3 oraz PUFA-6, czyli kwasów wielonienasyconych n-3 i n-6, najwyższy ich poziom stwierdzono w mięsie pochodzącym z grupy D2-Z2, jednocześnie w mięsie tym stwierdzono najwyższe relacje PUFA 6/3 oraz PUFA/SFA (razem z grupą kontrolną). Odwrotnie, najwyższą relację MUFA/SFA określono w mięsie grupy D2-Z1 oraz D1, natomiast łączną, ogólną UFA/SFA w mięsie grup D1 oraz D2-Z2, choć różnice w stosunku do pozostałych grup były niewielkie. W zestawieniu przedstawiono również poziom kwasów DFA, tj. kwasów określanych jako hipocholesterolemiczne (PUFA+c18), przy czym ich poziom w mięsie wszystkich grup był zbliżony, a najwyższy poziom stwierdzono w grupie D2-Z2. Dodatek mieszanki ziółowej 2 nie wpływał prawdopodobnie na zmiany profilu kwasów tłuszczowych w mięsie badanych zwierząt lub jego wpływ był nieznaczny.

W badanych próbkach analizowano również zawartość witaminy E (ug/g) i cholesterolu (mg/g) w zależności od czasu dojrzwiania mięsa oraz dodatku żywieniowego w badanych grupach doświadczalnych. W mięsie pobieranym z mięśnia najdłuższego grzbietu (MLD) z grup doświadczalnych, niezależnie od stosowanego dodatku żywieniowego, stwierdzono niższą zawartość witaminy E w porównaniu z grupą kontrolną (4,34 ug/g), przy istotnie wyższej jego zawartości w polędwicy wszystkich grup doświadczalnych (3,53-4,29 ug/g).

Porównując grupy doświadczalne, najwyższą zawartość witaminy E stwierdzono w MLD z grupy D1 (3,87 ug/g) po 7-dniowym dojrzwianiu, przy czym w pozostałych terminach dojrzwiania stwierdzono również zawartość powyżej 3 ug/g. W MLD pozostałych grup doświadczalnych poziom witaminy E był niższy, mieścił się w granicach 2,47-2,88 ug/g, co może wynikać z dodatku olejowego do paszy. Stwierdzono zależność polegającą na wzroście poziomu witaminy E po 7 dniach dojrzwiania, a następnie spadku do niższego poziomu. Najwyższy poziom cholesterolu stwierdzono w polędwicy zwierząt z grupy D2-Z2 (0,83 mg/g), zaś najniższy w mięsie z MLD grupy D2-Z1 (0,57 mg/g). Poziom cholesterolu w mięsie z grupy kontrolnej kształtował się na poziomie 0,61 mg/g. Stwierdzono wzrost poziomu cholesterolu w MLD każdej grupy doświadczalnej wraz z czasem dojrzwiania, przy czym w każdej grupie doświadczalnej poziom cholesterolu był wyższy w polędwicy niż w mięśniu najdłuższym grzbietu (MLD).

W toku badań przeprowadzono analizę organoleptyczną badanych próbek mięsa. Ocenę dokonał zespół pięciu degustatorów, przeszkolonych w zakresie oceny jakości mięsa wołowego, w skali 5 punktowej (1 – niedostateczny, 5 – bardzo dobry). Oceniano mięso wcześniej poddane obróbce cieplnej. Pod względem kruchości sensorycznej degustatorzy najlepiej ocenili mięso po 14 dniach dojrzewania z grup zwierząt żywionych dodatkowo mieszankami ziółowymi (4,1), natomiast najniższą ocenę uzyskali średnio zwierzęta z grupy kontrolnej. Soczystość mięsa zespół degustujący ocenił na zbliżonym poziomie u wszystkich zwierząt doświadczalnych i grupy kontrolnej. Podobną zależność stwierdzono badając strukturę mięsa. Analizując natężenie i pożądalność smaku, najlepiej oceniono mięso pochodzące od zwierząt z grup doświadczalnych (ocena około 4,2), podobnie oceniając natężenie i pożądalność zapachu, degustatorzy również najbardziej docenili mięso pochodzące z grup doświadczalnych.

W ramach badań mikrobiologicznych próbki zostały poddane testom, aby ustalić: ogólną liczbę tlenowych drobnoustrojów mezofilnych (wg PN-ISO 18593:2018-08 i PN-EN ISO 4833-1:2013) oraz liczbę kałowych bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* (wg PN-ISO 18593:2018-08 i PN-ISO 21528-2:2017-08). Podczas, gdy sposób interpretacji uzyskanych wyników w tych badaniach reguluje, nie tylko w naszym kraju, najnowsze rozporządzenie komisji (WE) NR 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 roku. Zgodnie z zamieszczoną w 2. rozdziale tego rozporządzenia tabelą (kryteria higieny procesu ubojowego), za czyste należy uznać tusze wołowe, których OLD (najbardziej prawdopodobna liczba) mieści się w granicach od 3,5 do 5,0 log jtk/cm², a liczba bakterii rodzaju *Enterobacteriaceae* (kałowe, w tym *E. coli*, *Enterobacter sakazakii* i *Salmonella* sp.) od 1,5 do 2,5 log jtk/cm². Zgodnie ze wspomnianymi kryteriami w przypadku prezentowanych badań należy uznać 11 za najczystsze próbki: ponieważ w toku uboju bywała często dochodzi do zanieczyszczania tuszy kałem przy jej skórowaniu i/lub wytrzewianiu. Niepokoi jednak odnotowana w nich wysoka liczba tlenowych drobnoustrojów mezofilnych, które poza wspomnianymi już procesami mogą pochodzić ze środowiska, w którym dokonano ubój, a ponadto ich liczba może wzrastać nawet przy przechowywaniu próbek w chłodni. Mięso (podobnie jak mleko) stanowi pożywkę dla rozwoju drobnoustrojów. Należące do populacji OLD bakterie zwykle należą do rodzajów: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Bacillus* i *Clostridium*. W przypadku czystych tusz ich wzrost logarytmiczny w chłodni, to co najwyżej 102 jtk/cm². Prezentowane dane są pilotażowymi analizami, ponieważ pochodzą z pierwszego badania w tym kierunku w rzeźniach prowadzonymi przez Instytut.

Wstępne stwierdzenia i wnioski:

1. W ekstensywnym chowie bydła rasy LM i mieszańców stwierdzono niskie wskaźniki wydajności rzeźnej na poziomie 49-58%, bez względu na grupę badawczą.
2. Najwyższy udział udźca w półtuszy stwierdzono w grupie K (41,84 kg), co stanowiło 29,8% masy prawej półtuszy. Najniższy uzysk wagi udźca stwierdzono w grupie D1 (32,19 kg), co stanowiło 25,9% wagi prawej półtuszy.
3. W grupie D1 (dodatek olejów) także poszczególne wyręby udźca były najniższe względem masy półtuszy w odniesieniu do badanych grup doświadczalnych.
4. W obrębie wyrębów wartościowych stwierdzono, że udział mięsa w wyrębie rozbratlu najwyższy był w grupie kontrolnej K – 5,76 kg (4,11% masy półtuszy), natomiast najniższa w grupie D2Z1 z dodatkiem mieszanki 1 na poziomie 3,96 kg (2,93% półtuszy).
5. Średnio, najwięcej mięsa w wyrębie antrykotu uzyskano w grupie D2Z1 (8,67 kg), natomiast najmniej w grupie K (5,72 kg). Jego udział względem masy półtuszy kształtował się od 4,08% do 6,42%.

6. W przypadku rostbefu najwyższy uzysk charakteryzował grupę K (5,08 kg), co stanowiło 3,62% masy półtuszy, najmniej natomiast w grupie D1 na poziomie 2,95 kg, co stanowiło 2,45% masy półtuszy.
7. W przypadku polędwicy największy uzysk stwierdzono w grupie D2Z1 z dodatkiem mieszanki ziółowej 1 na poziomie średnim 3,30 kg, natomiast najmniejszy w grupie D1 z dodatkiem olejów – 2,50 kg.
8. Największe zmiany wagi próbki podczas obróbki cieplnej w zależności od czasu dojrzewania odnotowano w grupie doświadczalnej D2Z1 na poziomie od 42 do 46% w stosunku do masy wyjściowej.
9. Na podstawie zmian pH podczas procesu dojrzewania mięsa wołowego stwierdzono, że przebiegał on we właściwym tempie, przy czym najlepszy poziom osiągnięto w grupie, w której jako dodatek żywieniowy zastosowano mieszankę ziółową 1 (grupa D2Z1).
10. Stwierdzono znaczne zróżnicowanie poziomu kwasów tłuszczowych w mięsie zwierząt doświadczalnych w zależności od zastosowania wariantów dodatków paszowych. Jednak wyniki uzyskane po zastosowaniu dodatku w postaci mieszanki ziółowej 2 (grupa D2Z2) są podobne do uzyskanych w grupie kontrolnej K, co świadczy o niewielkim wpływie na profil kwasów tłuszczowych w mięsie, tak pod względem poziomu wybranych kwasów nasyconych jak i nienasyconych.
11. Najwyższy poziom CLA w konfiguracji cis9-trans1 stwierdzono w mięsie grup żywionych dodatkami ziółowymi 1 (D2Z1) oraz mieszanką olejową D1, natomiast w konfiguracji trans 9-11 w grupie żywionej mieszanką ziółową 2 (D2Z2).
12. Najwyższy poziom kwasów hipocholesterolemicznych (DFA) stwierdzono w grupie żywionej z dodatkiem mieszanki ziółowej 2 (D2Z2), chociaż poziom tych kwasów był zbliżony również w mięsie pozostałych grup doświadczalnych.
13. W mięsie pobieranym z mięśnia najdłuższego grzbietu (MLD) z grup doświadczalnych, niezależnie od stosowanego dodatku żywieniowego, stwierdzono niższą zawartość witaminy E w porównaniu z grupą kontrolną K, przy istotnie wyższej jego zawartości w polędwicy wszystkich grup doświadczalnych.
14. W obrębie grup doświadczalnych najwyższy poziom witaminy E stwierdzono w mięsie grupy żywionej z dodatkiem mieszanki olejów z wyłoków lnianych D1. W mięsie pozostałych grup doświadczalnych poziom witaminy E był niższy, co może wynikać z dodatku olejowego do paszy.
15. W polędwicach grupy żywionej z dodatkiem mieszanki ziółowej 2 (D2Z2) stwierdzono najwyższy poziom cholesterolu, zaś najniższy w mięsie zwierząt żywionych z dodatkiem ziółowym 1 (D2Z1).
16. Stwierdzono wzrost poziomu cholesterolu w mięsie każdej grupy doświadczalnej wraz z czasem dojrzewania, przy czym w każdej grupie doświadczalnej poziom cholesterolu był wyższy w polędwicy niż w mięśniu najdłuższym grzbietu.
17. Analiza organoleptyczna mięsa po obróbce cieplnej wykazała znaczną różnicę ocen pod względem kruchości sensorycznej na korzyść mięsa zwierząt żywionych z dodatkiem mieszanek ziółowych, szczególnie po 14 dniach dojrzewania, w stosunku do grupy kontrolnej. Podczas oceny natężenia i pożądalności smaku i zapachu, najlepiej oceniono mięso pochodzące od zwierząt z grup doświadczalnych, natomiast soczystość oraz strukturę mięsa oceniono podobnie u wszystkich analizowanych grup.
18. W ocenie kruchości aparaturowej stwierdzono prawidłowe zależności spadku siły cięcia wraz z wydłużaniem okresu dojrzewania mięsa, przy czym najlepsze średnie parametry kruchości stwierdzono w grupie żywionej z dodatkiem mieszanki ziółowej 2 (D2Z2) w toku całego procesu dojrzewania.

19. W analizie sensorycznej próbek mięsa stwierdzono nieznaczne zmiany w zależności od czasu dojrzewania, natomiast pod względem twardości i żuźności mięsa najwyższe wartości uzyskano w próbkach pochodzących od grupy kontrolnej, pod względem spoistości i elastyczności dla próbek mięsa z grupy żywionej z dodatkiem mieszanki ziółowej 1 (D2Z1), zaś sprężystość mięsa wszystkich grup była zbliżona, niezależnie od czasu dojrzewania mięsa.

Przedstawiono jedynie wybraną część wyników. Pozostałe zostaną przedstawione w formie publikacji naukowych.

Tab. 4. Ocena organoleptyczna badanych grup doświadczalnych.

Nr próbki	Kruchość			Soczystość			Struktura			Natężenie smaku			Pożądalność smaku			Natężenie zapachu			Pożądalność zapachu		
	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni	48 h	7 dni	14 dni
K – grupa kontrolna																					
10048	2,4	3,6	bd	3,2	4,2	bd	3,2	3,2	Bd	3,2	3,8	bd	3,8	4,2	bd	3,6	3,8	bd	4,0	4,2	bd
11031	3,2	3,4	bd	3,8	3,8	bd	3,6	3,4	Bd	3,4	3,8	bd	3,4	3,8	bd	3,8	3,2	bd	3,8	4,0	bd
9684	2,8	3,2	bd	2,8	3,0	bd	4,0	3,8	Bd	3,4	3,0	bd	3,6	2,8	bd	3,6	3,2	bd	4,0	3,4	bd
10017	3,2	1,6	bd	3,4	2,0	bd	4,0	2,0	Bd	4,0	2,4	bd	3,6	2,2	bd	4,0	2,6	bd	4,2	2,8	bd
średnia	2,9	3,0	-	3,3	3,3	-	3,7	3,1	-	3,5	3,3	-	3,6	3,3	-	3,8	3,2	-	4,0	3,6	-
D2-Z1 (mieszanka ziółowa) 1 – grupa doświadczalna																					
19429	3,5	2,8	3,3	3,8	2,5	2,8	3,3	2,8	3,8	3,3	3,3	2,8	3,8	4,3	3,8	3,8	3,5	3,0	3,8	4,0	3,5
56201	3,5	4,0	4,8	3,3	3,5	4,0	3,5	3,5	4,3	3,5	3,5	3,8	3,5	4,0	4,3	3,5	3,8	3,5	4,5	4,0	4,3
17169	3,5	4,0	4,3	3,8	4,0	3,5	3,3	3,8	4,3	3,3	4,3	3,3	3,8	4,8	4,0	3,5	4,0	3,8	4,0	4,3	4,5
10192	4,3	3,8	3,8	3,5	3,8	3,0	4,0	3,8	4,3	3,8	3,8	2,8	4,5	4,5	3,3	3,8	4,3	3,5	4,8	4,0	3,5
44975	2,5	2,8	4,3	2,5	2,0	2,5	2,8	3,3	4,3	2,8	3,3	3,8	3,8	3,5	3,8	3,0	3,8	3,8	3,5	3,8	4,5
średnia	3,5	3,5	4,1	3,4	3,2	3,2	3,4	3,4	4,2	3,3	3,6	3,3	3,9	4,2	3,8	3,5	3,9	3,5	4,1	4,0	4,1
D1 (oleje+wytlaki lniane) – grupa doświadczalna																					
58604	3,3	3,8	4,0	3,0	3,3	3,3	3,8	3,8	3,3	3,0	3,8	3,5	3,5	4,0	2,8	3,5	3,8	3,3	3,5	4,3	2,8
10024	3,4	3,5	3,3	2,5	3,3	2,3	3,0	3,8	3,8	3,5	3,5	3,0	3,8	4,3	3,3	3,3	3,8	3,5	3,8	4,0	3,8
9678	3,1	3,4	3,3	2,8	3,4	3,1	3,0	3,7	3,7	3,2	3,4	3,1	3,7	4,2	3,7	3,5	3,7	3,6	3,7	4,0	3,9
9458	4,0	3,7	3,8	3,2	3,7	3,5	3,9	3,9	4,2	3,5	3,7	3,4	4,0	4,4	4,5	3,5	4,4	3,9	4,8	4,0	3,5
9090	3,5	3,9	4,8	3,4	3,6	4,2	3,6	3,7	4,4	3,4	3,8	4,1	3,7	4,2	4,5	3,6	3,9	4,1	4,5	4,0	4,3
średnia	3,5	3,7	3,8	3,0	3,5	3,3	3,5	3,8	3,9	3,3	3,6	3,4	3,7	4,2	3,8	3,5	3,9	3,7	4,1	4,1	3,7
D2-Z2 (mieszanka ziółowa) 2 – grupa doświadczalna																					
7937	4,1	3,6	3,7	3,4	3,7	3,1	3,8	3,5	4,1	3,7	3,6	3,4	4,2	4,2	3,5	3,7	4,1	3,5	4,8	4,0	3,5
3264	3,5	3,9	4,7	3,5	3,5	4,1	3,5	3,6	4,4	3,4	3,6	4,1	3,4	4,0	4,2	3,6	3,7	3,5	4,5	4,0	4,3
5408	3,4	3,7	4,2	3,2	3,4	3,5	3,7	3,6	3,8	3,4	3,6	3,8	3,4	4,0	3,7	3,6	3,5	3,3	3,5	4,2	3,0
5406	4,0	3,8	3,6	3,3	3,8	3,6	3,7	4,1	4,1	3,6	3,6	3,6	3,9	4,3	4,4	3,6	4,2	4,0	4,2	4,0	3,8
średnia	3,8	3,8	4,1	3,4	3,6	3,6	3,7	3,7	4,1	3,5	3,6	3,7	3,7	4,1	4,0	3,6	3,9	3,6	4,3	4,1	3,7

Zadanie 01-10-02-11

Implementacja potencjału nowoczesnych metod transkryptomiki, genomiki i genetyki populacji w doskonaleniu cech zdrowotności bydła holsztyńsko-fryzyjskiego na poziomie stad indywidualnych

Kierownik zadania: dr inż. Piotr Topolski

Cel badań:

Identyfikacja zmienności genetycznej (analiza transkryptomu) oraz związku rozpoznanych zmian polimorficznych (analiza genomu) w genomie bydła związanych z podatnością krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej na *mastitis*, *metritis* i występowanie torbieli jajnika oraz opracowanie molekularno-populacyjnych indeksów (wskaźników) selekcyjnych, ułatwiających pracę hodowlaną w zakresie tej grupy cech na poziomie stad indywidualnych.

Założenia metodyczne:

Podstawowy materiał doświadczalny stanowi populacja krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej utrzymywanych w fermach należących do zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Od kilku lat realizowany jest szczegółowy monitoring krów obejmujący stosowanie zabiegów profilaktycznych, prewencyjnych, medycznych oraz występowanie schorzeń, a także jest przeprowadzane regularne genotypowanie części krów. Materiał kliniczny (tkanka gruczołu mlekowego, endometrium oraz cysty jajnika, względnie próbki mleka, krew) do badania profilu ekspresji genów dla każdej jednostki chorobowej zostanie pobrany od 12 krów (6 o stwierdzonej, najwyższej podatności na występowanie *mastitis*, *metritis* i występowanie torbieli jajnika oraz grupy kontrolne krów, obejmujące zwierzęta, które nigdy nie chorowały). Zwierzęta zostaną wytypowane na podstawie wyników analizy fenotypowej, rodowodowej i genetycznej, uzyskanej z systemu baz danych PLOWET oraz w bazach Afifarm i Afifarm Net. Biopsje tkanki gruczołu mlekowego będą wykonywane w ubojniach na zwierzętach brakowanych w gospodarstwach zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Planuje się również pozyskać komórki somatyczne z mleka krów o najwyższej podatności na występowanie *mastitis* oraz grupy kontrolnej krów. W ramach badań zostanie przeprowadzone genotypowanie krów, od których pobrano materiał do analiz RNA-seq. Dodatkowy materiał doświadczalny będą stanowiły genotypy buhajów oraz krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej zdeponowane w bazie genotypów SNP Instytutu Zootechniki PIB, które genotypowano z wykorzystaniem mikromacierzy SNP Illumina EuroG LD (przynajmniej w wersji 8).

Na podstawie informacji zgromadzonych w instytutowych bazach danych oraz materiału pobranego od wytypowanych zwierząt zostanie wykonany szereg analiz: genomu (np. GWAS, CNV), transkryptomu (analiza różnicowej ekspresji genów, analiza ontologii genów, analiza szlaków metabolicznych, identyfikacji lncRNAs, ekspresji specyficznej dla *allelu*), metaanaliza danych, a także analizy z zakresu genetyki populacji.

Wyniki posłużą do opracowania zindywidualizowanych, molekularno-populacyjnych indeksów (wskaźników) selekcyjnych, ułatwiających pracę hodowlaną w zakresie w/w cech zdrowotnych w wysokoprodukcyjnych stadach bydła mlecznego.

Syntetyczny opis wyników zadania:

W ramach realizacji zadania przeprowadzono gruntowną charakterystykę fenotypową, genetyczną i rodowodową danych gromadzonych w bazach oraz wstępną analizę genomu. Wyniki tych analiz posłużyły do opracowania algorytmu pozwalającego na prowadzenie optymalnego – z punktu widzenia realizacji zadania – wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego.

W 2020 roku, w bazie PLOWET, gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych Instytutu. Spośród ok. 3500 rekordów, najczęściej jako pojedyncza choroba występowało *mastitis* (1445 przypadków), *metritis* (1261 przypadków) oraz cysty jajnika (848 przypadków).

W bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 1500 krów z zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Z tej liczby, ponad 1000 krów znajduje się na liście zwierząt odnotowanych w bazie PLOWET.

Na podstawie danych rodowodowych i genomowych przeprowadzono analizę struktury genetycznej populacji krów. W tym celu, w oparciu o identyfikację powtórzeń krótkich odcinków homozygotyczności w genomie, obliczono współczynniki inbredu genomowego (FROH). Badaniami objęto populację 1005 krów, których genotypy zimputowane do gęstości 43 772 SNPs są zdeponowane w bazie SNP IZ PIB.

Wyniki analiz wskazały, że wszystkie krowy są zinbredowane ze średnim FROH, mieszczącym się w przedziale od 0,03% do 16,59%. Przeprowadzono także analizę związku poziomu zinbredowania krów z częstością występowania *mastitis* (MA), *metritis* (ME) i cyst jajnika (OC). Krowy zostały przypisane do trzech grup, w zależności od poziomu FROH: FROH<5% – grupa I, FROH=>5%-<10% – grupa II i FROH=>10% – grupa III. W wynikach najmniejszą frekwencję występowania schorzeń stwierdzono w grupie I: 8,16% (MA), 9,91% (ME) i 7,78% (OC), a największą frekwencję w grupie III, (MA=17,28%, ME=14,12%, OC=15,08%).

Zwiększona częstość występowania *mastitis*, *metritis* i torbieli jajnika wraz ze wzrostem poziomu zinbredowania sugeruje możliwość wpływu depresji inbredowej na wzrost frekwencji występowania tych schorzeń w populacji krów.

W związku z tym, przy opracowywaniu algorytmu optymalizującego wybór zwierząt, poza wynikami analizy fenotypowej, wartości hodowlanych i spokrewnień krów – kandydatek do pobierania materiału biologicznego, uwzględniono także efekt inbredu genomowego. Na tej podstawie wytypowano zwierzęta, od których rozpoczęto pobieranie materiału do badań. Przeprowadzono także badania z zakresu analizy genomu, m.in. analizę asocjacyjną (GWAS) pomiędzy markerami genetycznymi SNP a w/w cechami (schorzeniami). Analizy GWAS przeprowadzono na danych zimputowanych do gęstości 650 000 SNPs za pomocą modelu regresji logistycznej. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 42 SNPs statystycznie istotnie związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 16 genów kandydujących związanych z występowaniem tych schorzeń.

Ponadto, genotypy krów u których stwierdzono schorzenie, zostały poddane analizie jakości pozyskanych genotypów oraz analizie głównych składowych (ang. *multidimensional scaling*). Ze względu na różnorodność mikromacierzy SNP, wykorzystywanych w badaniach, obciążającej wariancję genetyczną dane zostały imputowane z wykorzystaniem oprogramowania findhap (VanRaden i wsp., 2013) oraz informacji rodowodowej wobec mapy referencyjnej genomu bydła ARS-UCD1.2 (Rosen i wsp., 2020).

Podsumowanie:

W bazie PLOWET gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę fenotypową, genetyczną i rodowodową danych gromadzonych w bazach oraz wstępną analizę genomu.

Wyniki tych analiz posłużyły do opracowania algorytmu pozwalającego na prowadzenie optymalnego – z punktu widzenia realizacji zadania – wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego, potrzebnego do realizacji kolejnych etapów zadania.

Zadanie 01-10-03-11

Badania nad celem hodowlanym w warunkach selekcji bydła na wiele cech, ze szczególnym uwzględnieniem rasy simentalskiej

Kierownik zadania: prof. dr hab. Andrzej Żarnecki

Zgodnie z harmonogramem, opracowano metodykę badań i rozpoczęto gromadzenie danych. Ponieważ podstawowym narzędziem selekcji na wiele cech jest indeks selekcyjny, konieczne jest oszacowanie parametrów genetycznych i ustalenie wartości („wag”) ekonomicznych uwzględnianych w selekcji. Ze względu na dużą liczbę cech wchodzących w skład indeksu selekcyjnego, w praktyce hodowlanej cechy są pogrupowane w podindeksy.

W celu oszacowania wartości ekonomicznej poszczególnych cech przygotowano ankietę, która miała dostarczyć dane dotyczące:

1. Warunków organizacyjno-produkcyjnych gospodarstw rolnych:

- obsada stada podstawowego,
- organizacja stada,
- wskaźniki reprodukcji,
- okres użytkowania krów (długowieczność),
- długość laktacji,
- żywienie i ziemiochłonność produkcji,
- organizacja zaplecza paszowego,
- technologia produkcji,
- system utrzymania.

2. Kosztów pasz:

- pasze objętościowe własne i z zakupu,
- pasze treściwe z zakupu,
- koncentraty i dodatki do pasz.

3. Pozostałych kosztów:

- zakup materiału hodowlanego,
- brakowanie i remont stada,
- inseminacja,
- kontrola użytkowości mlecznej,
- wpis do ksiąg hodowlanych,
- usługi weterynaryjne i leki,

- ubezpieczenie stada,
- ubezpieczenia budynków,
- koszty nośników energii,
- usługi produkcyjne,
- usługi ogólnogospodarcze,
- podatki,
- czynniki zewnętrzne.

W okresie sprawozdawczym zostały rozestane i wypełnione ankiety zawierające wymienione powyżej dane, które objęły 50 obór bydła holsztyńsko-fryzyjskiego w woj. podlaskim i 30 obór bydła simentalskiego w woj. podkarpackim. Z systemu SYMLEK dla krów hodowanych w badanych oborach pobrano szczegółowe dane obejmujące pełny zakres cech produkcyjnych i funkcjonalnych. Ze zbiorów ocen wartości hodowlanej szacowanych w Instytucie wybrano konwencjonalne i genomowe wartości hodowlane oraz podindeksy i indeksy PF krów pochodzących z badanych obór. Pozyskane dane są opracowywane w celu ustalenia kosztów i dochodowości produkcji oraz powiązania ich z biologicznymi uwarunkowaniami hodowli.

Opracowano metodykę szacowania parametrów genetycznych niezbędnych do konstrukcji indeksów i podindeksów.

Obliczeniami objęto 12 nowych cech dotyczących przebiegu porodu i okołoporodowej śmiertelności cieląt, wprowadzonych do oceny krajowej i międzynarodowej w okresie sprawozdawczym: przebieg ocielenia (ocielenie 1, 2 i 3) – efekt bezpośredni i matczyny, śmiertelność okołoporodowa cieląt (ocielenie 1, 2 i 3) – efekt bezpośredni i matczyny.

Oszacowania przeprowadzono wg następującego modelu:
MT-ML-BLUP-S-MGS (MT: przebieg porodu i śmiertelność okołoporodowa cieląt, ML: trzy pierwsze laktacje, S-MGS: model ojca-ojca krowy), efekt bezpośredni i matczyny.

Efekty w modelu (dla każdej cechy i ocielenia):

- stado*rok,
- rok ocielenia*sezon ocielenia*płeć cielęcia,
- rok ocielenia*miesiąc ocielenia*wiek ocielenia*płeć cielęcia,
- płeć cielęcia.

W przypadku przebiegu porodu wykonano transformację *Snella* w obrębie ocielenia oraz klas*rok ocielenia*sezon ocielenia*płeć cielęcia. Komponenty wariancji i kowariancji oszacowano za pomocą metody bayesowskiej z użyciem próbkowania Gibbsa.

Tab. 1. Oszacowania odziedziczalności dla przebiegu porodu i śmiertelności okołoporodowej cieląt.

Cecha	Efekt	Ocielenie		
		1	2	3
Przebieg porodu	Bezpośredni	0,157	0,123	0,184
	Matczyny	0,116	0,102	0,136
Śmiertelność	Bezpośredni	0,083	0,064	0,105
	Matczyny	0,063	0,034	0,097

Odziedziczalności, zamieszczone w Tab. 1., mieszczą się w zakresie wartości otrzymywanych w większości krajowych i zagranicznych opracowań. Wielkość oszacowań odziedziczalności dla cech przebiegu porodu i śmiertelności okołoporodowej cieląt uzasadnia celowość

utworzenia nowego podindeksu, obejmującego wszystkie cechy mające związek z przebiegiem ocielen. Konstrukcja podindeksu będzie możliwa po uzyskaniu odpowiednich „wag” ekonomicznych.

W kolejnych etapach przewiduje się konstrukcję następnych podindeksów dla nowych cech oraz indeksu „ogólnego”, obejmującego cechy o największym znaczeniu dla osiągnięcia postępu hodowlanego, przy zachowaniu opłacalności produkcji.

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, prof. IZ PIB

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu preparatu zawierającego bakterie probiotyczne oraz mieszanki zawierającej ekstrakty ziołowe na status zdrowotny cieląt, ich przyrosty masy ciała oraz odporność immunologiczną. W doświadczeniu zastosowano zioła, które według danych literaturowych w badaniach *in vitro* wykazują działanie antybakteryjne, przeciwzapalne oraz immunostymulacyjne. Doświadczenie prowadzone było w ZD IZ PIB Rudawa Sp. z o.o. na 60 cieliczkach rasy polskiej holsztyno-fryzyjskiej w wieku od 2. do 60. dnia życia.

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 celu określenia przyrostów masy ciała ważono zwierzęta zaraz po urodzeniu oraz w 60. dniu życia. W trakcie trwania doświadczenia wykonywano codzienną ocenę statusu zdrowotnego cieląt. Krew oraz kał do wykonania analiz laboratoryjnych pobierano w 7., 30. i 60. dniu po urodzeniu. W krwi oznaczono podstawowe wskaźniki morfologiczne i poziom immunoglobulin, a w kale wykonano badania mikrobiologiczne i parazytologiczne.

Doświadczenie dowiodło korzystne oddziaływanie zastosowanych preparatów na przyrosty masy ciała oraz status zdrowotny cieląt. Najkorzystniejsze efekty uzyskano w przypadku zastosowania mieszanek ziołowych nr 3 i 4 (grupa V i VI). Przeprowadzone badania wykazały, iż grupy otrzymujące te mieszanki (grupa V i VI) miały większe odpowiednio o 17 i 23% dzienne przyrosty masy ciała oraz wyższą końcową wagę ciała w stosunku do grupy kontrolnej. W tych grupach stwierdzono także najniższy procent cieląt, u których wystąpiły objawy biegunki. Także zastosowanie preparatu probiotycznego dało pozytywny efekt w postaci zmniejszenia biegunki oraz większych przyrostów masy ciała, jednak uzyskane efekty nie były tak wysokie, jak w przypadku zastosowania ekstraktów ziołowych.

W okresie badawczym stwierdzono nieregularne wahania liczby leukocytów oraz hemoglobiny, natomiast liczba erytrocytów oraz hematokryt dla wszystkich grup wykazywały tendencje wzrostowe. Zawartość białych krwinek w badanych grupach utrzymywała się w górnych granicach uznawanych norm.

Zastosowanie zarówno preparatu probiotycznego jak i ekstraktów ziołowych korzystnie wpłynęło na koncentrację IgG, IgM, IgA w surowicy. Najwyższe wartości IgG stwierdzono w osoczu w 7. dniu życia w grupie V (18,51 g/L) i w grupie VI (18,91 g/L). Podobne zależności stwierdzono w przypadku stężenia IgA, które najwyższe było w 7. dniu natomiast w 30. i 60. było na zbliżonym poziomie. W przypadku koncentracji IgM badania wykazały wzrost koncentracji przeciwciał w kolejnych dniach życia. Porównując średnią zawartość immunoglobulin (IgG,

IgM, IgA) pomiędzy grupami stwierdzono, iż była ona najniższa w grupie kontrolnej, nieco wyższe wartości stwierdzono w grupach II-IV, średnie wartości były na zbliżonym poziomie, natomiast najwyższą koncentrację na każdym etapie badań stwierdzono w grupie V i VI.

W badaniach mikrobiologicznych kału największą ilość bakterii ogółem stwierdzono na początku badań, czyli w 7. dniu życia, w kolejnych terminach ilości te istotnie ($p \leq 0,05$) malały. Największe ilości bakterii ogółem stwierdzono w grupie I, II i III. Podobne, największe ilości *E. coli* oraz *Clostridium perfringens* stwierdzono w próbkach na początku badań, a w kolejnych pobraniach ilości te systematycznie, istotnie ($p \leq 0,05$) malały. W przypadku gronkowca w grupie I, II i V newralgicznym okazał się pierwszy miesiąc życia, kiedy to stwierdzono istotny wzrost ilości tych bakterii w kale cieliczek. W przypadku bakterii *Shigella* w grupie I, III, IV i V obserwowano spadek ilości tej bakterii w miarę wzrostu zwierząt, natomiast w grupie II i VI największe ilości *Shigelli* stwierdzono w 30. dniu życia. Na początku badań w kale, w żadnej próbce, nie stwierdzono obecności *Salmonelli*. W 30. dniu badań obecność *Salmonelli* stwierdzono w kale grupy kontrolnej (I), probiotycznej (II) oraz pojedyncze kolonie w grupie IV i V. Natomiast pod koniec badań obecność tych bakterii stwierdzono już tylko w kale grupy kontrolnej (I) i probiotycznej (II).

Badania parazytologiczne kału wykazały obecność (oprócz grupy IV) jaja nicieni żołądkowo-jelitowych z rzędu *Strongylida* (średnia intensywność inwazji od 20 do 40 EPG) oraz w grupach I-III kokcydia z rodzaju *Eimeria* sp. (10-30 OPG). Natomiast w grupach IV-VI nie stwierdzono obecności *Eimeria* sp. W żadnej z badanych prób kału badania parazytologiczne nie wykazały obecności oocyst *Cryptosporidium* sp.

Podsumowując, można stwierdzić, iż podawanie mieszanek ekstraktów ziołowych nr 3 i 4 miało najbardziej korzystny wpływ na przyrosty masy ciała, parametry morfologiczne krwi, stężenie immunoglobulin oraz mikrobiologię i parazytologię kału u cieląt.

Zadanie 04-10-08-11

Identyfikacja krów mlecznych rasy simental pod względem zawartości β -kazeiny typu A2 oraz możliwości wykorzystania mleka od nich pochodzącego do produkcji napojów fermentowanych

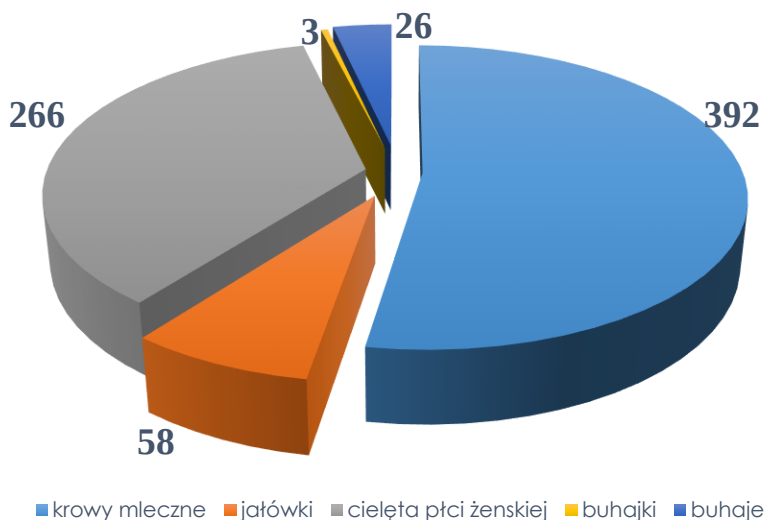
Kierownik zadania: dr hab. Iwona Radkowska, prof. IZ PIB

Ze względu na rosnącą liczbę osób cierpiących na liczne alergie pokarmowe, w tym związane z konsumpcją mleka, istnieje potrzeba przebadania i promowania mleka pochodzącego od krów o korzystnym typie β -kazeiny A2 oraz produktów powstałych na bazie tego mleka. Obecnie wszystkie buhaje ras wysokomlecznych mają w katalogach podany genotyp kappa – kazeiny CASK (A, B, E), a niektóre również gen β -kazeiny CSA2 (A1, A2), jednak tego typu badaniami w Polsce nie są objęte buhaje rasy simental. Brak jest również jakichkolwiek badań dotyczących frekwencji genu β -kazeiny CSA2 (A1, A2) w populacji bydła rasy simental. Stąd też nie ma informacji na temat genetycznych uwarunkowań produkcji kazeiny u córek buhajów tej rasy.

Dlatego celem I etapu badań była identyfikacja krów i buhajów pod względem genu β -kazeiny. Badania prowadzone były w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o., który posiada największe stado krów mlecznych rasy simental w Polsce.

W 2020 roku pobrano materiał genetyczny do badań, w celu oznaczenia genu β -kazeiny, od 392 krów mlecznych, 58 jatek oraz 266 cieląt płci żeńskiej i 3 buhajków. Pozyskano także materiał genetyczny od 26 buhajów używanych do inseminacji w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o.

Wykres 1. Ilość pobranych próbek materiału do badań genetycznych.

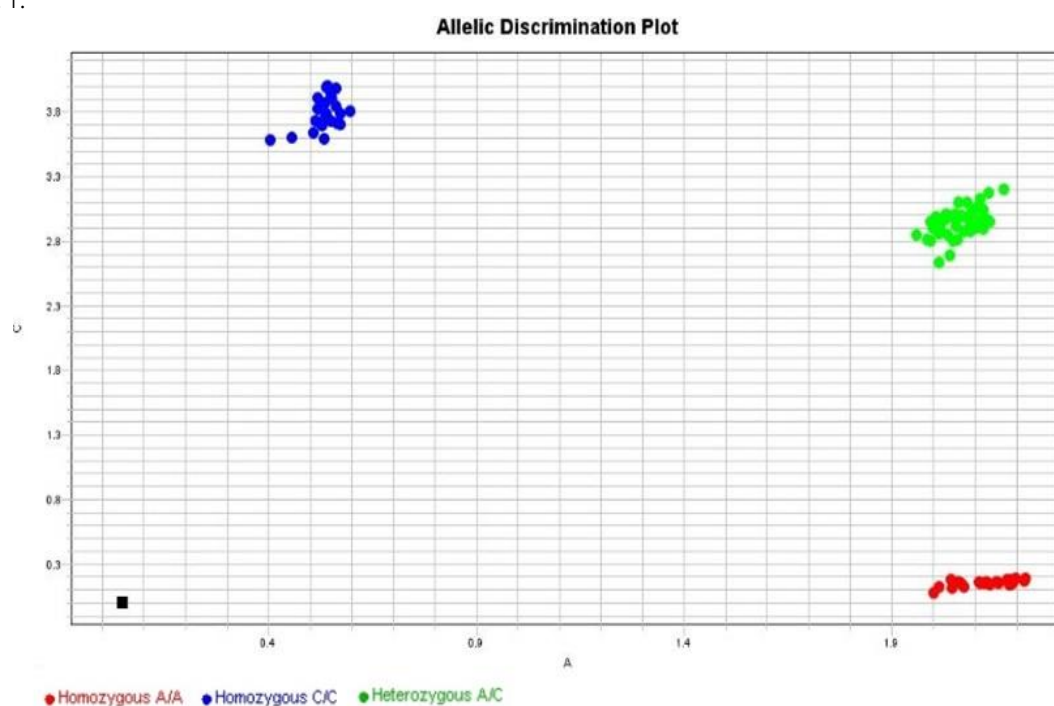


Oznaczenia wykonano dla wszystkich krów oraz 74 próbek pobranych od cieląt. Z pozostałych próbek wyizolowano DNA i będą one systematycznie oznaczane w 2021 roku.

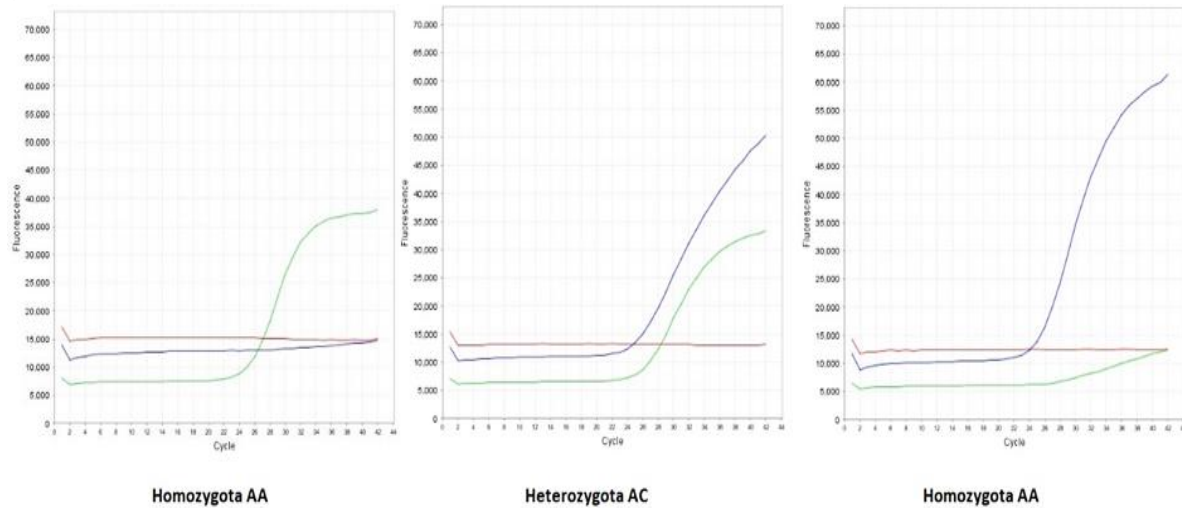
Poprawność genotypowania locus SNP: rs43703011 (polimorfizm genu CSN2 w egzonie 7. GenBank (M55158), g.8101C>A) została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych próbek o różnych genotypach.

Ponadto, poprawność genotypowania tego locus SNP została zweryfikowana na podstawie testu międzynarodowego – Bovine Comparison Test STR zorganizowanego przez ISAG (International Society for Animal Genetics, Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt) we wcześniejszych latach, uwzględniającego porównanie genotypów 20 próbek referencyjnych pomiędzy laboratoriami z całego świata (z laboratoriami, które oprócz genotypów markerów rekomendowanych do identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów zamieściły także genotypy próbek dla locus SNP: rs43703011).

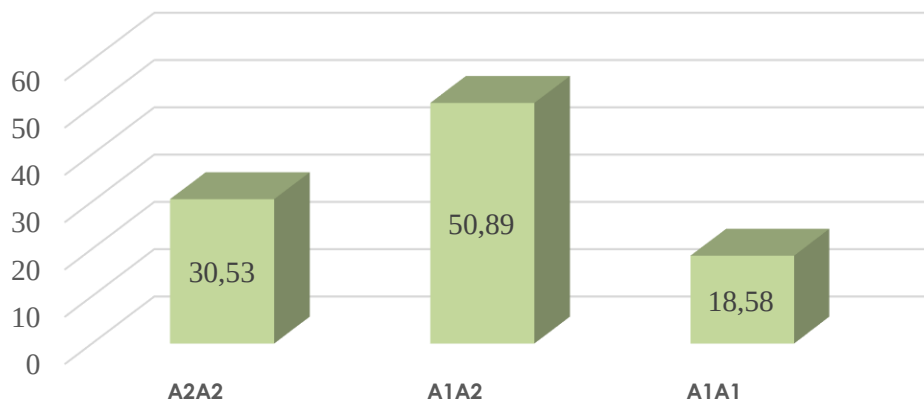
Ryc. 1.



Ryc. 2.



Przeprowadzone oznaczenia 392 krów rasy simental pod względem identyfikacji genów kodujących β -kazeinę wykazały, iż 30,5% przebadanych krów jest homozygotami A2A2; 50,9% to heterozygoty A1A2 i 18,6% to homozygoty A1A1.

Wykres 2. Frekwencja genu β -kazeiny (A1A1, A1A2 i A2A2) u krów rasy simental w ZD IZ PIB w Odrzechowej (%).

Genotypowanie cieląt wykazało, iż 45,7% cieliczek jest homozygotami A2A2, 50% to heterozygoty A1A2, a tylko 4,3% to homozygoty A1A1.

Wykres 3. Identyfikacja cieląt płci żeńskiej genu β -kazeiny (%).

Głównymi czynnikami wpływającymi na obecność β -kazeiny typu A1 lub A2 w mleku krowim są uwarunkowania genetyczne. W zależności od struktury genetycznej poszczególnych krów, w mleku może być obecny jeden lub obydwa typy β -kazeiny. Kazeina A1 i A2 różnią się budową białka, mutacja powodująca różnice w białku β -kazeiny jest wynikiem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w kodonie 67. w eksonie 7. genu CCT (A2, prolina), na CAT (A1, histydyna), zatem kazeina A2 zawiera resztę proliny, podczas gdy kazeina A1 resztę histydyny.

Badania przeprowadzone przez Miluchová i in. (2014) dla rasy simentalskiej wykazały następującą frekwencję poszczególnych genotypów: homozygotyczny genotyp A1A1 – 0,1261, heterozygotyczny genotyp A1A2 – 0,3333 i homozygotyczny genotyp A2A2 o frekwencji 0,5405.

W badaniach wykazano, iż genotypowanie buhajów pod względem β -kazeiny i preferowanie *allelu* A2 może przynieść dwie korzyści: zwiększenie wartości hodowlanej w zakresie zawartości białka i zmniejszenie częstości występowania wariantu białka A1, uznanego za czynnik ryzyka dla zdrowia ludzi.

Przeprowadzone badania krów mlecznych i cieląt rasy simental wykazały największą frekwencję heterozygotycznego genotypu A1A2 (50,8 i 50%), następnie homozygotycznego genotypu A2A2 (30,5 i 45,7%), natomiast najniższą frekwencję stwierdzono dla homozygotycznych genotypów A1A1 (18,5 i 4,3%). Wykonane oznaczenia umożliwią prowadzenie prac hodowlanych w kierunku produkcji mleka A2 i przyczynią się do poszerzenia wiedzy na temat frekwencji poszczególnych genotypów β -kazeiny w stadzie bydła mlecznego ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o.

Zakład Hodowli Trzody Chlewnej
p.o. Kierownika: 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

Cel zadania:

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

Planowane efekty naukowe i praktyczne:

- Zastosowanie metody RNA-seq oraz przeprowadzone analizy statystyczne dadzą aktualnie najbardziej obiektywny obraz genetycznych mechanizmów warunkowania zmienności w obrębie analizowanych cech.
- Umożliwienie pomiaru ekspresji genów w skali całego genomu, w tym dokładne określenie poziomu transkryptu genów ulegających niskiej ekspresji.
- Uzyskanie przewagi w stosunku do techniki mikromacierzy cDNA, poprzez wykrywanie nowych transkryptów lub izoform oraz detekcja nowych mutacji w sekwencjach kodujących.

- Analiza sumarycznego oddziaływania całego spektrum genów na daną użytkowość (bardziej obiektywna niż dotychczasowe analizy wpływu pojedynczych genów).
- Poznanie puli genowej odpowiedzialnej za zmienność krajowej populacji świń w zakresie analizowanych cech (ważnych z ekonomicznego jak i konsumenckiego punktu widzenia).

Zastosowanie nowej metody analitycznej (RNA-seq) umożliwia najbardziej obiektywne poznanie genetycznych podstaw warunkujących wybrane cechy użytkowe i może posłużyć do opracowania nowoczesnych metod hodowlanych.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie i całym zadaniu:

Harmonogram zadania w aktualnym okresie sprawozdawczym przewidywał „Dokończenie analiz bioinformatycznych oraz analiz asocjacyjnych”. Efektem realizacji tego etapu jest kompleksowe opracowanie końcowe zadania, obejmującego 59 stron maszynopisu. Uzyskane w badaniach wyniki przedstawiono w sposób czytelny i wyczerpujący w 43 tabelach i 8 figurach. W tabelach 1-9 przedstawiono dane z analiz genetycznych (frekwencje poszczególnych form analizowanych genów). Informacje te są szczególnie istotne w procesie typowania potencjalnych markerów genetycznych i zostały wykorzystane przy omawianiu wpływu tych mutacji na poszczególne grupy cech. W tabelach 10-17 przedstawiono wyniki wybranych cech rzeźnych i tucznych dla wszystkich analizowanych zwierząt oraz dla poszczególnych ras świń. Natomiast, w tabelach 18-43 przedstawiono właściwe wyniki wpływu mutacji badanych genów na poszczególne cechy, ze szczególnym uwzględnieniem cech jakości mięsa i tuszy świń.

Ze względu na obszerność materiału wynikowego w niniejszym opracowaniu przedstawiamy jedynie stwierdzenia i wnioski, jakie uzyskano w czasie realizacji zadania.

Stwierdzenia i wnioski na podstawie przeprowadzonych badań:

1. Rasy objęte badaniami stanowiące zarówno komponent ojcowski (Duroc, Pietrain) jak i mateczny (wbp, pbz, puławska) charakteryzują się dobrymi parametrami zarówno tucznymi jak i rzeźnymi, zgodnie z założeniami jakie są podstawą programów hodowlanych krajowej hodowli zarodowej, w których to wymienione rasy uczestniczą.
2. Stwierdzono niski poziom tłuszczu śródmięśniowego (IMF) w mięśni najdłuższym grzbiecie w najliczniejszej grupie zwierząt powszechnie wykorzystywanych w hodowli krajowej, czyli rasach wbp i pbz. Średnie wartości tego parametru dla tych ras kształtowały się dużo poniżej progu mięsa dobrej jakości (2%) i wynosiły odpowiednio 1,31% dla zwierząt rasy wbp i 1,28% dla pbz. Zwierzęta rasy Duroc jako jedyna grupa uplasowała się powyżej tego progu (2,37%). Duża zmienność wyrażona współczynnikiem zmienności w zakresie poziomu tłuszczu śródmięśniowego (IMF), jak również pozostałych parametrów jakości i tekstury mięsa, może świadczyć o ewentualnej możliwości poprawy tych wskaźników.
3. Analiza struktury analizowanych genów u świń ras wbp, pbz, puławska, Duroc i Pietrain wykazała wysoką polimorficzność genu GPAT1, LDLR, PPARGC1_1 oraz niską pozostałych genów. Badana populacja świń znajdowała się w stanie nierównowagi Hardy'ego Weinberga pod względem polimorfizmów: GPAT1_1, GPAT1_2, GPAT2_1 i PPARGC1_3, co może świadczyć o tym, że loci badanych genów ulegały zmianom na skutek selekcji hodowlanej, a więc mogą mieć potencjalny związek z cechami produkcyjnymi.

4. Duże zróżnicowanie frekwencji analizowanych mutacji genu PPARGC1 zarówno w obrębie danej mutacji pomiędzy rasami, jak i pomiędzy poszczególnymi mutacjami, daje nadzieję korzystnych wyników odnośnie analiz asocjacyjnych z cechami użytkowymi, zwłaszcza w ujęciu haplotypowym.
5. Większość analizowanych układów genetycznych rzutowała na poziom cech rzeźnych, głównie związanych z parametrami polędwicy i szynki. Największe różnice w przypadku tego wskaźnika obserwowano dla trzeciej mutacji genu PPARGC1.3. Zwierzęta o genotypie AA charakteryzowały się niemal 10 cm² większą powierzchnią oka polędwicy w stosunku do heterozygot przeciwnych (GG) oraz prawie 1,6 kg cięższą szynką zadnią bez słoniny i skóry, przy jednocześnie cieńszej słoninie z 5 pomiarów. Jednakże, frekwencja korzystnej formy (AA) jest już w populacji niemal 100%, co wyklucza tę mutację z możliwością zastosowania jej jako markera genetycznego w pracach selekcyjnych. Równie wysokie różnice pomiędzy wyżej wymienionymi cechami obserwowano w przypadku mutacji 2 tego genu. W tym przypadku korzystniejszą formą jest *allel B*. Jedynym minusem tej sytuacji jest stosunkowo niska frekwencja tego *allelu* w populacji (około 14%), ale nie na tyle niska by wyeliminować tę mutację z kandydatów na marker genetyczny.
6. W przypadku analiz wytypowanych genów i ich mutacji na wybrane wskaźniki jakości mięsa stwierdzono głównie zależność z poziomem tłuszczu śródmięśniowego IMF i odczynu mięsa (polędwicy) 45 minut po uboju.
7. Mutacje GPAT1_1 i GPAT1_3, pomimo wpływu na poziom tłuszczu śródmięśniowego, nie mogą zostać wykorzystane w selekcji w kierunku poprawy cech jakości mięsa, ze względu na ich niekorzystne oddziaływanie na niektóre parametry tekstury mięsa oraz użytkowości rzeźnej (brak kierunkowego oddziaływania w stosunku do poziomu IMF).
8. W przypadku mutacji GPAT2_1 stwierdzone zmiany w poziomie cech użytkowych obserwowano dla większej grupy badanych zwierząt, a ponadto nie wykazywały one niekorzystnych trendów obserwowanych pomiędzy grupami cech użytkowych. Jednak frekwencja korzystnego genotypu (TT) w populacji wynosi zaledwie 2% i jest zbyt niska, aby umożliwiała wykorzystanie tej mutacji w praktyce hodowlanej w roli markera genetycznego.
9. Analiza zbiorcza różnych grup cech użytkowych odnośnie genetycznego warunkowania tych cech może dać całkowicie różną odpowiedź w zakresie możliwości wykorzystania analizowanych genów jako markera genetycznego, niż podejście ukierunkowane tylko na jedną grupę cech lub pojedyncze cechy.
10. Jakkolwiek korzystne zależności w zakresie cech rzeźnych obserwowane dla mutacji 2. genu PPARGC1_2 i LDLR, skonfrontowane z wynikami dla cech jakości mięsa, a głównie dla poziomu tłuszczu śródmięśniowego (IMF) w polędwicy mogłyby wykluczyć gen LDLR z kandydatów na marker genetyczny warunkujący poprawę cech jakościowych mięsa. Osobniki posiadające korzystniejszy *allel* tego genu dla cech rzeźnych (G) okazują się równocześnie zwierzętami, które posiadają istotnie niższy poziom pożądanego przez nas tłuszczu w polędwicy (IMF). Jednakże nie potwierdziło się to w formie niskich parametrów sensorycznych analizowanego mięsa. W przypadku genu PPARGC1_2 takich zależności niekorzystnych nie stwierdzono.

11. Przeprowadzone analizy statystyczne w obrębie cech tucznych wykazały, że jedynie poszczególne genotypy genu PPARGC1A i FTO wpływały na różnicowanie poziomu tej grupy cech. Brak takiego oddziaływania jest też korzystną informacją z punktu widzenia hodowlanego, bowiem potencjalne wykorzystanie tych mutacji jako markerów genetycznych dla cech rzeźnych czy jakości mięsa nie skutkowałoby zmianami w tej grupie cech.
12. Analizując kompleksowo wszystkie grupy cech (tuczne, rzeźne, jakość mięsa) i kierując się uzyskanymi wynikami, trudno wytypować spośród wybranych genów jednego kandydata, który korzystnie oddziaływałby na całe spektrum analizowanych cech. Wobec tego nasuwa się propozycja, aby w obrębie poszczególnych ras, na potrzeby aktualnego programu hodowlanego mającego na uwadze poprawę cech jakości mięsa, tworzyć linie zwierząt predysponowanych do przekazywania swojemu potomstwu genów związanych z lepszymi parametrami dla poszczególnych grup użytkowości.

Ze względu na zakończenie zadania, jak i na to, że jednym z założeń badań było poszukiwanie genetycznych mechanizmów efektywności wykorzystania paszy (jej konwersji), która jest bardzo istotna w procesie produkcji tuczników, rzutująca wręcz na całą opłacalność procesu tuczu na tym etapie te poszukiwania się nie powiodły. Dalsze prace nad tym kierunkiem będą kontynuowane prawdopodobnie w ramach nowych badań i bardziej szczegółowych analiz statystycznych. Działania te będą miały na celu dokonanie kolejnych analiz bioinformatycznych na tym bogatym materiale, przy założeniu innych kryteriów progowych, a może i innych, nowszych aplikacji. Być może to pozwoli na wytypowanie kolejnej grupy genów kandydatów potencjalnie warunkujących tą tak ważną z ekonomicznego i hodowlanego punktu widzenia grupę cech.

Zadanie 01-11-03-11

Analiza wpływu immunokastracji na parametry użytkowości tucznej, rzeźnej i jakość mięsa jako alternatywa dla metody chirurgicznej

Kierownik zadania: dr inż. Martyna Małopolska

Celem zadania jest ocena metody immunokastracji preparatem Improvac prowadzonej w warunkach krajowych. Zastosowana metoda oraz przeprowadzone analizy dadzą kompleksowe informacje odnośnie alternatywnej metody kastracji i jej opłacalności. Ocenie poddana zostanie użytkowość tuczna, rzeźna i jakość mięsa knurków, wieprzków (kastrowanych chirurgicznie) oraz immunokastratów, a także zostanie określony poziom kortyzolu u analizowanych zwierząt. Przeprowadzona zostanie również analiza morfometryczna jąder, określenie poziomu skatolu, androstenonu i lotnych związków organicznych, analiza ekonomiczna oraz określenie ryzyka wprowadzenia przedstawionej metody. Dopełnieniem metody będzie wykonanie analiz z zakresu biologii molekularnej, które przybliżą procesy komórkowe w tkance tłuszczowej, mięśniowej, przysadce, wybranym fragmencie jelita cienkiego oraz jądrach. Będzie to także próba identyfikacji markera genetycznego, który może zostać wykorzystany w programach hodowlanych do eliminacji knurzego zapachu z populacji aktywnej świń.

Celem etapu było: typowanie materiału zwierzęcego do badań, ocena tuczna i rzeźna świń; ocena morfometryczna jąder; gromadzenie danych oraz materiału biologicznego do oznaczeń laboratoryjnych, morfometrycznych, genetycznych, dobrostanowych, parametrów

jakościowych mięsa wieprzowego; rozpoczęcie oznaczeń dotyczących tekstury i jakości mięsa.

Założenia metodyczne:

- Ocena tucza przeprowadzona na Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTC) w układzie 3 grupowym:
 - knurki – nie poddane zabiegowi kastracji,
 - wieprzki – poddane chirurgicznej kastracji bez znieczulenia do 7. dnia życia,
 - immunokastraty – dwukrotna iniekcja analogu czynnika uwalniającego gonadotropiny (GnRH).

W 2020 roku badaniom poddano 60 osobników (po 20 w każdej grupie).

- Dysekcja póltusz oraz ocena morfometryczna jąder (jeśli występują). Zostały zgromadzone i przeanalizowane cechy użytkowości tucznej i rzeźnej dla 60 osobników. Przeprowadzono analizy morfometryczne jąder, które obejmowały masę, długość, szerokość jąder pozyskanych od knurków i immunokastratów. Dodatkowo analizowano gruczoły dodatkowe – cewkowo-opuszkowe i pęcherzykowe.
- Gromadzenie materiału badawczego (szczeciny) do oznaczeń kortyzolu u analizowanych osobników. Pobieranie szczeciny następowało dwa tygodnie po przeprowadzonym zabiegu kastracji u wieprzków i knurków (grupa kontrolna), następnie dwa tygodnie po każdej iniekcji preparatu Improvac (immunokastraty) i u knurków (grupa kontrolna).
- Przeprowadzenie oceny jakości mięsa u 30 osobników.

Dodatkowe założenia metodyczne:

- Gromadzenie materiału badawczego – śliny – założenie metodyczne dodatkowe w ramach współpracy z Czeskim Uniwersytetem Rolniczym w Pradze.
- Badanie ultrasonograficzne mięśnia najdłuższego grzbietu oraz jąder (jeżeli występowały).

Kompleksowa analiza zagadnienia immunokastracji pomiędzy poszczególnymi obszarami, jak również wewnątrz każdego z nich, daje realne szanse do podjęcia prób wprowadzenia tej metody jako zamiennik kastracji chirurgicznej (bez znieczulenia), bądź ukierunkowania hodowców, producentów na alternatywne metody kastracji.

Syntetyczny opis wyników badań:

Badania wykonano na knurkach i wieprzkach rasy polska biała zwistoucha, pochodzących od hodowcy z województwa małopolskiego. Pierwsze pobranie szczeciny u prosiąt wykonywano u hodowcy, po uzyskaniu odpowiedniej masy ciała, świnie zostały przewiezione do Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTC) w Chorzelowie, gdzie nastąpiły kolejne etapy doświadczenia. Zwierzęta utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywienie odbywało się w systemie *ad libitum*, drobno granulowaną mieszanką o znanym i stałym składzie zadawaną z automatów. Ilość pobieranej paszy była ściśle kontrolowana. Pozostałe warunki utrzymania i postępowania ze zwierzętami były zgodne z dotychczasową metodyką oceny w stacjach kontroli. W okresie sprawozdawczym przekontrolowano 60 osobników, które przebywały w stacji w dwóch okresach – letnim – od czerwca do września oraz jesiennym – od września do grudnia. W tabelach poniżej zestawiono dane uzyskiwane w czasie tuczu kontrolnego, dysekcji oraz wyniki oceny morfometrycznej jąder dla całej grupy zwierząt.

Tab. 1. Wyniki oceny tucznej w poszczególnych grupach badawczych (średnia $\pm$ odchylenie standardowe).

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
Przyrost dzienny w teście (g) (30-120 kg)	1129,2 $\pm$ 166,61	1177,4 $\pm$ 97,45	1035,6 $\pm$ 94,29
Zużycie paszy w teście (kg)	238,6 $\pm$ 59,83	219,1 $\pm$ 30,83	266,65 $\pm$ 29,80
Dziennie pobranie paszy (kg)	2,95 $\pm$ 0,75	2,84 $\pm$ 0,26	2,99 $\pm$ 0,23
Zużycie paszy na 1 kg przyrostu (kg)	2,98 $\pm$ 0,75	2,74 $\pm$ 0,39	3,33 $\pm$ 0,37
Dni tuczu (dni)	79,8 $\pm$ 11,71	77 $\pm$ 8,25	89,35 $\pm$ 7,99
Waga żywa w dniu uboju (kg)	119,6 $\pm$ 3,13	120 $\pm$ 3,16	121,85 $\pm$ 2,32

Tab. 2. Wyniki oceny rzeźnej w poszczególnych grupach badawczych (średnia $\pm$ odchylenie standardowe).

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
Wydajność rzeźna (%)	74,38 $\pm$ 1,48	74,8 $\pm$ 1,22	77,19 $\pm$ 1,94
Masa polędwicy (kg)	7,51 $\pm$ 0,43	7,77 $\pm$ 0,82	8,28 $\pm$ 0,59
Masa szynki zadniej (kg)	11,70 $\pm$ 0,64	11,94 $\pm$ 0,81	12,52 $\pm$ 0,49
Masa szynki właściwej (kg)	10,17 $\pm$ 0,66	10,20 $\pm$ 0,23	10,53 $\pm$ 0,46
Szerokość oka polędwicy (cm)	10,66 $\pm$ 1,17	11,5 $\pm$ 0,92	11,21 $\pm$ 0,76
Wysokość oka polędwicy (cm)	6,38 $\pm$ 0,94	6,28 $\pm$ 0,39	6,57 $\pm$ 1,33
Powierzchnia oka polędwicy (cm ²)	52,48 $\pm$ 4,84	57,22 $\pm$ 4,25	55,79 $\pm$ 14,21
Procent mięsa w tuszy (%)	59,30 $\pm$ 0,12	59,47 $\pm$ 0,09	59,21 $\pm$ 0,24
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm)	1,27 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,13	1,73 $\pm$ 0,33

Następnie, na zgromadzonym materiale biologicznym z mięśnia najdłuższego grzbietu, oznaczone zostały parametry tekstury mięsa (Tab. 3.). Parametry te były analizowane przy użyciu analizatora tekstury TA.TX PLUS firmy Stable Micro System z wykorzystaniem procedur: analizy siły cięcia (Warner Bratzler Blade Set HDP) i testu podwójnego ściskania.

Tab. 3. Parametry tekstury mięśnia najdłuższego grzbietu wszystkich analizowanych osobników.

Wskaźniki	Średnia	Odchylenie standardowe
Jędrność	55,20	10,90
Wytrzymałość	129,18	20,41
Twardość	11,18	2,81
Spoistość	0,65	0,03
Sprężystość	0,71	0,04
Żujność	5,31	1,52
Elastyczność	0,29	0,17

Ocenę morfometryczną jąder przeprowadzono poubojowo w SKURTCh w Chorzeli (Tab. 4.).

Tab. 4. Cechy morfometryczne jąder knurów i immunokastratów (średnia $\pm$ odchylenie standardowe).

	Knury		Immunokastraty	
	Prawe	Lewe	Prawe	Lewe
Jądro				
Masa jądra (kg)	0,24 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,03
Masa najądrza (kg)	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
Długość jądra (cm)	13,2 $\pm$ 2,01	13,53 $\pm$ 1,69	9,01 $\pm$ 1,31	8,99 $\pm$ 1,59
Szerokość jądra (cm)	8,29 $\pm$ 1,92	8,40 $\pm$ 1,66	5,33 $\pm$ 1,43	5,69 $\pm$ 1,73
Obwód jądra (cm)	18,92 $\pm$ 2,30	19,20 $\pm$ 2,52	12,22 $\pm$ 2,62	12,11 $\pm$ 2,12

Zadanie 01-11-04-11

Opracowanie systemu tuczu dla rasy złotnickiej pstrej z wykorzystaniem mieszanek i dodatków paszowych pochodzenia krajowego w celu produkcji mięsa wieprzowego o wysokiej jakości i wartości prozdrowotnej dla człowieka

Kierownik zadania: dr hab. Magdalena Szyndler-Nędza

Celem praktycznym zadania jest opracowanie szczegółowej procedury tuczu świń rasy złotnickiej pstrej, uwzględniającej dedykowane pełnoporcjowe mieszanki paszowe z udziałem krajowych komponentów białkowych i innowacyjnego dodatku, które wraz ze wskazaniem właściwej ubojowej masy ciała, będą podstawą produkcji wysokojakościowego produktu, w postaci wieprzowego surowca rzeźnego o prozdrowotnej dla człowieka jakości.

Celem naukowym jest poznanie wpływu opracowanego sposobu żywienia i innowacyjnego dodatku paszowego na status zdrowotny świń oraz szeroko pojętą jakość i trwałość oksydacyjną mięsa i tłuszczu oraz ocena czy, lub w jakim stopniu, poprawa tych cech w mięsie przekłada się na jakość i trwałość wyrobów wędliniarskich.

Założenia metodyczne:

Zadanie obejmuje dwa doświadczenia, z których pierwsze przeprowadzono w 2020 roku. Doświadczenie 1. Określenie optymalnego składu mieszanki paszowej opartej o krajowe źródła białka i końcowej (ubojowej) masy ciała tuczników (pierwszy rok realizacji badań).

W ramach zadania przygotowano metodykę doświadczenia żywieniowego, w tym opracowano receptury czterech mieszanek paszowych grower i czterech mieszanek finisz. Całe doświadczenie wzrostowe objęło 96 tuczników (48 wieprzków, 48 loszek (Tab. 1.) rasy złotnickiej pstrej (Fot. 1.) o znanym genotypie RYR1. Zwierzęta zostały podzielone na 4 grupy żywieniowe (mieszanka kontrolna zbożowo-sojowa + 3 mieszanki doświadczalne, zawierające różne krajowe pasze białkowe – łubin (grupa B), bobik (grupa C), groch (grupa D). Wszystkie mieszanki były izobiałkowe i izoenergetyczne (w obrębie fazy tuczu, tj. grower i finisz). W każdej grupie 8 zwierząt (4 wieprzki, 4 loszki) tuczono do osiągnięcia masy ciała około 120 kg, kolejne 8 do 130 kg i kolejne 8 do 140 kg (Tab. 1.). W trakcie tuczu zwierzętom od 30 do 80 kg masy ciała podawano mieszankę typu grower, a od 80 kg do ustalonej końcowej masy ciała (120/130/140 kg) mieszankę typu finisz. Pobrano próbki pasz doświadczalnych typu finisz w celu wykonania analizy składu podstawowego oraz profilu kwasów tłuszczowych paszy, którą wykonano w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB.

Fot. 1. Warchlaki rasy złotnickiej pstrej (M. Szyndler-Nędza).



Tab. 1. Układ grup dla rasy złotnickiej pstrej.

Tucz od 30 kg masy ciała do:	Grupa kontrolna	Grupa doświadczalna		
	A	B	C	D
120kg masy ciała (± 4 kg)	8	8	8	8
130 kg masy ciała (± 4 kg)	8	8	8	8
140 kg masy ciała (± 4 kg)	8	8	8	8
Razem 96 sztuk	24	24	24	24

Syntetyczny opis wyników:

W próbkach paszy oznaczono białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy i suchą masę, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 152/2009, ustanawiającym metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz. Analizę kwasów tłuszczowych przeprowadzono metodą chromatografii gazowej aparatem SHIMADZU GC-2010 Plus (Kolumna - Rtx2330 , 105 m , 0,32 mm, 0,2 micron), zgodnie z P 015 wydanie 2 z dnia 01.03.2016 r. W Tab. 2. i 3. przedstawiono wyniki analiz tych pasz.

Tab. 2. Skład chemiczny mieszanek doświadczalnych finiszer.

Finiszer	Grupa			
	A	B	C	D
białko [%]	16,26	15,65	15,22	15,17
tłuszcz [%]	2,32	2,91	2,7	2,7
sm [%]	88,14	88,14	88,03	87,96
popiół [%]	4,01	3,95	3,67	4,13
włókno sur. [%]	3,62	4,24	4,05	3,72

Tab. 3. Profil kwasów tłuszczowych w mieszankach doświadczalnych finiszer (g/100 g wszystkich oznaczonych kwasów tłuszczowych).

Kwas	Finiszer A	Finiszer B	Finiszer C	Finiszer D
c8	0,02	0,01	0,02	0,01
c10	0	0	0	0
c12	0,18	0,02	0,06	0,06
c14	0,34	0,26	0,27	0,27
c16	21,56	15,26	16,44	16,09
c16-1	0,21	0,35	0,38	0,4
c18	2,09	2,12	1,95	2,28
c18-1	18,23	33,96	35,45	36,89
c18-2	47,8	37,32	35,96	34,25
gama18-3	0,03	0,04	0,04	0,03
c20	0,16	0,48	0,3	0,29
c18-3	8,89	8,99	8,58	8,93
CLA c9-t11	0	0	0	0
CLA t10-c12	0	0	0	0
CLA c9-c11	0	0	0	0
CLA t9-t11	0	0	0	0
c22	0,24	0,89	0,3	0,24

c20-4	0,02	0,01	0,02	0,02
c22-1	0,16	0,25	0,18	0,18
Epa	0,06	0,05	0,05	0,05
Dha	0	0	0	0
SFA	24,6	19,03	19,34	19,27
UFA	75,4	80,97	80,66	80,73
MUFA	18,6	34,56	36,01	37,46
PUFA	56,8	46,41	44,65	43,27
PUFA-n6	47,85	37,37	36,02	34,29
PUFA-n3	8,95	9,04	8,63	8,98
DFA	77,49	83,09	82,62	83,02
UFA/SFA	3,06	4,25	4,17	4,19
MUFA/SFA	0,76	1,82	1,86	1,94
PUFA/SFA	2,31	2,44	2,31	2,25
PUFA n6/n3	5,35	4,13	4,17	3,82

Do dnia 1 grudnia 2020 roku, w ramach doświadczenia wzrostowego, tucz kontrolny ukończyło 70 sztuk (tj. 73%) świń złotnickich pstrych. Po uboju zwierząt określono parametry dyssekcji ich tusz i jakości mięsa oraz pobrano próbki mięsa (polędwica za ostatnim żebrzem – *Longissimus lumborum*, mięsień półbłoniasty szynki – *Semimembranosus muscles*) w celu wykonania analiz tekstury (ZHTCh), a także do analiz chemicznych (CL).

W polędwicy oznaczono zawartość białka ogólnego, tłuszczu surowego i suchej masy, zgodnie z oficjalną metodą analizy AOAC International, (18. edycja; Method 981.10 Crude Protein in meat; Method 950.46 Moisture in Meat; Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Products) oraz świeżość mięsa po dwumiesięcznym przechowywaniu w zamrożeniu (TBARS). Ponadto w polędwicy i szynce określono profil kwasów tłuszczowych.

Analizę tekstury mięsa przeprowadzono po dwumiesięcznym przechowywaniu próbek polędwicy i szynki w zamrożeniu (-20°C). Analizę przeprowadzono w temperaturze pokojowej przy użyciu Texture Analyser TA-XTplus (Stable Micro Systems, Godalming, Wielka Brytania). Na mięsie gotowanym wykonano analizy siły ścinającej Warnera-Bratzlera (WBS; siła cięcia i energia cięcia) oraz określano profil tekstury (TPA). Parametry tekstury, takie jak: twardość, spoistość, żujność i sprężystość mierzono z krzywych siła-odkształcenie. Twardość [N] (hardness) zdefiniowano jako maksymalną siłę, przyłożoną do próbek podczas pierwszego cyklu ściskania, konieczną do osiągnięcia określonego odkształcenia. Spoistość (Cohesiveness) obliczono jako stosunek powierzchni pod drugą krzywą do powierzchni pod pierwszą krzywą. Sprężystość (Springiness) (mm) określono jako stosunek czasu kontaktu z próbką podczas drugiego ściskania do pierwszego ściskania. Elastyczność (Resilience) zdefiniowano jako stosunek ujemnej siły wejściowej do dodatniej siły wejściowej podczas pierwszego ściskania, podczas gdy żujność (chewiness) uzyskano przez pomnożenie twardości (hardness), spoistości (cohesiveness) i sprężystości (springiness) (Meullenet, Lyon, Carpenter i Lyon, 1998). Uzyskane dane zostały zebrane i obliczone przez oprogramowanie Texture Expert w wersji 1.20.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie zamierzonego celu:

W ramach pierwszego roku realizacji zadania przygotowano metodykę doświadczenia żywieniowego, w tym opracowano receptury czterech mieszanek paszowych grower i czterech mieszanek finisz (mieszanka kontrolna zbożowo-sojowa + 3 mieszanki doświadczalne zawierające różne krajowe pasze białkowe).

Przeprowadzono doświadczenie wzrostowe, które objęło 96 tuczników (48 wieprzków, 48 loszek) rasy złotnickiej pstrej o znanym genotypie RYR1. Na próbkach pasz doświadczalnych typu finiszera wykonano analizy składu podstawowego oraz profilu kwasów tłuszczowych paszy.

Do dnia 1 grudnia, w ramach doświadczenia wzrostowego, tuczący doświadczalny ukończyło 73% świń złotnickich pstrych. Po uboju zwierząt określono parametry dyssekcji ich tusz i jakości mięsa oraz pobrano próbki mięsa (polędwica za ostatnim żebrzem – *Longissimus lumborum*, mięsień półbłoniasty szynki – *Semimembranosus muscles*) w celu wykonania analiz tekstury, a także do analiz chemicznych. W polędwicy oznaczono zawartość białka ogólnego, tłuszczu surowego i suchej masy oraz świeżość mięsa po dwumiesięcznym przechowywaniu w zamrożeniu (TBARS). Ponadto w polędwicy i szynce określono profil kwasów tłuszczowych. Analizę tekstury mięsa przeprowadzono po dwumiesięcznym przechowywaniu próbek polędwicy i szynki w zamrożeniu (-20°C).

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 utworzenie na tej podstawie stada prarodzicielskiego. Stado to powinno charakteryzować się znacznie wyższymi parametrami użytkowymi i stanowić będzie początek nowej linii hodowlanej świń, która powinna sprostać konkurencji na krajowym rynku trzody chlewnej.

Cel ten jest realizowany poprzez:

- opracowanie i opatentowanie płytki SNP PigOpenArray dedykowanej do wykorzystania w selekcji trzody chlewnej,
- analizę populacji świń linii 990 pod kątem możliwości wyodrębnienia nowej linii rodzicielskiej o podwyższonej użyteczności,
- próbę wyodrębnienia stada prarodzicielskiego nowej linii 990.

Planowane 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, których istotny wpływ na cechy został opisany w literaturze, takie jak gen RYR1; IGF2 czy MC4R.

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, 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 i całym zadaniu:

Harmonogram zadania na 2020 rok obejmował zakres: „Kolekcja aktualnych danych użytkowych oraz materiału biologicznego do oznaczeń laboratoryjnych i genetycznych”. W ramach przewidzianej usługi, na podstawie analiz oceny przyżyciowej i danych rodowodowych stada linii 990, typowane zostały mioty, z których po dwie loszki trafiały do oceny stacyjnej. Zwierzęta na stacjach utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywienie odbywało się w systemie *ad libitum* drobno granulowaną mieszanką o znanym i stałym składzie zadawaną z automatów. Ilość pobieranej paszy była ściśle kontrolowana. Pozostałe warunki utrzymania i postępowania ze zwierzętami były zgodne z dotychczasową metodyką oceny w stacjach kontroli. 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 (od 30 kg do 100 kg), zużycie paszy w czasie testu (kg), zużycie paszy na kilogram przyrostu (kg), dzienne pobranie paszy (kg), wiek w dniu uboju (dni), ilość dni tuczu kontrolnego od 30 do 100 kg (dni).

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): odczyn pH najdłuższego grzbietu 45 min. po uboju, odczyn 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. Zgromadzony materiał biologiczny został zabezpieczony i w momencie wznowienia realizacji zadania zostanie wykorzystany w dalszych etapach (dane te będą w późniejszych etapach podstawą do analiz asocjacyjnych). Będą też wykorzystane do dalszych analiz służących do ustalenia progów selekcyjnych dla osobników stanowiących grupę prarodzicielską nowej linii wysokoprodukcyjnej.

Zakład Hodowli Drobiu

p.o. Kierownika: dr hab. Katarzyna Połtowicz, prof. IZ PIB

Zadanie 01-12-04-11

Technopatie i stereotypie w aspekcie dobrostanu zwierząt gospodarskich

Kierownik zadania: dr inż. Iwona Skomorucha

W ramach zadania kontynuowano realizację etapów badawczych: „Wpływ wielkości stadka i systemu odchowu na występowanie stereotypii i technopatii, a także rozwój układu kostnego kur nieśnych”, „Występowanie stereotypii i technopatii u kur różnych ras w zależności od wielkości stadka”, „Obserwacje wystąpienia stereotypii i technopatii u cieląt i krów mlecznych rasy simental w zależności od warunków utrzymania” oraz „Ocena wpływu zagęszczenia obsady i materiałów absorbujących uwagę na występowanie technopatii i stereotypii u prosiąt odsadzanych w 28. i 35. dniu życia”.

Badania zostały przeprowadzone na fermie drobiu Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach, ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o. oraz ZD IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o.

Materiał doświadczalny stanowiły:

- kury nieśne Hy-Line, odchowywane w baterii klatek oraz na ściółce zarówno w małym, jak i dużym stadku,
- kury rodzimych ras Leghorn i Sussex utrzymywane na ściółce w małym oraz dużym stadku,
- cielęta i krowy mlecznej rasy simental. Cielęta utrzymywano w kojcach grupowych, indywidualnych oraz budkach. Krowy mleczne utrzymywane były w oborze wolnostanowiskowej, na uwięzi oraz na pastwisku,
- prosięta odsadzane w 28. i 35. dniu życia utrzymywane w kojcach w ilości 14 lub 10 sztuk na kojec. Osobniki odsadzane w 28., jak i 35. dniu podzielono także na grupy utrzymywane w kojcach, wyposażonych w materiały absorbujące uwagę lub w kojcach standardowych.

W bieżącym roku opracowywano wyniki dotyczące analiz krwi pobieranej od zwierząt doświadczalnych.

U kur krew pobierana była w 24. tygodniu życia w celu oznaczenia: kalcytoniny, witaminy D₃, osteokalcyny, fosfatazy zasadowej, wapnia i fosforu. Oznaczono także poziom hormonów płciowych – estradiolu i progesteronu – wykonano rozmaz krwi i określono stosunek H:L (heterofilii do limfocytów). Krew pobierano także w 64. tygodniu odchowu w celu oznaczenia: poziomu pirydynoliny, deoksypirydynoliny, wapnia, fosforu, hormonów płciowych – estradiolu i progesteronu. Oznaczono również wskaźniki stresu: serotoninę, dopaminę, kortykosteron i noradrenalinę oraz wykonano rozmazy krwi i określono stosunek H:L.

Krew od cieląt i krów mlecznych rasy simental pobrano w celu wykonania oznaczeń koncentracji hormonów: kortyzolu, dopaminy i serotoniny. Krew pobrano od 30 cieląt poniżej 2. miesiąca życia, wykazujących zachowania stereotypowe i od 30 niewykazujących tych zachowań, oraz od 20 cieląt powyżej 2. miesiąca życia, wykazujących stereotypie i 20 niewykazujących stereotypii. Ponadto, krew pobrano od: 10 krów wykazujących stereotypie ustne, 10 sztuk obdających inne osobniki oraz od 10 krów niewykazujących zachowań anormalnych. Krew od prosiąt pobierano z kolei trzeciego dnia od odsadzenia (w godzinach 9.00-10.30) od 6 sztuk z każdej grupy w celu oznaczenia poziomu kortyzolu.

Nie stwierdzono wpływu systemu utrzymania oraz wielkości stada na rozmaz białokrwinkowy i stosunek H:L we krwi kur nieśnych Hy-Line. 24-tygodniowe kury, odchowywane w klatkach, odznaczały się większym poziomem estradiolu we krwi niż ptaki z odchowu ściółkowego przy $p < 0,05$. Stwierdzono również wpływ czynników doświadczalnych, a także ich interakcji na stężenie progesteronu we krwi kur nieśnych. Odnotowano wyższy poziom witaminy D₃ w surowicy krwi u 24-tygodniowych kur Hy-Line, utrzymywanych w małych stadkach, również interakcja obu czynników doświadczalnych, tj. systemu utrzymania i wielkości stada miała wpływ na kształtowanie się poziomu tej witaminy. Stwierdzono także, że 64-tygodniowe kury Hy-Line utrzymywane w systemie ściółkowym charakteryzowały się wyższym poziomem fosforu oraz wapnia w surowicy krwi. Również wielkość stada miała wpływ na poziom wapnia we krwi ptaków. Interakcja obu czynników doświadczalnych, tj. systemu utrzymania oraz wielkości stada, także wpłynęła na kształtowanie się zawartości wapnia i fosforu we krwi 64-tygodniowych kur.

Tab. 1. Wyniki analizy krwi kur Hy-Line.

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	System chowu (A)	Stadko (B)	AxB
	klatki		ściółka					
	małe stadko	duże stadko	małe stadko	duże stadko				
24. tydzień odchowu								
H:L	0,65	0,59	0,62	0,62	0,02	NS	NS	NS
Estradiol (pmol/l)	783,91	763,66	476,64	465,82	70,34	<0,05	NS	NS
Progesteron (nmol/l)	0,46 B	5,31 A	0,54 B	0,26 B	0,61	<0,01	<0,05	<0,01
D ₃ (ng/ml)	10,67 a	9,68 A	16,41 Bb	6,77 A	1,07	NS	<0,01	<0,01
Osteokalcyna (ng/ml)	0,52 a	0,94 b	0,76	0,84 b	0,06	NS	<0,05	<0,05
64. tydzień odchowu								
H:L	0,65	0,69	0,70	0,64	0,05	NS	NS	NS
Fosfor (mmol/l)	1,120 a	1,338	1,532	1,726 b	0,08	<0,05	NS	<0,05
Wapń (mmol/l)	4,13 Aa	4,39 bc	4,34 ac	4,60Bb	0,05	<0,05	<0,01	<0,01

a,b – wartości oznaczone różnymi literami różnią się między sobą istotnie ($p < 0,05$)

A,B – wartości oznaczone różnymi literami różnią się między sobą wysoko istotnie ($p < 0,01$)

W 24. tygodniu doświadczenia obserwowano większy poziom fosfatazy zasadowej oraz witaminy D₃ u kur rasy Leghorn w porównaniu z kurami rasy Sussex przy $p<0,01$. Wpływ wielkości stadka odnotowano jedynie w przypadku poziomu fosfatazy zasadowej we krwi 24-tygodniowych kur przy $p<0,01$. W tym okresie odchowu stwierdzono także interakcje czynników doświadczalnych i ich wpływ na poziom: fosfatazy zasadowej ($p<0,01$), fosforu, wapnia, witaminy D₃, osteokalcyny i klacystoniny ($p<0,05$).

W 64. tygodniu odchowu stwierdzono wyższy poziom estradiolu we krwi kur rasy Sussex w porównaniu z rasą Leghorn ($p<0,01$). Z kolei, poziom adrenaliny i noradrenaliny był wyższy we krwi kur rasy Leghorn w porównaniu z rasą Sussex przy $p<0,05$. W 64. tygodniu doświadczenia odnotowano także wpływ wielkości stadka na poziom kortykosteronu i adrenaliny w przypadku kur rasy Leghorn przy $p<0,05$. Odchów tej rasy w większej grupie miał stresujący wpływ na ptaki doświadczalne.

Obserwowano także interakcję czynników doświadczalnych (rasa x wielkość stadka) i jej wpływ na poziom we krwi estradiolu, kortykosteronu, adrenaliny przy $p<0,01$ oraz noradrenaliny przy $p<0,05$.

Tab. 2. Wyniki analizy krwi kur rasy Sussex i Leghorn.

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	Rasa (A)	Stadko (B)	AxB
	Sussex		Leghorn					
	małe stadko	duże stadko	małe stadko	duże stadko				
24. tydzień odchowu								
Fosfataza zasadowa (U/L)	306,25 A	316,63 A	317,88 A	545,60 B	28,73	<0,01	<0,01	<0,01
Fosfor (mmol/l)	1,904 a	1,328 b	1,726	1,636	0,09	NS	NS	<0,05
Wapń (mmol/l)	5,248 a	4,510 b	4,822	4,672 b	0,10	NS	NS	<0,05
D ₃ (ng/ml)	8,18 a	11,91 ac	36,55 b	29,80 bc	4,02	<0,01	NS	<0,05
Osteokalcyna (ng/ml)	0,39 a	0,53	0,51	0,77 b	0,06	NS	NS	<0,05
Kalcitonina (pq/ml)	8,95 a	1,37 b	1,27 b	3,19	1,18	NS	NS	<0,05
64. tydzień odchowu								
Adrenalina (pq/ml)	544,80 A	650,40 A	701,33 A	2170,314 B	219,62	<0,05	<0,05	<0,01
Noradrenalina (pq/ml)	168,00	25,37 a	124,14	208,99 b	29,12	<0,05	NS	<0,05
Kortykosteron (ng/ml)	16,40 b	14,72	8,15 Aa	22,42 B	1,63	NS	<0,05	<0,01
Estradiol (pmol/l)	722,46 A	503,68	227,92 B	233,96 B	67,56	<0,01	NS	<0,01

a,b – wartości oznaczone różnymi literami różnią się między sobą istotnie ($p<0,05$)

A,B – wartości oznaczone różnymi literami różnią się między sobą wysoko istotnie ($p<0,01$)

Oznaczenia zawartości kortyzolu wykazały wyższą jego koncentrację we krwi cieląt w obu grupach wiekowych, a także u krów wykazujących zachowania stereotypowe. Oznaczenia zawartości dopaminy u cieląt wykazały wyższą ($p<0,05$) koncentrację w grupie cieląt wykazujących zachowania stereotypowe. W grupie poniżej 2 miesięcy w stosunku do kontroli zawartość ta była o 24% wyższa, natomiast w grupie powyżej 2 miesięcy różnica ta wynosiła aż 76%. Ponadto, w grupie tej stwierdzono wzrost koncentracji dopaminy wraz z wiekiem cieląt. W przypadku zawartości dopaminy u krów stwierdzono statystycznie, istotnie wyższą zawartość w grupie, wykazującej zachowanie stereotypowe w postaci rolowania języka. Oznaczenia zawartości serotoniny u cieląt poniżej 2. miesiąca życia wykazały istotnie ($p<0,05$) wyższy jej poziom w grupie wykazującej stereotypie, natomiast u cieląt powyżej 2. miesiąca stwierdzono

niedco wyższą koncentrację w grupie kontrolnej. W przypadku krów najniższą koncentrację serotoniny stwierdzono w grupie wykazującej stereotypie w postaci rolowania języka, a najwyższą w przypadku krów obdajających inne krowy, było to odpowiednio: 912 i 1118 ng/ml. W grupie kontrolnej koncentracja serotoniny wynosiła 993 ng/ml. Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ występowania zachowań stereotypowych zarówno u krów jak i cieląt na zawartość kortyzolu i dopaminy we krwi, natomiast nie stwierdzono wpływu na koncentrację serotoniny.

W doświadczeniu na prosiętach stwierdzono brak istotnych różnic pomiędzy osobnikami z poszczególnych grup. Zarówno przebywanie w środowisku ubogim w bodźce, jak również obsada, nie miały istotnego wpływu na wahania w stężeniu kortyzolu. Zazwyczaj uważa się, że niewłaściwe lub ubogie warunki bytowania zwierząt mają kluczowe znaczenie dla występowania u nich frustracji i stresu. Badania naukowe dotyczące fizjologicznej odpowiedzi organizmu nie są jednak jednoznaczne w tym zakresie.

Tab. 3. Stężenie kortyzolu w surowicy krwi prosiąt w zależności od wzbogacenia środowiska i dnia odsadzenia.

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	p-value
	28. dzień wzbogacony	28. dzień standard	35. dzień wzbogacony	35. dzień standard		
Kortyzol (µg/100 ml)	28,10	25,55	26,85	27,16	1,32	0,987

Tab. 4. Stężenie kortyzolu w surowicy krwi prosiąt w zależności od wzbogacenia środowiska i obsady.

Wyszczególnienie	Grupa				SEM	obsada (A)	wzbogacony (B)	(AxB)
	10 szt./kojec		14 szt./kojec					
	wzbogacony	standard	wzbogacony	standard				
Kortyzol (µg/100 ml)	29,42	28,70	27,12	25,55	0,96	0,186	0,569	0,831

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 przeprowadzonych w 2020 roku było określenie wpływu dodatku do paszy mieszanki ziół o działaniu immunostymulującym (gr. II) oraz kwasu askorbinowego (gr. III) na status zdrowotny kur rasy Rhode Island Red (R-11) w chowie ekologicznym.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta rasy Rhode Island Red (R-11) pochodzące od kur nieśnych ekologicznych w ogólnej liczbie 252 sztuk. Ptaki były utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. W każdej grupie doświadczalnej na 10 kur niosek przypadał 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 R-11, zdrowotność niosek (m.in. parametry biochemiczne i morfologiczne krwi) oraz jakość jaj. Ponadto, przeprowadzono ocenę lęgów doświadczalnych, a także określono wartość biologiczną piskląt.

Wykazano statystyczne różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi w okresie od 25. do 28. tygodnia życia w przypadku masy jaja. Masa jaj od kur z grupy I (grupa kontrolna – kury RIR utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego) była większa o 1,3 g w porównaniu do jaj kur z grupy III przy $p \leq 0,05$. Statystycznie istotne różnice stwierdzono również w barwie żółtka, które najintensywniej zabarwione było w grupie II, natomiast żółtko w grupie I

było najjaśniejsze przy $p \leq 0,01$. Jaja z grupy I cechowały się najniższą wagą żółtka – 15,95 g w porównaniu z pozostałymi dwoma grupami, dla których ta wartość wynosiła odpowiednio 16,78 g i 17,28 g ($p \leq 0,01$). Indeks kształtu dla jaj z grupy I był najniższy i statystycznie istotny w porównaniu z pozostałymi grupami ($p \leq 0,05$). Największą średnią wytrzymałość skorupy jaj (50,11 N) odnotowano w grupie I ($p \leq 0,05$), równocześnie skorupy tych jaj były najgrubsze (0,315 μm) ($p \leq 0,01$), a jaja cechowały się największą gęstością skorupy (87,97 mg/cm^2) ($p \leq 0,05$). W żółtkach jaj z grupy I odnotowano niższy poziom witaminy E w porównaniu z jajami z grupy II i III przy $p \leq 0,05$. Stwierdzono różnicę w poziomie kwasu linolowego (C:18-2) pomiędzy grupą I i II a III odpowiednio przy $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$, linolenowego (C:18-3) oraz arachidonowego (C:20-4) pomiędzy grupą I a III przy $p \leq 0,05$. W żółtkach jaj z grupy I i II odnotowano wyższy poziom kwasów PUFA oraz PUFA-6 w stosunku do grupy III odpowiednio przy $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$. W żółtkach jaj z grupy I stwierdzono również większą o 0,51% zawartość kwasów PUFA-3 w porównaniu z żółtkami jaj z grupy III przy $p \leq 0,05$. Odnotowano także różnice w żółtkach jaj w PUFA/SFA pomiędzy grupą I a III ($p \leq 0,01$) oraz II a III ($p \leq 0,05$). Pomiędzy grupami nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w średniej zawartości suchej masy (SM), popiołu surowego (PS), tłuszczu surowego (TS) oraz średniej zawartości kwasów tłuszczowych w woreczkach żółtkowych piskląt, a także w poziomie hematokrytu, hemoglobiny, erytrocytów, leukocytów oraz stosunku H:L.

Pozostałe, zebrane wyniki badań są obecnie zestawiane i poddawane analizie statystycznej, a pobrane od ptaków próbki krwi zostały przekazane do laboratoriów do dalszych analiz.

Podsumowując dotychczas opracowane wyniki, dodatek do paszy mieszanki ziół oraz kwasu askorbinowego miał wpływ na jakość jaj. Jaja od kur z grup doświadczalnych charakteryzowały się intensywniejszą barwą oraz większą masą żółtka, gorszą jakością skorupy jaj oraz większą zawartością witaminy E w żółtkach jaj. Dodatek do diety kur kwasu askorbinowego wpłynął również na niższy poziom w żółtkach jaj PUFA, PUFA-6 oraz PUFA-3 w porównaniu z drugą grupą doświadczalną oraz kontrolną.

Tab. 1. Jakość jaj kur rasy Rhode Island Red.

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	I	II	III	
Barwa skorupy (%)	38,75	42,75	41,45	0,854
Masa jaja (g)	56,37	57,87	57,51	0,447
Wysokość białka (mm)	9,25	8,96	8,68	0,147
Jednostki Haugha (JH)	96,17	94,62	93,29	0,764
Plamy krwawe (%)	0,00	0,00	0,00	0,000
Plamy mięsne (%)	0,10	0,00	0,00	0,023
Kolor żółtka (pkt)	4,45 A	6,15 B	5,60 B	0,190
Masa żółtka (g)	15,95 A	16,78 B	17,28 B	0,144
Grubość skorupy (μm)	0,315 B	0,287 A	0,308 B	0,003
Masa skorupy (g)	6,56	6,38	6,43	0,044
Gęstość skorupy (mg/cm^2)	87,97 b	85,68 a	86,82 ab	0,450
Indeks kształtu (%)	76,89 a	77,40 ab	78,85 b	0,350
Wytrzymałość (N)	50,11 b	41,21 a	44,72 ab	1,410

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

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie dla $p \leq 0,01$

Tab. 2. Średnia zawartość cholesterolu, witaminy A oraz E w żółtkach jaj.

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	I	II	III	
Cholesterol (mg/g)	13,88	13,08	13,25	0,25
Witamina A (ug/g)	4,23	3,88	3,70	0,11
Witamina E (ug/g)	116,05 a	187,30 b	202,35 b	15,91

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. 3. Średnia zawartość kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj.

Wyszczególnienie	Grupa			SEM
	I	II	III	
c14	0,29	0,28	0,31	0,01
c16	25,41	25,79	263,39	0,37
c16-1	2,23	2,29	2,77	0,13
c18	8,29	8,68	9,09	0,77
c18-1	42,95	42,68	45,14	0,67
c18-2	15,80 A	15,38 a	11,97 Bb	0,66
gama18-3	0,15	0,17	0,14	0,01
c20	0,00	0,00	0,01	0,003
c18-3	1,09 a	1,06 ab	0,77 b	0,06
c22	0,13	0,13	0,09	0,02
c20-4	2,25 a	2,19 ab	2,04 b	0,04
c22-1	0,06	0,09	0,12	0,01
Epa	0,008	0,008	0,005	0,003
Dha	1,36	1,27	1,16	0,04
SFA	34,12	34,89	35,90	0,51
UFA	65,88	65,12	64,10	0,51
MUFA	45,24	45,05	48,03	0,70
PUFA	20,65 A	20,06 a	16,08 Bb	0,77
PUFA-6	18,20A	17,73 a	14,14 Bb	0,69
PUFA-3	2,45 a	2,33	1,94 b	0,10
DFA	74,17	73,79	73,19	0,38
UFA/SFA	1,94	1,88	1,79	0,04
MUFA/SFA	1,33	1,30	1,34	0,03
PUFA/SFA	0,61 A	0,58 a	0,45 Bb	0,03
PUFA 6/3	7,44	7,70	7,31	0,14

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

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie dla $p \leq 0,01$

Zadanie 01-12-07-12

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

Kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

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 (trzy powtórzenia). Ogółem, doświadczalnej inkubacji, poddano 840 jaj gęsich. Utworzono siedem grup doświadczalnych.

W 2018 roku, w okresie od kwietnia do czerwca, przeprowadzono iniekcję witaminą C (Acidum ascorbicum, 100 mg/ml, TEVA, Kraków), a w kolejnym roku witaminą E (Tocopheroli acetat, 300 j.m./ml, Vitaminum E HASCO-LEK, Wrocław).

Gąsięta z ostatniego, iniekowanego nakładu w 2018 i 2019 roku (10 szt. z każdej grupy doświadczalnej), wstawiono do odchowu, którego celem było określenie wpływu iniekcji in ovo witaminą C i E na wskaźniki użytkowości i wartości rzeźnej doświadczalnych grup ptaków. Przeprowadzono 17-tygodniowe odchowu gęsi (konwencjonalny tucz owsiany). Uzyskane w 2018 i 2019 roku wyniki wskaźników wylęgu, masy ciała, pomiarów zoometrycznych, masy tuszki i wydajności rzeźnej wykazano w sprawozdaniu rocznym za w/w lata.

W 2020 roku dokonano finalizacji założonych badań i kontynuowano analizę cech fizycznych mięsa gęsi odchowywanych w 2019 roku.

W tym celu przeprowadzono ocenę, obejmującą:

- wyciek termiczny (WT) (mięśnie piersiowe i nóg),
- parametry tekstury mięsa: surowego – siła cięcia (F2) nóż płaski i po obróbce termicznej – siła cięcia (F2) nóż płaski oraz siła (F2) gryzienia (mięśnie piersiowe i nóg),
- zawartość wody w mięsie (mięśnie piersiowe i nóg).

Fot. 1. Analizator tekstury TA.XT plus firmy Stable Micro Systems wraz z przystawką - tzw. uchwyty szczękowe Volodkievich'a - do określenia siły gryzienia (L. Lewko).



Fot. 2 . Zestaw noży (przystawki Warner-Bratzlera wyposażone w nóż płasko ścięty oraz z trójkątnym wycięciem) wraz ze stolikiem pomocniczym wykorzystywane do pomiaru siły cięcia (L. Lewko).



Wyciek termiczny oznaczono za pomocą metody Honikiel (1998), a zawartość wody zbadano zgodnie z PN-ISO 1442:2000. Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie zawartości wody (metoda odwoławcza). Zasadą tej metody jest dokładne wymieszanie próbki z piaskiem i wysuszenie do stałej masy w temperaturze 103°C ; $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

W celu określenia wybranych parametrów tekstury, po 24 godzinach od uboju, ze schłodzonych tuszek z mięśnia piersiowego powierzchownego (*musculus pectoralis superficialis*) i z mięśni uda pobrano próbki o wymiarach przekroju $1 \times 1 \text{ cm}$ i długości $1,5 \text{ cm}$ wzdłuż włókien mięśniowych (Honikiel, 1998). Spośród pobranych próbek $2/3$ poddano obróbce termicznej poprzez gotowanie prób w hermeticznie zamkniętych woreczkach foliowych (strunowych), zanurzonych w wodzie o temperaturze 80°C przez 40 minut pod przykryciem. Po ostudzeniu próbki schłodzono, umieszczając je na 24 godziny w chłodziarce. Badania tekstury mięsa gęsi zarówno surowego, jak i po obróbce cieplnej, wykonywano na próbkach schłodzonych do temperatury $+4^{\circ}\text{C}$. Pomiaru instrumentalnego dokonano za pomocą analizatora tekstury TA.XT plus (Stable Micro Systems) wraz z odpowiednimi przystawkami. Próbki mięsa surowego i po obróbce cieplnej poddano ocenie siły cięcia z wykorzystaniem zestawu noży Warner-Bratzlera (WB) ostrza płaskiego (NP), którego prędkość przesuwu podczas testu wynosiła $1,5 \text{ mm/s}$. Zmierzono siłę końcową (F2) – niezbędną do przecięcia całej ocenianej próbki mięsa. Natomiast po obróbce cieplnej zmierzono także za pomocą uchwytu szczękowego Volodkievich'a, przy prędkości przesuwu $2,00 \text{ mm/s}$, siłę niezbędną do całkowitego przegryzienia (F2) próbki mięsa. Dla wszystkich pomiarów liczebność prób wynosiła 10 ($n=10$) dla każdej grupy genetycznej.

Ponadto, wszystkie uzyskane wyniki w latach 2018 i 2019, składające się na ocenę wskaźników wylęgowości, wybranych parametrów użytkowości, cech rzeźnych i jakości mięsa gęsi z uwzględnieniem pochodzenia genetycznego ptaków, rodzaju zastosowanej witaminy oraz jej dawki i okresu inkubacji w czasie iniekcji opracowano statystycznie za pomocą programu *Statistica 10* (StatSoft, 2006). Obliczono średnie arytmetyczne ($\bar{x}$), odchylenie standardowe (SD) i współczynnik zmienności (v). W celu określenia istotności różnic między średnimi dla grup zastosowano test Duncana. Różnice uznano za statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$. Przeprowadzono ponadto trzy i czteroczynnikową analizę wariancji z uwzględnieniem interakcji. Istotność wpływu każdego źródła zmienności oceniono testem F-Snedecora.

Wyciek termiczny mięśni piersiowych samców różnił się nieznacznie we wszystkich grupach doświadczalnych i w ocenie łącznej wynosił od $35,45$ (K1) do $36,47\%$ (D2-E15), a współczynnik zmienności nie przekraczał $5,0$. W grupie doświadczalnej iniekowanej witaminą E w dawce 15 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (D1-E15) mięśnie piersiowe samców gęsi Białej Kozłudzkiej® (BK) wyróżniały się najniższą wartością tego parametru ($34,20\%$), a gęsi słowackie (St) najwyższą, ukształtowaną na poziomie $37,00\%$. Odwrotną sytuację zaobserwowano w grupie kontrolnej pozytywnej 2 (K2), iniekowanej solą fizjologiczną w 20. dniu inkubacji – mięśnie piersiowe samców BK cechował najwyższy wyciek termiczny ($36,81\%$) a najniższy, średnio o $1,16 \text{ p.p}$

mięśnie piersiowe samców Sł (35,65%). Z kolei, zawartość wody w ocenie łącznej, kształtowała się w przedziale od 71,49 (D2-E30) do 72,39% (K0).

W przypadku mięśni piersiowych samic największą wartość wycieku termicznego dla gęsi BK odnotowano w grupie D1-E15 (37,49%), dla gęsi kieleckiej (Ki) w grupie K2 (37,65%), a dla samic gęsi Sł w grupie K0 (37,31%). W ocenie łącznej parametr ten mieścił się w zakresie od 35,60 (K1) do 37,26% (D1-E15), a współczynnik zmienności nie przekraczał 3,7. Z kolei zawartość wody w ocenie łącznej ukształtowała się na wyrównanym poziomie, osiągając wartości od 72,07 (K2) do 72,71% (D2-E30).

Mięśnie gęsi BK, Ki oraz w ocenie łącznej pochodzące z grupy iniekowanej solą fizjologiczną w 20. dniu inkubacji (K2) charakteryzowały się największym wyciekiem termicznym wynoszącym odpowiednio 36,97; 36,85 i 36,61%. Najniższą natomiast wartości tego parametru odznaczały się mięśnie ptaków z grupy iniekowanej solą fizjologiczną w 13. dniu inkubacji (K1) – 35,53%. Wartość współczynnika zmienności w ocenie łącznej nie przekroczyła 4,3. Z kolei, w przypadku zawartości wody, w ocenie łącznej kształtowała się ona w przedziale od 71,95 (D1-E30 i K2) do 72,40% (K0).

Wielkość wycieku termicznego w mięśniach nóg samców mieściła się w zakresie od 28,74 (D1-E5) do 30,36% (K0) dla gęsi BK; od 27,72 (D2-E30) do 31,00% (K1) odnośnie gęsi Ki i od 28,35 (K2) do 31,44% (D2-E15) w przypadku gęsi Sł. Wartość tego parametru w przypadku mięśni nóg samic była większa i mieściła się dla gęsi BK w przedziale od 33,30 (D2-E30) do 34,46% (D1-E15), dla gęsi Ki od 32,98 (K1) do 34,46% (K2) i dla gęsi Sł od 32,92 (D1-E30) do 35,16% (K0). W ocenie łącznej współczynnik zmienności nie przekraczał 7,1 – mięśnie nóg samców i 6,2 – mięśnie nóg samic, a udział wody 72,33% (samce) i 73,04% (samice).

W ocenie łącznej (samce + samice) największą wartości wycieku termicznego wyróżniały się mięśnie ptaków z grupy kontrolnej, niepoddanej iniekcji (K0) – 32,16%, a najniższą z grupy iniekowanej witaminą E w dawce 30 mg/jajo w 20 dniu inkubacji (31,20%). Współczynnik zmienności nie przekraczał 6,2. Nie wykazano różnic statystycznie istotnych. Z kolei zawartość wody w mięśniach różniła się nieznacznie we wszystkich grupach doświadczalnych i wyniosła od 72,13 (D2-E15) do 72,39% (D1-E15). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Siła niezbędna do przecięcia nożem płaskim surowego mięśnia piersiowego była w poszczególnych grupach doświadczalnych bardzo zróżnicowana. W przypadku samców wynosiła ona od 51,87 (D1-E15) do 86,27 N (K0) – BK; od 54,61 (K2) do 86,16 N (D2-E15) – Ki i od 45,24 (D2-E15) do 85,51 N (K1) – Sł. Z kolei dla samic wartości te kształtowały się w przedziale od 27,50 (K1) do 45,88 N (K0) – BK; od 36,51 (K2) do 57,53 N (D1-E15) – Ki i od 34,59 (D2-E15) do 47,29 N (K2) – Sł. Różnice potwierdzono statystycznie $p \leq 0,05$. Z grupy doświadczalnej ptaków K1 – iniekowanych solą fizjologiczną w 13. dniu inkubacji, pochodziły mięśnie piersiowe samców, które po obróbce termicznej w ocenie łącznej wymagały użycia największej siły zarówno w przypadku noża płaskiego (58,48 N) jak i z trójkątnym wycięciem (43,63 N). Z kolei w grupie doświadczalnej ptaków iniekowanych witaminą E w dawce 30 mg/jajo w 13. dniu inkubacji do przecięcia w/w mięśni wykazano użycie najmniejszej siły wynoszącej 52,84 N (nóż płaski) i 35,15 N (uchwyt szczękowy Volodkievich'a). Z tej samej grupy doświadczalnej pochodziły mięśnie piersiowe samic o największej kruchości (36,49 N) w przeciwieństwie do grupy kontrolnej K0, która cechowała się mięśniami najbardziej twardymi (44,07 N). W ocenie łącznej (samce + samice), siła niezbędna do przecięcia nożem płaskim surowych mięśni gęsi różniących się pochodzeniem z poszczególnych grup doświadczalnych, mieściła się w przedziale od 51,09 (D2-E15) do 59,48 N (K0). Większej siły, średnio o 15,26 N, użyto do przecięcia mięśni po obróbce termicznej nożem płaskim (54,92 N) aniżeli nożem z trójkątnym wycięciem (39,66 N). Współczynnik zmienności nie przekraczał 36,7.

Do cięcia surowych mięśni nóg samców niezbędna była większa ($p \leq 0,05$) siła aniżeli mięśni samic. W przypadku samców była ona bardzo zróżnicowana i kształtowała się w zakresie

od 47,91 (BK/D2-E30) do 133,6 N (Sł/D2-E15), a samic od 39,64 (Ki/D2-E15) do 87,77 N (Sł/D1-E15). Analizując wartości siły niezbędnej do cięcia mięśni nóg samców po obróbce termicznej stwierdzono, iż była ona największa w grupie gęsi po iniekcji witaminą E w dawce 30 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (58,80 N-BK), a najniższa dla mięśni nóg gęsi Ki pochodzących z grupy kontrolnej (K0) – niepoddanej iniekcji (37,66 N). W przypadku mięśni udowych samic najbardziej kruchymi okazały się mięśnie pochodzące z grupy kontrolnej (K0) – niepoddanej iniekcji, tj. Ki (45,40 N) i Sł (45,10 N). Największej siły należało użyć w przypadku mięśni samic BK z grupy kontrolnej K1 (iniekcja solą fizjologiczną w 13. dniu inkubacji). Z kolei, w przypadku cięcia nożem trójkątnym, siła F2 przyjmowała wartości od 25,08 (BK/K2) do 48,63 N (Ki/D1-E30) w przypadku samców i od 27,17 (Ki/K0) do 49,75 N (Ki/D2-E30) odnośnie samic.

W ocenie łącznej siły niezbędna do przecięcia surowych mięśni udowych zawierała się w granicach od 66,13 (D1-E30) do 78,55 N (K2). Współczynnik zmienności nie przekraczał 51,0. Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Z kolei w przypadku mięśni udowych poddanych obróbce termicznej siła niezbędna do przecięcia mięśni w ocenie łącznej mieściła się w przedziale od 46,66 (K0) do 53,42 N (K1), a wartości siły niezbędnej do przegryzienia kształtowały się od 34,54 (K2) do 37,59 N (D2-E30). Współczynnik zmienności nie przekraczał 43,5. Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

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 głównym realizowanego zadania było określenie wpływu podania ekstraktu pyłku pszczelego metodą *in ovo* na rozwój i jakość piskląt oraz wyniki produkcyjne brojlerów.

W ramach zadania zrealizowano trzy cele badawcze:

1. Określenie wpływu manipulacji *in ovo* na tempo i przebieg klucia oraz jakość wylęzonych piskląt (Doświadczenie 1);
2. 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 (Doświadczenie 2);
3. 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 (Doświadczenie 3).

Założenia metodyczne:

Badania zostały przeprowadzone na jajach wylęgowych pochodzących od stada rodzicielskiego zestawu Ross 308 w wieku 38 tygodni. Jaja inkubowano w aparatach lęgowych typu HEKA 1500 oraz Fest Mini IV, w temperaturze 37,8°C i wilgotności względnej 55% (doby 1.-18.), a po przekładzie jaj do koszy klunikowych w temperaturze 37,2°C i wilgotności względnej 65% (doby 19.-21.). Wszystkie jaja prześwietlono w 7. i 18. dobie, odrzucając jaja niezapłodnione, uszkodzone lub zawierające zamarte zarodki. Wybrakowane jaja podczas świetlenia oraz pozostałe w koszach klunikowych po wylęgu zostały poddane ocenie embriopatologicznej.

Ocenę odpadu powylęgowego przeprowadzono w oparciu o następujące cechy: dzień zamarcia zarodka, wady ułożenia zarodka w jajach, stopień wciągnięcia woreczka żółtkowego do jamy ciała, ewentualne wady morfologiczne oraz pozostałości wód płodowych po 18. dobie inkubacji. W doświadczeniu 2. i 3. wylęzione pisklęta po seksowaniu (50% ♀ i 50% ♂) zostały przeznaczone do odchowu w okresie od 1. do 42. dnia życia.

Doświadczenie 1.

Doświadczenie wykonano na 612 jajach wylęgowych. W 18. dobie inkubacji jaja z żywymi zarodkami podzielono losowo na cztery równoliczne grupy. Jaja z grup I i II traktowano jako kontrolne i dlatego nie podawano im roztworu soli fizjologicznej. W pozostałych grupach doświadczalnych (III i IV) została przeprowadzona „ręczna” iniekcja *in ovo* 500 µl 0,9% roztworu NaCl (Gilbert, Francja) do komory powietrznej jaja (III) i płynu owodniowego zarodka (IV). Manipulacja została przeprowadzona przez otwór w skorupie o $\varnothing$ ok. 1 mm przy użyciu igły 21G od strony komory powietrznej jaja, po wcześniejszym zdezynfekowaniu powierzchni skorupy 70% roztworem etanolu. Po przeprowadzonej iniekcji otwór został zalepiony taśmą Parafilm®, a jaja przeniesiono do koszy klujnikowych, w celu kontynuacji lęgu. Czas wylęgu rejestrowano pomiędzy 18,5. a 21. dobą inkubacji (444–504 h) w interwałach czasowych wynoszących 12 godzin. W tym czasie monitorowano tempo naklucia wewnętrznego (IP) i zewnętrznego (EP) oraz moment wykluć (H). Wszystkie wykluć pisklęta zostały poddane ocenie jakości przez dwóch oceniających. Wykorzystano następujące parametry: masę wylęgową, punktację Tona i długość pisklęcia. Ewaluacja punktowa została wykonana zgodnie z metodyką opracowaną przez Tona et al., 2003a z oceną aktywności ruchowej, wyglądu zewnętrznego i pozostałości błon. Cechy te oceniane były zgodnie z ich znaczeniem w skali od 0-100 punktowej. Wymiary piskląt oznaczono poprzez pomiar długości od czubka dzioba do końca środkowego palca nogi.

Doświadczenie 2.

Doświadczenie wykonano na 1740 jajach wylęgowych. W 18. dniu inkubacji jaja zważono i prześwietlono, aby wyeliminować jaja niezapłodnione i zawierające zamarte zarodki. Jaja z żywymi zarodkami podzielono losowo na pięć równolicznych grup: (1) grupa kontrolna (sól fizjologiczna), (2, 3 i 4) grupy z różnymi stężeniami ekstraktu pyłku pszczelego – 1,5%, 2,5% i 5,0%. Do ostatniej grupy podano roztwór węglowodanowy (5). Na podstawie wyników doświadczenia 1., manipulacja została przeprowadzona do komory powietrznej jaja. W dniu wylęgu żywe pisklęta zważono indywidualnie i obliczono średnią masę ciała oraz określono wylęgowość (%) z jaj nałożonych dla każdej z grup. Jakość nowowyklutych piskląt oceniano na podstawie wyglądu zewnętrznego ptaków za pomocą 100-punktowej skali. Długość piskląt oznaczono poprzez pomiar od czubka dzioba do końca środkowego palca nogi. Wszystkie jaja niewykluć zostały objęte analizą embriopatologiczną. Z każdej grupy doświadczalnej, od 10 losowo wybranych ptaków, pobrano próbki krwi w celu oznaczenia poziomu białka ogólnego, cholesterolu całkowitego, HDL, LDL, glukozy, mocznika, kwasu moczowego i transaminaz. W 1., 7. i 42. dniu życia z każdej grupy doświadczalnej od 5 losowo wybranych ptaków, po wcześniejszej dekapitacji, pobrano do analizy próbki tkanek i narządów: mięśniowej prawego uda oraz wątroby. Po zarejestrowaniu wyników, tkanki zamrożono w ciekłym azocie. Oznaczenie zawartości glikogenu w wątrobie i mięśniach przeprowadzono w Dziale Analityki Laboratoryjnej Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach przy wykorzystaniu metody antronowej według Rasouli

i in. (2015) oraz Chun&Yin (1998). W trakcie doświadczenia, we wszystkich powtórzeniach określono masę ciała w 1., 21., 35. i 42. dniu życia, kontrolowano pobieranie paszy oraz liczbę sztuk padłych. Na podstawie zebranych danych doświadczalnych obliczono podstawowe wskaźniki produkcyjne. Po zakończonym odchowie na podstawie uzyskanych wyników produkcyjnych kurcząt brojlerów został obliczony dla każdej grupy doświadczalnej europejski wskaźnik wydajności (EWW). Ponadto, schłodzone tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej, a następnie wyliczono m.in. wydajność rzeźną oraz procentowy udział mięśni, tłuszczu i podrobów w tuszce.

Doświadczenie 3.

Doświadczenie wykonano na 494 jajach wylęgowych. Jaja ważono indywidualnie, a średnia masa wynosiła 61,4 g (między 60,3 a 63,4 g). W 18. dniu inkubacji jaja zważono i prześwietlono, aby wyeliminować jaja niezapłodnione i zawierające zamarte zarodki. Na podstawie wyników doświadczenia 2. wybrano dawkę pyłku pszczelego w koncentracji 1,5%. Jaja z żywymi zarodkami podzielono losowo na cztery równoliczne grupy: grupa 1 – brak iniekcji + żywienie standardowe; grupa 2 – iniekcja *in ovo* 1,5% pyłku pszczelego + żywienie opóźnione; grupa 3 – iniekcja *in ovo* roztworem węglowodanowym + żywienie opóźnione i grupa 4 – brak iniekcji + żywienie opóźnione. Wszystkie ptaki z grup doświadczalnych w trakcie odchovu miały jednakoowo stały dostęp do poideł w wodę. Dalsze procedury związane ze wskaźnikami doświadczalnymi w dniu wylęgu (ocena jakości piskląt), w trakcie odchovu (parametry produkcyjne i analiza rzeźna), zostały przeprowadzone zgodnie z metodyką zawartą w doświadczeniu 2. Preparaty histologiczne wykonano w Zakładzie Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach. Po uboju, w 42. dniu odchovu, do analizy histologicznej jelita cienkiego, wybrano 5 ptaków z każdej grupy o masie ciała zbliżonej do średniej dla grupy. Próbkę pobierano z punktu środkowego dwunastnicy po 3 odcinki dwucentymetrowe. W sumie pobrano 60 próbek (4 grupy × 3 fragmenty × 5 ptaków). Przy użyciu systemu przetwarzania obrazu określono: wysokość kosmków, szerokość i głębokość krypt oraz grubość warstwy mięśniowej jelita cienkiego.

Syntetyczny opis wyników:

W doświadczeniu 1. zaobserwowano, że przeprowadzenie zabiegów doświadczalnych nie zaburzyło tempa klucia wewnętrznego. W drugim okresie klucia, tzw. zewnętrznym, uzyskano tendencję do opóźnionego klucia zewnętrznego w grupie jaj z iniekcją do płynu owodniowego (grupa 4). Proces nakluwania skorupy jaja w grupie 4 trwał dłużej średnio o 7 h (grupa 2), 5 h (grupa 1) i 2,5 h (grupa 3) przy $P \leq 0,01$. Przeciętna długość inkubacji była statystycznie wysoko istotnie krótsza w grupie 2. Pisklęta ze wspomnianej grupy kludy się szybciej średnio o 6 h, w porównaniu z pozostałymi grupami. Analizując cały przebieg lęgu zaobserwowano, że przeprowadzenie iniekcji *in ovo* (grupa 3 i 4) wydłużyło proces klucia, natomiast sama dehermetyzacja skorupy wyraźnie go skróciła (grupa 2). Rezultaty inkubacji pod względem wylęgowości jaj nałożonych, jaj zapłodnionych oraz po zastosowaniu zabiegów doświadczalnych (dehermetyzacja jaj oraz iniekcja *in ovo*) nie wykazały statystycznie istotnych różnic. Jak wynika z przeprowadzonej analizy embriopatologicznej najwyższy wskaźnik stanów patologicznych występował w grupie, w której przeprowadzono iniekcję do płynu owodniowego. W grupie tej zaobserwowano również wyższy odsetek występowania zaburzeń związanych z retrakcją woreczka żółtkowego. Spośród wszystkich grup badawczych, punktowo najwyższą wartość odnotowano we

wszystkich grupach, w których przeprowadzono zarówno iniekcję *in ovo* jak i samą dehermetyzację skorupy. Analizując wszystkie cechy jakościowe łącznie, należy stwierdzić, iż najniższą jakością charakteryzowały się pisklęta z grupy kontrolnej (bez manipulacji *in ovo*).

W doświadczeniu 2. najniższy odsetek piskląt wykłutych zaobserwowano w grupie 4 (2,5% pyłku pszczelego), a najwyższy w grupie 2 (1,5% pyłku pszczelego). Różnica pomiędzy wspomnianymi grupami wynosiła 33,3% przy $P \leq 0,05$. Po zastosowaniu iniekcji *in ovo* 1,5% ekstraktu pyłku pszczelego i roztworu węglowodanowego zanotowano najwyższą średnią masę ciała w odniesieniu do innych dawek ekstraktu. Zastosowane czynniki doświadczalne nie wpłynęły na sumę punktów „Tona score”, natomiast pisklęta z grupy 2. były dłuższe średnio o 0,4 cm w porównaniu z grupą kontrolną. Analizując cały okres odchowu stwierdzono wyraźnie pozytywny wpływ podania iniekcji *in ovo* roztworu węglowodanów na uzyskane parametry odchowu. W grupie tej otrzymano najkorzystniejsze wyniki w zakresie przyrostów masy ciała i zużycia paszy. Wprowadzenie czynnika doświadczalnego w postaci ekstraktu pyłku pszczelego zmieniło także stężenie wybranych wskaźników biochemicznych we krwi pobranej od kurcząt w 7. dniu życia. We wszystkich grupach, w których zastosowano iniekcje *in ovo*, zaobserwowano istotny statystycznie niższy poziom białka ogólnego, cholesterolu, cholesterolu HDL i LDL, a także mocznika w odniesieniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie podanie roztworu węglowodanów *in ovo* dwukrotnie zwiększyło aktywność ALP i AST w porównaniu z innymi grupami. Ilościowe oznaczenie glikogenu w wątrobie i mięśniach brojlerów w 42. dniu odchowu nie potwierdziło długotrwałego oddziaływania iniekcji *in ovo* pyłku pszczelego.

W doświadczeniu 3. wydłużenie czasu oczekiwania na paszę dla piskląt do 36 godzin po wylęgu, skutkowało wolniejszym przyrostem masy ciała w pierwszym okresie odchowu (1.-21. dzień życia). W pierwszym tygodniu kurczęta osiągnęły wyższą masę ciała w grupie ze standardowym dostępem do paszy o 21% (grupa 2.), 50% (grupa 3.) oraz 18% (grupa 4.) przy $P \leq 0,01$. Najkorzystniejsze wskaźniki w pierwszym okresie odchowu, spośród grup kurcząt z opóźnionym dostępem do paszy, otrzymano w grupie bez iniekcji (grupa 2.) lub w grupie, której podano roztwór węglowodanowy metodą *in ovo*. Zastosowanie opóźnionego żywienia nie wpłynęło istotnie statystycznie na udział mięśni piersiowych i nóg w odniesieniu do grupy kontrolnej. Najwyższą wydajność rzeźną z podrobami odnotowano w grupie z wydłużonym okresem głodowym/bez iniekcji (grupa 2.), a różnica pomiędzy tą grupą i grupą, która otrzymała ekstrakt pyłku pszczelego (grupa 3.) wyniosła 10,6% i była statystycznie istotna ($P \leq 0,01$). Wysoko istotne ($P \leq 0,01$) zwiększenie udziału podrobów odnotowano jedynie w przypadku kurcząt, u których przeprowadzono iniekcję *in ovo* pyłku pszczelego i zastosowano opóźnione żywienie powylęgowe (grupa 3.). W przypadku żołądka i serca, grupy iniekowane (grupa 3. i 4.) charakteryzowały się wyższym udziałem tych podrobów w porównaniu z grupami kontrolnymi (grupa 1. i 2.). Ocena morfometryczna odcinka jelita cienkiego nie wykazała wpływu opóźnionego dostępu do paszy na wysokość i powierzchnię kosmków jelitowych u 42-dniowych brojlerów. Istotne obniżenie tych parametrów odnotowano jedynie w przypadku kurcząt, którym podano roztwór węglowodanowy w 18. dobie inkubacji, zarówno w przypadku skrócenia wysokości kosmków oraz zmniejszenia całej ich powierzchni.

Podsumowanie :

1. Przeprowadzenie iniekcji *in ovo* 500 µl 0,9% NaCl w 18. dobie inkubacji do komory powietrznej lub płynu owodniowego wydłużyło proces klucia, natomiast sama dehermetyzacja skorupy wyraźnie go skróciła (doświadczenie 1.).
2. Najwyższy odsetek stanów patologicznych i zaburzeń związanych z retrakcją woreczka żółtkowego odnotowano w odpadzie powylęgowym grupy, w której przeprowadzono iniekcję *in ovo* do płynu owodniowego zarodka (doświadczenie 1.).

3. 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 (doświadczenie 2.).
4. Nie zaobserwowano długotrwałego działania ekstraktu pyłku pszczelego podawanego w formie iniekcji *in ovo* na masę ciała kurcząt, zwłaszcza w drugim okresie odchowu (doświadczenie 2.).
5. Podanie ekstraktu pyłku pszczelego w 18. dobie inkubacji wpływa na wybrane wskaźniki biochemiczne w surowicy kurcząt, zwłaszcza w 7. dniu życia (doświadczenie 2.).
6. Opóźniony dostęp piskląt po wylęgu do paszy (36 h) skutkował spowolnieniem ich wzrostu, w efekcie czego kurczęta te miały niższe przyrosty w pierwszym etapie odchowu (od 1.-21. dnia życia). W drugim etapie odchowu masa ciała kurcząt była wyrównana (doświadczenie 3.).
7. Iniekcja *in ovo* ekstraktem pyłku pszczelego lub roztworem węglowodanowym nie rekompensuje okresu bez dostępu do paszy u piskląt (doświadczenie 3.).
8. Podsumowując, można stwierdzić, że zastosowanie ekstraktu pyłku pszczelego w iniekcji *in ovo* może stanowić skuteczną metodę poprawy jakości jednodniowych piskląt.

Fot. 1. Iniekcja *in ovo* (J. Pawłowska).

Fot. 2. Pisklęta jednodniowe (J. Pawłowska).



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 było określenie częstotliwości występowania i nasilenia miopatii i wad mięsa u szybko i wolno rosnących kurcząt rzeźnych oraz zbadanie mikrostruktury i fizykochemicznych i sensorycznych właściwości obarczonych nimi mięśni, a także skorelowanie ich z przyrostami masy ciała, umięśnieniem i odtuszczeniem ciała ptaków.

Celem etapu było określenie wpływu nasilenia miopatii *white stripping* (białych smug) na mikrostrukturę mięśni piersiowych kurcząt.

Materiał doświadczalny stanowiły mięśnie piersiowe powierzchniowe (*pectoralis superficialis*) szybko rosnących kurcząt Ross 308 odchowywanych do 42. dnia życia.

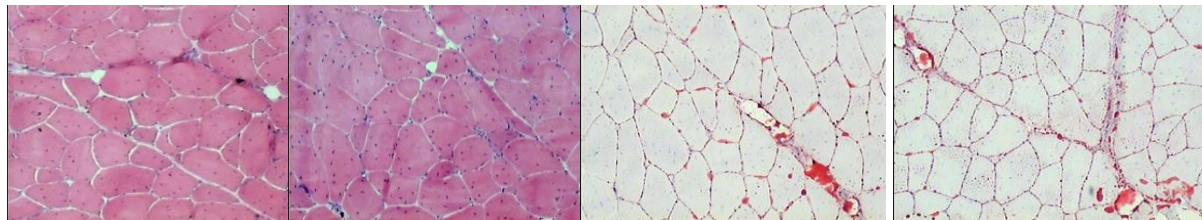
Po zakończonym odchowie wybrano do uboju 100 kurcząt w celu określenia częstotliwości występowania miopatii *white stripping* (białych smug). Od kurcząt tych, natychmiast po uboju, pobrano próbki mięśnia piersiowego powierzchownego (*pectoralis superficialis*) w celu przeprowadzenia badań histologicznych. Próbki mięśni, zbliżone kształtem do prostokątów o wysokości ok. 3 cm i podstawie ok. 0,5 cm² wycinano równolegle do przebiegu włókien mięśniowych i mrożono w ciekłym azocie. Do czasu analiz próbki przechowywano w zamrażarce w temp. -87°C.

Ocenione pod kątem defektu *white stripping* mięśnie piersiowe kurcząt przydzielono do grup w zależności od braku lub obecności tej wady z uwzględnieniem stopnia jej nasilenia. Grupę I stanowiły mięśnie normalne, w których nie obserwowano wady, do grup II, III i IV przydzielono mięśnie o odpowiednio: małym, średnim i dużym jej nasileniu.

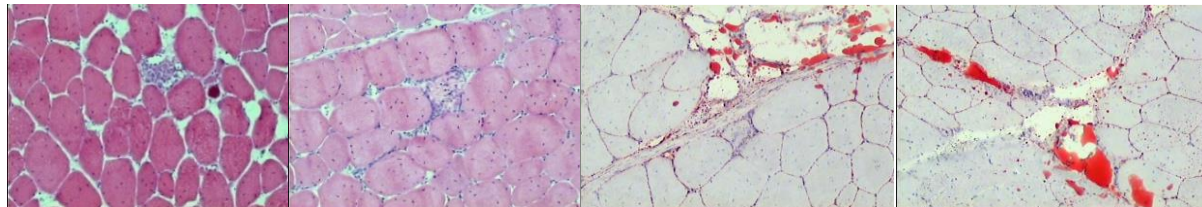
Z każdej grupy mięśni szybko rosnących ptaków wybrano po 5 reprezentatywnych próbek w celu określenia ich histochemicznego profilu. Próbki pocięto w kriostacie (HR-Slee) na skrawki o grubości 10 µm w temperaturze -25°C i poddano reakcji na wykrywanie dehydrogenazy NADPH (diaforazy) metodą Pearsa oraz reakcji na aktywność ATP-azy miozynowej, zgodnie z metodyką Brooke i Kaiser (1970) oraz Guth i Samaha (1972). W celu określenia tłuszczu śródmięśniowego przeprowadzono także barwienie czerwienią oleistą (*Oil red*). Badania zostały przeprowadzone przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon E600 oraz programu analizy obrazu Multi Scan 95.

Badania histochemiczne wykazały różnice w budowie mikroskopowej mięśni piersiowych kurcząt w zależności od stopnia nasilenia wady białych smug. Wraz ze wzrostem nasilenia białych prążków w mięśniach piersiowych kurcząt następował wzrost częstotliwości występowania zmian miopatycznych. W obrazie mikroskopowym, w mięśniach o największym nasileniu omawianej wady (grupa IV), obserwowano częste zwyrodnienie włókien mięśniowych, przerost tkanki łącznej prowadzący do zwłóknienia mięśnia oraz nagromadzenie ziaren tłuszczu śródmięśniowego.

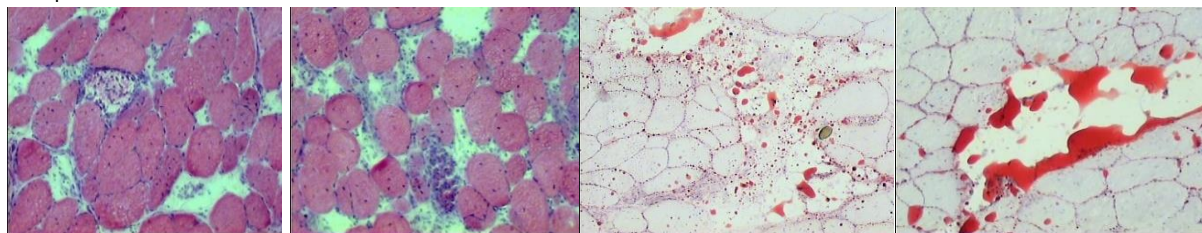
Grupa I



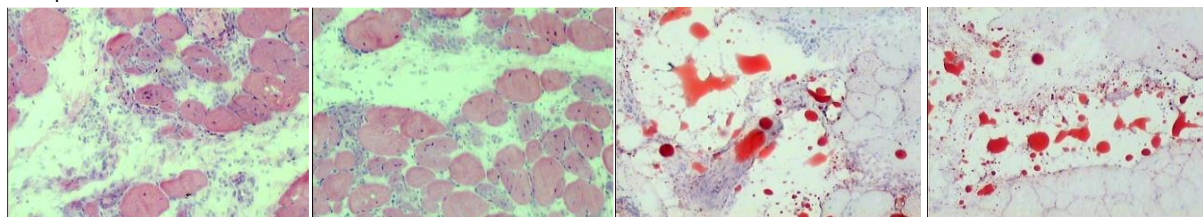
Grupa II



Grupa III



Grupa IV



Badania histochemiczne potwierdziły wyniki przeprowadzonej analizy składu chemicznego. Najwyższą zawartością tłuszczu surowego charakteryzowały się mięśnie z grupy IV, przy potwierdzonych statystycznie różnicach pomiędzy nimi, a mięśniami z grupy I i II. Wraz z nasilaniem się wady białych smug obniżeniu ulegał natomiast udział białka ogólnego.

W kolejnym etapie badań, wyodrębnione grupy mięśni piersiowych kurcząt, zostaną poddane dalszej charakterystyce pod względem mikrostruktury, a uzyskane wyniki zostaną skorelowane z pozostałymi fizykochemicznymi cechami mięśni kurcząt, a także z ich przyrostami masy ciała, umięśnieniem i odtuszczeniem przy równoczesnym uwzględnieniu genetycznego pochodzenia ptaków. Uzyskane wyniki przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat podłoża oraz przyczyn występowania miopatii i wad mięsa u szybko i wolno rosnących kurcząt rzeźnych.

Zakład Hodowli Owiec i Kóz
p.o. Kierownika: dr hab. Aldona Kawęcka, prof. IZ PIB

Zadanie 01-13-03-11

Charakterystyka zróżnicowania genetycznego małej populacji na przykładzie rodzimej rasy kóz karpackich

Kierownik zadania: dr hab. Aldona Kawęcka, prof. IZ PIB

Realizacja zadania uwzględnia cele szczegółowe:

- Analiza struktury genetycznej populacji o małej liczebności na przykładzie kóz karpackich.
- Wykorzystanie polimorfizmu białek mleka koziego w ocenie przydatności technologicznej i dietetycznej surowca.

W okresie sprawozdawczym, do utworzonej wcześniej aplikacji bazodanowej, zostały wprowadzone dane dotyczące kóz karpackich. Uaktualniona baza danych zawierała informacje o 330 kozach i 72 kozłach. W 2020 roku wprowadzono dane dotyczące kolejnych 94 kóz oraz 11 kozłów. Aplikacja umożliwia wyszukiwanie informacji o zwierzętach wraz z filtrowaniem, edycję i dodawanie nowych zwierząt i hodowców oraz generowanie „Świadectwa wpisu do ksiąg”. „Świadectwa” dla kóz wprowadzonych do ksiąg w 2020 roku, w wyniku wyboru licencyjnego, były generowane w nowej aplikacji.

Równolegle do tych zadań przeprowadzono analizę polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych rodzimej rasy kóz karpackich. Wykorzystując 14 markerów zalecanych przez ISAG do kontroli pochodzenia kóz, przeprowadzono analizy i oszacowano parametry, m.in. heterozygotyczność, indeks stopnia polimorfizmu czy współczynnik Wrighta. Uzyskane wyniki posłużą do analizy struktury genetycznej populacji kóz karpackich.

Fot. 1. Koza karpacka (M. Pasternak).



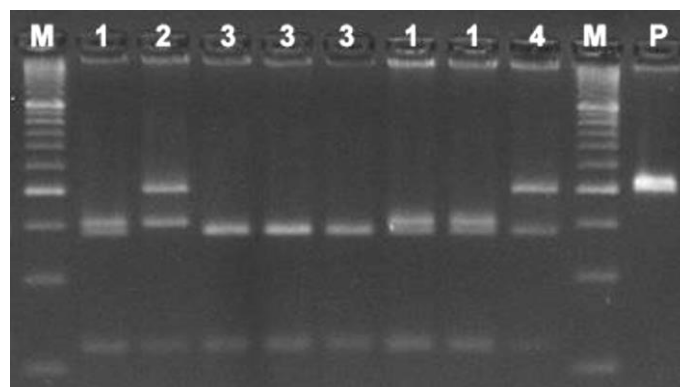
Tab. 1. Parametry struktury genetycznej w analizowanych loci.

LOCUS	Ho	He	PIC	PE1	PE2	FIS
RSP23	0,812	0,851	0,834	0,539	0,704	0,045
ILSTS87	0,726	0,754	0,714	0,354	0,531	0,036
INRA063	0,407	0,422	0,394	0,094	0,239	0,029
SRCRSP8	0,627	0,703	0,662	0,305	0,479	0,108
OARFCB20	0,670	0,676	0,622	0,258	0,424	0,009
MAF65	0,677	0,762	0,739	0,397	0,581	0,111
MCM527	0,641	0,683	0,648	0,285	0,467	0,059
CSRD247	0,737	0,752	0,715	0,358	0,536	0,019
INRA006	0,791	0,843	0,825	0,521	0,688	0,063
ILSTS19	0,716	0,761	0,728	0,375	0,554	0,059
ILSTS008	0,595	0,569	0,517	0,178	0,331	-0,045
INRA005	0,620	0,659	0,601	0,237	0,398	0,059
SRCRSP5	0,684	0,780	0,746	0,395	0,573	0,122
INRA023	0,698	0,722	0,69	0,337	0,518	0,033

Ho – heterozygotyczność obserwowana, He – heterozygotyczność oczekiwana, PIC – indeks stopnia polimorfizmu, PE – prawdopodobieństwo wykluczenia, Fis – współczynnik Wrighta

W ramach oceny polimorfizmu genów białek mleka koziego, próbki DNA 294 kóz różnych ras (karpackich, anglonubijskich, alpejskich i bezrasowych), poddano analizie genetycznej genów CSN1S1 i CSN2. W przypadku genu CSN1S1 zaprojektowano różne pary starterów do sekwencjonowania fragmentu genu, obejmującego odcinek intronu 8 do intronu 11. Dzięki tej metodzie zaobserwowano na żelu agarozowym 10 różnych wariantów genotypowych, powstałych wskutek różnej kombinacji wariantów *allelicznych*. Wariant *alleliczny*, opisany jako D-I- (brak delecji, brak insercji), związany jest wg danych literaturowych z *allelami* CSN1S1A i CSN1S101, wariant D-I+ (brak delecji, obecność insercji) związany jest z *allelami* CSN1S1B i CSN1S1E, wariant D-I+ (obecność delecji i insercji) związany jest z CSN1S1F, a wariantu D-I+ (obecność delecji, brak insercji) nie powiązano jeszcze z żadnym konkretnym *allem*. W najbliższym czasie planowana jest weryfikacja niektórych otrzymanych wariantów genotypowych.

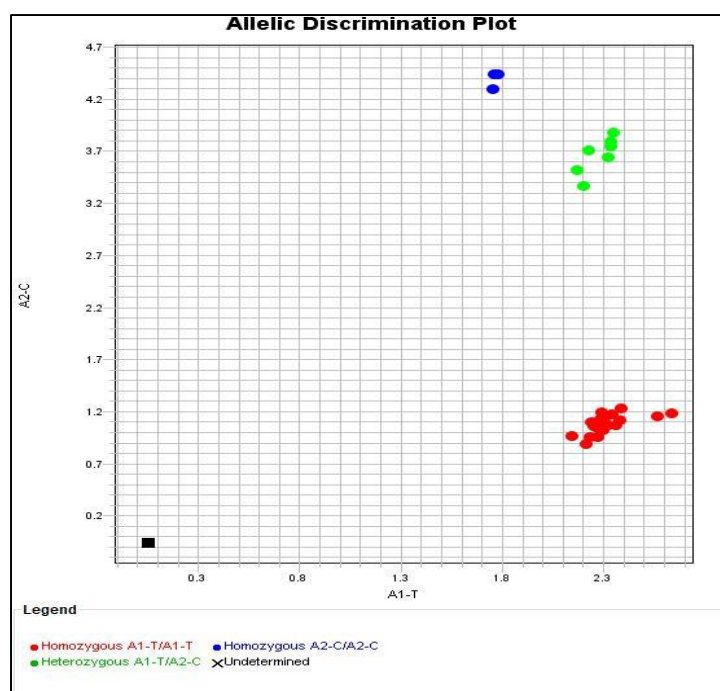
Ryc. 1. Analiza RFLP z enzymem XmnI fragmentu genu CSN1S1, wybrane warianty; M – marker; P – niepocięty produkt PCR; 1 – wariant D-I+ / D-I-; 2 – wariant D+I- / D-I+; 3 – wariant D-I- / D-I-; 4 – wariant D+I- / D-I-.



W przypadku genu CSN2 zastosowano metodę genotypowania z użyciem aparatu real-time PCR i znakowanych sond TaqMan MGB. Zaprojektowano zestawy sond i starterów do trzech pozycji w genie: AJ011018:g.8915C>T, AJ011018:g.8561delA oraz kodonu A177V; w przypadku AJ011018:g.8915C>T, występowanie T powiązane z niekorzystnym *allele* 01; w przypadku AJ011018:g.8561delA, delecja nukleotydu A została powiązana z występowaniem niekorzystnego *allelu* 0.

W kwestii kodonu 177, występowanie nukleotydu T (GTA) powiązane z *allele* C, a nukleotydu C (GCA) z *allelami* A1, E, 0 i 0'. W badanej grupie kóz wszystkie osobniki były homozygotami CC w pozycji AJ011018:g.8915 i homozygotami AA w pozycji AJ011018:g.8561 (brak delecji), co wyklucza w badanej populacji obecność *alleli* 01 i 0. Zaobserwowano zmienność. 55,4% kóz było homozygotami TT (genotyp CSN2 C/C), 34,5% kóz było heterozygotami CT (genotyp CSN2 C/i, gdzie i = inny *allele*), a tylko 10,1% osobników było homozygotami CC (genotyp CSN2 i/i). Wyniki wymagają jeszcze potwierdzenia sekwencjonowaniem, co jest planowane w najbliższym czasie.

Ryc. 2. Genotypowanie metodą dyskryminacji alleli dla kodonu 177; czerwone kropki – homozygoty TT; niebieskie kropki – homozygoty CC; zielone kropki – heterozygoty CT.



W celu oceny możliwości produkcyjnych kóz karpackich, utrzymywane w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o. kozy, poddano indywidualnej kontroli mleczności, podczas której pobierane są próby mleka do analiz podstawowego składu i liczby komórek somatycznych. W ostatnim etapie prac planowane jest znalezienie związku między polimorfizmem kazeiny a wydajnością i składem mleka kóz.

Zakład Hodowli Drobego Inwentarza
p.o. Kierownika: 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

Celem prowadzonych badań było wskazanie możliwości wykorzystania w żywieniu królików mięsnych nowego materiału paszowego, jakim są mączki z bezkręgowców, określenie ich wpływu na walory prozdrowotne mięsa króliczego oraz próba ich wykorzystania jako substytutu dla poekstrakcyjnej śruty sojowej.

Metody badawcze:

Materiał doświadczalny stanowiły króliki rasy nowozelandzkiej białej, pochodzące z fermy należącej do Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach, w ilości 112 sztuk podzielonych na 4 grupy po 28 sztuk w każdej. Badania prowadzono w okresie od odsadzenia młodych króliczków od matek w 35. dniu życia do 90. dnia życia. Na potrzeby doświadczenia sporządzono cztery mieszanki paszowe – kontrolną (K) i trzy doświadczalne: z 5% udziałem suszonych larw jedwabnika morwowego (A), z 5% udziałem suszonych larw mącznika młynarka (B) i z 5% udziałem larw drewnojada. W grupach doświadczalnych, oprócz mączki z larw owadów, w miejsce poekstrakcyjnej śruty sojowej wprowadzono łubin biały w ilości 5% dawki pokarmowej. Króliczka żywiono *ad libitum*.

W gotowych mieszankach paszowych przeprowadzono analizę podstawową, oznaczenie zawartości wybranych aminokwasów i kwasów tłuszczowych. W celu oceny wyników produkcyjnych zostały określone: indywidualne masy ciała królików w wieku 35 i 90 dni, procent upadków za cały okres tuczu i zużycie paszy na 1 kg przyrostu.

Po zakończeniu odchowu doświadczalnego (w wieku 90 dni), zwierzęta po 24-godzinnej głodówce, poddawano ubojowi (10 sztuk w grupie).

Pozyskane tuszki, po wcześniejszym podzieleniu na trzy części (część przednia – cięcie prowadzone na wysokości ostatniego żebra, comber – cięcie na wysokości ostatniego kręgu lędźwiowego, część tylna – obejmująca nogi wraz z częścią krzyżową), poddano dysekcji. W tuszce określono zawartość mięśni, tłuszczu i kości.

Cechy chemiczne mięsa króliczego oznaczano w próbkach mięsa o masie 50 g, pochodzących z udźca – część tylna (*m. biceps femoris*) i combra – mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*). Oznaczono poziom aminokwasów, kwasów tłuszczowych i cholesterolu całkowitego, kolagenu, witamin A i E, oceniono również stopień oksydacji.

Badaniom poddano również zawartość jelita grubego oznaczając ilość lotnych kwasów tłuszczowych.

Wyniki:

Diety zastosowane w prowadzonych badaniach były porównywalne pod względem białka surowego, przy nieco wyższej zawartości tłuszczu surowego w grupach doświadczalnych, nie stwierdzono natomiast różnic w zawartości NDF, ADF i ADL (Tab. 1.). Porównywalna była również zawartość aminokwasów.

Tab. 1. Analiza podstawowa granulatów z poszczególnych grup (%).

Składniki	Grupa			
	K	A	B	C
Sucha masa	89,43	89,46	89,01	89,82
Tłuszcz surowy	3,30	4,71	4,76	5,21
Popiół surowy	7,57	6,32	6,44	6,40
Białko ogólne	16,30	16,36	15,83	16,01
Włókno surowe	9,27	10,41	10,26	10,08
NDF	23,27	24,43	24,37	24,29
ADF	11,93	12,81	13,20	12,43
ADL	2,71	2,92	2,69	2,76

Zastosowanie 5% dodatku mączek z owadów zmodyfikowało profil FA lipidów w diecie. Całkowita wartość SFA była najwyższa w diecie A, B i C, podobnie kształtowała się zawartość kwasu oleinowego (C18: 1 n-9), podczas gdy kwas linolowy (C18: 2 n-6) i PUFA dominowały w profilu FA diety K. Najwięcej kwasów z rodziny PUFA n-3 stwierdzono w grupie doświadczalnej A z 5% dodatkiem mączki z larw jedwabnika morwowego (Tab. 2.).

Tab. 2. Zawartość wybranych kwasów tłuszczowych w mieszankach paszowych (g/100 g wszystkich oznaczonych kwasów).

Kwas	Grupa			
	K	A	B	C
C 8:0	0,00	0,004	0,002	0,83
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,03
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,21	0,21	0,91	0,64
C16:0	14,39	17,10	15,57	22,38
C16:1	0,34	0,55	0,78	0,47
C18:0	2,11	3,43	2,27	4,46
C18:1	20,92	29,46	28,07	27,10
C18:2	48,20	32,48	41,78	31,59
Gamma 18:3	0,06	0,01	0,01	0,07
C:20	0,13	0,24	0,23	0,27
C18:3	13,05	15,70	9,76	8,56
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4	0,06	0,24	0,02	0,04
C22:1	0,07	0,13	0,21	0,18
EPA	0,02	0,05	0,05	0,05
DHA	0,44	0,36	0,34	0,35
SFA	16,84	21,02	19,00	28,61
UFA	83,16	78,98	81,00	71,39
MUFA	21,33	30,14	29,05	27,74
PUFA	61,83	48,84	51,95	43,65
PUFA-6	48,32	32,73	41,80	34,70
PUFA-3	13,51	16,11	10,14	8,96
DFA	85,27	82,41	83,27	75,85
UFA/SFA	4,94	3,76	4,26	2,50
MUFA/SFA	1,27	1,43	1,53	0,97
PUFA/SFA	3,67	2,32	2,73	1,53
PUFA/6/3	3,58	2,03	4,12	2,87

W badaniach prowadzonych na królikach wykazano, że przy wyrównanej, początkowej masie ciała (752,4-765,4 g) w 90. dniu życia zwierząt istotne różnice ($p \leq 0,05$) stwierdzono pomiędzy grupą K a grupami doświadczalnymi A i B oraz między grupą C a pozostałymi. Masa tuszki ciepłej z głową była najwyższa w grupie A i B, a istotne różnice wystąpiły pomiędzy grupami A, B a K i C oraz między K a C (Tab. 3.). Masa mięśni w tuszce była najwyższa w grupach A i B, a różnice pomiędzy grupami A i B a K i C okazały się istotne na poziomie ($p \leq 0,05$). Nie stwierdzono statystycznie potwierdzonych różnic pomiędzy grupami w ilości tłuszczu pachwinowego, łopatkowego i okołonerkowego oraz w wykorzystaniu paszy na 1 kg przyrostu masy ciała. Wydajność rzeźna była zróżnicowana w grupach. Najwyższą stwierdzono w grupie skarmianej paszą z dodatkiem mączki z jedwabnika morwowego. Pomiedzy grupami K i C a A i B stwierdzono istotność na poziomie $p \leq 0,05$. Upadki na poziomie 10,7% (3 sztuki) stwierdzono jedynie w grupie C, skarmianej paszą z dodatkiem mączki z larw drewnojada. U zwierząt wystąpiła ostra biegunka.

Tab. 3. Masa ciała w 35. i 90. dniu życia królicząt (g), masa tuszki, mięsa i tłuszczu (g), wydajność rzeźna(%) oraz wykorzystanie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała (kg) (n=10).

Masa:	Grupa				p value
	K	A	B	C	
ciała w 35. dniu życia	752,4±9,60	762,5±6,64	759,9±7,21	765,4±6,84	0,628
ciała w 90. dniu życia	2462,7±21,2 ^a	2700,3±29,3 ^b	2634,2±27,6 ^b	2325,2±26,51 ^c	0,001
tuszki ciepłej z głową	1251,2±18,4 ^a	1562,3±26,1 ^b	1486,5±19,5 ^b	1152,7±16,42 ^c	0,002
mięśni w tuszce	928,5±24,1 ^a	1218,5±32,2 ^b	1186,1±21,1 ^b	869,2±11,41 ^a	0,006
tłuszczu pachwinowego	4,72±0,84	4,68±0,49	4,21±0,40	4,22±0,21	0,722
tłuszczu łopatkowego	11,80±1,11	10,63±0,61	11,38±0,82	10,21±0,52	0,253
tłuszczu okołonerkowego	15,22±1,41	16,12±1,98	15,32±1,38	15,38±1,43	0,101
Wykorzystanie paszy	3,892±0,52	3,956±0,29	3,802±0,25	3,796±0,26	0,021
WR	50,80±6,58 ^a	57,86±5,42 ^b	56,43±5,26 ^b	49,57±4,28 ^a	0,458

Wartości oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie a, b, c - $P \leq 0,05$.

Analiza podstawowa mięsa króliczego (sucha masa, popiół całkowity, białko ogólne, tłuszcz surowy) wykazała statystycznie potwierdzone różnice zarówno w mięśniach tylnej nogi, jak i combra pomiędzy badanymi grupami w zawartości suchej masy i tłuszczu surowego. Istotne różnice w zawartości suchej masy na poziomie $p \leq 0,05$ stwierdzono w mięśniach tylnej nogi pomiędzy grupami B i C, a w mięśniach combra pomiędzy grupą K a pozostałymi. W mięśniach tylnej nogi najwięcej tłuszczu surowego stwierdzono w grupie B i K, najmniej w A i C. Różnice te okazały się statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$. Najwięcej tłuszczu surowego w mięśniach combra stwierdzono w grupie K. Pomiedzy tą grupą a pozostałymi stwierdzono różnice na poziomie $p \leq 0,05$.

Największy, choć niepotwierdzony statystycznie udział białka, oznaczono w mięśniach combra wszystkich grup doświadczalnych, w mięśniach tylnej nogi poziom białka był wyrównany we wszystkich grupach.

Najniższe wartości TBARS po 14 dniach zamrażalniczego przechowywania mięsa tylnej nogi królików stwierdzono w grupie C, najwyższe w grupie K. Pomiedzy grupami K i A a pozostałymi stwierdzono istotność na poziomie $p \leq 0,05$. Po 90 dniach zamrażalniczego przechowywania mięsa tylnej nogi najniższa wartość dotyczyła grupy A, najwyższa grupy K. Nie stwierdzono statystycznie potwierdzonych różnic w zawartości kolagenu oraz witaminy E pomiędzy badanymi grupami. Natomiast najwyższy poziom witaminy A stwierdzono w grupie

kontrolnej. Pomiędzy grupą K a C różnica kształtowała się na poziomie $p \leq 0,05$. Najniższy poziom cholesterolu wystąpił w grupie K, najwyższy w C. Różnica ta została potwierdzona statystycznie ($p \leq 0,05$).

Istotne różnice ($p \leq 0,05$) po 14 dniach zamrażalniczego przechowywania mięśni combra stwierdzono dla wskaźnika TBARS pomiędzy grupą C a pozostałymi, po 90 dniach wartości te były wyrównane. Najniższą wartość cholesterolu stwierdzono w grupie C. Pomiędzy tą grupą a grupami K i A różnice zostały potwierdzone statystycznie ($p \leq 0,05$). Nie stwierdzono natomiast różnic w zawartości kolagenu, witaminy A i E.

Suma aminokwasów egzogennych w mięśniach tylnej nogi była najniższa w grupie C, gdzie króliki były skarmiane mieszanką paszową z dodatkiem mączki z larw drewnojada. Pomiędzy grupą C a pozostałymi stwierdzono statystycznie potwierdzone różnice na poziomie $p \leq 0,05$. W mięśniach combra suma aminokwasów egzogennych była najwyższa w grupie K i B. Pomiędzy tymi grupami a grupą A stwierdzono różnice na poziomie $p \leq 0,05$.

Dodatek do paszy dla królików mączek z larw owadów wpłynął na profil kwasów tłuszczowych. Zarówno w mięśniach tylnej nogi, jak i combra, wykazano istotne różnice ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do zawartości kwasu linolenowego (C18:3n-3) i EPA pomiędzy grupą A a pozostałymi, co wpłynęło na istotny wzrost ilości kwasów rodziny PUFA n-3 i najniższy stosunek kwasów PUFA n-6/n-3. We wszystkich grupach doświadczalnych, zarówno w mięśniach tylnej nogi jak i combra, stwierdzono niższy poziom kwasów SFA. W mięśniach combra wartości te zostały potwierdzone statystycznie na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy grupą K a pozostałymi. W obydwu mięśniach w grupach doświadczalnych w stosunku do kontrolnej istotnie wzrosła również zawartość kwasów UFA. W grupach A i C w obydwu badanych mięśniach istotnie wzrosła ilość kwasów DFA o działaniu hipocholesterolemicznym, zmniejszających wchłanianie cholesterolu.

W treści jelita grubego królików oznaczono lotne kwasy tłuszczowe. Pomiędzy grupami nie stwierdzono różnic w ilości kwasu octowego i izomasłowego. Najwięcej kwasu propionowego stwierdzono w grupie kontrolnej, a różnica pomiędzy grupami K, A i B a C została potwierdzona statystycznie na poziomie $p \leq 0,05$. Podobnie najwyższa ilość kwasu masłowego i izowalerianowego dotyczyła grupy K i była istotnie wyższa w stosunku do wszystkich grup doświadczalnych. Najmniej kwasu walerianowego stwierdzono w grupie C, otrzymującej 5% dodatek mączki z larw drewnojada. Pomiędzy grupą C a K i A stwierdzono istotność na poziomie $p \leq 0,05$. Istotne różnice w ilości tego kwasu stwierdzono również pomiędzy grupami K a A i B ($p \leq 0,05$). Ogólna suma lotnych kwasów tłuszczowych była największa w grupie kontrolnej, najniższa w grupie doświadczalnej C. Różnice, zarówno między grupą K a pozostałymi, jak i pomiędzy grupą C a pozostałymi zostały potwierdzone statystycznie na poziomie $p \leq 0,05$.

Podsumowanie wyników badań:

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że królikom w mieszankach paszowych można podawać mączki z larw owadów mącznika młynarka i jedwabnika morwowego w ilości 5% dawki pokarmowej, bez wpływu na ich zdrowotność i jakość pozyskanego mięsa. Możliwe jest również zastąpienie soi mieszanką mączek z tych owadów i łubinem białym. Koniecznym wydaje się wyjaśnienie negatywnego wpływu 5% dodatku mączki z drewnojada na wyniki produkcyjne królików. Wyniki badań własnych wykazały bowiem, że króliki z tej grupy uzyskały najniższą masę ciała i tym samym wydajność rzeźną. Trudno jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, co było powodem tak niskich przyrostów, tym bardziej że pomiędzy grupami nie stwierdzono istotności w zużyciu paszy na 1 kg przyrostu masy ciała. Początkowo niektórzy naukowcy zajmujący się żywieniem wyrażali obawy, że przeszkodą we wprowadzeniu owadów do żywienia zwierząt może być stosunkowo wysoki udział w nich chityny. Zależy on w dużym stopniu od

gatunku oraz fazy rozwoju owadów. Na przykład w mączce ze świerszcza polnego zawartość chityny może wynosić nawet do 8,7%. Powszechnie przyjmuje się, że chityna nie jest trawiona przez zwierzęta monogastyczne, jak i ryby. Jednak na podstawie badań naukowych stwierdzono, że ten związek chemiczny nie wykazuje efektu cytotoksycznego *in vitro*, jest fizjologicznie obojętny, biodegradowalny, ma właściwości antybakteryjne oraz wykazuje powinowactwo do białek. Dlatego też niskich przyrostów królików w grupie C nie można wiązać z ilością chityny w larwach drewnojada. Możliwe, że odpowiedzialna za ten fakt może być ilość hormonów juwenilnych związków o strukturze terpenoidu wytwarzanych przez ciała przyległe owadów. Niestety w literaturze faktu nie spotkano się z badaniami mogącymi dać konkretne wyjaśnienie.

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.

Grupy doświadczalne:

Grupy doświadczalne (kojec):

- Grupa 0. – kojec o wymiarach 60x80 cm (6 samic)
- Grupa 1. – kojec o wymiarach 120x80 cm (6 samic)

Grupy doświadczalne (klatki):

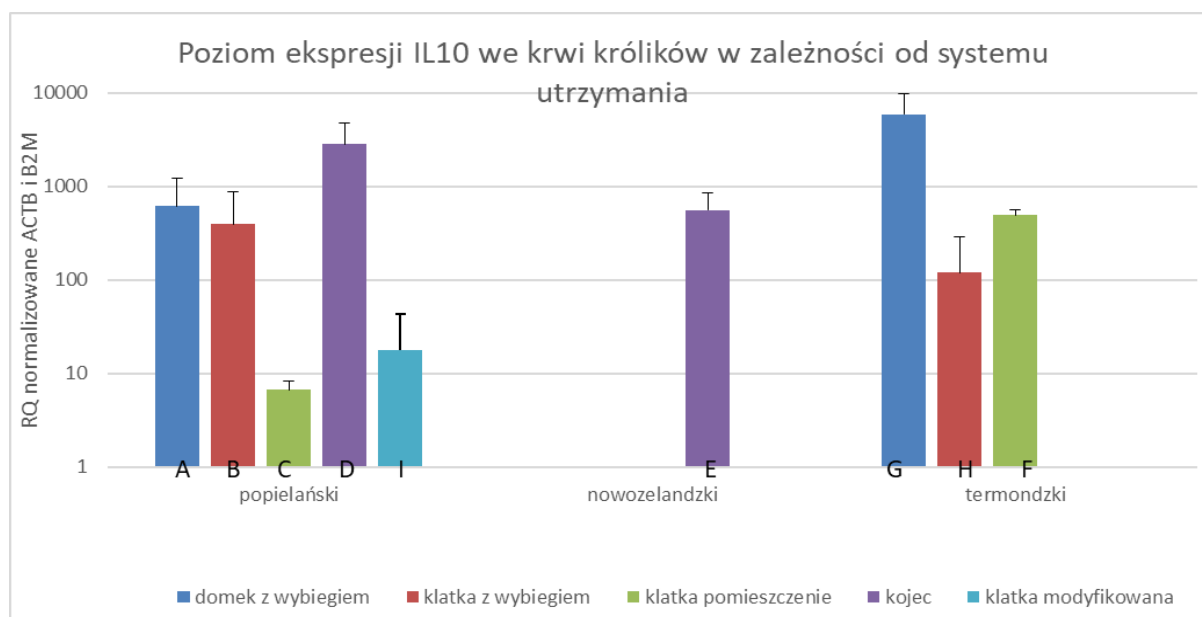
- Grupa 0. – klatka o wymiarach 60x80 cm (6 samic)
- Grupa 1. – klatka o wymiarach 120x80 cm (6 samic)

Grupy doświadczalne (system parkowy):

- Grupa I – budka z wybiegiem o pow. 2 m² (6 samic)
- Grupa II – kojec ziemny z wybiegiem (6 samic)

Po wykotach samice były odsadzane, a w dotychczasowym systemie, w każdej z grup, utrzymywana była odsadzona młodzież. 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.

Wykres 1. Poziom ekspresji IL10 we krwi królików w zależności od systemu utrzymania.



Fot. 1. Różne systemy utrzymania królików doświadczalnych (P. Bielański).

**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 drugiego sezonu badań była ocena zróżnicowania parametrów wartości odżywczej mięsa dwóch podgatunków jadalnego, lądowego ślimaka szarego (*Cornu aspersum*), zebranych w wieku ślimaka konsumpcyjnego (wiek 0+), w zależności od gatunku i stopnia intensywności chowu. Badania prowadzono na ślimaku małym szarym (*Cornu aspersum aspersum*) i ślimaku dużym szarym (*Cornu aspersum maxima*). Ślimaki z obu tych podgatunków utrzymywano w polowych zagrodach doświadczalnych, w zagęszczeniu standardowym stosowanym w produkcji fermowej (300 szt. wylęgu na 1 m² zagrody) oraz w warunkach chowu intensywnego (400 szt. na 1 m²). Natomiast, badania winniczków (*Helix pomatia*) jako gatunku dodatkowego, zostały przeprowadzone w pierwszym sezonie i przedstawione w ubiegłorocznej informacji. Dodatkowo przedmiotem badań była ocena zróżnicowania cech morfometrycznych i wydajności mięsnej ślimaków przy różnej intensywności ich chowu.

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

1. System standardowy

Powierzchnia 4 m²
 Ślimak mały szary
 300 szt. wylęgu/m²
 Powierzchnia 4 m²
 Ślimak duży szary
 300 szt. wylęgu/m²

2. System intensywny

Powierzchnia 4 m²
 Ślimak duży szary
 400 szt. wylęgu/m²
 Powierzchnia 4 m²
 Ślimak duży szary
 400 szt. wylęgu/m²

Wyniki:

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

Gatunek ślimaka/chów	BV	TD	NPU
Mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i>)/chów intens.	77,64 B	92,00	71,40 B
Mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i>)/chów standard.	69,90 A	92,19	64,45 A
Duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>)/chów intens.	71,61 A	92,40	66,19 AB
Duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>)/chów standard.	78,55 B	92,11	73,80 B
SEM	2,938	2,721	2,119

A, B – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P < 0.01$

Ocena wartości pokarmowej gotowanego mięsa ślimaków z partii nogi (Tab. 2.) wykazała najwyższą wartość biologiczną białka w przypadku ślimaków obu gatunków z chowu standardowego. BV białka w mięsie z partii nogi ślimaków z chowu intensywnego była również bardzo wysoka, jednak niższa niż z chowu standardowego. Różnice zostały potwierdzone statystycznie ($P < 0.01$). Te same prawidłowości stwierdzono w przypadku wykorzystania białka netto (NPU). Strawność rzeczywista białka mięsa z partii nogi u obu gatunków ślimaka była nieco wyższa niż w przypadku mięsa z partii worków trzewiowych i osiągnęła wyższe wartości w przypadku ślimaka małego szarego z obu systemów chowu, w porównaniu ze ślimakiem dużym szarym. Różnice w TD nie zostały potwierdzone statystycznie.

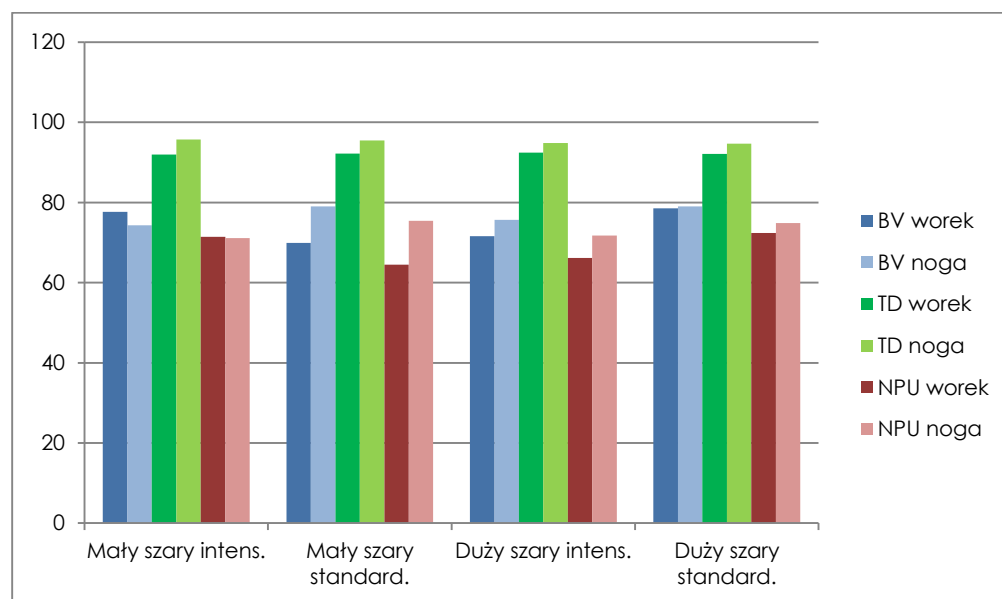
Tab. 2. Wartość pokarmowa białka gotowanego mięsa ślimaków (nogi).

Gatunek ślimaka/chów	BV	TD	NPU
Mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i>)/chów intens.	74,32 A	95,70	71,09 A
Mały szary (<i>Cornu aspersum aspersum</i>)/chów standard.	79,02 B	95,47	75,43 B
Duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>)/chów intens.	75,67 A	94,80	71,78 A
Duży szary (<i>Cornu aspersum maxima</i>)/chów standard.	79,00 B	94,67	74,9 B
SEM	2,391	2,810	2,192

A, B, C – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P < 0.01$

Aktualnie trwają analizy profilu aminokwasowego białka badanych liofilizatów mięsa ślimaków. Pozwoli to na porównanie wartości pokarmowej białka w doświadczeniu na szczurach z oceną chemiczną na podstawie składu aminokwasowego białka. Zostanie obliczony wskaźnik aminokwasów egzogennych (Essential amino acid index - EAII) wg wzorca jaja kurzego FAO/WHO (1995), wskaźnik aminokwasu ograniczającego (Chemical Score - CS) Blocka i Mitchella oraz wskaźnik aminokwasu ograniczającego, skorygowany o strawność rzeczywistą, uzyskaną w doświadczeniach na szczurach (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score – PDCAAS).

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



Wyniki biometryczne oraz wydajność mięsna ślimaka małego, szarego

	System standardowy (300 szt./m ²)	System intensywny (400 szt./m ²)
Masa ciała (g)	8,38 ^a	8,0 ^b
Średnica muszli (mm)	26,2 ^a	25,9 ^b
Współczynnik kondycji	0,42	0,40
Masa tuszy (g)	6,35 ^a	6,55 ^b
Masa nogi (g)	3,4 ^a	3,1 ^b
Masa worka trzewiowego (g)	2,7	2,6
Masa muszli (g)	1,7 ^a	1,55 ^b
Stosunek masy tuszy do masy ciała (%)	76,0	76,9
Stosunek masy nogi do masy ciała (%)	40,6	38,8
Stosunek masy nogi do masy tuszy (%)	53,5	50,4

Wyniki biometryczne oraz wydajność mięsna ślimaka dużego, szarego

	System standardowy (300 szt./m ²)	System intensywny (400 szt./m ²)
Masa ciała (g)	16,94 ^A	15,5 ^B
Średnica muszli (mm)	26,2 ^a	31,5 ^b
Współczynnik kondycji	0,43	0,40
Masa tuszy (g)	12,9 ^A	11,9 ^B
Masa nogi (g)	6,5 ^A	5,9 ^B
Masa worka trzewiowego (g)	5,4 ^A	4,9 ^B
Masa muszli (g)	3,62 ^A	3,38 ^B
Stosunek masy tuszy do masy ciała (%)	76,15	76,32
Stosunek masy nogi do masy ciała (%)	38,40	38,11
Stosunek masy nogi do masy tuszy (%)	50,39	49,58

W bieżącym roku badań, w intensywnym systemie chowu ślimaki obu podgatunków osiągały mniejsze rozmiary i masę ciała niż w systemie standardowym. W przypadku ślimaka małego szarego były to różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$), a w przypadku ślimaka dużego szarego wysoko istotne ($p < 0,01$). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic dotyczących wskaźników wydajności mięsnej pomiędzy obu systemami chowu.

Podsumowanie:

- Wartość pokarmowa białka mięsa z partii worka trzewiowego ślimaka małego szarego z chowu standardowego była istotnie niższa niż u ślimaka małego szarego z chowu intensywnego oraz ślimaka dużego szarego uzyskanego w obu systemach chowu. Białko w gotowanym mięsie z partii nogi ślimaków małego szarego i dużego szarego, charakteryzowało się wyższą wartością pokarmową niż białko mięsa z partii worka trzewiowego, niezależnie od systemu chowu. W przypadku mięsa z partii nogi, lepsze wyniki zanotowano u ślimaków obu podgatunków (ślimak duży i mały szary), uzyskanych w standardowym systemie chowu.
- W intensywnym systemie chowu ślimaki obu podgatunków osiągały mniejsze rozmiary i masę ciała niż w systemie standardowym. Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic dotyczących wskaźników wydajności mięsnej pomiędzy obu poziomami intensywności chowu.

Zakład Hodowli Koni
p.o. Kierownika: 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

Układ stawowo-kostny u koni podlega znaczącym przeciążeniom w wyniku użytkowania koni podczas pracy w zaprzęgu lub pod jeźdźcem. Jednopunktowe podparcie kończyny powoduje, że cały nacisk spowodowany siłą uderzenia, np. podczas skoku, musi być zamortyzowany przez cały skomplikowany układ połączeń kości i stawów oraz ścięgien i mięśni.

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.

W roku realizacji zadania kontynuowano badania służące do wyznaczenia teoretycznej fizjologicznej osi podparcia kończyny przedniej i tylnej konia.

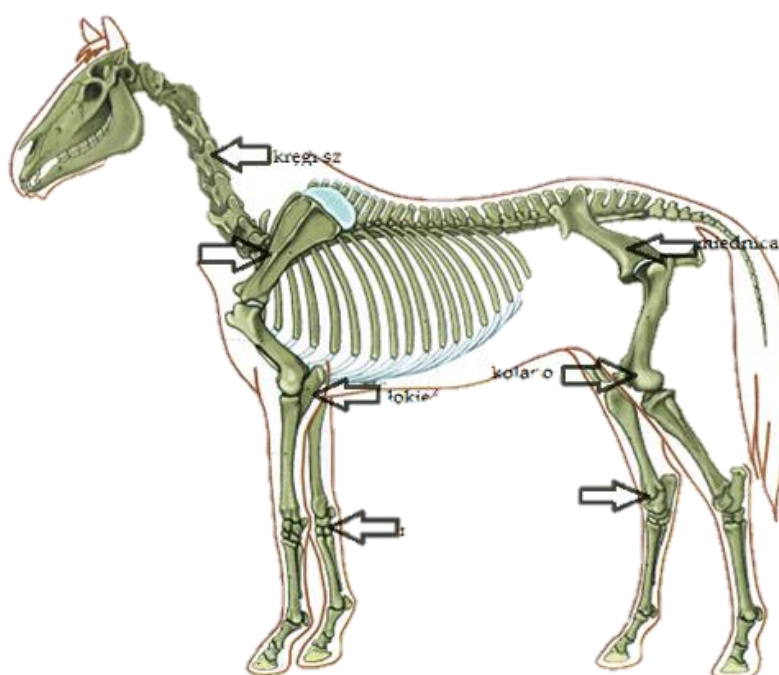
Wykorzystując doświadczenia z poprzedniego roku realizacji zadania i/ oraz opracowaną nieinwazyjną metodę, wyznaczano punkty na skórze. Łącznie pozwoliło to zdefiniować

20 punktów i wykonać pomiary zgodnie z opracowaną metodyką doświadczenia. Dodatkowo, wykonano szereg zdjęć koni z zaznaczonymi na skórze punktami, odzwierciedlającymi budowę anatomiczną szkieletu konia, które posłużą do dalszych analiz.

W omawianym okresie sprawozdawczym wykonano również rzeczywiste pomiary koni w celu opracowania metody wyznaczania fizjologicznej osi podparcia kończyn. Bazując na doświadczeniu rozpoczęto prace nad konstrukcją przyrządu – pozycjonera ze wskaźnikami laserowymi, umożliwiającego wykonywanie dalszych pomiarów, z możliwością wykorzystania dla zwierząt różnych grup wiekowych.

Z powodu wprowadzenia obostrzeń związanych z pandemią koronawirusa Covid-19 prace związane z realizacją wyznaczonych celów w terenie musiały zostać wstrzymane i będą kontynuowane w następnym roku.

Rys. 1. Układ stawowo-kostny konia.



Przeprowadzone badania i pomiary dotyczyły w szczególności określenia następujących zależności:

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

- Pomiary 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: 25 koni w ZD IZ PIB Odrzechowa sp. z o.o., 25 koni w SKH Gładyszów, 20 koni z prywatnych hodowli. Zbierany materiał dotyczył koni utrzymywanych w różnych warunkach środowiskowych: stajennych, stajennych z dostępem do wybiegów, wolnowybiegowych. Ponieważ każdy koń dokumentowany jest w co najmniej dwóch powtórzeniach z lewego boku, przodu i tyłu łącznie otrzymano w roku badawczym 2020 około 300 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 wykazała, że bez względu na rasę u koni przeważa postawa rozbieżna zarówno przednich jak i tylnych kończyn. Postawa równoległa praktycznie nie występuje. Potwierdzają to wyniki uzyskane podczas mierzenia kątów według opracowanej metody. Generalnie, również pole powierzchni styku kopyta z podłożem jest małe w stosunku do masy zwierząt oraz niepokojące są coraz częściej występujące bardzo małe, schowane strzałki w kopycie. Kopyta są także często pozbawione ścian wyporowych.

Zauważalna jest również zmiana stosunku długości poszczególnych części kończyny względem siebie. Dotychczasowe pomiary wskazują na zaburzenie równowagi między stosunkiem długości nadpęcia do długości kości ramieniowej. Na razie są to wstępne wyniki, które należy potwierdzić statystycznie po zebraniu większej ilości materiału badawczego w kolejnym roku.

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

Praca hodowlana, będąca fragmentem procesu ewolucyjnego, zależnego od zmiany roli i sposobu użytkowania koni, zmierza bardziej drogą eksterieru i ładnego wyglądu konia niż jego zdrowia i prawidłowego funkcjonowania oraz wykorzystania zgodnie z przeznaczeniem danej rasy.

Istnieje realne zagrożenie utraty podstawowych cech funkcjonalnych, jakim jest dobre zdrowie, długowieczność, płodność, a także charakter umożliwiający posiadanie i współpracę z końmi, nie tylko zaawansowanej grupie ludzi mających wysokie kwalifikacje w obchodzeniu się z koniem. W wielu opracowaniach naukowych i badawczych podejmowany jest temat oceny uzyskanych wyników, jednak nieliczne prace uwzględniają ważny kontekst analizy przyczyn i podłoża uzyskiwania niezadawalających wyników, często eliminujących konie z hodowli.

W metodzie zadania wydzielono cechy dotyczące wad pokroju i budowy z uwzględnieniem wad dyskwalifikujących oraz wad obniżających wartość użytkową. Następnym, ważnym

zagadnieniem są cechy rozrodcze, takie jak: płodność, żrebność, 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 bieżącym roku sprawozdawczym, w celu pozyskania danych, uczestniczono w przeglądach selekcyjnych stadnin koni rasy huculskiej (około 70 koni) oraz rasy śląskiej (40 koni).

Ze względu na ograniczenia związane z pandemią większość planowanych przeglądów nie odbyła się. Uzyskany materiał dotyczy różnych grup wiekowych ocenianych koni, ale nie jest zbyt liczny. Po zebraniu większej liczby danych, w kolejnym roku będzie można wydzielić grupy wiekowe z uwzględnieniem podziału na zakres wad i przyczyn eliminujących konie różnych ras na poszczególnych etapach selekcji, co pozwoli na statystyczne opracowanie materiału.

Z dotychczasowych obserwacji wynika, że bez względu na rasę, najwięcej koni eliminowanych jest z hodowli z powodu wadliwej budowy i nieprawidłowej postawy kończyn. Daje się zauważyć niepokojący wzrost i nasilenie tych wad. Niegdyś częste anomalie dotyczące wadliwego zgrzyzu należą obecnie do rzadkości.

Zadanie 04-15-02-11

Charakterystyka laktacji oraz określenie poziomu substancji biologicznie aktywnych w mleku klaczy

Kierownik zadania: dr inż. Grażyna Polak

Mleko klaczy, mając zbliżony skład do ludzkiego, i będąc produktem antyalergicznym, może być traktowane jako dodatkowy produkt otrzymywany w gospodarstwach rolnych, podnosząc opłacalność chowu i hodowli koni zimnokrwistych. Liczne publikacje na ten temat wskazują, że klacze zimnokrwiste są zdolne do produkcji ponad 20 litrów mleka dziennie.

W badaniach zostały wykorzystane klacze sokólskie, znajdujące się w stadzie objętym programem ochrony zasobów genetycznych w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. Jednocześnie, dla porównania, analizowane były informacje dotyczące składu mleka klaczy gorącokrwistych w stadzie współpracującym z Zakładem Hodowli Koni. Pobrane od klaczy mleko zostało przeanalizowane laboratoryjnie pod względem składu podstawowego, zawartości białek serwatkowych oraz kwasów tłuszczowych. Zbierane były również dane nt. objętości uzyskanego od klaczy sokólskich mleka, ich żywienia, utrzymania, zdrowia żrebiąt i zachowania klaczy sokólskich.

Uzyskane w ciągu 4 laktacji informacje były analizowane statystycznie pod kątem jakości produktu oraz zawartości składników odżywczych.

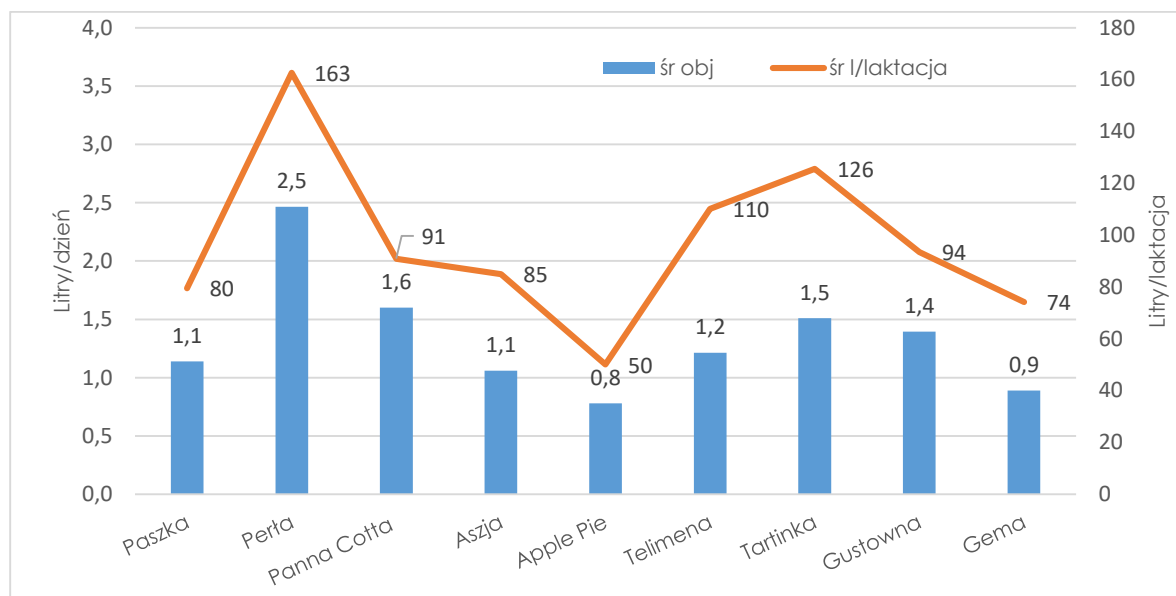
W latach 2017–2020 uzyskano mleko od 9 klaczy sokólskich, które dały łącznie 1581,2 litry mleka (Tab. 1.).

Tab. 1. Liczba klaczy, od których pozyskano mleko w latach 2017–2020 i ich średnie wydajności.

Rok	2017	2018	2019	2020
Liczba klaczy	5	2	4	5
Śr. dzienna wydajność	1,65	0,99	1,58	0,95
Łącznie (litry)	604,6	163,6	435	378

Największą objętość mleka uzyskano w 2019 roku od klaczy Perła – 170 l (średnio 3 l dziennie), a w 56. dniu laktacji aż 4,3 l. Była to jej druga laktacja, ale również w pierwszej uzyskano od tej klaczy bardzo wysoki wynik – 155,4 l.

Wykres 1. Średnia dzienna wydajność mleka uzyskanego od klaczy sokólskich oraz ich średnia wydajność za laktację.



W ciągu 4 lat badaniom poddano 155 próbek mleka, z czego 108 pochodziło od klaczy sokólskich i 47 od klaczy gorącokrwistych rasy szlachetnej półkrwi.

Badania laboratoryjne wykazały, że mleko klaczy sokólskich cechowało się wyższą średnią zawartością suchej masy i laktozy; wśród klaczy gorącokrwistych większa była średnia zawartość tłuszczu i nieznacznie zawartość popiołu oraz wartość energetyczna (Tab. 2.).

Tab. 2. Średnie i odchylenia standardowe zawartości podstawowych substancji odżywczych w mleku klaczy sokólskich (sok) oraz gorącokrwistych (sp).

	S.M. g/100 g	Białko g/100 g	Tłuszcz g/100 g	Laktoza g/100 g	Popiół g/100 g	Wartość energetyczna	
						kcal/100 g	kJ/100 g
sok	9,13	1,86	0,22	6,70	0,33	36,44	152,00
odch. st.	0,58	0,35	0,19	0,44	0,06	3,37	12,75
sp	9,05	1,86	0,39	6,50	0,30	36,96	152,44
odch. st.	0,48	0,29	0,17	0,28	0,03	2,50	8,74

Mimo występowania różnic w zawartości substancji nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych poszczególnych składników ani pomiędzy latami, ani pomiędzy rasami. Nie wystąpiły również statystycznie istotne różnice zawartości białek serwatkowych, w tym laktoferyny i lizozymu, mimo, że średnia zawartość pierwszego była niższa u klaczy sokólskich, a lizozymu u klaczy gorącokrwistych (Tab. 3.).

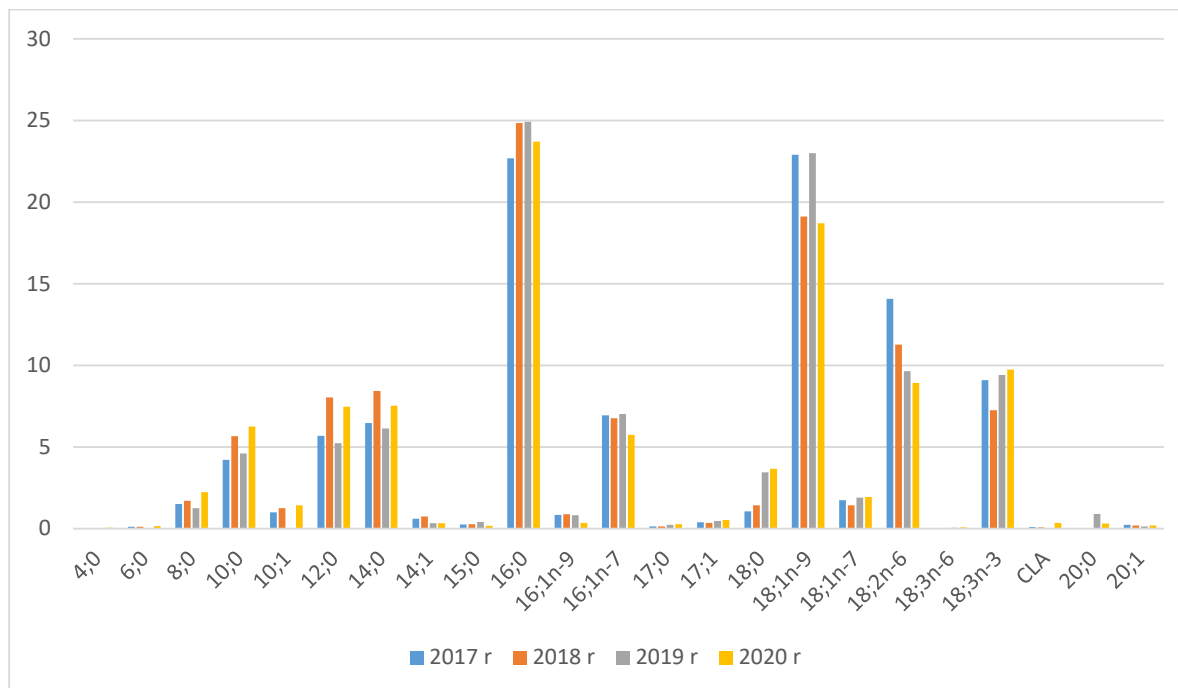
Tab. 3. Zawartość białek serwatkowych w mleku klaczy gorącokrwistych (sp) i sokólskich (sok) w latach 2017–2020.

	Białka serwatkowe ogółem	IMG	Laktoferyna	AS % białka ogółem	BLg	Lizozym	A-la
średnia sp	54,27	2,55	2,53	1,66	21,52	11,68	14,32
średnia sok	53,73	1,77	2,18	2,05	20,18	12,45	15,12

Zawartość tych substancji była najwyższa u klaczy sokólskich w 2018 roku (2,92 - laktoferyna) i w 2020 roku (13,18 - lizozym).

Analizie poddane były także 23 frakcje kwasów tłuszczowych (Wykres 2.). W ciągu czterech lat profil kwasów tłuszczowych wykazał najwyższą zawartość kwasu palmitynowego C16:0, oleinowego C18:1n-9, kwasu linolowego C18:2 n-6 z tym, że zawartość tego ostatniego co roku była coraz niższa.

Wykres 2. Poziom kwasów tłuszczowych w mleku klaczy w latach 2017–2020.



Podsumowanie:

1. Klacze sokólskie mogą być wykorzystywane do produkcji mleka ze względu na ich łagodny charakter, łatwe przystosowanie do tego procesu jak i jakość uzyskiwanego surowca.
2. Przeprowadzanie doju 1 raz dziennie nie wpłynęło na obniżenie kondycji klaczy i źrebiąt.
3. Występowały duże wahania objętości mleka zarówno pomiędzy klaczami jak i w latach.
4. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości substancji podstawowych, białek serwatkowych ani kwasów tłuszczowych pomiędzy klaczami zimnokrwistymi i gorcokrwistymi.
5. Otrzymane wyniki analizy składu mleka wykazały rozbieżności zawartości lizozymu i laktoferyny, w stosunku do wyników innych autorów.
6. Stwierdzono, że na objętość pozyskiwanego mleka silny wpływ miało środowisko, zwłaszcza wysokie temperatury otoczenia, jak i niespodziewane zjawiska podczas doju.
7. Należy prowadzić dalsze badania, które pozwolą na lepsze poznanie zagadnienia, a także promować wykorzystanie mleczne klaczy sokólskich, co może wpłynąć na popularyzację tego rodzimego typu koni zimnokrwistych.

Fot. 1. Dój kłaczy w ZD IZ PIB Kołacz sp. z o.o (G. Polak).



Fot. 2. Zakładanie kubów udojowych w ZD IZ PIB Kołacz sp. z o.o. (G. Polak).



Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
p.o. Kierownika: prof. dr hab. Beata Szymczyk

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:

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

Cel szczegółowy 1.

Celem wykonanych badań było określenie wpływu źródła i poziomu kwasów tłuszczowych w diecie dla kur nieśnych na wyniki produkcyjne, jakość treści i skorupy jaj oraz parametry biomechaniczne i geometryczne kości długich niosek. W ramach podjętych badań wykonano dwa doświadczenia żywieniowe na kurach nieśnych.

Celem doświadczenia 1. było określenie optymalnego źródła nienasyconych kwasów tłuszczowych w żywieniu kur nieśnych, biorąc pod uwagę optymalizację wskaźników produkcyjnych, wartości dietetycznej jaj, jakości skorupy jaj oraz parametrów wytrzymałościowych kości. Doświadczenie wykonano na 168 kurach, utrzymywanych w klatkach, na podłodze z siatki, przy stałym dostępie do paszy i wody. Utworzonych zostało 7 grup eksperymentalnych.

W skład każdej grupy wchodziło po 12 powtórzeń, w skład każdego powtórzenia – po 2 kury utrzymywane we wspólnej klatce. Doświadczenie zostało wykonane w układzie 1-czynnikowym, gdzie czynnikiem eksperymentalnym było źródło kwasów tłuszczowych, użyte do natłuszczenia mieszanek paszowych. Tak więc, diety doświadczałne natłuszczano 2% dodatkiem następujących olejów: olej sojowy, olej kokosowy, olej rzepakowy, olej lniany, olej z lnianki siewnej, olej rybny i olej z alg.

Uzyskane wyniki wskazują, że stosowane źródła tłuszczu nie miały wpływu na rezultaty produkcyjne kur, to jest: nieśność, średnią masę jaj, pobranie i wykorzystanie paszy, jak również parametry charakteryzujące jakość treści i skorupy jaja. Użyte źródło tłuszczu oddziaływało natomiast istotnie na profil kwasów tłuszczowych żółtka jaj. Wprowadzenie oleju z alg do diety miało korzystny wpływ na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w lipidach żółtka, zwiększając, między innymi, poziom długotańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z szeregu n-3 (LC PUFA n-3), takich jak kwas eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA). Jednak gotowane jaja, pochodzące od kur żywionych mieszanką paszową natłuszczoną olejem z alg, charakteryzowały się nieco gorszym smakiem i zapachem w porównaniu z jajami, pochodzącymi z innych grup doświadczalnych. Jednocześnie stwierdzono, że wprowadzenie niektórych olejów, charakteryzujących się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), miało korzystny wpływ na biomechaniczne parametry kości piszczelowych niosek. A zatem, kości niosek żywionych mieszanką paszową natłuszczaną olejem lnianym charakteryzowały się podwyższoną wytrzymałością mechaniczną, elastycznością i sztywnością oraz wartością modułu Younga, natomiast kości z grupy żywionej z udziałem oleju z alg – podwyższoną sztywnością i wartością modułu Younga.

Celem doświadczenia 2. było określenie optymalnego poziomu natłuszczenia, wybranymi na podstawie doświadczenia 1., źródłami kwasów tłuszczowych. Utworzono 7 grup eksperymentalnych. W skład każdej grupy wchodziło po 12 powtórzeń, które stanowiły po 2 kury utrzymywane we wspólnej klatce. Czynnikiem doświadczalnym był rodzaj i poziom w diecie tłuszczu stosowanego do natłuszczenia mieszanek paszowych (na podstawie doświadczenia 1. wybrano trzy najkorzystniejsze źródła). Schemat doświadczenia 2. był zatem następujący: grupa 1 (kontrolna) – 2% oleju rzepakowego, grupa 2 – 1% oleju lnianego (i 1% oleju rzepakowego), grupa 3 – 1,5% oleju lnianego (i 0,5% oleju rzepakowego), grupa 4 – 1% oleju rybnego (i 1% oleju rzepakowego), grupa 5 – 1,5% oleju rybnego (i 0,5% oleju rzepakowego), grupa 6 – 0,2% oleju z alg (i 1,8% oleju rzepakowego), grupa 7 – 0,3% oleju z alg (i 1,7% oleju rzepakowego).

Wykazano, że stosowane źródła i poziom tłuszczu nie miały wpływu na wskaźniki produkcyjne kur oraz parametry charakteryzujące jakość treści i skorupy jaja. Stwierdzono natomiast istotne różnice w profilu kwasów tłuszczowych żółtka jaj pomiędzy grupami doświadczalnymi. Tak więc, wprowadzenie badanych olejów do diety miało korzystny wpływ na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w lipidach żółtka, zwiększając, w porównaniu z grupą kontrolną, poziom LC PUFA n-3, takich jak EPA i DHA, jak również obniżając stosunek kwasów PUFA n-6 do PUFA n-3.

Jednocześnie, dzięki optymalizacji poziomu natłuszczenia mieszanek paszowych badanymi olejami, gotowane jaja, pochodzące od kur żywionych mieszanką paszową natłuszczoną olejem lnianym, rybnym i olejem z alg, charakteryzowały się dobrymi właściwościami sensorycznymi (smak, zapach), nieodbiegającymi od jaj z grupy kontrolnej. Jednocześnie stwierdzono, że wprowadzenie niektórych olejów, charakteryzujących się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), miało korzystny wpływ na biomechaniczne parametry kości piszczelowych. A zatem, kości niosek żywionych mieszanką paszową natłuszczaną olejem lnianym charakteryzowały się podwyższoną wytrzymałością mechaniczną, elastycznością i sztywnością oraz wartością modułu Younga, natomiast kości z grupy żywionej z udziałem oleju z alg – podwyższoną sztywnością i wartością modułu Younga.

Podsumowując uzyskane rezultaty można stwierdzić, że zastosowanie wybranych źródeł długołańcuchowych kwasów tłuszczowych – na przykład oleju z alg – w mieszankach paszowych dla kur nieśnych może nie tylko korzystnie wpływać na profil kwasów tłuszczowych w lipidach żółtek jaj, ale również na gospodarkę mineralną organizmu, poprawiając w ten sposób niektóre parametry charakteryzujące jakość kości długich. Jednocześnie dobór odpowiedniego poziomu źródeł wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (olej lniany, rybny oraz olej z alg) pozwala na ograniczenie ich negatywnego wpływu na sensoryczne cechy gotowanych jaj.

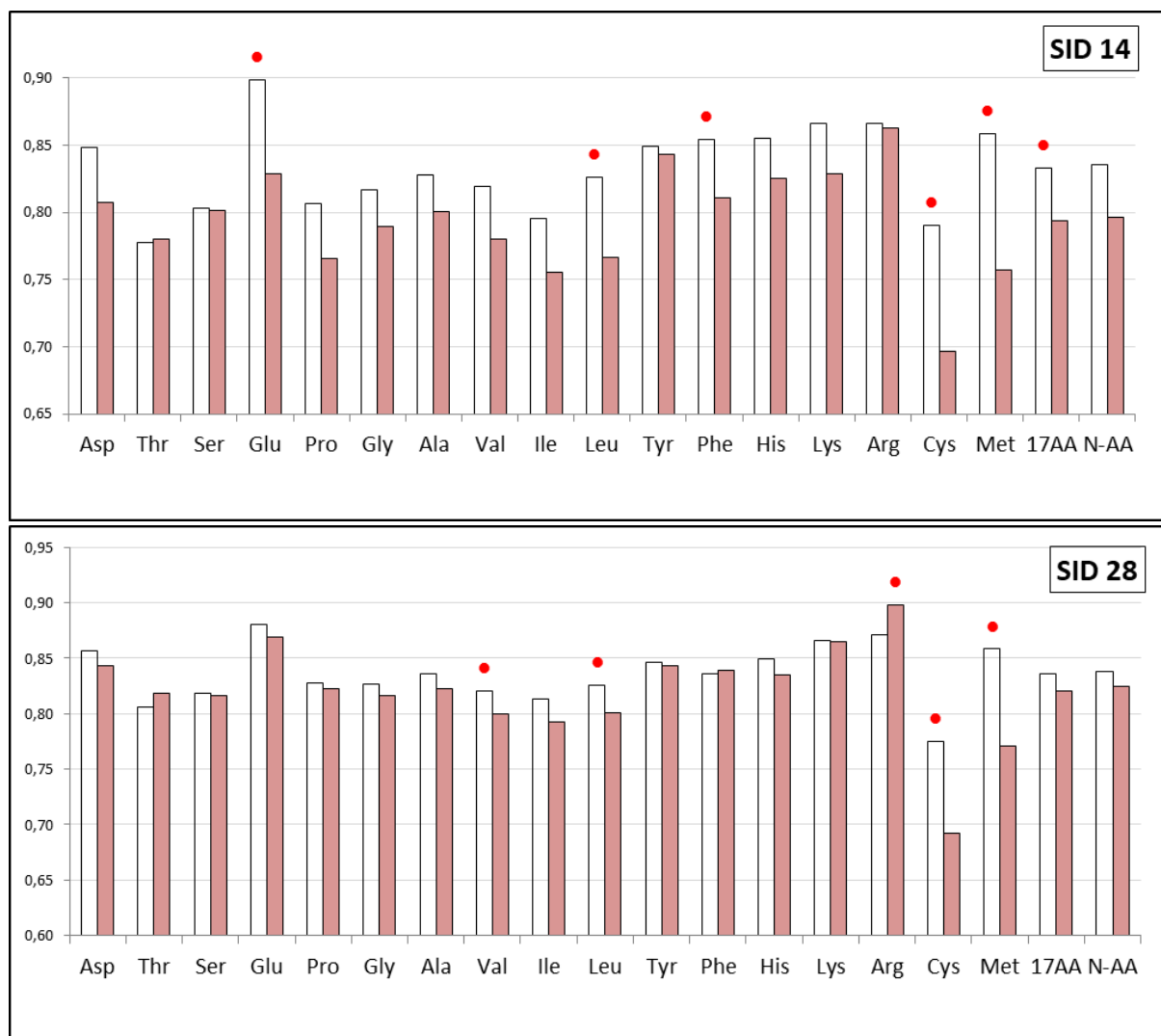
Cel szczegółowy 2.

Głównym celem projektu było określenie w testach na rosnących kurczętach brojlerach współczynników standaryzowanej strawności jelitowej (SID) aminokwasów białka nasion grochu siewnego, z uwzględnieniem ich przynależności podgatunkowej – odmiana białokwiatowa przeznaczona na nasiona ogólnoużytkowe oraz odmiana kolorowokwitnąca przeznaczona na nasiona paszowe. Dodatkowo określono zasadność stosowania w dietach z grochem mikrobiologicznych dodatków enzymatycznych, których deklarowana efektywność polega na bezpośredniej poprawie trawienia białka paszowego do aminokwasów dostępnych dla procesów anabolicznych. Dla zbadania stopnia trawienia białka nasion grochu i wchłaniania produktów tego procesu u ptaków w wieku 14. i 28. dni, w dwóch doświadczeniach na seksowanych kurczętach Ross 308, oznaczono strawność ogółem 17 aminokwasów (AA). Z wykorzystaniem wyników analiz zawartości w treści końcowego odcinka jelita cienkiego, pobranej po uboju ptaków, określono współczynniki pozornej strawności jelitowej (AID) aminokwasów dla nasion grochu odmiany Tarchalska – podgatunek hortense oraz grochu odmiany Milwa – podgatunek arvense. Współczynniki AID oznaczano techniką bezpośrednią, żywiąc ptaki do woli dietami testowymi, w których nasiona grochu stanowiły jedyne źródło białka, a substancją wskaźnikową był tlenek chromu. Diety stosowano w dwóch wersjach: bez dodatku lub z dodatkiem handlowego preparatu paszowej proteazy serynowej, wytwarzanej przez zmodyfikowany szczep *Bacillus licheniformis* (DSM 19670), w ilości wprowadzającej do kg diety 15000 jedn. PROT. Współczynniki strawności pozornej przekształcano w standaryzowane współczynniki (SID), stosując korektę na wielkość podstawowego przepływu jelitowego AA pochodzenia endogennego (pozapaszowych), określoną w równoległym eksperymencie na dodatkowej stawce 14- i 28-dniowych ptaków żywionych dietą bezbiałkową. Określone w badaniach wartości SID porównywano w obrębie danej odmiany grochu z uwzględnieniem różnego wieku ptaków i obecności proteazy w diecie (model dwuczynnikowy z interakcją oraz układ czterech kombinacji poziomów zmiennych grupujących), a także z uwzględnieniem różnic między odmianami grochu w obrębie tego samego wieku kurcząt.

Uzyskane wyniki były podstawą dla następujących wniosków: (1) w oparciu o porównanie wartości współczynników standaryzowanej strawności jelitowej można oczekiwać lepszego wykorzystania aminokwasów białka nasion grochu kolorowokwitnącej odmiany Milwa przez kurczęta w wieku 28 dni niż przez kurczęta 14-dniowe; (2) z wyjątkiem treoniny, glicyny oraz argininy, u kurcząt w wieku 14 i 28 dni standaryzowana strawność jelitowa aminokwasów nasion grochu białokwiatowej odmiany Tarchalska nie różni się znacząco; (3) groch odmiany Tarchalska jest bogatszym źródłem strawnej metioniny i cysteiny niż groch Milwa, zarówno dla 14-, jak i 28-dniowych kurcząt brojlerów; (4) niezależnie od wieku kurcząt, proteaza serynowa stanowiąca aktywny składnik zastosowanego handlowego preparatu paszowego, może istotnie poprawiać strawność niektórych aminokwasów, zwłaszcza treoniny, leucyny, lizyny, argininy i cysteiny z nasion grochu odmiany Tarchalska. Dodatek tego enzymu może także niwelować różnice w strawności jelitowej niektórych aminokwasów grochu odmiany Milwa spowodowane

różnym wiekiem ptaków; (5) przy bilansowaniu zawartości strawnych aminokwasów w mieszankach paszowych z udziałem nasion grochu testowanych odmian należy uwzględnić znacząco niższą strawność metioniny i cysteiny zawartej w nasionach grochu Milwa w porównaniu z grochem Tarchalska u brojlerów obu grup wiekowych.

Wykres 1. Porównanie współczynników standaryzowanej strawności jelitowej aminokwasów grochu odmiany Tarchalska i grochu odmiany Milwa oznaczonych u kurcząt w wieku 14 (SID 14) lub 28 (SID 28) dni (dieta testowa bez enzymu).



Legenda: 17AA - średnia SID siedemnastu AA; N-AA - średnia SID niezbędnych AA (Thr, Val, Ile, Leu, Phe, His, Lys, Arg, Met); • - różnice statystycznie istotne (test t).

Zadanie 01-16-06-11

Ocena wpływu innowacyjnych wysokobiałkowych pasz n-GMO pochodzenia krajowego na strawność składników pokarmowych, wskaźniki produkcyjne i status zdrowotny zwierząt gospodarskich

Kierownik zadania: prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz

Celem zadania jest pozyskanie wiedzy na temat bezpieczeństwa i wartości pokarmowej nasion soi n-GMO odmian uprawianych w kraju i produktów ich przetworzenia oraz produktów pochodzenia owadziego – jako wysokobiałkowych komponentów mieszanek paszowych dla

zwierząt gospodarskich. Planowane jest opracowanie i określenie wpływu innowacyjnego produktu białkowego, opartego na paszy sojowej n-GMO pochodzenia krajowego, wzbogaconego w wybrane naturalne substancje immunostymulujące, takie jak mączka owadzia, czy też silnie antyoksydacyjna astaksantyna, na rozwój fizjologiczny przewodu pokarmowego, status metaboliczny, zdrowotny i oksydacyjny oraz kształtowanie odporności czynnej zwierząt gospodarskich, jak również na emisję substancji szkodliwych.

W skład zadania wchodzi 4 cele szczegółowe:

1) ocena wartości pokarmowej oraz bezpieczeństwa stosowania niekonwencjonalnych źródeł białka paszowego na zwierzętach modelowych; 2) ocena wpływu niekonwencjonalnych źródeł białka paszowego pochodzenia krajowego na wskaźniki fermentacji w żwaczu i wskaźniki fizjologiczne we krwi krów przetokowanych; 3) opracowanie składu i ocena wpływu innowacyjnego produktu białkowego z krajowej soi n-GMO, wzbogaconego w prozdrowotne substancje biologicznie czynne, na wyniki odchowu i status zdrowotny świń oraz cieląt (4).

Zakres prac przeprowadzonych w pierwszym roku badań obejmował szczegółowe analizy chemiczne nasion soi 3 odmian popularnych i uprawianych w Polsce (Erica, Petrina, Viola) oraz 2 rodzaje materiałów paszowych wytworzonych w wyniku działania procesów barotermicznych (ekstrudat), a następnie wyłoczenia oleju (makuch). Zgodnie z założeniami, materiały te mogą być wyprodukowane w technologii możliwej do zastosowania w małych i średnich gospodarstwach lub spółdzielniach, z nasion pochodzących z własnych upraw.



Erica

Petrina

Viola

Materiały paszowe z nasion soi: ekstrudat (z lewej) i makuch

Drugim rodzajem badanej paszy są mączki owadzie z larw muchy Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). Zgodnie z założeniami wybrano rodzaj mączki, która jest dostępna na rynku, powstaje z larw określonego gatunku owadów, jest wytwarzana w niskiej temperaturze, co gwarantuje dobrą wartość pokarmową, cechuje się jednolitym standardem jakościowym. Wybierając mączkę z muchy BSF kierowano się wysoką zawartością białka i tłuszczu (w porównaniu z innymi owadami) oraz ekonomicznymi aspektami hodowli tego owada.

Mączki z larw muchy *Hermetia illucens*: petnotłusta (z lewej) i niskotłuszczowa

Wyniki uzyskane w 2020 roku – pasze sojowe:

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia kontroli na obecność modyfikacji genetycznych w nasionach soi pochodzących z upraw krajowych. W nasionach soi nie stwierdzono obecności sekwencji docelowej promotora 35S, terminatora nos, genu pat, genu bar oraz konstruktów

CTP2-CP4-EPSPS. W żadnej z odmian nie stwierdzono obecności DNA modyfikowanej soi linii DP 356043, DP 305423, CV 127, MON 87708, MON 87701, MON 87769, co potwierdza, że wybrane nasiona soi nie były genetycznie modyfikowane.

Przeprowadzono ocenę bezpieczeństwa pasz w zakresie mykotoksykologicznym. W nasionach soi odmian Erica i Viola stwierdzono obecność pleśni z rodzaju *Alternaria* i *Penicillium*, a w odmianie Petrina jedynie pleśnię z rodzaju *Eurotium*. Poddanie surowych nasion działaniu temperatury i ciśnienia obniżyło ilość żywych pleśni o 94,3%, natomiast poddanie ekstrudatu tłoczeniu oleju dodatkowo obniżyło ilość pleśni. W rezultacie, w porównaniu z surowymi nasionami, ilość pleśni w makuchu sojowym była o 97% niższa. W nasionach żadnej z odmian nie stwierdzono występowania ochratoksyny, fumonizyn, aflatoksyn, niwalenolu, diacetoksyscirpenol, toksyny T2 oraz HT2. Poziom deoksyniwalenolu w nasionach żadnej z odmian nie przekroczył 0,3 ppb, a zearalenon obecny był jedynie w śladowych ilościach w nasionach soi odmiany Erica i Petrina. Stwierdzoną ilość kolonii zarodników pleśni i drożdży, zarówno w nasionach jak i produktach paszowych, można uznać za śladową, a materiały za wolne od mykotoksyn, i w momencie analizy nie stanowiących zagrożenia pod względem skażenia mykotoksynami.

Przeprowadzono ocenę bezpieczeństwa pasz w zakresie substancji antyżywniowych. Zawartość inhibitorów trypsyny we wszystkich trzech odmianach była zbliżona (od 16,2 do 18,4 mg/g), przy czym najwyższa była w nasionach soi odmiany Petrina. Zastosowane procesy technologiczne w czasie wytwarzania ekstrudatu praktycznie całkowicie unieczynniły enzym ureazę (o 98-99%), natomiast obniżenie aktywności inhibitorów trypsyny było skuteczniejsze po przetworzeniu nasion soi na makuch (spadek o 52-59%), w porównaniu z przetworzeniem na ekstrudat (spadek o 30-45%). Różnice między odmianami były niewielkie.

Oceniano skład chemiczny i wartość pokarmową pasz. Nasiona trzech odmian soi zawierały zbliżoną ilość białka ogólnego, a w porównaniu z tabelarycznymi wartościami średnimi dla tej rośliny była ona o 7,5-9,6% wyższa. Także zawartość aminokwasów niezbędnych była wyższa lub porównywalna z wartościami tabelarycznymi. Zawartość tłuszczu surowego w badanych nasionach soi była o 4,4-19,3% niższa od wartości średniej i wyraźnie zróżnicowana między badanymi odmianami. Profil kwasów tłuszczowych w tłuszczu nasion soi był prawie identyczny w zakresie sumy kwasów nasyconych i nienasyconych, ale w każdej odmianie były nieco inne proporcje kwasów MUFA, PUFA-n6 i PUFA-n3. W nasionach zawartość skrobi była niższa, a cukrów wyższa, w porównaniu z wartościami średnimi. Badane nasiona wyraźnie różniły się między odmianami zawartością witaminy E, której najwięcej stwierdzono w soi Viola. W porównaniu do surowych nasion, przetworzone materiały paszowe cechowały się wyższą zawartością białka ogólnego (o 3,4% ekstrudat i o 19% makuch) i popiołu (o 7,7% ekstrudat i o 28% makuch) oraz substancji bezazotowych wyciągowych, podczas gdy zawartość włókna surowego była niższa (o 44% ekstrudat i o 33% makuch). Na skutek wytlóczenia oleju, zawartość tłuszczu surowego w makuchu była niższa niż w surowych nasionach i ekstrudowanych. Zarówno działanie temperatury w czasie produkcji ekstrudatu, jak i późniejsze wytlóczenie oleju w czasie przygotowywania makuchu, ograniczyło dostępność lizyny o około 8-9%, średnio dla wszystkich trzech badanych odmian soi. Jednakże, niezależnie od przyjętej technologii obróbki nasion, 91-92% lizyny całkowitej pozostało dostępne do wykorzystania przez zwierzęta. Wartość biologiczna białka (EAAI), w odniesieniu do wzorcowego białka jaja kurzego, była wyższa w przetworzonych materiałach paszowych niż w surowych nasionach (78% vs. 76%). Wśród aminokwasów niezbędnych, ograniczającymi są aminokwasy siarkowe Met+Cys, dla których indeks CS wynosi 42% w nasionach i 40-45% w materiałach paszowych, podczas gdy najwyższy był indeks lizyny (około 106%).

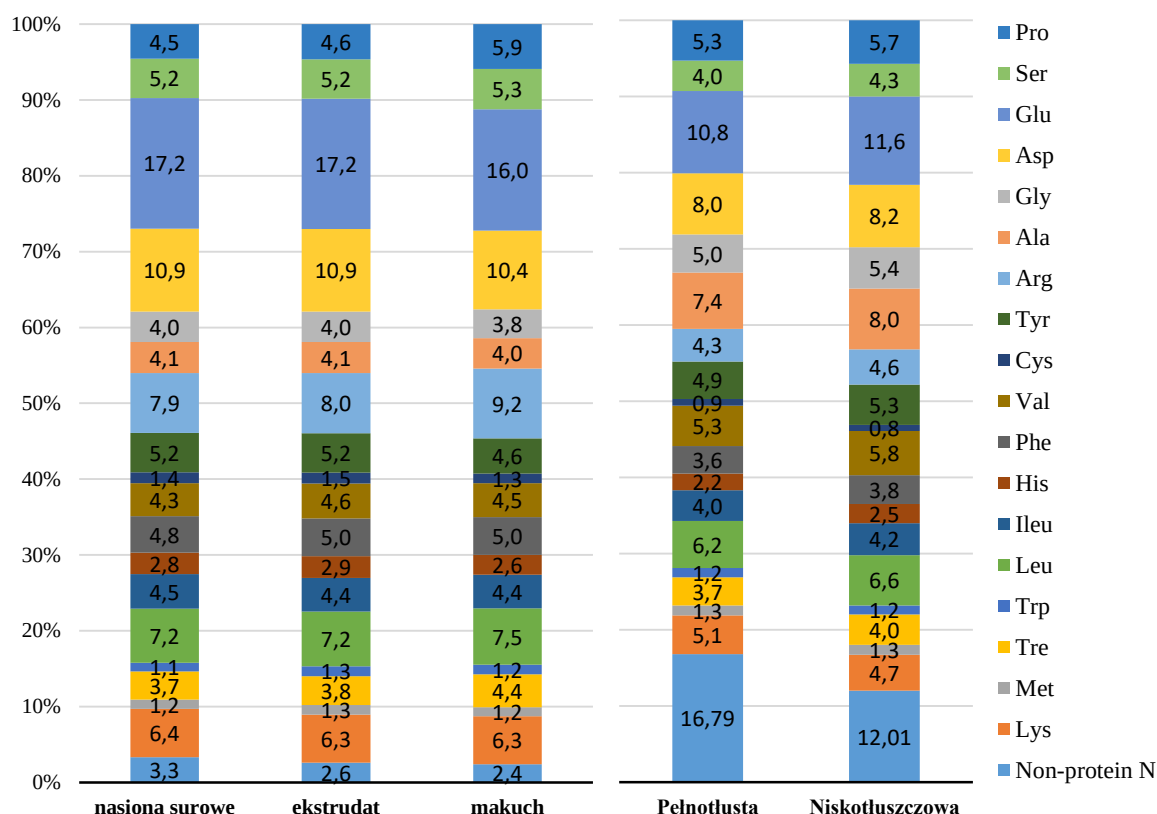
Poddanie nasion soi procesom barotermicznym oraz tłoczeniu wpłynęło na profil kwasów tłuszczowych. W porównaniu z surowymi nasionami, obserwowano wyższy poziom kwasów nasyconych (o 13-14%) i niższy nienasyconych (o około 2%), przy czym poziom kwasów MUFA

w niewielkim stopniu się zwiększył, a poziom PUFA był niższy o 4.8-6.4%. Wśród kwasów PUFA spadek dotyczył kwasów n6 (o 7,7-9%), podczas gdy w kwasach n3 obserwowano wzrost o około 7%. Jest to tendencja dobra pod względem wartości dietetycznej, co potwierdza niższy o 13-14% stosunek PUFA n6/n3 w ekstrudacie i makuchu, w porównaniu z surowymi nasionami. W porównaniu z surowymi nasionami, w ekstrudacie i makuchu wskaźnik S/P był wyższy o 16%, a liczba jodowa niższa o około 3%. Wyższy stopień nasycenia tłuszczu wskazuje na większą jego odporność na utlenianie, co przekłada się na lepszą trwałość podczas przechowywania, a tym samym wyższą jakość tłuszczu ekstrudatu i makuchu, niż surowych nasion.

Wyniki uzyskane w 2020 roku – pasze owadzie:

Przeprowadzono ocenę bezpieczeństwa mączek owadzych w zakresie mykotoksykologicznym. W zależności od technologii produkcji (pełnotłusta lub niskotłuszczowa) mączki owadzie różniły się składem pleśni: w mączce pełnotłustej przeważał rodzaj *Mucor*, a w niskotłuszczowej rodzaj *Geotrichum*. Jednakże ilość grzybów pleśniowych i drożdży w obu mączkach można uznać za śladową. W żadnej z mączek nie stwierdzono obecności ochratoksyny, aflatoksyn, toksyny DAS oraz T2. Ilość pozostałych badanych mykotoksyn jak fumonizyny i DON nie przekraczała kilkunastu ppb, a ilość toksyn NIV, HT2 i ZEN nie przekraczała kilku ppb. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że mączki z larw muchy *Hermetia illucens* są bezpieczne pod względem mykotoksykologicznym i mogą być stosowane jako składnik mieszanek paszowych.

Oceniano skład chemiczny i wartość pokarmową. Pełnotłusta mączka z larw muchy BSF zawierała o ponad 70% więcej tłuszczu, a zawartość białka ogólnego i włókna surowego była w tej mączce niższa, odpowiednio o 21 i 11%. Ilość aminokwasów w kg paszy była niższa, ale jakość białka obu mączek można uznać za zbliżoną, gdyż zawartość niezbędnych aminokwasów w 100 g białka była podobna (suma aminokwasów w mączce pełnotłustej wynosiła 83 g, a w niskotłuszczowej 88 g/100 g BO). Wartość biologiczna białka mączek w odniesieniu do wzorcowego białka jaja kurzego (EAAI) wynosiła 71-73%. Dostępność lizyny w mączce pełnotłustej była wyższa (79%) niż w niskotłuszczowej (71%). Wśród aminokwasów niezbędnych aminokwasami ograniczającymi są siarkowe Met+Cys, dla których indeks CS wynosi 36% w mączce pełnotłustej i 34% w niskotłuszczowej. Mączka pełnotłusta cechowała się wyższą o 39% zawartością witaminy E, a wśród składników mineralnych w obydwu mączkach dominował potas (17-19 g/kg), wapń (12-13 g/kg) i fosfor (10-12 g/kg). W tłuszczu mączki z larw muchy BSF ilościowo zdecydowanie dominuje kwas laurynowy C12:0 (ponad 36%). Po wyłoczeniu części tłuszczu, mączka niskotłuszczowa zawierała nieco więcej kwasów PUFA n6, na skutek większej ilości kwasu linolowego C18:2 (11,8 vs. 9,6%). Mączka niskotłuszczowa cechowała się korzystnymi wskaźnikami zdrowotnej jakości tłuszczu (AI, TI), ale wyższa o prawie 7% liczba jodowa wskazywała na większą podatność tłuszczu tej mączki na utlenianie w czasie przechowywania.

Wykres 1. Zawartość aminokwasów (g) w 100 g białka pasz sojowych i mączek z larw muchy *Hermetia illucens*.

Podsumowanie wyników oceny jakości i bezpieczeństwa pasz białkowych:

Po podsumowaniu otrzymanych wyników analiz chemicznych nasion soi, do przygotowania materiałów paszowych dla zwierząt gospodarskich wybrano nasiona odmiany Viola. Nasiona odmiany Petrina, co prawda zawierały najwięcej białka i lizyny, ale ogólna liczba kolonii grzybów pleśniowych i drożdży była w tych nasionach najwyższa i nasiona te cechowały się najwyższym poziomem substancji antyżywniowych. W nasionach odmian Erica i Viola zawartość wielu składników pokarmowych była zbliżona, ale Viola charakteryzowała się najlepszą czystością mykotoksykologiczną oraz zawierała zdecydowanie najwięcej witaminy E, co przy wyższym udziale kwasów MUFA w puli kwasów nienasyconych, pozwala przypuszczać, że nasiona tej odmiany lepiej nadają się do przechowywania, a ich tłuszcz ma mniejszą podatność na utlenianie.

Podsumowując wyniki analiz dwóch produktów paszowych z nasion soi (ekstrudat i makuch) do badań na zwierzętach gospodarskich wybrano makuch. Produkt ten, w porównaniu z ekstrudatem, cechował się większą zawartością białka i lizyny, a mniejszą zawartością tłuszczu, co kwalifikuje go jako paszę białkową. Ponadto, w makuchu stwierdzono niższy poziom substancji antyżywniowych i mniej kolonii grzybów pleśniowych w porównaniu z ekstrudatem.

Z kolei, analizując otrzymane wyniki analiz chemicznych mączek z larw muchy BSF do badań na zwierzętach gospodarskich, wybrano mączkę pełnotłustą. Wyższa zawartość tłuszczu przetoży się na większą ilość kwasu laurynowego w dawce, który jest ważnym czynnikiem prozdrowotnym. Tłuszcz tej mączki jest mniej podatny na utlenianie, a ponadto mączka ta cechuje się wyższą dostępnością lizyny oraz wyższym poziomem witaminy E.

Zadanie 01-16-07-21

Ewaluacja fenotypowych badań organoidów jelita cienkiego świni dla potrzeb badań żywieniowych na przykładzie badań nad maślanianem sodu, taninianu żelatyny oraz deoksyniwalenolu

Kierownik zadania: dr inż. Paulina Szczurek-Janicka

Celem prezentowanego zadania jest opracowanie innowacyjnego modelu trójwymiarowej hodowli organotypowej jelita cienkiego świni oraz ocena możliwości jej wykorzystania w badaniach żywieniowych.

Organoidy, czyli miniaturowe, uproszczone organy stanowiące komórki hodowane w specjalnych trójwymiarowych środowiskach, pozwalają zachować funkcje fizjologiczne organów w modelach *in vitro*. Jak dotąd, model organoidu jelita cienkiego świni nie został stworzony, co znacznie ogranicza możliwości badań żywieniowych u zwierząt hodowlanych. Tego rodzaju trójwymiarowy model *in vitro* pozwoli na zbadanie molekularnych mechanizmów działania poszczególnych metabolitów i związków aktywnych na wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych jelita, a co za tym idzie wzrost zwierząt. Wydaje się to być niezwykle istotne z uwagi na obowiązującą od kilku lat ustawę o ochronie zwierząt, wykorzystywanych w doświadczeniach naukowych, mającą na celu zastąpienie, ograniczenie oraz udoskonalenie badań, w których są one wykorzystywane.

Cele szczegółowe zadania obejmowały pozyskanie materiału badawczego, uzyskanie hodowli organoidów jelitowych świni oraz jej optymalizację, a także określenie charakterystyki fenotypowej i czynnościowej uzyskanych organoidów.

Metodyka:

Metodyka projektu zakładała pozyskanie materiału badawczego (fragmentów jelita cienkiego) oraz uzyskanie hodowli organoidów jelitowych świni z komórek macierzystych krypt jelitowych. Opisane w literaturze metody izolacji krypt jelitowych można podzielić na dwa typy: 1) mechaniczną dezintegrację tkanki poprzedzoną długookresową (między 30 a 60 minut) chelatacją dwuwartościowych jonów w buforze PBS^{Ca Mg free} z dodatkiem 2mM EDTA; 2) enzymatyczną dezintegrację tkanki przy pomocy enzymów proteolitycznych.

W trakcie realizacji zadania podjęto szereg prób izolacji krypt jelitowych. Finalnie pozyskano i zabezpieczono materiał od 8 osobników, co stanowi wystarczającą ilość dla zabezpieczenia powodzenia realizacji dalszych etapów. Komórki macierzyste krypt jelitowych zostały pozyskane jako materiał odpadowy poubojowy z fragmentu jelita zlokalizowanego ok. 50 cm od żołądka.

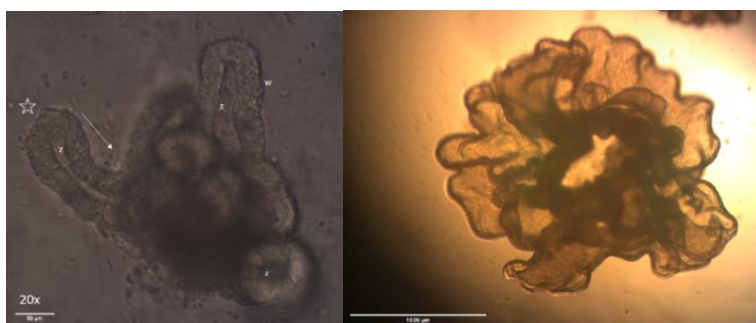
Następny krok uwzględnił optymalizację hodowli komórkowej. Medium hodowlane jest kluczowym elementem, które odpowiada za stabilny wzrost organoidów oraz utrzymywanie różnorodności komórkowej w ich populacji komórkowej. W celu wyłonienia odpowiedniego składu pożywki zdecydowano się na wykorzystanie komercyjnie dostępnych formułacji pożywek przeznaczonych do hodowli i różnicowania organoidów jelitowych: Intesticult organoid growth medium (przeznaczone dla myszy), Intesticult organoid growth medium (przeznaczone dla człowieka) oraz Intesticult organoid differentiation medium (przeznaczone dla człowieka), wszystkie firmy Stemcell. Dodatkowo, dla wspomagania procesu wzrostu oraz różnicowania komórek w postaci dwuwymiarowej warstwy nabłonka, użyto a) DAPT – inhibitora gama-sekretazy, pośredniego inhibitora szlaków białka Notch oraz E-Cadheryn i ErbB4; b) Y27632, inhibitora szlaku Rho-ROCK poprzez interakcję z białkami ROCK1 oraz ROCK2.

Następnym etapem było określenie charakterystyki fenotypowej i czynnościowej uzyskanych organoidów. Charakterystyka zawartości składu komórek organoidów ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego odwzorowania procesów zachodzących w tkance. Możemy tutaj wymienić zmiany przepuszczalności nabłonka pod wpływem działania czynników zewnętrznych, gdzie oprócz lateralnego wiązania komórka-komórka (ang. *tight junctions*), istotna jest także zdolność do wytwarzania ochraniającej warstwy śluzowej. Funkcję tę spełniają w tkance komórki Gobleta. Zawartość komórek gobletowych określono wykorzystując barwienie błękitem alcjańskim przy kontr-barwieniu 5% roztworem Giemsy. Organoidy hodowano na powlekanym szkiełku mikroskopowym przez okres 2 tygodni, pozwalając organoidom rozpaść się i utworzyć dwuwymiarowy monolayer. Barwienie przeprowadzono wg schematu: 1. przemywanie preparatu w buforze PBS; 2. utrwalanie w 4% paraformaldehynie oraz w 100% metanolu; 3. przemywanie preparatu wodą i przemywanie w 3% roztworze kwasu octowego; 4. barwienie Alcian Blue sol. (Sigma); 5. przemywanie wodą do uzyskania klarownego preparatu; 6. kontr-barwienie oraz wizualizacja.

Wyniki:

W wyniku prac prowadzonych w ramach celu szczegółowego I, uzyskano hodowlę organoidów jelita cienkiego świni na etapie 4 pasażu, co wynosi około 5 tygodni, po których nie zauważono zmian we wzroście i fenotypie komórek.

Fot. 1. Zestawienie morfologii organoidów w hodowli krótkookresowej (5 dni – zdjęcie lewe) wraz z hodowlą długookresową (14 dni – zdjęcie prawe). Strzałka-kierunek wzrostu pseudo-kosmka jelitowego, gwiazda-potencjalna nisza komórek macierzystych, z – światło pseudo-kosmka strona apikalna komórek, w – strona bazolateralna komórek.



Prowadzone eksperymenty wykazały, że zastosowanie metody enzymatycznej celem izolacji krypt jelitowych świni daje największą powtarzalność na przestrzeni cyklu 4 izolacji (8 osobników).

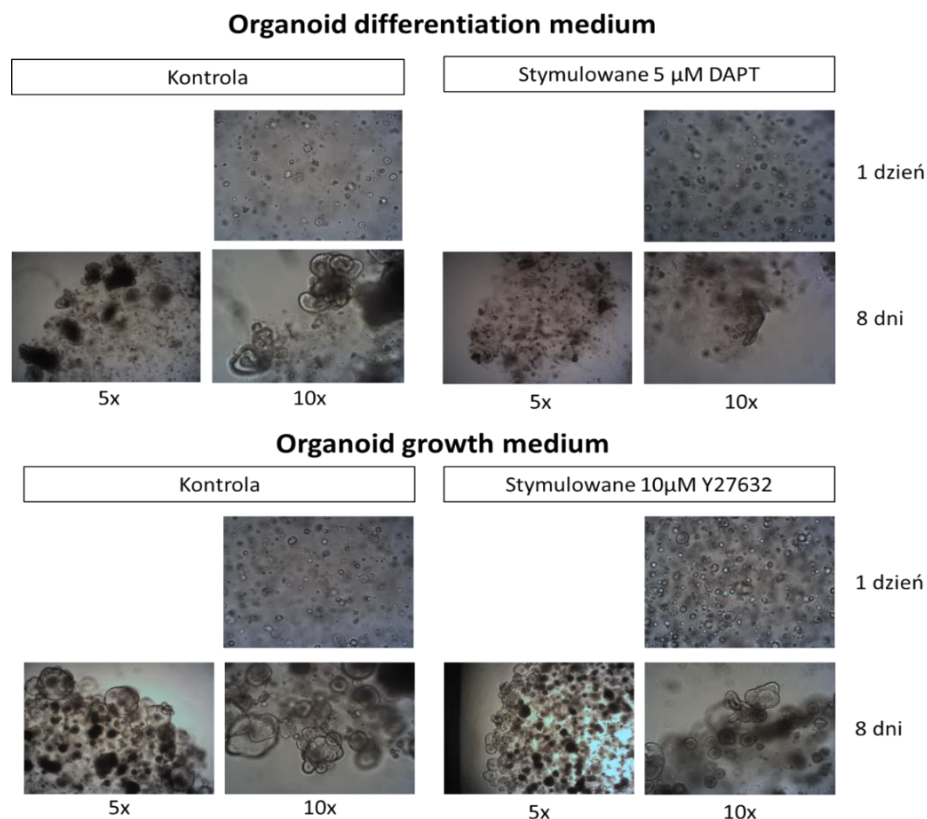
Na potrzeby zadania opracowano poniższy protokół izolacji organoidów: 1. Izolacja fragmentu tkanki; 2. Wstępne mechaniczne oczyszczanie światła jelita; 3. Płukanie zimnym PBS pH 7,2; 4. Pokrojenie tkanki na drobne kawałki; 5. Płukanie zimnym PBS pH 7,2; 6. Ekstrakcja: a. Materiał badawczy przenieść do 15 ml probówki i dodać Akutazę (Thermofisher) lub Trypsynę (Thermofisher); b. Inkubacja 30 minut w temperaturze 37°C z wytrząsaniem; c. Wirowanie – 300 g, 5 minut; d. Materiał badawczy zawiesić w 1% pełnowartościowym medium DMEM z antybiotykami (medium); e. Materiał badawczy przesączyć przez 70 um cell strainer (Gibco) przemywając medium; 7. Powtórzyć proces ekstrakcji 1-2 razy; 8. Wirowanie: 300 g, 5 minut; 9. Bankowanie. Z kolei opracowany i postulowany protokół pasażowania organoidów: 1. Płukanie zimnym PBS pH 7,2; 2. Inkubacja w Akutazie (Thermofisher) 10-20 minut, wytrząsając; 3. Homogenizacja mieszaniny poprzez pipetowanie; 4. Wirowanie w temperaturze 4°C, 5 minut, 300 g; 5. Zawieszenie osadu w medium hodowlanym; 6. Homogenizacja mieszaniny poprzez pipetowanie.

W wyniku przeprowadzenia szeregu próbnych hodowli wyłoniono również skład i rodzaj medium hodowlanego najlepiej spełniającego wymagania dla hodowli organoidów jelita cienkiego świni. Dla wzrostu organoidów optymalne okazało się wykorzystanie OGM^{hu} wraz z inhibitorem Y27632 na początkowych etapach hodowli, dla różnicowania organoidów w formy morfologicznie przypominające nabłonek jelitowy, a także dla uzyskania dwuwymiarowego komórkowego monolayera rekomendowane jest użycie medium ODM^{hu} z inhibitorem DAPT.

Fot. 2. Zestawienie trzydniowych hodowli organoidów z wykorzystaniem trzech różnych składów pożywki hodowlanej- Intesticult organoid growth medium (OGM, przeznaczone dla myszy), Intesticult organoid growth medium (OGM, przeznaczone dla człowieka) oraz Intesticult organoid differentiation medium (ODM, przeznaczone dla człowieka). Wszystkie zdjęcia wykonane w powiększeniu 5x.



Fot. 3. Zestawienie wpływu warunków hodowlanych, reprezentowanych poprzez użyte medium oraz stymulację dedykowanymi inhibitorami, na morfologię organoidów w czasie ponadtygodniowej hodowli.

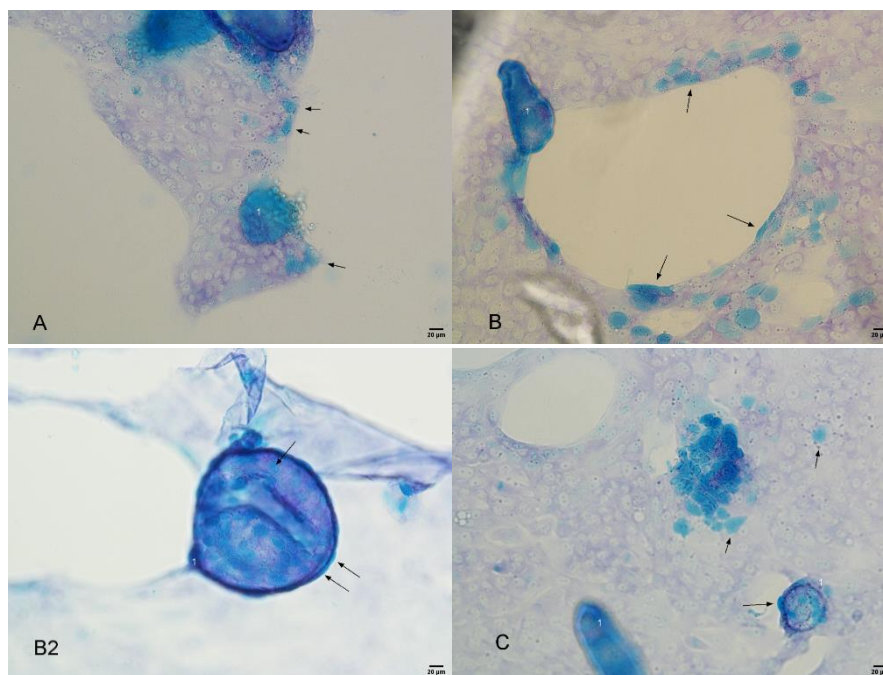


Część uzyskanego materiału badawczego (organoidów jelitowych) została poddana kriokonserwacji. Druga część była stale pasażowana w celu kontynuacji hodowli organoidowych. W trakcie preparowania organoidów z krypt jelitowych pozyskany materiał biologiczny

został częściowo zachowany w postaci tkanki krypt jelitowych, która posłuży jako materiał referencyjny do analiz transkryptomicznych w następnych etapach realizacji zadania.

Poniżej zaprezentowano również wyniki analizy składu komórkowego organoidów na zawartość komórek gobletowych.

Fot. 4. Eksperyment barwienia komórek gobletowych po 5 dniach hodowli w warunkach dwuwymiarowych. Wykorzystano różne ilości komórek dla inicjacji hodowli: 100.000/dotek (A), 200000/dotek (B, B2), 500000/dotek. (C). Strzałki wskazują na wybarwioną komórkę gobletową.



Podsumowanie:

W ramach przeprowadzonych czynności uzyskano hodowlę organoidów jelita cienkiego świni oraz zoptymalizowano warunki dla jej prowadzenia. Opracowana została metodyka izolacji krypt jelitowych świni celem uzyskania hodowli organoidów oraz protokół pasażowania organoidów. Określono także rodzaj i skład medium hodowlanego najlepiej spełniającego wymagania dla hodowli organoidów jelita cienkiego świni. Hodowla organoidów będzie kontynuowana celem realizacji dalszych etapów badawczych.

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

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 od gospodarstwa od 6 do 24%.

Celem planowanych badań była ocena wpływu dwóch preparatów wieloskładnikowych NANOCALF-Si oraz Selentin na status zdrowotny oraz parametry produkcyjne

odchowiwanych cieląt. W doświadczeniu wykorzystano dwa preparaty o działaniu przeciwbakteryjnym i immunostymulującym. Pierwszy z nich – NANOCALF-Si w swoim składzie zawierał: enzymy pochodzenia mikrobiologicznego o profilu trzustkowym (Amano), maślan sodu, nanocząstki krzemu (Aerosil 200, Evonik, Niemcy), chronione cząsteczki kwasów fumarowego, jabłkowego, cytrynowego, sorbowego. 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.

Doświadczeniem żywieniowym objęto 18 cieląt, mieszańców ras cb x Hf (50-75% genów Hf). Zwierzęta w miarę urodzeń przydzielono do 3 grup (kontrolnej oraz do 2 doświadczalnych). W momencie rozpoczęcia doświadczenia zwierzęta zostały zważone, a kolejne ważenia mas ciała odbywały się w odstępach 7-dniowych. Żywienie cieląt było oparte na preparacie mlekozastępczym podawanym 2 razy dziennie do 70. dnia, a od 10. dnia życia wprowadzona dodatkowo była mieszanka treściwa C oraz siano łąkowe. Pierwsza grupa doświadczalna od 10. do 70. dnia życia otrzymywała preparat NAOALF-Si (nanocząstki krzemu – 3000 mg, proteazę – 18 mg, lipazę – 45 mg, kwasy organiczne – 2 g, maślan sodu – 10 g), natomiast druga – Selentin (7 g) liofilizat grzyba *Lentinula edodes* wzbogaconego w selen związany z trójglicerydami. Cielęta były żywione indywidualnie, z codziennym odważaniem pasz i kontrolowaniem ilości niewyjadów. Na podstawie zgromadzonych danych wyliczono przyrosty masy ciała, zużycie paszy oraz preparatu mlekozastępczego na g przyrostu masy ciała (FCR). Na początku doświadczenia (10. dzień życia), w 35. i 70. dniu, pobrano krew w celu określenia wskaźników morfologicznych (hematokryt, stężenie hemoglobiny, MCV, MCH, MCHC, liczby czerwonych i białych krwinek), analiz biochemicznych (ALT, AST) oraz badania stężenia selenu w surowicy.

W 70. dniu życia poddano eutanazji 3 osobniki z każdej grupy w celu pobrania fragmentu dwunastnicy oraz żwacza brzuszego, a także zmierzenia długości jelit. Przeprowadzono badanie cytotoksyczne preparatów Aerosil 200 i Aerosil 300 na hodowlach komórkowych CaCo-2.

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. W późniejszym okresie życia, aż do 70. dnia, różnic statystycznych nie odnotowano, natomiast w 120. dniu pojawiła się tendencja do wyższych mas ciała u cieląt z obydwu grup doświadczalnych. W poszczególnych okresach odchowu nie zaobserwowano również różnic w pobraniu i wykorzystaniu paszy oraz preparatu mlekozastępczego czy średnich dziennych przyrostach masy ciała między 1.-35., 35.-42. i 42.-70. dniem. Parametry morfologiczne oraz biochemiczne krwi nie różniły się statystycznie istotnie przez cały okres eksperymentu pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną. Mimo, iż w grupie otrzymującej Selentin, w dniu kiedy zwierzęta zaczęły otrzymywać preparat, stwierdzono niższe wartości hematokrytu ($p < 0,40$) oraz MCHC ($p < 0,01$) – w późniejszym okresie doszło do ich wyrównania i nie obserwowano odmiennych wartości w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Barwienie dwunastnicy oraz żwacza brzuszego hematoksyliną i eozyną także nie wykazało istotnego wpływu zastosowanych preparatów na morfologię wybranych odcinków przewodu pokarmowego. Stężenie selenu w surowicy było wyższe u zwierząt otrzymujących *L. edodes* na początku doświadczenia, nie różniło się pomiędzy grupami i wynosiło 34,17 $\mu\text{g/l}$ – w grupie kontrolnej i 33,5 $\mu\text{g/l}$ – w grupie doświadczalnej – Selentin, natomiast w dniach 35. i 70. zaobserwowano różnice istotne statystycznie. Poziom selenu we krwi wynosił 44,33 $\mu\text{g/l}$ i 51,33 $\mu\text{g/l}$ – w grupie kontrolnej oraz 132 $\mu\text{g/l}$ i 93 $\mu\text{g/l}$ – w grupie otrzymującej preparat ($p < 0,001$). Długość jelit nie różniła się pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną. Średnia

długość wynosiła w grupie kontrolnej 28 m, w grupie NANOCALF-Si 27,5 m, natomiast w grupie Selentin 26 m ($p < 0,82$).

Przeprowadzone eksperymenty *in vitro* wykazały brak efektu cytotoksycznego dla szerokiego spektrum dawek Aerosil 200 oraz Aerosil 300 w warunkach statycznej ekspozycji w hodowli inkubatorowej, nawet na przestrzeni długiego okresu traktowania komórek linii CACo-2. Odmienna sytuacja następuje w sytuacji, cyklicznego wytrząsania poprzedzianego okresami statycznej inkubacji. W tej sytuacji mniejsze dawki Aerosil 200 oraz Aerosil 300 – 1,2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ i mniejsze – przejawiają największy cytotoksyczny wpływ na komórki rosnące w monolayerze. Wynikać to może z faktu, iż zaobserwowano tendencję badanych preparatów do powiększania średnicy ziaren przy większych koncentracjach.

Efekt cytotoksyczny może być indukowany, oprócz mechanicznego uszkodzenia błony także poprzez fagocytozę bądź pinocytozę substancji o frakcji rozmiaru komórki (kilka do kilkunastu nanometrów średnicy), co niesie ze sobą uszkodzenia błony organelli wewnętrznych, podwyższenie poziomu stresu oksydacyjnego, a to ostatecznie skutkuje widocznym efektem cytotoksycznym.

Zastosowane dodatki nie wpłynęły na parametry produkcyjne: masy ciała, średnie dzienne przyrosty, spożycie paszy i preparatu mlekozastępczego, ich wykorzystanie u cieląt doświadczalnych oraz aktywność enzymów wątrobowych. Preparat Selentin wpłynął pozytywnie na zawartość selenu w surowicy krwi. Zaobserwowano tendencję do wyższych mas ciała w 120. dniu życia, co może świadczyć o tym, iż preparaty NANOCALF-Si oraz Selentin pozytywnie oddziaływały na zwierzęta, jednak efekt zauważalny był w późniejszym okresie. Jako, że nie odnotowano różnic w obrębie przewodu pokarmowego, można przypuszczać, iż pozytywne oddziaływanie dodatków mogło wynikać z korzystnego modulowania bakterii jelitowych jak i obniżania cytokin prozapalnych oraz wspierania układu immunologicznego.

Tab. 1. Wyniki odchowu cieląt ($n=18$).

Wyszczególnienie	Kontrola	SD	NANO-CALF-Si	SD	SEM	P	Selentin	SD	SEM	P
Masa ciała (kg)	45,2	4,4	45,7	7,4	1,7	0,87	46,0	6,8	1,6	0,81
– urodzeniowa	45,1	4,4	44,6	5,1	1,3	0,86	44,8	4,7	1,2	0,90
– 7. dzień	45,1	4,4	45,3	5,2	1,3	0,94	45,5	4,7	1,2	0,89
– 14. dzień	46,8	3,0	46,7	5,5	1,2	0,98	46,7	5,0	1,1	0,99
– 21. dzień	47,3	4,0	48,8	6,7	1,5	0,66	49,0	6,2	1,4	0,57
– 28. dzień	50,4	5,3	50,0	7,2	1,7	0,91	50,5	6,7	1,6	0,98
– 35. dzień	55,2	5,4	55,2	6,4	1,6	0,99	55,0	5,8	1,5	0,96
– 42. dzień	59,4	7,0	59,4	6,1	1,8	0,98	58,9	5,7	1,7	0,89
– 49. dzień	65,8	9,2	64,9	6,9	2,3	0,85	64,4	6,5	2,1	0,76
– 56. dzień	71,7	10,7	71,8	7,6	2,6	0,99	71,4	7,0	2,4	0,95
– 63. dzień	76,1	12,8	77,5	9,2	3,1	0,82	76,6	8,8	2,9	0,92
– 70. dzień	114,1	15,3	127,2	14,8	6,2	0,34	120,4	11,6	5,15	0,60
Średnie dzienne przyrosty mas ciała (g/d/szt.)										
1.-35.	148,51	72,91	120,95	163,53	35,09	0,71	127,78	150,37	32,39	0,76
35.-42.	690,48	251,47	740,48	388,97	90,46	0,79	655,10	420,83	94,15	0,86
42.-70.	744,64	293,09	799,40	192,82	68,78	0,71	770,92	191,48	64,63	0,85
Średnie dzienne spożycie paszy (g/d/szt.)										
35.-42.	458,05	295,86	471,05	267,40	77,64	0,93	391,79	213,47	65,31	0,95
42.-70.	1042,65	548,82	1027,83	353,15	127,04	0,96	898,18	357,43	127,16	0,64

Średnie dzienne spożycie preparatu mlekozastępczego (g/d/szt)										
5.-35.	483	18,6	507	16,1	4,96	0,13	499	18,6	4,96	0,36
35.-42.	719	44,8	736	31,0	8,68	0,31	634	22,3	59,52	0,63
42.-70.	538	68,2	520	57,0	17,36	0,99	690	23,5	49,6	0,64
Wykorzystanie paszy (g/g)										
35.-42.	0,76	0,59	0,73	0,46	0,15	0,93	0,85	0,90	0,21	0,83
42.-70.	1,52	0,99	1,28	0,32	0,21	0,58	1,14	0,42	0,22	0,41
Wykorzystanie preparatu mlekozastępczego (g/g)										
5.-35.	3,99	1,74	-6,40	19,1	4,05	0,21	-6,3	18,9	4,01	0,21
35.-42.	1,19	0,51	1,32	0,83	0,19	0,76	1,19	0,66	40,16	0,84
42.-70.	0,85	0,51	0,71	0,16	0,106	0,49	0,91	0,21	0,11	0,83

Zadanie 04-16-04-11

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

Kierownik zadania: dr inż. Sylwia Orczewska-Dudek

Celem zadania było określenie możliwości całkowitego zastąpienia śruty sojowej w mieszance grower dla kurcząt brojlerów nasionami łubinu w połączeniu z mączkami z larw owadów jako źródło białka oraz wpływ badanych komponentów białkowych na wyniki produkcyjne, parametry rzeźne i jakość mięsa.

W okresie sprawozdawczym wykonano dwa doświadczenia żywieniowe na kurczętach brojlerach Ross 308.

Doświadczenie 1. przeprowadzono na 160 jednodniowych kogutkach pozyskanych z komercyjnego zakładu wylęgowego. Ptaki odchowywano w przedziałach grupowych na ściółce, w zakresach termicznych i wilgotnościowych odpowiednich dla ich wieku. W całym okresie doświadczenia kurczęta miały stały dostęp do paszy i wody. W wieku trzech tygodni kogutki przydzielono losowo do 5 grup żywieniowych, po 32 ptaki w grupie złożonej z 4 powtórzeń – po 8 sztuk. Ptaki grupy kontrolnej (I) żywiono mieszanką typu grower na bazie śruty kukurydzianej i sojowej. W grupie II – 60% soi zastąpiono nasionami łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) odmiany Baryt, charakteryzującej się najniższą zawartością alkaloidów. W grupach III do V – soję całkowicie zastąpiono mączką z larw owadów w ilości 200 g/kg paszy jedwabnika morwowego, mącznika młynarka lub drewnojada oraz nasionami łubinu żółtego w ilości 170 g/kg paszy. Kurczęta odchowywano do wieku 42 dni przy stałym dostępie do paszy i wody. W okresie odchowu kontrolowano codziennie padnięcia ptaków oraz grupowo pobranie paszy w odstęпах tygodniowych. Po zakończeniu okresu odchowu, w 42. dniu życia, kogutki zważono i ubito po 8 sztuk z każdej grupy. Tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej. W trakcie analizy pobrano i zamrożono w temperaturze -20°C próbki mięsa piersi i nóg do dalszych badań. W próbkach mięsa piersi i nóg oznaczono zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego i popiołu surowego. Przeprowadzono analizę organoleptyczną jakości mięsa piersi i nóg. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań poddano analizie statystycznej, wykorzystując program SAS wersja 9.2. Istotność różnic oceniano za pomocą testu Duncana, uznając różnice

za statystycznie istotne przy wartości P poniżej 0,05. Analiza chemiczna składu komponentów białkowych zastosowanych w doświadczeniu wykazała, że zawartość białka w mączce z larw drewnojada odpowiadała zawartości tego składnika w śrucie sojowej, natomiast zawartość białka w mączce z larw mącznika i poczwerek jedwabnika był wyższa odpowiednio o 38% i 25%. Mączki owadzie, szczególnie z larw drewnojada zawierały znacznie więcej tłuszczu surowego, w porównaniu do śruty sojowej.

Pod względem zawartości włókna surowego tylko mączka z poczwerek jedwabnika odpowiadała śrucie sojowej. Pozostałe komponenty, szczególnie nasiona łubinu i mączka z larw mącznika młynarka, zawierały więcej włókna w kg suchej masy odpowiednio o 373% i 121%, w porównaniu do zawartości tego składnika w śrucie sojowej. Pośród aminokwasów egzogennych, mączki z larw owadów charakteryzowały się niższą zawartością argininy i fenyloalaniny w porównaniu do śruty sojowej. W okresie doświadczenia przeżywalność ptaków we wszystkich grupach była zbliżona i wahała się w granicach 94,9-95%. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w masie ciała i średnich przyrostach masy ciała kogutków, otrzymujących w mieszance nasiona łubinu, mączkę z poczwerek jedwabnika i mączkę z larw mącznika młynarka, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zastąpienie śruty sojowej mączkami z larw owadów istotnie obniżyło średnie pobranie paszy, natomiast najlepsze wykorzystanie paszy stwierdzono u ptaków otrzymujących mączkę z larw mącznika młynarka. Wyniki analizy rzeźnej wykazały, że zastąpienie 60% śruty sojowej łubinem żółtym (grupa II) nie wywarło statystycznie istotnego wpływu na jakość tuszki, niemniej jednak obserwowano tendencję do wzrostu masy tuszki i masy tłuszczu sadełkowego. Eliminacja śruty sojowej z mieszanek paszowych w poszczególnych grupach nie miała istotnego wpływu na względne masy wątroby i serca. Obserwowano natomiast istotny wzrost ($P \leq 0,01$) masy żołądka u kogutków otrzymujących mączki z owadów, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej jak i sojowo-łubinowej. Wyniki analizy składu chemicznego mięśni piersiowych i mięśni udowych wskazują, że zawartość suchej masy w mięsie piersi grupy kontrolnej była istotnie niższa w porównaniu do grup II, III i V. Grupa otrzymująca w mieszance mączkę z larw drewnojada cechowała się istotnie wyższą ($P \leq 0,05$) zawartością białka w mięsie piersi w porównaniu do grupy kontrolnej. Organoleptyczna charakterystyka mięsa kogutków otrzymujących mieszanki zawierające mączki z larw owadów nie wykazała istotnych różnic w zakresie zapachu i smakowości. Obserwowano natomiast tendencję do większej soczystości i kruchości mięsa kogutków otrzymujących w paszy mączki z larw owadów. Na podstawie opracowanych wyników można stwierdzić, że mączka z larw mącznika młynarka lub mączka z poczwerek jedwabnika w połączeniu z nasionami łubinu żółtego mogą stanowić alternatywne źródło białka w mieszankach paszowych dla kurcząt brojlerów w drugim okresie odchowu bez negatywnego wpływu na wyniki produkcyjne i jakość sensoryczną mięsa.

Doświadczenie 2. przeprowadzono na 252 seksowanych kurczętach brojlerach Ross 308, pochodzących z komercyjnego zakładu wylęgowego, odchowywanych na ściółce w standardowych warunkach środowiskowych ze stałym dostępem do paszy i wody. Od 1. do 21. dnia życia kurczęta żywiono mieszanką typu starter. Po zakończeniu pierwszego okresu odchowu kurczęta przydzielono losowo do 4 grup doświadczalnych po 24 ptaki (4 powtórzenia po 6 sztuk – 3 kurki i 3 kogutki). Grupy kontrolne żywiono odpowiednio mieszanką kukurydziano-sojową (I) i kukurydziano-sojowo-łubinową (II). W mieszankach doświadczalnych soję zastąpiono nasionami łubinu żółtego (170 g/kg paszy) w połączeniu z mączką z poczwerek jedwabnika morwowego (200 g/kg paszy) – grupa III lub z mączką z larw mącznika młynarka (200 g/kg paszy) – grupa IV. W całym okresie doświadczenia ptaki miały swobodny dostęp do wody i paszy. Masę ciała kurcząt oraz pobranie paszy kontrolowano w odstępach tygodniowych. Padnięcia ptaków odnotowywano codziennie. Po zakończeniu okresu odchowu (42 dni), kurczęta pozbawiano dostępu do paszy na 12 h, a następnie wybierano losowo po 8 kurcząt

z każdej grupy (po 2 ptaki różnej płci z każdego powtórzenia) i poddano ubojowi. Krew do analiz pobrano poubojowo z żyły jarzmowej do probówek z heparyną. W otrzymanym osoczu oznaczono zawartość białka ogólnego, glukozy trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, HDL-c i LDL-c oraz enzymów wątrobowych. Hormony tarczycy oznaczano metodą radioimmunologiczną, przy użyciu komercyjnych zestawów T4-RIA-CT i T3-RIA-CT firmy DAsource Immuno-Assays S.A.-Belgium, znakowanych izotopem jodu 125 – według załączonej metodyki do danego testu. Po uboju wypreparowywano wątrobę i przewód pokarmowy. Określano masę narządu oraz długość dwunastnicy jelita czczego, jelita krętego, jelit ślepych i jelita końcowego. Dwucentymetrowe segmenty tkanki, pobrane z odcinka dwunastnicy i jelita czczego, przemylano w roztworze soli fizjologicznej, utrwalone w 10% roztworze buforowanej formaliny przez 24 h. Utrwalone tkanki odwadniano w rosnącym szeregu alkoholi i prześwietlano w ksylenie. Odwadnianie tkanek przeprowadzano w procesorze tkankowym Cytadel 2000 firmy Thermo Scientific według zaprogramowanego cyklu trwającego 20 h. Przepojony skrawek został zatopiony we wnętrzu bloczka parafinowego, który sporządzono, wlewając porcję parafiny do metalowej formy, a następnie umieszczono na parafinie fragment tkanki ustawiony w odpowiedniej orientacji przestrzennej i zatopiono go w ciekłej parafinie. Proces ten odbył się z wykorzystaniem zatapiarki parafinowej Myr EC 350-1 połączonej z płytą chłodzącą Myr EC 350-2. Tkanki zatopione w bloczku parafinowym zostały pocięte na skrawki o grubości 5 mikrometrów przy użyciu mikrotomu rotacyjnego Microm HM 340E Thermo Scientific. Barwienie preparatów przeprowadzono standardową techniką obrazowania histologicznego H+E (hematoksylina i eozyna). Otrzymany preparat histologiczny został oceniony pod mikroskopem Zeiss AX10. Zdjęcia tkanek wykonano aparatem Axiocom 105 colour. Doświadczenie strawnościowe przeprowadzono na 144 kurczętach podzielonych na 4 grupy w 6 powtórzeniach, po 6 ptaków w każdym powtórzeniu. Jako wskaźnika użyto bezwodny trójtlenek chromu (Cr_2O_3). Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań poddano analizie statystycznej wykorzystując program SAS wersja 9.2. Istotność różnic oceniano za pomocą testu Duncana, uznając różnice za statystycznie istotne przy wartości P poniżej 0,05. Analiza osiągniętych wyników produkcyjnych kurcząt brojlerów nie wykazała istotnego wpływu zastąpienia śrutą sojowej mączką z poczwerek jedwabnika lub larw mącznika młynarka w połączeniu z nasionami łubinu żółtego, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zastąpienie w 60% śrutą sojowej nasionami łubinu żółtego 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 śrutą sojowej z mieszanek paszowych i zastąpienie jej mączką z poczwerek jedwabnika w połączeniu z nasionami łubinu żółtego istotnie zwiększyło względną masę żołądka mięśniowego ($P<0,01$) i jelita czczego ($P<0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Wprowadzenie do mieszanki paszowej mączki z larw mącznika młynarka istotnie zwiększyło względną masę żołądka mięśniowego ($P<0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Względna długość jelita czczego i jelit ślepych kurcząt żywionych mieszanką, zawierającą mączkę z poczwerek jedwabnika, była zbliżona do wartości obserwowanych w grupie sojowo-łubinowej, natomiast istotnie wyższa ($P<0,01$), w porównaniu do grupy kontrolnej, i otrzymującej w diecie mączkę z larw mącznika młynarka wraz z nasionami łubinu żółtego. Nie stwierdzono wpływu stosowania mączek z larw jedwabnika jak również larw mącznika młynarka, w połączeniu z nasionami łubinu żółtego na morfologię dwunastnicy i jelita cienkiego. Zastąpienie w 60% śrutą sojowej nasionami łubinu żółtego nie miało istotnego wpływu na pozorną strawność jelitową białka ogólnego i tłuszczu surowego, zawartych w mieszance paszowej. Natomiast całkowite wyeliminowanie śrutą sojowej z mieszanek i zastąpienie jej mączkami z larw mącznika młynarka i poczwerek jedwabnika, w połączeniu z nasionami łubinu żółtego, istotnie zwiększyło współczynniki pozornej strawności jelitowej tych składników ($P<0,01$). Badania wskaźników biochemicz-

nych krwi kurcząt 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 w połączeniu z nasionami łubinu żółtego. Względna masa wątroby ptaków otrzymujących w diecie mączkę z poczwerek jedwabnika oraz nasiona łubinu żółtego była statystycznie istotnie niższa ($P<0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W pozostałych grupach wartości tego parametru były zbliżone, a obserwowane różnice nie wykazywały istotności statystycznej. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości aminotransferazy asparaginowej. Kurczęta żywione mieszanką sojowo-łubinową charakteryzowały się istotnie niższą zawartością fosfatazy alkalicznej ($P<0,01$), natomiast wprowadzenie do mieszanki mączki z larw mącznika młynarka, w połączeniu z nasionami łubinu żółtego, istotnie obniżyło zawartość aminotransferazy alaninowej ($P<0,01$), w porównaniu do grup żywionych mieszankami z udziałem soi. Zastąpienie w 60% śruty sojowej nasionami łubinu żółtego istotnie zwiększyło poziom tyroksyny ($P<0,05$), trójiodotyroniny ($P<0,01$) oraz stosunek T3/T4 ($P<0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Całkowite wyeliminowanie śruty sojowej z mieszanki i zastąpienie jej mączką z poczwerek jedwabnika lub larw mącznika młynarka w połączeniu z nasionami łubinu żółtego obniżyło wartości badanych parametrów do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki badań wskazują, że śrutę sojową w mieszance typu grower można całkowicie zastąpić nasionami łubinu żółtego oraz mączką z larw mącznika młynarka lub mączką z poczwerek jedwabnika bez negatywnego wpływu na wyniki odchowu i jakość sensoryczną mięsa. Nasiona łubinu żółtego, w połączeniu z mączką z larw mącznika młynarka lub z poczwerek jedwabnika, mogą stanowić alternatywne źródło białka dla śruty sojowej w mieszankach paszowych dla kurcząt brojlerów w drugim okresie odchowu.

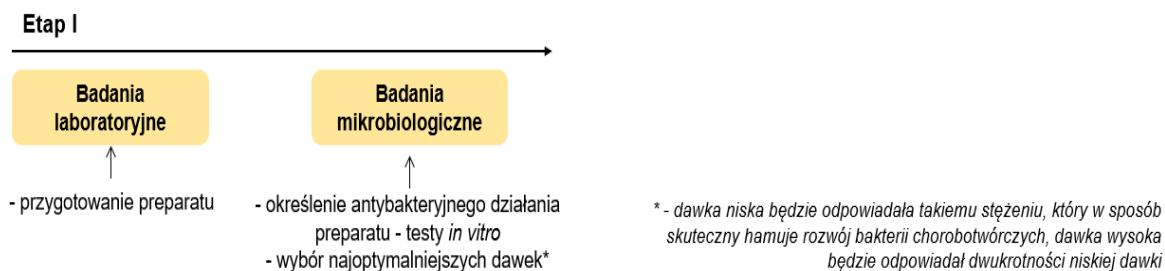
Zadanie 04-16-05-11

Ochrona przewodu pokarmowego prosiąt przed negatywnym wpływem bakterii chorobotwórczych

Kierownik zadania: prof. dr hab. Marek Piesza

Celem głównym zadania badawczego jest ocena wpływu autorskiego dodatku paszowego o właściwościach buforujących, ograniczającego rozwój bakterii o charakterze patogennym i mającego wpływ na stabilizację mikroflory jelit u odsadzonych prosiąt, morfometrię tkanek przewodu pokarmowego, funkcje fizjologiczne przewodu pokarmowego, w tym aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego i dojrzewanie śluzówkowego układu immunologicznego oraz parametry produkcyjne i zdrowie rosnących świń.

Ryc. 1. Schemat badań w etapie I.



I etap badań obejmował:

- a) badania laboratoryjne polegające na przygotowaniu preparatu, który zawiera w swym składzie substancję o właściwościach przeciwbakteryjnych i buforujących (octan sodowy) oraz substancję wspomagającą, odżywiającą nabłonek jelitowy (maślan sodowy) w różnych dawkach i proporcjach. Badano stabilność roztworów pod względem pH. Ze względu na ochronę patentową dokładny skład i proporcje nie jest podany.
- b) badania mikrobiologiczne w celu sprawdzenia skuteczności biobójczego działania przygotowanych roztworów preparatu został przeprowadzony test mikrobiologiczny *in vitro*. Do badań posłużyły wybrane bakterie *Salmonella enterica* PCM 2565, *Clostridium perfringens* PCM 2486 oraz *Escherichia coli* PCM 2560 pochodzące z kolekcji banku mikrobiologicznego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu.

Do hodowli bakterii zastosowano odpowiednio: podłoże agarowe SS, podłoże agarowe Endo oraz podłoże Wilsona-Blaira. Po namnożeniu kultur bakteryjnych wykonano zawiesiny w soli fizjologicznej, a następnie pobrano 0,5 cm³ każdej z nich na jałowe szalki Petriego. Szalki te zalano roztworami badanych związków oraz ich mieszaniny na podłożu agarowym o stężeniu: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 i 2% na wzrost i rozwój wybranych szczepów patogennych (*Clostridium Sp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella Sp.*) w hodowli *in vitro*. Jako kontrolę zastosowano zawiesiny drobnoustrojów z odpowiednim podłożem mikrobiologicznym.

Wszystkie mikroorganizmy inkubowano w temp. 37°C przez 24 h, przy czym hodowla bakterii *Salmonella enterica* PCM 2486 i *Escherichia coli* PCM 2560 przebiegała w warunkach tlenowych, natomiast *Clostridium sporogenes* PCM 2486 w warunkach beztlenowych pod warstwą 3% agaru. Po okresie inkubacji przeliczono ilość wyrosłych kolonii mikroorganizmów na poszczególnych podłożach z dodatkiem badanych substancji o odpowiednim ich stężeniu, a uzyskane wyniki porównano z kontrolą. Hodowlę przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki zbiorcze uśredniono. Liczenie kolonii bakterii wykonano metodą mikroskopową. Badania wykonano przy współpracy z Katedrą Mikrobiologii UR w Krakowie.

Opis wyników:

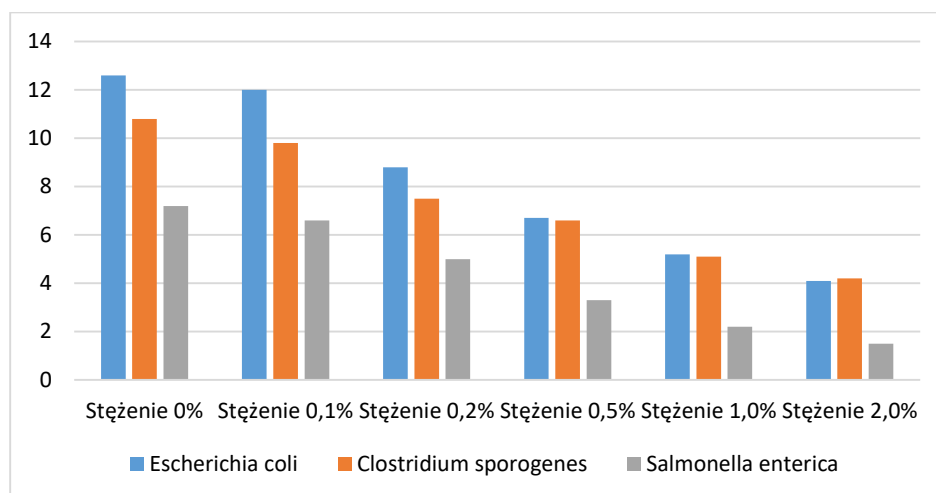
W pierwszym etapie badań wykonano preparat, następnie sporządzono wodne roztwory o stężeniu: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1 i 2%. Badano pH rozcieńczonych roztworów mierzonych w czasie: 0, 1, 2, 4, 8, 16 i 24 godziny po sporządzeniu, utrzymując preparaty w cieplarni w temperaturze 39,4°C, co odpowiada ciepłocie ciała prosiaka. Oznaczenia wykonano na pHametrze CP-411 firmy Elmetron ze szklaną elektrodą po wcześniejszym jej wykalibrowaniu w zakresie pH 4,0 a 7,5 według Polska Norma PN-77/A-82058. Roztwory robocze preparatu sporządzono w płynie fizjologicznym o stężeniu NaCl 0,9% buforowanym fosforanami i zawierającym w swoim składzie: KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Oznaczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

Tab. 1. pH roztworów preparatu podczas inkubacji przez okres 24 godzin, w temperaturze 34,9°C.

Czas inkubacji w godzinach	Stężenie preparatu, %					
	0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
0	7,36	7,39	7,40	7,44	7,55	7,82
1	7,30	7,32	7,34	7,42	7,50	7,77
2	7,25	7,27	7,29	7,40	7,45	7,72
4	7,18	7,20	7,23	7,38	7,40	7,62
8	6,82	6,85	6,83	7,32	7,36	7,54
16	6,24	6,22	6,25	6,80	6,90	7,35
24	5,74	5,76	7,71	6,55	6,66	6,99

* średnie odchylenie standardowe pomiarów mieściło się w zakresie od ±0,01 do ±0,02.

Wykres 1. Wpływ stężenia preparatu na rozwój bakterii patogennych w hodowli *in vitro* wyrażone w CPU 10⁶.



Czas inkubacji wynosił 24 h w 37°C. Po zastosowanym czasie w hodowli zliczano wyrosty kolonie na każdym rozcieńczeniu i przeliczono ilości na 1 ml roztworu według wzoru:

$$L = \frac{\sum_{i=0}^n xy}{n}; \text{ gdzie:}$$

L – liczba mikroorganizmów w 1 g

x – średnia liczebność kolonii w danym rozcieńczeniu

y – rozcieńczenie

n – ilość odczytów

Podsumowując wyniki pierwszego roku badań należy stwierdzić, że najskuteczniejszymi właściwościami hamującymi rozwój bakterii *Clostridium*, *Salmonella* i *Escherichia coli* okazały się rozcieńczenia preparatu w zakresie od 0,5 do 2,0%. Na podstawie uzyskanych wyników zostanie przeprowadzone doświadczenie *in vivo*.

Zakład Systemów i Środowiska Produkcji
p.o. Kierownika: dr hab. Jacek Walczak

Zadanie 01-17-03-11

Waloryzacja metod ograniczenia rozpraszania związków azotu z produkcji zwierzęcej

Kierownik zadania: dr hab. Jacek Walczak

Postępująca intensyfikacja produkcji zwierzęcej bezpośrednio wpływa na jakość środowiska naturalnego i zmiany klimatu. Zarówno „Europejski Zielony Ład” jak i strategia „Od pola do stołu”, nakładają na ten sektor gospodarki szereg zobowiązań mających ograniczyć lub nawet całkowicie zniwelować wspomniane oddziaływanie. Mimo, że w obszarze UE od 1991 r. obowiązuje już Dyrektywa Rady, dotycząca ochrony wód przed zanieczyszczeniami powodowanymi przez azotany pochodzenia rolniczego (91/676/EWG) (Dz. Urz. WE L 756 z 31.12.1991, s. 1), to jednak w Polsce wdrażający ją program działań, mający na celu zmniejszenie zanieczyszczenia wód azotanami pochodzącymi ze źródeł rolniczych, wdrożono

w 2017 r. W okresie jego pierwszej ewaluacji ważne stało się zaproponowanie metod nie tylko bilansowania azotu, ale również jego rozpraszania, których brak jest w obecnej wersji.

Założenia metodyczne:

Zadaniem objęto podstawowe gatunki zwierząt gospodarskich, jak: świnie, bydło, drób czystych ras jak i krzyżówek towarowych, w liczbie 1000 szt., 12 systemów utrzymania, 4 typy płyt i zbiorników na odchody, 960 t odchodów w fazie płynnej i stałej oraz 4 sposoby aplikacji nawozów naturalnych. Ocenę i weryfikację metod ograniczania rozpraszania związków azotu zrealizowano w oparciu o 4 cele szczegółowe.

Pierwszy z nich dotyczył określenia efektywności metod redukcji rozpraszania azotu z systemów utrzymania bydła, świń i drobiu. Porównaniu podlegały tu wielkości produkcji i koncentracja azotu w nawozach naturalnych oraz emisja amoniaku i tlenków azotu z utrzymania świń, bydła i drobiu w niskoemisyjnych technologiach chowu. Grupy doświadczalne utrzymywano: nioski – w systemie z podsuszaniem pomiotu, bydło – w systemie podłóg ryflowych i z częstym usuwaniem obornika, świnie – w systemie częściowo rusztowym i z biofiltrami. Grupy kontrolne utrzymywane były w systemach bezściołowych.

Drugi z celów obejmował wpływ rodzaju stosowanych dodatków paszowych oraz liczby faz żywienia na poziom ograniczenia wydalania azotu. Porównaniu podlegały koncentracje BO w paszach i azotu w odchodach, tak w fazie płynnej jak i stałej, oraz w formie organicznej i nieorganicznej dla różnych sposobów żywienia. Grupy doświadczalne stanowiły żywienie 5-fazowe dla drobiu i żywienie 4-fazowe dla świń, a w przypadku bydła pastwiskowanie. Grupy kontrolne żywiono standardowymi mieszankami paszowymi.

Realizacja kolejnego celu polegała na określeniu możliwości redukcji rozpraszania azotu na drodze modyfikacji warunków przechowywania nawozów naturalnych. Prace objęły tu określenie wielkości emisji amoniaku i ilości wymywanego azotu z przechowywania płynnych i stałych nawozów naturalnych. Jako grupy doświadczalne wykorzystano przykrycie obornika i gnojowicy folią, separację gnojowicy i fermentację metanową. W grupach kontrolnych analogiczne nawozy przechowywano bez modyfikacji.

Ostatni ze zrealizowanych celów dotyczył wpływu sposobu aplikacji nawozów naturalnych w trakcie nawożenia na wielkość rozpraszania azotu. Jako grup doświadczalnych użyto redlicowych aplikatorów doglebowych i kątownego rozrzutnika obornika. Grupami kontrolnymi były klasyczne rozrzutniki obornika oraz wozy asenizacyjne.

Dane pomiarowe zbierane w trakcie realizacji prac:

- skład obornika, pomiotu i gnojowicy (NPK, sm, azot organiczny, całkowity, amonowy azotanowy),
- objętość oraz skład odprowadzonej gnojówki w trakcie przechowywania,
- zawartość N i P w dawkach pokarmowych zwierząt,
- emisje gazów w jednostce czasu.

Syntetyczny opis wyników zadania:

Uzyskane w doświadczeniu wyniki podsumowuje Tab. 1. Największą efektywnością, w stosunku do grup kontrolnych, wykazywały metody przykrywania zbiorników na gnojowicę i płyt obornikowych. W ten sposób redukowano emisję przede wszystkim amoniaku, ale również tlenków azotu. Bardzo wysoką skuteczność uzyskały także podłogi separujące dla bydła i częściowo

rusztowe dla świń. W pierwszym przypadku, działanie polegało na odseparowaniu moczu zawierającego ureazę od kału zawierającego wysoką koncentrację niestrawionych związków azotu. W drugim przypadku, działanie ograniczało się do fizycznej zmiany wielkości powierzchni emisji. Metody te wymagają jednak sporych nakładów inwestycyjnych. Zmian organizacyjnych wymaga żywienie wielofazowe, polegające na precyzyjnym doborze poziomu BO do potrzeb rosnących zwierząt i wprowadzeniu dodatkowych etapów żywienia i samych pasz. Uzyskane tu redukcje rozpraszania są w zasadzie bezkosztowe, a nawet redukują koszty żywienia. Co istotne, metody te wprowadzają niższy ładunek azotu na samym wejściu do układu bilansowania, stąd na dalszych etapach produkcji wolumen uwalnianego azotu, również pozostaje niższy.

Tab. 1. Efektywność metod redukcji rozpraszania związków azotu do środowiska.

Lp.	Metoda redukcji	Sposób działania	% redukcji
1.	Podsuszanie pomiotu	Dezaktywacja ureazy	31,5
2.	Podłogi separujące	Eliminacja działania ureazy	49,2
3.	Podłogi cz. rusztowe	Redukcja powierzchni emisji	69,6
4.	Żywienie 5-fazowe – drób	Redukcja BO	19,1
5.	Żywienie 4-fazowe – tuczniki	Redukcja BO	18,4
6.	Pastwiskowanie	Podsuszanie, redukcja emisji	39,7
7.	Przykrycie folią – gnojowica	Redukcja emisji	100
8.	Przykrycie folią – obornik	Redukcja emisji	95
9.	Separacja gnojowicy	Eliminacja ureazy	40,3
10.	Fermentacja metanowa	Spalanie biogazu	27,7
11.	Doglebowa aplikacja	Redukcja powierzchni emisji	75,8
12.	Rozrzutnik kątowy	Redukcja powierzchni emisji	36,2

Specyficznym rozwiązaniem jest zwiększenie udziału pastwiskowania bydła. Przebywanie na pastwisku eliminuje etapy pośrednie przechowywania i aplikacji nawozów naturalnych, a zatem i źródła powstających emisji. Dodatkowo, dzięki szybkiemu wchłanianiu moczu do gleby oraz efektowi podsuszania nawozu przez czynniki naturalne, ograniczona zostaje aktywność ureazy i emisja amoniaku.

Fot. 1. Separator gnojowicy (J. Walczak).



Fot. 2. Przykrycie zbiorników na gnojowicę (J. Walczak).



Fot. 3. Doglebowy, redlicowy aplikator gnojowicy (J. Walczak).

**Zadanie 01-17-04-11**

Określenie potencjału biogenego obornika oraz możliwości 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 sztuk matek stada podstawowego. Rasy te w dość reprezentatywny sposób odzwierciedlają znaczne zróżnicowanie pod względem eksterieru, kierunku i potencjału produkcyjnego występujące w obrębie krajowego pogłowia zwierząt tego gatunku.

Zwierzęta wymienionych ras były utrzymywane całodobowo w budynkach owczarskich (z dostępem do okólników), z wyłączeniem okresu pastwiskowego (wypas 8-godzinny), na głębokiej ściółce (usuwanej 2-krotnie podczas roku, w okresie wiosennym i jesiennym – ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o. [Ch], bądź tylko w okresie jesiennym – ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. [K]), 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), zgodnie ze standardami wynikającymi z aktualnych norm Żywienia IZ INRA. W pierwszym etapie doświadczenia określono wartości nominalne dla mikroklimatu i stężeń domieszek gazowych. W etapie drugim, dwukrotnie w tygodniu, przeprowadzono oprysk podłogi owczarni (ściółki) wraz z jej ścianami (do wysokości ok. 1 m) wodnym roztworem fermentowanego ekstraktu ziółowego (FHE), w stężeniu około 100 ml/1 l wody, a następnie zastosowano suplementację dawki pokarmowej paszą treściwą w formie granulatu. Budynki owczarni wyposażone są w wentylację grawitacyjną. Określono wartości temperatury, wilgotności względnej i ruchu powietrza. Pomiary mikroklimatyczne zrealizowano przy użyciu elektronicznego miernika firmy Testosterm, model Testo 435, w trakcie pomiarów emisji gazów.

Pomiar emisji gazowych obejmuje oznaczenie stężenia:

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

Przeprowadzony w pobliżu pomiar (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 w I etapie badań wskazują, iż nominalne parametry mikroklimatyczne (N) objętych doświadczeniem pomieszczeń owczarskich (bez zastosowania preparatów celem poprawy tegoż – oprysk fermentowanym ekstraktem ziołowym (FHE) i suplementacja dawki pokarmowej paszą treściwą w formie granulatu [P]) oraz stwierdzone stężenie domieszek gazowych we wszystkich przeprowadzonych pomiarach, choć zróżnicowane, kształtowały się na korzystnym poziomie. Zakres temperatur zmierzonych we wszystkich obiektach w okresie rocznym zawierał się w zakresie od 5°C w okresie zimowym do maksymalnie 29°C w okresie letnim. Podczas sezonu stwierdzono dość znaczne różnice w szybkości ruchu powietrza, a najwyższe jego wartości, osiągające maksymalnie 0,9 m/s odnotowano w okresie letnim, podczas gdy w okresie zimowym analogiczne pomiary były kilkukrotnie niższe. Stwierdzono podwyższoną (85% w okresie od grudnia do lutego), niemniej akceptowalną wilgotność powietrza w obiekcie w Chorzelowie. W przypadku obydwu obiektów zaznaczyła się dość wyraźna tendencja: wartość tego pomiaru była znacząco niższa w okresie letnim, wynosząc około 60% w porównaniu z 80% w zimie.

W żadnym z pomiarów nie stwierdzono przekroczenia zalecanego stężenia CO₂, a jego wartości zmierzone w okresie od listopada do marca (0,07-0,16%) uznać należy za korzystne. Stężenie amoniaku było zmienne w zależności od terminu pomiaru i we wszystkich obiektach wyniosło 0-8 ppm (najwyższe wartości występujące sporadycznie), nie wykazując równocześnie jakiegokolwiek wyraźnego zaznaczonej tendencji. Nie stwierdzono obecności siarkowodoru w żadnym z obiektów i w jakimkolwiek okresie pomiaru. Zakres wskazań stężenia CH₄ wykazywał dość znaczną rozpiętość 10000-49500 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. W owczarni w Chorzelowie – z racji częstszej, dwukrotnej wymiany obornika – tendencja ta zaznaczyła się jeszcze w miesiącu czerwcu i lipcu. Wskazuje to na tendencję do poprawy mikroklimatu budynków inwentarskich w zakresie stężenia CH₄ przez okres kilkudziesięciu dni po wymianie ściółki. Wartości NO_x wyniosły maksymalnie 8 ppb, kształtując się z reguły w zakresie 2-6 ppb, a udział NO był zazwyczaj co najmniej 2-krotnie wyższy od stężenia NO₂. Pomiary udziału związków azotu w powietrzu owczarni wyróżniły się największą zmiennością.

Wartość parametrów mikroklimatycznych oraz ich przebieg w II. etapie badań – podczas gdy przez rok zastosowano oprysk podłogi owczarni roztworem fermentowanego ekstraktu ziołowego [FHE], a w kolejnym sezonie suplementację dawki pokarmowej paszą treściwą w formie granulatu [P] – dość mocno koresponduje z analogicznymi wartościami nominalnymi (I etap). Dotyczy to zarówno temperatury, ruchu powietrza, jak i jego wilgotności. Konsekwencję tej tendencji stanowiły średnie wartości roczne tych czynników dla N, FHE i P, które dla obiektu K wyniosły odpowiednio: 14,4, 13,3 i 13,9°C; 0,25, 0,23 i 0,23 m/s; 71,2, 72,3 i 72,5% (P>0,05; Tab. 1.). Analogicznie, dla obiektu Ch: 15,3, 14,1 i 14,6°C; 0,20, 0,23 i 0,23 m/s; 78,4, 79,9 i 79,7% (P>0,05; Tab. 2.).

W przeciwieństwie do powyższego, oprysk podłogi owczarni (ściółki) wraz z jej ścianami (do wysokości ok. 1 m) wodnym roztworem fermentowanego ekstraktu ziołowego, skutkowało istotną redukcją emisji amoniaku ($P \leq 0,01$). Stężenie tego gazu w obiekcie K uległo obniżeniu średnio o 35,5% względem wartości nominalnych i o 33,3% porównując z systemem z suplementacją granulatem (Tab. 1.). Przekłada się to na odpowiednią dzienną emisję NH_3 w przeliczeniu na 1 sztukę stada podstawowego, która nominalnie oraz przy suplementacji granulatem osiągała wartość 0,0124 i 0,012 ppm, natomiast w wariancie FHE: 0,008 ppm.

Analogiczne wyniki, uzyskane w owczarni Ch wykazały tą samą, niemniej wyraźniej zaznaczoną tendencję (Tab. 2.). Stężenie omawianego gazu w wyniku oprysku było o ponad połowę niższe, zarówno w porównaniu z wartością nominalną (o 56%), jak i w przypadku wariantu P (54,2%). Dzienna emisja NH_3 w przeliczeniu na 1 sztukę stada podstawowego wyniosła odpowiednio: 0,0048, 0,0109 i 0,0104 ppm.

Wyniki przeprowadzonych badań w zakresie redukcji stężenia amoniaku w obiekcie owczarskim wskazują, iż zastosowanie roztworu ekstraktu ziołowego spowodowało istotne, 33-56% obniżenie jego stężenia, na drodze osłabienia dynamiki procesu amonifikacji przebiegającej w oborniku. Substancje czynne zawarte w wyciągu, zapewne mają wpływ na ograniczenie namnażania się bakterii i grzybów odpowiedzialnych za proces rozkładu białek i obniżenie wolumenu wytwarzanej ureazy, będącej katalizatorem w procesie hydrolitycznej deaminacji mocznika prowadzącej do powstania amoniaku.

Wykorzystanie granulatu oraz oprysku FHE miały także istotny wpływ na redukcję zawartości metanu w mikroklimacie badanych obiektów (Tab. 1. i 2.). Nominalne średnie stężenie CH_4 w owczarniach K i Ch wyniosło 32400 ppb i 24600 ppb, a po zastosowaniu oprysku oraz wprowadzeniu suplementacji granulatem przyjęto wartość, odpowiednio: 28100 i 28000 ppb oraz 20400 i 21000 ppb ($P \leq 0,01$; Tab. 1. i 2.). Wielkość redukcji metanu wahała się w zakresie 13,3 (K, FHE) do 17,1% (Ch, FHE).

Rozpatrując skład chemiczny obornika owczego, we wszystkich etapach doświadczenia – N, FHE i P, N organiczny stanowił dominującą frakcję azotu, natomiast jego zawartość była istotnie wyższa w próbkach K. 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 23-26:1, jaki to poziom uznać należy za korzystny, gdyż pozwala on na uzyskanie znacznej ilości szybko przyswajalnych form azotu. Zawartość suchej masy i pH były zbliżone i wyniosły odpowiednio 29,8-34,5% i 7,6-8,4.

Konsekwencją dłuższego okresu deponowania ściółki w K – wymiana co 12 miesięcy, były wyższe straty wszystkich związków biogennych, w odróżnieniu od Ch, gdzie zabieg ten był przeprowadzany z dwukrotnie większą częstotliwością – co 6 miesięcy, w wyniku czego straty te przyjmowały istotnie niższe wartości. Należy zaznaczyć, iż większa końcowa akumulacja N, P, K w oborniku (częstsza wymiana ściółki) powoduje, że przy późniejszym jego wykorzystaniu jako nawozu, przy równoczesnym, właściwym przechowywaniu i odpowiedniej, niskoemisyjnej metodzie aplikacji na użytki rolne, posiada on wyższą wartość nawozową.

Nie stwierdzono wpływu suplementacji dawki pokarmowej paszą granulowaną na wartość strat pierwiastków biogennych w oborniku owczym (z wyłączeniem N całkowitego, $P \leq 0,05$). Tendencja taka wyraźnie zaznaczyła się w przypadku N całkowitego i organicznego przy zastosowaniu oprysku FHE, gdzie były one istotnie bądź wysoko istotnie mniejsze. Przyjmowały wartość od 3,8 (N-org., Ch) do 14,7% (N-całk., K). W przypadku wartości nominalnych i suplementacji granulatem, utrata form azotu z obornika podczas jego deponowania w owczarni była o około 10% wyższa.

Podsumowując, wykorzystanie pełnoporcjowej mieszanki treściwej w formie granulatu w żywieniu owiec prowadzi do ograniczenia emisji metanu, natomiast przeprowadzenie oprysku ekstraktem ziołowym ponadto skutkuje mniejszymi stratami azotu z obornika, co prowadzi do istotnego obniżenia koncentracji amoniaku w obiekcie owczarni. Skutkuje to niższym stopniem emisji towarzyszących produkcji owczarskiej domieszek gazowych – metanu i amoniaku do środowiska.

Tab. 1. Porównanie nominalnych parametrów mikroklimatycznych oraz stężenia domieszek gazowych w owczarni ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. ze zmierzonymi po zastosowaniu oprysku FHE oraz suplementacji dawki pokarmowej paszą granulowaną.

Cecha	Parametry nominalne	Oprysk FHE	Suplementacja paszą granulowaną
Testo 435 Średnia roczna temperatura (°C)	14,4	13,3	13,9
Ruch powietrza (m/s)	0,25	0,23	0,23
% wilg. pow.	71,2	72,3	72,5
Dräger Multiwarn II CO ₂ (%)	0,09	0,09	0,09
CH ₄ (ppm)	0	0	0
NO (ppm)	0	0	0
H ₂ S (ppm)	0	0	0
NH ₃ (ppm)	3,1 Bb	2,0 Aa	3,0 Bb
Dzienna emisja NH ₃ (ppm)/szt.	0,0124 Bb	0,008 Aa	0,012 Bb
Tiger i-2000 CH ₄ (ppb)	32400 Bb	28100 Aa	28000 Aa
Dzienna emisja CH ₄ (ppb)/szt.	129,6 Bb	112,4 Aa	112,0 Aa
Horiba APNA-370 NO (ppb)	1,2	1,5	1,2
NO ₂ (ppb)	4,3	3,99	3,9
NO _x (ppb)	5,5	5,5	5,1

a, b, c – różnice istotne przy poziomie $\alpha=0,05$; A, B, C – różnice istotne przy poziomie $\alpha=0,01$.

Tab. 2. Porównanie nominalnych parametrów mikroklimatycznych oraz stężenia domieszek gazowych w owczarni ZD IZ PIB Chorzelów sp. z o.o. ze zmierzonymi po zastosowaniu oprysku FHE oraz suplementacji dawki pokarmowej paszą granulowaną.

Cecha	Parametry nominalne	Oprysk FHE	Suplementacja paszą granulowaną
Testo 435 Średnia roczna temperatura (°C)	15,3	14,1	14,6
Ruch powietrza (m/s)	0,20	0,23	0,23
% wilg. pow.	78,4	79,9	79,7
Dräger Multiwarn II CO ₂ (%)	0,09	0,09	0,09
CH ₄ (ppm)	0	0	0
NO (ppm)	0	0	0
H ₂ S (ppm)	0	0	0
NH ₃ (ppm)	2,5 Bb	1,10 Aa	2,4 Bb
Dzienna emisja NH ₃ (ppm)/szt.	0,0109 Bb	0,0048 Aa	0,0104 Bb
Tiger i-2000 CH ₄ (ppb)	24600 Bb	20400 Aa	21000 Aa
Dzienna emisja CH ₄ (ppb)/szt.	107,0 Bb	88,7 Aa	91,3 Aa
Horiba APNA-370 NO (ppb)	1,4	1,3	1,8
NO ₂ (ppb)	5,3	4,1	4,2
NO _x (ppb)	6,7	5,4	6,0

a, b, c – różnice istotne przy poziomie $\alpha=0,05$; A, B, C – różnice istotne przy poziomie $\alpha=0,01$.

Zadanie 04-17-01-11

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

Kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

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

Cel główny realizowano poprzez :

- Analizę przychodów i kosztów produkcji zwierzęcej w ujęciu terytorialnym uwzględniającą zmiany w technologii i technikach wytwarzania w gospodarstwach ekologicznych i konwencjonalnych.
- Inwentaryzację zmian w technologii i technikach wytwarzania w gospodarstwach ekologicznych i konwencjonalnych.
- Ustalenie, jakie działania innowacyjne mające na celu wzrost dochodowości gospodarstw, były realizowane w gospodarstwach z produkcją zwierzęcą również ekologiczną, identyfikację działań na rzecz zrównoważonej produkcji zwierzęcej w gospodarstwach rodzinnych.

Badania były prowadzone w latach 2017–2019. Dane gromadzono w gospodarstwach ekologicznych i konwencjonalnych. Analizowane obiekty położone były w obrębie Polski południowo-wschodniej, południowo-zachodniej i północno-wschodniej. Badaniami objęto łącznie 680 gospodarstw. Dobór gospodarstw był celowy, kryterium doboru stanowiła specjalizacja zgodnie z metodyką FADN [Goraj i Olewnik, 2015] oraz region predystynowany do przedmiotowej działalności (region Polski południowo-wschodniej, południowo-zachodniej oraz północno-wschodniej). Badane obiekty zestawiono w przypadku gospodarstw ekologicznych w grupy gatunkowe (bydło mięsne, bydło mleczne, kury niośki), natomiast gospodarstwa konwencjonalne przypisano do III grup zgodnie z rejonizacją, tj. miejscem pochodzenia danych (czyli podkarpackie, podlaskie, dolnośląskie). W oparciu o pozyskane dane analizowano m.in.: strukturę obszarową gospodarstw, strukturę wsparcia finansowego gospodarstw oraz wyniki ekonomiczne wyrażone kosztami pasz, kosztami bezpośrednimi i dochodem rolniczym netto. Ponadto, określono poziom zrównoważenia oraz zmiany wprowadzane w gospodarstwach rolnych w zakresie technik i technologii produkcji.

Gospodarstwa ekologiczne:

We wszystkich grupach badanych gospodarstw, na etapie dochodu z działalności bez dopłat, zanotowano stratę, a dopiero po uwzględnieniu otrzymanych subwencji, wygenerowano dodatni wynik finansowy (dochód z działalności), który wahał się od ponad 16,4 tys. zł (gosp. z produkcji jaj), poprzez 32,1 tys. zł (gosp. z produkcji mleka) – do ponad 32,6 tys. zł. Dochód z działalności, w przeliczeniu na 1 krowę mięsną, był na poziomie 2,4 tys. zł, a przeliczając to na 1 kg żywca uzyskano wartość 5,61 zł. Z kolei, przeliczając to na 1 os. pełnozatrudnioną uzyskano wartość ponad 21,1 tys. zł, co dało ponad 2,6 tys. zł miesięcznie i było o ponad 50% niższe od wynagrodzenia w gospodarce narodowej w 2016 r. Dochód z działalności w przeliczeniu na 1 krowę mleczną był na poziomie 2,3 tys. zł, a po przeliczeniu na 1 kg mleka uzyskano wartość 0,55 zł. Przeliczając to na 1 os. pełnozatrudnioną uzyskano wartość ponad 14,3 tys. zł, co dało ponad 1,2 tys. zł miesięcznie i było o ponad 2,4 krotnie niższe od wynagrodzenia w gospodarce narodowej w 2016 r. Natomiast dochód z działalności w przeliczeniu na 1 kurę był na poziomie 128,60 zł, a po jego przeliczeniu na

1 jajo osiągnął wartość 0,70 zł. Przeliczając to na 1 os. pełnozatrudnioną uzyskano wartość ponad 10,7 tys. zł, co dało ponad 894 zł miesięcznie i było o ponad 3,5 krotnie niższe od wynagrodzenia w gospodarce narodowej w 2016 r.

Podmioty produkujące żywiec i mleko uzyskały wysoki wskaźnik zagregowany oceny stopnia zrównoważenia, według 3 wskaźników społecznych, natomiast gospodarstwa z produkcją jaj średni. Gospodarstwa ekologiczne produkujące żywiec i jaja uzyskały wysoki wskaźnik zagregowany oceny stopnia zrównoważenia według 6 wskaźników środowiskowych, te z produkcją mleka nawet bardzo wysoki, natomiast badając stopień zrównoważenia gospodarstw ekologicznych poprzez 6 wskaźników ekonomicznych, stwierdzono, że jest on niski we wszystkich specjalizacjach gospodarstw (Tab. 1.).

Tab.1. Wskaźniki społeczne, środowiskowe i ekonomiczne do oceny zrównoważonego rozwoju w gospodarstwach utrzymujących bydło mięsne, bydło mleczne i kury nioski (2016).

Wyszczególnienie (wartości średnie na 1 gospodarstwo)	b. mięsne 47,01 szt., w tym: k. mięsne 13,17 szt.	b. mleczne 23,11 szt., w tym: k. mleczne 14,37 szt.	k. nioski 127,68 szt.
<i>Wskaźniki społeczne do oceny zrównoważonego rozwoju</i>			
Ocena stopnia zrównoważenia gospodarstw - wskaźnik zagregowany (3 wskaźniki)	3,33	3,33	2,67
	wysoki	wysoki	średni
<i>Wskaźniki środowiskowe do oceny zrównoważonego rozwoju</i>			
Ocena stopnia zrównoważenia gospodarstw - wskaźnik zagregowany (6 wskaźników)	3,83	4,33	3,8
	wysoki	b. wysoki	wysoki
<i>Wskaźniki ekonomiczne do oceny zrównoważonego rozwoju</i>			
Ocena stopnia zrównoważenia gospodarstw - wskaźnik zagregowany (6 wskaźników)	1,5	1,5	1,83
	niski	niski	niski

Źródło: badania własne

Do określenia czynników determinujących dochody gospodarstw zastosowano współczynnik korelacji Pearsona (przy poziomie istotności $p=0,05$). W gospodarstwach z produkcją żywca wraz ze wzrostem: nakładów pracy ogółem (AWU) $r=-0,30$; obsady krów/ha UR $r=-0,18$; kosztów bezpośrednich (zł) $r=-0,46$ i kosztów całkowitych (zł) $r=-0,25$ dochód ulegał zmniejszeniu. W relatywnie największym stopniu na poprawę sytuacji dochodowej tych podmiotów wpływał wzrost skali produkcji $r=0,53$. Wskazane jest obniżenie kosztów bezpośrednich $r=-0,46$. W gospodarstwach z produkcją mleka wraz ze wzrostem kosztów bezpośrednich (zł) $r=-0,34$ i kosztów całkowitych (zł) $r=0,22$ dochód ulegał zmniejszeniu. Stosunkowo w największym stopniu na poprawę ich sytuacji dochodowej, również wpływał wzrost skali produkcji $r=0,69$ i w równym stopniu liczba utrzymywanych krów/ha UR $r=0,69$. Natomiast w gospodarstwach z produkcją jaj dochód ulegał zmniejszeniu wraz ze wzrostem powierzchni UR (ha) $r=-0,28$; nakładów pracy ogółem (AWU) $r=-0,41$; kosztów bezpośrednich (zł) $r=-0,45$; kosztów całkowitych (zł) $r=-0,51$. Wzrost skali produkcji $r=0,70$ w największym stopniu miał wpływ na poprawę sytuacji dochodowej tych podmiotów.

Gospodarstwa konwencjonalne:

Podstawową kategorią ekonomiczną jest dochód z rodzinnego gospodarstwa rolnego, od którego zależy konkurencyjność gospodarstw (Tab. 2.). Wartość dochodu w odniesieniu do gospodarstwa zależy od kierunku produkcji i od wielkości gospodarstwa, ale nie daje pełnego obrazu sytuacji ekonomicznej rodziny rolniczej. Bardziej obiektywny obraz otrzymamy odnosząc

poziom dochodu na osobę pełnozatrudnioną w gospodarstwie rolnym. Z tego punktu widzenia najkorzystniej wypadają gospodarstwa owczarskie z województwa podlaskiego, w których dochód rolniczy netto na 1 osobę pełnozatrudnioną wyniósł 31 126,46 zł i był on zdecydowanie wyższy na Podkarpaciu.

Wyliczając minimalną skalę produkcji, pozwalającą uzyskać parytetowy dochód z działalności, odpowiadający dochodowi równemu średniej miesięcznej płacy krajowej osoby zatrudnionej poza rolnictwem, ustalono, że w województwie podkarpackim należało utrzymywać średnio około 98 matek stada podstawowego. Na uwagę zasługuje fakt, że główne przychody gospodarstw owczarskich to wszelkiego rodzaju płatności, stanowiące na Podlasiu aż 54,76% i nieco mniej, bo 44,42% na Podkarpaciu. W strukturze przychodów środki finansowe pozyskane z produkcji owczarskiej, to zaledwie 9,96% w województwie podlaskim i 15,27% w województwie podkarpackim.

Wyniki badań przeprowadzonych w gospodarstwach utrzymujących trzodę chlewną, pokazują, iż produkcja świń w analizowanym okresie była nieefektywna ekonomicznie niezależnie od regionu, w którym zlokalizowane były gospodarstwa. Analizowane obiekty uzyskały ujemny dochód z działalności w przeliczeniu na 1 lochę. Uzyskiwane przez gospodarstwa pozostałe przychody z innych działalności rolniczych pozwoliły uzyskać dodatni dochód z gospodarstwa rolnego. Dochód ten w przeliczeniu na 1 osobę pełnozatrudnioną był wyższy aniżeli roczny dochód osoby zatrudnionej poza rolnictwem.

W łącznej ocenie wskaźników ekonomicznych należy stwierdzić, że najlepiej prezentowały się gospodarstwa z bydłem mlecznym położone w rejonie Podlasia. Duże stada podstawowe z wysoką wydajnością generowały zyski pozwalające 5-krotnie przewyższyć dochody uzyskiwane z pracy poza rolnictwem. Dopłaty czy subwencje jakie uzyskiwali producenci mleka na Dolnym Śląsku były pomostem do niwelowania strat jakie przynosiła produkcja mleka. Niemniej jednak gospodarstwa jako całość były dochodowe osiągając bardzo wysoki parytet dochodu. Wynikało to z faktu, iż gospodarstwa te posiadały znacznie większą powierzchnię ogólną niż wymagała tego produkcja mleka.

Tab. 2. Wskaźniki efektywności ekonomicznej w badanych gospodarstwach.

Województwo	świnie		owce		krowy mleczne		
	PODK	PODL	PODK	PODL	PODK	PODL	DOL
Liczba zwierząt w gosp. (szt.)	11,75	30,37	59,12	127,2	37,64	42,36	42,1
Dochód z działalności z dopłatami /lochę/matkę/krowę	-737,1	-688,1	313,85	275,77	2625,16	5291,95	1239,21
Dochód rolniczy z gosp. rol./lochę /matkę/krowę	9029,40	9494,90	808,04	697,4	6123,58	7379,65	7421,80
Dochód rolniczy z gospodarstwa rolnego/ha UR	4910,20	5515,90	2044,48	1761,68	3444,66	7881,79	2953,01
Dochód rolniczy z gospodarstwa rolnego/AWU (tys. zł)	74,214	14,091	26,075	31,126	88,234	193,818	136,587

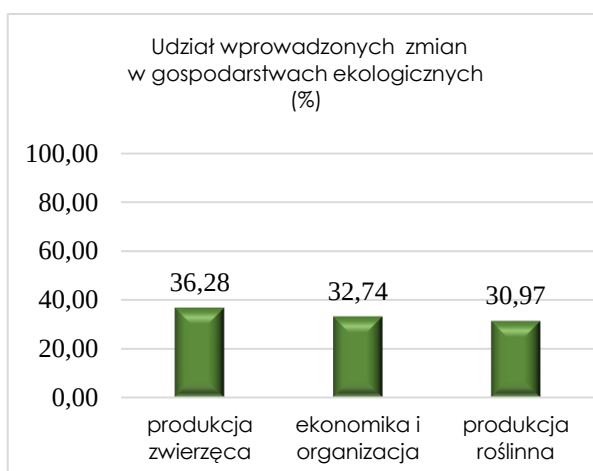
Zmiany technologiczne w gospodarstwach konwencjonalnych i ekologicznych:

Działalność innowacyjna jest wyznacznikiem nowoczesności oraz niezwykle ważnym czynnikiem rozwoju i modernizacji polskiego rolnictwa. W celu zwiększenia wydajności produkcji i obniżenia jej kosztów wiąże się ze zmianami, upowszechnianiem wszelkich nowości, udoskonaleniem stanów już istniejących, a wprowadzanie innowacji przyczynia się do rozwoju gospodarstw rolnych. Jest to jeden z możliwych sposobów dostosowawczych do warunków gospodarki rynkowej spowodowany chęcią uzyskania wyższych dochodów.

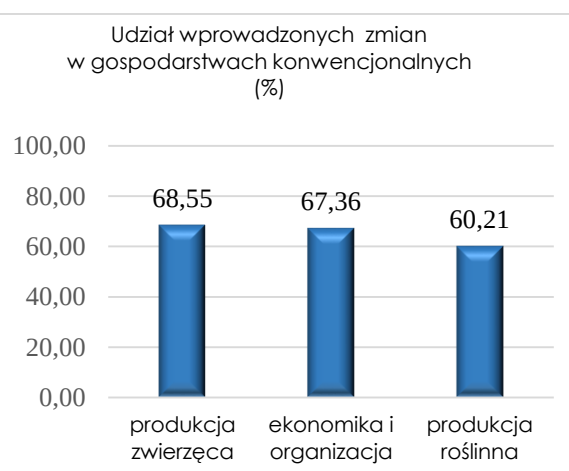
Przeprowadzone badania wykazały, że w gospodarstwach ekologicznych, które utrzymywały bydło mleczne oraz mięsne zmiany technologiczno-organizacyjne dotyczyły przede wszystkim działu produkcji zwierzęcej, ekonomiki i organizacji produkcji oraz działu produkcji roślinnej (Wykres 1.). W przypadku gospodarstw zlokalizowanych w województwie podlaskim odnotowano wyższy odsetek zmian ogółem wprowadzonych w gospodarstwach w porównaniu z województwem podkarpackim. W gospodarstwach konwencjonalnych wybranych do badań, utrzymujących owce, świnie oraz bydło mleczne zmiany technologiczno-organizacyjne, dotyczyły w głównej mierze działu produkcji roślinnej (owce, świnie), produkcji zwierzęcej (bydło) oraz ekonomiki i organizacji produkcji (świnie) – Wykres 2. W przypadku gospodarstw utrzymujących świnie odnotowano najwyższy odsetek zmian ogółem wprowadzonych w gospodarstwach.

Głównym źródłem informacji o możliwych do wprowadzenia zmianach technologicznych w gospodarstwach ekologicznych były ODR-y (w przypadku producentów mleka z woj. podkarpackiego we wszystkich badanych obiektach ODR-y stanowiły główne źródło informacji). Ponadto producenci ekologiczni najczęściej wskazywali, że źródłem pozyskiwania informacji jest uczestnictwo w różnego rodzaju szkoleniach i kursach. Jako źródło informacji najczęściej wymieniano także telewizję. Na kolejnych miejscach pojawiały się takie odpowiedzi jak prasa czy inni uczestnicy rynku (np. dostawcy środków do produkcji).

Wykres 1. Udział wprowadzonych zmian w gospodarstwach ekologicznych (%).



Wykres 2. Udział wprowadzonych zmian w gospodarstwach konwencjonalnych (%).



Źródło: badania dr inż. Anna Borecka

W przypadku gospodarstw konwencjonalnych 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 związanych z produkcją zwierzęcą dotyczył poprawy dobrostanu zwierząt oraz wprowadzenia zmian w żywieniu zwierząt poprzez zastosowanie nowych pasz treściwych i dodatków mineralnych. Powiększenie stada z własnej reprodukcji dotyczyło głównie produkcji owczarskiej. Przeprowadzenie inwestycji polegających m.in. na zmodernizowaniu parku maszynowego (14,7% – podlaskie) czy związanych z modernizacją pomieszczeń wykorzystywanych do produkcji rolnej (18,1% – podkarpackie) odnotowano w większych obszarowo gospodarstwach. W województwie podkarpackim średnio w okresie badań blisko 20% obiektów wprowadziło „rachunkowość”, natomiast w województwie

podlaskim nieznacznie mniej, tj. blisko 16%. Na uwagę zasługuje fakt, że objęci badaniami producenci jagnięciny w regionie Podlasia nie prowadzili w ogóle 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. Zaznaczyć należy, że w przypadku większych gospodarstw zmiany dokonujące się w nich przyjmują bardziej zintensyfikowane działania, a rolnicy rozumieją konieczność wprowadzania tych zmian i wykazują postawy proinnowacyjne.

Podsumowanie:

Reasumując, stwierdzono, że w gospodarstwach rolnych zarówno konwencjonalnych jak i ekologicznych, w strukturze wprowadzanych innowacji, większa ich część dotyczyła zmian w zakresie produkcji roślinnej, następnie w produkcji zwierzęcej oraz w zakresie ekonomiki i organizacji.

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. Według właścicieli badanych gospodarstw rolnych czynnikiem w głównej mierze hamującym rozwój gospodarstwa rolnego są zbyt niskie ceny zbytu produktów rolnych.

Tradycyjne postrzeganie rolnictwa i możliwości efektywnego nim zarządzania poprzez pryzmat ilości i jakości ziemi oraz zaangażowanego kapitału ulega stopniowej zmianie. Potencjał produkcyjny gospodarstwa, to przede wszystkim zasoby materialnych czynników produkcji (ziemi, siły roboczej, środków trwałych oraz obrotowych), jak również nabierające coraz większego znaczenia niematerialne czynniki produkcji, tj. wykształcenie, wiedza, umiejętności, kompetencje oraz inne czynniki, które pozytywnie wpływają na tworzenie indywidualnego, społecznego i gospodarczego dobrobytu dostępu do informacji rynkowej.

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

Zadanie 01-18-05-21

Analiza procesów molekularnych związanych z odkładaniem się tkanki tłuszczowej z zastosowaniem metod sekwencjonowania następnej generacji na przykładzie modelu świni domowa

Kierownik zadania: dr hab. Katarzyna Piórkowska, prof. IZ PIB

Celem badań jest poszukiwanie genetycznego podłoża procesów związanych z odkładaniem się tkanki tłuszczowej na modelu świni domowej. Umożliwi to dostarczenie nowych informacji pomocnych przy opracowaniu skutecznych narzędzi w walce z otyłością u ludzi. Otyłość, która

w ostatnich latach stanowi poważny problem społeczny i zdrowotny, sprzyja występowaniu także innych poważnych schorzeń cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca, nadciśnienie czy niewydolność narządowa. Wykorzystanie świni jako zwierzęcia modelowego świetnie sprawdza się w tego rodzaju badaniach ilościowych, ponieważ lepiej odzwierciedla procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie ludzkim, w porównaniu np. do modelu mysiego, ze względu na zbliżone proporcje ciała świni i człowieka. Wykorzystanie w proponowanym projekcie techniki ATAC-seq, która identyfikuje aktywne transkrypcyjnie regiony chromatyny, pozwoli zweryfikować hipotezę czy u podłoża tej choroby cywilizacyjnej leżą nowe, dotąd nieznane mechanizmy regulacji ekspresji genów. Dopełnieniem analizy ATAC-seq będzie ocena transkryptomiczna (RNA-seq) tkanki wątrobowej i tłuszczowej. Umożliwi to trafne wskazanie procesów metabolicznych wysoce istotnie powiązanych z regulacją odkładania się tkanki tłuszczowej.

Założenia metodyczne:

Identyfikacja aktywnych procesów molekularnych w tkance tłuszczowej oraz wątrobowej, związana z podwyższonym poziomem otyłości u świń, była utożsamiana z wykorzystaniem technik opartych na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS), w tym techniki RNA-seq oceniającej poziom poszczególnych transkryptów oraz techniki ATAC-seq identyfikującej transkrypcyjnie czynną chromatynę. Do badań wybrano loszki pochodzące z rasy złotnicka biała, charakteryzujące się skrajnie niskim oraz wysokim poziomem tkanki tłuszczowej w tuszy. Od osobników zostały pobrane próbki wątroby oraz tkanki tłuszczowej, z których kolejno wyizolowano RNA oraz przygotowano biblioteki cDNA.

Wyniki:

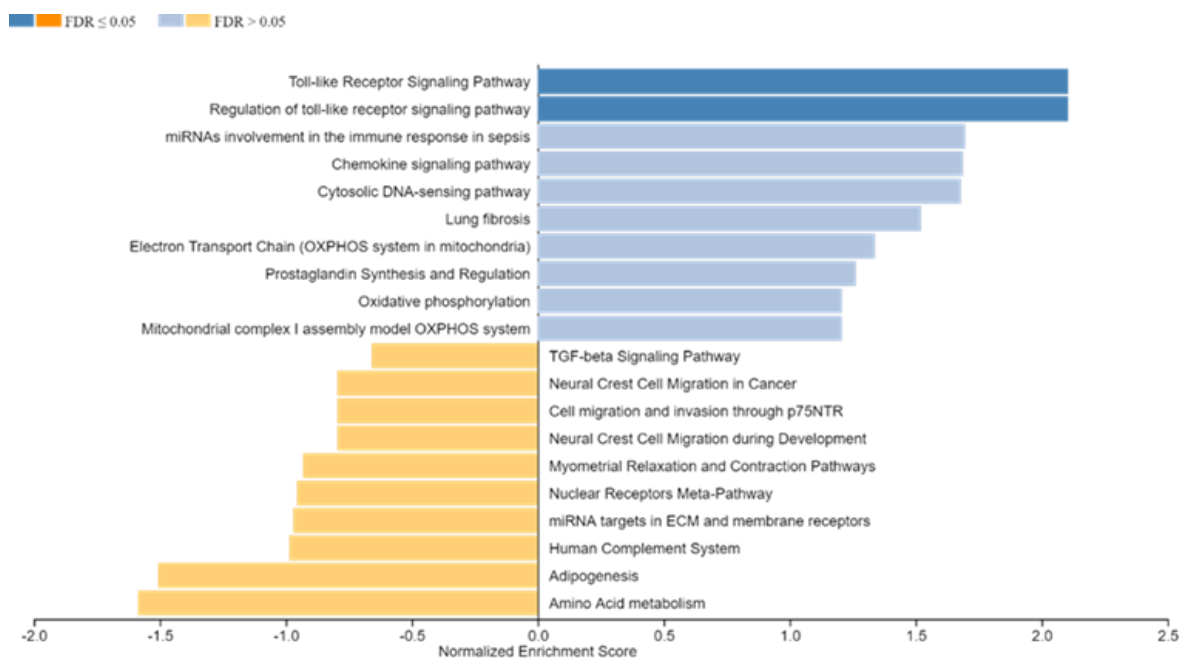
Wybrane do badań zwierzęta charakteryzowały się skrajnie różnymi ilościami tkanki tłuszczowej w tuszach. Poszczególne cechy zostały przedstawione w Tab. 1.

Tab. 1. Średnie parametry otyłości dla loszek wykorzystanych w badaniach.

Cecha	Badane loszki		
	chude	tłuste	%
	n = 8	n = 8	
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Przyrosty dzienne (g)	763,25 ± 103 ^a	642 ± 98 ^b	16
Dzienny pobór paszy (kg/day)	3,39 ± 0,27	3,62 ± 0,12	6
Wydajność rzeźna	74,20 ± 1,32 ^a	75,9 ± 1,5 ^b	2
Słonina ze skórą (kg)	1,64 ± 0,71 ^a	2,61 ± 0,51 ^b	37
Słonina szynki ze skórą (kg)	1,82 ± 0,64	2,53 ± 0,59 ^a	28
Tłuszcz otrzewnowy (kg)	0,46 ± 0,13 ^a	0,79 ± 0,21 ^b	42
grubość słoniny (cm)*	1,65 ± 0,44 ^a	2,24 ± 0,47	26
Słonina nad łopatką (cm)	2,30 ± 0,01 ^a	3,06 ± 0,01 ^b	25
Słonina w okolicy krzyża I *	1,59 ± 0,38 ^a	2,64 ± 0,40 ^b	29
Słonina w okolicy krzyża II	1,39 ± 0,38 ^a	2,30 ± 0,40 ^b	40
Słonina w okolicy krzyża III	1,85 ± 0,38 ^a	2,71 ± 0,40 ^b	32
Średnia grubość słoniny	1,76 ± 0,38 ^a	2,59 ± 0,40 ^b	31
Grubość słoniny w punkcie K *	1,54 ± 0,38	2,56 ± 0,39 ^a	40
Grubość słoniny w punkcie C1 *	1,54 ± 0,38	2,56 ± 0,39 ^a	40

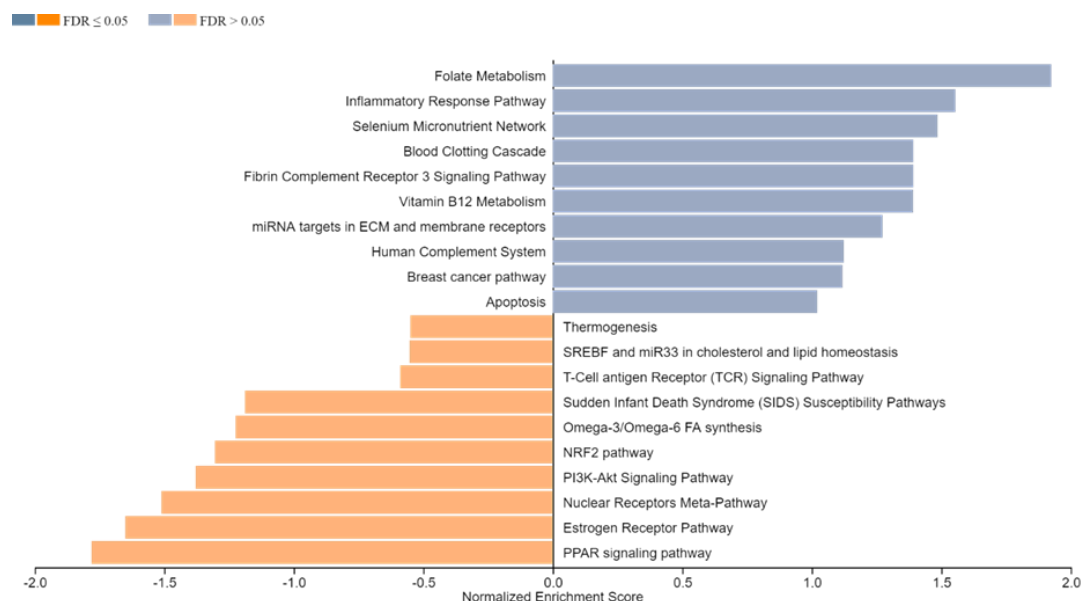
Po sekwencjonowaniu transkryptomu dla próbek wątroby oraz tłuszczu otrzymano średnio 62 276 008 surowych odczytów, a po filtracji 61 480 178. Średnio 71% zostało zmapowane do eksonów dla genomu Sscrofa11.1 GCA_000003025.6. Dla tkanki tłuszczowej zidentyfikowano 103 geny o podwyższonej ekspresji u osobników, charakteryzujących się wyższym poziomem tkanki tłuszczowej. Geny te wzbogacały procesy biologiczne, takie jak: metabolizm cholesterolu (*APOB*, *CES*, *LEP*), odpowiedź immunologiczna (*TBXA2R*, *CCL4*, *CXCL10*, *CXCL9*, *SPP1*), odpowiedź na obecność witamin (*SPP1*, *CXCL10*, *CD4*, *LEP*), odpowiedź na obecność cząstek tłuszczu (*CD4*, *CRYAB*, *TBXA2R*, *LEP*, *APOB*, *CXCL10*, *CXCL9*), odpowiedź na obecność hormonów (*LEP*, *APOB*, *SPP1*, *CD4*, *CRYAB*, *TBXA2R*, *RHOQ*) oraz ścieżkę sygnałową receptorów białek Toll (*SPP1*, *IRF7*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CCL4*).

Fig. 1. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych DEGs w tkance tłuszczowej dla osobników bardziej otyłych przeprowadzona z wykorzystaniem WebGestalt oraz testu Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).



Z kolei w tkance wątrobowej, podwyższoną ekspresją u osobników otyłych, charakteryzowały się geny wzbogacające takie ścieżki molekularne, jak ścieżka sygnałowa Wnt (*CELSR1*, *FZD*, *MYC*), sygnałowa nikotynowego receptora acetylocholino (*MYO6*, *BCHE*, *MYH10*), sygnałowa apoptozy (*FAS*, *ATF4*, *HSPA5*, *CRADD*), sygnałowa integryn (*FGA*, *FGB*, *FGG*), sygnałowa odpowiedzi immunologicznej (*COL1A1*, *COL1A2*, *LAMB2*) oraz związana metabolizmu witaminy B12 (*HBA1*, *HBB*, *CRP*).

Fig. 2. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych DEGs w tkance tłuszczowej dla osobników o niższym depozycie tłuszczowym przeprowadzona z wykorzystaniem WebGestalt oraz testu Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).



Natomiast geny, które wykazywały negatywnie skorelowaną z poziomem tkanki tłuszczowej ekspresję w tkance tłuszczowej wzbogacały takie procesy molekularne, jak: ścieżkę sygnałową adipocytokiny (*PCK1*), ścieżkę sygnałową PI3K-Akt (*PCK1* i *NGFR*), syntezę hormonów tarczycy (*DUOX2* i *DUOX1*), metabolizm hormonów (*HSD17B6*, *CYP11A1*, *HSD3B1*, *MME*, *RBP4*, *DUOX2*, *DUOX1*, *CRABP2*) oraz różnicowanie się komórek tłuszczowych (*ADIG*, *GDF10* i *NR4A3*). Z kolei w wątrobie, negatywnie skorelowane z poziomem otyłości geny były związane z takimi procesami molekularnymi, jak: termogeneza (*CPT1*), ścieżka sygnałowa PPAR (*PCK1*, *CPT1*, *PPARA*, *FADS2*), aktywacja SREBF i miRNA33, regulujących homeostazę cholesterolu i lipidów (*PPARA*, *HMGCR*), ścieżka sygnałowa adipocytokiny (*PCK1*, *CPT1*, *PPARA*), aktywacja lipidów (*PLCD1*, *ABHD3*, *CCL5*, *PLA1A*), wiązanie węglowodanów (*SLC2A8*, *MRC2*, *P4HA*, *FBXO6*, *ENPP1*, *FCN2*, *CD302*) oraz procesy kataboliczne lipidów (*PCK1*, *PLCD1*, *CPT1A*, *PPARA*, *ABHD3*, *ACCA2*, *PLA1A*, *NUDT19*, *HEXB*, *LPIN3*) (Fig. 1. i Fig. 2.).

W tkance tłuszczowej zidentyfikowano 5 lncRNA pozytywnie skorelowanych z poziomem otyłości (ENSSSCG000000051330, ENSSSCG000000048394, ENSSSCG000000047210, ENSSSCG000000047442, ENSSSCG000000048856) oraz 3 negatywnie skorelowane z odkładaniem tłuszczu (ENSSSCG00000003846, ENSSSCG000000047207, ENSSSCG000000041577), z czego jeden ENSSSCG000000048856 jest ortologiem ludzkiego lncRNA *MALAT1*, opisywanego wcześniej u ludzi pod kątem powiązań z otyłością. Jego dokładna funkcja w tej chorobie cywilizacyjnej nie jest znana, a badania przeprowadzone na myszach z wyłączeniem genu *MALAT1* również nie dały jednoznacznej odpowiedzi (Carter et al. 2018).

W tkance wątrobowej zidentyfikowano 6 pozytywnie skorelowanych z otyłością lncRNAs (ENSSSCG000000048748, ENSSSCG000000045401, ENSSSCG000000045200, ENSSSCG000000046841, ENSSSCG000000049824, ENSSSCG000000041461) oraz 10 negatywnie skorelowanych (ENSSSCG000000050178, ENSSSCG000000041743, ENSSSCG000000034990, ENSSSCG000000041596, ENSSSCG000000042151, ENSSSCG000000041875, ENSSSCG000000044931, ENSSSCG000000045025, ENSSSCG000000048719, ENSSSCG000000042140).

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu zadania:

Uzyskane wyniki pomogą w identyfikacji procesów związanych z regulacją ekspresji genów, czyli podkreślona zostanie rola długich niekodujących RNA (lncRNAs). Wyniki RNA-seq będą następnie konfrontowane z kolejnym, które zostaną uzyskane w 2021 roku z wykorzystaniem techniki ATACseq. To pozwoli odpowiedzieć na pytanie czy zidentyfikowane regiony promotowe w transkrypcyjnie czynnej chromatynie zawsze przekładają się na poziom transkryptu.

Zadanie 01-18-06-21

Wpływ poziomu żywienia i suplementacji witaminą D, na mechanizmy epigenetyczne i zmiany w poziomie ekspresji genów, powiązane ze zmianami anatomicznymi i układem odpornościowym zwierząt

Kierownik zadania: dr inż. Ewelina Semik-Gurgul

Zamierzeniem projektu jest analiza zmian epigenetycznych na poziomie metylomu oraz w poziomie ekspresji cząsteczek mikroRNA i związanych z nimi zmianami w poziomie ekspresji genów, które mogą wynikać z zastosowanej diety we wczesnym okresie życia i suplementacji witaminy D.

Wcześniejsze badania, przeprowadzone na grupie cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych, dowiodły, że żywienie modeluje przebieg zmian anatomicznych gruczołu mlekowego. Pomiar anatomiczne potwierdziły, że u cieliczek żywionych do woli wystąpił wzrost masy całego gruczołu mlekowego, tkanki mięsowej i żółtej w porównaniu do tych cech określonych u cieliczek żywionych restrykcyjnie. Na tej podstawie stwierdzono, że mechanizm regulacji rozwoju gruczołu mlekowego jest modulowany poziomem żywienia. Dlatego też, w proponowanych badaniach przyjęto hipotezę, iż poziom żywienia we wczesnym okresie życia modeluje zmiany na poziomie epigenetycznym i w poziomie ekspresji genów, prowadząc do zmian anatomicznych gruczołu mlekowego cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych.

Istnieje silna zależność między systemem witaminy D a mechanizmami epigenetycznymi. System witaminy D jest z jednej strony regulowany przez mechanizmy epigenetyczne, a z drugiej strony bierze udział w regulacji zdarzeń epigenetycznych. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów jest precyzyjnym mechanizmem, a jej deregulacja może prowadzić do stanów patologicznych. Wpływ witaminy D na prawidłowe funkcjonowanie epigenomu podkreśla centralną rolę tego hormonu w fizjologii. Jednym z najbardziej podstawowych pytań dotyczących kontroli ekspresji genów jest sposób rozpoznawania, ustalania i usuwania znaków epigenetycznych. Regulowanie epigenetycznych zdarzeń może być dalszym mechanizmem, dzięki któremu 1,25-D3 może zapobiegać i opóźniać rozwój nowotworów i chorób przewlekłych. Konieczne jest lepsze zrozumienie wpływu witaminy D na epigenom. Dlatego w przedstawionych badaniach przyjęto kolejną hipotezę, że suplementacja witaminą D oddziałuje na modyfikacje epigenetyczne i zmiany w poziomie ekspresji genów, prowadząc do poprawy statusu zdrowotnego zwierząt.

Połączenie wyników porównawczej analizy profilu metylacji DNA w skali genomu z badaniami różnicowej ekspresji na poziomie transkryptomu i zmianami w profilu mikroRNA może być interesujące pod względem ustalenia udziału określonych grup genów w molekularnych mechanizmach prowadzących do obserwowanych zmian w układzie odpornościowym i anatomicznym, wynikających z zastosowanej diety w okresie wczesnego wychowu i suplementacji witaminą D. W aspekcie zwierząt gospodarczych proponowane badania, jak dotąd nie były

realizowane na świecie. W przypadku zwierząt hodowlanych taka wiedza może przynieść wymierne korzyści ekonomiczne dzięki zastosowaniu metody odżywiania, stymulującego osiągnięcie prawidłowego rozwoju anatomicznego i sprzyjającego prawidłowemu funkcjonowaniu układu immunologicznego.

W pierwszym roku badań, z 52 prób biologicznych (17 próbek parenchymy, 18 próbek tkanki tłuszczowej oraz 17 próbek wątroby), pobranych od cieliczek rasy polska holsztyńsko-fryzjska, wyizolowano całkowite RNA oraz RNA wraz z frakcją mikroRNA z wykorzystaniem komercyjnych zestawów PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) i Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) (wskaźnik integralności RNA – RIN w zakresie od 6,1 do 9,3) oraz z 48 prób mięśnia i płuca świń otrzymujących różną formę witaminy D w diecie. Dodatkowo przeprowadzono izolację 52 prób DNA (Sherlock AX - A&A Biotechnology) z materiału biologicznego pobranego od wspomnianych cieliczek. Do przygotowania 48 bibliotek typu miRNA-seq z wybranych próbek parenchymy, tkanki tłuszczowej oraz wątroby wykorzystano kit NEBNext Multiplex Small RNA Prep Set for Illumina (Set1), zgodnie z zaleceniami producenta. Z kolei do sporządzenia 48 bibliotek do analizy poziomu metylacji DNA zastosowano komercyjny zestaw Ovation® RRBS Methyl-Seq System 1–16 (NuGen). Przygotowano również 48 bibliotek cDNA z mięśnia oraz płuca pobranych od świń otrzymujących różną formę witaminy D w diecie, z wykorzystaniem zestawu QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina firmy Lexogen. Ocenę jakościową uzyskanych bibliotek cDNA, miRNA i RRBS przeprowadzono z użyciem aparatu TapeStation, natomiast ocenę ilościową wykonano metodą fluorymetryczną na aparacie Qubit. Biblioteki miRNA i RRBS doprowadzono do koncentracji 10 nM i połączono w pule, w zależności od sekwencji przyłączonego indeksu i typu bibliotek. Przygotowane biblioteki cDNA zsekwencjonowano na aparacie Nextseq 550 (Illumina), stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 75 nukleotydów. Uzyskane dane zostaną następnie poddane analizie bioinformatycznej.

Zadanie 01-18-07-11

Genetyka molekularna jako narzędzie w nowoczesnej hodowli zwierząt – opracowanie i wdrożenie nowych metod badawczych

Kierownik zadania: dr Agata Piestrzyńska-Kajtoch

Metody biologii molekularnej stanowią doskonałe narzędzia diagnostyczne, weryfikacyjne i potwierdzające, dzięki czemu mają szerokie zastosowanie w wielu różnych dziedzinach badań. Zapotrzebowanie na szybkie, wiarygodne testy oparte na metodach biologii molekularnej ciągle rośnie. Ich opracowanie wymaga badań, a komercjalizacja walidacji.

Celem głównym zadania jest opracowanie, walidacja i wdrożenie nowych metod laboratoryjnych z zakresu biologii molekularnej, które umożliwią także badania populacyjne polskich populacji zwierząt oraz poszerzą ofertę Instytutu Zootechniki PIB dla hodowców zwierząt, inspektoratów i lekarzy weterynarii, producentów pasz i żywności oraz przemysłu.

W ramach zadania planowane jest opracowanie kilku metod, tj.: rozróżnianie gatunkowe mięsa i jego produktów pochodzących od dzika (*Sus scrofa*), świni domowej (*Sus scrofa domestica*), wykrywanie krętków *Borrelia* sp. u zwierząt gospodarskich i towarzyszących, identyfikacja mieszańców lama x alpaka, identyfikacja genetyczna markerów powiązanych z płcią koniowatych, identyfikacja markerów umaszczenia podstawowego i wariantów umaszczenia koniowatych i innych gatunków zwierząt, identyfikacja markerów chorób spichrzeniowych koniowatych, genotypowanie/analiza polimorfizmu genu PRNP jeleniowatych oraz metody analizy kariotypu komórek adherentnych.

Efektom zadania będą nowe metody laboratoryjne w ofercie Instytutu Zootechniki PIB oraz praca doktorska.

Stosowane w projekcie metody badawcze są z zakresu biologii molekularnej i zależą od danego celu szczegółowego. Materiał do badań został częściowo skolekcjonowany. Materiał genetyczny pozyskiwany był głównie metodami izolacji opartymi o kolumnienki. W projekcie wykorzystano lub planuje się wykorzystać takie techniki, jak: PCR, sekwencjonowanie, RFLP, genotypowanie na płytach OpenArray, dyskryminacja *alleli*, analiza markerów mikrosatelitarnych, analiza ekspresji genów, wyprowadzanie linii komórkowych, hodowle komórkowe.

Przeprowadzono próbę rozróżnienia świni od dzika na podstawie polimorfizmu SNP w genie *NR6A1* (748 nt w sekwencji AB248749) przy użyciu techniki Real Time PCR ze specyficznymi sondami. Zsekwencjonowano fragment genu *NR6A1* zawierającego miejsce, gdzie położony jest SNP (Ryc. 1.). Wybrano geny i regiony mtDNA, które wg różnych źródeł literaturowych i baz (np. Ensembl, NCBI) różnią się u świń i dzików. Zaprojektowano około 70 różnych zestawów sond TaqMan MGB i starterów do wybranych genów, a następnie zamówiono płytki OpenArray do przesiewowego testowania populacji w zakresie wybranych markerów. Rozpoczęto analizę przesiewową genomu świń i dzików na podstawie wybranych markerów.

Pozyskano pasożyty od koni, psów oraz kotów (Fot. 2.). Materiał opisano i skatalogowano, wyizolowano DNA z kleszczy. Wykonano test metody badawczej detekcji fragmentu genu *FLA* w układzie nested PCR. Produkty reakcji poddawane były elektroforezie agarozowej celem detekcji produktów amplifikacji PCR-in oraz PCR-out. Wykazano obecność niespecyficznych produktów w żelu agarozowym. W kolejnym etapie prac badawczych zostanie przeprowadzona optymalizacja reakcji PCR i weryfikacja metody badawczej.

Wytypowano fragmenty genomu konia, które będą podlegały testom molekularnym w kierunku badania płci. Zaprojektowano i przetestowano sondę molekularną, specyficzną do fragmentu genu *SRY*. Weryfikacja wyników z danymi rodowodowymi i wynikami w *locus* LEX3 wykazała nieprawidłowe wyniki reakcji real-time PCR. Sekwencja zaprojektowanej sondy będzie weryfikowana z informacjami dostępnymi w bazach danych genomu konia, następnie sonda zostanie przeprojektowana.

W zakresie umaszczenia koni zebrano kolekcję materiału biologicznego oraz zebrano i zweryfikowano informację o umaszczeniu dla poszczególnych prób. Wytypowano próby do badań umaszczenia podstawowego. Pobrano materiał oraz wytypowano zwierzęta z kolekcji materiału od owiec różniących się umaszczeniem następujących ras: merynos polski w starym typie, wrzosówka, owca romanowska, polska owca górska barwna, merynos barwny, czarnogłówek. DNA wyizolowano. Zaprojektowano startery do kodującego regionu genu *MC1R*, dopracowano warunki reakcji i zsekwencjonowano region kodujący i fragment regionu promotora u wybranych zwierząt (Ryc. 2.). Wyniki są w trakcie analizy. Zaprojektowano metody do analizy sekwencji genów *ASIP* i *TYRP*.

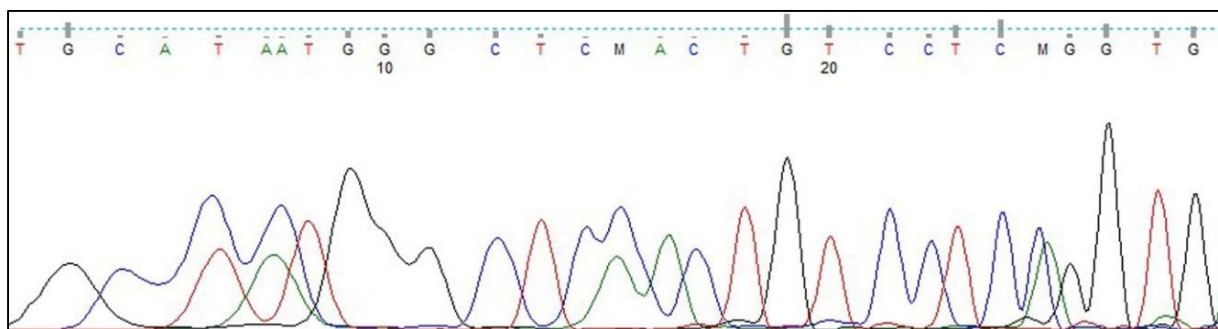
Wytypowano fragmenty genomu konia, które będą podlegały testom molekularnym pod względem diagnostyki chorób spichrzeniowych MH oraz PSSM. Sprawdzono obowiązujące w tym zakresie patenty. Na podstawie danych literaturowych określono rasy, u których występowały lub stwierdzono wybrane jednostki chorobowe. Przejrzano kolekcję materiału biologicznego w kierunku wytypowania ras i osobników do badań przesiewowych. Zaprojektowano startery do analizy sekwencji wybranych genów. Wykorzystano materiał pochodzący z kolekcji materiału LGM od jeleni i saren. Pozyskano materiał od łosi dzięki współpracy z PIWeł PIB Puławy. Zakupiono startery i dopracowano reakcję PCR do analizy genu *PRNP* u saren i jeleni. Metoda nie zadziałała u łosi. Zamówiono startery specyficzne wyłącznie dla łosi. Metoda specyficzna dla łosi jest w trakcie testowania. Fragment genu *PRNP*, obejmujący niemal cały region kodujący, został zsekwencjonowany u około 100 jeleni i kilkunastu saren. Znalezione miejsca polimorficzne różniące oba gatunki jak i zmienne w obrębie danego gatunku, w tym

mutacje ciche i niesynonimiczne: 63C>T, 234G>A, 292A>G (292Thr>Ala), 408C>T, 460C>T (460Arg >Cys), 676C>G (676Gln>Glu) (Ryc. 4.). Niektóre występowały tylko u pojedynczych osobników. Niektóre ze znalezionych mutacji były raportowane w innych, wcześniejszych badaniach. Badania są kontynuowane na większej grupie zwierząt. Testowaniu podlegać też będą metody izolacji DNA z różnego rodzaju materiału.

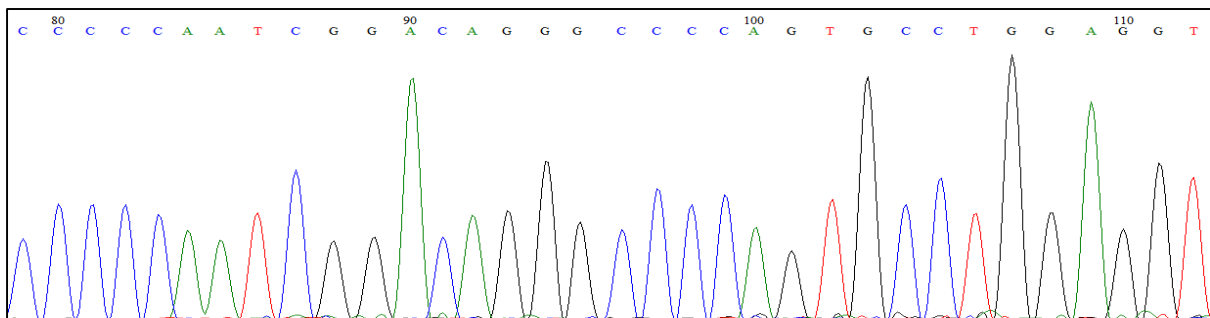
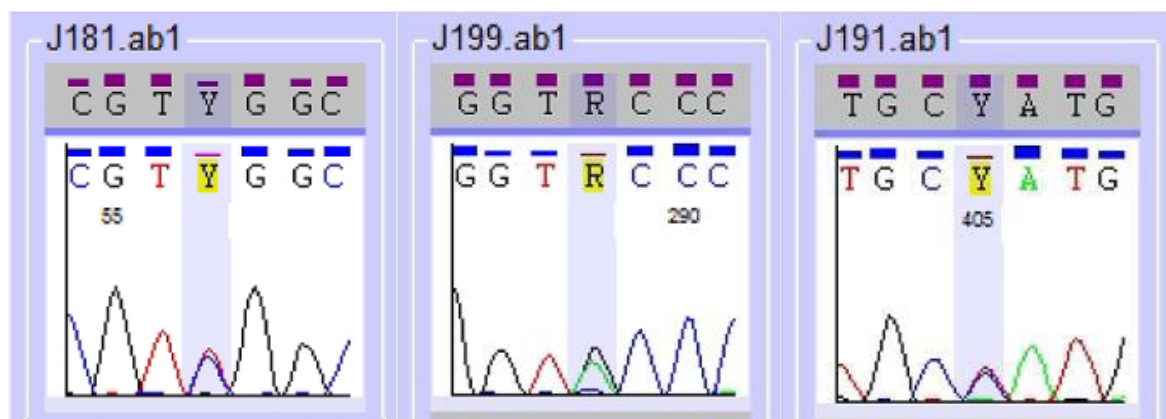
Wynikiem pierwszego etapu zadania w 2020 roku było zrealizowanie wyznaczonego celu w postaci izolacji oraz bio-bankowania w temperaturze ciekłego azotu następujących linii komórkowych, które zostaną przeznaczone do dalszych badań: 6 linii pierwotnych komórek fibroblastów skóry konia domowego, 4 linii pierwotnych komórek fibroblastów skóry świni domowej, 2 linii fibroblastów skóry królika domowego pobrane z okolicy skóry uszu, 3 pierwotnych linii sarkoidów końskich (Fot. 2.), otrzymanych jako materiał odpadowy po zabiegu chirurgicznego usunięcia guza. Wszystkie otrzymane powyżej linie komórkowe zostały otrzymane na zasadzie migracji komórek ze skrawek tkanki. Ponadto, dokonano izolacji 2 linii komórkowych chrząstki stawowej konia domowego ze stawu pęciny, izolowanej analogicznie jak powyżej, z dodatkowym, początkowym etapem pozyskiwania skalpelem warstwy chrząstki stawowej. Komórki zawieszinowe to komórki krwi oraz pozostałe komórki linii hematopoetycznej, które w naturalnych warunkach organizmu, ze względu na swoją ruchliwość, ewolucyjnie utraciły konieczność wiązania się z podłożem dla uniknięcia procesów apoptozy. Do komórek tych zaliczamy tzw. PBMC czyli monojądrzaste komórki krwi obwodowej. Należą do nich limfocyty B, T, NK oraz monocyty. Stanowią one licznie znaczącą większość komórek wykorzystywanych do analiz prawidłowości kariotypu w Instytucie Zootechniki PIB. Wyizolowano 4 linie PBMC krwi obwodowej konia domowego.

Wykonano analizy mtDNA dla 80 alpak i lam. Do dalszych analiz zrezygnowano ze sprawdzania cytochromu B, z uwagi na bardzo małą zmienność badanych osobników w tym obszarze. W zamian wprowadzono gen *DBY*. Otrzymane sekwencje po odpowiednim przygotowaniu sklastrowano i przygotowano filogramy (Ryc. 4.). Po analizie mtDNA wywnioskowano, że analiza ta nie pozwala w żaden sposób odróżnić hybrydy w przypadku, gdy matka jest alpaką, ojciec lamą, a urodzonym dzieckiem będzie samica. Być może ten problem pozwoli rozstrzygnąć GBS. Trwają dalsze analizy mtDNA i *DBY* u większej liczby zwierząt. Zostanie również przeprowadzona analiza GBS po ostatecznym wyselekcjonowaniu odpowiednich osobników.

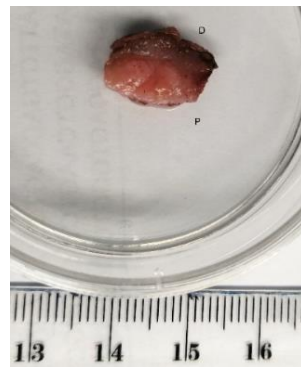
Ryc. 1. Fragment sekwencji genu *NR6A1* u dzika.



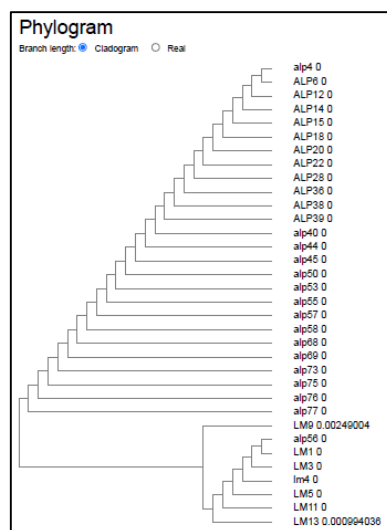
Fot. 1. Kleszcz pobrany od kota.

Ryc. 2. Zsekwencjonowany monomorficzny fragment genu *MC1R* u owiec. Widok z programu BioEdit.Ryc. 3. Wybrane miejsca polimorficzne genu *PRNP* jeleniowatych, od lewej: 63C>T, 292A>G i 408C>T. Analiza w programie Variant Reporter.

Fot. 2. Fragment łagodnej neoplazji skóry konia wraz z tkanką otaczającą przed przystąpieniem do izolacji komórek.
D - część dystalna, P - część proksymalna fragmentu skóry konia domowego.



Ryc. 4. Filogram wybranych lam i alp na podstawie zmienności genu DBY.



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

Cel zadania:

- opracowanie i walidacja metod jakościowej oraz ilościowej identyfikacji owadów wykorzystywanych jako źródło białka w żywieniu zwierząt monogastrycznych, w szczególności mącznika młynarka,
- opracowanie i walidacja metod jakościowej oraz ilościowej identyfikacji jak najszerszej grupy owadów bez podziału na konkretne gatunki.

Opracowanie testu identyfikacji jakościowej:

- owadów bez względu na podział gatunkowy,
- mącznika młynarka.

Opracowanie testu obejmowało:

- wybór/modyfikację metody izolacji DNA skutecznej dla każdej postaci biologicznej owada (larwa, postać dorosła) i niezależnej od potencjalnego przetworzenia (surowe owady, suszone, przetworzone mechanicznie/baryczno-termicznie),
- opracowanie reakcji real-time PCR specyficznej dla danego gatunku/grupy gatunków owadów,
- walidację testu.

Ekstrakcja DNA:

Metoda izolacji była dostosowana do rodzaju materiału tkanki. Do wyekstrahowania DNA owadów użyto zestawu Sherlock (A&A Biotechnology), ulepszanego poprzez zastosowanie dodatku DTT. Ponadto zastosowano dwie własne modyfikacje:

- wydłużając czas ogrzewania do 4 h, wortexując intensywnie,
- w pierwszym etapie izolacji wytrącano DNA buforem TE poddając dodatkowo wirowania w odpowiednich obrotach. Dopiero z tak przygotowanego przesącza izolowano DNA dodatkowo wydłużając czas ogrzewania i intensywnie wortexując.

Zawartość otrzymanego DNA określono stosując Nanodrop 2000. Czystość izolatów DNA określono na podstawie stosunku absorbancji 260/280.

Reakcja qPCR:

Otrzymane DNA poddano reakcji Real-Time PCR przy użyciu StepOne Plus Thermal Cycler Software v2.3 (Applied Biosystems). Zastosowano startery i sondy tamra. Wszystkie analizy wykonano w trzykrotnych powtórzeniach dla niezależnych izolacji. Dla wszystkich próbek określono wartość cyklu granicznego (C_T) skorelowaną z obecnością i pierwotną ilością materiału biologicznego o DNA kompatybilnym z wykorzystywanymi w teście starterami i sondą. Dla cyklu granicznego wyznaczono również odchylenie standardowe bezwzględne (SD), oraz względne (RSD%) w celu sprawdzenia powtarzalności otrzymanego wyniku z niezależnych izolacji DNA.

Walidacja testów:

Specyficzność molekularna metody

Specyfikę molekularną metody określono poprzez analizę *in silico* starterów przy zastosowaniu narzędzia Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Następnie, specyficzność starterów sprawdzono doświadczalnie stosując DNA wyekstrahowane z owadów (w postaci dorosłej i larw), roślin oraz mięsa.

Liniowość oraz czułość: granica wykrywalności (LOD):

Dla sprawdzenia czułości metody wyznaczono granicę wykrywalności oraz oznaczalności, natomiast dla sprawdzenia liniowości testu skonstruowano krzywą standardową złożoną z analizowanych rozcieńczeń i wyznaczono jej współczynnik nachylenia oraz współczynnik korelacji (R^2) i wydajność PCR (%) wg wzoru: $E = [10 \cdot (-1 / \text{nachylenie}) - 1]$. Informacja o liniowości testu jest niezbędna do określenia potencjalnej możliwości zastosowania testu do oznaczeń ilościowych.

Zastosowanie metody do próbek komercyjnych:

Dla pełniejszego zobrazowania metody analizowano próbki komercyjnych karm dla gadów mogące zawierać w swoim składzie owady.

Analiza ilościowa:

Dla przeprowadzenia analizy ilościowej wyznaczono (oprócz liniowości opisanej wcześniej) odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe oraz błąd pomiaru dla powtórzeń izolacji wykonanych z różnych próbek wyjściowych (wykonanych z różnych osobników) oznaczanego owada.

Syntetyczny opis wyników badania:

Ekstrakcja DNA

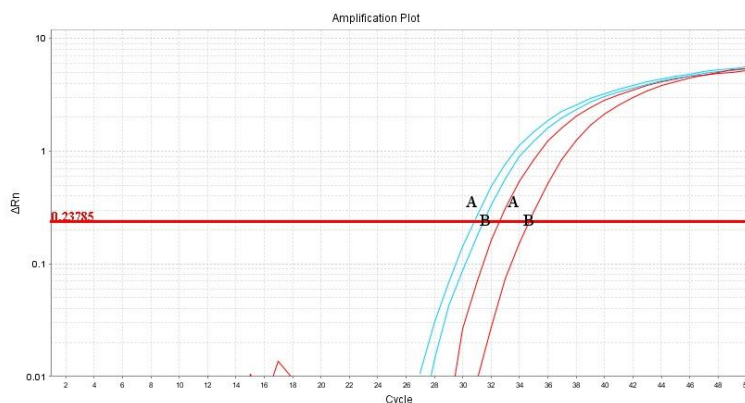
Ilość oraz jakość DNA uzyskane obiema metodami były na podobnym poziomie. Stężenie i jakość DNA wahały się od 11,16 do 848,43 ng/μl przy absorbancji między 1,35 i 1,9 dla pierwszej modyfikacji oraz 10,563-329,543 ng/μl (A260/280 między 1,42, a 1,93) dla drugiej modyfikacji.

Izolacja DNA z owadów jest zazwyczaj kłopotliwa ze względu na obecność pancerzyków chitynowych. Zwiększenie masy próbki analitycznej, użycie DTT, długiego ogrzewania połączonego z wydłużonym worteksowaniem czy izolacja DNA z wytlukanego za pomocą TE pozwoliło na otrzymanie izolatów DNA na tyle, by reakcja PCR była możliwa. Próbki przetworzone miały korzystniejsze parametry, natomiast ich surowe odpowiedniki, głównie larwy mącznika, miały dużą zawartość białka, dlatego testowano izolacje DNA przy zastosowaniu wytlukiwania DNA za pomocą TE. Pomimo niedogodności otrzymane izolaty DNA pozwoliły dla wszystkich próbek otrzymać produkt reakcji PCR. Ponadto, dla powtórzeń izolacji otrzymano produkty PCR w przybliżonym cyklu, co sugeruje, że zastosowana metoda izolacji DNA jest powtarzalna. O powtarzalności testu świadczy niewielkie odchylenie standardowe i względne odchylenie standardowe. Wielkości te zostały omówione w dalszej części sprawozdania.

Przykładowy test identyfikacji gatunkowej mącznika młynarka:

Przykładową analizę próbki przedstawiono na Rys. 1. Dla KN nie otrzymano produktu reakcji.

Rys 1. Wykres dla stężenia podstawowego. Wykres dla rozcieńczenia 100x.



A, B – powtórzenia izolacji

Analiza jakościowa. Walidacja. Specyficzność i czułość metody, granica wykrywalności i oznaczalności:

Analiza *in silico* wykazała, że proponowane startery są specyficzne gatunkowo tylko dla mączników. Specyficzność sprawdzona doświadczalnie wykazała reakcje pozytywne dla DNA mączników, a dla wszystkich pozostałych gatunków brak produktu reakcji lub produkt w bardzo późnych cyklach – po 40. cyklu. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość C_T z trzech niezależnych izolacji próbek, SD między nimi oraz RSD (Tab. 1.).

Analiza czułości wykazała reakcje pozytywne dla wszystkich rozcieńczeń DNA mącznika młynarka między 0,025-25 ng. Odchylenie standardowe wynosiło między 1,16-4,92%, co stanowiło względną niepewność pomiaru poniżej 12,46%.

Krzywa standardowa wygenerowana z otrzymanych wyników qPCR dla rozcieńczeń DNA mącznika miała wzór: $C_T = -3,374 \log c + 33,407$, przy współczynniku korelacji $R^2 = 1$ i efektywności $E = 97,888$, co wskazywało, że zastosowany test jest liniowy w całym zakresie badania. Granicę oznaczalności (najmniejszą ilość produktu możliwą do oznaczenia ilościowego) ustalono na poziomie 0,025 ng, co odpowiada stężeniu 0,1%. Granice wykrywalności ustalono na tym samym poziomie, ponieważ nie wykonywano badań dla niższych stężeń.

Test identyfikacji gatunkowej owadów (18S rRNA)

Analiza jakościowa. Walidacja. Specyficzność i czułość metody, granica wykrywalności i oznaczalności:

Analiza *in silico* wykazała, że proponowane startery są specyficzne gatunkowo dla owadów. Specyficzność sprawdzona doświadczalnie wykazała reakcję pozytywną dla DNA owadów. Z reakcji krzyżowych dla DNA ptaków, ssaków oraz mieszanki paszowej bez udziału składnika zwierzęcego nie otrzymano produktu reakcji. Wyniki przedstawiono jako średnią wartości C_T z trzech niezależnych izolacji próbek, dla wyników dodatnich wyliczono SD oraz RSD (Tab. 1.).

Analiza próbek komercyjnych. Zastosowanie metody do próbek komercyjnych:

Dla próbek zawierających mączniki otrzymano pozytywne wyniki reakcji między 24. do 36. cyklem (dla stężeń podstawowych), natomiast dla próbek niezawierających mączników nie otrzymano produktu reakcji lub reakcja zaszła w późniejszym cyklu (np. suszone świerszcze). W próbkach pozytywnych szybkość zachodzenia reakcji nie była zawsze skorelowana z deklarowaną przez producenta zawartością owadów, stąd wniosek, że rzeczywista zawartość nie zawsze odpowiadała zawartości deklarowanej na opakowaniu. Próbki komercyjne są oznaczone symbolem P.

Analogiczne badania wykonane w celu oznaczenia wszystkich owadów wskazują na reakcje pozytywne między 17., a 34. cyklem dla stężeń podstawowych, natomiast dla próbek niezawierających owadów reakcja nie zachodzi lub zachodzi po 38. cyklu (Tab. 2.).

Analiza ilościowa mącznika młynarka:

Wyniki dla próbek wykonanych z różnych próbek wyjściowych (tzn. różnych osobników) przedstawia Tab. 3. Błąd pomiaru dla poszczególnych próbek wynosił około 30%.

Analiza ilościowa oznaczania owadów:

Z Tab. 2. wynika, że C_T dla próbek 100% dla rozcieńczeń podstawowych wahało się między 18. a 33. cyklem, w zależności od gatunku owada. Przy tak dużej różnicy sygnału błąd pomiaru ilościowego jest bardzo wysoki, dlatego nie kontynuowano badań w tym kierunku.

Podsumowanie:

- Metoda ekstrakcji DNA zestawem Sherlock z DTT oraz wydłużonym czasem ogrzewania/wortkowania ma zastosowanie do szerokiego spektrum próbek zawierających w swoim składzie owady, niezależnie od ich biologicznej postaci i sposobu przetworzenia.
- Prezentowane testy pozwalają na szybkie i skuteczne oznaczenie gatunkowe owadów oraz osobno mącznika młynarka na podstawie mtDNA.
- Parametry metody wskazują na wysoką czułość testu, zakres działania dla zawartości mącznika 0,01-100%, specyficzność biologiczną oraz liniowość.
- Dla oznaczeń ilościowych błąd pomiaru wynosi około 30%.
- Test jest skuteczny do produktów przetworzonych i może być stosowany do monitorowania karmy.

Tab. 1. Wyniki reakcji dla oznaczania mącznika młynarka z trzech niezależnych izolacji DNA.

Rodzaj próbki	Skład próbki	Rozcieńczenia podstawowe			Rozcieńczenia 100x	Interpretacja wyniku
		C_T średnia	SD	RSD %	C_T średnia	
S	świerszcz kubański	b.r			b.r	-
S	drewnojad	b.r			b.r	-
S	karaczan argentyński	b.r			b.r	-
S	mącznik młynarek	38,88	0,34	0,88%	41,16	+
S	szarańcza wędrowna	b.r			b.r	-
S	świerszcz bananowy	b.r			b.r	-
P	suszone larwy mącznika	26,01	1,45	5,58%	30,84	+
P	larwy mącznika 20%, suszone świerszcze 10%	29,86	2,26	7,56%	33,43	+
P	suszone larwy mącznika	31,79	0,15	0,46%	35,50	+
P	larwy mącznika 4%	32,40	0,12	0,38%	38,25	+
P	mączniki 10%	26,85	0,43	1,59%	33,42	+
P	suszone świerszcze	39,24	0,68	1,72%	b.r	-
P	muchówki/skorupiaki 1	b.r			b.r	-
P	świerszcze 0,3%, mączniki 0,2%	35,68	0,33	0,91%	40,41	+
P	skorupiaki/owadów brak	b.r			b.r	-
S	mącznik	37,76	1,59	4,21%	40,52	+
S	drewnojad	41,65	0,65	1,53%	b.r	-
S	świerszcz kubański	45,45		2,20%	b.r	-
S	szarańcza wędrowna	43,60		2,29%	b.r	-
S	karaczan madagaskarski	41,97		2,38%	b.r	-
P	brak owadów/skorupiaki	b.r			b.r	-

P	suszone larwy mącznika	26,66	0,68	2,56%	33,99	+
P	muchówki/skorupiaki 2	38,37	0,28	0,72%	b.r	-
P	brak owadów/skorupiaki, skł. roślinne				b.r	-
S	larwa mącznika	33,83	2,05	6,05%	38,24	+
S	larwa drewnojada				b.r	-

+ zawartość mącznika młynarka; - brak zawartości mącznika młynarka; S – próbki surowe, P – przetworzone (próbki komercyjnie dostępnej karmy dla zwierząt).

Tab. 2. Wyniki reakcji dla oznaczania owadów z trzech niezależnych izolacji DNA.

Rodzaj próbki	Skład próbki	Rozcieńczenia podstawowe			Rozcieńczenia 100x	Interpretacja wyniku
		średnia c_T	SD	RSD %	średnia c_T	
S	świerszcz kubański	32,10	3,40	8,95%	36,18	+
S	drewnojad	22,15	0,82	3,70%	26,05	+
S	karaczan argentyński	47,75	2,68	8,08%	26,48	+
S	mącznik młynarek	32,44	1,14	3,21%	35,97	+
S	szarańcza wędrowną	26,55	0,22	0,82%	29,28	+
S	świerszcz bananowy	28,45	0,25	0,89%	31,74	+
P	suszone larwy mącznika	20,34	4,17	20,52%	22,58	+
P	larwy mącznika 20%, suszone świerszcze 10%	25,36	3,37	13,30%	25,37	+
P	suszone larwy mącznika	27,46	5,49	19,99%	27,07	+
P	larwy mącznika 4%	27,91	4,97	17,81%	28,38	+
P	mączniki 10%	24,34	6,21	20,05%	24,98	+
P	suszone świerszcze	32,12	1,43	4,46%	34,83	+
P	muchówki/skorupiaki 1	31,08	2,57	6,89%	38,56	+
P	świerszcze 0,3%, mączniki 0,2%	29,68	2,93	9,86%	32,52	+
P	skorupiaki/brak owadów				b.r	+
S	mącznik	31,42	1,10	3,50%	32,99	+
S	drewnojad	27,29	6,49	23,79%	27,35	+
S	świerszcz kubański	29,44	0,93	3,17%	32,26	+
S	szarańcza duża	24,47	5,72	23,39%	25,33	+
S	karaczan madagaskarski	24,77	7,03	28,39%	26,11	+
P	brak owadów/skorupiaki				41,79	-
P	suszone larwy mącznika	18,91	1,02	5,41%	23,90	+
P	muchówki/skorupiaki 2	30,40	1,06	3,48%	35,80	+
P	brak owadów/skorupiaki, skł. roślinne				44,95	-
S	larwa mącznika	27,08	1,02	3,76%	31,27	+
S	larwa drewnojada	23,32	0,29	1,23%	25,79	+

Tab. 3. Parametry oznaczania ilościowego DNA mącznika młynarka.

Zawartość mącznika młynarka	Oznaczona doświadczalnie ilość	Średnie stężenie	SD	RSD%	Błąd pomiaru
100%	112,79	120,52	8,73	7,24%	20,52%
100%	118,80				
100%	129,99				
10%	13,21	13,26	1,16	8,74%	32,62%
10%	12,13				
10%	14,44				
1%	1,23	1,28	0,05	3,65%	27,51%
1%	1,33				
1%	1,26				
0.1%	0,14	0,14	0,02	13,43%	35,07%
0.1%	0,11				
0.1%	0,15				

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 projektu 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 odgrywa znaczącą rolę w regulacji poziomu ekspresji genów, jako jeden ze stosunkowo niedawno odkrytych i mało poznanych mechanizmów epigenetycznych. Efektem przeprowadzonych prac będzie informacja o poziomie metylacji RNA oraz o różnicach w poziomie ekspresji wytypowanych genów, wykorzystana do typowania szlaków molekularnych charakterystycznych dla fizjologii badanych tkanek i komórek. Co więcej, w przypadku zwierząt hodowlanych będą dodatkowym źródłem wiedzy dla analiz genetycznych zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów ekspresji genomu i procesów, w wyniku których kształtowane są dziedziczne cechy użytkowe.

W ramach 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. 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. 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). 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 analizy poziomu metylacji RNA. W tym celu wykorzystano komercyjny zestaw EpiNext 5-mC RNA Bisulfite-Seq Kit (EpiGentek). Mimo zastosowania izolatów RNA uzyskanych różnymi metodami izolacji, dodatkowego doczyszczania RNA na kulkach magnetycznych RNAClean XP (Beckman Coulter) oraz zastosowania modyfikacji metodycznych, z dwunastu planowanych bibliotek udało się uzyskać pięć. Podjęto decyzję o przygotowaniu dodatkowych bibliotek typu RRBS oraz miRNA-seq w celu określenia tkankowo-specyficznych wzorów metylacji DNA oraz charakterystyki profilu mikroRNA tkanek. Wykorzystano komercyjny zestaw Ovation® RRBS Methyl-Seq System 1–16 (NuGen) oraz NEBNext Multiplex Small RNA Prep Set for Illumina (Set1). Sekwencjonowanie bibliotek cDNA oraz 5-mC RNA przeprowadzono na urządzeniu HiSeq 4000 (Illumina), stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 150 nukleotydów. Biblioteki typu RRBS i miRNA-seq 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. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono zależność pomiędzy poziomem metylacji miejsc CpG a profilem ekspresji genów w oparciu o różnice w poziomie metylacji 1330 miejsc metylacyjnych i zmian w poziomie ekspresji 809 genów pomiędzy tymi samymi próbami tkanki płuca, wątroby i serca. Aby uwzględnić różnice w sposobie regulacji ekspresji genów przez metylację w zależności od poziomu ekspresji genu, stawkę genów podzielono na geny o wysokiej, średniej i niskiej ekspresji na podstawie analizy rozkładu i odchylenia standardowego ekspresji wszystkich genów (>1 znormalizowany odczyt sekwencyjny). Geny o wysokiej ekspresji reprezentowały III kwartył (Q3) obserwacji, natomiast geny o niskiej ekspresji I kwartył (Q1). Dodatkowo, uwzględniono także podział miejsc CpG w zależności od ich lokalizacji w sekwencji genu, tj. w sekwencjach kodujących białko (tzw. „ciele genu”) i w promotorze genu (TSS1500), jako że metylacja w tych częściach genu może powodować przeciwną regulację ekspresji genu. Dla wszystkich analizowanych genów przeprowadzono analizę korelacji zmian w poziomie metylacji poszczególnych miejsc CpG ze zmianami poziomu ekspresji genów, w których dane miejsce metylacyjne jest zlokalizowane. Normalność rozkładu zbioru danych oceniono w oparciu o test Shapiro-Wilk'a. Dla wszystkich danych określono współczynniki korelacji Pearson'a i Spearman'a oraz ich istotność (Tab. 1.). Przeprowadzone analizy wykazały znikomy związek zmian w poziomie metylacji ciała genu i zmian poziomu ekspresji tego genu. Taki brak zależności był obserwowany niezależnie od bazowego poziomu ekspresji genu. Natomiast wyraźną negatywną zależność zaobserwowano pomiędzy poziomem metylacji sekwencji promotorowych genu a poziomem jego ekspresji w większości par tkanek i na różnych poziomach ekspresji (Tab. 1.). Wynik ten sugeruje złożone zależności pomiędzy metylacją i ekspresją genów, które są wypadkową ich poziomu ekspresji, lokalizacji miejsca metylowanego w sekwencji genu oraz potencjalnie innych czynników regulacyjnych i epigenetycznych. Niemniej jednak, otrzymane wyniki potwierdzają istnienie negatywnej zależności pomiędzy metylacją sekwencji promotorowych i ekspresją genów w genomie.

Tab. 1. Zależność pomiędzy poziomem metylacji miejsc CpG a profilem ekspresji genów pomiędzy tymi samymi próbkami tkanki płuca, wątroby i serca.

	Liczba sekwencji CpG	Liczba genów	Średnia różnica w poziomie metylacji (%)	Średnia różnica w poziomie ekspresji genu	Korelacja Pearson'a	Istotność Pearson'a	Korelacja Spearman'a	Istotność Spearman'a
Porównanie dla tkanek płuca i serca								
Hypermetylacja	1330	809	33.675	-621.684	-0.032	0.247	-0.019	0.478
Hypometylacja	909	580	-32.794	82.563	-0.065	0.050	0.001	0.970
Hypermetylacja w „ciele genu”	1203	735	33.770	-406.094	-0.024	0.410	-0.006	0.829
Hypometylacja w „ciele genu”	802	521	-32.647	71.934	-0.034	0.337	-0.002	0.958
Hypermetylacja promotora	59	40	33.238	-261.603	0.017	0.898	-0.085	0.524
Hypometylacja promotora	54	37	-32.692	235.793	-0.469	< .001	-0.011	0.935
Porównanie dla tkanek płuca i wątroby								
Hypermetylacja	1154	669	38.682	-4019.657	-0.091	0.002	-0.127	< .001
Hypometylacja	820	509	-34.150	152.707	-0.074	0.033	-0.080	0.021
Hypermetylacja w „ciele genu”	1052	606	38.633	-4064.042	-0.089	0.004	-0.117	< .001
Hypometylacja w „ciele genu”	748	472	-34.025	145.511	-0.085	0.020	-0.068	0.062
Hypermetylacja promotora	63	45	38.776	-5078.151	-0.251	0.047	-0.213	0.094
Hypometylacja promotora	47	20	-36.825	234.763	0.165	0.267	-0.178	0.231
Porównanie dla tkanek serca i wątroby								
Hypermetylacja	1425	801	39.509	-2154.829	-0.049	0.066	-0.136	< .001
Hypometylacja	1445	812	-35.613	160.432	-0.007	0.781	-0.056	0.032
Hypermetylacja w „ciele genu”	1260	710	39.648	-2249.631	-0.045	0.107	-0.131	< .001
Hypometylacja w „ciele genu”	1326	749	-35.743	164.654	-0.009	0.731	-0.068	0.013
Hypermetylacja promotora	110	70	38.405	-2085.889	-0.192	0.044	-0.258	0.007
Promoter hypo	60	36	-34.249	187.732	0.141	0.283	0.137	0.296

Przeprowadzono również walidację wyników sekwencjonowania bibliotek RRBS i cDNA. Do potwierdzenia danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek RRBS, wytypowano cztery regiony wykazujące różnicową metylację DNA pomiędzy analizowanymi tkankami, znajdujące się w sąsiedztwie lub w obrębie *loci*: *TSPAN8*, *A1BG*, *ERRF1* oraz *PNN*. W celu przeprowadzenia ilościowej analizy metylacji poszczególnych miejsc CpG, wyselekcjonowanych z wykorzystaniem techniki RRBS, fragmenty DNA obejmujące te miejsca poddano klonowaniu w wektorze plazmidowym, a poszczególne klony poddano sekwencjonowaniu metodą Sanger. Walidację poziomu ekspresji wybranych genów (*TSPAN8*, *A1BG*, *ERRF1* oraz *PNN*) przeprowadzono metodą real-time qPCR. Oznaczenie poziomu ekspresji przeprowadzono na aparacie QuantStudio Real-Time PCR. Dla wszystkich danych określono współczynniki korelacji Pearson'a i Spearman'a oraz ich istotność. Różnice w poziomie metylacji sekwencji CpG określone metodą klonowania molekularnego w odniesieniu do metody RRBS wynosiły od 0.00% do 25.70%, z zachowaniem kierunku i tendencji obserwowanych zmian dla wszystkich analizowanych regionów (Tab. 2.). Współczynnik korelacji Pearson'a i Spearman'a pomiędzy tymi wartościami był dodatni, i wyniósł odpowiednio 0.965 oraz 0.954. Analiza techniką real-time qPCR, w odniesieniu do wyników uzyskanych z sekwencjonowania NGS, potwierdziła podwyższony poziom ekspresji w tkankach wątroby w odniesieniu do tkanek serca i płuca genów *TSPAN8*, *ERRF1*

i A1BG oraz obniżony w przypadku transkryptu PNN w tkankach wątroby w odniesieniu do tkanki serca (Tab. 3.). Współczynnik korelacji pomiędzy tymi wartościami również był dodatni, i wyniósł odpowiednio 0.942 i 0.819.

Tab. 2. Procent metylacji sekwencji CpG w obrębie czterech analizowanych regionów, określony na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek RRBS oraz z zastosowaniem metody klonowania molekularnego (s – serce, p – płuco, w – wątroba).

Gen	TSPAN8			A1BG		
Metoda	NGS (%)	Klonowanie molek. (%)	Różnica (%)	NGS (%)	Klonowanie molek. (%)	Różnica (%)
Grupa s	78,03	84,13	6,09	70,37	69,17	1,20
Grupa p	23,81	22,50	1,31	75,35	81,25	5,90
Grupa w	-	-	-	24,87	33,21	8,34
p vs s	54,23	61,63	7,40	-	-	-
p vs w	-	-	-	50,48	48,04	2,44
s vs w	-	-	-	45,50	35,96	9,54
Gen	ERRFI1			PNN		
Metoda	NGS (%)	Klonowanie molek. (%)	Różnica (%)	NGS (%)	Klonowanie molek. (%)	Różnica (%)
Grupa s	97,81	99,17	1,36	95,86	98,13	2,26
Grupa p	73,93	76,25	2,32	-	-	-
Grupa w	41,83	39,44	2,39	48,75	50,00	1,25
p vs s	-	-	-	-	-	-
p vs w	32,10	36,81	4,71	-	-	-
s vs w	55,98	59,72	3,75	47,11	48,13	1,01

Tab. 3. Dane liczbowe przedstawiające względną ilość transkryptów analizowanych genów, określonych na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek cDNA oraz obliczonych na podstawie wyników reakcji real-time qPCR (s – serce, p – płuco, w – wątroba).

Gen	TSPAN8		A1BG		A1BG	
Metoda	RNA-seq	Real-Time PCR	RNA-seq	Real-Time PCR	RNA-seq	Real-Time PCR
Grupa s	65,10	4,72	460,27	55,79	-	-
Grupa p	3605,33	7,48	-	-	82,24	2,79
Grupa w	-	-	43464,56	3607,57	83201,65	3607,57
Gen	ERRFI1		ERRFI1		PNN	
Metoda	RNA-seq	Real-Time PCR	RNA-seq	Real-Time PCR	RNA-seq	Real-Time PCR
Grupa s	74,36	2,16	-	-	602,32	6,41
Grupa p	-	-	689,44	9,61	-	-
Grupa w	1861,08	31,80	3545,87	31,80	380,36	1,17

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 Oczkiewicz, prof. IZ PIB

Celem prowadzonych badań była ocena wpływu suplementacji witaminą D na status zdrowotny oraz procesy biologiczne zachodzące w różnych tkankach u szczurów poprzez analizę transkryptomyczną.

Założenia metodyczne:

Materiał doświadczalny. Badania na zwierzętach obejmowały dwa doświadczenia – na szczurach młodych i dojrzałych.

Doświadczenie I.

Materiał zwierzęcy stanowiły szczury laboratoryjne szczepu Wistar (samce i samice) w wieku początkowym ok. 12 miesięcy. Doświadczenie zostało przeprowadzone na 36 szczurach, po 12 szt. w grupie (po 4 szczury w klatce), w pomieszczeniach z kontrolowanym mikroklimatem. Zwierzęta były żywione do woli izobiałkowymi i izoenergetycznymi granulowanymi paszami, które różniły się jedynie zawartością witaminy D (0, 1000, 5000 IU/kg). Doświadczenie trwało 90 dni. Zwierzęta były ważone indywidualnie na początku doświadczenia, co 2 tygodnie, i w ostatnim dniu. Po zakończeniu doświadczenia wszystkie zwierzęta z każdej grupy zostały uśpione za pomocą dwutlenku węgla. Pobrane zostały próbki krwi oraz wybrane tkanki do badań genomicznych i biochemicznych (mięśnie ud, tkanka tłuszczowa, krew, wątroba, serce, tkanka kostna [kość udowa], szpik kostny [kość udowa], naczynia wieńcowe, fragmenty mózgu).

Doświadczenie II.

Materiał zwierzęcy stanowiły szczury laboratoryjne szczepu Wistar (samce i samice) w wieku początkowym ok. 5-6 tygodni (zaraz po odsadzeniu). Doświadczenie zostało przeprowadzone na 36 szczurach, po 12 szt. w grupie (po 6 szczurów w klatce). Układ grup, czas trwania doświadczenia, oznaczane parametry oraz sposób gromadzenia próbek materiału biologicznego – jak w doświadczeniu I.

Wyniki prac badawczych:

Trzymiesięczna suplementacja witaminą D u szczurów młodych doprowadziła do uzyskania trzech grup reprezentujących deficytowy, niewystarczający i wystarczający poziom witaminy D we krwi. U szczurów dojrzałych, pomimo stosowania tych samych dawek, co u szczurów młodych, zakresy te obejmowały poziom niewystarczający (wg *Endocrine Society*), poziom wystarczający oraz poziom bardzo wysoki. Wyniki analizy masy ciała i poszczególnych narządów, parametrów hematologicznych i biochemicznych krwi, a także ocena histopatologiczna nerki i wątroby oraz analizy wytrzymałości kości wskazują na niewielki efekt suplementacji witaminą D, jedynie po zastosowaniu dawki podwyższonej, na te cechy.

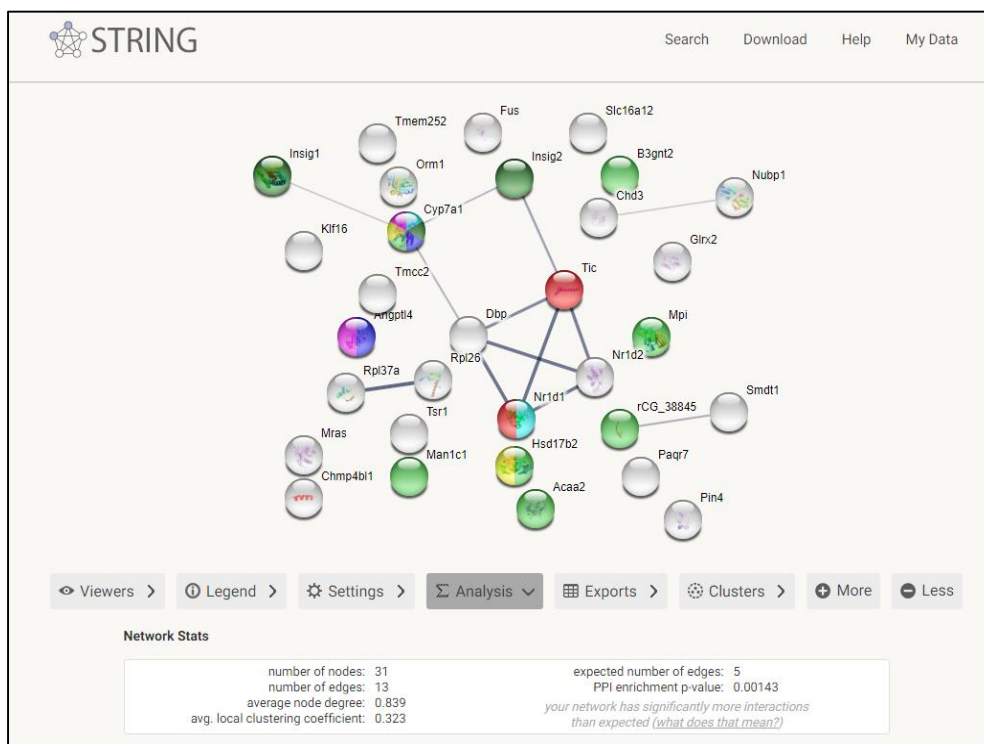
Analiza RNA-seq:

Analiza ta nie wykazała istotnych ($p\text{-adjusted} < 0.05$) różnic w poziomie ekspresji genów w mózgu pomiędzy badanymi grupami osobników. W mięśni u osobników młodych zidentyfikowano jedynie 6 genów o istotnie różnym poziomie ekspresji (geny: *Timp3*, *Klf5*, *Tet3*, *Cygb*, *Clstn1*, *Atp16l1*) pomiędzy osobnikami niesuplementowanymi a osobnikami otrzymującymi w paszy 5000 U/kg, natomiast nie stwierdzono różnic pomiędzy osobnikami otrzymującymi standardową ilość witaminy D (1000) kg a pozostałymi grupami. W wątrobie u osobników młodych nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic, natomiast u osobników dorosłych zidentyfikowano 35 genów o istotnie różnej ekspresji, ale tylko u samców. U samic nie stwierdzono istotnych zmian.

Analiza funkcjonalna:

Dalszej analizie funkcjonalnej poddano 35 genów zidentyfikowanych w porównaniu próbek pochodzących z wątroby od dojrzałych szczurów płci męskiej (grupa bez suplementacji vs grupa 5000 U/kg). Analiza z zastosowaniem programu STRING (<https://string-db.org/>) (Fig. 1.) wykazała szereg konkretnych procesów biologicznych, w które zaangażowane są geny o zmienionej ekspresji pod wpływem witaminy D.

Fig. 1. Wyniki analizy funkcjonalnej genów o zróżnicowanej ekspresji z zastosowaniem programu STRING.



Wśród najważniejszych procesów i szlaków regulowanych przez witaminę D w wątrobie wymienić należy: GO:0070857 regulation of bile acid biosynthetic proces (kolor turkusowy), GO:0008203 cholesterol metabolic proces (kolor ciemno zielony), rno01100 Metabolic pathways (kolor jasnozielony), rno04710, Circadian rhythm (kolor czerwony), rno04979 Cholesterol metabolism (kolor niebieski), rno00140 Steroid hormone biosynthesis (kolor żółty), rno03320 PPAR

signaling pathway (kolor różowy). Z kolei geny, dla których odnotowano najwyższe zmiany ekspresji pod wpływem wysokiej dawki witaminy D3 to: Paqr7, Hsd17b2, nDbp, Arntl, Insig1, Tmem 252, Mpi, Smdt1. Następnie, wykonaliśmy analizy genów cyp2r1, vdr oraz cyp27b1 w tkankach (mózg, wątroba, tłuszcz, nerka) u wszystkich osobników z eksperymentów, w celu sprawdzenia efektu suplementacji (Fig. 2., 3.), wieku oraz płci (Fig. 4., 5.). U szczurów młodych zaobserwowaliśmy niewielki efekt dawki witaminy D, jedynie istotne statystycznie różnice odnotowaliśmy u samic w nerce i wątrobie dla genu cyp27b1 oraz u samców w nerce dla genu cyp2r1. Dużo silniejsze efekty zaobserwowaliśmy po porównaniu samców do samic – gen vdr ulegał około 10-krotnie silniejszej ekspresji u samic niż u samców. Z kolei gen cyp27b1 ulegał silniejszej ekspresji u samców. Efekty suplementacji u szczurów dojrzałych wydają się nieco silniejsze niż u szczurów młodych. U samców szczurów dojrzałych, otrzymujących 5000 U/kg witaminy D w paszy, obserwowaliśmy spadek ekspresji genu vdr w nerce, wzrost w wątrobie oraz spadek genu cyp27b1 w wątrobie i tłuszczu. Jeśli chodzi o efekt płci, to odnotowaliśmy podobne zależności, jak w przypadku młodych szczurów: w wątrobie, gen vdr ulegał znacznie silniejszej ekspresji u samic niż u samców. Podobny trend był obecny w przypadku cyp2r1 we wszystkich badanych tkankach, natomiast ekspresja cyp27b1 była nieco wyższa u samców w nerce (różnice nieistotne statystycznie po podziale na grupy suplementacyjne).

Fig. 2. Wpływ suplementacji witaminą D na ekspresję genów w różnych tkankach szczurów młodych, z podziałem na płcie oraz grupy suplementacyjne.

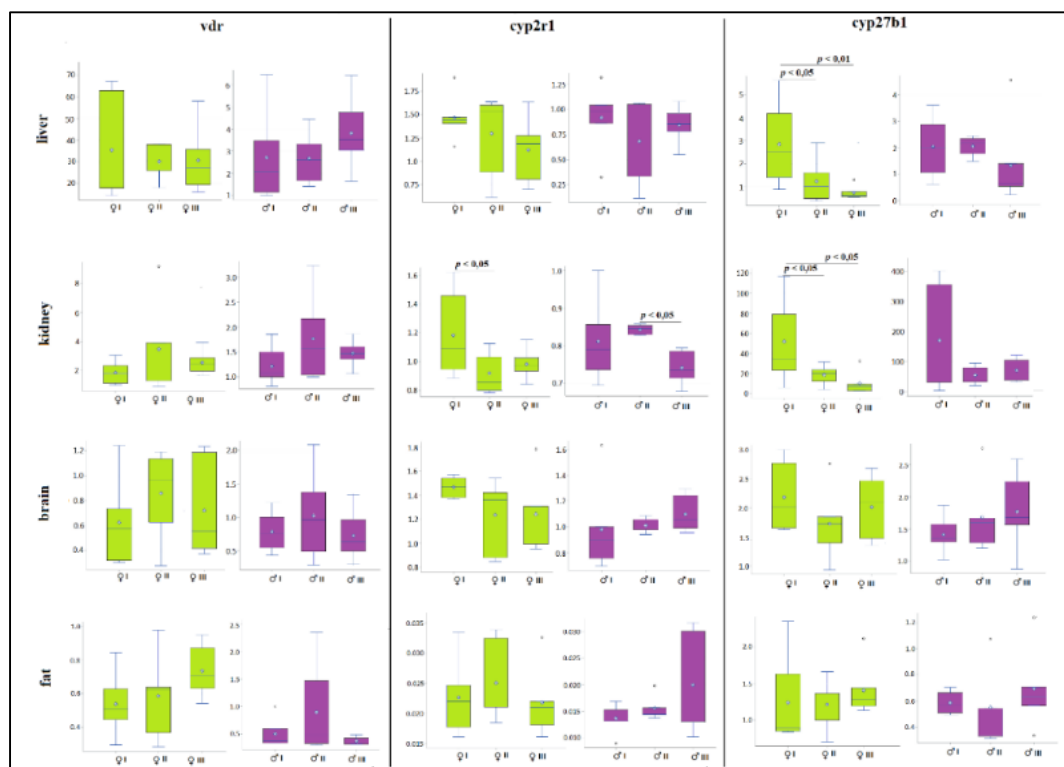


Fig. 3. Wpływ suplementacji witaminą D na ekspresję genów w różnych tkankach szczurów dojrzałych, z podziałem na płeć oraz grupy suplementacyjne.



Fig. 4. Wpływ płci na ekspresję genów w różnych tkankach szczurów młodych, z podziałem na grupy suplementacyjne.

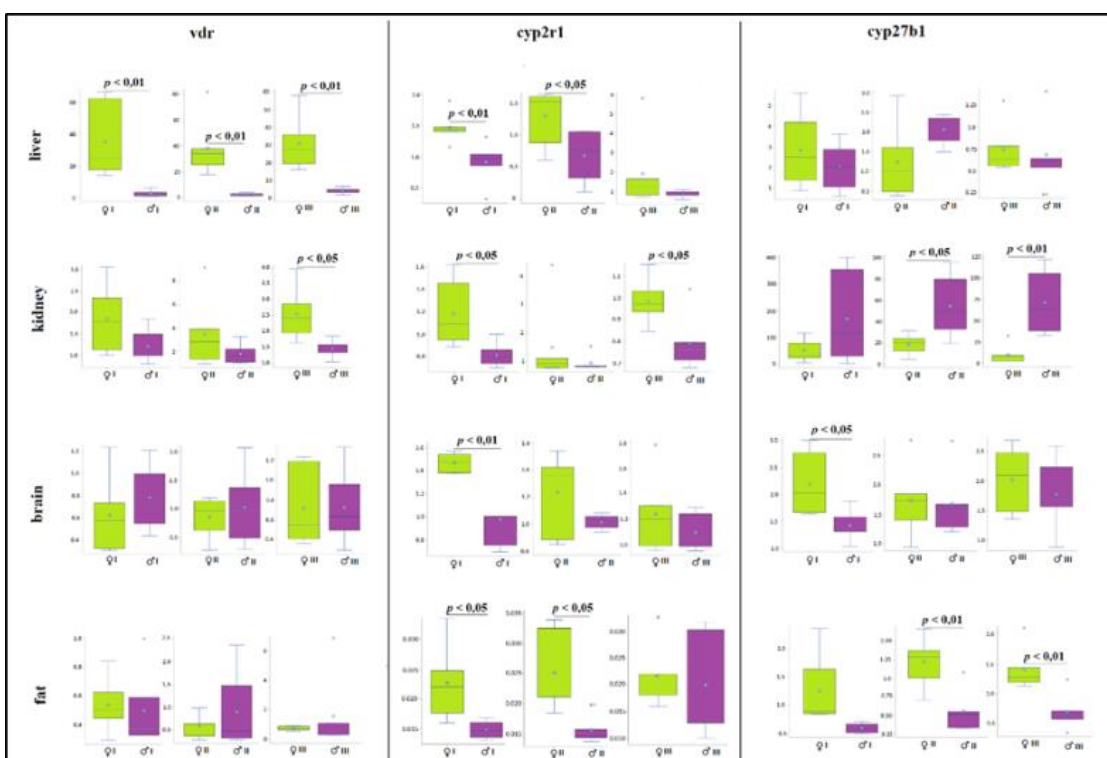
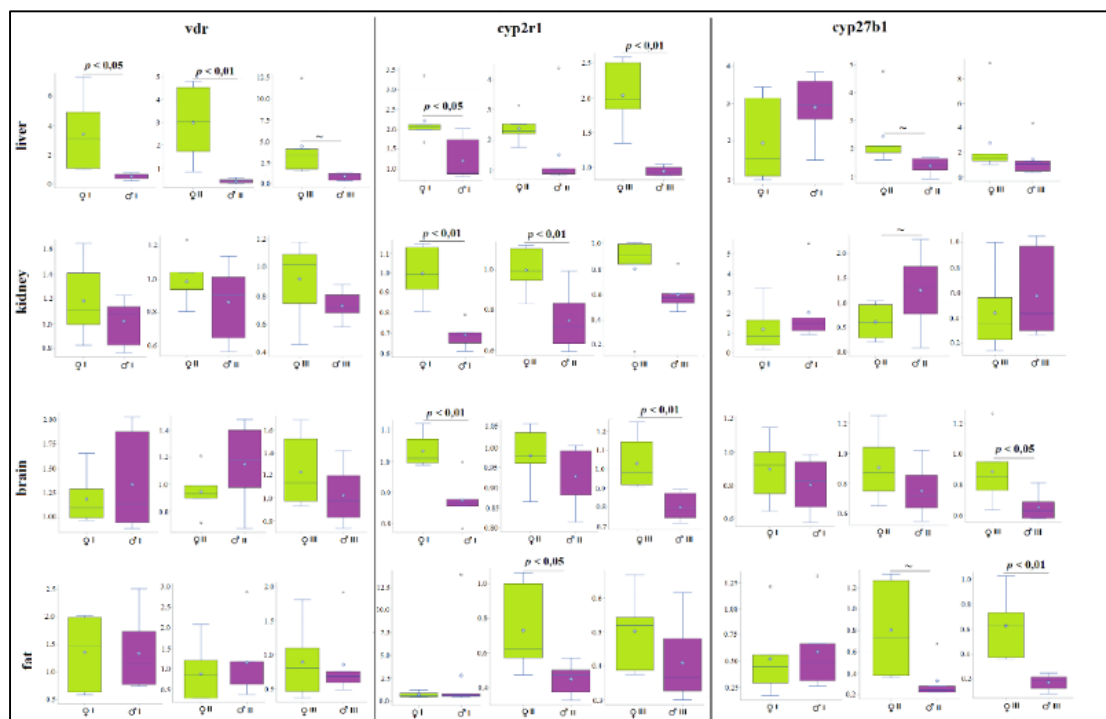


Fig. 5. Wpływ płci na ekspresję genów w różnych tkankach szczurów dojrzałych, z podziałem na grupy suplementacyjne.



Podsumowanie:

Przeprowadzone wyniki sugerują niewielki wpływ trzymiesięcznej suplementacji witaminą D na ogólne cechy zdrowotności. Brak suplementacji nie wywołał zmian we wzroście czy masie ciała zwierząt. Niewielki wpływ suplementacji na masę serca zaobserwowano u szczurów młodych. Badania biochemiczne, hematologiczne oraz histopatologiczne sugerują jedynie niewielki wpływ suplementacji na pojedyncze parametry. Jeśli chodzi o wytrzymałość kości, to suplementacja przyczyniła się do zwiększenia siły elastyczności kości, jednak nie do średniej gęstości kości (mbp). Wpływ suplementacji witaminą D na te parametry można określić jako niewielki/umiarkowany. Na uwagę zasługuje fakt odmiennego poziomu ekspresji genów, związanych z metabolizmem witaminy D i receptora witaminy D u samic i samców oraz zidentyfikowanie w analizie RNA-seq genów o zróżnicowanej ekspresji jedynie w wątrobie u samców dojrzałych.

Uzyskane wyniki pokazują, że:

- osobniki młode mają większe zapotrzebowanie na witaminę D niż osobniki dojrzałe (tylko u młodych brak suplementacji wywołał deficyt),
- trzymiesięczna suplementacja jest niewystarczająca, aby zaobserwować wyraźne zmiany na poziomie fenotypowym,
- w wątrobie samców dojrzałych suplementacja wysoką dawką witaminy D wywołuje zmiany ekspresji genów związanych z biosyntezą cholesterolu i kwasów żółciowych, biosyntezą tłuszczu oraz rytmem okołodobowym,

- efekty suplementacji witaminą D na poziomie ekspresji genów są różne u osobników męskich i żeńskich, co wskazuje na konieczność uwzględniania tego czynnika w badaniach i zaleceniach odnośnie suplementacji,
- efekty suplementacji witaminą D na poziomie ekspresji genów są widoczne jedynie przy bardzo wysokim poziomie witaminy D w osoczu.

Zadanie 04-18-13-21

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

Kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Celem niniejszych badań 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. Proponowane badania pozwalają lepiej zrozumieć wpływ zakresu i intensywności zmian glikolitycznych i proteolitycznych w mięsie na jego jakość. Wytypowanie specyficznych białek związanych z określonym zakresem parametrów jakości mięsa może umożliwić szybką i jednoznaczną ocenę jego jakości, zastępując aparaturową, czasochłonną analizę tekstury.

Założenia metodyczne:

Materiałem do analizy profilu białkowego przy użyciu elektroforezy 2DE będą fragmenty mięśnia najdłuższego grzbietu – *Longissimus dorsi*, pobrane od dwóch ras świń charakteryzujących się różną jakością mięsa (puławska, wielka biała polska – wbp lub rasa wbp zostanie zamieniona na polską białą zwistoucha – pbz ze względu na dostępność materiału), po 5 osobników z każdej z badanych ras. Próbkę do analizy pobierane będą od każdej ze sztuk w trzech okresach: bezpośrednio po uboju, 45 min. po uboju, 24 h oraz 48 h po uboju. W poszczególnych okresach pomiarowych przeprowadzone zostaną analizy dotyczące jakości mięsa. Wszystkie świny (loszki niespokrewnione) pochodzą ze stacji kontroli użytkowości trzody chlewnej w Chorzowie, gdzie utrzymywane będą w jednakowych warunkach środowiskowych i żywieniowych przez cały okres tuczu, czyli do uzyskania wagi około 100 kg.

W przypadku mięsa wołowego materiałem do analizy profilu białkowego będą fragmenty mięśnia – *Longissimus dorsi*, pobrane od bydła mięsnego rasy Limousine oraz mieszańców rasy PHF, ZB, o udokumentowanym pochodzeniu i będące pod stałą kontrolą użytkowości. Zwierzęta zostaną podzielone na trzy grupy doświadczalne po 5 sztuk w każdej: K (kontrolna), D1 oraz D2. Próbkę do analizy zostaną pobrane od każdej ze sztuk w trzech okresach: 24 h, 7 dni oraz 14 dni po uboju. W poszczególnych okresach zostaną przeprowadzone analizy dotyczące jakości mięsa.

W grupie kontrolnej – K – zwierzęta będą żywione standardową dawką żywieniową dla krów mlecznych. Zwierzęta z grupy doświadczalnej – D1 – oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o dodatek chronionych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasy omega-3 i -6). Okres żywienia doświadczalnego wynosić będzie 60 dni. Zwierzęta z grupy doświadczalnej – D2 – oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o zestaw ziół zwiększających żerność oraz parametry mięsa wołowego. Okres żywienia doświadczalnego wynosić będzie 60 dni.

Zakłada się, że w okresie prowadzenia badań kontrolnemu boju zostaną poddane buhajki i cieliczki w wadze co najmniej 380-450 kg.

Analizy przewidziane podczas realizacji zadania:

1. Analiza parametrów jakości mięsa wieprzowego i wołowego.
2. Przygotowanie próbek do izolacji białek.
3. Izolacja białek.
4. Oczyszczanie wyizolowanych białek oraz oznaczanie ich stężenia.
5. Analizy białkowe żeli 2D:
 - a) Ogniskowanie izoelektryczne (IEF);
 - b) SDS-PAGE;
 - c) Wybarwienie białka oraz analiza komputerowa skanów otrzymanych żeli (DIGE opcjonalnie);
 - d) Analiza LC-MS (Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas).
 - e) Analiza typu Western blot – walidacja wyników.

Syntetyczny opis wyników zadania:

W pierwszym etapie realizacji zadania pozyskano materiał z mięśnia najdłuższego grzbietu 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.

Próbki zostały zabezpieczone i przygotowane do dalszych analiz proteomicznych.

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. Zastosowanie w/w metod izolacji okazało się wydajne, lecz zastosowane składniki buforów zatrzymywały migrację białek na paskach IPG oraz żelu.

Fot. 1. Żel 2D wybarwiony barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 przy użyciu dwóch metod izolacji białka RIPA buffer i Tissue Extraction Reagent I. Na próbkach brak widocznych spotów białkowych lub są w małej ilości (G. Smółucha).



W celu poprawy izolowanego białka zastosowano zmienioną metodę izolacji białek, dającą lepszą wydajność.

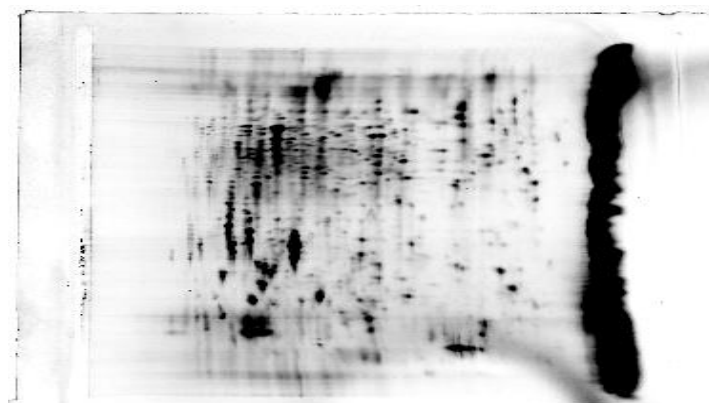
Do izolacji z tkanki mięśniowej użyto bufor 6 M mocznik, 2 M tiomocznik, 2% CHAPS i 30 mM Tris-HCl pH 7.5. Inne testowane buforu pienią się podczas homogenizacji i nie dały dobrego odzysku dla białek błonowych. Lizę komórek przeprowadzono z użyciem homogenizatora mechanicznego na lodzie w 3-4 cyklach: 5 s homogenizacji, 15 s próbka odpoczywa na lodzie.

Dodatkowym etapem (polepszającym jakość wyizolowanego białka) jest sonifikacja przez 15 minut w sonifikatorze, następnie 20 minut wirowania przy 20 000 x g w 4°C. Po odwirowaniu gruzu komórkowego, należy zrobić precypitację chloroform/metanol. Po precypitacji próbkę trzeba rozpuścić w ammonium bicarbonate, 30 mM Tris-HCl pH 8 lub 10 mM HEPES pH 8, już tym razem bez detergentów i mocznika.

Zastosowanie tej metody izolacji eliminuje również czynniki, które mają wpływ na późniejszą identyfikację białek przy użyciu metody LC-MS.

Wszystkie pobrane próbki od dwóch ras świń zostały wyizolowane oraz oznaczono w nich stężenie białka metodą Bradforda.

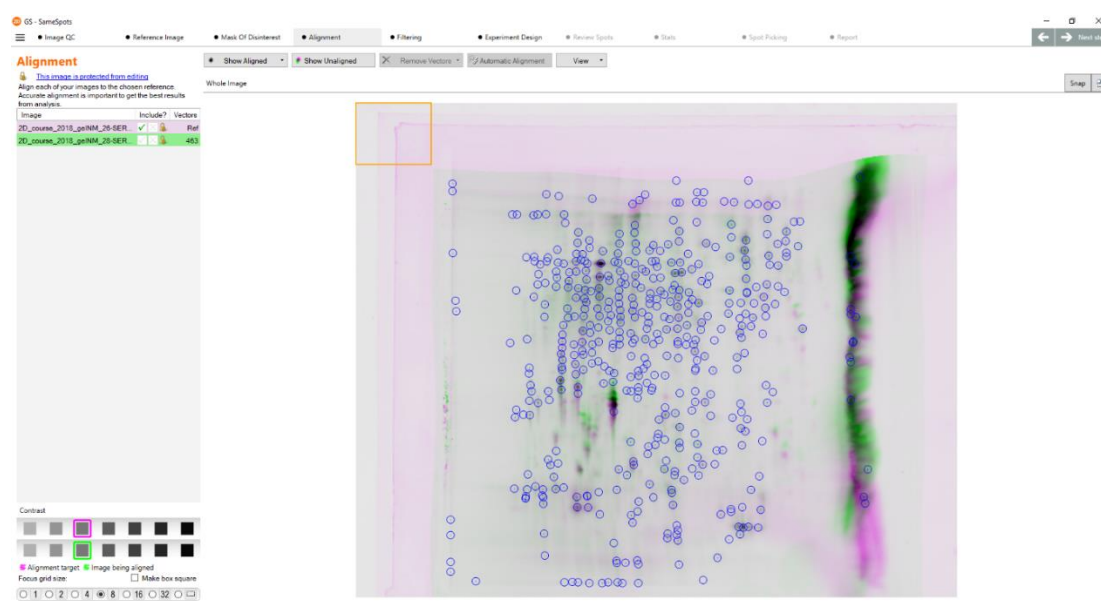
Fot. 2. Żel 2D wybarwiony barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 przy użyciu zmienionej metodyki izolacji białek (G. Smółucha).



Próbki z pierwszego pobrania zostały poddane rozdzielaniu na paskach IPG z immobilizowanym pH, a następnie rozdzielono je wg wielkości.

Po izolacji i rozdzieleniu białek pochodzących z pobranych próbek od dwóch ras świń, otrzymane żele 2D są analizowane przy użyciu programu SameSpot2D wykrywającego spoty białkowe w żelu oraz dokonuje się ich porównania pomiędzy badanymi próbkami. Analiza ta pozwala na wykrycie różnic w ekspresji danego białka. Takie spoty białkowe są wycinane z żelu, zabezpieczane i poddawane dalszej analizie LC-MC. W trwających badaniach wycięto 10 spotów białkowych różniących się ekspresją pomiędzy badanymi próbkami i przesłane do dalszych analiz ich oznaczenia.

Fot. 3. Analiza żeli 2D przy użyciu programu SameSpot2D (G. Smółucha).



Część spotów białkowych wyciętych z żelu została wysłana do analiz LC-MS w celu weryfikacji jakości otrzymanych izolatów białkowych i poprawności wycięcia spotów białkowych oraz wstępnej identyfikacji białka. Po otrzymaniu wyników z analiz LC-MS zostaną przeprowadzone analizy walidacyjne otrzymanych wyników (Western blot).

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 jest identyfikacja zmian w metylacji genomu komórek chrzęstnych koni, pochodzących z różnych pasażów komórkowych, które są odzwierciedleniem epigenetycznych zmian towarzyszących starzeniu się chondrocytów w warunkach *in vitro*.

Wykonano analizę bioinformatyczną odczytów NGS w ramach eksperymentu RRBS na liniach komórkowych chondrocytów końskich pasażowanych w warunkach długoterminowej hodowli jednowarstwowej oraz analizę ekspresji wybranych genów podlegających różnicowej metylacji w zależności od numeru pasażu.

Analiza odczytów sekwencyjnych genomowego DNA komórek chrzęstnych po konwersji bisulfitowej ujawniła obecność 1880 miejsc w sekwencji DNA wykazujących spadek metylacji

oraz 2256 miejsc DNA wykazujących wzrost metylacji w regionach kodujących genomu zależnie od numeru pasażu (Tab. 1.).

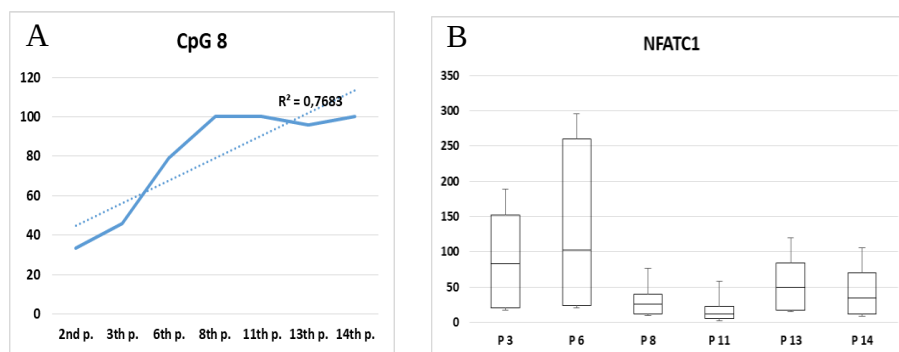
Tab. 1. Miejsca hypo- (DMS hypo) oraz hypermetylowane (DMS hiper) w liniach komórek chrzęstnych z początkowych pasaży, zidentyfikowane metodą RRBS.

Typ jednostki transkrypcyjnej	DMS hypo	DMS hyper
sekwencje mRNA	1669	1805
lncRNA	177	428
rRNA	3	4
miRNA	14	12
snoRNA	6	0
snRNA	5	3
pseudogeny	6	4

Zidentyfikowane geny związane z różnicową metylacją między wczesnymi a późnymi pasażami chondrocytów mają między innymi udokumentowane znaczenie dla procesów związanych z kontaktowaniem się i tworzeniem środowiska komórek chrzęstnych w warunkach *in vitro* oraz procesami immunologicznymi charakterystycznymi dla patologicznych zmian chrząstki stawowej. W celu weryfikacji potencjalnego znaczenia różnicowej metylacji DNA dla aktywności genów, w zależności od wczesnego bądź późnego pasażu komórek chrzęstnych, przeprowadzono analizę ich różnicowej ekspresji. Lokalizacja miejsc o różnicowej metylacji DNA (DMS), pokrywająca się z lokalizacją sekwencji kodujących oraz udokumentowane znaczenie biologiczne genów związanych z występowaniem DMS, było podstawą w typowaniu genów do analiz różnicowej ekspresji. W efekcie, analizie ekspresji poddano 20 genów związanych z biologią tkanki łącznej (ADAM17, ADAMTS2, AXIN2, BMP4, BMPR2, BRD7, CHST11, CLMP, COL11A1, COL15A1, COL16A1, CRY2, CTTN, DCBLD1, DOT1L, JAK3, MMP16, NADSYN1, NFATC1, TGFB1), spośród których 13 wykazało zróżnicowany poziom aktywności w zależności od numeru pasażu komórek chrzęstnych w długoterminowej hodowli jednowarstwowej.

Zastosowanie metody RRBS pozwoliło scharakteryzować zmiany w metylacji DNA istotne dla mechanizmu regulacji ekspresji genów transkrypcyjnie zaangażowanych w procesy związane z utratą fenotypu (odróżnicowywania) chondrocytów w warunkach długoterminowej hodowli w monowarstwie. W przeprowadzonych badaniach ewidentny związek pomiędzy zróżnicowaną ekspresją i metylacją DNA w zależności od numeru pasażu chondrocytów końskich wykazano między innymi dla genów JAK3 i NFATC1 (przykład Rys. 1.), które są zaangażowane w procesy immunologiczne, a w literaturze udokumentowano ich znaczenie w patologii chorób chrząstki stawowej.

Rys. 1. Wzrost metylacji w regionie promotorowym genu NFATC1 (A) związany ze spadkiem aktywności tego genu (B) w zależności od numeru pasażu w warunkach długoterminowej hodowli komórkowej.



Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Kierownik: prof. dr hab. Zdzisław Smorąg

Zadanie 01-19-04-21

Zastosowanie nukleofekcji do uzyskania potencjalnie transgeniczných mezenchymalnych komórek macierzystych oraz potencjalnie transgeniczných zarodków, płodów i/lub potomstwa klonalnego u świń

Kierownik zadania: dr hab. Marcin Samiec, prof. IZ PIB

Cel zadania:

Weryfikacja zdolności jąder nukleofekowanych i dwukrotnie modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs do pokierowania rozwojem *in vivo* potencjalnie transgeniczných zarodków świni uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego.

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników:

W trzecim etapie realizacji niniejszego zadania badawczego, przeprowadzano zabiegi uzyskiwania potencjalnie transgeniczných zarodków świni z oocytów zrekonstruowanych z jąder szpi-kopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych (BM-MSCs), które uprzednio poddano zarówno transgenizacji *in vitro* z użyciem wariantu programowego U-23 (wysoka efektywność nukleofekcji) oraz komercyjnej konstrukcji genowej *pmaxGFP* (Amara Biosystems, Lonza Bioscience), jak i dwustopniowej (sekwencyjnej) modulacji epigenetycznej za pośrednictwem trichostatyny A (TSA; niespecyficzny inhibitor deacetylaz histonów chromatyny jądrowej).

Przed wykorzystaniem jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania, rozmrożone subpopulacje modulowanych epigenetycznie, a następnie nukleofekowanych komórek BM-MSCs, które poddawano zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, były one jednocześnie poddawane powtórnej modulacji epigenetycznej poprzez ich 24-godziną inkubację w pożywce uzupełnionej 50 nM TSA. W wyniku pokrycia gęstą, pojedynczą warstwą całej dostępnej powierzchni dna butelki lub szalki hodow-

lanej, przylegające ściśle zarówno do siebie, jak i do polistyrenowego lub kolagenowego substratu 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 transfekowane komórki pochodzące z trzy- lub czterokrotnie pasażowanych linii klonalnych.

Źródłem oocytów były jajniki loszek i loch uzyskiwane w lokalnej rzeźni. Niedojrzałe oocyty świni były pozyskiwane metodą aspiracji z antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-6 mm. Wyselekcjonowane do dojrzewania mejotycznego *in vitro* (IVM) oocyty w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV) były hodowane w grupach liczących 40-50 sztuk, w 500 μ L pożywki TCM 199, uzupełnionej 10% surowicy płodów bydłych (FBS), 10% płynu wyizolowanego z antralnych pęcherzyków jajnikowych świni (pFF), mieszaniną aminokwasów egzogennych i endogennych (2% EAA oraz 1% NEAA), a także 62,5 ng/mL rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF), 30 ng/mL rekombinowanego epidermalnego czynnika wzrostowego człowieka (rhEGF), 1 mM/L cyklicznego dibutyryloadenozynomonofosforanu (dwumaślan cAMP; db-cAMP), 0,2 IU/mL ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG) oraz 10 mIU/mL hormonu folikulotropowego świni (pFSH). Po około 20-21 godzinach, oocyty były przenoszone do tej samej pożywki hodowlanej, lecz pozbawionej db-cAMP oraz hMG i pFSH. W tych warunkach fizykochemicznych oocyty były hodowane *in vitro* przez kolejne 22-23 godziny, aż do czasu osiągnięcia dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej w stadium metafazy II. podziału mejotycznego. Dojrzałe *in vitro* oocyty, z wyraźnie wyodrębnionymi ciątkami kierunkowymi I. rzędu i jednolicie granulowaną cytoplazmą, niewykazującą zmian nekrotycznych lub apoptotycznych, stanowiły źródło biorców dla jąder nukleofekowanych i dwustopniowo modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs w klonowaniu somatycznym świń. Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego oocyty były enukleowane przy zastosowaniu metody mikrochirurgicznej, wspomaganej chemicznie (z użyciem demekolcyny, a następnie cytochalazyny B). E nukleowane oocyty świni były rekonstruowane z jąder nukleofekowanych i dwukrotnie transformowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs. Do sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów był zastosowany protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A). W protokole tym, impulsy prądu stałego, które indukowały fuzję kompleksów ooplastkomórka BM-MSC, były równocześnie bodźcami inicjującymi aktywację rekonstruowanych oocytów. Elektroporacja błon plazmatycznych enukleowanych oocytów oraz komórek BM-MSCs była przeprowadzana w izotonicznym roztworze dielektryku o podwyższonym do 1 mM/L stężeniu jonów Ca^{2+} , z użyciem dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 120 V/mm i czasie trwania 60 μ s każdy. Uzyskane w wyniku F/A cybrydy klonalne były inkubowane przez 2-3 godziny w pożywce NCSU-23 uzupełnionej 5 μ g/mL cytochalazyny B, 0,8% albuminy surowicy bydłej (frakcja V; BSA-V) oraz mieszaniną aminokwasów egzogennych i endogennych (2% EAA oraz 1% NEAA). Bezpośrednio po inkubacji w obecności cytochalazyny B, zarodki klonalne w stadium 1-blastomerowym były transferowane chirurgicznie do dróg rozrodczych (jajowodów) zsynchronizowanych hormonalnie loch-biorczyń.

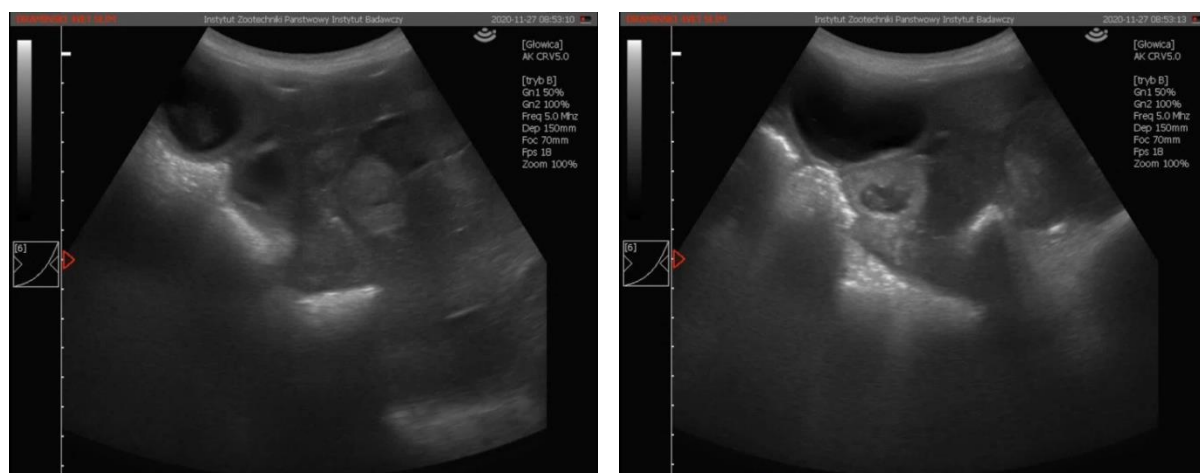
Ogółem, do zabiegów klonowania somatycznego wyselekcjonowano 268 (96,8%) dojrzałych *in vitro* oocytów spośród 277 oocytów zakwalifikowanych do IVM. Do jajowodów 3 zsynchronizowanych hormonalnie loch-biorczyń transferowano łącznie 252 (94,0%) efektywnie zrekonstruowanych zarodków klonalnych spośród 268 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 biorczyń wynosiła 84. W 30.-35. 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 powtórzone w odstępie 15-dniowym, w celu

weryfikacji tempa rozwoju płodów klonalnych lub oceny stopnia resorpcji pęcherzy płodowych.

Podsumowanie i wnioski:

1. Przydatność nukleofekowanych i dwukrotnie modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSCs do klonowania somatycznego świń była weryfikowana w oparciu o ocenę zdolności jąder tych komórek do pokierowania przed- i poimplantacyjnym rozwojem potencjalnie transgenicznych zarodków klonalnych, transferowanych chirurgicznie do dróg rozrodczych 3 samic-biorczyń.
2. Na podstawie diagnostyki USG, przeprowadzonej u wszystkich loch-biorczyń, potwierdzono obecność pęcherzy płodowych w macicy jednej z trzech samic, poddanych transferowi potencjalnie transgenicznych zarodków klonalnych (Ryc. 1.). Wskazuje to na odsetek ciężarnych loch utrzymujący się na poziomie 33,3% w okresie przypadającym między 30. a 35. dniem po transferze potencjalnie transgenicznych zarodków klonalnych do jajowodów samic-biorczyń. Z kolei, powtórna diagnostyka ultrasonograficzna ciężarnej lochy-biorczyny w okresie przypadającym między 45. a 50. dniem po transferze zarodków klonalnych wskazywała na symptomy zaawansowanej resorpcji pęcherzy płodowych.

Ryc. 1. Ultrasonogramy potwierdzające obecność płodów klonalnych w macicy ciężarnej lochy-biorczyny nr 19 (diagnostyka USG przeprowadzona między 30. a 35. dniem po transferze potencjalnie transgenicznych zarodków klonalnych do dróg rozrodczych samicy-biorczyny).



Zadanie 01-19-06-11

Wpływ parametrów jakościowych nasienia seksowanego na płodność inseminowanych jatek 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 holendersko-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 zapłodniającej seksowanego nasienia przeprowadzane są inseminacje jałówek i krów.

Syntetyczny opis wyników:

W okresie sprawozdawczym zakupiono do badań seksowane nasienie buhajów rasy holendersko-fryzyjskiej (18 słomek w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o. i 10 słomek w ZD IZ PIB Chorzełów sp. z o.o.). Pochodziło ono od 6 buhajów. Nasienie przeznaczone do oceny plemników *in vitro* zostało przewiezione do laboratorium ZBRK w Balicach celem wykonania przewidzianych metodyką analiz. Wyniki dotychczas przeprowadzonych analiz nasienia seksowanego zamieszczono w Tab. 1. i 2. W celu oceny zdolności zapłodniającej nasienia seksowanego przeprowadzono inseminację 467 jałówek i krów. Z tego 279 zabiegów inseminacji przeprowadzono w ZD IZ PIB Kołbacz sp. z o.o., a 188 w ZD IZ PIB Chorzełów sp. z o.o. Po 35 dniach od zabiegu inseminacji przeprowadzano badanie USG na ciążę. Wyniki uzyskane na podstawie dotychczas wykonanych badań wskazują, że wskaźnik zacieleń dla nasienia seksowanego waha się od 10,7% do 85,7% (Tab. 3.)

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 (Chorzeliów)	0,96	0,83	97,72	-59,5
32	Black Gold sex 118094 (Chorzeliów)	-	-	-	-52,8
33	Greenway sex 17306 (Chorzeliów)	-	-	-	-85,0
34	Jeepson sex 16292 (Chorzeliów)	0,91	0,80	99,09	-70,2
35	Mayflower sex 19108 (Chorzeliów)	1,69	1,48	109,00	-
36	Baltic Star sex 17122 (Chorzeliów)	1,68	1,50	114,17	-
37	Firebird sex 19281	3,75	3,27	100,08	-
38	Supersire sex 19311	3,85	3,41	97,52	-
39	Enterprise sex 119043	5,27	4,39	86,47	-
40	Windmill 190130 (Chorzeliów)	5,48	5,04	100,96	-

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

Lp.	Buhaj	Plemniki apoptotyczne	Błony komórkowe			Uszkodzona chromatyna
			żywe	martwe	zamier.	
1	Mozilla sex	2,46%	42,87%	38,78%	18,34%	1,05%
2	Mayflower sex 18046	5,23	38,37%	51,51%	10,13%	1,60%
3	Luksus sex	14,72%	35,62%	26,80%	37,58%	1,02%
4	Pharo sex 18043	5,15%	34,26%	53,14%	12,60%	0,62%
5	Megabit sex 18109	2,14%	35,29%	50,75%	13,96%	1,99%
6	Megabit sex 17331	27,21%	30,30%	56,12%	13,58%	1,29%
7	Maldives sex 117228	3,62%	33,79%	59,86%	6,35%	1,64%
8	Maldives sex 117230	2,45%	43,27%	49,19%	7,53%	0,88%
9	Missouri sex					
10	Sutton sex 17068	40,62%	44,41%	39,34%	16,25%	0,32%
11	Sutton sex 17079	1,07%	35,23%	21,17%	43,60%	0,59%
12	Greenway 17356					
13	Hondo sex	1,05%	41,51%	46,07%	12,42%	0,31%
14	Baylaboy sex	18,09%	30,63%	58,03%	11,33%	1,75%
15	All Star sex 18109	8,49%	25,45%	34,41%	40,14%	0,47%
16	Tenpin sex S-C	0,1%	7,48%	84,86	7,66%	
17	Lundy sex	1,92%	30,07%	65,44%	13,48%	1,10%
18	Windmill sex 170921	4,86%	39,33%	46,34%	14,33	2,25%
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 S-C	8,39%	9,65%	80,36%	10,00%	

23	Surprise sex	8,39%	25,23%	64,39%	10,38%	1,08%
24	Dreamweaver sex S-C	7,05%	9,26%	82,45%	8,29%	
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 (Chorzeliów)	19,42%	27,31%	55,02%	16,47%	0,47%
32	Black Gold sex 118094 (Chorzeliów)					
33	Greenway sex 17306 (Chorzeliów)					
34	Jeepson sex 16292 (Chorzeliów)	13,50%	40,73%	50,35%	8,92%	0,94%
35	Mayflower sex 19108 (Chorzeliów)		18,53%	64,96%	16,51%	1,30%
36	Baltic Star sex 17122 (Chorzeliów)		25,47%	45,25%	29,28%	1,06%
37	Firebird sex 19281		19,09%	25,36%	55,55%	1,31%
38	Supersire sex 19311		19,70%	36,87%	43,43%	1,65%
39	Enterprise sex 119043 S-C		12,43%	83,14%	4,43%	
40	Windmill 190130 (Chorzeliów)		26,61%	48,04%	25,35%	2,09%

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
35	Mayflower sex 19108 (Chorzaków)	65	35,4
36	Baltic Star sex 17122 (Chorzaków)	68	39,7
37	Firebird sex 19281	119	60,2
38	Supersire sex 19311	41	68,3
39	Enterprise sex 119043	119	63,9
40	Windmill 190130 (Chorzaków)	55	50,9

Zadanie 01-19-07-11

Wykorzystanie kriokonserwacji nasienia w programie hodowlanym Gęsi Białej Kołudzkiej®

Kierownik zadania: dr hab. Mirosław Lisowski

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

W efekcie przeprowadzonych prac badawczych zgromadzono ponad 21 ml nasienia pobranego od 10 gęsiorów, pochodzących z rodu W-11 oraz 17,7 ml nasienia od 10 gęsiorów z rodu W-33 – łącznie 38,79 ml.

Średnia objętość nasienia pobranego od osobników z pierwszego z rodów wynosiła 0,22 ml, natomiast drugiego 0,19 ml. Łącznie pobrano 119 ejakulatów nasienia czystego, a kolejnych 13 zostało wyeliminowanych z powodu zanieczyszczenia kałem. W 56 przypadkach nie udało się pobrać nasienia z powodu zakończenia jego produkcji przez poszczególne osobniki. Średnia ruchliwość plemników w nasieniu świeżym wynosiła 60%, po schłodzeniu 50%, i 40% po rozmrożeniu nasienia. Koncentracja plemników w pobranym nasieniu zawierała się w przedziale od 220,0 do 540,0, średnio – 370,0 ($n \times 0^6/\text{ml}$).

Do oceny fragmentacji chromatyny plemników gęsi wykorzystano cytometr przepływowy. W analizowanych próbkach stwierdzono średnio 84,4% plemników prawidłowych (od 27,3 do 99,04) i 15,6% plemników z uszkodzoną chromatyną.

Pobrane, czyste nasienie zamrożono w parach ciekłego azotu. Stworzono biorepozytorium nasienia w liczbie 152 słomek o pojemności 0,25 ml każda, utworzone z 119 ejakulatów gęsiorów.

Stwierdzono również dużą zmienność osobniczą cechy, jaką jest wytrwałość w produkcji nasienia przez gęsiory. Konsekwencją tego jest możliwość doskonalenia tej cechy na drodze selekcji. Informacja ta powinna zostać wykorzystana przez IZ PIB ZD Kołuda Wielka, a cecha wytrwałości w produkcji nasienia przez gęsiory uwzględniona w programie hodowlanym (selekcji).

Zadanie 01-19-08-21

Poprawa efektywności pozaustrojowego uzyskiwania i kriokonserwacji oocytów świni poprzez redukcję zawartości lipidów

Kierownik zadania: dr inż. Katarzyna Poniedziałek-Kempny

Celem badań jest poprawa efektywności pozaustrojowego uzyskiwania zarodków świni i ich kriokonserwacji poprzez regulację zawartości lipidów. Zakłada się, że dzięki zastosowaniu takich związków, jak forskolina, L-karnityna lub siarczan fenazyny, jako suplementów do pożywki do hodowli *in vitro* oocytów, możliwe będzie obniżenie zawartości lipidów w tak hodowanych oocytach, jak również w uzyskanych zarodkach.

W pierwszym etapie badań poszukiwano optymalnej koncentracji forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny jako suplementów do pożywki do dojrzewania oocytów. W tym celu do medium do hodowli oocytów dodawano forskolinę o koncentracji 10 μ M i 15 μ M lub L-karnitynę o koncentracji 0,5 mg i 1 mg lub siarczan fenazyny o koncentracji 0,025 μ M i 0,05 μ M. Oocyty uzyskiwano z jajników pochodzących od loszek po uboju. Aspirację pęcherzyków o wielkości 3-6 mm przeprowadzano za pomocą strzykawki o poj. 10 ml z dołączoną igłą o średnicy 1,2 mm. Oocyty wraz z płynem pęcherzykowym aspirowano przy pomocy medium manipulacyjnego TCM-199 Hepes (Tissue Culture Medium 199 Hepes), wzbogaconego 10% surowicą płodów cielęcych (FCS-fetal calf serum). Pozyskane oocyty, prawidłowe morfologicznie (Fot. 1.) poddawano dojrzewaniu w pożywce z dodatkiem dwóch różnych stężeń forskoliny (10 μ M i 15 μ M), L-karnityny (0,5 mg i 1 mg) lub siarczanu fenazyny (0,025 μ M i 0,05 μ M) – grupy doświadczalne – lub bez dodatku tych suplementów – grupa kontrolna. Hodowlę oocytów prowadzono przez 42-44 godzin, do osiągnięcia stadium metafazy II (Fot. 1.). Efektywność dojrzewania oocytów świni badano na podstawie oceny dojrzałości jądra oocytu przy zastosowaniu barwienia DAPI. W tym celu dojrzałe oocyty świni, pozbawione komórek wzgórka jajonośnego, po uprzednim umieszczeniu ich na kilka minut w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% hialuronidazy, utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 60 minut, w temperaturze pokojowej, i przepłukiwano trzykrotnie w 200 μ l roztworu PBS-PVP (sól fizjologiczna buforowana fosforanami z dodatkiem poliwinylpirolidonu w ilości 0,1 mg/ml PVP). Następnie, oocyty inkubowano w rosnącym gradiencie (50-, 70-, 100%) Vecta Shield z DAPI w (DAPI- 4', 6-tiamino-2-fenylindol) w celu wybarwienia DNA chromatyny i ciałka kierunkowego. Ocenę przeprowadzano pod mikroskopem epifluorescencyjnym za pomocą filtra o długości fali 358-461 nm. Chromatyna i ciało kierunkowe w oocytach wybarwiały się na kolor niebieski (DAPI) (Fot. 2.).

Ocenie dojrzałości jądrowej oocytów przy zastosowaniu barwienia DAPI poddawano łącznie 200 oocytów dojrzałych w dwóch testowanych stężeniach wszystkich trzech związków: forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny oraz 99 oocytów kontrolnych. Wyniki badań dotyczące dojrzewania oocytów świni w obecności forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny przedstawiono w Tab. 1-3.

Tab. 1. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w medium o dwóch koncentracjach forskoliny.

Forskolina	Liczba oocytów ocenionych/liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 mM	33/3	90,9
10 mM	26/3	80,8
15 mM	44/3	63,6

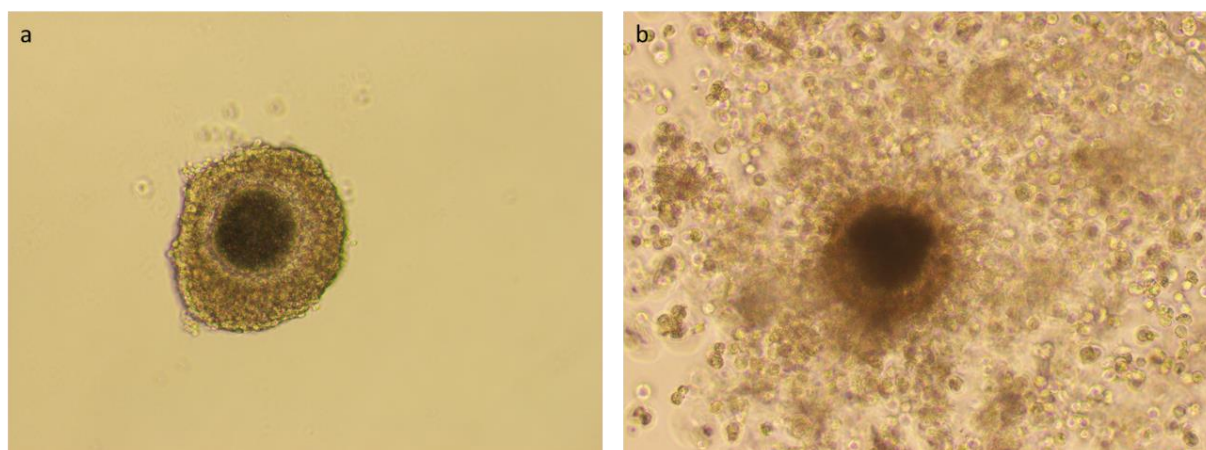
Tab. 2. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w medium o dwóch koncentracjach L-karnityny.

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych/ liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 mg	33/3	90,9
0,5 mg	29/3	96,6
1 mg	40/3	97,5

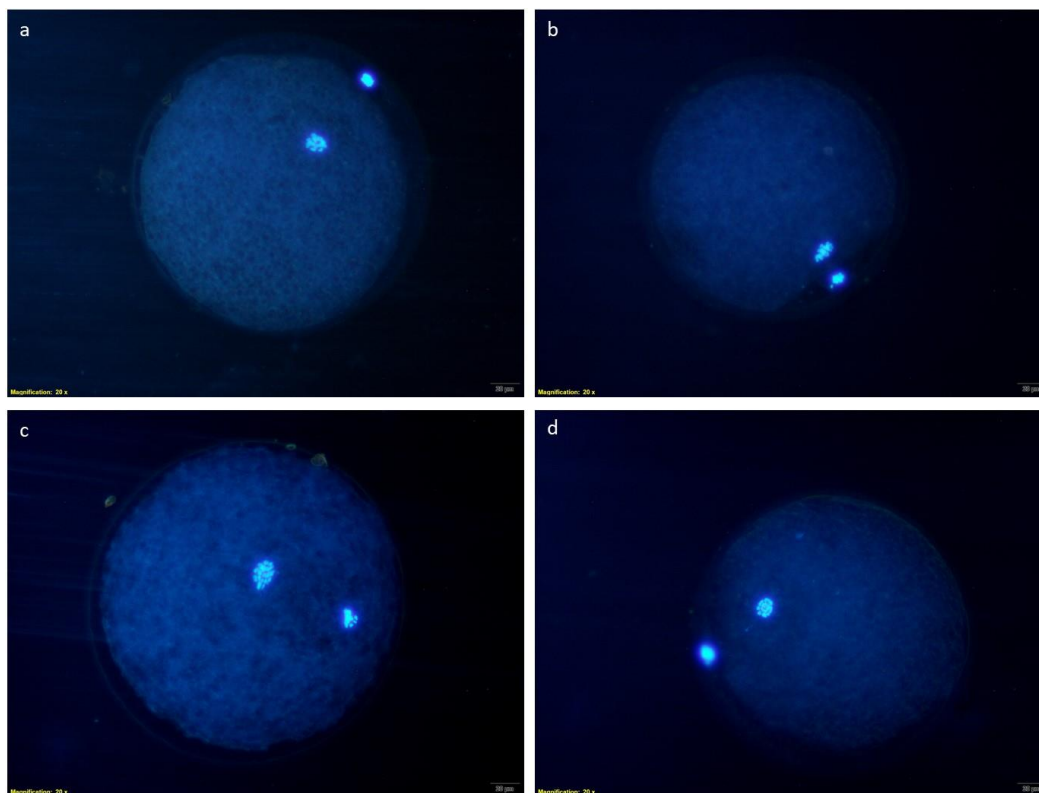
Tab. 3. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w medium o dwóch koncentracjach siarczanu fenazyny.

Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych/liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 mM	33/3	90,9
0,025 mM	24/3	95,8
0,05 mM	37/3	75,7

W badaniach wstępnych dotyczących pierwszego etapu zaobserwowano tendencję do uzyskania wyższego odsetka dojrzałych oocytów w grupie doświadczalnej, w której zastosowano dodatek L-karnityny, zarówno o koncentracji 0,5 mg jak i 1 mg w stosunku do oocytów grupy kontrolnej. Stwierdzono tendencję do uzyskania wyższego odsetka dojrzałych oocytów w grupie doświadczalnej, w której pożywkę wzbogacano dodatkiem 0,025 μ M siarczanu fenazyny w stosunku do oocytów grupy kontrolnej. Zarówno w przypadku forskoliny jak i siarczanu fenazyny optymalne dla dojrzewania oocytów świni wydaje się być zastosowanie niższych koncentracji tych związków.

Fot. 1. Oocyt świni: niedojrzały (a) oraz dojrzały *in vitro* (b). Obraz w mikroskopie świetlnym.

Fot. 2. Oocyty dojrzałe w stadium metafazy II w pożywce z dodatkiem forskoliny (a), L-karnityny (b), siarczanu fenazyny (c) oraz oocyt z grupy kontrolnej (d). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym, po wybarwieniu DAPI.



W następnym etapie rozpoczęto badania dotyczące poziomu aktywnych form tlenu (ROS) w dojrzałych oocytach świni. W tym celu oocyty po uzyskaniu dojrzałości w warunkach *in vitro* pozbawiano komórek wzgórka jajonośnego poprzez umieszczenie ich na kilka minut w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% hialuronidazy. Następnie, gamety wybarwiano w roztworze CM-H₂DCFDA w pożywce hodowlanej o stężeniu 5 µL/ml w ciemności przez 30 min. W temperaturze 39°C i atmosferze 5% tlenu i 5% dwutlenku węgla. Po tym czasie oocyty przepłukiwano 2 × po 5 min w temp. 39°C, w ciemności w pożywce manipulacyjnej (20% FCS w PBS) oraz umieszczano na szkiełkach. Przygotowano 53 preparaty w grupach doświadczalnych oraz 20 w grupie kontrolnej. W późniejszym etapie badań preparaty będą oceniane pod mikroskopem fluorescencyjnym i będzie określana zawartość aktywnych form tlenu.

Przygotowano również materiał do jakościowej i ilościowej oceny lipidów. W tym celu oocyty świni po uzyskaniu dojrzałości *in vitro* pozbawiano komórek wzgórka jajonośnego poprzez umieszczenie ich na kilka minut w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% hialuronidazy, a następnie utrwalano przez 3 godz. w 4% formaldehydzie, przez 3 godz. w temperaturze pokojowej, i płukano 3-krotnie po 15 min. w PBS. Utrwalono 232 oocyty w grupach doświadczalnych oraz 52 w grupie kontrolnej. Następnie, gamety zamrożono w kulkach w 2% glicerolu i umieszczono w ciekłym azocie. W dalszym etapie oocyty zostaną poddane ocenie jakościowej i ilościowej zawartości lipidów za pomocą analizy widmowej, pod mikroskopem konfokalnym. Badania te są prowadzone we współpracy z Zakładem Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

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 było ustalenie dopuszczalnego czasu i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej u świni, krowy i konia z których izolowane były MSC. Ponadto, opracowanie warunków kriokonserwacji komórek MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej pobranych poubojowo i przyżyciowo (kontrola) u świni i poubojowo u konia i krowy oraz ocenę funkcjonalną uzyskanych MSC po uboju poprzez ich odróżnicowanie w iPSC tylko u świni. Celem zadania było również opracowanie metody izolacji MSC ze szpiku pobranego od krowy.

Założenia metodyczne:

- pobieranie poubojowo szpiku od: a) konia, b) świni, c) krowy,
- izolacja komórek MSC ze szpiku,
- opracowanie metody izolacji MSC ze szpiku krowy,
- wyprowadzenie linii pierwotnej MSC trzech gatunków zwierząt i hodowla *in vitro*,
- potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC na poziomie białek, przy użyciu cytometrii przepływowej – CD90,CD73,CD105,CD31,CD34 (co najmniej 3 markery) i immunocytochemii – z uwagi na wyniki odbiegające od oczekiwanych,
- kriokonserwacja MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranych poubojowo i przyżyciowo świni i poubojowo konia i krowy,
- lipofekcja MSC świni z użyciem egzogennych cząsteczek DNA kodujących białka SOX2, KLF4, Oct4 i c-myc, przy wykorzystaniu technologii CRISPR/Cas – usługa UP Poznań,
- odróżnicowanie MSC w kierunku komórek iPSC,
- potwierdzenie pluripotentnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC na poziomie białek, przy użyciu cytometrii przepływowej – SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 – nie wykonano ostatniego punktu z uwagi na niepomyślne odróżnicowanie w iPSC.

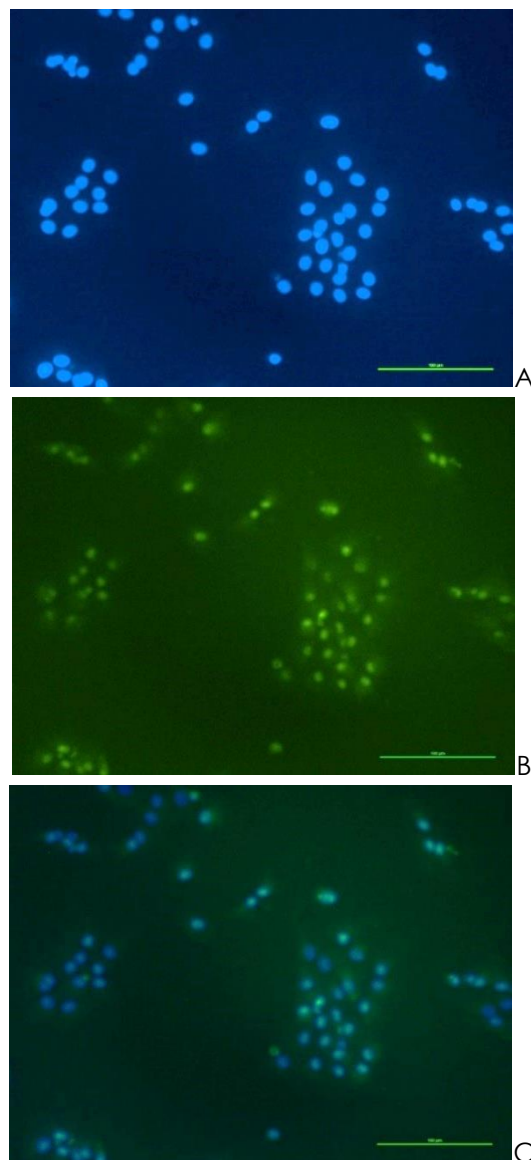
Podsumowanie wyników:

- Ustalono dopuszczalny czas i techniki uzyskania poubojowo szpiku kostnego u świni, konia i krowy, z których izolowane będą MSC – z naszych badań wynika, że do 6 godz. od pobrania szpiku możliwe jest założenie hodowli MSC *in vitro* o prawidłowej morfologii.
- Opracowano izolację MSC ze szpiku pobranego od krowy.
- Opracowano warunki kriokonserwacji MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranych poubojowo i przyżyciowo (kontrola) – zalecamy mrożenie w 10% FCS/DMSO w pudełku do mrożeniu Mr Frosty.
- Ocena morfologiczna MSC po uboju – markery CD MSC izolowanych ze szpiku po uboju u świni w większości nie odbiegają od ekspresji obserwowanej w komórkach izolowanych ze szpiku pobranego przyżyciowo. CD73 analizowany na cytometrze przepływowym wykazywał negatywny wynik – prawdopodobnie p/ciało jest niespecyficzne dla świni, gdyż immunofluorescencyjnie wynik był pozytywny. Podobna interpretacja dotyczy CD105 –

cytometrycznie uzyskano wynik negatywny zarówno przyżyciowo, jak i poubojowo. Jednak przyżyciowe MSC barwione immunofluorescencyjnie dały wynik pozytywny. MSC konia dla vimentinu, CD13 i CD34 wykazują niejednoznaczną ekspresję. Nie było możliwości porównania wyników z komórkami pozyskanymi przyżyciowo. MSC pozyskane z macicy różnią się analizowanymi markerami w stosunku do szpiku – wynik na dwóch osobnikach nie pozwala na wyciąganie wniosków.

- Odróżnicowanie MSC w kierunku komórek iPSC – nie uzyskano – najprawdopodobniej przyczyną niepowodzenia może być brak odpowiedniej pożywki umożliwiającej utrzymanie stabilnych linii komórek iPS świni, jak również słaby potencjał proliferacyjny komórek mezenchymalnych po rozmrożeniu. Dane te zgadzają się z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze za granicą (Technische Universität München), dlatego nie uważamy za uzasadnione kontynuowanie badań.

Fig. 1. Anti-CD105 expression of pig MSCs (magnification: 400x) 3A) staining with DAPI, 3B) staining with anti-CD105 antibody, 3C) microphotograph after merging.



Zadanie 04-19-10-21*Uzyskanie transgeniczných świń z knock-out (KO) genu miostatyny (MSTN)***Kierownik zadania: dr hab. Jacek Jura, prof. IZ PIB**

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 genu KO MSTN I w technologii CRISPR/Cas9. Konstrukcję genową wprowadzano na drodze mikroiniekcji z zastosowaniem mikroskopu odwróconego, wyposażonego w system optyczny Nomarskiego, przy pomocy mikromanipulatorów mechanicznych Leica. Stężenie konstrukcji KO MSTN I wynosiło 4 ng/μl – optymalne stężenie konstrukcji w technologii CRISPR/Cas9 stosowane do transfekcji zygot świń.

Na potrzeby realizacji zadania, ZD IZ PIB Żerniki Wielkie sp. z o.o. przygotował 36 zsynchronizowanych i superowulowanych samic dawczyń, zgodnie z ustalonym protokołem. Do inseminacji dawczyń zygot stosowano nasienie wyselekcjonowanych knurów. Jednocześnie, jako matki zastępcze przygotowano 30 loszek biorczyń, które zsynchronizowano z cyklem rujowym dawczyń zygot do transfekcji. W rezultacie przeprowadzonych zabiegów superowulacji u dawczyń uzyskano 784 komórki jajowe. Przed przeprowadzeniem transfekcji, uzyskane komórki jajowe oceniano morfologicznie i poddawano wirowaniu w celu uwidocznienia przedjądrzy. Do wirowania wybierano komórki jajowe z wyraźnie widocznymi dwoma ciałkami kierunkowymi oraz z prawidłową morfologicznie cytoplazmą. Wyselekcjonowane zygoty poddano wirowaniu przez 5 minut z siłą 14 000 g. Następnie, pod mikroskopem przeprowadzano drugi etap selekcji, przeznaczając do transfekcji wyłącznie zygoty z widocznymi na ostonce przejrzystej licznymi plemnikami oraz uwidocznionymi przedjądrzami. Zabieg transfekcji – wprowadzenie konstrukcji genowej KO MSTN I do jednego z przedjądrzy wykonano na 564 zygotach. Po przeprowadzeniu zabiegu transfekcji, zygoty ponownie poddawano ocenie morfologicznej. Do przeniesienia, do jajowodów zsynchronizowanych loszek biorczyń, wyselekcjonowano 422 zygoty. Wyselekcjonowane zygoty wprowadzono do jajowodów 15 loszek biorczyń. Badania na prośność wykazały ciążę u 11 biorczyń. Od zaproszonych loszek biorczyń pobrano i skonfekcjonowano włosy z cebulkami, na których zostaną wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB, analizy dla genów SETD2, TBX2, IGF2 i RYR 1.