

Zakłady Naukowe

Zakład Hodowli Bydła
kierownik: dr hab. Piotr Wójcik, prof. IZ PIB

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

W ramach realizacji zadania, kontynuowano charakterystykę opisową dotyczącą danych fenotypowych, genetycznych i rodowodowych, gromadzonych w bazach Instytutu Zootechniki PIB oraz prowadzono analizę genomu. Wyniki tych analiz posłużyły do modyfikacji algorytmu pozwalającego na optymalizację wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego.

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. Spośród ok. 8900 rekordów, najczęściej jako pojedyncza choroba występowało *mastitis* (4397 przypadków), *metritis* (2417 przypadków) oraz cysty jajnika (2053 przypadki). W Instytucyjnej bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 3500 krów z Zakładów Doświadczalnych. Z tej liczby ponad 2700 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 (F_{ROH}). Wyniki analizy wskazały na zwiększoną częstość występowania *mastitis*, *metritis* i torbiele jajnika wraz ze wzrostem poziomu zimbredowania. 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 pobierano materiał do badań. Regresja na inbred (jako istotny efekt) została także uwzględniona w trakcie opracowywania modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych.

Kontynuowano również badania z zakresu analizy genomu, m.in. analizę asocjacyjną (GWAS) pomiędzy markerami genetycznymi SNP a w/w cechami (schorzeniami). Do analizy użyto wartości fenotypowych cech *mastitis*, *metritis* oraz torbiele jajnika i były one dostępne dla około 2000 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Każda z krów została zgenotypowana przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip, zawierającej genotypy 54 609 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polimorphism*, SNP) lub Illumina BovineLD Genotyping BeadChip zawierającej genotypy 7 931 SNP. Genotypy osobników zgenotypowanych przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineLD Genotyping BeadChip, zostały zimputowane do gęstości mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip. W dalszej analizie wykorzystano polimorfizmy o minimalnej wartości $MAF > 1\%$ oraz minimalnej jakości genotypowania $> 99\%$. Kryteria te spełniło 46 216 SNP. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 94 SNPs statystycznie istotnie związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 29 genów kandydujących związanych z występowaniem tych schorzeń.

W poprzednich latach sprawozdawczych wystąpiły okresowe utrudnienia w pobieraniu tkanek do badań molekularnych od części wytypowanych zwierząt, związane z brakiem możliwości współpracy z ubojniami i/lub lekarzami weterynarii wynikającymi z nałożonych kwarantann. W związku z tym kontynuowano typowanie zwierząt, od których pobierano tkanki. Pobrany materiał badawczy posłużył m.in. analizie jakościowej i optymalizacji metody izolacji RNA. Z części zebranych próbek nie zdołano wyizolować RNA, co wymaga uzupełnienia materiału biologicznego w kolejnym roku. Kontynuowano prace nad optymalizacją modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych. Komponenty (ko)wariancji szacowano za pomocą programów zaimplementowanych w pakiecie BLUPF90 autorstwa prof. Misztala. Parametry genetyczne i fenotypowe szacowano za pomocą modeli liniowych i progowych, wykorzystując programy renumf90 i gibbsf90 z zaimplementowaną metodą Bayesa. Podstawowy zbiór do analiz został utworzony na podstawie danych zgromadzonych w bazie PLOWET oraz AFIFARM i obejmował około 30 000 rekordów krów. Po wprowadzeniu odpowiednich restrykcji (na wielkości podklas HYS, wiek oceny, kompletności rodowodów) ostateczny zbiór do estymacji parametrów objął 12 911 rekordów. W trakcie szacowania komponentów (ko)wariancji wygenerowano 100 000 próbek parametrów. Pierwsze 20 000 próbek usunięto jako tzw. *rozruchowe*. Na podstawie kolejnych próbek obliczono średnie wartości komponentów (co)wariancji oraz błąd losowy. Wszystkie czynności związane z szacowaniem parametrów genetycznych powtarzano wielokrotnie, uwzględniając różną kombinację efektów stałych i losowych. Odziedziczalności cech zdrowotności oraz współczynniki korelacji genetycznej i fenotypowej między nimi zostały wyznaczone na podstawie wyników charakteryzujących się możliwie najmniejszym błędem oszacowań. Weryfikację optymalizacji zastosowanych modeli obserwacji prowadzono w oparciu o wyniki statystyk bayesowskich.

W analizie jako wartości fenotypowe, wykorzystano informacje czy u danej krowy zostało stwierdzone kliniczne zapalenie sutka, *metritis* lub torbiel jajnika, czy też nie (cechy binarne przyjmujące wartość=1 przy wystąpieniu choroby i 0 przy jej braku). Konwencjonalne wartości hodowlane (ang. *Estimated Breeding Values*, EBV) dla 12 911 krów i buhajów (ojców i dziadków tych krów) rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej zostały wyznaczone przy pomocy następującego modelu:

$$y = X\beta + Za + \varepsilon, \quad (1)$$

gdzie y reprezentuje wartość cechy (0 lub 1); β jest wektorem efektów stałych reprezentowanych przez średnią ogólną, stado oraz wiek wystąpienia schorzenia; X jest macierzą wystąpień dla efektów stałych; Z jest macierzą wystąpień dla efektu addytywnie poligenicznego, a reprezentuje efekt addytywnie poligeniczny krowy, natomiast ε jest wektorem błędów. Zakładamy, że $\varepsilon \sim N(0, I\sigma_\varepsilon^2)$, gdzie I jest macierzą identycznościową i σ_ε^2 jest wariancją błędu. Efekt a ma rozkład $N(0, A\sigma_a^2)$, gdzie A jest macierzą spokrewnień, natomiast σ_a^2 reprezentuje wariancję addytywnie poligeniczną. Genomowe wartości hodowlane (ang. *direct genomic value* DGV) są definiowane jako suma addytywnych efektów SNP uzyskanych przy pomocy modelu:

$$(DGV) \approx \mu + Z_1 g$$

Kombinowane wartości hodowlane (ang. *genomically enhanced breeding value*, GEBV) dla osobnika są wyznaczone na podstawie wartości DGV oraz indeksu rodowodowego (ang. *parental index*, PI):

$$GEBV_i = \frac{(1 - REL_{PI_i})(DGV_i - \mu_{EBV}) + (1 - REL_{DGV_i})(PI_i - \mu_{EBV})}{1 - REL_{DGV_i}REL_{PI_i}} + \mu_{EBV},$$

gdzie REL_{DGV_i} jest dokładnością DGV dla osobnika i , REL_{PI_i} jest dokładnością PI. μ_{EBV} jest średnią wartością EBV dla populacji referencyjnej.

Dokładność GEBV dla osobnika i uzyskujemy przy pomocy wzoru:

$$REL_{GEBV_i} = \frac{REL_{DGV_i}(1 - REL_{PI_i}) + REL_{PI_i}(1 - REL_{DGV_i})}{1 - REL_{DGV_i}REL_{PI_i}}$$

Genomowe i kombinowane wartości hodowlane zostały wyestymowane dla wszystkich zgenotypowanych w bazie Instytutu Zootechniki PIB osobników, tj. 156 204 krów i buhajów. Statystyki opisowe dla DGV i GEBV pod względem *mastitis*, *metritis* oraz torbieli jajnika zawarto odpowiednio w tabeli 1., 2. i 3.

Tabela 1. Statystyki opisowe dla DGV, GEBV pod względem *mastitis* i ich dokładności

	min	max	mean	sd
DGV	75.47	125.77	100.89	5.76
relDGV	0.15	0.15	0.15	0.00
GEBV	75.03	127.14	100.37	5.42
relGEBV	0.16	0.81	0.26	0.11

Tabela 2. Statystyki opisowe dla DGV, GEBV pod względem *metritis* i ich dokładności

	min	max	mean	sd
DGV	79.59	129.12	100.81	5.62
relDGV	0.13	0.13	0.13	0.00
GEBV	80.76	130.05	100.74	5.13
relGEBV	0.15	0.69	0.24	0.07

Tabela 3. Statystyki opisowe dla DGV, GEBV pod względem torbieli jajnika i ich dokładności

	min	max	mean	sd
DGV	62.03	144.16	103.87	6.91
relDGV	0.17	0.17	0.17	0.00
GEBV	59.51	140.77	105.22	7.96
relGEBV	0.17	0.82	0.37	1.83

Otrzymane wyniki świadczą o możliwości prawidłowego szacowania wartości hodowlanej dla wyżej wymienionych cech zdrowotnych oraz o zasadności kontynuacji prac nad konstrukcją precyzyjnych, zindywidualizowanych indeksów selekcyjnych w krajowej populacji bydła rasy HF.

Zadanie 01-10-04-11

Ocena dobrostanu cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców

kierownik zadania: dr inż. Dorota Godyń

Oddzielenie cieląt od matek we wczesnym okresie życia oraz utrzymywanie młodych pojedynczo wzbudza coraz większy niepokój społeczny, z uwagi przede wszystkim na cierpienie zwierząt, a tym samym niski poziom dobrostanu. Cielęta są zwierzętami stadnymi i naturalnie potrzebują towarzystwa innych osobników swojego gatunku. Brak interakcji z innymi cielętami może prowadzić do stresu i frustracji, co wpływa negatywnie na ich rozwój. W okresie młodości zwierzęta tego gatunku uczą się ważnych umiejętności społecznych – hierarchii, komunikacji. Odizolowanie i brak bodźców (nudne otoczenie) mogą prowadzić do problemów behawioralnych: apatii, agresji, występowania zachowań stereotypowych.

Pewnego rodzaju kompromisem w zapewnieniu odpowiedniego rozwoju społecznego, ale także w zapobieganiu nadmiernej ilości chorób w stadach, jest utrzymywanie cieląt w kojcach o powierzchni przeznaczonej dla 2-4 sztuk.

Określenie wpływu utrzymywania cieląt parami w okresie po odpojeniu siarą, na wskaźniki związane z dobrostanem i produktywnością. Hipoteza badawcza zakłada istnienie różnic w behawiorze, w przyrostach masy ciała oraz w poziomie hormonu stresu analizowanym u cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców. Przyjmuje się także, iż wyniki badań wskażą istotność zastosowania małoinwazyjnej metody oceny kortyzolu (badanego w sierści zwierząt), jako wiarygodnego maklera stresu.

Badaniami objęto grupę 8 cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Po odizolowaniu od matek, cielęta umiejscowione zostały w kojcach z wysuwaną przegrodą (fotografia 1.). Tworzono 2-osobnikowe grupy cieląt, przebywające w kojcu przez okres 14 dni, po tym czasie cielęta trafiły do kojców grupowych.

Kojce z wysuwanymi przegrodami (Fot. 1. D. Godyń)



Zbierano następujące dane: zwierzęta były ważone przy wejściu do kojca oraz po okresie 14 dni (fotografia 2.). Monitorowano zachowanie zwierząt, poprzez zapisy kamer. Prowadzona była dokumentacja dotycząca stanu zdrowotnego. Pobierana była sierść do analizy kortyzolu. Od wszystkich osobników objętych badaniem w 14. dniu życia, pobierany był omawiany materiał biologiczny w celu oznaczenia poziomu hormonu związanego z reakcją stresową. Próbkę sierści pobrane były z okolicy nasady ogona. Pobieranie materiału przebiegało w sposób niepowodujący stresu i cierpienia u zwierząt. Przy uwzględnieniu niewielkich modyfikacji, detekcja kortyzolu we włosach zostanie przeprowadzona za pomocą komercyjnego zestawu ELISA zgodnie z wytycznymi producenta (Cortisol Enzyme Immunoassay firmy Arbor Assays).

Ważenie cieląt (Fot. 2. D. Godyń)



Na podstawie pomiarów mikroklimatycznych ustalono, że temperatura powietrza podczas prowadzenia badań wynosiła średnio 19,6°C; wilgotność względna kształtowała się na poziomie 62%; prędkość ruchu powietrza wynosiła 0,07 m/s. Dzielne przyrosty masy ciała w pierwszych dwóch tygodniach kształtowały się na poziomie 460 g/dzień. Były to najwyższe przyrosty zanotowane od początku doświadczenia. Poziom zdrowotności cieląt utrzymywanych w kojach pojedynczych, w porównaniu do zwierząt utrzymywanych w parach, nie różnił się znacząco (biorąc pod uwagę także wcześniejsze powtórzenia). Nastąpiły pewnego rodzaju problemy z oceną zachowania zwierząt, z uwagi przede wszystkim na znaczną ilość materiału do analizy. Planowane jest, aby w kolejnym etapie doświadczenia użyć specjalistycznego oprogramowania Observer XT. Oczekuje się, że z tą technologią formy zachowań cieląt, istotne dla omawianego doświadczenia, będą łatwiejsze do uchwycenia i analizy. Z uwagi na długotrwałą procedurę przygotowywania próbek materiału biologicznego, w okresie sprawozdawczym nie udało się uzyskać wyników poziomu kortyzolu w sierści.

Zadanie 01-10-05-11

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

Produkty mleczne, zwłaszcza wytworzone z mleka krowiego, są głównym składnikiem diety ludzi na całym świecie, a ich spożycie stale rośnie. Niestety wiele badań sugeruje, iż rosnące spożycie produktów mlecznych może przyczyniać się do wzrostu ryzyka lub nasilenia objawów niektórych zaburzeń, w tym chorób przewodu pokarmowego oraz związanych z układem odpornościowym i stanami zapalnymi. Szczególną rolę w tym zakresie odgrywają białka mleka krowiego, które są powszechnym źródłem bioaktywnych peptydów uwalnianych w wyniku trawienia kazeiny i białek serwatkowych. W ostatnim czasie duże zainteresowanie, ze względów zdrowotnych wzbudza β -kazeina. Istnieje 12 genetycznych wariantów β -kazeiny jednak najczęstszymi wariantami genetycznymi są A1 i A2, które różnią się budową białka. Badania wykazały, iż powstająca w wyniku trawienia kazeiny typu A1 β -kazomorfina-7, może wpływać na rozwój niektórych ważnych chorób u ludzi. Głównymi czynnikami wpływającymi na obecność β -kazeiny typu A1 w mleku krowim są uwarunkowania genetyczne.

Celem realizowanego tematu była identyfikacja genetyczna krów pod kątem określenia wariantu β -kazeiny u krów rasy simental, określenie składu chemicznego mleka oraz wytworzenie i przebadanie produktów fermentowanych na bazie tego mleka. W mleku pochodzącym od tych krów został oznaczony skład chemiczny, zawartość frakcji białkowych oraz zawartość witamin. Mleko, pozyskane od krów z genem β -kazeiny typu A2, zostało ocenione pod względem przydatności do produkcji napojów fermentowanych. Badania genetyczne w celu oznaczenia genu β -kazeiny wykonano na pobieranym materiale biologicznym (sierści) w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt (ZBM). *Allele* CSN2 oszacowano stosując *Allelic Discrimination* z sondami TaqMan MGB znakowanymi VIC i FAM (system OneStep Real-Time PCR).

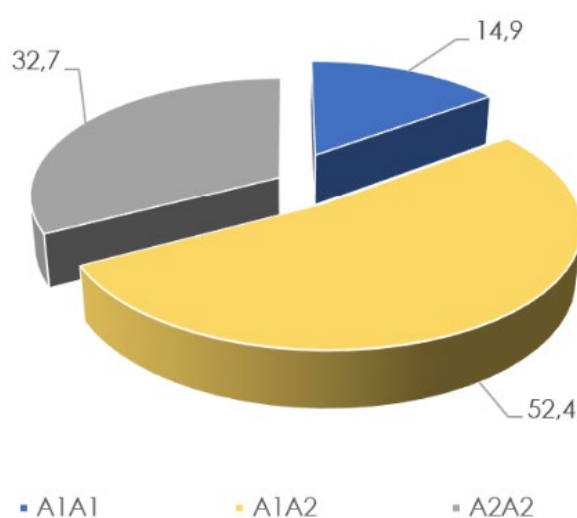
Wyniki produkcyjne oraz podstawowego składu chemicznego pozyskano na podstawie próbnych udojów. Analizy chemiczne mleka zostały wykonane zgodnie z przyjętą metodyką w Centralnym Laboratorium IZ PIB oraz na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Wykonano ocenę fizykochemiczną mleka, oznaczono zawartość aminokwasów oraz ocenę sensoryczną mleka. W Centralnym Laboratorium IZ PIB oznaczono zawartość witamin, kwasów tłuszczowych, makroelementów w mleku. Z pobranego mleka wyko-

nano także produkty fermentowane: jogurt, jogurt probiotyczny, kefir i maślanekę. W wytworzonych produktach określono: skład chemiczny, teksturę, kwasowość, aktywność antyoksydacyjną, mikrobiologię, barwę oraz wykonano ocenę sensoryczną produktów.

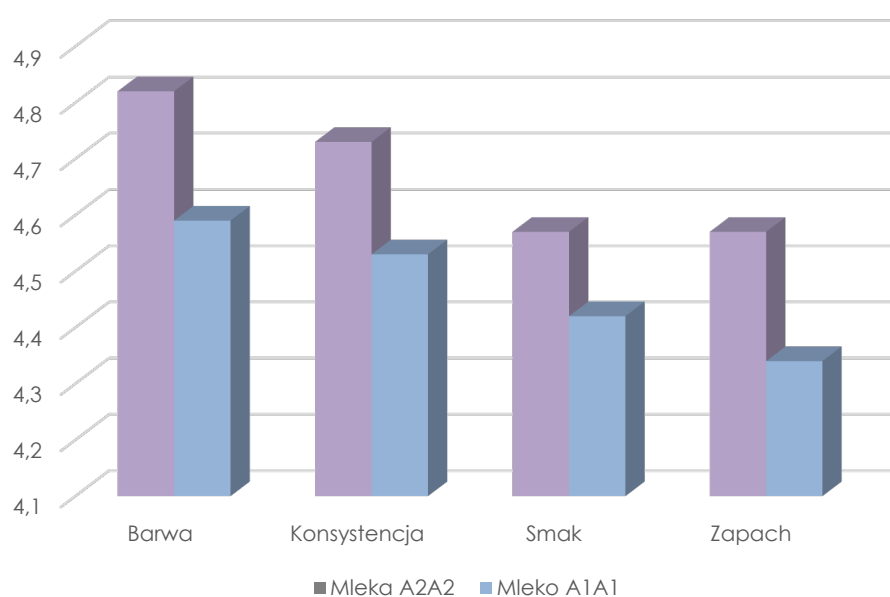
Na podstawie wykonanych badań genetycznych stwierdzono, iż w badanym stadzie bydła simentalskiego frekwencja genotypu A2A2 wynosił 32,7%, odsetek krów mlecznych posiadających genotyp A2A2 wynosił 29,7%, wyższy procent w/w genotypów stwierdzono u jałówek i cieląt. Znaczny procent zidentyfikowanych krów oraz młodzieży hodowlanej stanowiły genotypy A1A2, co daje podstawę do prowadzenia dalszej hodowli ukierunkowanej na produkcję mleka A2 w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o.

Wykres 1. Frekwencja genu β -kazeiny (A1A1, A1A2 i A2A2) w badanej populacji bydła w ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. (w %)

% udział genotypów w badanej populacji bydła simental



Wykres 2. Ocena sensoryczna mleka



Analiza produkcyjności ze względu na zidentyfikowany genotyp nie wykazała różnic w wydajności mlecznej w zależności od stwierdzonego genotypu. Podobnie nie stwierdzono różnic

w podstawowym składzie mleka ze względu na zidentyfikowany rodzaj genotypu. Zawartość białka, tłuszczu, laktozy kształtowała się na zbliżonym poziomie, a stwierdzone różnice nie były istotne. Otrzymane wyniki wskazują zatem, iż prace hodowlane w kierunku uzyskania stada jednolitego pod względem wariantu β -kazeiny A2 nie niosą z sobą ryzyka związanego z obniżeniem wydajności mlecznej czy zawartości składników w mleku. Wykonane oznaczenia zawartości witaminy wykazały nieco wyższą koncentrację witamin A i E w mleku A2, jednak różnice te nie były statystycznie istotne. W mleku A2 stwierdzono także wyższe zawartości: alfa kazeiny i kappa kazeiny. Analiza sensoryczna mleka wykazała, że mleko A2 zostało wyżej ocenione pod względem barwy, konsystencji, smaku i zapachu w porównaniu do mleka A1.

Na bazie mleka A1 i A2 wytworzono i oceniono napoje mleczne fermentowane, takie jak: jogurt, jogurt probiotyczny, kefir i maślankę. Stwierdzono, że jogurt, jogurt probiotyczny i maślanka wytworzone z mleka A2 cechowały się wyższą twardością, lepkością i gumowatością w porównaniu do produktów wytworzonych na bazie mleka A1. Natomiast kefir, powstający z mleka A2, charakteryzował się wyższymi wartościami wszystkich badanych parametrów, tj. wyższą twardością, lepkością, spójnością i gumowatością. Po trzytygodniowym okresie przechowywania wszystkie wytworzone napoje na bazie mleka A2 uzyskały wyższe wartości ocenianych parametrów.

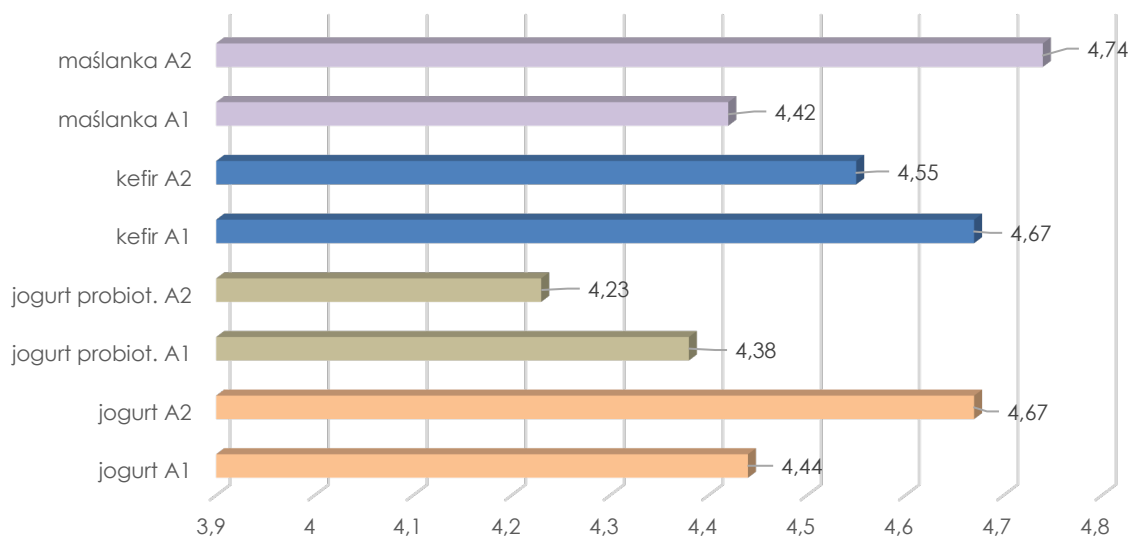
Tabela 1. Ocena produktów fermentowanych wytworzonych na bazie mleka A1 i A2

typ mleka fermentowanego	rodzaj mleka	twardość [G]	lepkość [Gxs]	spójność	gumowatość [G]
Po tygodniu przechowywania					
jogurt	A1A1	89,4985a	270,9270a	0,3875	34,7575a
	A2A2	99,8320b	299,1425b	0,3745	37,3740b
jogurt probiotyczny	A1A1	80,0950a	142,6930a	0,4415	35,3830a
	A2A2	93,4895b	265,8150b	0,4050	37,8515b
kefiry	A1A1	40,5120a	61,3325a	0,4750	19,2380a
	A2A2	49,2050b	115,2300b	0,4780	23,5325b
maślanka	A1A1	44,8315a	63,2395a	0,4940	22,1270a
	A2A2	50,7360b	133,7740b	0,4815	24,4115b
Po 3 tygodniach przechowywania					
jogurt	A1A1	98,2855a	321,8925a	0,3885	38,1885a
	A2A2	116,4340b	366,4015b	0,3885	45,1760b
jogurt probiotyczny	A1A1	101,7295a	225,4725	0,3840	39,0650a
	A2A2	127,4765b	223,4195	0,3890	49,5395b
kefir	A1A1	52,9310a	95,7670a	0,4390a	22,2080a
	A2A2	61,4425b	164,6345b	0,4675b	29,9410b
maślanka	A1A1	50,6190a	118,1110a	0,4850	25,5565a
	A2A2	64,0660b	143,1020b	0,5050	31,0330b

a, b – różnice istotne ($p \leq 0,05$) dla poszczególnych napojów A1A1 i A2A2

W ocenie sensorycznej wytworzone produkty fermentowane uzyskały zróżnicowane oceny. Wytworzone z mleka A2 jogurt i maślanka zostały najwyżej ocenione, natomiast w przypadku mleka A1 wyżej oceniono jogurt probiotyczny i kefir.

Wykres 3. Ogólna ocena sensoryczna napojów fermentowanych wytworzonych na bazie mleka A1A1 i A2A2 (w pkt.)



Otrzymane wyniki wskazują zatem, iż prace hodowlane w kierunku uzyskania stada jednolitego pod względem wariantu β -kazeiny A2 nie niosą z sobą ryzyka związanego z obniżeniem wydajności mlecznej czy zawartości składników w mleku. Wyniki przyczynią się do poszerzenia wiedzy na temat frekwencji poszczególnych genotypów β -kazeiny w stadzie bydła mlecznego Zakładu Doświadczalnego IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. oraz wytypowaniu i wydzieleniu krów homozygot pod względem genów kodujących β -kazeinę i produkujących mleko A2. Ponadto, badania te mogą przyczynić się do zwiększenia różnorodności asortymentu produktów mlecznych skierowanych do konsumentów zainteresowanych żywnością pochodzenia naturalnego, mającą właściwości prozdrowotne oraz osób z problemami trawiennymi.

Zadanie 01-10-06-11

Opracowanie metody szacowania wartości hodowlanych dla cech produkcyjnych za pomocą modelu dziennych próbnych udojów (TDM) w populacji bydła simentalskiego

kierownik zadania: prof. dr hab. Andrzej Żarnecki

Krajowa ocena wartości hodowlanej bydła rasy simentalskiej w zakresie cech wydajności mleka i jego składników opiera się na laktacjach 305-dniowych. W większości krajów, w tym członków INTERBULL do szacowania wartości hodowlanych cech produkcyjnych, stosuje się modele dziennych próbnych udojów (test day model TDM). Dzięki temu możliwe jest modelowanie indywidualnych krzywych laktacji uwzględniające efekty środowiskowe i genetyczne.

Celem zadania jest opracowanie metody szacowania wartości hodowlanej dla cech produkcyjnych oraz zawartości komórek somatycznych w oparciu o próbne udoje. Stosunkowo niewielka liczebność populacji bydła simentalskiego, a w szczególności jej struktura utrudniały wdrożenie metody TDM.

Pierwszy etap przewidywał utworzenie zbiorów danych i ich edycję, a także zbadanie struktury populacji pod kątem możliwości oszacowania parametrów genetycznych. Dane pobrano z systemu SYMLEK i utworzono zbiór próbnych udojów wykonanych między 5. a 305. dniem doju. Uwzględniono dzienną wydajność mleka, tłuszczu, białka i laktozy oraz zawartość tłuszczu, białka, laktozy, komórek somatycznych oraz mocznika. Krowy posiadające trzecią laktację musiały posiadać laktację drugą i pierwszą, a krowy posiadające drugą laktację musiały posiadać pierwszą laktację.

Zbiór poddany analizie zawierał 214 793, 156 611 oraz 107 001 próbných udojów odpowiednio z trzech pierwszych laktacji 28 306 krów, wycielonych w 2 858 stadach w latach 2003–2022. Utworzono 5 klas ocielenia (18–24, 25–26, 27–28, 29–30, 31–48 miesięcy) w pierwszej, 4 klasy (29–38, 39–41, 42–44, 45–65 miesięcy) w drugiej oraz 3 (41–51, 52–55, 56–75 miesięcy) w trzeciej laktacji. Przyjęto dwa sezony ocielenia: letni (IV–IX) i zimowy (X–III). Tabela 1. podaje liczbę buhajów uszeregowaną w zależności od liczby posiadanych w populacji córek – 2141 buhajów posiadało jedną córkę. Największa grupa buhajów posiadała od 2 do 10 córek, a zatem w populacji występowały niewielkie grupy sióstr i półsióstr, które są podstawowym elementem wiarygodnej oceny wartości hodowlanej. Utworzono 105 321 klas stado x data próbnego udoju oraz 24 klasy sezon x wiek ocielenia. Zbiór rodowodowy zawierał 41 676 zwierząt (krowy i ich rodzice).

Komponenty (ko)wariancji oszacowano wg dwucechowego modelu zwierzęcia z losowymi regresjami oraz Bayesowską metodą próbkowania Gibbsa programem gibbs2f90 z pakietu BLUPF90. W modelu liniowym uwzględniono stały efekt dnia doju w stadzie, stałą regresję w podklasach sezon x wiek ocielenia oraz losowe regresje dla efektu addytywnego genetycznego i efektu trwałego środowiskowego. Krzywe laktacji w podklasach sezon x wiek ocielenia modelowano za pomocą funkcji Wilminka, a pozostałe krzywe laktacji za pomocą wielomianów Legendre'a stopnia 2-go. Generowano 100 000 próbek, z których pierwsze 20 000 odrzucono, jako tzw. okres rozruchowy, a następnie zapisano co 5-tą próbkę. W celu otrzymania korelacji fenotypowych i genetycznych między wszystkimi cechami, obliczenia wykonano w 36 krokach, analizując cechy parami.

Tabela 1. Zestawienie liczby ojców wg liczby posiadanych córek

Liczba ojców	Liczba córek
2141	1
4909	2-10
253	11-20
130	21-30
79	31-40
66	41-50
97	51-100
129	>100

Odziedziczalność laktacyjnej wydajności mleka wyniosła 0,35, tłuszczu 0,35, białka 0,31 oraz laktozy 0,34. Odziedziczalność laktacyjnej zawartości tłuszczu w mleku wynosiła 0,72, zawartości białka 0,73, zawartości laktozy 0,61, zawartości komórek somatycznych 0,26 oraz zawartości mocznika 0,64.

Wartości otrzymanych odziedziczalności są zbliżone wielkością do parametrów uzyskiwanych i stosowanych w ocenie wartości hodowlanych w rasie holsztyńsko-fryzyjskiej. Przewiduje się zastosowanie otrzymanych oszacowań odziedziczalności w dalszych pracach nad wdrożeniem oceny wartości hodowlanej na podstawie próbných udojów (TDM) w populacji bydła simentaliskiego. Analiza struktury populacji bydła simentaliskiego i wiarygodne oszacowanie parametrów genetycznych wskazują na możliwość opracowania i wdrożenia metody próbných udojów do praktyki hodowlanej.

Zadanie 01-10-07-11

Frekwencja genu beta-kazeiny typu A2 u bydła mlecznego rasy polskiej czerwonej, jego wpływ na wyniki produkcyjne i zawartość składników prozdrowotnych

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

Ze względu na rosnącą liczbę osób cierpiących na liczne alergię pokarmowe, nietolerancje oraz choroby dietozależne, w tym związane z konsumpcją mleka, istnieje potrzeba przebadania i promowania mleka pochodzącego od krów o korzystnym typie β -kazeiny oraz produktów powstałych na bazie tego mleka. Najczęściej występującymi wariantami genetycznymi CSN2 są kazeina A1 i A2. Negatywne działanie wykazano w odniesieniu do kazeiny typu A1, gdyż podczas jego trawienia powstają pochodne opioidów (β -kazomorfin-7 - BCM-7), które pokonują barierę krew-mózg i mogą powodować nasilenie objawów w chorobach neurologicznych, takich jak autyzm i schizofrenia oraz wpływać na rozwój lub potęgować objawy niektórych chorób, takich jak miażdżyca, zespół nagłej śmierci niemowląt oraz chorób układu krążenia. Takich negatywnych właściwości natomiast nie wykazano w odniesieniu do mleka zawierające β -kazeinę typu A2.

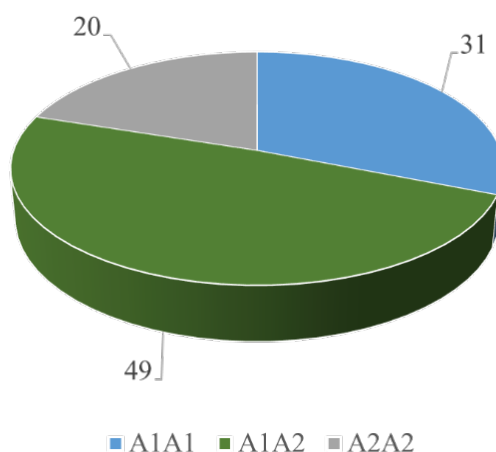
Czynnikami wpływającymi na obecność danego wariantu β -kazeiny w mleku krowim są uwarunkowania genetyczne. Aby je zidentyfikować konieczne są badania genetyczne, które umożliwiają prowadzenie dalszych prac hodowlanych w kierunku uzyskania jednolitego stada. Dlatego celem I etapu badań była identyfikacja krów i buhajów pod względem genu β -kazeiny krów rasy zachowawczej polskiej czerwonej. Oznaczenia polimorfizmu DNA w genie β -kazeiny wykonano w materiale biologicznym pozyskiwanym z cebulek włosowych.

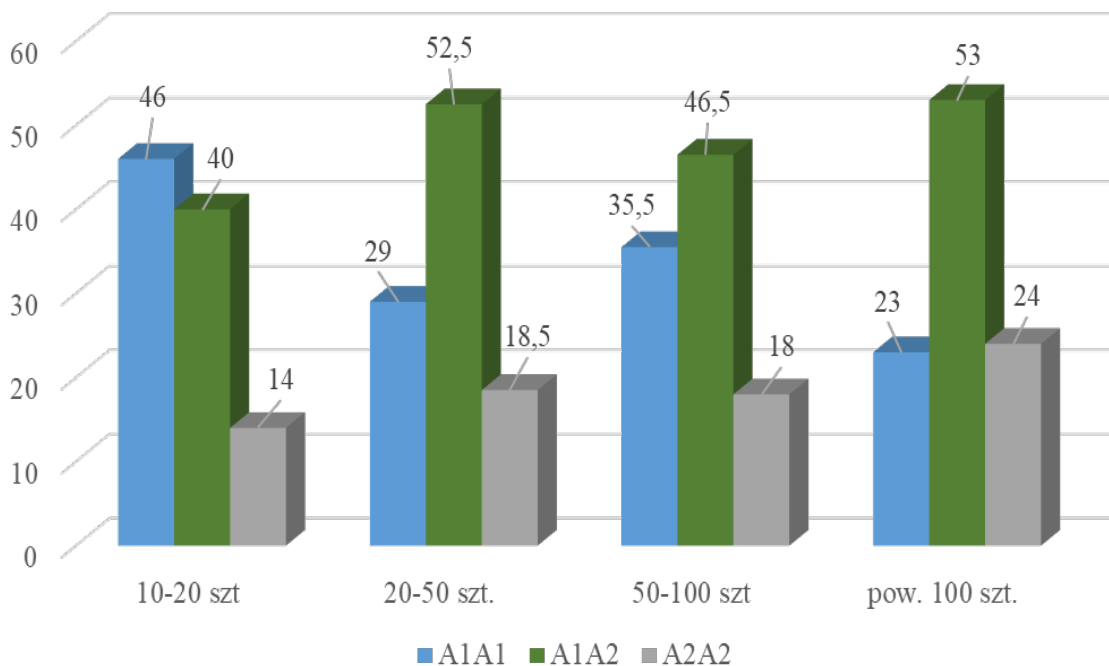
Pobrano materiał genetyczny do badań i wykonano oznaczenia genu β -kazeiny od 273 krów mlecznych rasy polska czerwona. Krowy te utrzymywane były w dwunastu gospodarstwach zlokalizowanych na terenie pow. limanowskiego. Liczebność krów w poszczególnych stadach wahała się od 10 do 109 krów.

Przeprowadzona u 273 krów rasy polskiej czerwonej identyfikacja genów kodujących β -kazeinę wykazała, iż ok 20% przebadanych krów jest homozygotami A2A2; 49% to heterozygoty A1A2 a ok. 30% to homozygoty A1A1.

Ze względu na wielkość stada frekwencja poszczególnych wariantów genu β -kazeiny u krów rasy polskiej czerwonej wykazywała zróżnicowanie. Najwięcej homozygot A2A2 stwierdzono w stadzie utrzymującym powyżej 100 sztuk – 24%. W stadach utrzymujących od 20 do 50 sztuk oraz od 50 do 100 sztuk frekwencja była taka sama i wyniosła ok. 18%.

Wykres 1. Frekwencja poszczególnych wariantów genu β -kazeiny (A1A1, A1A2 i A2A2) u krów rasy polskiej czerwonej



Wykres 2. Frekwencja poszczególnych wariantów genu β -kazeiny u krów rasy polskiej czerwonej ze względu na wielkość stada

Najwięcej homozygoty A1A1 stwierdzono w małych stadach utrzymujących od 10 do 20 sztuk bydła – 46%, natomiast najmniej w stadzie powyżej 100 sztuk – 23%. Heterozygoty A1A2, w zależności od wielkości stada, stanowiły od 40% (stada utrzymujące 10-20 sztuk) do 53% w większych stadach.

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.

W badaniach prowadzonych przez Cieślińską i in. (2019) na 24 buhajach i 177 krowach rasy polskiej czerwonej stwierdzono, iż częstość występowania genu β -kazeiny A2 w populacji polskiej czerwonej wynosiła 0,47. Ze względu na właściwości prozdrowotne mleka ras zachowawczych celowe jest także przebadanie buhajów reprodukcyjnych tych ras pod kątem częstotliwości występowania obydwu jej wariantów, a wysoka frekwencja *allelu* A2 β -kazeiny (0,58) wśród buhajów tej rasy może zwiększyć jego frekwencję wśród całej populacji (Cieślińska i in., 2019).

Zadanie 04-10-09-11

Możliwość wprowadzenia nowych podindeksów selekcyjnych w celu zwiększenia efektywności produkcji w zakresie płodności i wskaźników opasu bydła mięsnego

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

Celem niniejszego zadania było opracowanie nowych podindeksów selekcyjnych w hodowli bydła mięsnego w Polsce uwzględniających wskaźniki wartości opasowej i rzeżnej oraz cechy płodności, oszacowanie parametrów genetycznych cech opasowych i rzeżnych oraz płodności bydła mięsnego dla rasy limousine, charolaise i hereford, określenie związku pomiędzy wskaźnikami oszacowanymi przyżyciowo dotyczącymi opasu ze wskaźnikami poubojowymi. Opracowanie wariantów podindeksów selekcyjnych uwzględniających cechy płodności oraz

wskaźniki wartości opasowej i rzeźnej – dane z etapu I i II uzupełnione o zbiory z systemów eBovis i buhaje mięsne.

Badania prowadzone były równolegle na czterech poziomach: analizy płodności, analizy cech opasowych bydła mięsnego na poziomie gospodarstwa, analizy cech środowiskowych warunkujących efektywność produkcji oraz analizy cech wydajności rzeźnej bydła skierowanego do uboju. Wszystkie poziomy stanowiące dwa główne cele badawcze były realizowane przez cały okres badawczy zadania (trzy lata) w oparciu o gromadzone dane z systemów, jak i pochodzące z wytypowanych do badań gospodarstw i ubojni. W ostatnim roku w oparciu o pozyskane dane opracowano podindeksy selekcyjne (podindeks łatwości wycieleń oraz podindeks budowy kończyn). W pierwszym roku wytypowane zostało 15 gospodarstw utrzymujących stada bydła mięsnego rasy LM, CH oraz HH, w których rozpoczęto stały monitoring produkcyjny oparty o ankietyzację oraz gromadzenie danych bezpośrednio w gospodarstwie. Materiał doświadczalny – wszelkie obliczenia i analizy statystyczne były wykonywane na danych dotyczących trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine (LM), charolaise (CH), hereford (HH). Dla każdej z wybranych ras został przygotowany zbiór danych skonstruowany na podstawie informacji o buhajach ocenianych pod względem cech pokroju i mięsności. Liczba buhajów w zbiorze wynosiła dla rasy LM ok. 3200, dla CH ok. 500, a dla HH ok. 400. Pobierane dane zostały zanonimizowane.

Dla każdej z wybranych ras został skonstruowany zbiór danych dotyczących osobnika, obejmujący dane rodowodowe, produkcyjne i poubojowe. W celu utworzenia podindeksu płodności opracowano strukturę baz danych zawierających informację o cechach płodności krów, pokrytych lub unasienionych nasieniem buhajów hodowlanych. Informacje zawarte w podstawowym zbiorze danych zostały również wykorzystane do obliczenia wielkości grup półsióstr i podklas stado/rok/sezon ocielenia (HYS) oraz wyznaczenia ich rozkładów. Grupy półsióstr stanowiły krowy mające tego samego ojca, a podklasy HYS utworzone zostały w oparciu o informacje o oborze, roku i sezonie oceny, przy czym sezon letni obejmuje okres od kwietnia do września, a zimowy – od października do marca.

Do oszacowania parametrów genetycznych i fenotypowych cech zdolności udojowej krów wykorzystany został podstawowy zbiór danych. Odziedziczalności, korelacje genetyczne i fenotypowe zostały oszacowane za pomocą pakietu BLUPF90 (Misztal, 2008). W pakiecie tym wykorzystano m.in. programy renumf90, gibbsf90, airemlf90, w których zaimplementowano najważniejsze metody stosowane przy estymacji komponentów (ko)wariancji: metodę REML oraz metodę Bayesowską. Uporządkowanie zbioru danych oraz przenummerowanie efektów stałych i losowych wykonano przy pomocy renumf90.

Oszacowania komponentów (ko)wariancji addytywnych i środowiskowych za pomocą obu metod przeprowadzano wielokrotnie na podstawie modelu obserwacji uwzględniającego różną kombinację efektów stałych i losowych. Otrzymane wyniki pozwoliły na wybór optymalnego modelu szacowania parametrów genetycznych cech zdolności udojowej. Z kolei, oszacowanie wartości hodowlanej pod względem cech pokroju oraz łatwości wycieleń przeprowadzono za pomocą programów zaimplementowanych w pakiecie BLUPF90 (Misztal, 2008). Wartość hodowlaną oszacowano za pomocą metody BLUP – w oparciu o dwucechowy model zwierzęcia. Model liniowy obserwacji składał się z tych samych efektów, które uwzględnione zostały przy estymacji parametrów genetycznych.

W ramach przeprowadzonej analizy, zgromadzono materiał obejmujący wyniki rutynowej oceny fenotypowej cech pokroju oraz płodności buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine (LM), charolaise (CH), hereford (HH). Dla każdej z wybranych ras został przygotowany zbiór danych skonstruowany na podstawie informacji o buhajach ocenianych pod względem cech pokroju i mięsności. Liczba buhajów wynosiła dla rasy LM – 3858, dla CH – 597, a dla rasy HH – 458. W okresie od 2014 do 2022 roku liczba porodów

łatwych była wysoka, osiągając około 16 000 przypadków, co stanowiło aż 98% wszystkich porodów. Porody z kategorii od 2 do 6, czyli porody skomplikowane, trudne, ciężkie, z embrio-transferu lub poronienia, były stosunkowo rzadkie w polskiej populacji buhajów mięsnych. Przeprowadzona analiza fenotypowych cech płodności buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine, charolaise i hereford – dostarcza istotnych informacji dla hodowców i naukowców. Badania wykazały, że rasy te charakteryzują się dobrą płodnością z wysoką liczbą porodów łatwych. Waga urodzeniowa buhajów z roku na rok rośnie, co może wpływać na ich dalszy rozwój i wzrost. Analiza cech budowy zadu wskazała na wysokie średnie wartości punktowe w ocenie pokroju dla długości zadu, szerokości w biodrach, szerokości w kulszach i szerokości zadu. To sugeruje, że badane rasy mają korzystne cechy anatomiczne, które mogą przyczyniać się do łatwiejszego przebiegu porodów.

Wyniki opisanych badań mają istotne znaczenie dla dalszych prac hodowlanych. Płodność jest kluczowym aspektem w hodowli bydła mięsnego, ponieważ wpływa na populację, wydajność i efektywność produkcji. Badania fenotypowych cech płodności buhajów pozwalają hodowcom dokonywać świadomych wyborów hodowlanych, aby poprawić płodność i inne istotne cechy u przyszłych potomków. Wnioski z przeprowadzonych badań mogą zostać wykorzystane do opracowania optymalnej postaci podindeksu selekcyjnego, który będzie uwzględniał cechy płodności. Taki podindeks selekcyjny pozwoli hodowcom skupić się na rozwijaniu i utrwalaniu pozytywnych cech płodności w badanych rasach bydła mięsnego.

W ramach realizacji zadania, dane z poprzedniego roku sprawozdawczego uzupełniono i wzbogacono o informacje obejmujące wyniki rutynowej oceny fenotypowej cech pokroju buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine (LM), charolaise (CH), hereford (HH) za 2022 rok. Wzbogacając i uzupełniając utworzony w poprzednim roku sprawozdawczym zbiór danych, przeprowadzono charakterystykę fenotypową cech płodności oraz cech pokroju związanych z lokomocją. Do edycji danych i przeprowadzania operacji na zbiorach danych (tzn. ich czytania, zapisywania, dokonywania zmian struktury, sortowania, wyszukiwania rekordów spełniających określone warunki, gromadzenia i łączenia informacji pochodzących z kilku plików źródłowych) zostało wykorzystane oprogramowanie własne napisane w języku R oraz z wykorzystaniem pakietu MS Excel, kompilowane i uruchamiane na serwerach Instytutu Zootechniki PIB. Liczebność i struktura danych spełniają warunki niezbędne do realizacji tego etapu badań.

Liczebności (N), średnie oraz wartości minimalne i maksymalne cech budowy zadu, które zostały wytypowane w poprzednim roku sprawozdawczym do utworzenia podindeksu płodności dla ras trzech najczęściej występujących w Polsce ras bydła mięsnego

Zgromadzone dane pochodzą z oceny przeprowadzonej w latach 2000–2022. Dla wszystkich trzech ras oceniano cztery cechy budowy zadu. Cechy te związane są z predyspozycjami produkcyjnymi, ale też i łatwością ocieleń, która wpływa m.in. na cechy płodności zwierząt. Po uzupełnieniu zbioru z poprzedniego roku sprawozdawczego o dane za 2022 rok w rasie limousine dla długości zadu przeprowadzono 187 352 oceny, dla szerokości w biodrach – 191 131 pomiarów, dla szerokości w kulszach – 184 542 oceny, a dla szerokości zadu – 186 517 ocen. Dla rasy tej przyjęto następującą punktację dla poszczególnych cech budowy zadu: dla długości zadu, szerokości w biodrach oraz w kulszach minimalna wartość oceny wynosiła 2 punkty, zaś maksymalna 10 punktów, natomiast dla szerokości zadu ocena mieściła się w przedziale od minimum 3 do maksimum 10 punktów. Średnie wartości z przeprowadzonych ocen w rasie limousine dla wszystkich analizowanych cech budowy zadu uzyskały wysoką punktację, która wynosiła: dla długości zadu – 7,41 punktu, dla szerokości w biodrach – 7,53 punktu, dla szeroko-

kości w kulszach – 7,29 punktu oraz dla szerokości zadu – 7,46 punktu. W rasie charolaise przeprowadzono od 17 070 (dla szerokości zadu) do 19 481 (dla szerokości w biodrach) pomiarów cech budowy zadu. W rasie tej przyjęto punktację mieszczącą się w przedziale od minimum 4 do maksimum 10 punktów (dla długości zadu i szerokości w biodrach) oraz od min. 3 do maks. 10 punktów (dla szerokości w kulszach i w zadzie). Przeciętna ocena poszczególnych cech pokroju zadu w rasie charolaise wynosiła: dla długości zadu – 7,46 punktu, dla szerokości w biodrach – 7,57 punktu, dla szerokości pomiędzy guzami kulszowymi – 7,23 punktu oraz dla szerokości zadu – 7,40 punktu. W rasie hereford wykonano od 16 437 (dla szerokości w kulszach) do 17 098 (dla długości zadu) pomiarów, przyjmując przedział punktacji dla poszczególnych cech pokroju od 3 do 9 punktów dla szerokości w kulszach, od 4 do 9 punktów dla szerokości w zadzie, od 4 do 10 punktów dla szerokości w biodrach oraz od 5 do 10 punktów dla długości zadu. Średnia punktacja dla analizowanych cech w rasie hereford wynosiła: dla długości zadu – 7,63 punktu, dla szerokości bioder – 7,52 punktu, dla szerokości pomiędzy guzami kulszowymi – 7,32 punktu i dla szerokości zadu – 7,34 punktu.

Zależność liniowa pomiędzy cechami budowy zadu a rokiem urodzenia bydła mięsnego w polskiej populacji objętej oceną użytkowości mięsnej

Dla długości zadu stwierdzono ujemny trend u zwierząt urodzonych pomiędzy latami 2000 a 2003 – spadek z oceny na poziomie 8,0 punktów do oceny 7,2 punktu. Dla zwierząt urodzonych w latach 2003–2022 stwierdzono dodatni wpływ roku urodzenia na punktację uzyskaną dla długości zadu (wzrost z 7,2 do 7,7 punktu) z wyjątkiem załamania dodatniego trendu w efekcie roku urodzenia na długość zadu u sztuk wycielonych w 2006 oraz 2014 roku. U bydła urodzonego w latach 2001–2012 zaobserwowano dodatni trend w efekcie roku urodzenia na szerokość w biodrach – od wartości oceny na poziomie 7,4 (zwierzęta urodzone w 2001 roku) do 7,6 punktu (zwierzęta urodzone w 2004 roku). Dla bydła ocielonego w 2006 roku, stwierdzono obniżenie pozytywnego trendu w ocenie dla szerokości bioder ponownie do wartości 7,4 punktu. Dla urodzeń pomiędzy 2006 a 2012 rokiem tendencja dodatnia dla tej cechy pokroju zadu utrzymywała się na wyrównanym i stabilnym poziomie wynoszącym około 7,6 punktu. Dla wycieleń w latach 2012–2014 odnotowano ponowny spadek wartości dla szerokości w biodrach – ponownie do 7,4 punktu. Dla urodzeń od 2015 roku, stwierdzono pozytywny wpływ roku wycielenia na ocenę punktową dla szerokości w biodrach – od 7,4 punktu dla 2015 roku do ponad 7,7 punktu dla 2022 roku. Krzywa regresji liniowej dla zależności pomiędzy rokiem urodzenia a szerokością w kulszach charakteryzowała się podobnymi tendencjami jak w przypadku krzywej wyznaczonej dla szerokości bioder. Stwierdzono pozytywny trend wpływu roku urodzenia na szerokość między guzami kulszowymi, dla której oceny wartości wynosiły od 7,0 pkt w roku 2000 do 7,5 pkt w 2022 roku. W odniesieniu do cechy – szerokości zadu w pierwszych latach prowadzonej oceny, tj. dla zwierząt urodzonych w latach 2000–2002 stwierdzono dynamiczny wzrost ilości punktów przyznanych za omawianą cechę – z 7,0 punktów do 7,4 punktu. Na przelocie lat 2002/2003 efekt roku urodzenia na ocenę szerokości zadu kształtował się na ujemnym poziomie, obniżając się ponownie do wartości 7,0 punktów. Dla bydła urodzonego w latach 2003–2022 trend ten osiągnął pozytywny wymiar i stopniowo poprawiała się ocena dla tej cechy budowy zadu osiągając przedział wartości od 7,0 do 7,7 punktu w 2022 roku.

Ustalenie wag cech wykorzystywanych w podindeksach

Kolejnym z etapów opracowania podindeksów selekcyjnych było ustalenie ważności oraz wag zaproponowanych do wykorzystania w podindeksach cech. W wyniku przeprowadzonego

przeglądu literatury ustalono, że najlepszą do tego metodą będzie metoda subiektywna – nadanie wag cechom w wyniku dyskusji hodowców, związków i naukowców zaangażowanych w hodowlę bydła mięsnego. W celu zgromadzenia odpowiedzi od uczestników dyskusji dotyczącej wag cech przygotowano ankietę, w której poproszono ankietowanych o ustalenie kolejności cech w podindeksach i przyporządkowanie tym cechom odpowiedniej wartości punktowej, tak aby ich suma wynosiła 100.

Jako najważniejsze w podindeksie płodności zostały wskazane cechy – waga urodzeniowa oraz ocena porodu, uzyskując odpowiednio 265 i 260 punktów. Cechy te były również najczęściej wskazywane jako pierwsze w kolejności w ostatecznej postaci podindeksu. Najmniej ważne dla ankietowanych okazały się cechy związane z budową zadu – długość i szerokość zadu, uzyskując odpowiednio 84 i 83 punkty.

Najistotniejsza w podindeksie budowy kończyn została wskazana postawa nóg tylnych, uzyskując 470 punktów. Jednoznacznie została ona wskazana jako najważniejszą dla tego indeksu. Najmniej ważną według ankietowanych cechą okazała się cecha obwód nadpęcia, uzyskując 165 punktów. Cecha ta została wskazana jako trzecia w kolejności w ostatecznej postaci tego indeksu. W ostatnim roku sprawozdawczym zostały przedstawione finalne postaci podindeksów. Analizując tabelę dotyczącą parametrów genetycznych można stwierdzić, że współczynniki odziedziczalności wskazują, jak duży procent zmienności danej cechy jest związany z czynnikami genetycznymi. W przypadku cech pokroju bydła mięsnego, współczynniki odziedziczalności są stosunkowo wysokie, co oznacza, że geny odgrywają istotną rolę w ich kształtowaniu. Współczynniki korelacji genetycznych wskazują jak silnie powiązane są ze sobą cechy pod względem genetycznym. W przypadku cech pokroju bydła mięsnego, korelacje genetyczne są często wysokie, co oznacza, że cechy te są ze sobą silnie skorelowane.

Oszacowanie współczynników korelacji genetycznych i fenotypowych

Współczynniki korelacji fenotypowych wskazują jak silnie powiązane są ze sobą cechy pod względem fenotypowym. W przypadku cech pokroju bydła mięsnego, korelacje fenotypowe są często nieco niższe niż korelacje genetyczne, co oznacza, że na cechy te wpływają również czynniki środowiskowe. Analizując tabelę, można stwierdzić, że cechy pokroju bydła mięsnego są silnie skorelowane ze sobą. Na przykład, kaliber, obwód nadpęcia i szerokość klatki piersiowej są silnie skorelowane ze sobą, co oznacza, że zwierzęta o dużym kalibrze mają również duży obwód nadpęcia i szeroką klatkę piersiową. Podobne korelacje można zaobserwować między innymi cechami, takimi jak szerokość klatki piersiowej i szerokość między łopatkami, szerokość grzbietu i grubość mięśnia grzbietu, długość grzbietu i długość zadu, wysklepienie mięśnia uda i długość mięśnia uda, szerokość w biodrach i szerokość w kulszach, szerokość zadu i szerokość w kulszach, postawa nóg tylnych i postawa nóg przednich. Wysokie korelacje między cechami pokroju bydła mięsnego oznaczają, że wybór zwierząt na podstawie jednej cechy może mieć wpływ na inne cechy. Na przykład, wybór zwierząt o dużym kalibrze może również zwiększyć prawdopodobieństwo, że będą miały duży obwód nadpęcia i szeroką klatkę piersiową. Współczynniki odziedziczalności w tabeli wskazują, że geny odgrywają istotną rolę w kształtowaniu cech pokroju bydła mięsnego. W przypadku niektórych cech, takich jak kaliber, obwód nadpęcia i szerokość klatki piersiowej, geny odpowiadają za nawet 80% zmienności danej cechy. Wysokie współczynniki odziedziczalności oznaczają, że selekcja zwierząt na podstawie cech pokroju może być skutecznym sposobem poprawy tych cech.

Propozycje podindeksu – IWYCIEL

$$1. IWYCIEL_1 = 0,5 \times WH_OMW + 0,3 \times WH_ŁW + 0,1 \times WH_WG + 0,1 \times WH_CP$$

WH_OMW – wartość hodowlana, okres międzywycieleniowy

WH_ŁW – wartość hodowlana łatwość wycieleń

WH_WG – wartość hodowlana waga urodzeniowa

WH_CP – wartość hodowlana cech pokroju

Wszystkie trzy propozycje indeksów cech płodności dla bydła mięsnego uwzględniają cztery cechy: okres międzywycieleniowy, łatwość wycieleń, wagę urodzeniową i cechy pokroju. Różnią się one jednak wagą przypisaną poszczególnym cechom.

Należy również pamiętać, że wagi indeksu są zmienne w czasie. Wraz z rozwojem wiedzy o hodowli bydła mięsnego mogą być one zmieniane, aby uwzględniać nowe informacje i cele hodowlane.

Propozycja podindeksu – IKON

$$1. IKON = 0,5 \times WH_PNT + 0,25 \times WH_PNP + 0,25 \times WH_ON$$

WH_PNT – wartość hodowlana postawa nóg z tyłu

WH_PNP – wartość hodowlana postawa nóg z przodu

WH_ON – wartość hodowlana obwód nadpęcia

Oba warianty indeksu IKON uwzględniają trzy cechy: postawę nóg tylnych, postawę nóg przednich i obwód nadpęcia. Różnią się one jednak wagą przypisaną poszczególnym cechom.

Po opracowaniu wariantów indeksów przeprowadzono symulacje i obliczenia rankingów buhajów uczestniczących w ocenie wartości hodowlanej. Dla każdego z wytypowanych buhajów wyliczono wartości poszczególnych wariantów obu indeksów i wskazano dla każdego z buhajów najbardziej korzystny dla niego wariant indeksu płodności IWYCIEL oraz indeksu budowy kończyn – IKON.

Wszystkie zamierzenia, cel naukowy oraz praktyczny, który zakładał skonstruowanie nowych podindeksów selekcyjnych uwzględniających cechy mięsności i płodności w aspekcie poprawy ekonomiki produkcji bydła mięsnego zostały zrealizowane zgodnie z zaplanowanym zadaniem badawczym. Między opracowanymi indeksami selekcyjnymi występują silne korelacje, jednakże zdefiniowane indeksy selekcyjne pozwalają hodowcy na wybór takiego kryterium selekcyjnego, które najbardziej odpowiada założonemu przez niego celowi hodowlanemu.

Zadanie 04-10-10-11

Wykorzystanie alternatywnej populacji referencyjnej w genomowej ocenie wartości hodowlanej bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Celem badań była analiza oraz wdrożenie nowych rozwiązań w zakresie budowy populacji referencyjnej, wykorzystywanej w ocenie genomowej wartości hodowlanej bydła mlecznego rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, w oparciu o jednostopniowe modele oceny.

Optymalizacja populacji referencyjnej męskiej (buhaje) w stosunku do aktualnego modelu populacji referencyjnej wykorzystywanej w:

a) imputacji genotypów,

- b) estymacji genomowej oceny wartości hodowlanej z wykorzystaniem modelu dwustopniowego oraz jednostopniowego.

Wprowadzenie do populacji referencyjnej krów:

- a) imputacji genotypów,
b) estymacji genomowej oceny wartości hodowlanej z wykorzystaniem modelu dwustopniowego oraz jednostopniowego.

Populacja referencyjna jest to grupa zwierząt posiadająca dane fenotypowe oraz określony własny profil genetyczny. Celem populacji referencyjnej jest (w modelach dwustopniowych) oszacowanie efektów markerów SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism* w skrócie SNP) związanych z daną ocenianą cechą (krok 1.). Na podstawie oszacowań efektów SNP (krok 2.) możliwe jest uzyskanie dokładnej oceny wartości hodowlanej już dla bardzo młodych osobników (praktycznie zaraz po urodzeniu). Dane fenotypowe zwierząt populacji referencyjnej pochodzą z konwencjonalnej oceny wartości hodowlanej i są estymowane, w zależności od grupy cech, z wykorzystaniem różnych modeli statystycznych.

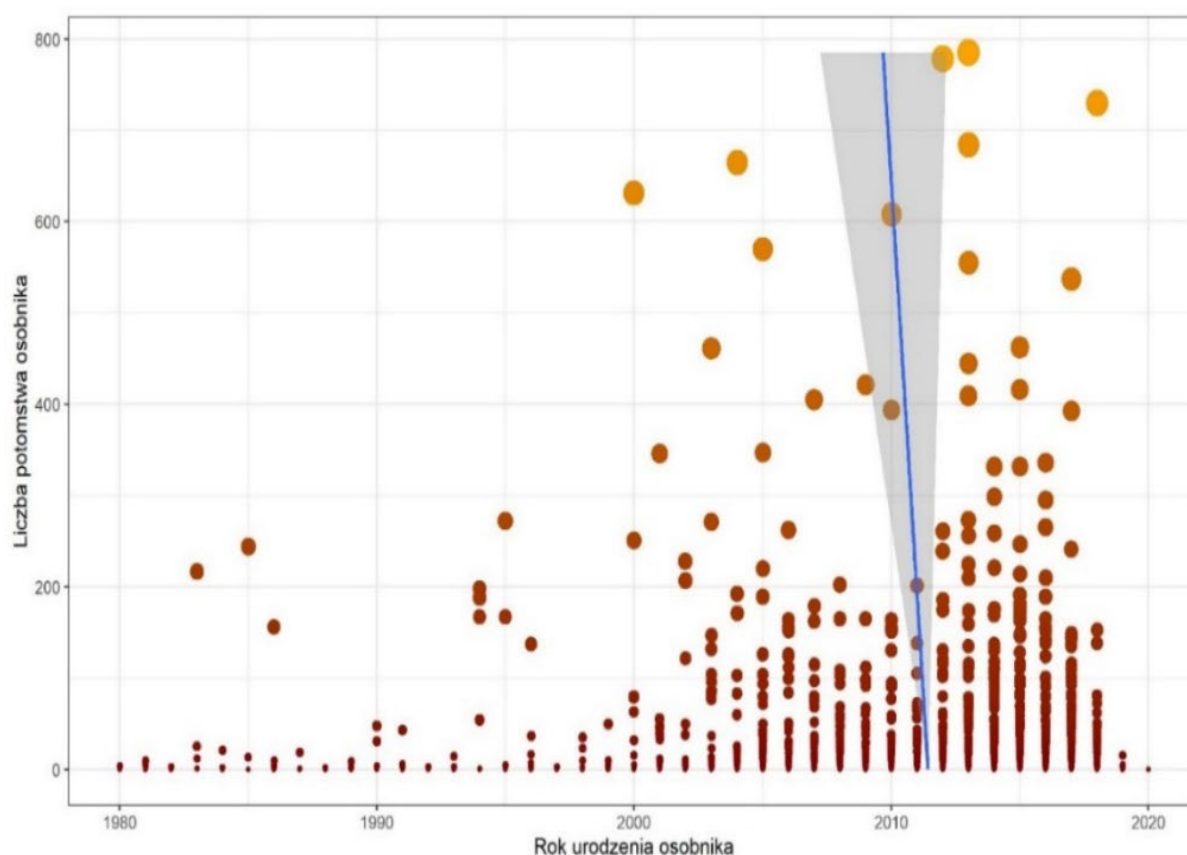
Profil genetyczny zwierząt w „erze genomowej” określa się najczęściej z wykorzystaniem mikromacierzy SNP, które winny zawierać ponad 50 000 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Mikromacierze są wtedy określane mianem chipów średniego pokrycia (*medium density* lub MD), przy czym w badaniach naukowych oraz w rutynowych zadaniach dedykowanych dla bydła mlecznego wykorzystywane są mikromacierze od 3 000 – 10 000 SNP (*low density*) do nawet 800 000 SNP (*high density*). Istotnym elementem do uzyskania dokładnej genomowej oceny wartości hodowlanej jest skład populacji referencyjnej. Aktualnie, w wielu krajach, w tym w Polsce, wykorzystuje się populację referencyjną składającą się głównie z buhajów. W celu jak najlepszego scharakteryzowania wszystkich zależności występujących w genomie wraz z ich wpływem na cechy oceniane rutynowo do populacji referencyjnej wybiera się wszystkie użytkowane buhaje posiadające wysoką liczbę córek w ocenie wartości hodowlanej, jak i te o niskiej liczbie córek. Uzyskanie wysokiej dokładności oceny wartości hodowlanej zależy również od wielkości populacji referencyjnej. Z tego też powodu, zawiązywane są dedykowane organizacje, które mają na celu współdzielenie zwierząt, głównie buhajów populacji referencyjnych. Takim przykładem może być Spółdzielnia EuroGenomics, której członkiem od 2012 roku jest Polska, a w chwili obecnej współdzielonych jest ponad 35 000 buhajów. Zwiększenie liczebności populacji referencyjnej, przekładającej się na zwiększenie dokładności genomowej oceny, stało się w ostatnim dziesięcioleciu istotnym elementem badań obejmujących czołowe na świecie hodowle bydła HF. Jedną z głównych propozycji na zwiększenie dokładności oceny, poprzez zwiększenie liczebności populacji referencyjnej, jest włączenie do niej krów ocenianych w krajowych systemach oceny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wprowadzania do oceny nowych cech, takich jak np. *mastitis*, *metritis* czy ketoza, które są nisko odziedziczalne. Dlatego włączenie do populacji referencyjnej buhajów krów wydaje się celowe, mimo niższego niż w przypadku buhajów współczynnika przeniesienia (1 buhaj ~ 7 krów w zależności od zastosowanego scenariusza oceny), ponieważ krajowe cele hodowlane realizowane są również przez stronę żeńską.

W ramach zadania została przeanalizowana oraz oceniona aktualna struktura populacji referencyjnej, w której liczebność populacji referencyjnej – w zależności od modelu badawczego – jest zmienna dla poszczególnych analizowanych cech. Dla zwierząt ocenianych rutynowo w ramach genomowej oceny wartości hodowlanej liczebność ta może wynosić od ponad 5 000 buhajów (cechy pokroju oraz cechy płodności przy wykorzystaniu krajowej populacji referencyjnej) ponad 35 000 buhajów (cechy produkcyjne oraz wybrane cechy pokroju przy wykorzystaniu referencyjnej populacji EuroGenomics).

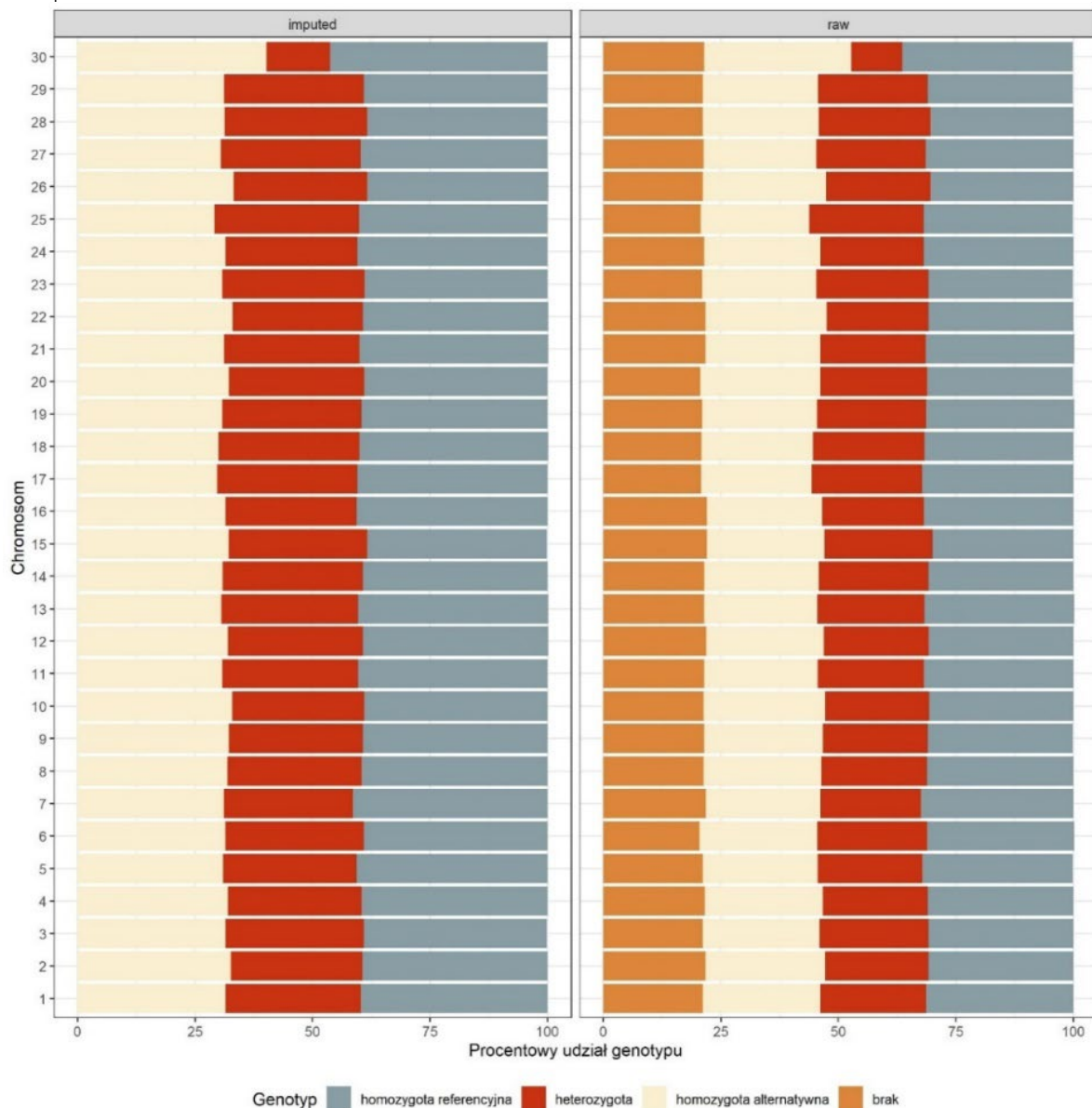
Analiza roku urodzenia osobników (głównie ojcowie) w zależności od wielkości potomstwa wykazała, że najwięcej osobników posiadających największą liczbę potomstwa urodziło się po 2000 roku (wykres 1.). Należy zwrócić uwagę na charakterystyczną linię odcięcia (po 2010 roku), od kiedy rutynowo zaczęto wykorzystywać buhaje selekcjonowane genomowo, i to one obecnie tworzą główną część populacji referencyjnej użytkowanej w Polsce.

Kolejnym krokiem analizy był wybór zwierząt do alternatywnych modeli populacji referencyjnej oraz imputacja. Finalnie, imputowane zbiory zostały poddane analizie, w których oceniono dokładność imputacji oraz frekwencję imputowanych markerów, w zależności od chromosomu, modelu alternatywnej populacji oraz oprogramowania. Nie zidentyfikowano istotnych różnic pomiędzy badanymi modelami, a wyniki imputacji w zależności od chromosomu zostały zaprezentowane na wykresie 2. Różnice we frekwencji poszczególnych genotypów SNP nie różniły się znacząco w zależności od chromosomu dla zbioru z brakującymi obserwacjami oraz dla zbioru po imputacji.

Wykres 1. Analiza liczby potomstwa w zależności od roku urodzenia osobników wraz z linią regresji tworzącą linię odcięcia pomiędzy osobnikami selekcionowanymi na potomstwie (lewa część wykresu) oraz selekcionowanymi genomowo (prawa strona wykresu)



Wykres 2. Analiza frekwencji imputowanych SNP w zależności od chromosomu z wykorzystaniem oprogramowania findhap



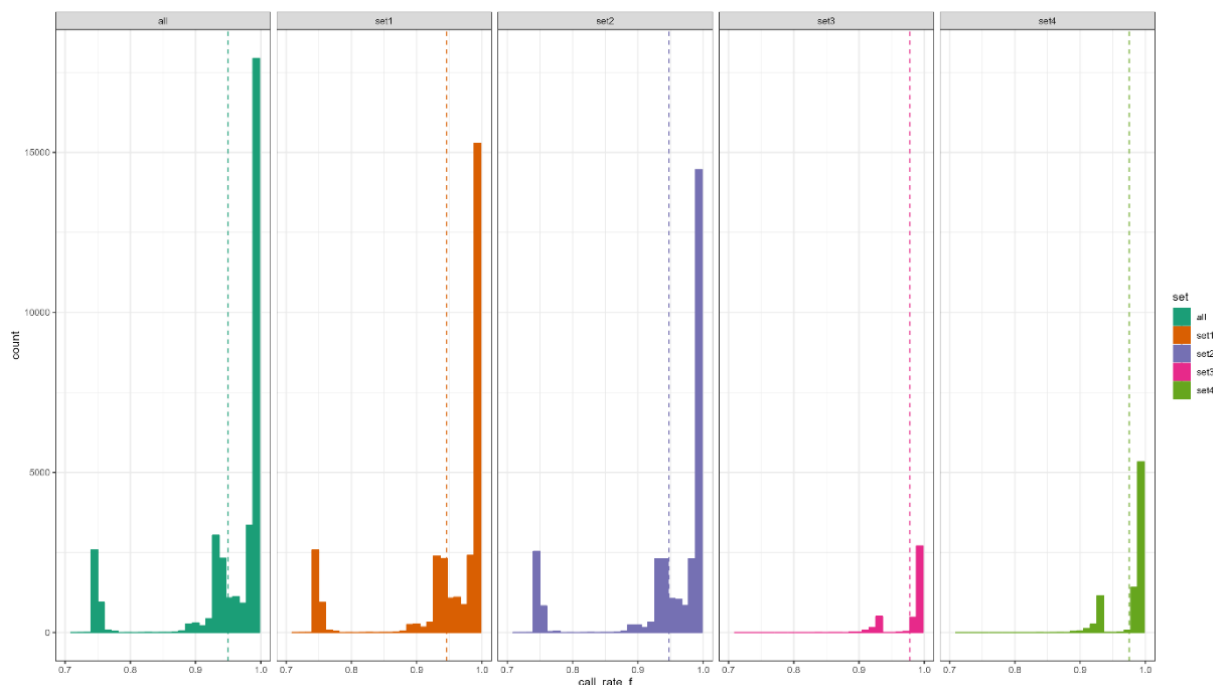
Została wykonana imputacja wszystkich dostępnych genotypów (aktualizacja danych względem roku 2021) ze szczególnym uwzględnieniem genotypów zwierząt do poszczególnych scenariuszy analizy.

Pełen zestaw genotypów liczący ponad 37 000 zwierząt podzielony został na scenariusze uwzględniające:

- pełen zestaw danych (ponad 37 000 buhajów w populacji referencyjnej);
- set1 – wykorzystanie tylko materiału męskiego (ponad 32 000 buhajów w populacji referencyjnej);
- set2 – wykorzystanie tylko materiału męskiego z pominięciem buhajów amerykańskich (ponad 30 000 buhajów w populacji referencyjnej);
- set3 – wykorzystanie tylko materiału męskiego z Polski (ponad 5000 buhajów w populacji referencyjnej);
- set4 – wykorzystanie zwierząt z Polski (ponad 10 000 buhajów i krów w populacji referencyjnej).

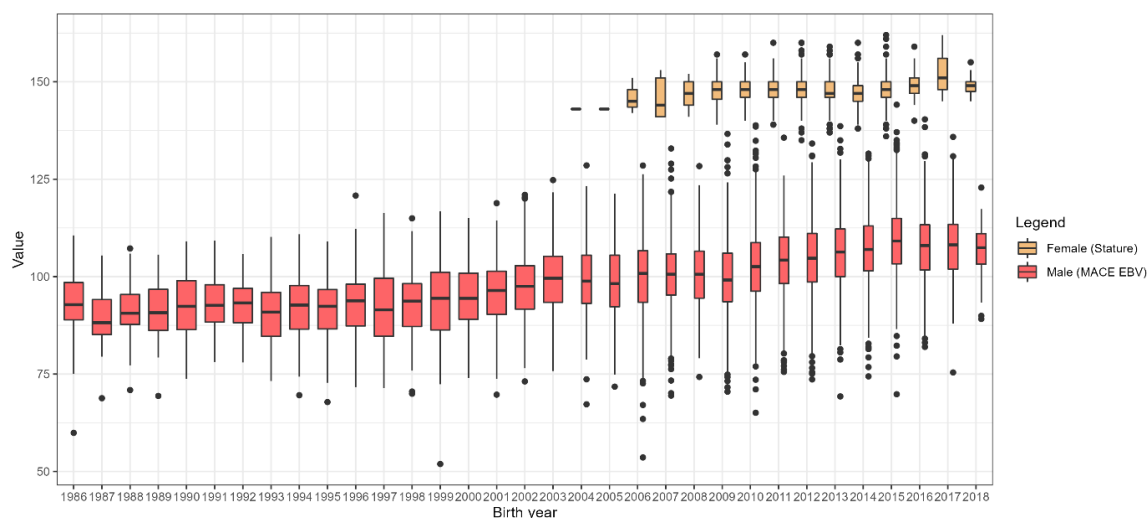
Zwierzęta w każdym z przyjętych scenariuszy zostały genotypowane z użyciem macierzy Illumina BovineSNP50 v2 i charakteryzowały się różnym rozkładem *call rate*, co zostało przedstawione na wykresie 3.

Wykres 3. Rozkład *call rate* w zależności od wybranego zbioru analizy danych w populacji referencyjnej

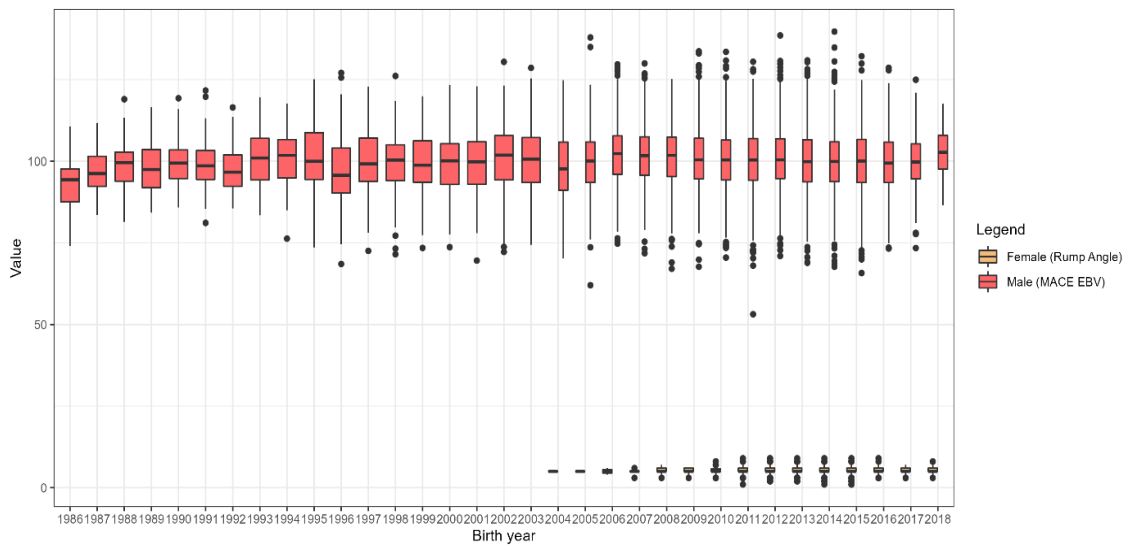


W kolejnym kroku zostały przeanalizowane dane fenotypowe wybranych osobników. Dane fenotypowe zostały przygotowane w oparciu o dane pochodzące z rutynowej oceny wartości hodowlanej bydła mlecznego rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Został również uszczegółowiony wybór cech do cech pokroju, charakteryzujących się różnym poziomem odziedziczalności: wysokość w krzyżu ($h^2=0.54$), ustawienie zadu ($h^2=0.28$), racice ($h^2=0.09$). Rozkład fenotypowy cech z podziałem na płeć został przedstawiony kolejno na wykresach: wysokość w krzyżu – 4, ustawienie zadu – 5, racice – 6.

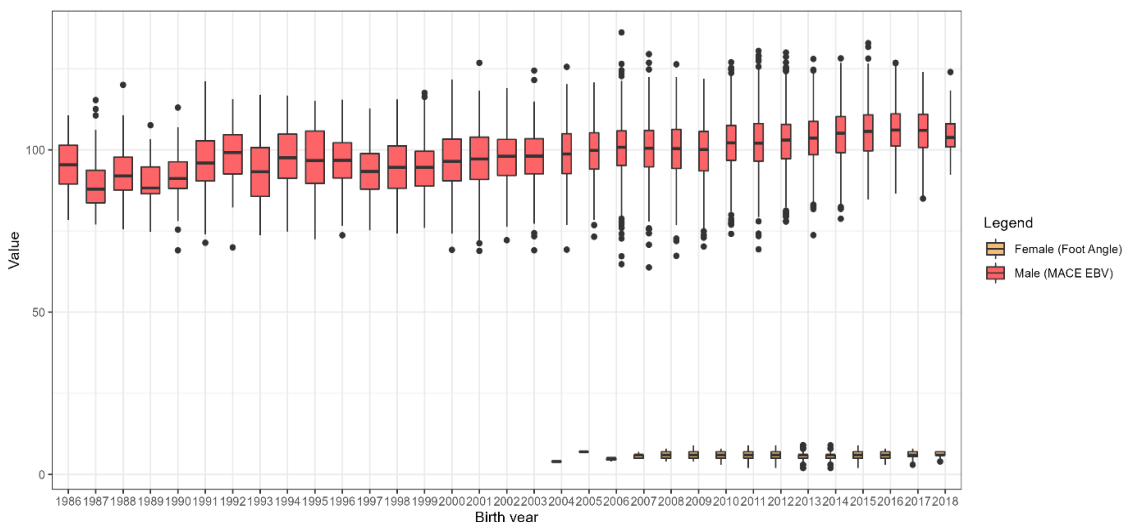
Wykres 4. Rozkład fenotypów dla cechy wysokość w krzyżu



Wykres 5. Rozkład fenotypów dla cechy ustawienie zadu



Wykres 6. Rozkład fenotypów dla cechy racice



Liczebności zwierząt wykorzystanych w analizie zostały przedstawione w tabeli 1. wraz z podstawowymi statystykami opisowymi – tabela 2. Ze względu na różną liczebność dostępnych fenotypów w stosunku do genotypów liczebności populacji referencyjnej, w zależności od cechy zostaną ograniczone i ponownie zweryfikowane, a finalna liczba wykorzystanych zwierząt dla danego podzbioru określona na podstawie analizy w programie MixBLUP. Należy zwrócić uwagę, że wartości prezentowane w tabeli 2. oparte są na wartościach MACE EBV dla danej cechy w przypadku buhajów oraz w przypadku krów o wartości cechy w centymetrach (wysokość w krzyżu), punktach (racice, ustawienie zadu). Pełen zestaw danych fenotypowych jest przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba zwierząt dla poszczególnych cech

Cecha	Płeć	Liczba zwierząt
Wysokość w krzyżu	Krowy	3,378
	Buhaje	14,432
Racice	Krowy	3,378
	Buhaje	14,429
Ustawienie zadu	Krowy	3,378
	Buhaje	14,372

Podstawowe statystyki dla danych fenotypowych przedstawione zostały w tabeli 2.

Tabela 2. Podstawowe statystyki dla poszczególnych cech

Statystyka	Płeć	Wysokość w krzyżu	Racice	Ustawienie zadu
Minimum	Krowy	135	2	1
	Buhaje	51.924	67.793	53.139
Maximum	Krowy	162	9	9
	Buhaje	144.120	136.177	139.717
Średnia	Krowy	147.938	5.888	5.155
	Buhaje	102.861	101.621	100.409
Mediana	Krowy	148	6	5
	Buhaje	102.861	101.928	100.326
Pierwszy kwantyl	Krowy	144.673	4.876	4.144
	Buhaje	92.632	92.713	90.845
Trzeci kwantyl	Krowy	151.202	6.900	6.166
	Buhaje	112.648	110.530	109.972

W ramach prac przewidzianych do realizacji została wykonana imputacja wszystkich dostępnych genotypów, ze szczególnym uwzględnieniem genotypów zwierząt do poszczególnych scenariuszy analizy oraz ze względu na zmianę oprogramowania wykorzystywanego w imputacji genotypów (Flmpute).

Ze względu na różnice w dostępności danych fenotypowanych oraz genotypów krów i buhajów, zaproponowane zbiory danych zostały zmodyfikowane:

- set1 pełen zestaw danych (ponad 17.7K zwierząt w populacji referencyjnej),
- set2 – wykorzystanie tylko materiału męskiego (ponad 14 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set3 – wykorzystanie tylko materiału męskiego z Polski (ponad 5 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set4 – wykorzystanie zwierząt z Polski (ponad 8 000 buhajów i krów w populacji referencyjnej).

Zostało przeprowadzone szacowanie wartości hodowlanej wybranych wcześniej cech (wysokość w krzyżu, racice oraz ustawienie zadu). W analizie został wykorzystany model jednocechowy ssSNP-BLUP

$$y = X\beta + Wa + e,$$

gdzie y jest wektorem zależnych zmiennych, reprezentowanych przez zmierzone fenotypy krów dotyczące wysokości w krzyżu lub racice lub ustawienie zadu oraz pseudo-fenotypy byków wyrażone przez ich MACE DRP, β to wektor stałych efektów obejmujących wiek przy wyciele- niu, fazę laktacji oraz stado odpowiadające fenotypom krów i DRP byków (należy zauważyć, że dla byków użyto sztucznych kodów dla stałych klas efektów), a jest wektorem wartości hodowlanych jednostek i grup genetycznych, które dla zgenotypizowanej części populacji wyrażane są jako $a = Zg + u$, gdzie g to wektor losowych efektów SNP, u to wektor losowych addytywnych (resztkowych) efektów poligenicznych, e to wektor reszt, X , Z i W to odpowiadające im macierze projektowania/incydencji. Grupy genetyczne zostały zdefiniowane na podstawie 10-letniego okna w oparciu o rok urodzenia zwierząt, oddzielnie dla krów, byków i ich kraju pochodzenia podanego przez: Polskę, USA-Kanadę oraz pozostałe kraje. Pełen opis modelu znajduje się pod <https://doi.org/10.1186/s12711-023-00856-5>.

Do zbioru walidacyjnego zostały wybrane buhajki ocenione genomowo w latach 2020–2022. Ze względu na małą liczebność zbioru walidacyjnego można było wykorzystać tylko 467 polskich buhajów ocenionych genomowo. Otrzymane tak wyniki zostały skorelowane z wartościami hodowlanymi otrzymanymi w rutynowej ocenie bydła holsztyńsko-fryzyjskiego w Polsce.

Tabela 3. Korelacja pomiędzy buhajami w zbiorze walidacyjnym pomiędzy modelem jednostopniowym (ssSNP-BLUP) oraz modelem wykorzystywanym w rutynowej ocenie genomowej wartości hodowlanej

Zbiór danych	Opis	Cecha		
		Wysokość w krzyżu	Racice	Ustawienie zadu
SET1	Ponad 17.7K buhajów i krów	0.70	0.46	0.60
SET2	Ponad 14K buhajów	0.68	0.40	0.56
SET3	Ponad 5K polskich buhajów	0.55	0.35	0.44
SET4	Ponad 8K polskich buhajów i krów	0.58	0.37	0.47
		$h^2 = 0.54$	$h^2 = 0.09$	$h^2 = 0.28$

Wyniki korelacji otrzymane dla wybranych cech należy uznać za niskie, ze względu na niską liczebność zwierząt w populacji referencyjnej (dostępność danych fenotypowych). Niemniej wyraźny jest trend związany ze spadkiem korelacji przy mniejszej liczbie zwierząt w populacji referencyjnej modelu ssSNP-BLUP oraz niższej odziedziczalności badanej cechy.

Powiększenie populacji referencyjnej o kilka tysięcy krów wydaje się nieznacznie poprawiać te wyniki, co może być związane z dość wysokim współczynnikiem substytucji (w zależności od cechy i jej odziedziczalności) dla badanej grupy zwierząt. Najgorsze wyniki otrzymano dla zbioru zawierającego 5000 polskich buhajów populacji referencyjnej, a najlepsze dla pełnej grupy zwierząt.

Ze względu na zmianę założeń oraz harmonogramu pracy przyjętego w ramach oceny wartości genetycznej bydła mlecznego w Polsce, zaproponowane modele ssBLUP przygotowane przy pomocy oprogramowania MIXBLUP na chwilę obecną nie będą wprowadzone w Polsce.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że zwiększenie populacji o materiał żeński może zwiększyć dokładność oceny wartości hodowlanej, wyrażoną poprzez korelację oceny wartości hodowlanej zwierząt przy wykorzystaniu modelu jednostopniowego i dwustopniowego – w zależności od badanej cechy i liczebności zwierząt w populacji referencyjnej. W niniejszym badaniu, przy ograniczonym zbiorze danych „zysk” wykorzystania alternatywnej populacji referencyjnej zdefiniowanej poprzez genotypy buhajów i genotypy krów w stosunku do „klasycznej” populacji referencyjnej od 0.02 do 0.06.

Zwiększenie populacji referencyjnej o krowie genotypy nie wpływa na proces przygotowania danych, w tym przede wszystkim na imputację genotypów.

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

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. Małgorzata Małopolska

Celem zadania jest ocena metody immunokastracji preparatem Improvac prowadzonej w warunkach krajowych. Zastosowana metoda oraz przeprowadzone analizy dają kompleksowe informacje odnośnie alternatywnej metody kastracji i jej opłacalności. Ocenie poddana została użytkowość tuczna, rzeźna i jakość mięsa knurków, wieprzków (kastrowanych chirurgicznie) oraz immunokastratów, a także określono poziom kortyzolu u analizowanych zwierząt. Przeprowadzono również analizę morfometryczną jąder, określono poziomu skatolu, androstenu i lotnych związków organicznych, analizę ekonomiczną oraz określono ryzyko wprowadzenia przedstawionej metody. Dopełnieniem metody jest wykonanie analiz z zakresu biologii molekularnej, które przybliżą procesy komórkowe w tkance tłuszczowej, mięśniowej, przysadce, wybranym fragmencie jelita cienkiego oraz jądrach. Jest 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, analiza statystyczna, ekonomiczna i ocena ryzyka.

Zwierzęta w układzie 3 grupowym:

- knurki – niepoddane zabiegowi kastracji,
- wieprzki – poddane chirurgicznej kastracji bez znieczulenia do 7. dnia życia,
- immunokastraty – dwukrotna iniekcja analogu czynnika uwalniającego gonadotropiny (GnRH).

Przeprowadzono analizy na poziomie molekularnym. Analizom poddano transkryptom tkanki jelitowej, mięśniowej, tłuszczowej, przysadki mózgowej oraz jąder dla trzech wyżej wymienionych grup doświadczalnych. Wytypowano geny kandydujące związane z nieprzyjemnym zapachem wieprzowiny oraz związane z ewentualnym negatywnym efektem immunokastracji.

Dokonano analizy ekonomicznej zastosowania immunokastracji jako alternatywnej metody do kastracji chirurgicznej bez znieczulenia – w zależności od wielkości gospodarstwa. Zgromadzone dane poddano analizom statystycznym.

Kompleksowa analiza zagadnienia immunokastracji stwarza szanse do podjęcia prób wprowadzenia tej metody jako zamiennik kastracji chirurgicznej (bez znieczulenia), bądź ukięrowania hodowców, producentów na alternatywne metody kastracji. Do dalszych analiz wytypowano geny: AGT, STAR, LDLR, CYP11B2, MRAP, SRD5A1, CYP19A1 i SCD5.

Tabela 1. Wybrane cechy użytkowości tucznej i rzeźnej w poszczególnych grupach badawczych (n=118)

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
N	60	58	60
Zużycie paszy w okresie testu 30-120 kg	231,33	239,97	261,03
Przyrost średni (g)	988,93	1013,16	995,48
Pobranie paszy/dzień (kg)	2,67	2,71	2,91

Analiza ekonomiczna przeprowadzenia immunokastracji jest obarczona dużym marginesem błędu wynikającym z różnych stawek weterynaryjnych za usługę (w zależności od regionu, niektóre gospodarstwa płacą kwotę za obsługę weterynaryjną całego stada, itp.).

Tabela 2. Przykładowa analiza kosztów immunokastracji w zależności od liczby osobników (do 50 sztuk w stadzie)

Liczba sztuk zwierząt do zaszczepienia	szt.	10	30	50
Ilość preparatu potrzebnego na 1 dawkę dla całego stada	ml	5	15	25
Liczba fiolek preparatu potrzebna dla całego stada	szt.	2	2	2
Koszt 1 fiołki	PLN	400	400	400
Koszt preparatu w przeliczeniu na 1 sztukę	PLN	80	26,67	16
Koszt wykonania dwóch iniekcji (przez lekarza weterynarii)	PLN	25,84	25,84	25,84
Łączny koszt dwóch iniekcji oraz preparatu	PLN	105,84	52,51	41,84
Całkowity koszt dojazdu lekarza weterynarii do gospodarstwa	PLN	193,83	193,83	193,83
Całkowity koszt dojazdu lekarza weterynarii do gospodarstwa w przeliczeniu na 1 sztukę	PLN	19,38	6,46	3,88
Koszt zabiegu (preparat+usługa)	PLN	125,23	58,97	45,72

Tabela 3. Przykładowa analiza kosztów immunokastracji w zależności od liczby osobników (do 5000 sztuk w stadzie)

Liczba sztuk zwierząt do zaszczepienia	szt.	100	500	1000	5000
Ilość preparatu potrzebnego na 1 dawkę dla całego stada	ml	50	250	500	2500
Liczba fiolek preparatu potrzebna dla całego stada	szt.	2	10	20	100
Koszt 1 fiołki	PLN	400	400	400	400
Koszt preparatu w przeliczeniu na 1 sztukę	PLN	8	8	8	8
Koszt wykonania dwóch iniekcji (przez lekarza weterynarii)	PLN	25,84	25,84	25,84	25,84
Łączny koszt dwóch iniekcji oraz preparatu	PLN	33,84	33,84	33,84	33,84
Całkowity koszt dojazdu lekarza weterynarii do gospodarstwa	PLN	193,83	193,83	193,83	193,83
Całkowity koszt dojazdu lekarza weterynarii do gospodarstwa w przeliczeniu na 1 sztukę	PLN	1,94	0,39	0,19	0,04
Koszt zabiegu (preparat+usługa)	PLN	35,78	34,23	34,04	33,88

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-Nęcza, prof. IZ PIB

Celem praktycznym zadania jest opracowanie szczegółowej procedury tuczu świń ras rodzimych, uwzględniającej dedykowane pełnoporcjowe mieszanki paszowe z udziałem krajowych komponentów białkowych i innowacyjnego dodatku, które wraz ze wskazaniem właściwej ubojowej masy ciała, będą podstawą produkcji wysoko jakościowego 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.

Przeanalizowano dane uzyskane w ramach doświadczenia 3., przeprowadzonego w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Pawłowicach, w 2022 roku. W doświadczeniu tuczono świnię rasy puławskiej (fotografia 1.) do masy ciała 140 kg, w ostatnim etapie tuczu (od 90 kg) zastosowano mieszanki doświadczalne *finiszer* z trzema rodzajami dodatków paszowych (X, Y, Z), będących mieszaniną suszy ziołowych i/lub owocowych z dodatkiem ekstradowanych nasion Inu. Dodatki te zawierały biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego o działaniu antyutleniającym i poprawiającym trwałość oksydacyjną oraz wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa.

Warchlaki rasy puławskiej (Fot. I. M. Szyndler-Nęcza)



Pozyskane w ramach doświadczenia 3. dane pozwoliły na wykonanie analiz statystycznych. Wykonano analizę wpływu czynnika doświadczalnego na wybrane cechy tuczne i rzeźne oraz jakość technologiczną i dietetyczną mięsa i wyrobów pochodzących od świń rasy puławskiej. Analizy te wykonano w oparciu o analizę wariancji z wykorzystaniem modelu GLM, gdzie efektami stałymi były grupy doświadczalne (A, C, E, F) i płeć (1, 2). Dodatkowo, wprowadzono zmienną towarzyszącą masę ciała i dni tuczu, ponieważ planowane doświadczenie wzrostowe do 140. kg masy ciała, musiało być zakończone wcześniej ze względu na wprowadzoną strefę ASF w ostatnim miesiącu tuczu.

Ponadto, określono wpływ czynnika doświadczalnego na wskaźniki oksydo-redukcyjne we krwi i mięsie oraz biochemiczne we krwi tuczników puławskich, z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (efekt stały – grupa doświadczalna).

W celu określenia wpływu dodatków paszowych na jakość mięsa i produktów pochodzących od ras rodzimych (puławskiej i złotnickiej pstrej) połączono w jedną bazę dane z doświadczenia 2., wykonanego na rasie złotnickiej pstrej (fotografia 2.) i z doświadczenia 3., wykonanego na rasie puławskiej. W bazie uwzględniono tylko cztery grupy żywieniowe występujące w obu doświadczeniach (A, C, E i F).

Warchlaki rasy złotnickiej pstrej (Fot. 2. M. Szyndler-Nędza)



Wykonano analizę wpływu czynnika doświadczalnego na wskaźniki oksydo-redukcyjne we krwi i mięsie oraz biochemiczne we krwi tuczników ras rodzimych. W tym celu zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, gdzie efektem stałym były grupa doświadczalna (A, C, E, F) i rasa (puł, złp). W modelu tym uwzględniono również interakcję pomiędzy czynnikami. Określono również wpływ czynnika doświadczalnego na podstawowy skład chemiczny mięsa i wyrobów, ich teksturę oraz profil WKT z wykorzystaniem wielkoczynnikowej analizy wariancji, gdzie efektem stałym były grupa doświadczalna (A, C, E, F), rasa (puł, złp) i płeć. Do modelu wprowadzono zmienną towarzyszącą o nazwie dni tuczu, ponieważ zwierzęta tych ras cechują się różnym przyrostem dziennym, a tym samym zmienną długością tuczu. Ponadto, oba przeprowadzone doświadczenia wzrostowe do 140 kg masy ciała, musiały być zakończone wcześniej ze względu na wprowadzoną strefę ASF w ostatnim miesiącu tuczu.

Porównując wyniki obu ras rodzimych do wyników dla mięsa handlowego zastosowano analizę wariancji GLM, gdzie efektem stałym były grupa doświadczalna (A, C, E, F), rasa (puł, złp, handl), uwzględniono także interakcję pomiędzy czynnikami. Analizując uzyskane dane wzięto pod uwagę tylko wyniki dla grup kontrolnych (A) i mięsa handlowego.

We wszystkich analizach różnice statystycznie istotne pomiędzy średnimi w grupach określono przy $P \leq 0.05$ z wykorzystaniem testu NIR. Do analiz wykorzystano program STATISTICA v 12 (StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.).

Doświadczenie 3. dla rasy puławskiej

Na podstawie uzyskanych wyników analiz stwierdzono, że wprowadzenie do mieszanki paszowej *finiszer* dodatku nasion lnu, wraz z suszem ziołowym (grupa C), owocowym (E) lub ziołowoburaczanym (F), w porównaniu do grupy kontrolnej A, nie wpłynęło w rasie puławskiej na pogorszenie wskaźników tucznych i rzeźnych, ani na parametry jakości mięsa. Wykazano natomiast, że przede wszystkim dodatki żywieniowe stosowane w grupie C (susze ziołowe+ln), w porównaniu do pozostałych grup (A, E, F) statystycznie istotnie poprawiły wartość wskaźników antyoksydacyjnych w krwi i mięsie tuczników, a także wartości wskaźników immunologicznych organizmu świń rasy puławskiej.

W przypadku jakości mięsa stwierdzono, że proponowane dodatki paszowe (C, E, F) wpłynęły niekorzystnie na statystycznie istotne zmniejszenie zawartości witaminy E zarówno w mięsie polędwicy, jak i polędwicy surowo dojrzewającej. Analizując parametry siły cięcia i energii cięcia wykazano na korzystne statystycznie istotne zmniejszenie tych parametrów jedynie w przypadku grupy F w polędwicy surowo dojrzewającej ($F < A$).

Wszystkie zastosowane dodatki paszowe (C, E, F) wpłynęły na zmianę profilu kwasów tłuszczowych, przede wszystkim poprzez korzystne zwiększenie zawartości kwasów tłuszczowych z grupy PUFA n-3 w mięsie polędwicy i szynki, a także w polędwicy i kielbasach surowo dojrzewających. Ponadto, mięso polędwicy z grupy tuczników żywionych mieszanką C cechowało się dodatkowo korzystnie mniejszą zawartością kwasów SFA i większą zawartością kwasów UFA i MUFA. W przypadku mięsa szynki stwierdzono natomiast, że żywienie tuczników mieszanką F wpłynęło na korzystne zmniejszenie zawartości kwasów SFA i zwiększenie kwasów UFA. Dodatki te (C, E, F) wpłynęły także na poprawę wartości wskaźników dietetycznych – ważnych z punktu widzenia konsumenta. Wszystkie produkty (mięso polędwicy i szynki, polędwice dojrzewające i kielbasy), pochodzące z tych grup cechowały się mniejszą wartością proporcji kwasów tłuszczowych PUFA n-6/n-3 oraz mniejszą wartością wskaźnika TI. Wykazano także, że żywienie dodatkiem paszowym zawierającym susz ziołowy+len (C) wpłynęło na zwiększenie zawartości kwasów hypocholesterolowych (DFA), a tym samym zwiększenie wartości proporcji kwasów hypocholesterolowych do hipercholesterolowych (h/H) w mięsie polędwicy. W przypadku mięsa szynki stwierdzono, że to mieszanka ziołowo buraczana z lnem (F) miała korzystniejszy wpływ na wartość wskaźników DFA i h/H w tym produkcie. W przypadku oceny stabilności oksydacyjnej tłuszczu wykazano, że dodatki paszowe z grup E i F wpłynęły na pogorszenie (zwiększenie) wartości wskaźnika IV w mięsie szynki oraz w polędwicy surowo dojrzewającej (tylko z grupy F).

Analizy wyników dla ras rodzimych (doświadczenia 2. i 3.)

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że dodatki żywieniowe stosowane w grupie C (susz ziołowy+len), w porównaniu do pozostałych grup (A, E, F) poprawiły wartość wskaźników antyoksydacyjnych w krwi i mięsie tuczników, a także wartości wskaźników immunologicznych organizmu świń ras rodzimych.

Wykazano także, że mięso świń ras rodzimych (złp i puł), w porównaniu do mięsa dostępnego w sieciach handlowych (H), cechuje się korzystniejszym profilem kwasów tłuszczowych pod kątem żywienia człowieka przede wszystkim w szynce [niższa zawartość kwasów SFA, większa zawartość UFA, w tym MUFA oraz mniejsza zawartość kwasów z rodziny PUFA n-6, niższe wartości indeksu nasycenia tłuszczu (SI) i liczby jodowej (IV)], niższe wartości wskaźników dietetycznych, tj. długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (LCFA), indeksu aterogennego (AI) i peroksydacji (PI)].

Wyniki żywieniowych doświadczeń 2. i 3. wskazują, że zastosowane dodatki paszowe w postaci lnu oraz suszu z ziół (C), owoców (E) oraz ziół i buraka czerwonego (F) wpłynęły na zmniejszenie zawartości witaminy E w mięsie polędwicy oraz korzystnie zmodyfikowały profil kwasów tłuszczowych w tych rasach, przede wszystkim ze względu na dietę człowieka. Wszystkie mieszanki (C, E, F) wpłynęły na zwiększenie zawartości PUFA n-3 w mięsie polędwicy i szynki oraz polędwicach surowo dojrzewających, a tym samym na zmniejszenie wskaźnika dietetycznego tych produktów wyrażonego proporcją kwasów PUFA n-6/n-3 oraz indeksu trombogennego TI. Wpłynęły także na nieznaczne zwiększenie liczby jodowej (IV) w tych produktach. Mieszanka paszowa C, zawierająca zioła i len, dodatkowo wpłynęła na korzystne zwiększenie zawartości kwasów DFA w mięsie polędwicy, a w polędwicy surowo dojrzewającej na zmniejszenie zawartości SFA i zwiększenie zawartości UFA. Ponadto, w produkcie surowo dojrzewającym

pochodzącym od świń z grupy C stwierdzono korzystne zmniejszenie wartości indeksu aterogenności (AI) oraz zwiększenie proporcji kwasów h/H. Dodanie do ziół suszu z buraka czerwonego (grupa F) wpłynęło przede wszystkim na modyfikację profilu kwasów tłuszczowych w szynce (zmniejszenie zawartości SFA, zwiększenie UFA, w tym PUFA, obniżenie wartości SI, zwiększenie proporcji PUFA/SFA, h/H oraz zawartości kwasów DFA, zmniejszenie indeksu aterogenności (AI) i zawartości LCFA). W przypadku tego dodatku wykazano także niekorzystny jego wpływ na zwiększenie wskaźnika peroksydacji (PI) tłuszczu w szynce. Dodatek paszowy w postaci suszu owocowego (E) wpłynął na zwiększenie zawartości kwasów DFA w mięsie polędwicy i szynki. Ponadto, mięso szynki z tej grupy cechowało się większą zawartością kwasów PUFA, w tym PUFA n-6, a także wyższą proporcją kwasów PUFA/SFA i h/H. W przypadku tego dodatku stwierdzono jego negatywny wpływ na statystycznie istotne zmniejszenie zawartości MUFA oraz zwiększenie wskaźnika peroksydacji (PI) w mięsie szynki, a także niekorzystne zwiększenie wartości wskaźnika świeżości mięsa TBARS w polędwicy surowo dojrzewającej.

W czwartym roku realizacji zadania, przeanalizowano dane uzyskane w ramach doświadczenia trzeciego wykonanego w 2022 roku oraz utworzono bazę i poddano analizie statystycznej dane z dwóch doświadczeń wykonanych w latach 2021 i 2022 na dwóch rasach rodzimych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dla obu ras rodzimych w tuczu do 140 kg masy ciała najlepszym dodatkiem paszowym, który wpłynie na poprawę wskaźników immunologicznych organizmu oraz statusu oksydacyjnego we krwi i mięsie świń, a także korzystnie wpłynie na zmianę profilu kwasów tłuszczowych (pod kątem zdrowej diety człowieka) bez negatywnego wpływu na jakość oksydacyjną tłuszczu w produktach mięsnych, będzie dodatek zastosowany w mieszance doświadczalnej C (ziół+len).

Zadanie 01-11-05-11

Ocena wpływu cech tucznych i rzeźnych loszek rasy puławskiej oraz rodu matki i linii ojca na wyniki użytkowości rozplodowej

kierownik zadania: dr hab. Magdalena Szyndler-Nędza, prof. IZ PIB

Celem poznawczym jest ocena wpływu cech tucznych i rzeźnych młodych loszek oraz rodziny matki i linii ojca na wyniki użytkowości rozplodowej loch i knurów rasy puławskiej (fotografia 1.).

Locha i knur rasy puławskiej (Fot. 1. M. Szyndler-Nędza)



Celem użytkowym jest określenie możliwości wykorzystania parametrów oceny przyżyciowej do przewidywania potencjału loch w zakresie ich rozrodczości oraz wskazanie najkorzystniejszych

kojarzeń rodzin matek z liniami ojców pod względem liczby prosiąt urodzonych i odchowanych w rasie puławskiej.

W roku sprawozdawczym utworzono trzy bazy danych zawierające:

- numer indywidualny lochy, imię lochy, dane z oceny przyżyciowej, dane z oceny rozplodowej w kolejnych miotach (baza loch),
- numer indywidualny knura, imię knura, dane z oceny przyżyciowej, dane z oceny rozplodowej, ilość miotów uzyskanych po knurze, ilość urodzonych prosiąt, ilość odchowanych prosiąt (baza knurów),
- numer indywidualny lochy, imię lochy, numer indywidualny knura, imię knura, dane zużytkowości rozplodowej w kolejnych miotach loch (baza kojarzeń).

Bazy zostały przygotowane do obliczeń statystycznych. W tym celu zwierzęta w bazach pogrupowano (tam gdzie to było możliwe) ze względu na numer kolejnego miotu oraz na podstawie średnich wartości cech i sd na grupy związane z masą ciała, przyrostem dziennym, mięsnością określonych w dniu oceny przyżyciowej.

Wykonano analizy statystyczne dotyczące:

- Podstawowej charakterystyki cech tucznych i rzeźnych oraz rozplodowych loch (średnie, sd, minimum, maksimum).
- Oszacowania korelacji *Pearsona* pomiędzy użytkowością tuczną i rzeźną młodych loszek a ich wynikami oceny rozplodowej.
- Określenia wpływ przyrostu dziennego, masy ciała, mięsności loszek na ilość urodzonych i odchowanych prosiąt. Analizy zostały wykonane w różnych układach uwzględniając efekt czynników głównych oraz efekt czynników z interakcją (masa ciała i przyrost, masa ciała i mięsność, przyrost i mięsność).
- Podstawowe charakterystyki cech użytkowości tucznej i rzeźnej oraz rozplodowej dla rodzin loch i linii knurów.
- Określenie wpływu rodziny lochy i linii knura na wyniki użytkowości rozplodowej.
- Korelacje pomiędzy użytkowością tuczną i rzeźną młodych loszek a ich wynikami oceny rozplodowej w poszczególnych rodzinach.
- Charakterystyka kojarzeń rodzin loch z liniami knurów.

Do analiz wykorzystano program STATISTICA v 12 (StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com). Różnice statystycznie istotne pomiędzy średnimi w grupach określono przy $P \leq 0.05$ z wykorzystaniem testu NIR.

Na podstawie analizy części wyników badań (punkty 1-3) można stwierdzić, że w rasie puławskiej wartości cech tucznych i rzeźnych loszek określone w dniu oceny przyżyciowej miały znaczący wpływ na zmniejszenie życiowej liczby prosiąt urodzonych i odchowanych. Stwierdzono, że młode loszki poddane ocenie przy masie ciała do 55,9 kg oraz przyrostach dziennych do 519 g/dzień cechowały się statystycznie istotnie najgorszymi parametrami produkcyjnymi zarówno w miotach pierwszych jak i kolejnych. W przypadku mięsności zbyt wysoka jej zawartość w tuszy samic ($\geq 60\%$, klasa S) wpływała na zmniejszenie liczby prosiąt urodzonych i odchowanych przede wszystkim w miotach pierwszych. W miotach 2. i 3. wysoka wartość tej cechy wpływała na zmniejszenie liczby odchowanych prosiąt.

Najkorzystniejszymi parametrami oceny rozplodowej cechowały się loszki, które w dniu oceny użytkowości tucznej i rzeźnej uzyskały:

- masę ciała 96 kg i więcej,

- przyrost dzienny do 800 g/dz.,
- procentową zawartość mięsa w tuszy do maksymalnie 55%–59,9% (klasa E).

W tabelach 1. i 2. przedstawiono charakterystykę kojarzeń rodzin loch z liniami knurów w oparciu o liczbę prosiąt urodzonych (tabela 1.) i liczbę prosiąt odchowanych (tabela 2.). W tabeli 1. na czerwono zaznaczono nazwy rodów loch i linii knurów charakteryzujące się najniższymi wynikami pod względem średniej liczby prosiąt urodzonych. W obu tabelach, na jasnozielono zaznaczono kojarzenia, gdzie urodziło się średnio minimum 10,4 prosiąt w miocie i odchowało się średnio minimum 9,5 prosiąt, na ciemnozielono kojarzenia o liczbie prosiąt urodzonych w miocie przewyższającej średnią wartość 10,7 szt.

Tabela 1. Charakterystyka kojarzeń rodzin loch z liniami knurów – liczba prosiąt urodzonych w miocie

	AKRA	ARKA	DAZERKA	FAJKA	FUKA	FURA	SAMA
FRYKAS	9,61	9,00	9,88	10,37	11,00	10,53	10,80
KARAT	10,16	8,25	10,60	10,71	10,83	10,62	10,85
POL	10,22	8,96	10,52	9,95	-	10,13	10,83
RODAK	10,39	10,05	10,22	9,24	-	10,10	10,50
SAM	10,93	10,12	11,28	9,88	-	10,14	10,66
WICHER	10,57	8,54	10,41	10,21	-	10,75	10,40
WINIAK	10,12	10,00	10,94	10,77	-	10,80	10,60

Tabela 2. Charakterystyka kojarzeń rodzin loch z liniami knurów – liczba odchowanych prosiąt w miocie

	AKRA	ARKA	DAZERKA	FAJKA	FUKA	FURA	SAMA
FRYKAS	8,30	7,64	9,09	9,29	9,50	9,27	9,22
KARAT	9,42	7,37	9,65	9,51	9,50	9,46	9,61
POL	9,04	8,49	9,30	8,93	-	9,06	9,58
RODAK	9,28	9,35	9,48	8,48	-	9,10	9,23
SAM	9,94	9,12	10,09	9,14	-	9,44	9,62
WICHER	9,46	7,54	9,36	9,13	-	9,75	8,97
WINIAK	8,88	8,50	9,66	9,47	-	9,56	9,50

W roku sprawozdawczym przygotowano bazy danych do obliczeń oraz wykonano szereg analiz statystycznych, które dały podstawę do dokonania oceny wpływu cech tucznych i rzeźnych młodych loszek na wyniki ich użytkowości rozplodowej. Pozostałe analizy statystyczne będą podstawą do opracowania kolejnych publikacji naukowych dotyczących wpływu rodziny lochy i linii ojca na użytkowość rozplodową rasy puławskiej.

Zadanie 01-11-06-11

Analiza zmienności genetycznej na poziomie genomowym u świń różnych ras w aspekcie oporności na choroby

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

Wirus afrykańskiego pomoru świń (ASF) jest obecnie największym zagrożeniem dla populacji dzików oraz trzody chlewnej w kraju. Choroby nie leczy się, ponieważ jest zwalczana z urzędu, ze względu na duże ryzyko jej rozprzestrzeniania się oraz bardzo wysoką śmiertelność zarażonych zwierząt. Powoduje to duże straty ekonomiczne dla producentów i gospodarki kraju, wynikające z tytułu ewentualnych depopulacji zarażonych stad, ograniczenia w możliwości przemieszczania świń, mięsa wieprzowego i innych produktów pozyskanych od świń oraz dzików, a także ograniczeń związanych z zakazem eksportu wieprzowiny. Brak jest szczepionek przeciwko wirusowi ASF i pomimo prac nad nią wielu laboratoriów na świecie, cel jest jeszcze odległy, a stosowanie kosztownej bioasekuracji nie gwarantuje stuprocentowego bezpieczeństwa.

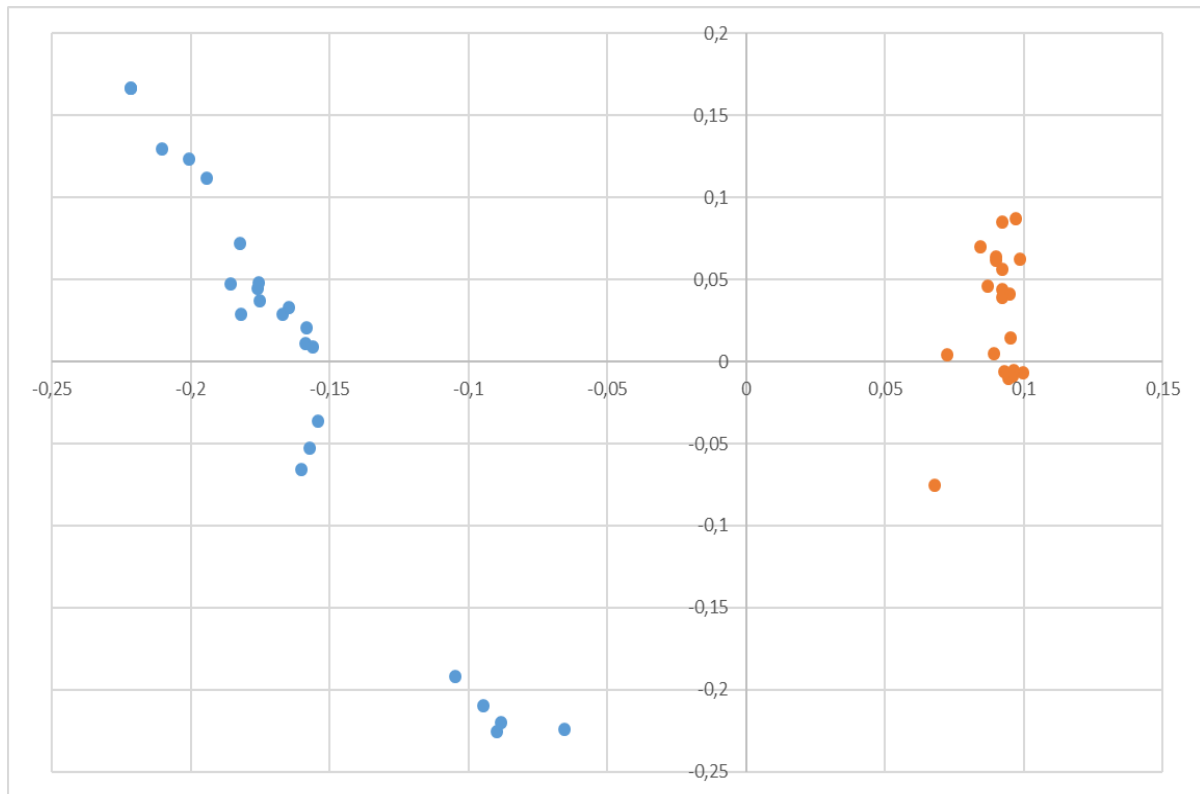
Dlatego też celem projektu jest identyfikacja genetycznych różnic pomiędzy grupami zwierząt wrażliwych i opornych na ASF jako potencjalnych markerów tej oporności oraz analiza możliwości wykorzystania ich w krajowej praktyce hodowlanej.

Wynikiem badań do zastosowania w praktyce hodowlanej może być marker oporności na ASF genetyczny lub grupa takich markerów oraz analiza możliwości jego (ich) wdrożenia do szeroko rozumianej praktyki hodowlanej (na podstawie analiz dotyczących ich wpływu na cechy użytkowe). W odróżnieniu od konieczności stałego i kosztownego stosowania potencjalnych szczepionek na ASF, wdrożenie do programu hodowlanego ewentualnych markerów genetycznych oporności na ASF jest skutecznym sposobem eliminacji problemu na poziomie hodowli zarodkowej, a także produkcji towarowej. Zastosowanie w hodowli wspomnianych markerów genetycznej oporności na ASF w przestrzeni kilku pokoleń może skutecznie wyeliminować problem ASF dając materiał hodowlany i produkcyjny oporny na wirusa. Pozytywne wyniki poszukiwań takiego markera i ich wpływu na cechy użytkowe mogą finalnie przyczynić się do opatentowania takiego rozwiązania.

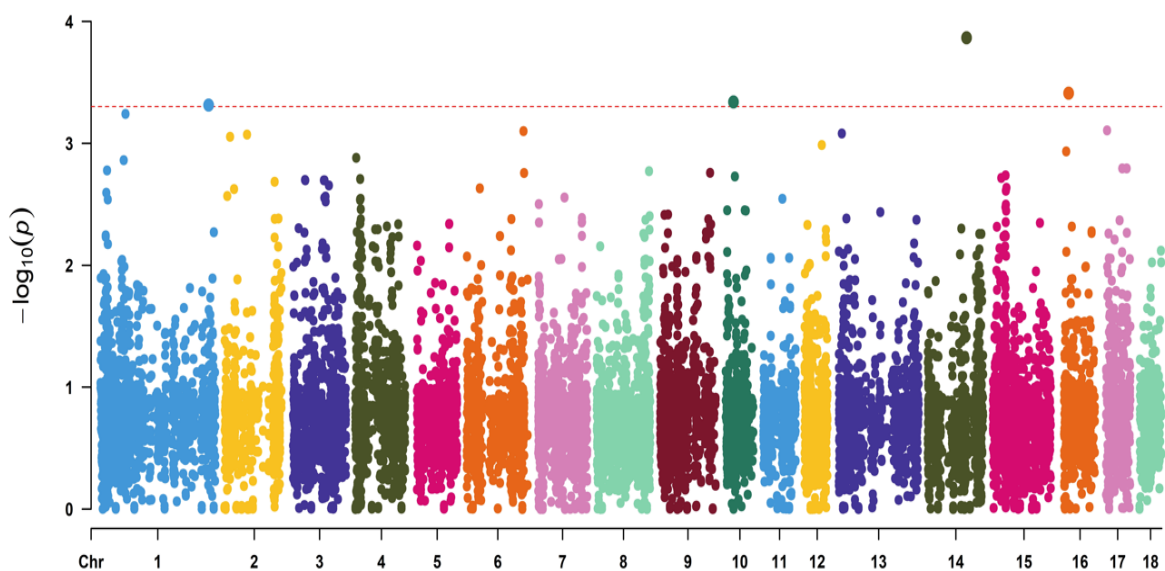
Ze względu na restrykcyjne podejście do ASF polskich służb weterynaryjnych, w kraju do tychczas nie stwierdzono wśród zwierząt, które przechorowały ASF tzw. „ozdrowieńców”, stąd materiał DNA został pozyskany w ramach współpracy z Agricultural Research Institute of Mozambique, gdzie takie zwierzęta zidentyfikowano. Łącznie pozyskano ponad 80 próbek DNA pochodzących między innymi od zwierząt, które przeszły zakażenie ASF i są w tzw. grupie „ozdrowieńców”. Pozyskane próbki DNA zostały spektrofotometrycznie ocenione ilościowo i jakościowo (aparat NanoDrop 2000), a następnie rozcieńczone do odpowiedniego stężenia końcowego. W celu identyfikacji regionów w genomach związanych z potencjalną podatnością lub opornością na wirusa AFS została wykonana analiza polimorfizmów przy użyciu mikro-macierzy SNP PorcineSNP60v2 BeadChip (Illumina). Analiza taka umożliwia identyfikację 64 000 mutacji równomiernie rozłożonych w genomie dla każdego osobnika. Macierze zostały przygotowane zgodnie z zaleceniami producenta, a ich odczyt został przeprowadzony na aparacie iScan (Illumina). Analiza klastrowania PCA uzyskanych wyników wskazała na utworzenie się dwóch niezależnych klastrow, w tym unikalnego klastra utworzonego przez grupę ozdrowieńców (rycina 1.).

Następnie, na podstawie uzyskanych danych, przeprowadzona została analiza asocjacyjna całego genomu (*genome-wide association studies* – GWAS) z informacją dotyczącą przebiegu choroby. Powyższa analiza pozwoliła na identyfikację polimorfizmów SNP istotnie ($p\text{-value} < 0,01$) skorelowanych z podatnością/opornością na ASF (rycina 2.). Wykryto 133 polimorfizmy zlokalizowane w 40 genach (rycina 3.).

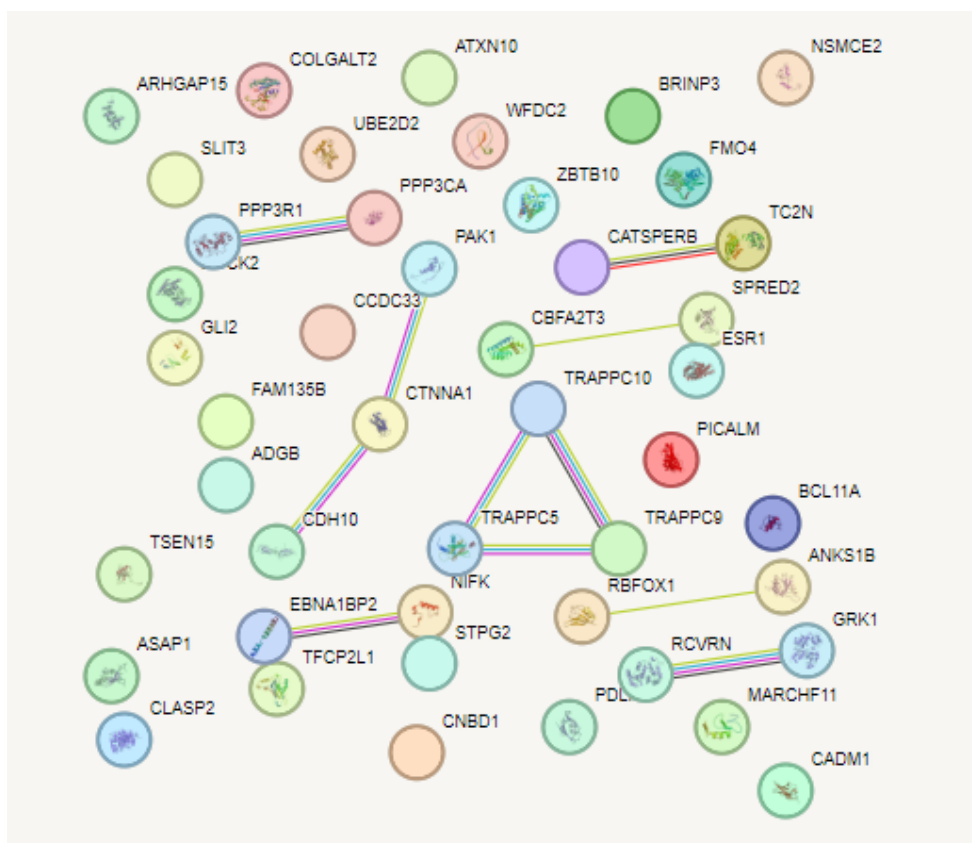
Rycina 1. Klastrowanie próbek DNA pochodzących z populacji z Mozambiku na podstawie analizy mikromacierzy SNP (kolorem pomarańczowym zaznaczono osobniki, które przeżyły ASF)



Rycina 2. Wykres typu Manhattan plot przedstawiający wartości P value dla polimorfizmów w skali całego genomu skorelowanych z podatnością/opornością na ASF



Rycina 3. Geny o istotnych pvalue ($p < 0,01$), w których polimorfizmy wytypowano jako potencjalnie związane z podatnościami/opornościami na AFS (String software)



W kolejnym etapie, obecność wybranych istotnych mutacji zostanie potwierdzona na populacji świń utrzymywanych w Polsce – rasie polskiej białej zwiśtoucej, której Zakład Hodowli Trzody Chlewnej posiada bazy profili DNA. Obecnie w bazie zdeponowano ponad 1000 profili DNA, co pozwoli na jednoznaczne określenie czy i z jaką frekwencją badane polimorfizmy występują w polskiej populacji.

Ponadto, na podstawie analizy SNP zostały wytypowane próbki w obrębie badanych grup o istotnych różnicach w frekwencji polimorfizmów, dla których zostało zlecone przeprowadzenie sekwencjonowania całego genomu WGS (ang. *Whole Genome Sequencing*). Sekwencjonowanie zostało wykonane na platformie Illumina i przy użyciu zestawu dedykowanych odczytników dla 42 próbek (po 16 próbek DNA pozyskanych z dwóch uzyskanych klastrów z populacji z Mozambiku i 10 próbek DNA pozyskanych od niespokrewnionych osobników krajowych rasy PBZ). W dalszym etapie frekwencje mutacji oraz nowo zidentyfikowane mutacje w rejonach genomu nie badanych mikromacierzami zostaną porównane pomiędzy grupami, co pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie mutacji wybranych na podstawie mikromacierzy i wytypowanie nowych SNP. Wybrane mutacje zostaną zwalidowane przy użyciu metod PCR-RFLP lub sekwencjonowania Sangera.

W kolejnym roku, wytypowane potencjalne markery genetyczne o frekwencji w krajowej populacji na poziomie umożliwiającym wykorzystanie ich w praktyce hodowlanej będą analizowane pod kątem ich wpływu na wartość cech użytkowych, ważnych z gospodarczego punktu widzenia (asocjacji z cechami użytkowymi) w aspekcie ewentualnych antagonizmów z aktualnymi programami hodowlanymi poszczególnych ras. Analiza asocjacji poszczególnych polimorfizmów z cechami użytkowymi przeprowadzona zostanie na ok. 800 zwierzętach dla wytypowanych około 6 genów.

Zakład Hodowli Drobiu
kierownik: dr hab. Katarzyna Połtowicz, prof. IZ PIB

Zadanie 01-12-08-11

Wpływ czynników środowiskowych na poprawę efektywności chowu kur ras zachowawczych

kierownik zadania: prof. dr hab. Józefa Krawczyk

Materiałem badawczym były jaja pobrane od dwóch ras/rodów kur nieśnych objętych w Polsce programem ochrony tj.: zielononóżka kuropatwiana (Z-11) i rhode island white (A-33). W okresie 24.–56. tygodniu życia, co cztery tygodnie, od każdej rasy kur z tego samego przędziału zbierano wszystkie jaja o godzinie 7.00, 10.00 i 13.00, które następnie poddawano analizie oceny jakości treści i skorup. Ponadto, w 40. tygodniu życia przez trzy dni zebrano po 10 jaj w ww. porach dnia i przekazano do Centralnego Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB do wykonania analizy chemicznej ich żółtek.

Nieśność kur zielononóżka kuropatwiana (Z-11) w okresie 21-56 tygodni wynosiła 152 sztuki/nioskę, a kur rhode island white (A-33) 177 sztuk/nioskę.

Analizując wyniki składu chemicznego żółtek jaj w rodzie A-33 zanotowano w nich statystycznie istotnie niższy poziom wszystkich badanych składników w porównaniu z żółtkami jaj od kur Z-11. Natomiast nie odnotowano w tym zakresie istotnych różnic między żółtkami jaj znoszonymi o różnych porach dnia z wyjątkiem popiołu surowego w jajach kur Z-11, którego niższy poziom stwierdzono w żółtkach jaj znoszonych po południu.

Kury A-33 znosiły jaja o większej masie, ale o mniejszym wskaźniku JH i niższym zabarwieniu żółtka w porównaniu do jaj kur Z-11. W rodzie A-33 żółtka jaj zebranych o godz. 10.00 wyróżniały się lepszym wybarwieniem niż te zniesione rano i po południu.

Większy wpływ pory znoszenia jaj na ich jakość odnotowano wśród jaj od niosek Z-11. Jaja od tych kur znoszone rano wyróżniały się większą masą całkowitą i masą żółtek, ale gorszymi parametrami świeżości (wysokość białka i JH), w porównaniu do znoszonych później.

Kury i jaja rhode island white (A-33)
(Fot. 1. J. Krawczyk)



Skorupy jaj Z-11, w porównaniu do A-33, były lżejsze, cieńsze, o mniejszej gęstości i jaśniejszej barwie. Nie potwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie wytrzymałości na zgniecenie między jajami obydwu badanych ras. Jaja kur Z-11 ze zbioru rannego wyróżniały się istotnie większą masą skorupy i ich grubością w porównaniu do zbieranych później. Wśród jaj od kur A-33 istotny wpływ pory znoszenia jaj na jakość ich skorup odnotowano w zakresie grubości, wytrzymałości na zgniecenie oraz barwy. Jaja od tych kur znoszone rano wyróżniały się największą masą skorup i większą ich wytrzymałością na zgniecenie oraz jaśniejszą barwą w porównaniu z tymi, które zbierano później.

Kury i jaja zielononóżki kuropatwiane (Z-11)
(Fot. 2. J. Calik i J. Krawczyk)



W przeprowadzonych badaniach stwierdzono statystycznie istotne różnice w zakresie większości cech fizycznych i chemicznych jakości jaj między jajami pochodzącymi od starej rodzimej rasy kur, o niskiej nieśności, zielononóżka kuropatwiana (ród Z-11) a jajami uzyskanymi od kur o znacznie większej nieśności rhode island white (ród A-33). Dla większości cech jakości jaj nie odnotowano istotnego wpływu na ich kształtowanie pory zniesienia jaj.

Zadanie 01-12-09-11

Opracowanie metod produkcji certyfikowanych kurcząt rzeźnych w sezonie zimowym (w warunkach stresu zimna) w aspekcie produktywności, dobrostanu, statusu immunologicznego, poziomu stresu oraz wybranych parametrów jakości mięsa

kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnowka-Czajka

Przeprowadzono badania, których celem była ocena efektywności odchovu kurcząt rzeźnych rasy przysposobionej lokalnie rhode island red (RIR) oraz wolno rosnących mieszańców hubbard JA 957 w chowie ekologicznym.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta kurcząt rzeźnych rhode island red (RIR) oraz hubbard JA 957 – w ogólnej liczbie 300 sztuk. Kurczęta odchowywano metodami ekologicznymi, zgodnie z wymogami, określonymi w aktach prawnych dotyczących rolnictwa ekologicznego. Przez cały okres doświadczenia ptaki miały swobodny dostęp do paszy i wody. Zastosowano żywienie półintensywne zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. Mieszanki paszowe składały się z certyfikowanych komponentów. Kurczęta utrzymywano na ściółce o obsadzie nie przekraczającej 21 kg/m², z dostępem do zielonych wybiegów. Wybiegi wyposażono w zadaszki i poidła.

Ptaki doświadczalne zostały przydzielone do dwóch grup. Każda grupa składała się z pięciu podgrup:

- I – kurczęta rzeźne rhode island red (RIR) utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego
- II – kurczęta rzeźne hubbard JA 957 utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego.

Podczas badań zbierano dane dotyczące warunków klimatycznych (temperatura i wilgotność powietrza, ruch powietrza, domieszki gazowe). Kontrolowano wyniki produkcyjne kurcząt rzeźnych (zużycie paszy, masa ciała, liczba padłych ptaków). W ostatnim dniu doświadczenia przeprowadzono analizę poubojową, wykonano pomiar pH₁₅ oraz pH₂₄ mięśni piersiowych i nóg, a także pobrano próbki mięśni piersiowych i nóg w celu wykonania badań dotyczących wodochłonności, wycieku chłodniczego, składu chemicznego, profilu kwasów tłuszczowych, zawartości cholesterolu, poziomu witaminy A i E oraz wskaźnika TBA. W 6., 9., 10. i 12. tygodniu odchowu pobrano krew od 10 ptaków z grupy, w celu oznaczenia całkowitego poziomu immunoglobulin, glukozy, hormonów tarczycy, hematokrytu, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), dialdehydu malonowego (MDA) oraz poziomu kortykosteronu.

W wyżej wymienionych tygodniach doświadczenia określono także masę narządów limfatycznych ptaków (*Torby Fabrycjusza*, śledziony i grasicy) oraz wykonano pomiar temperatury rektalnej i radiacyjnej u 10 ptaków z grupy. Określono również stan kończyn (przerost pazurów, zapalenie skóry podeszwy stóp, złamania, zwichnięcia, zmiany w stawach skokowych, itp.), stan upierzenia oraz przeprowadzono pomiar czasu trwania tonicznego bezruchu (TI). W okresie doświadczenia przeprowadzono także obserwacje behawioralne.

Obserwacje behawioralne obejmowały: liczbę ptaków pijących, jedzących, ziewających, unoszących skrzydła, siedzących i stojących pojedynczo lub grupowo, dziobanie ściółki i innych elementów nieożywionych otoczenia (z wyłączeniem paszy) oraz agresji.

Zebrane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica version 12.0 PL (StatSoft Inc., 2011, USA).

Podsumowując dotychczas opracowane wyniki, porównywane kurczęta rzeźne rasy przysposobionej lokalnie oraz wolno rosnące mieszańce w chowie ekologicznym różniły się znacząco pod względem masy ciała oraz wydajności rzeźnej. Ptaki hubbard JA 957 odznaczały się lepszymi wynikami produkcyjnymi w stosunku do ptaków rhode island red. Pochodzenie ptaków miało znaczący wpływ na pH mięsa. Kurczęta rzeźne hubbard JA 957 charakteryzowały się mniejszym udziałem narządów limfatycznych (śledziony i *Torby Fabrycjusza*) w porównaniu z kurczętami RIR. Odnotowano różnice pomiędzy grupami w temperaturze rektalnej oraz radiacyjnej w 6., 9. oraz 12. tygodniu doświadczenia. Wykazano również znaczące różnice pomiędzy kurczętami rzeźnymi rhode island red a hubbard JA 957 w poziomie oznaczonych parametrów krwi: hematokrytu, hormonów tarczycy, kortykosteronu, SOD oraz MDA.

Tabela 1. Wyniki analizy rzeźnej kurcząt rzeźnych

Wyszczególnienie (%)	RIR	hubbard JA 957	SEM
wydajność rzeźna z podrobami	72,26 A	77,68 B	0,51
wydajność rzeźna bez podrobów	67,39 A	74,31 B	0,61
mięśnie piersiowe	14,86 A	21,38 B	0,58
mięśnie nóg	19,01	19,89	0,26
kości nóg	7,03 A	5,41 B	0,18
tłuszcz sadełkowy	1,73 A	2,66 B	0,16
podroby	6,62 A	4,33 B	0,20

wątroba	2,40 A	2,10 B	0,05
żółtek	3,56 A	1,67 B	0,17
serce	0,67 A	0,53 B	0,01

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,01$)

Tabela 2. pH – mięśni piersiowych i nóg kurcząt rzeźnych

Wyszczególnienie		RIR	hubbard ja 957	SEM
mięśnie piersiowe	pH ₁₅	6,07 a	6,30 b	0,05
	pH ₂₄	6,25 A	5,87 B	0,04
mięśnie nóg	pH ₁₅	6,32 A	6,62 B	0,04
	pH ₂₄	6,67	6,39	0,08

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

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,01$)

Tabela 3. Udział narządów limfatycznych i serca (%) w stosunku do masy ciała kurcząt rzeźnych

Wyszczególnienie (%)	Tydzień odchowu	RIR	hubbard JA 957	SEM
śledziona	6	0,244 A	0,106 B	0,020
	9	0,204 A	1,310 B	0,141
	10	0,208 a	0,161 b	0,012
	12	0,198 A	0,108 B	0,013
torba Fabrycjusza	6	0,723 A	0,272 B	0,063
	9	0,458 A	0,273 B	0,026
	10	0,483 A	0,101 B	0,048
	12	0,385 A	0,089 B	0,040
grasica	6	0,569	0,449	0,037
	9	0,508	0,443	0,025
	10	0,457	0,417	0,031
	12	0,414	0,474	0,040

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

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,01$)

Tabela 4. Wyniki analizy krwi kurcząt rzeźnych

Wyszczególnienie	Tydzień odchowu	RIR	Hubbard JA 957	SEM
Hematokryt (%)	6.	30,80 a	28,39 b	0,54
T ₃ (nmol/l)		5,57 A	3,32 B	0,38
T ₄ (nmol/l)		96,79 A	22,32 B	11,64
Kortykosteron (ng/ml)		2,18 A	0,85 B	0,28
SOD (ng/ml)		16,00 A	30,02 B	2,50
MDA (nmol/ml)		11,82 a	70,31 b	12,39
Hematokryt (%)	9.	29,78	27,60	0,78
T ₃ (nmol/l)		4,13a	2,96 b	0,27
T ₄ (nmol/l)		88,97 A	23,16 B	11,99
Kortykosteron (ng/ml)		4,65	0,76	1,03

SOD (ng/ml)		17,27	10,85	3,12
MDA (nmol/ml)		14,03	21,04	1,98
Hematokryt (%)	10.	26,95	24,90	0,56
T ₃ (nmol/l)		4,32 A	2,06 B	0,40
T ₄ (nmol/l)		93,84 A	32,33 B	11,58
Kortykosteron (ng/ml)		3,58 a	1,16 b	0,58
SOD (ng/ml)		17,11	11,03	1,74
MDA (nmol/ml)		10,69 a	18,27 b	1,79
Hematokryt (%)	12.	28,85	30,40	0,50
T ₃ (nmol/l)		3,62 A	1,39 B	0,40
T ₄ (nmol/l)		127,27 A	35,97 B	15,86
Kortykosteron (ng/ml)		4,76 A	0,31 B	0,84
SOD (ng/ml)		31,76	6,13	6,93
MDA (nmol/ml)		20,01	13,34	4,28

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

A, B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,01$)

Zadanie 04-12-04-11

Wpływ zabiegu sterylizacji kogutów i żywienia w oparciu o krajowe źródła białka na jakość mięsa

kierownik zadania: dr inż. Jolanta Calik

W ostatnich latach obserwuje się coraz większe zainteresowanie produktami pochodzącymi od kurcząt rzeźnych, powstałych przy udziale rodzimych ras odchowywanych w warunkach ekstensywnych. Polska posiada unikalną na skalę europejską kolekcję ras/rodów kur nieśnych objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że dysponujemy rasami kur o zróżnicowanym fenotypie, produktywności oraz jakości jaj i mięsa. Wyróżnia je dobra zdrowotność, odporność na niekorzystne warunki klimatyczne, a także niekontrolowane warunki chowu drobnostadkowego. W produkcji drobiarskiej dużą trudność w powiązaniu nieśnego użytkowania kur z wykorzystaniem ich dla potrzeb produkcji mięsa, sprawia wzrastająca w miarę intensyfikacji kierunku nieśnego liczba zbędnych kogutków, a rozwiązaniem tych trudności może być zabieg kastracji kogutków.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu zabiegu sterylizacji wybranych ras kogutów i żywienia w oparciu o krajowe źródła białka na jakość mięsa. Badania przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzeli Sp. z o.o.

Materiał doświadczalny stanowiły:

- koguty/kapłony rasy rhode island Red K-22 – doświadczenie I,
- kapłony rhode island red (R-11), rhode island white (A-33), sussex (S-66) i żółtonóżka kuro-patwiana (Ż-33) – doświadczenie II.

Ptaki po wylęgu indywidualnie zważono i oznakowano znaczkami, a następnie przydzielono do czterech grup po 40 sztuk w każdej grupie. Procedury doświadczenia były zgodne z wymaganiami nadanymi przez Komisję Etyczną nr 515/2021 z dnia 28 kwietnia 2021 roku. Zabieg kastracji przeprowadził lekarz weterynarii w 8. tygodniu życia. Ptaki utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 sztuk/m². Przez cały

okres odchowu i tuczu, ptaki żywione były *ad libitum* mieszankami paszowymi według receptur opracowanych w Instytucie Zootechniki PIB, w układzie: doświadczenie I – mieszanka kontrolna i doświadczenia, doświadczenie II – mieszanka doświadczenia. Po zakończeniu tuczu, w 24. tygodniu życia, z każdej grupy wybrano do uboju po 10 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Po uboju określono wydajność rzeźną ptaków, parametry fizyko-chemiczne mięśni piersiowych i nóg oraz przeprowadzono ich ocenę sensoryczną.

Zdrowotność ocenianych kogutów i kapłonów w okresie wychowu jak i tuczu kształtowała się na dobrym poziomie. Obserwowane padnięcia i brakowania zdrowotne były niskie i dotyczyły pierwszych dni po wykonaniu zabiegu kastracji (2,50-5,00%).

W produkcji kapłonów bardzo ważną rolę odgrywa żywienie. Generalnie zaleca się, aby podzielone było na 2-3 okresy, a 70% ich diety powinny stanowić zboża, uzupełniane paszami objętościowymi. Właściwie już od wieków wskazywano na końcowy okres żywienia, tj. 2-3 tygodnie przed ubojem. Stosowano wówczas specjalne dotuczanie, gdzie ptakom podawano kluski przygotowane z mąki jęczmiennej lub owsianej, mleka, miodu i ziół. Obecnie, w większości badań wykorzystywane są mieszanki zbożowe z soją. Wychodząc naprzeciw konsumentom, którzy coraz częściej zwracają uwagę na sposób żywienia ptaków, w zaprojektowanych doświadczeniach opracowano mieszanki paszowe, które oparte były na krajowych źródłach białka.

Kapłon rasy żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33)
(Fot. 1. J. Calik)



Kapłon rasy rhode Island red (R-11)
(Fot. 2. J. Calik)



Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono zasadność zastosowania w żywieniu kapłonów mieszanki doświadczenia, opartej na krajowych źródłach białka. Zabieg kastracji kogutów wpłynął korzystnie na masę ciała, wykorzystanie paszy, wydajność rzeźną i umięśnienie tuszki. Oceniane mięśnie kapłonów wyróżniały się lepszą wodochłonnością i kruchością oraz oceną chemiczną w porównaniu do niekastrowanych kogutów. Pomiedzy ocenianymi grupami ptaków odnotowano także zróżnicowanie w zakresie wybarwienia tuszek i mięśni, które u kapłonowanych ptaków były jaśniejsze (L^*) i bardziej żółte (b^*), natomiast u kogutów bardziej czerwone (a^*). Mięśnie piersiowe, jak i nogi kapłonów, w porównaniu do kogutów wyróżniały się lepszą oceną sensoryczną we wszystkich kategoriach oceny. Zapach i smak mięsa był delikatny, aromatyczny, a mięso soczyste i kruche. Zastosowanie mieszanki doświadczenia, tj. opartej na krajowych źródłach białka wpłynęło korzystnie na parametry fizyko-chemiczne jakości mięsa, a spośród ocenianych rodów szczególnie wyróżniały się kapłony rasy: Ż-33 i R-11 i K-22. Mięso kapłonów uzyskanych w oparciu o rodzime rasy może być atrakcyjnym surowcem w tradycyjnej polskiej kuchni i cennym uzupełnieniem rynku o produkt niszowy, przeznaczony

dla konsumentów poszukujących mięsa o wysokiej jakości. Ponadto, zabieg kastracji może przyczynić się do zagospodarowania nadliczbowych kogutków.

Zadanie 04-12-05-11

Określenie wpływu wybranych preparatów bioaktywnych podanych in ovo na kształtowanie wskaźników wylęgowości drobiu wodnego

kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

Celem badań było określenie wpływu wybranego preparatu synbiotycznego podanego *in ovo*, w określonych terminach okresu embriogenezy kaczek i gęsi, na kształtowanie wskaźników wylęgowości, przeżywalności i zdrowotności piskląt.

Materiałem badawczym w realizowanym zadaniu były jaja wylęgowe kaczek pochodzące ze stada hodowlanego D-11 (kaczka dworka), przeznaczonego do chowu przydomowego oraz jaja wylęgowe gęsi białych kołudzkie® (W-31). Ptaki te utrzymywane są w Dworzyskach w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego IZ PIB ZD Kołuda Wielka.

Kaczki dworki (Fot. 1. L. Lewko)



Gęsi białe kołudzkie® (Fot. 2. L. Lewko)



Ptaki, od których pobierano jaja do iniekcji utrzymywane były w warunkach technologicznych zgodnych z ogólnymi założeniami dla tego typu produkcji. Od ptaków będących w jednakowym wieku, pobrano jaja do doświadczalnej inkubacji (dwa powtórzenia). Ogółem, doświadczalnej inkubacji poddano 240 jaj kaczyc i 240 jaj gęsich (łącznie 480 jaj). W okresie od maja do czerwca przeprowadzono iniekcję wylęgowych jaj kaczek i gęsi preparatem synbiotycznym POULTRYSTAR®Sol (BIOMIN, Austria).

Utworzono osiem grup doświadczalnych:

- jaja kaczki (D-11) w następujących grupach:
 1. kontrolna niepoddana iniekcji (D11-K1)* (30 jaj) (13. doba),
 2. doświadczalna 1 (D11-S1) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
 3. kontrolna niepoddana iniekcji (D11-K2)* (30 jaj) (20. doba),
 4. doświadczalna 2 (D11-S2) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj),
- jaja gęsi (W-31) w następujących grupach:
 1. kontrolna niepoddana iniekcji (W31-K1)* (30 jaj) (13. doba),

2. doświadczalna 1 (W31-S1) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 13 dniu inkubacji (30 jaj),
3. kontrolna niepoddana iniekcji (W31-K2)* (30 jaj) (20. doba),
4. doświadczalna 2 (W31-S2) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

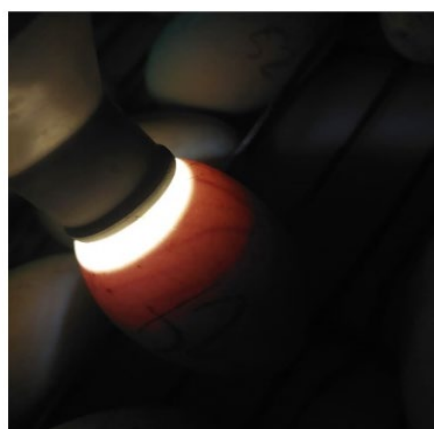
*jaj nie poddano iniekcji, ale wyjęto z aparatu na czas (średnio 30 minut), w którym przebywały na zewnątrz aparatu wylęgowego jaja iniekowane danej grupy doświadczalnej.

Wszystkie doświadczenia i badania zrealizowano w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, IZ PIB ZD Kołuda Wielka, ze względu na to, iż na fermie utrzymywane są stada kaczek D-11 i gęsi białych kołudzkich (W-31), od których pobrano jaja przewidziane do eksperymentów.

W tutym zakładzie wylęgowym przeprowadzono, zgodnie z przyjętymi w nim standardowymi procedurami, inkubację doświadczalnych jaj oraz iniekcje.

Wszystkie uzyskane wyniki składające się na ocenę wskaźników wylęgowości z uwzględnieniem rodzaju zastosowanego preparatu synbiotycznego oraz jego 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 dwuczynnikową analizę wariancji z uwzględnieniem interakcji. Istotność wpływu każdego źródła zmienności oceniono testem F-Snedecora.

Świecenie doświadczalnych jaj (Fot. 3. i 4. L. Lewko)



W przypadku kaczek, najcięższe jaja nałożone pochodziły z grupy doświadczalnej D11-S1 iniekowanej preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg /jajo w 13. dniu inkubacji – 92,33 g. Z kolei najniższą masę nałożonych jaj odnotowano w grupie D11-K1 (grupa kontrolna niepoddana iniekcji/13. doba) – 89,77 g. W przypadku pozostałych grup doświadczalnych masa w/w jaj ukształtowała się na zbliżonym poziomie i wyniosła 91,13 g (iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 20. dniu inkubacji) i 91,55 g (grupa kontrolna niepoddana iniekcji/20. doba). Masy nałożonych jaj gęsi zawierały się w przedziale od 175,9 g (W31-K1/grupa kontrolna nie poddana iniekcji w 13. dobie) do 177,9 g (W31-K2/grupa kontrolna nie poddana iniekcji w 20 dobie). Masa jaj nałożonych z grup doświadczalnych iniekowanych preparatem synbiotycznym wyniosła: 176,4 g (iniekcja w 20. dobie) oraz 177,2 g (iniekcja w 13. dobie). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

W grupie doświadczalnej kaczek iniekowanych preparatem synbiotycznym – w dawce 5 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (D11-S1) – wykazano największy stosunek jaj wylęzonych do zapłodnionych (88,12%) i wylęzonych do przełożonych (93,85%). Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku grupy kontrolnej w 20 dniu inkubacji (D11-K2), gdzie uzyskane wartości były najniższe i wyniosły odpowiednio 84,40 i 91,21%. Podobną zależność odnotowano w przypadku jaj gęsi, gdzie największy stosunek jaj wylęzonych do zapłodnionych (87,16%) i wylęzonych do przełożonych (93,88%) dotyczył jaj wylęgowych pochodzących z grupy doświadczalnej iniekowanej preparatem synbiotycznym (5 mg/jajo) w 13. dniu inkubacji. Na zbliżonym poziomie ukształtował się stosunek jaj wylęzonych do przełożonych, który zawierał się w przedziale od 93,26% (W31-K2) do 93,88% (W31-S1). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Jaja doświadczalne kaczek iniekowane preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 13. dniu inkubacji cechowały się najmniejszą ilością jaj niewylęzonych (6,15%) i zarodków zamartych (6,10%), a jednocześnie największą ilością jaj przełożonych (93,90%). Ilość piskląt kalekich mieściła się w przedziale od 0,20% (D11-S2) do 0,25% (D11-K1). Natomiast największą ilością zarodków zamartych (7,55%) przy jednocześnie najmniejszej ilości jaj przełożonych wyróżniła jaja pochodzące z grupy doświadczalnej kontrolnej nie poddanej iniekcji w 13. dobie (D11-K1). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Iniekcja doświadczalnych jaj wybranym preparatem synbiotycznym (Fot. 5. L. Lewko)



W przypadku gęsi najkorzystniejszymi wskaźnikami wylęgu wyróżniła się grupa doświadczalna iniekowana preparatem synbiotycznym w 13. dniu inkubacji dawką 5 mg/jajo. Wykazano najmniejszą ilość jaj niewylęzonych (6,12%), piskląt kalekich (0,30%), zarodków zamartych (7,16%), a ponadto największą ilość jaj przełożonych wynoszącą 92,84%. Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Zadanie 04-12-06-11

Kształtowanie się wybranych cech fizykochemicznych mięsa kur i pulard w zależności od pochodzenia i żywienia

kierownik zadania: dr inż. Joanna Obrzut

Celem badań była ocena jakości mięsa kur i pulard rhode island red (K-22). Doświadczenie przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB Chorzów Sp. z o.o. Procedury doświadczenia były zgodne z wymaganiami Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Ptaki po wylęgu oznakowano i przydzielono losowo do czterech grup:
grupa I – kurki bez sterylizacji; żywienie mieszanką standard,

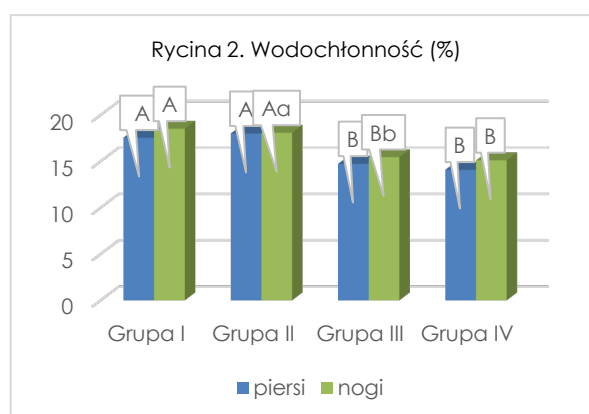
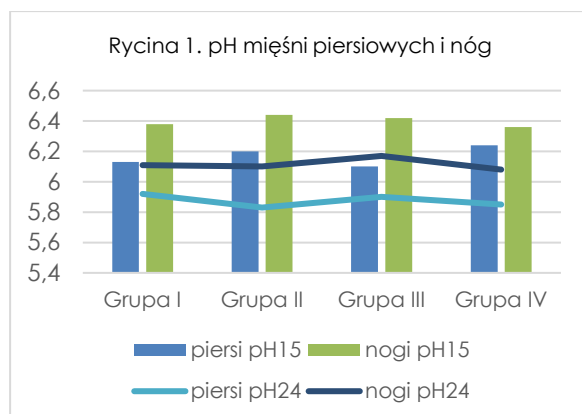
grupa II – kurki bez sterylizacji; żywienie mieszanką doświadczalną,
 grupa III – pulardy; żywienie mieszanką standard,
 grupa IV – pulardy; żywienie mieszanką doświadczalną.

Ptaki utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 sztuk/m². Program szczepień obejmował szczepienia przeciwko chorobie Mareka, rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro oraz kokcydiozie. Przez cały okres odchowu i tuczu kurki/pulardy żywione były *ad libitum*. Zabieg sterylizacji został przeprowadzony w znieczuleniu miejscowym przez lekarza weterynarii w 10. tygodniu życia ptaków, przy masie ciała ok. 1 kg. Tucz ptaków trwał do 24. tygodnia życia.

Po zakończeniu doświadczenia, z każdej grupy wybrano do uboju po 8 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Ptaki przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Po uboju sprawdzono skuteczność przeprowadzonego zabiegu sterylizacji (brak jajnika). Schłodzone tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989). Z każdej tuszki pobrano próbki mięśni piersiowych i nóg w celu określenia ich cech fizycznych, tj.: kwasowości, barwy, wodochłonności, wycieku, strat termicznych oraz kruchości mięsa.

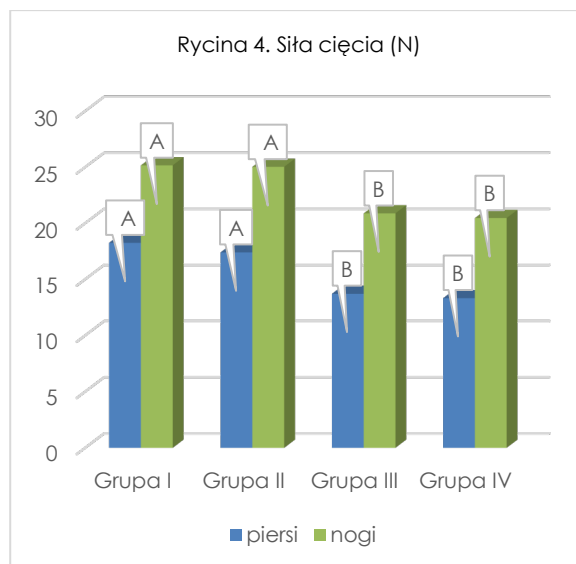
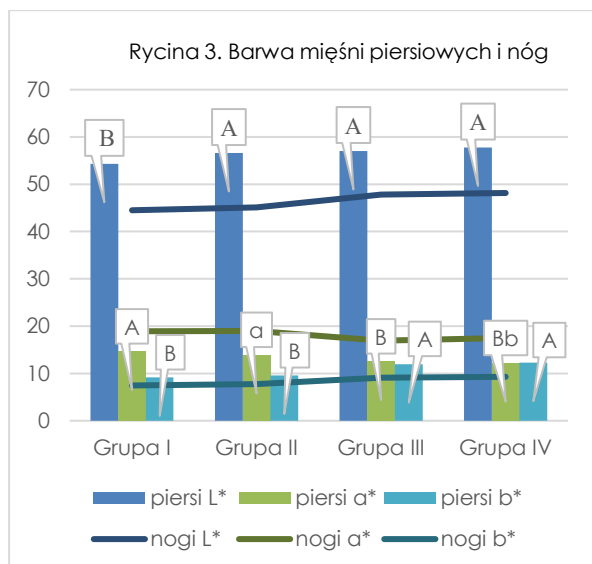
W badaniach przeprowadzono również ocenę sensoryczną mięśni piersiowych i mięśni udowych, zgodnie z założeniami metodycznymi Baryłko-Pikielna i Matuszewska (2014). Uzyskane wyniki zweryfikowano statystycznie, przy użyciu analizy wariancji (ANOVA). Obliczenia wykonano pakietem statystycznym Statistica 13.3.

Kwasowość mięśni piersiowych i mięśni nóg ptaków (rycina 1.), mierzona po 15 minutach po uboju oraz po 24 godzinach chłodzenia tuszek, utrzymywała się na podobnym poziomie, zarówno między kurkami a pulardami żywionymi tymi samymi mieszankami. Wodochłonność w badanych mięśniach była lepsza u pulard niż u kur i statystycznie istotna (rycina 2.).



W mięśniach piersiowych i mięśniach nóg pulard stwierdzono istotnie mniejszy ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$) wyciek po 24 godzinach przechowywania. Ponadto, w mięśniach nóg ptaków sterylizowanych odnotowano istotnie ($p \leq 0,05$) mniejsze straty termiczne.

Zarówno mięśnie piersiowe jak i nóg ptaków sterylizowanych były jaśniejsze (L^*), cechowały się mniejszym wybarwieniem w kierunku czerwieni (a^*) a większym w kierunku żółci (b^*) (rycina 3.). Pomiar siły cięcia był najwyższy i statystycznie istotny ($p \leq 0,01$) u kur karmionych mieszanką standardową zarówno w mięśniach piersiowych jak i nóg (rycina 4.).



W ocenie sensorycznej, mięso pulard we wszystkich kategoriach, tj.: zapach, soczystość, kruchość i smak, uzyskało więcej punktów niż mięso kurek (tabela 1.). Różnice te potwierdzono statystycznie ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$).

Tabela 1. Wyniki analizy sensorycznej mięśni piersiowych i mięśni nóg

Wyszczególnienie	grupa I	grupa II	grupa III	grupa IV
mięśnie piersiowe				
zapach (pkt.)	4,27 ± 0,26 B	4,22 ± 0,26 B	4,77 ± 0,36 A	4,83 ± 0,25 A
soczystość (pkt.)	3,88 ± 0,54 Bb	3,94 ± 0,52 Bb	4,55 ± 0,39 a	4,66 ± 0,55 A
kruchość (pkt.)	4,16 ± 0,55 b	4,22 ± 0,57 b	4,72 ± 0,44 a	4,77 ± 0,50 a
smak (pkt.)	3,66 ± 0,79 B	3,72 ± 0,61 B	4,72 ± 0,44 A	4,77 ± 0,26 A
mięśnie nóg				
zapach (pkt.)	4,22 ± 0,66 B	4,38 ± 0,22 b	4,77 ± 0,36 A	4,88 ± 0,33 Ab
soczystość (pkt.)	4,11 ± 0,54 B	4,22 ± 0,26 B	4,72 ± 0,36 A	4,83 ± 0,25 A
kruchość (pkt.)	4,11 ± 0,48 B	4,27 ± 0,50 b	4,72 ± 0,36 Aa	4,77 ± 0,36 Aa
smak (pkt.)	4,16 ± 0,43 B	4,22 ± 0,26 B	4,72 ± 0,36 A	4,83 ± 0,25 A

Istotność różnic: A, B – różnice wysoce istotne ($P \leq 0,01$); a, b – różnice istotne ($P \leq 0,05$).

Podsumowując, zabieg sterylizacji kurek oraz zastosowanie mieszanki doświadczalnej wpłynęło korzystnie na masę ciała i badane parametry jakości mięsa. Oceniane mięśnie pulard wyróżniały się lepszą wodochłonnością i kruchością w porównaniu do niesterylizowanych kurek. W mięśniach piersiowych i mięśniach nóg ptaków sterylizowanych, stwierdzono większe wysycenie barwy w kierunku jasności (L^*) i żółci (b^*), a mniejsze w kierunku czerwieni (a^*).

W przeprowadzonej ocenie sensorycznej zarówno mięśnie piersiowe, jak i nóg pulard, oceniono wyżej w zakresie wszystkich badanych cech ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$).

Zakład Hodowli Owiec i Kóz
kierownik: dr hab. Aldona Kawęcka, prof. IZ PIB

Zadanie 01-13-04-11

Wykorzystanie dodatków ziołowych w poprawie zdrowotności i wyników produkcyjnych małych przeżuwaczy

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

Celem podjętych badań jest zbadanie wpływu wybranych dodatków paszowych na zdrowotność i wyniki produkcyjne jagniąt i koźląt ras rodzimych oraz na wyniki użytkowości mlecznej kóz karpackich. Zwierzęta otrzymywały mieszankę ziołową, w postaci dodatku suszu z ziół do paszy treściwej.

Koziółek rasy karpackiej
(Fot. 1. M. Puchata)



Jagnięta wrzosówki
(Fot. 2. M. Pasternak)



W Stacji Oceny Tryków w Kociugach w ZD IZ PIB Pawłowice przeprowadzono część doświadczalną zadania. Koźłeta rodzimej rasy kóz karpackich ze stada Instytutu Zootechniki PIB utrzymywane były w kojach grupowych. Przez cały okres tuczu zwierzęta w grupie doświadczalnej otrzymywały sporządzoną w ramach eksperymentu mieszankę treściwą w ilości 20 g/kg paszy (skład: czosnek, jeżówka, czarnuszka, oregano).

Pomiary przyżyciowe

W czasie doświadczenia wykonano pomiary przyżyciowe: masa ciała, pomiary USG powierzchni *m.l. dorsi*, kontrola pobrania paszy (tabela 1.).

Pomiary poubojowe

Po zakończeniu tuczu jagnięta i koźłeta zostały poddane ubojowi doświadczalnemu. Analiza rzeźna wykonana została według procedur stosowanych w Instytucie Zootechniki PIB. Ocena poubojowa tuszy objęta oszacowanie wydajności rzeźnej, pomiary wyrębów, określenie masy wyrębów, dysekcję szczegółową udźca.

Ocena jakości mięsa

Pobrane próbki mięśnia udźca zabezpieczono w celu poddania dalszym analizom składu mięsa: sucha masa, popiół całkowity, tłuszcz wolny, białko ogólne profil WKT z CLA cholesterol, kolagen, aminokwasy.

Ocena jakości mięsa jagniąt i kozłąt

W tabeli 2. przedstawiono wyniki analiz chemicznych mięsa jagniąt i kozłąt żywionych paszą kontrolną oraz z różnym udziałem fitododatku (10 lub 20 g/kg paszy). Analizy te dotyczą prac zaplanowanych na 2022 rok.

Nie stwierdzono różnic w podstawowym składzie mięsa między gatunkami. Dodatek ziół nie miał wpływu na zawartość składników w mięsie. W przypadku tłuszczu mięsa obu gatunków stwierdzono różnice w zawartości kwasów PUFA n-3 oraz stosunku n-6/n-3.

Tabela 1. Cechy tuczne koziołków

Pomiary	Grupa	Kontrola		Ziółta	
		średnia	odch. stan.	średnia	odch. stan.
Wiek rozpoczęcia tuczu (dni)		202,45	32,30	209,00	30,97
Wiek zakończenia tuczu (dni)		256,45	32,30	263,00	30,97
Czas trwania tuczu (dni)		54,00	0,00	54,00	0,000
Masa początkowa (kg)		18,97	4,34	19,33	4,31
Masa końcowa (kg)		24,08	4,56	24,65	3,64
Przyrost w czasie tuczu (kg)		5,11	1,85	5,32	2,26
Zużycie paszy całkowite (kg)		41,82	0,01	36,66	0,001
Zużycie paszy na 1 kg przyrostu (kg)		9,44	4,09	8,8	5,68
Przyrost w czasie tuczu (g/dzień)		94,64	34,19	98,55	42,04
Przyrost całkowity (g/dzień)		94,73	17,29	93,97	10,06

Tabela 2. Skład chemiczny mięsa jagnięcego i kozłowego

Grupa	Parametr	Koziołki		Tryczki	
		średnia	odch. stand.	średnia	odch. stand.
Kontrola	SFA	39.16	1.34	41.65	2.51
	UFA	60.84	1.34	58.35	2.52
	MUFA	44.62	5.42	41.73	3.01
	PUFA	16.21	5.49	16.62	2.10
	PUFA-6	14.55	5.37	14.98	2.02
	PUFA-3	1.03A	0.24	0.98A	0.16
	DFA	77.84	1.74	76.01	1.12
	UFA-SFA	1.55	0.08	1.41	0.14
	MUFA-SFA	1.14	0.14	1.01	0.12
	PUFA-SFA	0.41	0.14	0.40	0.06
	PUFA 6-3	14.38A	2.98	15.28A	0.84
	SFA	40.05	1.03	40.51	1.54
	UFA	59.94	1.03	59.48	1.54
	MUFA	41.25	5.80	42.44	4.35
Ziółta 1	PUFA	18.68	6.07	17.04	3.41

Ziota 2	PUFA-6	17.17	5.96	15.49	3.31
	PUFA-3	0.88B	0.21	0.74B	0.14
	DFA	78.80	1.59	75.33	1.11
	UFA-SFA	1.49	0.06	1.47	0.09
	MUFA-SFA	1.02	0.14	1.05	0.14
	PUFA-SFA	0.46	0.15	0.41	0.07
	PUFA 6-3	19.77B	6.13	20.81B	1.57
	SFA	39.25	2.21	39.85	1.35
	UFA	60.74	2.21	60.14	1.35
	MUFA	40.03	5.45	44.82	3.84
	PUFA	20.71	4.91	15.31	3.52
	PUFA-6	19.21	4.77	14.01	3.29
	PUFA-3	0.95B	0.19	0.72B	0.21
	DFA	79.90	2.24	75.77	1.49
	UFA-SFA	1.55	0.14	1.51	0.08
	MUFA-SFA	1.02	0.17	1.12	0.11
	PUFA-SFA	0.53	0.12	0.38	0.09
	PUFA 6-3	20.71B	6.34	19.1B	2.64

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

Ocena jakości mięsa jagniąt merynosa

W tabeli 3. przedstawiono wyniki analiz chemicznych mięsa jagniąt merynosa polskiego w starym typie oraz merynosa barwnego, żywionych paszą kontrolną oraz z różnym udziałem fitododatku (10 lub 20 g/kg paszy). Analizy statystyczne potwierdziły wpływ dodatku ziół do paszy na profil kwasów tłuszczowych tłuszczu udźca jagniąt merynosa, a także różnice między rasami.

Tabela 3. Profil kwasów tłuszczowych tłuszczu mięsa jagnięcego

Grupa	Parametr	Merynos barwny		Merynos w starym typie	
		średnia	odch. stand.	średnia	odch. stand.
Kontrola	SFA	46.68A	1.24	46.12A	1.62
	UFA	53.32A	1.24	53.87A	1.62
	MUFA	38.63	1.58	38.78	1.87
	PUFA	14.68	0.49	15.09	2.12
	PUFA-6	13.25	0.44	14.39	2.09
	PUFA-3	1.28	0.11	0.51A	0.07
	DFA	72.31	0.95	70.74	2.38
	UFA-SFA	1.14A	0.05	1.17A	0.07
	MUFA-SFA	0.82A	0.05	0.84A	0.05
	PUFA-SFA	0.31	0.01	0.32	0.05
Ziota 1	PUFA6-3	10.38A	0.91	28.34A	4.73
	SFA	44.88	1.32	42.07B	1.63
	UFA	55.11	1.32	57.92B	1.63
	MUFA	40.03	1.97	41.68	2.09
	PUFA	15.08	2.69	16.24	2.24
	PUFA-6	13.87	2.61	15.07	2.14
	PUFA-3	1.08	0.11	0.99B	0.14
	DFA	72.23	1.35	72.33	2.05
	UFA-SFA	1.22	0.06	1.38B	0.09
	MUFA-SFA	0.89	0.04	0.99B	0.07
Ziota 2	PUFA-SFA	0.33	0.06	0.38	0.05
	PUFA6-3	12.73B	1.76	15.29B	1.86

	SFA	44.37B	1.02	43.63B	1.69
	UFA	55.62B	1.02	56.36B	1.69
	MUFA	41.23	2.67	40.93	3.83
	PUFA	14.39	2.02	15.42	4.22
	PUFA-6	13.16	1.83	14.34	4.03
	PUFA-3	1.09	0.22	0.92B	0.23
	DFA	72.60	1.45	71.86	1.87
	UFA-SFA	1.25B	0.05	1.29B	0.08
	MUFA-SFA	0.93B	0.08	0.93B	0.09
	PUFA-SFA	0.32	0.04	0.35	0.11
	PUFA-6-3	12.19B	1.50	15.70B	2.91

A, B – $p \leq 0,01$ - wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się statystycznie istotnie

Ocena jakości mleka

Badania na kozach karpackich przeprowadzono w siedzibie stada ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. Kozy karpackie po odsadzeniu koźląt (około 100. dnia życia) były dojne mechanicznie od maja do października. Na czas trwania badań stado podzielono na grupy doświadczalne. Czynnikiem doświadczalnym była ilość dodatku ziółowego w paszy treściwej.

W miesiącach lipiec – sierpień, po okresie adaptacji do nowej paszy pobierano próbki mleka co dwa tygodnie do oceny jego jakości (skład, zawartość komórek somatycznych) na aparacie Milcoscan. Obecnie trwa analiza uzyskanych wyników.

Zadanie 01-13-05-11

Ocena jakości mleka pozyskanego od rodzimych ras owiec i kóz pod kątem produkcji wyrobów mlecznych ze szczególnym uwzględnieniem walorów prozdrowotnych i składników alergennych

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

Celem zadania jest ocena jakości mleka pozyskanego od rodzimych ras owiec i kóz pod kątem produkcji wyrobów mlecznych, ze szczególnym uwzględnieniem walorów prozdrowotnych i składników alergennych.

Kozy karpackie (Fot. I. M. Pasternak)



W pierwszym roku realizacji ocenie poddano mleko pochodzące od kóz rasy karpackiej ze stada objętego programem ochrony zasobów genetycznych, kóz saaneńskich oraz krów utrzymywanych w gospodarstwie ekologicznym. Zwierzęta utrzymywane były w tradycyjnych systemach, ze stałym dostępem do pastwiska od maja do września.

Zbiornicze próby mleka do analiz pobrano w maju i wrześniu, podczas doju porannego i wieczornego, a następnie dostarczone w warunkach chłodniczych do przetwórnicy, gdzie wytwarzano z nich jogurty i sery.

Jogurt i świeży ser podpuszczkowy wytworzone zostaną w warunkach przetwórnicy z mleka zbiorczego (osobno z każdego rodzaju mleka), zgodnie z recepturami stosowanymi przez serowara przy wytwarzaniu tych produktów (tabela 1.).

Tabela 1. Etapy produkcji sera i jogurtów

Etapy produkcji sera	Etapy produkcji jogurtu
Pasteryzacja w temperaturze 75°C w czasie 15 s Zaprawianie podpuszczką, ok 30 min. Krzepnięcie ok. 30 min. Mechaniczno-termiczna obróbka skrzepu Przeniesienie do perforowanych form, Ociekanie przez 24 godziny Formowanie, prasowanie Pakowanie	Podgrzanie mleka do temperatury 40–45°C Normalizacja zawartości tłuszczu Pasteryzacja w 90°C przez 5 minut Chłodzenie do 42°C Zaszczepienie mleka bakteriami Rozlew i inkubacja Zakwaszenie kwasem jogurtowym Schłodzenie do 4–7°C w ciągu kilkunastu godzin

Próbki mleka, jogurtów i serów poddano analizom w laboratorium Katedry Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Przeprowadzono następujące analizy:

- mleko: gęstość, kwasowość miareczkowa, pH, czas krzepnięcia pod wpływem podpuszczki, liczbę alkoholową. Określono również podstawowy skład chemiczny: suchą masę, białko w tym zawartość frakcji białkowych oraz profil aminokwasowy, tłuszcz, laktozę, popiół oraz ocenę sensoryczną. Zbadano również zawartość polifenoli ogółem i właściwości przeciwutleniające.
- produkty: przy ocenie jakości produktów mlecznych wzięto pod uwagę skład chemiczny: suchą masę, białko w tym zawartość frakcji białkowych oraz profil aminokwasowy, tłuszcz, laktozę, popiół, ocenę sensoryczną. Tak jak w przypadku mleka określono zawartość polifenoli ogółem i właściwości przeciwutleniające.

Sery i jogurty z mleka koziego (Fot. 2. M. Puchała)



Przydatność technologiczna mleka

Skład podstawowy i wartość energetyczną mleka krowiego i koziego przedstawiono w tabeli 2. Mleko krowie miało wyższą zawartość suchej masy, tłuszczu i białka niż mleko kozie oraz było bardziej kaloryczne. Mleko kóz saaneńskich zawierało najwięcej laktozy, natomiast kóz karpaccich było bogatsze w składniki mineralne.

W tabeli 3. przedstawiono wybrane wskaźniki przydatności technologicznej mleka. Kwasowość mleka jest jednym z głównych parametrów decydujących o jego przydatności technologicznej. Normalne, świeże mleko charakteryzuje się pH w granicach 6,6-6,8 oraz kwasowością miareczkową od 6,5 do 7,5°SH. Badane próbki mleka cechowały się kwasowością mieszczącą się w powyższym zakresie, co dobrze świadczy o świeżości i normalności składu surowca.

Podstawowym kryterium przydatności technologicznej mleka do produkcji koncentratów i produktów sterylizowanych jest ocena stabilności układu koloidalnego mleka, którą można oznaczyć jako tzw. stabilność alkoholową. Wynika to z faktu, że stężony alkohol etylowy ma właściwości silnie dehydratacyjne, a zatem destabilizuje układ koloidalny białek mleka. Mleko o wysokiej stabilności powinno charakteryzować się liczbą alkoholową powyżej 6. Uzyskane wyniki świadczą zatem o niskiej stabilności układu koloidalnego badanego mleka.

Metoda koagulacji podpuszczkowej mleka jest powszechnie stosowana podczas produkcji serów. W związku z tym jednym z głównych kryteriów przydatności technologicznej mleka do produkcji serów jest ocena krzepliwości mleka pod wpływem podpuszczki. Wszystkie oceniane próbki mleka charakteryzowały się typowym dla mleka czasem koagulacji podpuszczkowej, który w założonych warunkach analizy w próbie Scherna powinien wynosić od 240 do 600 sekund.

Tabela 2. Skład chemiczny mleka pochodzącego od krów rasy jersey, kóz saaneńskich i kóz karpaccich

Skład chemiczny	Krowa jersey	Koza saaneńska	Koza karpacka
S.M (g/100 g)	13,37	11,86	11,08
Tłuszcz (g/100 g)	5,24	3,61	3,48
Białko (g/100 g)	3,43	3,20	3,10
Popiół surowy (g/100 g)	0,75	0,81	0,83
Laktoza (g/100 g)	4,05	4,24	3,67
kcal/100 g	77,03	62,27	58,36
kJ/100 g	320,84	260,14	243,67

Tabela 3. Wskaźniki przydatności technologicznej mleka pochodzącego od krów rasy jersey, kóz saaneńskich i kóz karpaccich

Parametr	Krowa jersey	Koza saaneńska	Koza karpacka
Gęstość (g/cm ³)	1,03	1,03	1,03
pH	6,74	6,68	6,70
Kwasowość (SH)	7,59	6,80	6,45
Czas krzepnięcia (min)	3,90	3,28	3,10
Liczba alkoholowa (ml)	4,43	2,73	3,37

Analiza frakcji białkowych mleka i jogurtów

Przydatność technologiczna mleka uzależniona jest od ogólnej zawartości białka oraz od zawartości poszczególnych jego frakcji. Z punktu widzenia produkcji serów znaczenie ma przede wszystkim wysoka zawartość frakcji kazeinowych, gdyż decyduje w głównym stopniu o wydajności produkcji. Wzajemnie proporcje między kazeiną i białkami serwatkowymi wpływają także na stabilność termiczną białek mleka. W przypadku nadmiaru, podatnych na koagulację pod wpływem wysokiej temperatury białek serwatkowych zmniejsza się stabilność termiczna mleka.

W procesie produkcji jogurtów procesowi fermentacji podlega laktoza jak również dochodzi do różnego rodzaju procesów proteolizy. Między innymi z części b-kazeiny powstaje gamma kazeina. Zmiany proteolityczne mają wpływ na właściwości przeciwutleniające. Zawartość poszczególnych frakcji białkowych różniła się w mleku (tabela 4.) oraz jogurtach krowich i owczych (tabela 5.).

Tabela 4. Frakcje białkowe białka mleka pochodzącego od krów rasy jersey, kóz saaneńskich i kóz karpackich

Frakcje białkowe	Krowa jersey	Koza saaneńska	Koza karpacka
Laktoferryina	0,70	2,30	2,13
Albumina serum	1,00	2,95	3,55
Immunoglobuliny	0,78	3,26	2,13
α -kazeina	51,30	13,41	18,09
β -kazeina	20,39	48,20	41,89
K-kazeina	11,39	10,96	15,56
β -laktoglobulina	7,30	10,04	5,91
α -laktoalbumina	5,17	6,44	9,08
Peptydy	1,96	2,44	1,66

Tabela 5. Frakcje białkowe białka jogurtów z mleka krowiego i koziego

Frakcje białkowe	Krowa	Koza
Laktoferryina	3,47	0,86
Albumina serum	1,87	1,58
Immunoglobuliny	1,28	1,17
α -kazeina	49,48	12,98
β -kazeina	18,12	48,14
gammaCN	0,57	10,81
K-kazeina	12,01	2,30
β -laktoglobulina	3,97	13,61
α -laktoalbumina	6,08	6,86
Peptydy	3,15	1,69

Właściwości przeciwutleniające

Mleko i mleczne produkty fermentowane mają ogromny wpływ na zdrowie. Szczególnie produkty fermentowane, dzięki obecności bakterii fermentacji mlekowej, wykazują silne działanie przeciwutleniające w stosunku do wolnych rodników, a jest to jeden z czynników zapobiegający nowotworom. Potencjał antyoksydacyjny wykazuje kazeina oraz laktoferryina, białka występujące w mleku i w mlecznych produktach fermentowanych. Jogurt oraz kefir cechują się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu z innymi produktami fermentowanymi dostępnymi na rynku. Frakcja β -kazeiny cechuje się wysoką aktywnością antyoksydacyjną ze względu na obecność reszt prolinowych.

Potężenie białek mleka, głównie kazeiny i β -laktoglobuliny oraz polifenoli może wpływać na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego mlecznych produktów fermentowanych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zarówno mleko jak i jego przetwory posiadają właściwości przeciwutleniające, przy czym potencjał utleniający jest wyższy w produktach, w których zaszły kontrolowane zmiany proteolityczne (tabela 6.).

Tabela 6. Właściwości przeciwutleniające mleka krowiego i koziego oraz serów i jogurtów wytworzonych z tego mleka

Parametr	Mleko		Ser		Jogurt	
	Krowa	Koza	Krowa	Koza	Krowa	Koza
Zawartość polifenoli ogółem (mg kw. galusowego/100g)	38,39	37,00	322,24	173,78	111,60	107,51
Właściwości przeciwutl. (met. FRAP)	0,16	0,14	0,60	0,33	0,31	0,15

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

Zadanie 01-14-05-11

Wpływ rolnictwa precyzyjnego na produkcję suma afrykańskiego w obiegu zamkniętym

kierownik zadania: dr inż. Przemysław Pol

Celem prac było wykazanie wpływu systemów filtracji wody na poziom stresu u ryb. Wykonano pierwszy cel badawczy pn. „Założenie hodowli suma afrykańskiego”. Polegał on na uruchomieniu dwóch obiegu produkcji suma afrykańskiego. Jeden obieg obejmował prosty system filtracji, drugi obieg posiadał zaawansowane systemy filtracji. Następnie wykonano drugi cel badawczy pn.: „Zakup aparatury i odczynników”, polegający na przetestowaniu oraz skonfigurowaniu urządzeń do monitorowania parametrów: TDS, pH, temperatury, ORP. Urządzenia zostały podłączone do routera pracującego w paśmie 2,4 GHz oraz podłączone do jednej cyfrowej platformy, z której można było zarządzać ich pracą i zmieniać ustawienia. Następnie wpuszczono ryby do obiegu. Pobrano próbki wody z obiegu RAS z brudną wodą, w które wykazały: pH = 6,5 NO₃ = 1650 mg/l NH₄ = 3,21 mg/l, PO₄ = 24,6326 mg/l. Równocześnie wykonano próby poboru kortyzolu od badanych zwierząt w celu ich skorelowania z poziomem kortyzolu w wodzie oraz parametrami fizyczno-chemicznymi wody.

W następnym kwartale ponownie pobrano ryby oraz próbki wody. Badanie ICP wykazało pH = 6,4 NO₃ = 2150 mg/l NH₄ = 4,28 mg/l, PO₄ = 31,7647. Wyniki pokazały znaczący spadek jakości parametrów wody w obiegu ze standardową filtracją.

Podczas pobierania tkanek od ryb z prostym i zaawansowanym systemem filtracji zauważono, że samice ryb z brudnej wody posiadały jaja koloru jasnoszarego co oznaczało ich resorpcję przez organizm matki. Pobrane tkanki i narządy węchu oraz rozrodcze przekazano do analiz do Wydziału Biologii Zakładu Anatomii Porównawczej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Ponadto, ryby z brudnej wody posiadały więcej ran spowodowanych podgryzaniem się ryb. Jednoznacznie stwierdzono, że słaba filtracja wody ma bardzo duży wpływ na poziom stresu u ryb, który przekłada się na tempo wzrostu, kondycję oraz gotowość do rozrodu.

Zadanie 01-14-06-11

Wpływ dodatku makuchu i oleju z nasion dyni na użytkowość królików

kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Pestki dyni są cennym źródłem białka (około 30 g/100 g) i tłuszczu (około 50 g/100 g), zawierają natomiast niewiele węglowodanów (około 10 g/100 g). Wartość energetyczna 100 g suszonych łuskanych pestek wynosi 566 kcal (23,7 MJ/kg). Występują w nich witaminy A, C, D, E i K oraz z grupy B: B1, B2 i B6.

Z żywieniowego punktu widzenia ważna jest wysoka zawartość w pestkach wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, błonnika pokarmowego, fitosteroli, fosforu, potasu, żelaza, seleniu i cynku, dzięki czemu przypisuje się im właściwości prozdrowotne. Związki bioaktywne zawarte w pestkach dyni stanowią naturalną alternatywę dla zwalczania organizmów patogennych i pasożytów (głównie fitosterol – kukurbitacyna), a także zwiększają odporność na różnego typu infekcje bakteryjne, mają również działanie przeciwnowotworowe. Przypisuje się im

wzrost potencjału rozrodczego i poprawę rozwoju jąder u zwierząt. Bakeer i wsp. (2021) stwierdzili u samców królików karmionych mieszanką z dodatkiem oleju z pestek dyni zmniejszenie odsetka anomalii nasienia. Z kolei Mohammadi i wsp. (2014) wykazali, że podanie imbiru i ekstraktu z pestek dyni jednocześnie zwiększa liczbę komórek rozrodczych w przewodach nasennych i ma pozytywny wpływ na odnowienie procesu spermatogenezy u dorosłych szczurów po leczeniu cyklofosfamidem.

Produktem ubocznym tłoczenia oleju z nasion dyni jest makuch, stanowiący znakomity dodatek do podstawowej diety zwierząt gospodarskich i ryb. Badania naukowe wykazały, że zawartość białka ogólnego w suchej masie makuchu z pestek dyni wynosi 59,94%, jest zatem wyższa niż w poekstrakcyjnej śrucie sojowej – 47,42% (Zduńczyk i wsp., 1998). W przypadku żywienia królików makuchem ważna może okazać się wysoka zawartość aminokwasów siarkowych, niezbędnych w ich diecie ze względu na sezonową zmianę okrywy włosowej.

Celem podjętych badań było określenie wpływu dodatku makuchu i oleju z pestek dyni do pełnodawkowych mieszanek paszowych na zdrowotność, wskaźniki odchowu królicząt i wydajność rzeźną oraz jakość mięsa tych zwierząt. Prowadzone badania mogą przyczynić się do istotnego zwiększenia efektywności wykorzystania makuchu i oleju z pestek dyni poprzez wdrożenie receptur i produkcję mieszanek paszowych dla królików zawierających ten komponent.

W pierwszym kwartale roku pokryto 30 samic królików rasy popielniańskiej białej, utrzymywanych w fermie należącej do Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach. Urodzone króliczka odchowywano przy matkach, w kojach na głębokiej ściółce do wieku 35 dni, a następnie przeniesiono do metalowych klatek przeznaczonych do odchowu towarowego zwierząt. Utworzono trzy grupy kontrolną (K) i dwie doświadczalne (D1 i D2) po 20 sztuk królicząt w każdej, które żywiono do wieku 90 dni pełnoporcjowymi mieszankami granulowanymi z 0,5 i 10% dodatkiem makuchu z pestek dyni. W skład podstawowej mieszanki paszowej wchodziła: poekstrakcyjna śruta sojowa, susz z lucerny, otręby pszenne, śruty: jęczmienna i kukurydziana, olej rzepakowy, fosforan paszowy, NaCl, premix mineralno-witaminowy i arbocel. W grupie D2 makuch z dyni zastąpił w całości poekstrakcyjną śrutę sojową.

W 90. dniu życia ubito po 10 sztuk królicząt z każdej grupy. Podczas uboju pobrano tkanki niezbędne do dalszych analiz, takie jak: mięso, krew, wątrobę, nerki, jelita i śledzionę. Przeprowadzono analizę rzeźną (masa tuszki ciepłej z głową/masa zwierzęcia przed ubojem x100) tuszki ciepłej i zimnej. Wykonano morfologię i badanie biochemiczne pobranej krwi króliczej. Określono takie parametry krwi, jak: ALT, ALP, albumina, lipaza, kreatynina, mocznik, poziom cholesterolu i trójglicerydów.

W próbkach pobranego mięsa wykonano analizę kwasowości i barwy po 45 minutach i 24 godzinach od uboju, a także analizę tekstury określając takie parametry, jak: siła cięcia, twardość, spójność, sprężystość i żuźność. Określono podstawowy skład chemiczny i zawartość wyższych kwasów tłuszczowych, cholesterolu i aminokwasów w próbkach mięsa pobranego z mięśnia combra (*m. longissimus lumborum*).

Od momentu odsadzenia królicząt od matek do dnia uboju, raz na dwa tygodnie, zbierano z podłoża świeży kał w celu określenia obecności oocyst *Eimerii* oraz zbadania składu gatunkowego tego pierwotniaka w poszczególnych grupach żywieniowych.

Tabela 1. Masa ciała królików (g) w poszczególnych tygodniach odchowu (średnia $\pm$ SEM)

Wyszczególnienie	Grupa			p-value
	K	D1	D2	
Masa ciała w 35. dniu	962,2 $\pm$ 11,8	973,3 $\pm$ 13,2	972,5 $\pm$ 11,8	0,779
Masa ciała w 56. dniu	1635,0 $\pm$ 39,9 ^a	1505,0 $\pm$ 35,7 ^b	1547,0 $\pm$ 43,3 ^{ab}	0,070

Masa ciała w 70. dniu	2059,3±48,1	2042,8±41,3	2020,3±54,1	0,847
Masa ciała w 77. dniu	2346,0±51,3	2330,0±41,4	2298,0±54,2	0,782
Masa ciała w 90. dniu	2769,0±66,5	2869,8±46,8	2926,3±55,7	0,150

K – grupa kontrolna żywiona granulowaną mieszanką podstawową o standardowej recepturze

D1 – grupa żywiona mieszanką z 5% udziałem makuchu z pestek dyni

D2 – grupa żywiona mieszanką z 10% udziałem makuchu z pestek dyni

SEM – błąd standardowy średniej

Przy wyrównanej masie ciała w dniu odsadzenia, statystyczne potwierdzone różnice stwierdzono jedynie w 56. dniu życia królicząt, pomiędzy grupą K a D1 i D2 (tabela 1.).

Tabela 2. Analiza rzeźna tuszki ciepłej (g) i wydajność rzeźna (%) (średnia ± SEM)

Wyszczególnienie	Grupa			p-value
	K	D1	D2	
Masa ciała królika	2821,5±88,0	2893,0±57,1	2881,0±83,6	0,784
Masa tuszki bez głowy	1412,6±52,9	1499,8±34,4	1477,2±57,3	0,441
Głowa	243,6±9,02	240,9±3,51	236,0±4,81	0,684
Wątroba	83,20±5,79	83,34±1,92	81,29±4,98	0,938
Serce	9,440±0,34	9,540±0,42	10,54±0,62	0,221
Nerki	18,05±0,86	17,74±0,75	17,18±0,89	0,761
Płuca	19,14±1,43 ^a	15,76±0,47 ^b	15,70±0,71 ^b	0,026
Tłuszcz okołonerkowy	16,01±2,63	11,03±4,18	10,67±3,08	0,464
Ogółem części jadalne	1802,1±66,5	1878,2±38,5	1848,6±63,0	0,644
Skóra z okrywą włosową	308,0±14,5	311,2±12,3	298,5±11,3	0,766
Krew	151,0±4,35	146,9±7,40	156,4±6,75	0,576
Skoki	80,50±2,19	81,16±1,47	81,92±2,32	0,885
Przewód pokarmowy	479,9±11,5	475,5±12,6	495,6±10,7	0,449
Ogółem odpady	1019,4±23,5	1014,8±20,9	1032,4±22,2	0,846
Wydajność rzeźna	50,00±0,48 ^b	51,82±0,37 ^a	51,15±0,60 ^{ab}	0,047

Oznaczenia jak w tabeli 1.

Najwyższą, potwierdzoną statystycznie w stosunku do grupy K wydajność rzeźną stwierdzono w grupie D1, otrzymującej mieszankę paszową z 5% dodatkiem makuchu z pestek dyni (tabela 2.).

Tabela 3. Kwasowość i barwa mięśni combra (*m. longissimus lumborum*) (średnia ± SEM)

Wyszczególnienie	Grupa			P-value	Normy
	K	D1	D2		
pH ₄₅	6,715±0,04 ^a	6,601±0,05 ^{ab}	6,504±0,03 ^b	0,006	6,10-6,80
pH ₂₄	5,733±0,27 ^a	5,588±0,03 ^b	5,563±0,02 ^b	0,000	5,60-5,85
L* ₄₅	60,82±0,63	62,71±0,98	62,97±0,92	0,172	
a* ₄₅	6,562±0,65	6,590±0,61	5,260±0,80	0,313	
b* ₄₅	3,871±0,62	4,474±0,43	3,875±0,61	0,684	
L* ₂₄	56,18±1,62 ^b	59,29±1,45 ^{ab}	60,27±0,69 ^a	0,090	
a* ₂₄	8,578±0,85 ^{ab}	9,068±0,46 ^a	7,090±0,29 ^b	0,062	
b* ₂₄	6,750±0,38	6,929±0,41	6,130±0,30	0,286	

Oznaczenia jak w tabeli 2.

W grupach doświadczalnych w mięśniu combra stwierdzono niższą od wymaganych norm kwasowość mięsa po 24 godzinach od uboju. Statystycznie potwierdzone różnice pomiędzy grupami stwierdzono dla składowej L^*_{24} i a^*_{24} (tabela 3.).

Tabela 4. Profil wybranych kwasów tłuszczowych (g/100 g wszystkich oznaczonych kwasów) i cholesterolu (mg/g) w mięśniach combra (*m. longissimus lumborum*) (średnia $\pm$ SEM)

Kwas	Grupa			p-value
	K	D1	D2	
C _{10:0}	0,115 $\pm$ 0,017	0,109 $\pm$ 0,014	0,114 $\pm$ 0,012	0,946
C _{12:0}	0,131 $\pm$ 0,014	0,144 $\pm$ 0,012	0,156 $\pm$ 0,014	0,438
C _{16:0}	25,25 $\pm$ 0,516 ^a	27,88 $\pm$ 0,734 ^b	27,36 $\pm$ 0,325 ^b	0,031
C _{16:1n-9}	0,474 $\pm$ 0,021 ^a	0,420 $\pm$ 0,015 ^b	0,344 $\pm$ 0,012 ^c	< 0,001
C _{17:0}	0,585 $\pm$ 0,023 ^a	0,499 $\pm$ 0,016 ^b	0,538 $\pm$ 0,019 ^{ab}	0,016
C _{18:0}	5,757 $\pm$ 0,194 ^a	5,065 $\pm$ 0,141 ^b	5,851 $\pm$ 0,172 ^a	0,006
C _{18:1n-9}	31,05 $\pm$ 0,551 ^a	26,47 $\pm$ 0,621 ^b	23,02 $\pm$ 0,471 ^c	< 0,001
C _{18:2n-6}	22,02 $\pm$ 0,426 ^a	23,54 $\pm$ 0,519 ^a	29,67 $\pm$ 0,804 ^b	< 0,001
C _{18:3n-3}	2,164 $\pm$ 0,116 ^a	1,414 $\pm$ 0,078 ^b	1,147 $\pm$ 0,045 ^c	< 0,001
CLA	0,032 $\pm$ 0,003 ^a	0,018 $\pm$ 0,002 ^b	0,032 $\pm$ 0,002 ^a	< 0,001
C _{20:0}	0,109 $\pm$ 0,005	0,101 $\pm$ 0,004	0,102 $\pm$ 0,006	0,537
C _{20:5n-3} (EPA)	0,099 $\pm$ 0,020 ^a	0,084 $\pm$ 0,008 ^a	0,040 $\pm$ 0,005 ^b	0,009
C _{22:6n-3} (DHA)	0,052 $\pm$ 0,008	0,070 $\pm$ 0,008	0,053 $\pm$ 0,009	0,241
C _{22:4n-6}	0,745 $\pm$ 0,113 ^a	1,102 $\pm$ 0,113 ^b	0,794 $\pm$ 0,108 ^{ab}	0,065
C _{22:5n-6}	0,333 $\pm$ 0,053 ^a	0,481 $\pm$ 0,048 ^b	0,318 $\pm$ 0,047 ^a	0,054
C _{22:5n-3}	0,445 $\pm$ 0,077 ^a	0,449 $\pm$ 0,049 ^a	0,216 $\pm$ 0,029 ^b	0,008
SFA	34,62 $\pm$ 0,726 ^a	36,58 $\pm$ 0,845 ^b	36,95 $\pm$ 0,350 ^b	0,046
UFA	65,01 $\pm$ 0,702 ^a	62,91 $\pm$ 0,857 ^b	62,69 $\pm$ 0,323 ^b	0,038
MUFA	36,01 $\pm$ 0,677 ^a	31,68 $\pm$ 0,743 ^b	27,46 $\pm$ 0,757 ^c	< 0,001
PUFA	29,00 $\pm$ 0,867 ^a	31,23 $\pm$ 0,536 ^a	35,23 $\pm$ 0,955 ^b	< 0,001
PUFA n-6	26,20 $\pm$ 0,831 ^a	29,19 $\pm$ 0,514 ^b	33,76 $\pm$ 0,915 ^c	< 0,001
PUFA n-3	2,802 $\pm$ 0,069 ^a	2,044 $\pm$ 0,043 ^b	1,472 $\pm$ 0,046 ^c	< 0,001
PUFA n-6/n-3	9,368 $\pm$ 0,263 ^a	14,32 $\pm$ 0,282 ^b	22,99 $\pm$ 0,423 ^c	< 0,001
Cholesterol	0,601 $\pm$ 0,03 ^a	0,575 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,570 $\pm$ 0,03 ^b	0,083

Oznaczenia jak w tabeli 2.

Z żywieniowego punktu widzenia najbardziej korzystny stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych PUFA n-6/n-3 stwierdzono w grupie K (tabela 4.). Najniższy poziom cholesterolu w mięśniu combra oznaczono w grupie D2 (0,570 mg/g). W stosunku do grupy K (0,601 mg/g) różnica okazała się statystycznie istotna.

Tabela 5. Parametry biochemiczne krwi króliczej (średnia $\pm$ SEM)

Wyszczególnienie	Grupa			P-value
	K	D1	D2	
ALT (U/l)	35,835 $\pm$ 16,75	47,779 $\pm$ 15,73	44,546 $\pm$ 17,81	0,275
ALP (U/l)	173,050 $\pm$ 65,10	215,075 $\pm$ 67,90	216,300 $\pm$ 61,54	0,258
Albumina (g/dl)	3,721 $\pm$ 0,50	3,470 $\pm$ 0,46	3,778 $\pm$ 0,64	0,410
Lipaza (U/l)	251,470 $\pm$ 48,30 ^b	234,709 $\pm$ 67,28 ^b	330,656 $\pm$ 96,33 ^a	0,016
Kreatynina (mg/dl)	0,846 $\pm$ 0,18 ^b	0,944 $\pm$ 0,17 ^{ab}	1,059 $\pm$ 0,15 ^a	0,031
Mocznik (mg/dl)	29,305 $\pm$ 5,13 ^a	22,199 $\pm$ 4,49 ^b	24,670 $\pm$ 6,01 ^{ab}	0,017

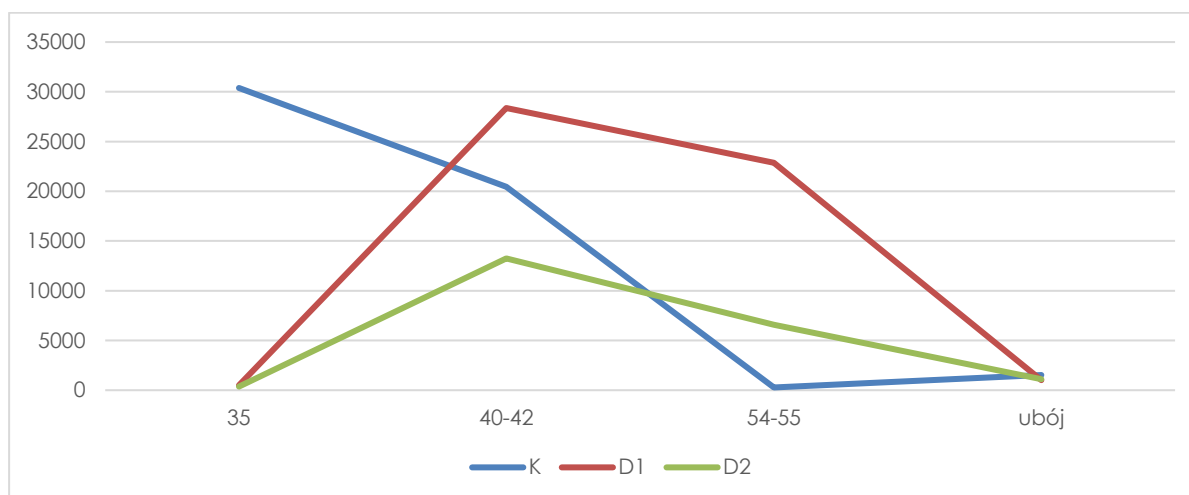
Cholesterol (mg/dl)	208,30±5,52 ^a	194,30±2,26 ^b	181,40±2,16 ^c	< ,001
Trójglicerydy (mg/dl)	189,30±3,69 ^a	177,40±3,24 ^b	161,10±2,72 ^b	< ,001
HDL (mg/dl)	59,20±2,29	61,00±1,39	62,00±1,63	0,549
LDL (mg/dl)	111,24±3,73 ^a	97,82±2,09 ^b	87,18±2,32 ^c	<0,001

Oznaczenia jak w tabeli 1.

We wszystkich trzech grupach stwierdzono przekroczenie wartości parametru ALP w stosunku do podawanych wartości referencyjnych, co jednak jak podaje literatura tematu jest dopuszczalne u młodych królicząt. Za korzystny należy uznać statystycznie potwierdzony spadek w grupach doświadczalnych poziomu cholesterolu i LDL.

Poziom oocyst *Eimerii* różnił się pomiędzy grupami w poszczególnych okresach pobierania kału do badań (wykres 1.). Nie stwierdzono obecności *E. stiedai*, powodującej kokcydiozę wątrobową, a poziom najbardziej inwazyjnych gatunków bytujących w jelitach (*E. intestinalis*, *E. flavescens*) był niski i dotyczył jedynie próbek kału z grup K i D1 pobieranych bezpośrednio po odsadzeniu.

Wykres 1. Poziom oocyst *Eimerii* w próbkach kału pobieranych w okresie od odsadzenia do uboju



Zakład Hodowli Koni
kierownik: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

Zadanie 01-15-03-11

Ocena dyskomfortu u koni pracujących oraz dotkniętych egzemą letnią i analiza genetyczna występowania tej choroby

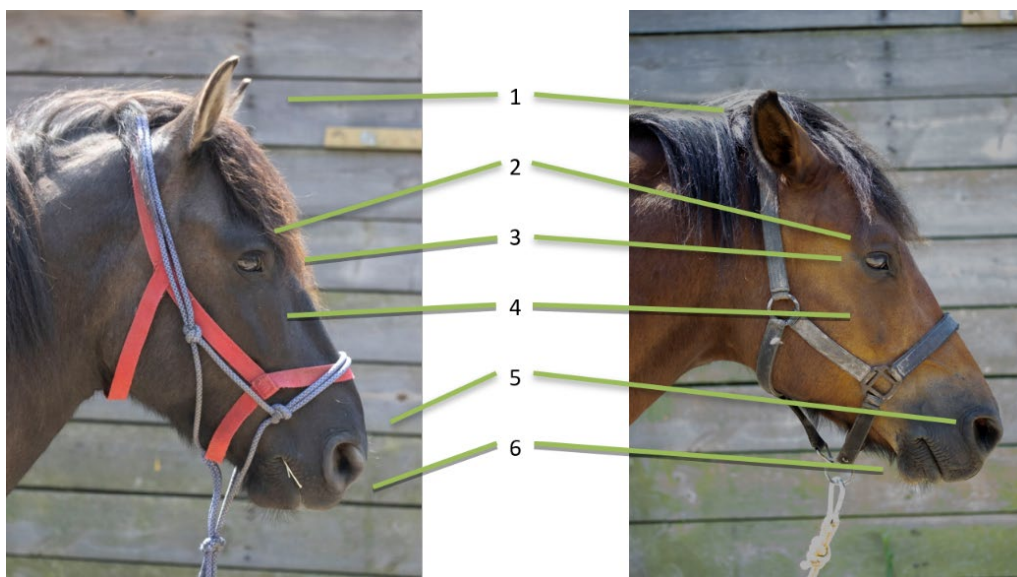
kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

Ocena dobrostanu koni poprzez rozpoznanie sygnałów dyskomfortu i/lub bólu u koni pracujących

Habitualizacja koni do obecności aparatu (wykonanie zdjęć koni na pastwisku powtarzano do momentu, w którym przestały wykazywać zainteresowanie obecnością aparatu). Procedura zakładała wykonanie zdjęcia co 5 sekund. Następnie koń był prowadzony do schodków, z których jeźdźcy wsiadają na konie. Zrealizowano trzy fotografie w odstępie 5 sekund, gdy koń znajdował się przy schodkach. W trakcie eksperymentu koniom założono holter do pomiaru tętna – polar equine z nadajnikiem H10.

W eksperymencie wzięło udział 15 koni pracujących w dwóch ośrodkach jeździeckich. Konie różnych ras w wieku od 6 do 15 lat, w tym 8 wałachów i 7 klaczy. Wszystkie konie uczestniczące w doświadczeniu były zdrowe i nie posiadały żadnych kontuzji. W obu stajniach konie miały dostęp do padoków, żywienie było oparte na paszy objętościowej, a dostęp do wody był nieograniczony. Wykonano po 3 zdjęcia każdego konia w różnych sytuacjach: na pastwisku/padoku, podczas prowadzenia i podczas stania przy schodkach do wsiadania. Dokonano analizy opartej na punktacji wyrazu pyska koni Horse Grimace Scale (HGS). Oceniono takie wskaźniki jak: obniżone uszy (1), skurcz mięśni nad okiem m.levator anguli oculi medialis (2), powieki zakrywające połowę oka (3), napięte mięśnie twarzowe (4), napięte i rozszerzone nozdrza (5), napięty pysk (6) (fotografia 1.). Przyznano punkty: 0 – niewidoczne, 1 – lekko widoczne, 2 – wyraźnie widoczne.

Konie przy schodkach do wsiadania – po lewej nie pracuje w szkółce jeździeckiej (3 pkt. w skali HGS);
 po prawej pracuje od lat w rekreacji (9 pkt. w skali HGS)
 (Fot. 1. I. Tomczyk-Wrona)



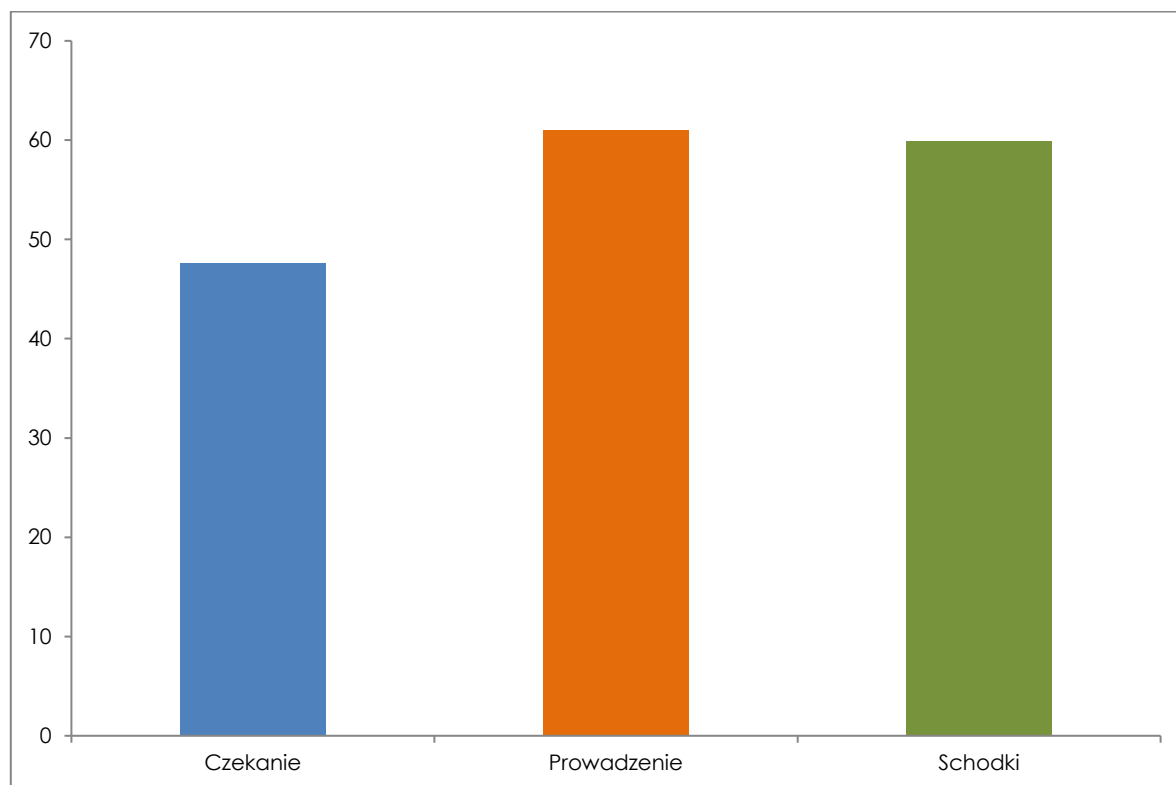
Do obliczeń statystycznych wykorzystano oprogramowanie Statistica 13. Z trzech zdjęć obliczono średnią dla każdej z sytuacji i dla każdego indywidualnego osobnika. Sprawdzono normalność rozkładu testem Shapiro-Wilka. Dla porównania grup zastosowano test *t* studenta, oraz w przypadku rozkładu odbiegającego od normalnego test kolejności par Wilcozona.

Tabela 1. Wyniki oceny mimiki koni z dwóch ośrodków jeździeckich

	średnia	mediana	minimum	maksimum	percentyl	percentyl	odch. std
Pastwisko	3,32	3,26	1,25	5,44	2,30	3,99	1,22
Prowadzenie	4,51	4,66	1,31	6,66	4,34	4,99	1,08
Przy schodkach	5,67	5,81	3,01	7,50	4,67	6,00	1,15

Wykazano istotne różnice pomiędzy oceną mimiki na pastwisku a podczas prowadzenia na uwięzi ($Z=3.33$, $P=0.001$), oraz pomiędzy oceną na pastwisku i podczas stania przy schodkach ($t=-4.98$, $P<0,001$). Wykazano również różnice pomiędzy mimiką w skali HGS u koni podczas prowadzenia na uwięzi i przy schodkach ($Z=2.32$, $P=0.02$).

Wykres 1. Częstotliwość skurczów serca podczas trzech różnych sytuacji



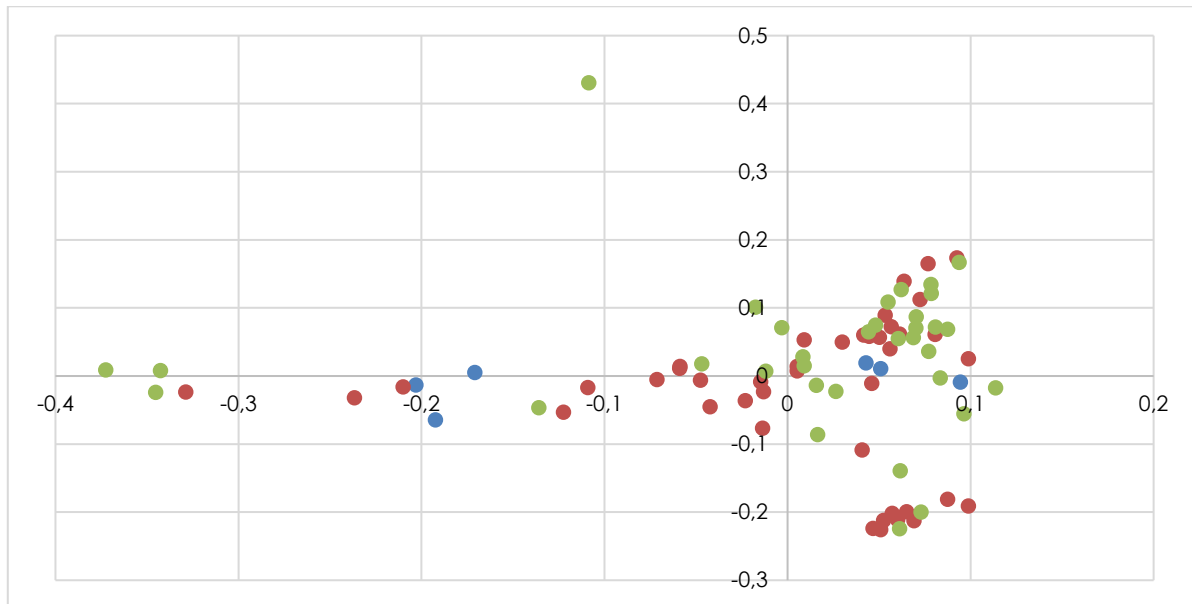
Wyraz pyska koni zmieniał się istotnie z zrelaksowanego/rozluźnionego na zestresowany, gdy konie były doprowadzane do schodków do wsiadania. Wyniki te sugerują, że konie mogą mieć negatywne skojarzenia ze schodkami do wsiadania, spowodowane nieprzyjemnym momentem wsiadania i/lub jazdy. Częstotliwość skurczów serca zmieniła się nieznacznie, w tym podczas prowadzenia ruch wpłynął na pobudzenie pracy serca, które mogło się utrzymać przy schodkach do wsiadania. Wyniki sugerują, że przy schodkach do wsiadania zmienia się nastawienie emocjonalne koni, jednak pomiary tętna wskazują, że nie są one w nadmiernym strachu.

Zbadanie podłoża genetycznego egzemy letniej u koni huculskich

Zebrano materiał DNA do badań nad lipcówką u hucutów. Część materiału pochodziła z bazy Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB. Przebadano 81 koni, które podzielono na trzy grupy: obarczone chorobą (34 konie), zdrowe (41) i prawdopodobnie obarczone (6).

Wykres 2. Populacja koni huculskich.

Zielony – konie obarczone lipcówką; czerwony – konie zdrowe; niebieski – prawdopodobnie obarczone lipcówką



Egzema letnia (lipcówka) to choroba poligenetyczna, a wyodrębnienie genów, które są odpowiedzialne za jej występowanie wymaga dalszych, dogłębnych analiz. U koni obarczonych egzemą skórną wyodrębniono między innymi ADAMTS2 – odpowiedzialny za stany zapalne skóry, KCnT2 – związany z działaniem pompy sodowo-potasowej, mogący powodować nadwrażliwość na ból. KCnT2 oraz LhX9 – u ludzi są powiązane z nowotworami. Mutacja w genie SH3PXD2B może wywoływać rzadki zespół autosomalny recesywny i odgrywa rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej i migracji komórek. Dodatkowo, analiza rodowodów koni wykazała, że wśród przodków koni obarczonych lipcówką powtarza się ogier Cukor-Gurgul-5 w linii zarówno po matce, jak i po ojcu.

Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
kierownik: prof. dr hab. Beata Szymczyk

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 badań było uzyskanie wiedzy na temat bezpieczeństwa i wartości pokarmowej nasion soi n-GMO uprawianych w kraju i produktów ich przetworzenia oraz białkowych produktów pochodzenia owadziego, jako niekonwencjonalnych komponentów mieszanek paszowych dla zwierząt gospodarskich.

Ponadto, celem było opracowanie i określenie wpływu innowacyjnego produktu białkowego, opartego na paszy sojowej n-GMO pochodzenia krajowego, wzbogaconej w wybrane naturalne substancje immunostymulujące takie jak mączka owadzia czy też antyoksydant (astaksantyna), na rozwój przewodu pokarmowego, status zdrowotny oraz kształtowanie odporności czynnej zwierząt gospodarskich, jak również na emisję substancji szkodliwych.

Badania zaplanowane w zadaniu realizowano w ramach czterech podzadań (tzw. celów badawczych):

- Cel nr 1: Ocena jakości, składu chemicznego i wartości pokarmowej niekonwencjonalnych źródeł białka paszowego n-GMO pochodzenia krajowego, oraz ocena bezpieczeństwa ich stosowania i wpływu na status metaboliczny i zdrowotny zwierząt modelowych.
- Cel nr 2: Ocena wpływu niekonwencjonalnych źródeł białka paszowego n-GMO na rozkład i przebieg fermentacji w żwaczu, strawność jelitową i wskaźniki fizjologiczne we krwi krów przetokowanych.
- Cel nr 3: Ocena zastąpienia poekstrakcyjnej śruty sojowej materiałem białkowym z nasion krajowej soi n-GMO, oraz ocena wpływu innowacyjnego produktu białkowego (z nasion soi, wzbogaconego w prozdrowotne substancje biologicznie czynne), na wyniki odchowu i status zdrowotny warchlaków.
- Cel nr 4: Ocena zastąpienia poekstrakcyjnej śruty sojowej materiałem białkowym z nasion krajowej soi n-GMO, oraz ocena wpływu innowacyjnego produktu białkowego (z nasion soi, wzbogaconego w prozdrowotne substancje biologicznie czynne), na wyniki odchowu i status zdrowotny cieląt.

Uogólniając, przebieg realizacji całego zadania można przedstawić następująco: badania rozpoczęto od dokładnej analizy chemicznej wybranych materiałów paszowych (surowe nasiona soi trzech odmian, ekstrudowane nasiona soi trzech odmian (ekstrudat), makuch z nasion soi trzech odmian, mączka z larw muchy *Hermetia illucens* (HI) pełnotłusta, mączka z larw HI odtłuszczona oraz oceny bezpieczeństwa ich stosowania na zwierzętach modelowych (szczury) – cel nr 1. Następnie, oceniono przydatność tych materiałów paszowych w żywieniu przeżuwaczy na podstawie doświadczeń na krowach przetokowanych do żwacza i do jelita cienkiego – cel nr 2. W kolejnym kroku wybrano dwa materiały paszowe najbardziej przydatne do żywienia zwierząt gospodarskich, tj. makuch z nasion soi odmiany *Viola* oraz mączkę z larw HI pełnotłustą. Badania przydatności tych materiałów, jako zamienników poekstrakcyjnej śruty

sojowej, przeprowadzono na odsadzonych prosiętach i cielętach, tj. najbardziej wymagających i wrażliwych grupach technologicznych świń i bydła – cel nr 3 i 4. Badania te prowadzono dwutorowo: a) w pierwszym doświadczeniu ocena przydatności makuchu sojowego, b) w drugim doświadczeniu ocena przydatności innowacyjnego produktu białkowego (z makuchu sojowego wzbogaconego dodatkiem pełnotłustej mączki z larw *HI* i przeciwutleniacza astaksantyny). Dodatkowo, w celu nr 4 (jako badania uzupełniające), przeprowadzono ocenę wpływu formy podania (pasza treściwa lub preparat mlekozastępczy) oraz dawki astaksantyny (0,11 lub 0,25 mg/kg mc/dz.), na wskaźniki wzrostowe cieląt oraz status zdrowotny.

Wyniki badań zrealizowanych w ramach zadania wykazały, że:

- procesy technologiczne zastosowane 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 ekstrudatem (spadek o 30-45%). Różnice między odmianami soi były niewielkie,
- makuch, w porównaniu z ekstrudatem, cechował się większą zawartością białka i lizyny i mniejszą zawartością tłuszczu, co lepiej kwalifikuje go jako paszę białkową dla zwierząt gospodarskich. Ponadto, w makuchu stwierdzono niższy poziom substancji antyżywniowych i mniej kolonii grzybów pleśniowych, w porównaniu z ekstrudatem.
- ocena wartości pokarmowej białka przeprowadzona na zwierzętach modelowych (szczury) wykazała, że makuch z nasion krajowej soi odmiany *Viola* charakteryzuje wysoka i porównywalna z kazeiną wartość biologiczna białka. Wskaźniki uzyskane dla pełnotłustej i niskotłuszczowej mączki z larw *HI* wskazują na istotnie niższą, niż w produktach sojowych i kazeinie, wartość pokarmową białka, która może jednak wzrosnąć po uzupełnieniu w mieszance niedoboru aminokwasów siarkowych, ograniczających wykorzystanie białka w organizmie,
- zastąpienie w diecie zwierząt modelowych (szczurów) poekstrakcyjnej śruty sojowej innowacyjnym produktem białkowym (makuch sojowy z dodatkiem pełnotłustej mączki z larw *Hermetia illucens* stosowanej łącznie lub bez astaksantyny) nie wywarło negatywnego wpływu na wskaźniki wzrostowe i status zdrowotny tych zwierząt, obserwowano wyraźną poprawę czynności trzustki w stosunku do grupy kontrolnej. Wskaźniki wątrobowe również uległy poprawie, jednak wpływ żywienia zależny był od płci zwierząt – w przypadku samców najkorzystniej na czynność wątroby wpłynął dodatek do makuchu 1% mączki *HI*, a u samic najlepszy efekt uzyskano stosując 1% mączki *HI* z astaksantyną. Wpływ żywienia na profil lipidów i wskaźniki nerkowe był niejednoznaczny, dlatego istnieje konieczność kontynuowania badań, w celu wyjaśnienia wszystkich niejasności,
- produkty sojowe oraz niskotłuszczowa mączka *HI* miały wyższy rozkład żwaczowy białka niż poekstrakcyjna śruta sojowa dla początkowych terminów inkubacji, aż do 16 godzin włącznie. Surowe pełnotłuste nasiona soi oraz materiały paszowe z tych nasion (makuch, ekstrudat), stosowane jako całkowite zamienniki białka poekstrakcyjnej śruty nie modyfikowały istotnie fermentacji żwaczowej,
- pomimo obiecujących wyników dotyczących rozkładalności w żwaczu białka mączki z larw *HI*, najprawdopodobniej intensywny zapach sprawił, że pasza z jej udziałem nie była pobierana przez krowy, co uniemożliwiło wykorzystanie jej jako zamiennika poekstrakcyjnej śruty sojowej w mieszance treściwej dla krów i przebadanie wpływu takiej mieszanki na przebieg fermentacji w żwaczu i wskaźniki krwi,

- w przypadku żywienia warchlaków istnieje możliwość całkowitego zastąpienia poekstrakcyjnej śrutu sojowej, makuchem z nasion krajowej soi, gdyż nie odnotowano statystycznie istotnego wpływu na strawność składników pokarmowych i fosforu,
- wskaźniki produkcyjne oraz zdrowotne tych zwierząt. Stwierdzono, że obecność makuchu sojowego w paszy może istotnie wpływać na jakość tłuszczu mięsa świń (więcej kwasów PUFA), przy czym nie obserwowano negatywnego wpływu wyższego stopnia nienasylenia tłuszczu na trwałość mięsa i stoniny w czasie przechowywania,
- w przypadku żywienia warchlaków każdy z testowanych innowacyjnych produktów białkowych może w 100% zastąpić poekstrakcyjną śrutę sojową, gdyż nie wpływa istotnie na wyniki produkcyjne, a wskaźniki zdrowotne, mimo że zróżnicowane pozostają w obrębie normy, ponadto nie obserwowano zmian w składzie podstawowym mięsa. Obecność mączki *HI* w innowacyjnym produkcie białkowym ma istotny wpływ na profil kwasów tłuszczowych mięsa i stoniny. Produkty te w grupach otrzymujących innowacyjny produkt białkowy cechowały się większą ilością kwasów SFA i mniejszą ilością MUFA, przy czym w przypadku mięsa nie miało to wpływu na trwałość oksydacyjną, natomiast w przypadku stoniny stwierdzono korzystniejszy niższy poziom wskaźnika TBARS,
- zastąpienie poekstrakcyjnej śrutu sojowej makuchem sojowym lub innowacyjnym produktem białkowym w paszy dla świń może obniżyć ilość amoniaku wydalanego z odchodami do środowiska. Testowane zamienniki poekstrakcyjnej śrutu sojowej w niektórych odcinkach jelita grubego obniżają poziom fenolu, ale mogą podnosić poziom krezolu. Sam makuch sojowy nie wpływa na sumę lotnych kwasów tłuszczowych powstających w wyniku fermentacji w jelicie grubym, natomiast innowacyjny produkt białkowy (makuch z dodatkiem mączki *HI* z dodatkiem lub bez astaksantyny) może obniżać sumaryczną ilość LKT,
- pełnotłusta mączka z larw muchy *Hermetia illucens* dodana do makuchu sojowego w ilości 2,5 lub 5% nie ma istotnego wpływu na ilość badanych bakterii wyhodowanych na podłożach (*Escherichia coli*, *Enterococcus*, pałeczki kwasu mlekowego),
- makuch sojowy może być stosowany jako główne źródło białka w mieszankach treściwych dla cieląt, jako całkowity zamiennik poekstrakcyjnej śrutu sojowej, gdyż nie obserwowano wpływu makuchu sojowego na wyniki produkcyjne, rozwój anatomiczny oraz status metaboliczny przewodu pokarmowego tych zwierząt. Niższy poziom IgG wskazuje na potrzebę uzupełnienia makuchu sojowego o dodatki o charakterze immunostymulującym, co może poprawić odporność wtórną cieląt w pierwszych tygodniach życia,
- zastosowane warianty innowacyjnego produktu białkowego, jako zamienniki poekstrakcyjnej śrutu sojowej w mieszankach treściwych dla cieląt, nie pogorszyły pobrania paszy ani przyrostów masy ciała cieląt, nie stwierdzono ich wpływu na rozwój anatomiczny oraz status metaboliczny przewodu pokarmowego tych zwierząt. Jednakże, wprowadzenie mączki z larw *HI* w ilości 3% do mieszanki treściwej dla cieląt oddziaływało na przebieg fermentacji żwaczowej obniżając poziom kwasu masłowego. Obecność astaksantyny w innowacyjnym produkcie białkowym poprawiała odporność wtórną cieląt w pierwszych tygodniach życia, jednak na koniec doświadczenia (90. dzień życia) cielęta z grupy kontrolnej wykazywały tendencję do wyższego poziomu IgG,
- astaksantyna podawana cielętom w okresie odpajania wykazuje pozytywne działanie na przyrosty masy ciała, parametry biochemiczne i immunologiczne krwi. Astaksantyna rozpuszczona w preparacie mlekozastępczym jest lepiej przyswajalna dla cieląt. Opty-

malna dawka astaksantyny dla cieląt jest o połowę mniejsza niż zalecana dla dorosłych przeżuwaczy. Pobranie astaksantyny z preparatem mlekozastępczym w ilości około 5 mg dziennie stymuluje apetyt cieląt. Dodatek astaksantyny wykazuje również działanie immunostymulujące.

Podsumowując przeprowadzone badania można stwierdzić, że makuch z krajowych nasion soi, otrzymany w procesie technologicznym dostępnym dla średnich i małych gospodarstw, jest paszą bezpieczną, cechującą się wysoką wartością pokarmową i przydatną w żywieniu różnych gatunków zwierząt gospodarskich, w większym zakresie niż ekstrudowane pełnotłuste nasiona soi (ekstrudat). Trzeba podkreślić ograniczenie wydalania amoniaku do środowiska przez zwierzęta otrzymujące makuch sojowy zamiast poekstrakcyjnej śruty sojowej. Makuch z krajowych nasion soi ma potencjał być białkowym materiałem paszowym, który może zwiększyć dywersyfikację krajowego rynku pasz białkowych i poprawić krajowe bezpieczeństwo żywnościowe. W zależności od aktualnych/lokalnych cen, makuch z krajowych nasion soi przygotowany we własnym gospodarstwie, jako zamiennik importowanej poekstrakcyjnej śruty sojowej, może zmniejszyć koszt produkcji wieprzowiny, nie wpływając negatywnie na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne świń. Ponadto, rezultaty badań wykazały, że innowacyjny produkt białkowy, przygotowany na bazie makuchu sojowego wzbogaconego komponentami o właściwościach prozdrowotnych (pełnotłusta mączka z larw muchy *Hermetia illucens* i astaksantyna) może być ciekawym materiałem paszowym i zamiennikiem poekstrakcyjnej śruty sojowej, tj. paszą białkową o właściwościach funkcjonalnych, poprzez oddziaływanie na niektóre wskaźniki krwi, struktury nabłonka jelitowego, układ immunologiczny czy modyfikowanie profilu kwasów tłuszczowych, a tym samym trwałości oksydacyjnej mięsa. Zagadnienie opracowania optymalnego składu naszego innowacyjnego produktu białkowego wymaga jednak jeszcze dalszych badań.

Zadanie 01-16-08-11

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

kierownik zadania: dr hab. Witold Szczurek, prof. IZ PIB

- Cel nr 1: Określenie wpływu dodatków preparatów ziołowych (oraz ich interakcji z kokcydiostatykami jonoforowymi lub L-karnityną) w kontekście oddziaływania na produktywność kurcząt brojlerów i kur niosek, status zdrowotny tych ptaków, jakość produktów (mięso, jaja) oraz ich bezpieczeństwo dla konsumenta.
- Cel nr 2: Określenie wpływu uwarunkowań fizjologicznych związanych z rozwojem przewodu pokarmowego i układu enzymatycznego u kurcząt brojlerów w wieku 10, 20 i 30 dni na strawność jelitową aminokwasów zawartych w nasionach bobiku, z uwzględnieniem ich klasyfikacji ze względu na obecność tanin (odmiana niskotaninowa oraz odmiana wysokotaninowa).

Badania zakładają, że: (1) wystąpi korzystny efekt łącznego stosowania kokcydiostatyków (brojlery) lub L-karnityny (nioski) i substancji fitobiotycznych na funkcjonowanie wątroby, parametry wydzielnicze przewodu pokarmowego, wskaźniki produkcyjne, jakość i wartość dietetyczną jaj, oraz że (2) szczegółowe poznanie strawności jelitowej aminokwasów zawartych w nasionach bobiku krajowych odmian przyczyni się do poprawy wiedzy na temat możliwości optymalnego ich wykorzystania w mieszankach paszowych stosowanych w systemie wielofazowego żywienia kurcząt brojlerów.

Cel szczegółowy 1.

W ostatnim kwartale bieżącego roku przeprowadzono doświadczenie 2. (test wzrostowy na łącznie 490 kogutkach brojlerach Ross 308 przydzielonych do 7 grup żywieniowych), poświęcone ocenie efektywności dodatków ziołowych w warunkach żywienia kurcząt mieszankami paszowymi zawierającymi monenzynę. Mieszanki paszowe dla ptaków z grupy 1. nie zawierały kokcydiostatyku (kontrola negatywna), a w pozostałych sześciu grupach doświadczalnych (w tym grupa 2 – kontrola pozytywna) zawierały monenzynę w rekomendowanej dawce (preparat Coxidin® 200 Mikrogranulat; Huvepharma). Zgodnie z przyjętym schematem (tabela 1.) do podstawowych mieszanek paszowych z kokcydiostatykiem dodano preparat z czosnku, oregano, ostropestu, karczocha lub ostryżu długiego.

Tabela 1. Schemat doświadczenia 2. na kurczętach brojlerach

Grupa żywieniowa	Monenzyna (kokcydiostatyk)	Preparat ziołowy
1	–	–
2	+	–
3	+	Czosnek (<i>Allium sativum</i>)
4	+	Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)
5	+	Ostropest (<i>Sylibum marianum</i>)
6	+	Karczoch (<i>Cynara scolymus</i>)
7	+	Ostryż długi (<i>Curcuma longa</i>)

W doświadczeniu rejestrowano masę ciała kurcząt oraz spożycie paszy w kolejnych okresach odchowu (1.-21.; 22.-35. dzień życia). Aktualnie dane te są zestawiane i przygotowywane do obliczeń podstawowych wskaźników produkcyjnych. W celu pozyskania materiału biologicznego do zaplanowanych analiz, w 21. i 35. dniu życia z każdej grupy ubito po 7 kurcząt. W osoczu pobranej krwi obwodowej określone zostaną parametry biochemiczne (m.in. białko, trójglicerydy, cholesterol i jego frakcje, glukoza, enzymy wątrobowe), hormony układu pokarmowego (grelina, leptyny, Neuropeptyd Y), enzymy antyoksydacyjne (m.in. dialdehyd malonowy, dysmutaza nadtlenkowa, peroksydaza, katalaza). W trakcie ubojów pobrano fragmenty wątroby oraz jelita cienkiego do oceny struktury histologicznej. Po zakończeniu odchowu przeprowadzono także dysekcję i analizę rzeźną wybranej stawki ptaków (po 7 sztuk z każdej grupy) w celu określenia podstawowych wskaźników poubojowych (wydajność rzeźna, udział mięśni piersiowych i tłuszczu sadełkowego) oraz udziału żołądka, wątroby i narządów limfoidalnych (śledziony i torby Fabrycjusza). Zabezpieczone próbki wątroby zostaną przekazane do analiz stężenia kokcydiostatyku. Zgromadzone dane są w trakcie zestawiania i obróbki statystycznej, a zabezpieczone próbki materiału biologicznego są sukcesywnie poddawane analizom.

Kontynuowano analizy materiału biologicznego zgromadzonego w trakcie doświadczenia 3. na 240 kurach nieśnych Iohmann brown. Celem doświadczenia było określenie wpływu wybranych dodatków paszowych o działaniu hepatoprotekcyjnym (lub ich mieszaniny) na produkcyjność, status zdrowotny towarowych kur nieśnych, jakość skorupy i jaj, a także wartość dietetyczną jaj. Kurom podawano izobiałkowe i izoenergetyczne mieszanki paszowe. W grupach eksperymentalnych, do podstawowej mieszanki paszowej wprowadzano dodatek ekstraktów ziołowych (2 g/kg mieszanki paszowej) i L-karnityny (300 mg/kg mieszanki paszowej) według schematu przedstawionego w tabeli 2.

Tabela 2. Schemat doświadczenia 3. na kurczętach nieśnych

Grupa żywieniowa	Czynnik doświadczalny
1	kontrolna
2	L-karnityna
3	Ostropest plamisty
4	Karczoch
5	Ostryż długi
6	Ostropest plamisty + karczoch
7	Ostropest plamisty + L-karnityna
8	Karczoch + L-karnityna
9	Ostryż długi + L-karnityna
10	Ostropest plamisty + karczoch + L-karnityna

Wyniki zakończonych analiz parametrów biochemicznych surowicy krwi ptaków objętych tym doświadczeniem zestawiono w tabeli 3. Zastosowanie ostryżu długiego wpłynęło na istotne obniżenie aktywności enzymatycznej wątroby, co znalazło swoje odzwierciedlenie w niższej aktywności ASAT i LDH w surowicy krwi. Korzystny efekt, w porównaniu z grupą kontrolną, odnotowano także w odniesieniu do poziomu ASAT w przypadku zastosowania kombinacji dodatków ziołowych i L-karnityny (grupy 7-10), a w odniesieniu do poziomu aktywności LDH w przypadku równoczesnego zastosowania ostropestu z karczochem lub L-karnityną. Zastosowanie wszystkich dodatków używanych pojedynczo, lub łączne zastosowanie ostropestu z karczochem, istotnie obniżyło zawartość trójglicerydów w osoczu. Ostropest, karczoch lub ostryż zastosowane jako pojedyncze dodatki wpłynęły na istotne obniżenie poziomu cholesterolu oraz jego frakcji LDL. Połączenie L-karnityny z dodatkami ziołowymi najczęściej nie przynosiło korzystnych zmian w profilu biochemicznym osocza krwi kur nieśnych.

Tabela 3. Wyniki parametrów biochemicznych kur nieśnych

GRUPA	ALAT [U/L]	ALP [U/L]	ASAT [U/L]	GLUC [mmol/L]	LDH [U/L]	CHOL [mmol/L]	HDL D [mmol/L]	LDL D [mmol/L]	TG [mmol/L]	TP [g/dL]
1	8.88	840	313 a	11.2 bcd	4109 ab	2.25 abc	0.63	0.58 a	10.3 a	3.66
2	7.31	610	282 abc	10.0 e	4107 ab	1.75 abc	0.56	0.45 abc	8.4 b	3.36
3	8.39	947	302 ab	10.5 de	3664 abcd	1.50 c	0.54	0.37 c	7.9 b	3.35
4	7.26	508	266 bcde	10.4 de	3237 bcd	1.50 c	0.56	0.38 c	7.3 b	3.40
5	5.40	777	285 abc	10.3 de	2990 cd	1.64 bc	0.59	0.38 c	7.4 b	3.32
6	6.28	755	276 abcd	10.8 cde	2843 d	1.75 abc	0.58	0.48 abc	8.3 b	3.56
7	5.45	855	249 cdef	11.7 abc	3848 abc	1.83 abc	0.58	0.41 bc	9.4 ab	3.29
8	6.78	835	241 def	11.0 bcd	4193 a	2.42 ab	0.67	0.55 abc	12.2 a	3.50
9	5.35	987	228 f	11.8 ab	3327 abcd	2.09 abc	0.65	0.48 abc	10.7 ab	3.63
10	6.98	907	235 ef	12.2 a	3539 abcd	2.58 a	0.75	0.57 a	12.3 a	3.96
SEM	0.353	51.2	4.47	0.11	95.9	0.08	0.018	0.02	0.37	0.06

Wyniki analiz, ilustrujące działanie badanych dodatków paszowych na stopień stłuszczenia wątroby oraz poziom dialdehydu malonowego jako markeru stresu oksydacyjnego, przedstawiono w tabeli 4. Zastosowane dodatki paszowe nie wywarły istotnego wpływu na poziom współczynnika TBA, natomiast w przypadku poziomu stłuszczenia wątroby stwierdzono korzystny wpływ mieszaniny ostropestu i karczocha na istotne obniżenie zawartości tłuszczu w miąższu wątroby oraz niekorzystny wpływ łącznego zastosowania ostropestu, karczocha i L-karnityny, co skutkowało najwyższym stopniem odtłuszczenia wątroby. Nie stwierdzono ich istotnego wpływu tych dodatków na zawartość cholesterolu w jajach. Analiza histologiczna wą-

troby nie wykazała korzystnego wpływu zastosowanych dodatków paszowych na obraz stłuszczenia mięszku wątroby (tabela 4.). W żadnej z grup doświadczalnych nie stwierdzono zwłóknień świadczących o intensywnych procesach zapalnych tkanki wątrobowej.

Tabela 4. Zawartość tłuszczu i współczynnik TBA oznaczone w wątrobach kur, poziom cholesterolu w żółtkach jaj oraz stopień stłuszczenia wątroby

GRUPA	Tłuszcz wolny [%]	Współczynnik TBA [mg aldehydu malonowego/kg]	Cholesterol [mg/g]	Stłuszczenie [+ /++ /+++]
1	5.19 bc	1.72	11.6	+
2	5.16 bc	1.59	11.1	+
3	5.20 bc	1.75	11.1	++
4	5.74 bc	1.80	11.0	++
5	5.45 bc	1.76	11.2	+
6	4.56 c	1.70	11.2	++
7	5.98 bc	1.62	10.9	++
8	6.93 ab	1.82	10.8	++
9	6.98 ab	1.73	10.9	++
10	8.53 a	1.56	10.8	++
SEM	0.227	0.042	0.056	

Cel szczegółowy 2.

Wyniki własnych analiz laboratoryjnych potwierdziły oczekiwane różnice w zawartości tanin skondensowanych (CT) oraz sumy związków fenolowych (TP) w surowych nasionach odmian bobiku wybranych do testów strawnościowych. Nasiona niskotaninowej odmiany *Amigo* (LTB) charakteryzowały się ponad 12-krotnie niższą zawartością CT oraz ponad 3-krotnie niższą zawartością TP w suchej masie niż nasiona wysokotaninowej odmiany *Bobas* (HTB). Jednocześnie nie stwierdzono obecności CT (poniżej LOQ metody) w poekstrakcyjnej śrucie sojowej (SBM), włączanej do badań jako materiał odniesienia (kontrolny). W roku sprawozdawczym przeprowadzono kalkulacje wartości współczynników standaryzowanej strawności jelitowej (SSJ) aminokwasów (AA) dla wszystkich badanych materiałów (bobik LTB, bobik HTB, SBM) w obrębie każdej grupy wiekowej kurcząt, tj. w 10., 20. i 30. dniu życia ptaków. Zgodnie z przyjętą metodyką odpowiednie obliczenia, dla każdego z 17 analizowanych aminokwasów, wykonano według wzoru: $SSJ = PSJ + (EAA, \text{mg/kg SM} / \text{zawartość aminokwasu w diecie testowej, mg/kg SM})$, gdzie PSJ = współczynnik pozornej strawności jelitowej poszczególnych aminokwasów w danym materiale paszowym, oznaczony w części eksperymentalnej badań odpowiednio na ptakach w wieku 10, 20 i 30 dni; EAA = wielkość przepływu jelitowego poszczególnych AA pochodzenia endogennego (pozapaszowych) w przeliczeniu na jednostkę pobrania suchej masy diety bezbiałkowej, oznaczona w części eksperymentalnej badań odpowiednio u 10-, 20- i 30-dniowych ptaków.

Wszystkie dane liczbowe poddano wstępnie dwuczynnikowej analizie wariancji w układzie: badany materiał paszowy (bobik LTB, bobik HTB, SBM) × wiek kurcząt (10., 20. i 30. dzień życia). Zgodnie z przyjętymi pierwotnie hipotezami badawczymi [(1) „występowanie różnic w strawności (SSJ) aminokwasów u kurcząt w danym wieku wynikające zarówno z udziału tanin w nasionach bobiku, jak i między wiekiem ptaków w obrębie odmiany nisko- i wysokotaninowej”; (2) „strawność aminokwasów bobiku LTB i HTB różni się od wartości oznaczonych dla SBM u ptaków danej grupy wiekowej”], zaplanowane porównania szczegółowe przeprowadzono metodą kontrastów (SDFC). Efekty czynników głównych i dwuczynnikowej interakcji (ANOVA) oraz różnice między średnimi w analizie kontrastów (SDFC) traktowano jako statystycznie istotne przy wartości $P < 0.050$. W niniejszej prezentacji wyników skupiono się na współczynnikach SSJ

dziiesięciu aminokwasów z grupy niezbędnych dla drobiu, obejmującej lizynę (Lys), metioninę (Met), treoninę (Thr), argininę (Arg), izoleucynę (Ile), leucynę (Leu), histydynę (His), walinę (Val) i fenyloalaninę (Phe) oraz na wartości SSJ uśrednionej dla ogółu tych aminokwasów (NAA). Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła istotny ($P < 0.001$ – 0.022) efekt interakcyjny pomiędzy rodzajem testowanego materiału i wiekiem kurcząt (M x A) dla wszystkich analizowanych AA niezbędnych, co stanowiło dodatkowe uzasadnienie dla dalszych porównań różnic między średnimi dla poszczególnych kombinacji czynników głównych („grup doświadczalnych”).

Wpływ wieku kurcząt na standaryzowaną strawność jelitową (SSJ) aminokwasów bobiku obu testowanych odmian oraz SBM przedstawiono w tabeli 5. Zarówno w przypadku bobiku Amigo (LTB), jak i bobiku Bobas (HTB), najniższą wartość SSJ niezbędnych AA stwierdzono u 10-dniowych ptaków (kontrast 10 d vs. 20 d oraz 10 d vs. 30 d, $P < 0.050$). Wyniki porównań dla starszych kurcząt (kontrast 20 d vs. 30 d) wykazały natomiast zbliżone wartości SSJ dla bobiku Amigo ($P > 0.050$, z wyjątkiem Arg) oraz istotnie niższą wartość SSJ u 20-dniowych kurcząt ($P < 0.050$, z wyjątkiem Arg, Lys i Met) w przypadku wysokotaninowego bobiku Bobas. Dość nieoczekiwanie, z wyjątkiem metioniny, wiek kurcząt nie miał wpływu na SSJ pozostałych AA niezbędnych śruty sojowej (SBM).

Tabela 5. Porównanie współczynników SSJ u kurcząt w różnym wieku (10 d vs. 20 d; 10 d vs. 30 d; 20 d vs. 30 d) w obrębie każdego testowanego materiału

AA	LTB bobik niskotaninowy Amigo			HTB bobik wysokotaninowy Bobas			SBM poekstrakcyjna śruta sojowa		
	Wiek kurcząt			Wiek kurcząt			Wiek kurcząt		
	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d
Arg	0.850 ^c	0.906 ^b	0.935 ^a	0.834 ^b	0.882 ^a	0.896 ^a	0.952	0.970	0.952
His	0.798 ^b	0.887 ^a	0.889 ^a	0.774 ^c	0.845 ^b	0.879 ^a	0.928	0.910	0.895
Ile	0.771 ^b	0.831 ^a	0.845 ^a	0.732 ^c	0.814 ^b	0.868 ^a	0.912	0.923	0.899
Leu	0.787 ^b	0.847 ^a	0.852 ^a	0.738 ^c	0.817 ^b	0.874 ^a	0.904	0.921	0.902
Lys	0.841 ^b	0.881 ^a	0.895 ^a	0.789 ^b	0.851 ^a	0.878 ^a	0.910	0.930	0.931
Met	0.840 ^b	0.865 ^a	0.898 ^a	0.733 ^b	0.811 ^a	0.818 ^a	0.918 ^b	0.943 ^a	0.932 ^a
Phe	0.793 ^b	0.854 ^a	0.870 ^a	0.778 ^c	0.842 ^b	0.880 ^a	0.911	0.927	0.917
Thr	0.797 ^b	0.863 ^a	0.861 ^a	0.745 ^c	0.823 ^b	0.873 ^a	0.864	0.887	0.871
Val	0.792 ^b	0.856 ^a	0.863 ^a	0.734 ^c	0.819 ^b	0.870 ^a	0.907	0.928	0.912
NAA	0.805 ^b	0.865 ^a	0.878 ^a	0.755 ^c	0.830 ^b	0.871 ^a	0.910	0.924	0.909

Wartości oznaczone różnymi literami oznaczają istotne różnice w SSJ między kurczętami w różnym wieku (wartość P kontrastu < 0.050)

Wyniki analizy porównawczej badanych odmian bobiku w obrębie tej samej grupy wiekowej kurcząt (tabela 6.) wykazały ogólnie wyższą SSJ aminokwasów niezbędnych zawartych w nasionach odmiany Amigo (LTB) u 10- i 20-dniowych kurcząt w stosunku do wartości określonych dla bobiku HTB (odm. Bobas) u ptaków w tym samym wieku. Średnia SSJ aminokwasów niezbędnych (NAA) dla bobiku LTB była wyższa ($P = 0.001$ dla wieku 10 dni i $P = 0.007$ dla wieku 20 dni), odpowiednio o 5,0 i 3,5 p.p., niż dla bobiku HTB. U kurcząt w wieku 30 dni różnice w wartości SSJ między testowanymi odmianami bobiku były (z wyjątkiem Arg i Met) nieistotne statystycznie ($P > 0.050$).

Tabela 6. Porównanie współczynników SSJ dla nasion bobiku Amigo (LTB) i nasion bobiku Bobas (HTB) w każdej grupie wiekowej kurcząt

AA	Wiek 10 d			Wiek 20 d			Wiek 30 d		
	LTB	HTB	P	LTB	HTB	P	LTB	HTB	P
Arg	0.850	0.834	NS	0.906	0.882	0.014	0.935	0.896	0.001
His	0.798	0.774	NS	0.887	0.845	0.003	0.889	0.879	NS
Ile	0.771	0.732	0.006	0.831	0.814	NS	0.845	0.868	NS
Leu	0.787	0.738	0.002	0.847	0.817	0.017	0.852	0.874	NS
Lys	0.841	0.789	<.001	0.881	0.851	0.012	0.895	0.878	NS
Met	0.840	0.733	<.001	0.865	0.811	0.003	0.898	0.818	<.001
Phe	0.793	0.778	NS	0.854	0.842	NS	0.870	0.880	NS
Thr	0.797	0.745	0.001	0.863	0.823	0.016	0.861	0.873	NS
Val	0.792	0.734	0.001	0.856	0.819	0.009	0.863	0.870	NS
NAA	0.805	0.755	0.001	0.865	0.830	0.007	0.878	0.871	NS
Względna wartość różnic LTB vs. HTB (w punktach procentowych)									
NAA	5.0			3.5			0.7		

P – prawdopodobieństwo kontrastu; NS – P>0.050

Dwie poniższe tabele ilustrują odpowiedź na pytanie, w jakim zakresie standaryzowana strawność jelitowa AA niezbędnych w badanych nasionach bobiku LTB i HTB różniła się od wartości oznaczonych dla śruty sojowej (SBM) w kolejnych grupach wiekowych kurcząt. Dla nasion niskotaninowego bobiku Amigo (tabela 7.) współczynniki SSJ wszystkich AA niezbędnych u 10-dniowych ptaków były istotnie niższe (średnio o 10,5 p.p.) niż dla SBM testowanej na kurczętach analogicznej grupy wiekowej. U ptaków w wieku 20 dni SSJ siedmiu AA (Arg, Ile, Leu, Lys, Met, Phe i Val) bobiku Amigo (LTB) była niższa (P<0.001) w porównaniu z SBM, co skutkowało mniejszą o 5,9 p.p. uśrednioną wartością NAA. W przypadku 30-dniowych kurcząt przewaga SBM (nad bobikiem Amigo) dotyczyła potwierdzonej statystycznie wyższej strawności pięciu AA (Ile, Leu, Lys, Phe i Val). Dla nasion wysokotaninowego bobiku Bobas (tabela 8.) współczynniki SSJ wszystkich AA niezbędnych u 10- i 20-dniowych kurcząt były istotnie niższe (średnio o odpowiednio 15,5 i 9,4 p.p.) niż dla SBM testowanej na ptakach w analogicznym wieku. U ptaków w wieku 30 dni istotne różnice w strawności SSJ (Bobas << SBM) odnotowano dla siedmiu spośród dziewięciu AA z grupy niezbędnych, w tym Arg, Ile, Leu, Lys, Met, Phe i Val.

Tabela 7. Porównanie współczynników SSJ dla śruty sojowej (SBM) i nasion bobiku Amigo (LTB) w każdej grupie wiekowej kurcząt

AA	Wiek 10 d			Wiek 20 d			Wiek 30 d		
	SBM	LTB	P	SBM	LTB	P	SBM	LTB	P
Arg	0.952	0.850	<.001	0.970	0.906	<.001	0.952	0.935	NS
His	0.928	0.798	<.001	0.910	0.887	NS	0.895	0.889	NS
Ile	0.912	0.771	<.001	0.923	0.831	<.001	0.899	0.845	<.001
Leu	0.904	0.787	<.001	0.921	0.847	<.001	0.902	0.852	<.001
Lys	0.910	0.841	<.001	0.930	0.881	<.001	0.931	0.895	0.003
Met	0.918	0.840	<.001	0.943	0.865	<.001	0.932	0.898	NS
Phe	0.911	0.793	<.001	0.927	0.854	<.001	0.917	0.870	0.001
Thr	0.864	0.797	<.001	0.887	0.863	NS	0.871	0.861	NS
Val	0.907	0.792	<.001	0.928	0.856	<.001	0.912	0.863	0.001
NAA	0.910	0.805	<.001	0.924	0.865	<.001	0.909	0.878	0.005
Względna wartość różnic SBM vs. LTB (w punktach procentowych)									
NAA	10.5			5.9			3.1		

P – prawdopodobieństwo kontrastu; NS – P>0.050

Tabela 8. Porównanie współczynników SSJ dla śruty sojowej (SBM) i nasion bobiku Bobas (HTB) w każdej grupie wiekowej kurcząt

AA	Wiek 10 d			Wiek 20 d			Wiek 30 d		
	SBM	HTB	P	SBM	HTB	P	SBM	HTB	P
Arg	0.952	0.834	<.001	0.970	0.882	<.001	0.952	0.935	<.001
His	0.928	0.774	<.001	0.910	0.845	<.001	0.895	0.889	NS
Ile	0.912	0.732	<.001	0.923	0.814	<.001	0.899	0.845	0.031
Leu	0.904	0.738	<.001	0.921	0.817	<.001	0.902	0.852	0.024
Lys	0.910	0.789	<.001	0.930	0.851	<.001	0.931	0.895	<.001
Met	0.918	0.733	<.001	0.943	0.811	<.001	0.932	0.898	<.001
Phe	0.911	0.778	<.001	0.927	0.842	<.001	0.917	0.870	0.006
Thr	0.864	0.745	<.001	0.887	0.823	<.001	0.871	0.861	NS
Val	0.907	0.734	<.001	0.928	0.819	<.001	0.912	0.863	0.004
NAA	0.910	0.755	<.001	0.924	0.830	<.001	0.909	0.878	0.001
Względna wartość różnic SBM vs. HTB (w punktach procentowych)									
NAA	15.5			9.4			3.8		

P – prawdopodobieństwo kontrastu; NS – P>0.050

W oparciu o porównanie różnic w wartości współczynników SSJ, można oczekiwać znacznie lepszego wykorzystania aminokwasów z białka surowych nasion bobiku zarówno odmiany niskotaninowej (*Amigo*), jak i wysokotaninowej (*Bobas*), przez kurczęta brojlery w wieku 20 i 30 dni niż przez młodsze ptaki.

W porównaniu z odmianą *Bobas*, nasiona bobiku niskotaninowej odmiany *Amigo* są bogatszym źródłem strawnych aminokwasów, zwłaszcza metioniny, lizyny, treoniny, waliny i leucyny, dla 10- i 20-dniowych kurcząt brojlerów.

Z wyjątkiem argininy i metioniny, u kurcząt w wieku 30 dni standaryzowana strawność jelitowa niezbędnych aminokwasów nasion bobiku niskotaninowego (odm. *Amigo*) i wysokotaninowego (odm. *Bobas*) nie różni się znacząco.

U kurcząt brojlerów w wieku 10 i 20 dni, dobrej jakości poekstrakcyjna śruta sojowa cechuje się zdecydowanie wyższą jelitową strawnością niezbędnych aminokwasów niż surowe (nieprzetworzone) nasiona bobiku obu testowanych odmian.

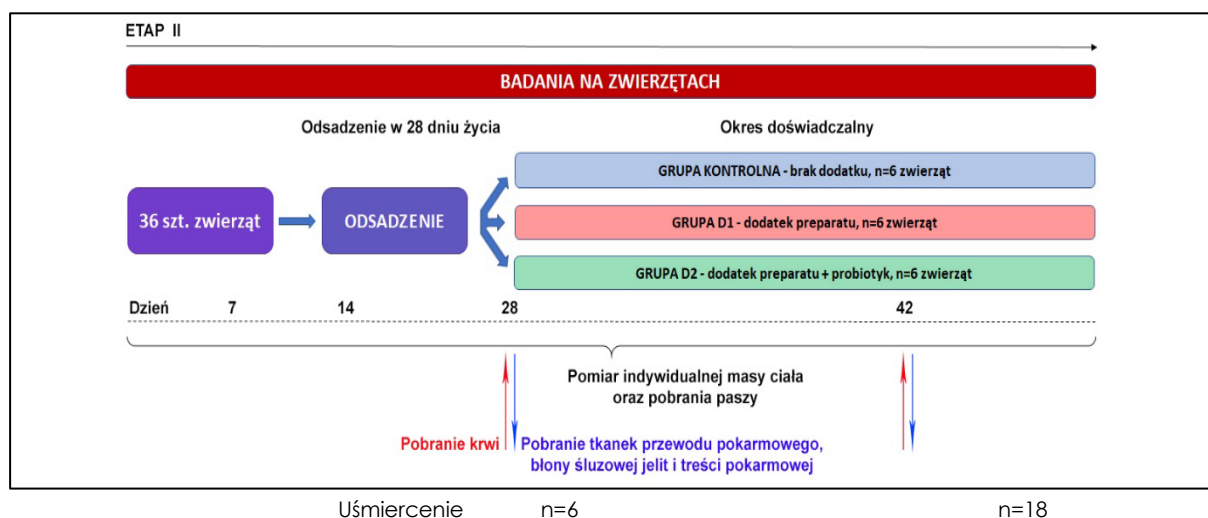
Zadanie 04-16-05-11

Ochrona przewodu pokarmowego prosiąt przed negatywnym wpływem bakterii chorobotwórczych

kierownik zadania: prof. dr hab. Marek Pieszka

Celem etapu badawczego była fizjologiczna ocena wpływu dodatków paszowych ograniczających rozwój bakterii o charakterze patogennym i mających wpływ na stabilizację mikroflory jelit u odsadzonych prosiąt, morfometrię tkanek przewodu pokarmowego, funkcje fizjologiczne przewodu pokarmowego, w tym aktywność enzymów rąbka szczoteczki i dojrzewanie śluzówkowego układu immunologicznego oraz parametry produkcyjne i zdrowie rosnących świń. Doświadczenie zostało wykonane ogółem na trzech miotach (36 prosiątach) pochodzących od loch linii 990, według schematu podanego niżej. Lochy od 100. dnia ciąży do odsadzenia prosiąt utrzymywane były w kojcach porodowych. Lochy otrzymywały mieszankę pełnoporcjową dla loch prośnych i karmiących. Prosięta po urodzeniu przebywały wraz z matkami w kojcach porodowych do odsadzenia w 28. dniu życia, a następnie do 42. dnia życia, odchów prowadzono w kojcach dla prosiąt starszych. Okres właściwy doświadczenia trwał od odsadzenia prosiąt od loch w 28. dniu do 42. dnia życia.

Rycina 1. Schemat doświadczenia



Analizę wybranych parametrów biochemicznych surowicy krwi wykonano metodą spektrofotometryczną, wykorzystując dedykowane zestawy diagnostyczne firmy PZ Cormay SA, (Warszawa, Polska) i postępując zgodnie z instrukcją producenta. Natomiast analizy haptoglobiny CRP, IgG, IgM i IgA wykonano za pomocą metody ELISA, wykorzystując zestawy diagnostyczne ELISA Kit (BT-Lab, Shanghai, Chiny). Pomiarów dokonano na czytniku ELISA - Magellan™ firmy Tecan Trading AG, (Switzerland). Aktywność sacharazy, laktazy i maltazy w homogenatach błony śluzowej oznaczono według zmodyfikowanej metody Dahlquist'a (1964), z kolei aktywność aminopeptydazy A i N oraz dipeptydopetydazy IV według zmodyfikowanej metody Maroux i in. (1973). W badanych próbkach treści jelita grubego oznaczono skład mikrobiomu wykorzystując technikę (NGS – ang. *next-generation sequencing*).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi szacowano stosując test Tukey'a przy wykorzystaniu programu SAS (2018). Różnice uznawano za statystycznie istotne przy poziomie istotności $P \leq 0,05$.

Wskaźniki biochemiczne krwi prosiąt

W surowicy krwi prosiąt poddanych eutanazji oznaczono wybrane wskaźniki metaboliczne oraz stanu zapalnego organizmu (tabela 1., 2. i 3.).

Tabela 1. Zawartość wybranych wskaźników biochemicznych w surowicy krwi prosiąt

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-wartość
	Kontrola	±SD	D1	±SD	D 2	±SD		
Liczba prosiąt, szt.	6		6		6			
Haptoglobulina (ng/ml)	19,77 ^b	0,91	16,37 ^A	0,77	14,22 ^A	0,65	0,68	0,001
CRP (ng/ml)	4,99 ^b	0,41	2,91 ^a	0,32	2,67 ^a	0,29	0,435	0,044
AST, u/dL	111,09	7,48	54,69	5,14	73,07	6,46	10,24	0,064
ALP, u/dL	236,08	22,36	240,58	23,04	215,33	21,68	17,74	0,842
Mocznik, mg/dL	8,62	0,94	15,28	1,12	14,77	1,09	1,91	0,298
Białko ogólne g/dL	4,77	0,24	5,05	0,26	4,95	0,22	0,782	0,16
Kreatynina, mg/dL	1,72	0,16	1,61	0,14	1,26	0,10	0,04	0,449

* grupa kontrolna – grupa nieotrzymująca dodatku; grupa D1 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacz; grupa D2 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacz i probiotyk

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,05$

^{A,B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,01$

Tabela 2. Zawartość immunoglobulin w surowicy krwi prosiąt w 56. dniu życia (mg/ml)

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-wartość
	Kontrola	±SD	D1	±SD	D 2	±SD		
Ilość prosiąt, szt.	6		6		6			
IgA, mg/ml	0,807	0,053	0,964	0,050	0,829	0,046	0,049	0,382
IgG, mg/ml	1,945 ^b	0,071	1,381 ^a	0,054	1,432 ^a	0,066	0,068	0,041
IgM, mg/ml	0,621	0,045	0,600	0,048	0,586	0,055	0,052	0,969

* jak w tabeli 1.

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p≤0,05^{A,B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p≤0,01

Tabela 3. Aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt (nM/min/mg białka)

Enzymy	Część jelita	Grupy żywieniowe						SEM	p-wartość
		Kontrola	±SD	D1	±SD	D2	±SD		
Prosięta, szt.		6		6		6			
Sacharaza	Prox	0,55 ^{aA}	0,17	0,88 ^{abB}	0,17	1,46 ^{bcB}	0,22	0,10	0,009
	Mid	0,70	0,11	0,55	0,09	0,59	0,11	0,061	0,426
	Dist	0,14	0,01	0,18	0,02	0,22	0,02	0,011	0,058
Laktaza	Prox	10,54	3,11	12,86	3,31	14,96	4,02	2,75	0,342
	Mid	16,54	1,94	18,24	2,00	20,11	2,09	1,58	0,086
	Dist	11,12	3,04	8,92	1,11	10,86	1,08	1,01	0,654
Maltaza	Prox	7,22	1,34	6,84	1,52	7,48	1,68	0,92	0,774
	Mid	5,04	1,28	5,86	1,60	6,11	1,55	0,58	0,556
	Dist	3,02	0,41	4,68	0,48	4,98	0,66	0,32	0,218
Dipeptydaza IV	Prox	1,48 ^a	0,54	1,86 ^b	0,58	2,11 ^b	0,60	0,33	0,048
	Mid	1,64	0,62	2,44	0,70	2,98	0,74	0,22	0,051
	Dist	2,02	0,66	2,96	0,71	3,28	0,78	0,24	0,054
Aminopeptydaza N	Prox	5,52 ^a	1,88	7,12 ^{ab}	1,88	9,18 ^b	1,99	0,66	0,034
	Mid	5,44	1,80	7,00	1,90	8,96	1,79	0,81	0,055
	Dist	6,64	1,86	7,34	1,94	9,36	2,01	0,86	0,098
Aminopeptydaza A	Prox	6,50	1,19	7,55	1,22	8,12	1,28	0,70	0,111
	Mid	4,80	1,14	5,28	1,08	6,68	1,24	0,57	0,286
	Dist	3,84	0,99	4,36	0,96	5,02	1,16	0,41	0,312

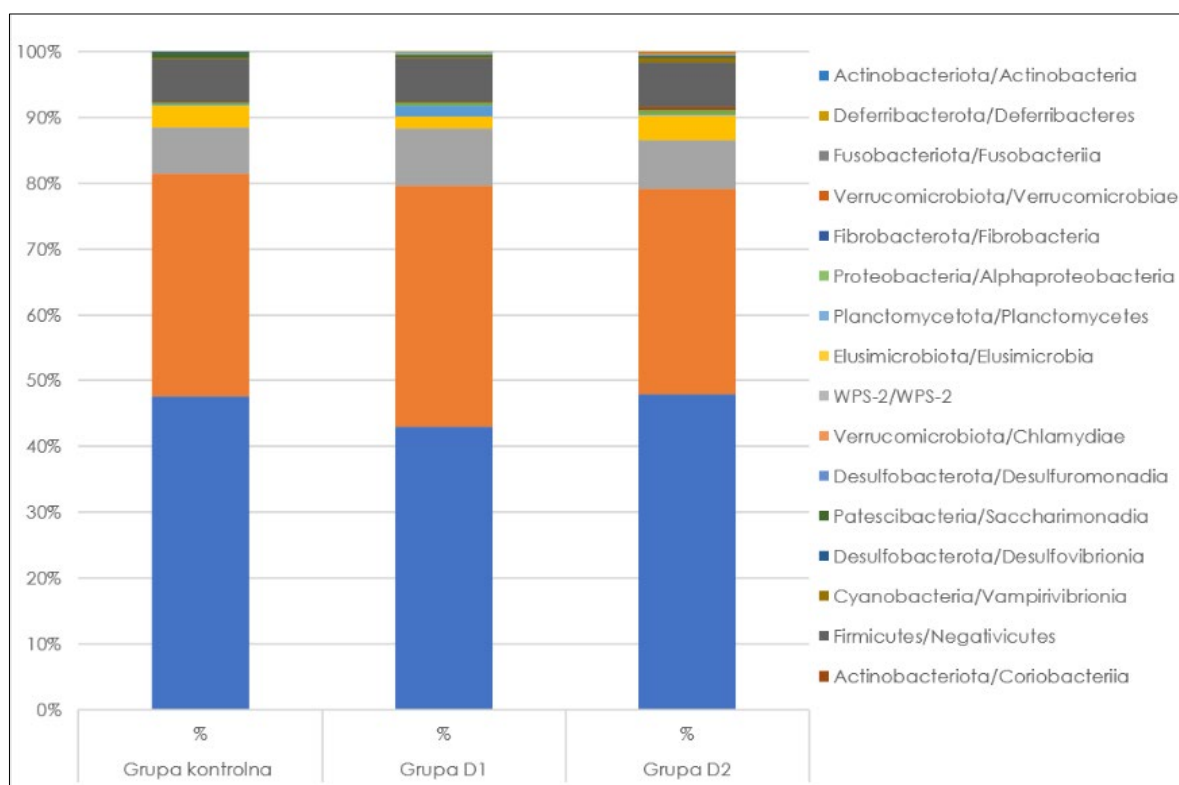
* jak w tabeli 1

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p≤0,05^{A,B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy p≤0,01

Ocena składu mikrobioty jelita grubego

Skład mikrobioty treści pokarmowej okrężnicy przedstawiono na wykresie numer 1.

Wykres 1. Względna liczebność rodzajów drobnoustrojów (%) w okrężnicy świń w 42. dniu życia



* jak w tabeli 1.

Jednoczesne zastosowanie mrówczanu potasu lub mrówczanu potasu wraz z probiotykiem daje najlepsze rezultaty zdrowotne w okresie okołoodsadzeniowym prosiąt, co potwierdzono istotnie niższymi wskaźnikami prozapalnymi.

Podawanie mrówczanu potasu lub mrówczanu potasu wraz z probiotykiem w okresie odsadzenia prosiąt powoduje wyższą aktywność sacharazy i aminopeptydazy N w początkowej części jelita czczego.

Zastosowanie mrówczanu potasu w diecie prosiąt odsadzonych ogranicza liczbę bakterii patogennych *Clostridium*, jednocześnie powodując wzrost poziomu bakterii z rodziny *Bacteroidia*.

Podsumowując wyniki badań nad zastosowaniem mrówczanu potasu lub/z probiotykiem można stwierdzić, że stosując je oddzielnie w odchowie prosiąt nie zawsze uzyskuje się korzystny efekt, który jest prawdopodobnie uzależniony od wielu czynników. Dlatego coraz więcej badaczy uważa, że pojedynczy dodatek paszowy nie może stanowić alternatywy dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Dla osiągnięcia podobnych i powtarzalnych efektów do tych, jakie dawało wykorzystanie antybiotyków w żywieniu prosiąt konieczne jest łączne podawanie dwóch lub więcej naturalnych dodatków paszowych w formie dodatku kompleksowego, dostosowanego m.in. do wieku zwierząt, ich kondycji zdrowotnej, warunków sanitarnych w chlewni i systemu utrzymania.

Zakład Systemów i Środowiska Produkcji
kierownik: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Zadanie 01-17-05-11

Ekonomiczny wymiar realizacji wybranych założeń Green Deal w gospodarstwach rolnych ze zróżnicowaną produkcją zwierzęcą

kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Głównym celem zadania była ocena działań i nakładów finansowych skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej na środowisko w obrębie rodzinnych gospodarstw rolnych. W roku sprawozdawczym zaplanowano etap dotyczący analizy ekonomiczno-produkcyjnej w kontekście zastosowanych działań skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej na środowisko w obrębie rodzinnych gospodarstw.

W trzecim roku sprawozdawczym:

- wytypowano gospodarstwa rodzinne utrzymujące bydło mięsne, bydło mleczne oraz owce i świnie,
- skorygowano i uzupełniono kwestionariusz ankiety do gromadzenia danych źródłowych w terenie,
- przygotowano arkusz kalkulacyjny do wprowadzenia pozyskanych danych oraz obliczeń,
- zgromadzono dane z zakresu zasobów gospodarstw, które posłużą do wykonania analizy efektywności ekonomiczno-produkcyjnej,
- zgromadzono informacje o działaniach skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko w obrębie gospodarstw rodzinnych,
- dane źródłowe poddane analizie w 2023 w roku pochodziły z 205 gospodarstw konwencjonalnych, w tym:
 - 60 gospodarstw utrzymujących krowy mleczne,
 - 68 gospodarstw utrzymujące bydło mięsne,
 - 39 gospodarstw utrzymujących owce,
 - 38 gospodarstw utrzymujących świnie.

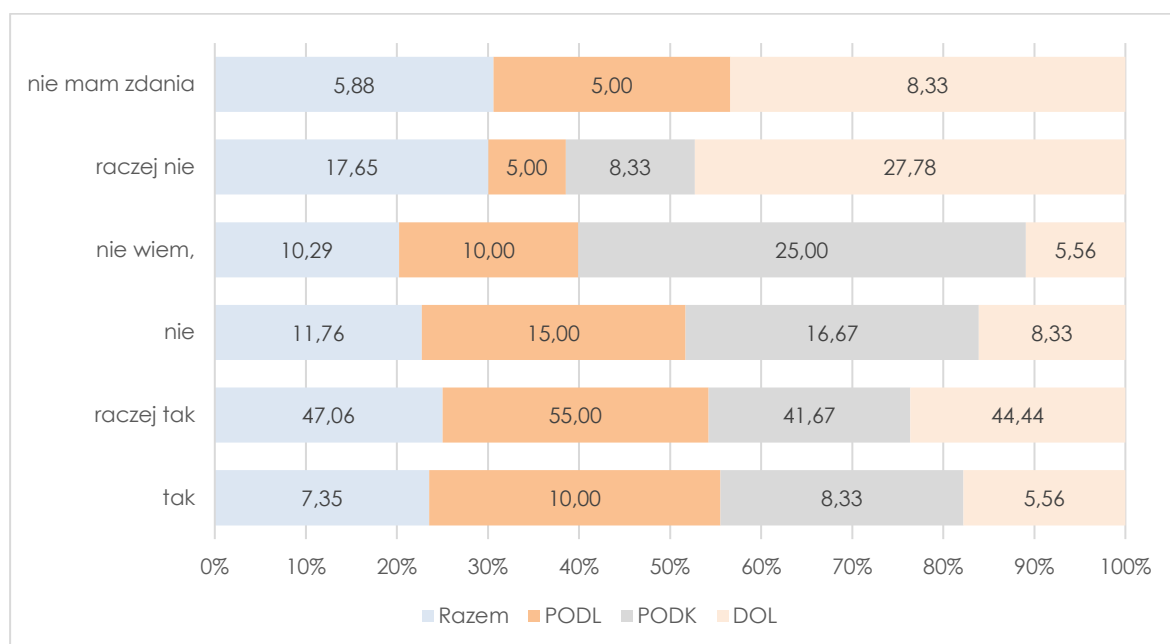
Działania skierowane na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko w obrębie gospodarstw rodzinnych

Działalność produkcyjna (szczególnie produkcja zwierzęca) wywiera znaczący wpływ na środowisko, często negatywnie oddziałując na glebę, powietrze oraz wodę (powierzchniową i podziemną). Rolnictwo bezpośrednio użytkuje zasoby przyrody w procesach produkcji. Z drugiej strony, rolnicy funkcjonujący w gospodarce rynkowej muszą produkować zgodnie z potrzebami społecznymi i jednocześnie maksymalizować swoje funkcje celu poprzez efekty produkcyjne oraz ekonomiczne w warunkach konkurencji. Osiąganie mikroekonomicznych celów produkcyjnych w rolnictwie nie zawsze idzie w parze z celami środowiskowymi.

Na uwagę zasługuje jednak fakt, że w przeważającej większości właściciele objętych badaniami gospodarstw mają świadomość o istotności działań dostosowawczych produkcji rolnej mających na celu ochronę środowiska naturalnego (wykres 1.).

Analizując wypowiedzi producentów rolnych stwierdzono, iż ponad połowa (54,41%) przyznaje, że produkcja rolna w zdecydowany sposób przyczynia się do zanieczyszczenia i degradacji środowiska naturalnego. Najczęściej to zdanie podzielają rolnicy z Podlasia. Interesujący jest fakt, że około 40% uważa, iż produkcja rolna nie ma negatywnego wpływu na środowisko. Natomiast około 6% respondentów nie zajmuje stanowiska. Na podstawie powyższych danych nasuwa się wniosek o konieczności lepszej współpracy nauki z praktyką celem przekazywania informacji o wpływie rolnictwa na środowisko naturalne i zagrożeń jakie z tego wypływają.

Wykres 1. Czy produkcja rolna (rolnictwo) przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska?



Źródło: badania własne

Działalność rolnicza jest nieodłącznym elementem życia społecznego, ale jednocześnie wpływa na środowisko naturalne. Zrozumienie głównych źródeł narażenia środowiska na degradację ze strony rolnictwa jest kluczowe dla opracowywania zrównoważonych praktyk rolniczych, które minimalizują negatywne skutki dla ekosystemów i zachowują równowagę między produkcją żywności a ochroną środowiska.

Niekorzystne aspekty obejmują degradację i utratę żyzności gleby, zanieczyszczenie wód i powietrza, spadek bioróżnorodności, wyczerpywanie zasobów mineralnych oraz zwiększenie obszarów upraw roślin. Z drugiej strony istnieją także korzystne efekty dla środowiska, takie jak: podnoszenie i utrzymywanie żyzności gleby, kształtowanie krajobrazu, ochrona bioróżnorodności oraz absorpcja dwutlenku węgla (CO₂).

Do głównych źródeł narażenia środowiska naturalnego na degradację ze strony działalności rolniczej odnieśli się rolnicy, którzy uznali (około 60% pytanym), że prowadzenie intensywnych form gospodarowania w rolnictwie prowadzi do nasilenia erozji gleb i zanieczyszczenia wód (tabela 1). Drugim bardzo istotnym czynnikiem, o którym mówiło aż 58% rolników było wypalanie roślinności oraz ściernisk po żniwach. Jako jedną z głównych przyczyn negatywnego wpływu na środowisko, a tym samym na klimat – wskazano utrzymanie dużych powierzchni monokulturowych czyli wieloletnie uprawianie na tym samym obszarze roślin jednego gatunku, bądź o podobnych wymaganiach glebowych.

Tabela 1. Główne źródła narażenia środowiska naturalnego na degradację ze strony działalności rolniczej (% – opinii producentów rolnych)

	Razem	PODL	PODK	DOL
Prowadzenie intensywnych form gospodarowania w rolnictwie zmierzających do nasilenia erozji gleb i zanieczyszczenia wód (<i>niszczenia</i>)	58,82	35,00	41,67	77,78
Utrzymanie dużych powierzchni monokulturowych (<i>wieloletnie uprawianie na tym samym obszarze roślin jednego gatunku, bądź o podobnych wymaganiach glebowych</i>)	50,00	50,00	33,33	55,56
Nadmierna intensyfikacja łąk lub pastwisk poprzez wczesne terminy wypasów, koszenia, zwiększenia obsady zwierząt	30,88	50,00	16,67	25,00
Wypalanie roślinności, ściernisk po żniwach (zabronione)	58,82	65,00	58,33	55,56
Osuszanie i eksploatacja obszarów wodno-błotnych	25,00	25,00	8,33	30,56
Zaniedbywanie i zaniechanie użytkowania łąk i pastwisk, które przekształca się w tereny zadrzewione	26,47	20,00	33,33	27,78
Zanikanie lokalnych ras zwierząt gospodarskich i odmian roślin uprawnych	19,12	5,00	8,33	30,56

Źródło: badania własne

W badanych gospodarstwach producenci wyjaśniają, iż głównym czynnikiem hamującym rozwój gospodarstwa rolnego są niskie ceny zbytu produktów rolnych, a wysokie koszty produkcji szczególnie w gospodarstwach produkujących metodami ekologicznymi. Jedną z takich barier jest również mała liczba przetwórci ekologicznych, szczególnie mięsnych ale i paszowych, co przekłada się na konieczność sprzedaży towaru ekologicznego po cenach konwencjonalnych, co wpływa negatywnie na opłacalność produkcji. Dużym problemem są zawite oraz niespójne przepisy i zbyt duża biurokracja. Ilość dokumentacji, którą ekologiczni rolnicy zobligowani są do prowadzenia, liczba przeprowadzanych kontroli, jakim są poddawani, ale i niestabilność przepisów powodująca trudności w ich interpretacji. Dlatego też, jak widzimy w tabeli 2. ponad 60% zapytanych rolników stwierdziło, że do stosowania zasad produkcji rolnej bardziej przyjaznej środowisku skłoniłyby ich „zachęty finansowe” stanowiące rekompensatę podwyższonych kosztów produkcji lub cen skupu nie uwzględniających ich wysiłku w walkę z degradacją środowiska.

Tabela 2. Czynniki zachęcające do stosowania zasad produkcji rolnej bardziej przyjaznej środowisku [% – opinii producentów rolnych]

	Razem	PODL	PODK	DOL
1. Zachęty finansowe	61,76	50,00	66,67	66,67
2. Chęć poprawy środowiska naturalnego	33,82	20,00	16,67	47,22
3. Regulacje prawne	22,06	30,00	8,33	22,22
4. Nie wiem	1,47	5,00	0,00	0,00
5. Nic	0,00	0,00	0,00	0,00

Źródło: badania własne

Według danych Krajowego Ośrodka Bilansowania i Zarządzania Emisjami (KOBIZE, 2022), przedstawionych w raporcie inwentaryzacyjnym w 2022 roku, udział rolnictwa w całkowitej emisji gazów cieplarnianych (wyrażonej w ekwiwalencie CO₂) w Polsce wynosi 9,1% – co stanowi drugą pozycję w strukturze poszczególnych kategorii źródeł w całkowitej emisji krajowej GHG. Należy jednak podkreślić, że rolnictwo w Polsce jest źródłem 31,9% krajowej emisji metanu i aż 81,8% krajowej emisji podtlenku azotu.

Można wyróżnić wiele czynników mających wpływ na zmiany poziomu emisji gazów cieplarnianych w rolnictwie. Są to czynniki związane m.in. z technologią uprawy gleby, przyjętym

profilem gospodarstw, możliwościami absorpcyjnymi gleby, ale również z działaniami państwa w sferze ochrony środowiska. Natomiast emisje GHG z produkcji zwierzęcej obejmują głównie emisje z fermentacji jelitowej i odchodów zwierzęcych.

W badanych gospodarstwach producenci pytani o działania zmierzające do ograniczania emisji gazów cieplarnianych i amoniaku najczęściej wskazywali na przestrzeganie właściwego płodozmianu i wprowadzanie wsiewek międzyplonowych. Średnio ok. 43% rolników zamierza stosować takie praktyki. Zwiększenie udziału żywienia pastwiskowego deklaruje średnio 47% pytanym, a zmniejszyć nawożenie mineralne ma zamiar około 34%. W tych trzech propozycjach praktyk ograniczających emisje GHG nie odnotowano zróżnicowania regionalnego.

Efektywne wykorzystanie energii elektrycznej w gospodarstwach rolniczych stanowi kluczowy aspekt dążenia do zrównoważonej produkcji rolnej. W tym kontekście, podejmowane są różnorodne działania mające na celu optymalizację zużycia energii elektrycznej w badanych gospodarstwach: modernizacja sprzętu i maszyn; użycie technologii precyzyjnych; optymalizacja systemów oświetlenia; inwestycje w odnawialne źródła energii; edukacja i świadomość pracowników; monitorowanie i analiza zużycia energetycznego.

Analizując dane pozyskane z gospodarstw, stwierdzono, że producenci najczęściej wskazywali energię słoneczną i zastosowanie ogniw fotowoltaicznych jako podstawowe działania zmierzające do efektywnego wykorzystania energii elektrycznej w badanych gospodarstwach. O energii wiatrowej czy energii z biomasy wspominało zaledwie 8% respondentów, wskazując na wysokie koszty inwestycyjne. Co ciekawe, oszczędzanie energii planowało wprowadzić zaledwie 1,5% rolników.

W rezultacie, efektywne wykorzystanie energii elektrycznej w badanych gospodarstwach rolniczych nie tylko przyczynia się do zmniejszenia kosztów operacyjnych, ale także stanowi ważny krok w kierunku zrównoważonej produkcji rolnej, minimalizując negatywny wpływ na środowisko.

Ograniczanie zużycia wody w różnych sektorach jest niezwykle istotnym aspektem w kontekście zrównoważonego zarządzania zasobami naturalnymi. W przypadku gospodarstw rolniczych, podejmowane są różnorodne działania, których celem jest efektywne gospodarowanie wodą, minimalizacja strat oraz utrzymanie zrównoważonego stosunku między zapotrzebowaniem a dostępnością wody. Podejmowane są różnorodne działania: systemy nawadniania o niskim zużyciu wody; monitorowanie wilgotności gleby; praktyki uprawowe sprzyjające oszczędzaniu wody; recykling i oczyszczanie wody; edukacja rolników; innowacyjne technologie.

W rezultacie, działania zmierzające do ograniczania zużycia wody w gospodarstwach rolniczych nie tylko przyczyniają się do oszczędności tego cennego zasobu, ale również wspierają zrównoważoną produkcję rolno-żywnościową, przyczyniając się do ochrony środowiska naturalnego.

W analizowanych gospodarstwach (tabela 3.) rolnicy deklarowali, że najprawdopodobniej będą wprowadzać w swoich gospodarstwach zmiany dotyczące stosowania nawozów naturalnych, szczególnie obornika (średnio 42,65%), oraz zwiększania powierzchni gruntów ornych pokrytych roślinnością w okresie zimy (średnio 35,29%). Również dość duża grupa producentów rolnych (średnio 32,35%) deklarowała przestrzeganie optymalnych terminów uprawy, siewu i sadzenia oraz ochrony roślin. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie deklarowane zmiany dotyczyły produkcji roślinnej. Najprawdopodobniej wynika to z mniejszej czasochłonności i poziomu trudności.

Tabela 3. Prawdopodobne zmiany do wprowadzenia w badanych gospodarstwach – z zakresu ochrony środowiska [% – opinii producentów rolnych]

	Razem	PODL	PODK	DOL
Powierzchnia GO pokrytych roślinnością w okresie zimy	35,29	30,00	25,00	41,67
Udział mieszanek z roślinami bobowatymi grubonasiennymi i drobno-nasiennymi w strukturze zasiewów	20,59	10,00	8,33	30,56
Mulcz z resztek poźniwnych czy też roślin poplonowych	16,18	5,00	8,33	25,00
Przyorywanie stomy	11,76	15,00	25,00	5,56
Szybka podorywka ścierniskowa po żniwach	30,88	40,00	16,67	30,56
Agregatowanie zabiegów uprawowych, aby minimalizować ubijanie gleby	26,47	30,00	8,33	30,56
Stosowanie nawozów naturalnych, szczególnie obornika	42,65	50,00	25,00	44,44
Likwidacja podeszwy płużnej i niedopuszczanie do zbitcia warstwy podglebia	13,24	10,00	16,67	13,89
Zrównoważone nawożenie, szczególnie przedsiwne i pogłównie podawanie składników odpowiedzialnych za gospodarkę wodną roślin, jak potas	5,88	0,00	0,00	11,11
Rezygnacja, tam gdzie istnieje możliwość, z upraw roślin jarych na rzecz roślin ozimych, które lepiej wykorzystują wodę z zimowych opadów	22,06	25,00	8,33	25,00
Stosowanie międzyplonów	22,06	30,00	16,67	19,44
Zrównoważone nawożenie	23,53	25,00	33,33	19,44
Stosowanie obniżonych norm wysiewu zbóż i rzepaku, co umożliwi silniejszy rozwój systemu korzeniowego i mocniejsze rozkrzewienie czy tworzenie pędów bocznych roślin	4,41	0,00	8,33	5,56
Przykrywanie folią nieporośniętych fragmentów gleby	0,00	0,00	0,00	0,00
Przestrzeganie optymalnych terminów uprawy, siewu i sadzenia oraz ochrony roślin	32,35	35,00	33,33	30,56
Inne	0,00	0,00	0,00	0,00

Źródło: badania własne

Zadanie 01-17-06-11*Ewaluacja metod pomiaru emisji i mitygacji GHG w trakcie pastwiskowania***kierownik zadania: dr inż. Paweł Paraponiak (od 03.04.2023)****dr hab. Jacek Walczak**

Potencjał praktyk redukcyjnych w rolnictwie jest znaczący i stanowi mocną podstawę do uzyskania zakładanego dla Polski poziomu redukcji emisji gazów cieplarnianych (GHG). Dokumenty UE zakładają, że rolnictwo może zredukować emisje o 3,2% bez uszczerbku dla bezpieczeństwa żywnościowego.

Rolnicze wykorzystanie trwałych użytków zielonych wypełnia szereg funkcji publicznych z ochroną bioróżnorodności, krajobrazu czy dziedzictwa kulturowego. Stąd większe emisje GHG z utrzymania pastwiskowego przeżuwalcy muszą znaleźć przeciwwagę w postaci metod mitygujących to oddziaływanie.

Celem głównym podjętych badań było określenie najskuteczniejszych metod redukcji emisji metanu podczas pastwiskowego utrzymania bydła.

Ponadto, przeprowadzono porównanie nieinwazyjnych sposobów pomiaru emisji tego gazu, z uwzględnieniem metody tracerów SF₆.

Cel gospodarczy zadania stanowiło opracowanie metod redukcji emisji metanu z pastwiskowania bydła mlecznego, które wprowadzone do praktyki produkcyjnej wesprą krajowy cel redukcyjny emisji GHG.

Badania przeprowadzono w ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. na grupie 60 sztuk bydła rasy simental oraz w ZD IZ PIB Rudawa Sp. z o.o. na 60 sztukach rasy HF. Zwierzęta o jak najbardziej zbliżonej masie ciała oraz przeciętnej wydajności 7 tysięcy kg mleka/laktację, w okresie wegetacyjnym – od maja do października – utrzymywane były w systemie pastwiskowym kwaterym, natomiast w okresie zimowym przebywały w oborach wolnostanowiskowych i żywione były w systemie PMR z udziałem kiszonki z kukurydzy.

Dokonano porównania emisji metanu z wykorzystaniem różnych metod mitygacji w pastwiskowym utrzymaniu krów, tj. wcześniejszy wypas, wypas klasyczny oraz wypas z wykorzystaniem podsiewu trawami hybrydowymi (30%) oraz wypas opóźniony. Wartości emisji szacowano w trzech okresach sezonu pastwiskowego, podobnie jak i w okresie alkierzowym (odstępy około 2-miesięczne).

Ponadto porównano wartości emisji metanu utrzymywanych pastwiskowo krów mlecznych (simental i HF) ze zwierzętami wysokoprodukcyjnymi (HF – wydajność powyżej 9 tysięcy kg mleka/laktację) całodobowo utrzymywanymi alkierzowo i żywionymi TMR bez udziału paszy zielonej. Ten etap prac realizowano w ZD IZ PIB Kołbacz Sp. z o.o. oraz ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. Wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem analizy wariancji.

Podczas realizacji badań przeprowadzono prace konstrukcyjne tracerów z wykorzystaniem SF₆ do pomiaru emisji żwaczowego metanu. Wykonano również testy porównawcze mierników CH₄, których rezultaty wskazywały na preferencję ergonomicznych, przenośnych aparatów pomiarowych.

Uzyskane podczas sezonu pastwiskowego wyniki wskazują na dość duże zróżnicowanie emisji metanu żwaczowego we wszystkich grupach doświadczalnych. W ujęciu poszczególnych dwumiesięcznych okresów sezonu, początkowo, jej wartości – choć różne – były najniższe, a następnie wykazywały tendencję wzrostową (tabela 1.).

Zostało to spowodowane stopniowym wzrostem udziału włókna w zielonce, przy równoczesnym obniżaniu się strawności paszy, co powoduje jej dłuższe zaleganie w przedżołądku oraz intensyfikację procesów metanogenezy. W porównaniu z klasycznym wariantem, wprowadzenie o 2 tygodnie wcześniejszego wypasu skutkowało statystycznie istotną, 3,9% redukcją żwaczowego CH₄, a tendencję odwrotną potwierdzono w przypadku rozpoczętego o 2 tygodnie później spasanania (emisja wyższa o 9,0%). Najkorzystniejszy rezultat redukcyjny uzyskano w przypadku introdukcji traw hybrydowych. Wykorzystanie ich do podsiewu skutkowało dwukrotnie większym obniżeniem emisji względem wcześniejszego pastwiskowania, w odniesieniu do klasycznego odpasu.

Tabela 1. Porównanie emisji metanu podczas różnych wariantów pastwiskowania krów (kg/ szt./60 dni)

Okres pastwiskowania (miesiąc)	Wariant pastwiskowania			
	Trawy hybrydowe	Wcześniejszy wypas	Klasyczny wypas	Późniejszy wypas
V-VI	32,7 Aa	35,2 ABb	36,1 ABc	39,9 Bd
VII-VIII	35,7 Aa	37,7 ABb	39,7 ABc	42,4 Bd
IX-X	37,9 Aa	42 ABb	43,6 ABc	47,8 Bd

a, b, c – różnice istotne przy poziomie $\alpha \leq 0,05$

A, B, C – różnice istotne przy poziomie $\alpha \leq 0,01$

We wszystkich wariantach, 6-miesięczna emisja pastwiskowa przekroczyła wartość 100 kg/szt. (tabela 2.). Najwyższą, wysoko istotnie różną od pozostałych grup emisję CH₄ zmierzono u krów później wypasanych – 130,1 kg/szt./180 dni. Redukcja CH₄, spowodowana zastosowaniem podsiewu oraz wcześniejszym terminem wypasu wyniosła, odpowiednio: 12,3 i 3,9%.

Tabela 2. Całkowita emisja metanu podczas okresu pastwiskowania krów (różne warianty; kg/szt./180 dni)

Cecha	Wariant pastwiskowania			
	Trawy hybrydowe	Wcześniejszy wypas	Klasyczny wypas	Późniejszy wypas
Całkowita emisja	106,3 Aa	114,9 ABb	119,4 Bc	130,1 Cd
Względna zmiana emisji metanu (%)	-12,3	-3,9	0	+9,0

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

Roczna wartość emisji metanu w pastwiskowym utrzymaniu krów doświadczalnych przyjmowała wartości od niewiele przekraczających 200 kg/szt. – trawy hybrydowe – do ponad 230 kg/szt. w przypadku późniejszego wypasu, a zaistniałe różnice były statystycznie wysoko istotne (tabela 3.). W tym ujęciu, cel redukcyjny został osiągnięty na poziomie 6,9 i 2,2% (odpowiednio: trawy hybrydowe i wcześniejszy wypas) względem wartości emisji z systemu klasycznego. Z kolei, wypas opóźniony indukował niemal 5% jej wzrost. W wyniku porównania przeprowadzonego pomiędzy systemem alkiezowym a pastwiskowym stwierdzono, iż w oborze krowy w ujęciu rocznym produkowały o ponad 14% mniej metanu w porównaniu ze zwierzętami wprowadzanymi na pastwisko w klasycznym terminie, a występujące różnice były statystycznie wysoko istotne (tabela 3.).

Tabela 3. Porównanie rocznej emisji metanu od krów utrzymywanych pastwiskowo i alkiezowo (kg/szt./rok)

Cecha	Utrzymanie pastwiskowe (6 mies.) – warianty:				Utrzymanie alkiezowe (12 mies.)
	Trawy hybrydowe	Wcześniejszy wypas	Klasyczny wypas	Późniejszy wypas	
Całkowita emisja	206,9 Bb	216,4 BCc	221,1 Cd	232,0 De	189,5 Aa
Względna zmiana emisji metanu (%)	-6,9	-2,2	0	+4,9	-14,3

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

Polowa metoda redukcyjna emisji metanu – podsiew trawami hybrydowymi – pomimo braku zasadniczych zmian w rodzaju dawki pokarmowej (zielonka), w grupie rozpatrywanych wariantów pastwiskowych była mitygacyjnie najskuteczniejsza, nawet na tle analogicznej wartości określającej emisję od zwierząt żywionych łatwiej strawnymi paszami przetworzonymi (alkierz). Dosyć prawdopodobnym jest, iż przeprowadzenie fuzji dwóch pastwiskowych zabiegów redukcji metanu: wykorzystanie w praktyce hodowlanej podsiewu jednoliściennymi hybrydami wraz z równoczesnym, wcześniejszym terminem introdukcji zwierząt na pastwisko może prowadzić do uzyskania skumulowanego wolumenu redukcyjnego CH₄, jeszcze bliższego wartościom uzyskiwanym przez zwierzęta skarmiane mieszanką pełnoporcjową bądź łatwostrawnymi paszami gospodarskimi. Świadczą o tym korzyści płynące z zastosowania każdej z tych metod z osobna.

Prezentowane wartości określające potencjał obniżenia emisji metanu w różnych typach pastwiskowania, na pozór niezbyt spektakularne, w szerszej perspektywie osiągają swoją właściwą wagę: w ujęciu wolumenu redukcyjnego całego pogłowia przeżuwaczy utrzymywanych pastwiskowo w Polsce.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano skuteczność metod pastwiskowej redukcji emisji metanu żwaczowego od bydła. Utrzymanie pastwiskowe bydła skutkuje istotnie wyższą emisją metanu do środowiska w porównaniu z jego utrzymaniem i żywieniem alkiezowym.

Za najprostszą, bezkosztową metodę mitygacji metanu należy uznać wcześniejszy wypas, natomiast najskuteczniejszym sposobem redukcyjnym jest wprowadzenie do składu florystycznego obiektów pastwiskowych znaczącego udziału łatwostrawnych traw hybrydowych.

Zabiegi te, stanowiące formę niskokosztowej transformacji technologii chowu dla potrzeb ochrony środowiska, skutkują niższym stopniem emisji najistotniejszej, towarzyszącej produkcji bydła, domieszki gazowej.

Zadanie 01-17-07-11

*Przyrodniczo-produkcyjne następstwa procesów recesywnych o charakterze dezagraryzacji i dezanimalizacji w obszarach chronionych
Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej*

kierownik zadania: dr Kamila Musiał

Głównym celem realizowanego zadania badawczego jest zdiagnozowanie stanu zaawansowania procesów recesywnych, a zatem dezagraryzacji i dezanimalizacji na obszarach chronionych i znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie w obrębie Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej. W 2023 roku został wykonany pierwszy etap badań zaplanowanych na trzy lata.

W pierwszej części zawarto wyniki analiz o charakterze produkcyjnym, dotyczące subregionalnych problemów dezagraryzacji oraz jej składowej, czyli dezanimalizacji. Analiza objęła wybrane zmienne pozyskane poprzez badania terenowe o charakterze ankietowym. Przeprowadzono je w 21 gminach położonych w woj. małopolskim oraz w 23 gminach w obrębie woj. śląskiego. Ogólna liczba przeprowadzonych ankiet wynosiła 175, a zatem średnio po 4ankiety w każdej gminie objętej badaniami. Druga część pierwszego etapu analiz obejmowała badania o charakterze przyrodniczym w poszczególnych gminach. Kluczową kwestią było określenie stanu i kondycji rolnictwa, a stąd też gospodarstw znajdujących się w analizowanych gminach. W użytej w badaniach ankiecie eksperckiej zastosowano podział badanych gospodarstw w obrębie gminy na cztery kategorie: A – rozwojowe; B – wykazujące cechy rozwoju; C – nierozwojowe lecz podtrzymujące produkcję oraz D – schyłkowe. Wyodrębnienie i ocena udziału tych czterech grup gospodarstw ma kluczowe znaczenie dla rozważań dotyczących kształtowania się na poziomie lokalnym, także tzw. uwarunkowań strukturalnych oraz środowiskowych. Syntetyczna analiza gmin objętych badaniami wskazuje, że łącznie ok. 14% gospodarstw z tego obszaru wykazuje cechy rozwoju (A). Udział ten w obszarze należącym administracyjnie do woj. śląskiego wynosi 13%, z kolei w woj. małopolskim jest on wyższy o 2 p.p. Na drugim biegunie tak prowadzonych obserwacji znajdują się gospodarstwa schyłkowe (D), które wycofują się z prowadzenia produkcji rolniczej. Ich udział jest średnio dwukrotnie wyższy, aniżeli gospodarstw rozwojowych i wynosi dla woj. śląskiego 30%, natomiast dla woj. małopolskiego 25%. Badania w terenie wykazały, że udział gospodarstw wykazujących cechy rozwoju (B) jest niemal dwukrotnie niższy aniżeli w przypadku grupy C, które stanowią średnio 37,5% dla całego rejonu badań.

Kluczowe dla prowadzonych badań są kwestie dotyczące zaawansowania procesu dezanimalizacji, który bezpośrednio rzutuje na użytkowanie, a stąd też wykorzystanie potencjału produkcyjnego TUZ oraz utrzymanie różnorodności upraw. Proces ten na poziomie gospodarstw rolnych, dotyczy przeważnie chowu przeżuwaczy, widoczna jest także rezygnacja z chowu świń. Porzucanie produkcji zwierzęcej sprzyja sukcesjom roślinnym i przemianom granicy rolno leśnej. To w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w krajobrazie kulturowym danego obszaru. Wstępna ocena procesu dezanimalizacji potwierdza takie niepokojące tendencje. Udział gospodarstw utrzymujących bydło w analizowanych gminach, położonych w woj. małopolskim wynosi ok. 7%. Jeszcze mniej jest podmiotów prowadzących chów świń (ok. 4%). Jed-

nak wahania pomiędzy poszczególnymi gminami są tam dosyć duże. W przypadku gospodarstw prowadzących chów owiec wskazania respondentów wahają się od całkowitego ich braku (0%), do ok. 1-2%. Dla tej części obszaru badań, na terenie woj. śląskiego, zaawansowanie procesu dezanimalizacji jest jeszcze większe. Udział gospodarstw utrzymujących bydło wyszacowano tam na 3%, świnie na 4%, a chów owiec jest w fazie wygaśnięcia. Dla celów analizy przyjęto, że stada liczące po 30 sztuk krów lub bydła opasowego, mogą być uznane za takie, które kreują dochody i przychody w rolnictwie uznane za satysfakcjonujące. Mogą być one także biorcami nieużytkowanych TUZ znajdujących się w ich bliskim sąsiedztwie. Jednakże w obszarze prowadzonych badań takich podmiotów rolnych jest bardzo mało, dla woj. śląskiego liczba stad >30 sztuk krów średnio w gminie wynosi 2, natomiast dla woj. małopolskiego 4. Jeszcze mniej jest gospodarstw, które są nastawione na produkcję bydła opasowego, odpowiednio 2 dla woj. małopolskiego i 1 dla woj. śląskiego.

Ocena przyrodnicza skutków omawianych procesów recesywnych w rolnictwie objęta teren bezpośrednio otaczający wybraną do badań tzw. enklawę przyrodniczą, w pasie o szerokości ok. 200-300 m. Enklawy takie znajdują się w obszarach chronionych lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie i stanowią najczęściej łąki lub murawy kserotermiczne. Oceniane były pod względem koegzystencji z innymi gruntami rolnymi lub nieużytkami, na podstawie analizy stanu i procesów przemian przy zastosowaniu autorskiej oceny punktowej, wybranych stymulant. Uśrednione oceny z wybranych gmin odnośnie stanu zagospodarowania rolniczej przestrzeni produkcyjnej w bezpośrednim sąsiedztwie obszarów chronionych wskazują, że widoczne jest rozprzestrzenianie się roślin zielnych z nieużytków na enklawy, wyraźna jest także ekspansja drzew i krzewów oraz wkraczanie gatunków roślin inwazyjnych, zwłaszcza z grupy roślin zielnych. Intensywność prowadzonych upraw, w otoczeniu wybranych do badań enklaw oceniono jako ekstensywne lub średnio-intensywne, zróżnicowanie gatunków uprawnych średnio wynosi ok. 7 gat., z dominacją zbóż i przy średniej wielkości poszczególnych pól wynoszącej ok. 0,5-2 ha.

Zadanie 01-17-08-11

Analiza efektywności produkcji w gospodarstwach utrzymujących zwierzęta gospodarskie

kierownik zadania: dr inż. Anna Borecka

Celem badawczym zadania było określenie wpływu prowadzonej działalności gospodarstw utrzymujących bydło, świnie oraz drób na poszczególne elementy posiadanego kapitału naturalnego, jak również ustalenie w sposób kompleksowy kierunku zmian w zakresie relacji gospodarstwo rolne – środowisko naturalne.

Cel realizowano poprzez oszacowanie:

- wydajności środowiskowej,
- środowiskowej intensywności produkcji,
- kosztów poprawy efektu środowiskowego,
- efektywności kosztów środowiskowych.

Etap zaplanowany na ten rok obejmował swoim zakresem:

- opracowanie założeń metodycznych w zakresie konstrukcji kwestionariuszy ankiety,
- przeprowadzenie badań pilotażowych w minimum 12 gospodarstwach celem sprawdzenia adekwatności doboru metody badawczej do analizowanego problemu na każdym etapie procesu badawczego,
- identyfikacja działań skierowanych na ochronę środowiska w obrębie gospodarstw rolnych.

W pierwszym półroczu badań został opracowany kwestionariusz ankiety dla poszczególnych działalności. Miał on za zadanie dostarczyć informacji m.in. z zakresu: obsady zwierząt gospodarskich w każdym z obiektów, powierzchni i struktury użytków rolnych, udziału zbóż w zasiewach, plonów roślin uprawnych, pokrycia gleby roślinnością w ciągu roku, skali produkcji, towarowości produkcji, przychodów uzyskiwanych przez gospodarstwa, bilansu substancji organicznej, zużycia energii elektrycznej i innych nośników energii w gospodarstwie rolnym, zużycia paliw, zużycia nawozów naturalnych i mineralnych oraz środków ochrony roślin, wartości pieniężnej wydatków na nawozy azotowe, fosforowe i wieloskładnikowe, zużycia wody w gospodarstwie, wysokości nakładów poniesionych na ochronę środowiska w poszczególnych obiektach oraz informacji szczegółowych o organizacji produkcji zwierzęcej.

Źródłem informacji były dane pozyskane z gospodarstw utrzymujących zwierzęta gospodarskie (bydło (17), świnie (15) oraz drób (10)) w różnych regionach kraju. Dotychczas analizą zostały objęte 42 gospodarstwa specjalistyczne, w których przychody ze sprzedaży świń, bydła lub drobiu stanowiły wysoki udział (ponad 60%) w przychodach z produkcji rolnej ogółem.

Podstawowe informacje o objętej badaniami próbie gospodarstw w podziale według specjalizacji zostały zamieszczone w tabeli 1.

Tabela 1. Podstawowe informacje o badanych gospodarstwach rolnych

Wyszczególnienie	Średnio razem	Gospodarstwa z bydłem	Gospodarstwa ze świniami	Gospodarstwa z drobiem
Liczba gospodarstw rolnych (szt.)	42	17	15	10
Wiek właściciela gospodarstwa (lata)	48,85	44,13	51,67	51,12
Okres prowadzenia gospodarstwa rolnego (lata)	23,00	28,60	16,50	24,80
FWU*	1,91	2,01	1,81	1,82
AWU**	1,98	2,02	1,87	1,95
Użytki rolne (ha)	21,95	27,37	25,18	8,11
Grunty orne (ha)	14,32	10,36	22,49	7,58
Trwałe użytki zielone (ha)	7,43	16,88	2,46	0,28
Ziemia własna w użytkowaniu (%)	92,86	100,00	100,00	70,00
Procentowy udział zbóż w zasiewach (%)	61,13	62,94	64,60	52,67
UR*** położone na wys. poniżej 300 m n.p.m.	40,48	52,94	53,33	10,00
UR położone na wys. 300-600 m n.p.m.	26,19	23,53	46,67	10,00
Ilość uprawianych roślin (ogółem szt.)	3,29	2,53	4,41	2,70
DJP na gospodarstwo	18,48	21,71	11,64	23,26
Zużycie nawozów azotowych (kg na 1 ha UR)	92,52	99,19	100,60	63,78

Źródło: badania własne

* FWU – Family Work Unit; ** AWU – Annual Work Unit; *** UR – użytki rolne

Poszczególni producenci rolni prowadzili swoje gospodarstwa od 8 do 32 lat. Blisko 48% gospodarstw miało wyznaczoną osobę, która w przyszłości bezpłatnie przejmie gospodarstwo. W gospodarstwach pracowali głównie członkowie rodziny. Roczne nakłady pracy ogółem w przeliczeniu na jednego pełnozatrudnionego były wyższe w gospodarstwach utrzymujących bydło mleczne (2,02 AWU). Dla porównania w gospodarstwach utrzymujących świnie wyniosły 1,87 AWU. W gospodarstwach utrzymujących powyżej 20 sztuk bydła oraz powierzchni użytków rolnych przekraczającej 25 ha zarówno nakłady pracy ogółem (AWU) oraz pracy własnej rolników i członków ich rodzin (FWU) były najwyższe.

W każdej grupie zaobserwowano duże zróżnicowanie obszarowe. Średnia powierzchnia użytków rolnych była większa niż średnia krajowa. Średnia wielkość powierzchni UR w gospodarstwie wyniosła 21,95 ha i była wynikiem blisko dwukrotnie wyższym w porównaniu ze średnią krajową (11,32 ha). Największe gospodarstwa występowały w grupie gospodarstw utrzymujących bydło (średnio – ponad 27 ha) natomiast mniejsze w utrzymującej drób (średnio – 8,11 ha). Wśród analizowanych gospodarstw ponad 33% stanowiły te, które położone były na obszarach z ograniczeniami naturalnymi lub innymi szczególnymi ograniczeniami.

Korzystny udział zbóż w zasiewach występował w gospodarstwach jednokierunkowych z drobiem (ok. 53%), natomiast w gospodarstwach z bydłem i świniami zboża były grupą roślin dominującą w zasiewach.

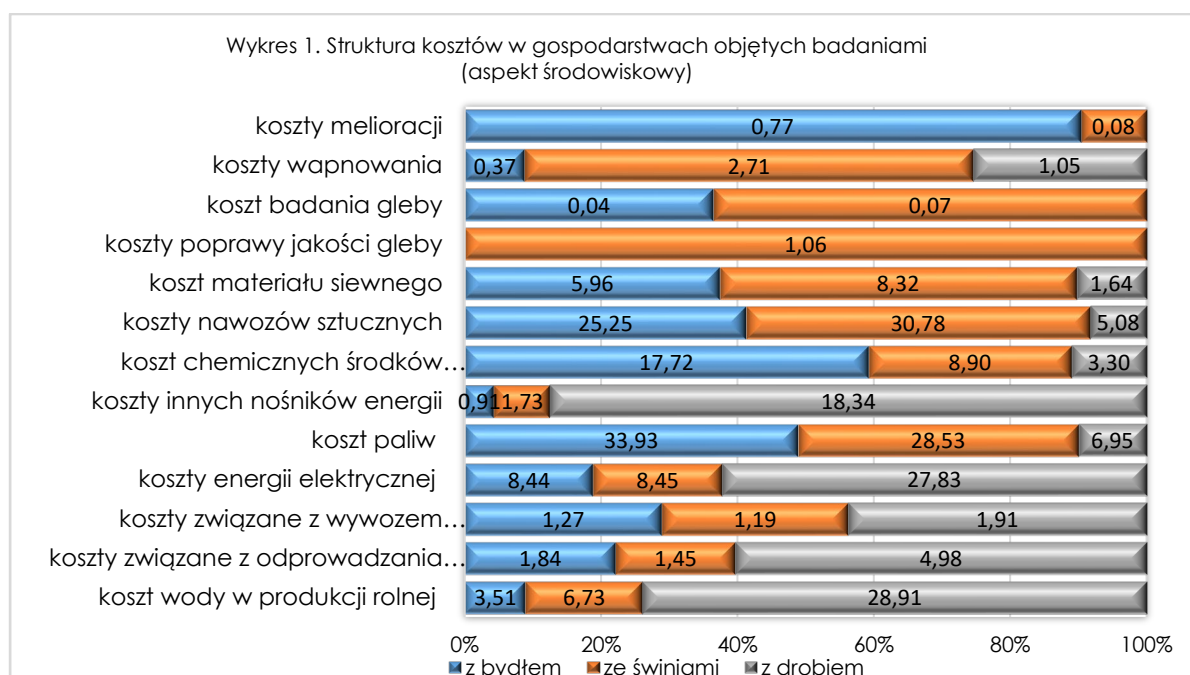
Obsada zwierząt w przeliczeniu na powierzchnię użytków rolnych dostarcza informacji o poziomie intensywności produkcji oraz obciążenia środowiska nawozami naturalnymi. Przeciętna liczba utrzymywanego bydła przypadająca średnio na jedno gospodarstwo wyniosła 26,37 sztuk, w tym 17 sztuk krów, co przełożyło się na 21,71 DJP w gospodarstwie.

W gospodarstwach utrzymujących świnie analiza organizacji produkcji zwierzęcej wykazała, że DJP wyniosła średnio 11,64. W przypadku drobiu obsada w 10 badanych gospodarstwach, wynosiła 23,26 DJP i wahała się od 8,8 do 54 DJP na obiekt.

Oszacowane zużycie nawozów azotowych w gospodarstwach wyniosło średnio 92,52 kg/1 ha UR z rozproszeniem od blisko 64 kg (obiekty z drobiem) do 100,60 kg (obiekty ze świniami).

Z uwagi na powyższe koszty nawożenia miały najwyższy udział w strukturze kosztów „środowiskowych” ponoszonych w gospodarstwach specjalizujących się w produkcji zwierzęcej. W obiektach wyspecjalizowanych w produkcji żywca wieprzowego stanowiły one blisko 31% kosztów środowiskowych ogółem wynosząc średnio na obiekt 28 042,27 zł.

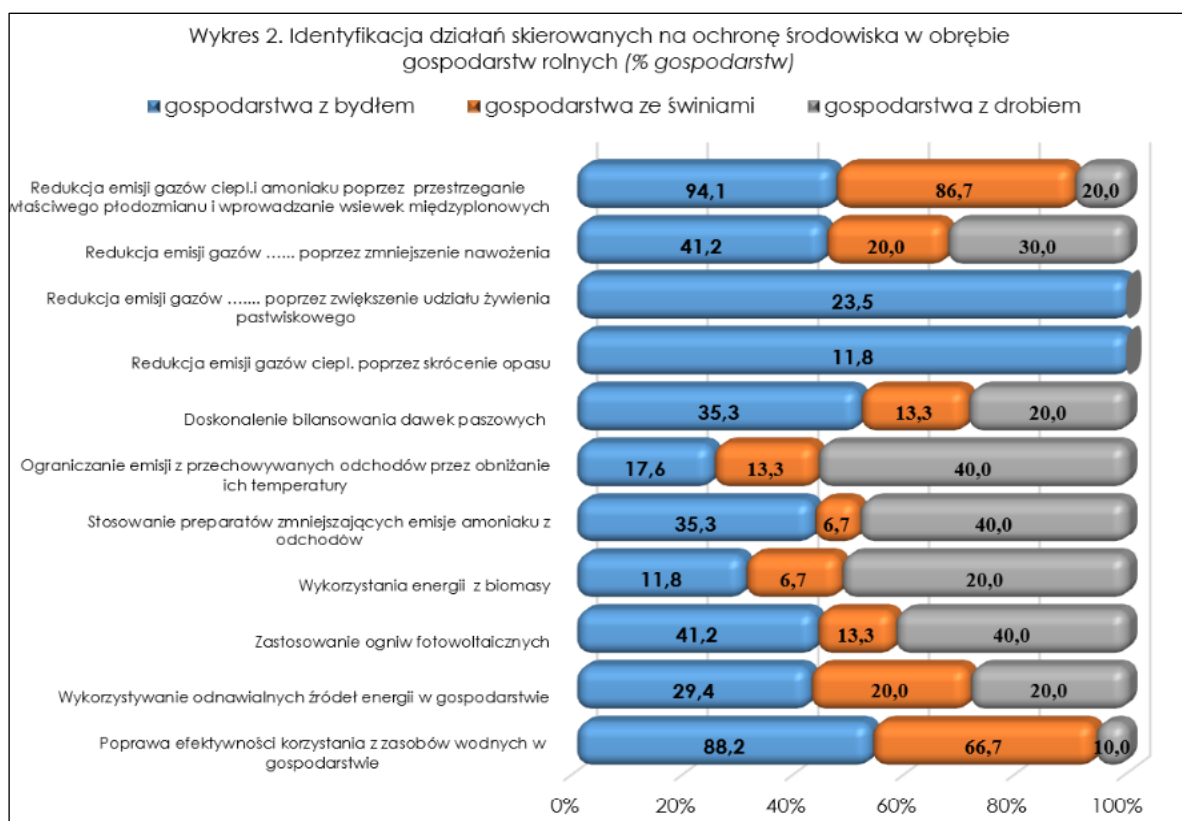
W gospodarstwach z bydłem stanowiły odpowiednio 25,25% i 20 247,06 zł. W przypadku produkcji drobiarskiej najwyższe koszty ponoszono na wodę do produkcji rolnej (zużycie odnotowane zostało średnio na poziomie 35 641,0 m³) oraz koszty związane z energią elektryczną i innymi nośnikami energii (wykres 1.).



Źródło: badania własne

Działalność rolnicza wywiera znaczący wpływ na środowisko. Niewłaściwe stosowanie przemysłowych środków produkcji nawozów sztucznych i środków ochrony roślin, może niekorzystnie wpływać na wiele ekosystemów. Rolnictwo bezpośrednio użytkuje zasoby przyrody w procesach produkcji. Z drugiej strony producenci rolni funkcjonujący w gospodarce rynkowej muszą produkować zgodnie z potrzebami społecznymi i jednocześnie maksymalizować swoje cele poprzez efekty produkcyjne oraz ekonomiczne w warunkach konkurencji.

W badanych gospodarstwach średnio najwięcej działań skierowanych na ochronę środowiska dotyczyło poprawy efektywności korzystania z zasobów wodnych w gospodarstwie. Były to działania m.in. takie, jak pokrycie powierzchni gruntów ornych roślinnością w okresie zimy, udział mieszanek z roślinami bobowatymi w strukturze zasiewów poprawiających bilans próchnicy w glebie oraz wprowadzanie wodooszczędnych systemów nawadniających eliminujących nieefektywne zużycie wody. Ponadto, działaniami skierowanymi na ochronę środowiska w obrębie gospodarstw rolnych w analizowanych obiektach było zwiększenie wykorzystywania odnawialnych źródeł energii w gospodarstwie, zastosowanie ogniw fotowoltaicznych oraz wykorzystanie energii z biomasy (wykres 2.).



Źródło: badania własne

Rolnictwo jest głównym źródłem emisji amoniaku do atmosfery, a większość emisji amoniaku w Polsce pochodzi z produkcji zwierzęcej. Największa część emisji amoniaku związana jest z odchodami zwierząt – 78%, a pozostałe 22% emisji związane jest ze stosowaniem mineralnych nawozów azotowych. Dlatego też istotne są wszystkie działania podejmowane przez kierujących gospodarstwami rolnymi, które przyczyniają się do obniżenia emisji amoniaku oraz gazów cieplarnianych.

W gospodarstwach z bydłem objętych badaniami działaniem podejmowanym przez ponad 35% właścicieli gospodarstw była redukcja emisji gazów cieplarnianych poprzez doskonalenie bilansowania dawek paszowych (udział roślin strączkowych i bobowatych w dawce pokarmowej, suplementacja dawek pokarmowych probiotykami oraz ekstraktami roślinnymi).

Ponadto w 23,5% gospodarstw zwiększano udział pastwiskowego żywienia krów, a w blisko 12% skracano długość opasu bydła. W 35,3 % gospodarstw zakwaszano gnojowicę celem obniżenia jej pH i ograniczenia emisji. W przypadku gospodarstw drobiarskich gdzie obsada zwierzęca była najwyższa w przeliczeniu na obiekt oraz 1 ha UR stosowano preparaty zmniejszające emisję amoniaku z odchodów (4 obiekty) oraz obniżano temperaturę przechowywanych odchodów zwierząt (40% gospodarstw).

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt
kierownik: prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik

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 proponowanych badań jest poszukiwanie genetycznego podłoża procesów związanych z odkładaniem tkanki tłuszczowej na modelu świni domowej. Dla hodowli trzody chlewnej badania te stanowią ważny element, ponieważ prowadzona długoletnia selekcja w kierunku poprawy mięsności i cech wzrostowych przyczyniła się do istotnego obniżenia tkanki tłuszczowej podskórnej i śródmięśniowej (IMF). IMF odgrywa ważną rolę w ocenie sensorycznej mięsa (kruchości, soczystości) oraz przydatności wieprzowiny do przetwórstwa technologicznego. Wielka biała polska i polska biała zwistoucha, dwie główne rasy wykorzystywane jako komponent matczynej w polskiej hodowli posiadają IMF na poziomie ok 1%, czyli około dwa razy mniej niż od pożądanych wartości. Podejmowane są więc różne próby, aby poprawić ten stan i podnieść poziom tkanki tłuszczowej w tuszach wieprzowych, w tym poszukiwanie procesów molekularnych czy biomarkerów związanych z tworzeniem się tkanki tłuszczowej i jej odkładaniem. Z innej strony, świnię są dobrym modelem do badań nad otyłością, która jest aktualnie zaliczana do chorób cywilizacyjnych, a jej występowanie sprzyja chorobom układu krążeniowego, cukrzycy czy chorobom nowotworowym. Proponowane badania umożliwią dostarczenie nowych informacji pomocnych przy opracowaniu skutecznych narzędzi w walce z otyłością u ludzi. 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 nieznanne mechanizmy regulacji ekspresji genów. Dopełnieniem analizy ATAC-seq będzie ocena transkryptomowa (RNA-seq) tkanki wątrobowej i tłuszczowej. Umożliwi to trafne wskazanie procesów metabolicznych wysoce istotnie powiązanych z regulacją odkładania tkanki tłuszczowej.

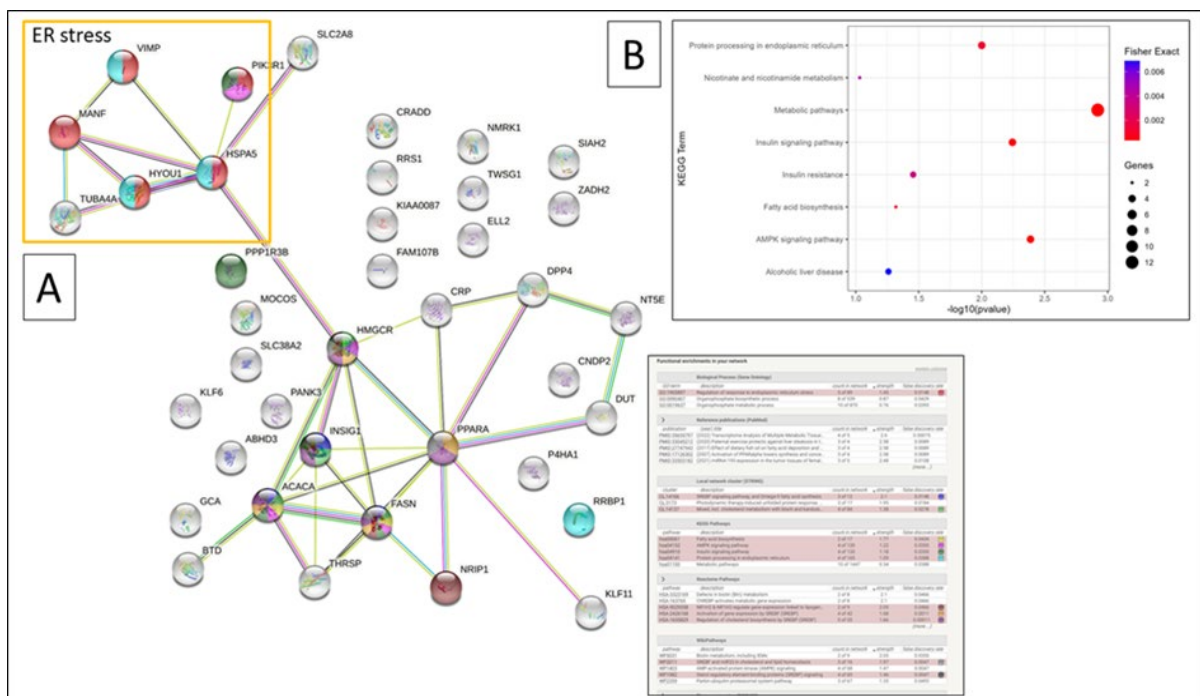
Dla próbek wątroby pozyskanej od 16 loszek rasy złotnicka biała, charakteryzujących się niskim oraz wysokim poziomem odtuszczenia zostały przygotowane biblioteki dla fragmentów aktywnej transkrypcyjnie chromatyny (ATAC-seq). Biblioteki zostały przygotowane na podstawie wcześniej mrożonych komórek wątroby, dlatego też po rozmrożeniu została oceniona żywotność komórek z wykorzystaniem Cellcouter i specjalnego barwienia 0,4% trypanem blue. Biblioteki zostały poddane ocenie jakości tzn., namnożone zostały amplikony dla promotora genu GAPDH oraz dla tzw. pustynnego DNA czyli region niekodujący. Biblioteki, które przeszły testy jakości zostały wysłane do sekwencjonowania w technologii NGS 150PE. Po sekwencjonowaniu, wyniki pochodzące z obu frakcji zostały połączone i przeprowadzono dla nich dalszą analizę identyfikacji sygnałów w regionach związanych z wiązaniem czynników transkrypcyjnych z wykorzystaniem narzędzia Genrich. Uzyskane sygnały zostały przypisane do genomu świni z wykorzystaniem narzędzia VEP (Ensemble), uwzględniając regiony 5'UTR, 3'UTR, intron, sekwencja kodująca, regiony powyżej (do 300 bp) i poniżej genu (do 300 bp). Ponadto mapowanie uwzględniało wszystkie izoformy i regiony startu transkrypcji tzw. TSS (transcription start site). Analizę funkcjonalną przeprowadzono z wykorzystaniem narzędzia David, a dla interakcji białko-białko (PPI) narzędzia STRING. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu metody ANOVA (SAS).

Analiza sygnałów ATAC dla regionu TSS i promotora <1, <2kb i <3kb

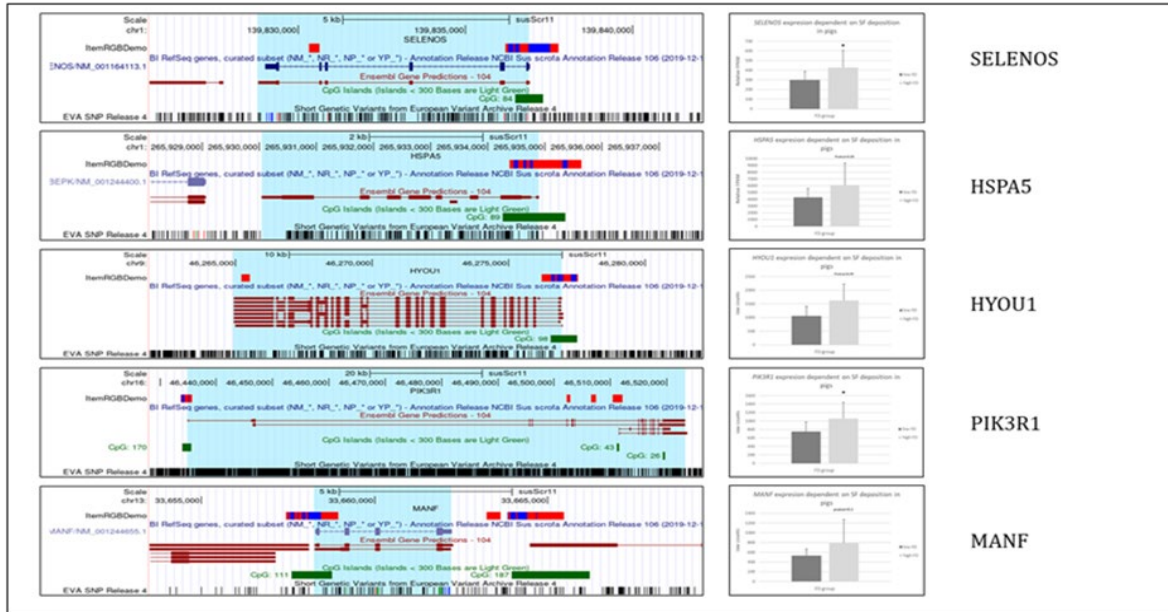
Zidentyfikowano średnio 5425 pików (odpowiadających 12680 genom) i 2194 (odpowiadających 8840 genom) nakładających się odpowiednio na region TSS oraz promotora <1 kb. Blisko 70% tych sygnałów pochodziło z frakcji A (wstawki do 150 pz). Po wygenerowaniu sygnałów w oparciu o narzędzie Genrich i przypisaniu ich do regionów genomu świni, z analizy pominięto jeszcze dwie próbki (WPT n=6 i NPT n=6), ponieważ miały one małą liczbę sygnałów nakładających się na regiony TSS, co mogło oznaczać wysoki procent tła w próbce jako konsekwencja różnic w żywotności hepatocytów wejściowych podczas przygotowywania biblioteki ATAC. Analiza transkryptomyczna dostarczyła interesujących wyników; dlatego w niniejszym badaniu skupiliśmy się na sygnałach ATAC związanych z genami wykazującymi istotne różnice w poziomie transkryptu pomiędzy badanymi grupami o niskim oraz wysokim stopniu otyłości (DEG). Analiza, w tym wszystkie sygnały ATAC związane z regionami promotora TSS i <1 kb, pokrywała się z 272 DEG. Niemniej jednak wspólnych sygnałów ATAC, które były obecne we wszystkich próbkach (w grupie WPT lub NPT), było znacznie mniej. Naszym zdaniem wskazanie wspólnych sygnałów ATAC zawęziło obszar poszukiwań do najważniejszych regulacji ekspresji genów. Z drugiej strony, niektóre sygnały ATAC były zlokalizowane w regionach zachodzących na regiony TSS i promotora <1 kb jednocześnie, więc zostały one włączone do tego samego testu.

890 i 2028 wspólnych sygnałów ATAC odpowiadających regionom promotorowym TSS i <1 kb zidentyfikowano odpowiednio w grupach WPT i NPT. Nakładające się DEG i wspólne sygnały ATAC wyłoniły 45 genów. Analiza funkcjonalna z wykorzystaniem narzędzia Davida GO wykazała, że geny te wzbogaciły procesy związane z destynacją komórek tłuszczowych, stresem oksydacyjnym zachodzącym w siateczce śródplazmatycznej (ER) (rycina 1.) oraz wpływem cholesterolu. Analiza klastrowania wskazała 5 klastrów, m.in. związanych z ER i biosyntezą lipidów.

Rycina 1. Funkcjonalne sieci asocjacji białek dla 45 ATAC-DEG. A) Analiza PPI przedstawiona przez STRING: FD – odkładanie tłuszczu, DEG – geny o różnicowanej ekspresji. B) wykres wygenerowany przez pakiet R ggplot2. Na podstawie analizy DAVID GO przedstawiającej udział poszczególnych genów w znaczącym GO



Rycina 2. Wizualizacja sygnałów ATAC TSS przy użyciu przeglądarki UCSC Genome Browser na świni, luty 2017 roku (Sscrofa11.1/susScr11) i ekspresja genów przedstawiona na podstawie surowych odczytów wygenerowanych przez sekwencję RNA związaną z genami stresu ER. Kolory czerwony i niebieski pokazują sygnały ATAC TSS odpowiednio dla grup świń o wysokim i niskim FD. Dodano informacje referencyjne dotyczące genów Ensemble i NCBI. W jasnoniebieskiej ramce zaznaczone są interesujące geny. Wyspy CpG są zaznaczone na zielono zgodnie z wewnętrzną bazą danych przeglądarki genomu UCSC.



Analiza PPI (STRING) potwierdziła tę obserwację. Analiza RNA-seq dla wątroby świńskiej wskazała, że poziom wszystkich genów zaangażowanych w stres ER dla których zidentyfikowano sygnały ATAC w regionach TSS czy <1 kb TSS ulegały podwyższonej ekspresji w wątrobie, wraz ze zwiększonym poziomem podskórnej tkanki tłuszczowej (rycina 2). Co więcej, wizualizacja (uzyskana z wykorzystaniem przeglądarki UCSC Genome Browser w połączeniu z informacjami o wyspach CpG) pokazuje, że każdy sygnał TSS ATAC był silnie skorelowany z występowaniem wysp CpG. Dla regionu promotorowego <2kb, <3kb oraz zlokalizowanego poniżej TSS zidentyfikowano średnio 1013 sygnałów ATAC (odpowiadających 4720 genom) i 850 (odpowiadających 4388 genom), które nakładały się odpowiednio na regiony promotorowe <2kb i <3kb. 54 i 118 wspólnych sygnałów ATAC-DEG pasujących do regionów promotora <2 kb zidentyfikowano odpowiednio w grupach WPT i NPT. Wspólnych sygnałów (zidentyfikowanych dla wszystkich próbek) ATAC-DEG dla promotora <2 kb zidentyfikowano tylko 4 DEG (*CRADD*, *TBC1D10C*, *SMTN* i lncRNA *ENSSSCG00000034990*).

Z kolei test obejmujący region promotora <3 kb zidentyfikowano 47 i 103 wspólnych sygnałów ATAC odpowiadających regionom promotora <3 kb odpowiednio w grupach WPT i NPT. Jednak żaden z sygnałów ATAC nie dotyczył DEGs. Podobne testy przeprowadzono dla regionów położonych poniżej TSS do -1kb, -2kb i -3kb, zidentyfikowano tam sygnały ATAC odpowiadające a. *TUBA4A* i *DUT*; b. *NR1P1*, *TBC1D10C*, *INSIG1*, *ST3GAL1*, *FBLN2*, *NUDT13* i c. *ULK1*, odpowiednio.

Identyfikacja czynników transkrypcyjnych wśród wskazanych 45 genów ATAC-DEG i ich elementów regulatorowych na podstawie dostępnych baz danych

Do analizy TRRUST włączono DEG, dla których znaleziono sygnały ATAC nakładające się na TSS lub zlokalizowane w regionie promotorowym <1kb. To narzędzie informatyczne wykazało dla 45 ATAC-DEG, że najbardziej prawdopodobnymi czynnikami regulującymi ekspresję dla tych

genów są *HIF1A*, *HNF1A*, *NR1I2* i *SREBF1*, które regulują ekspresję *PPARA*, *THRSP*, *FASN* itp. (tabela 1). Analiza transkryptomyczna wykazała, że wszystkie TF ulegają ekspresji w tkance wątroby. Ponadto TRRUST wskazał, że *PPARA*, *NR1P1*, *KLF6* i *KLF11* należą do rodziny TF.

Tabela 1. Kluczowe czynniki transkrypcyjne wzbogacone dla genów, dla których sygnały ATAC nakładały się na TSS lub znajdowały się w regionach promotora <1kb

	Czynnik transkrypcyjny	Opis	Geny regulowane	P value	FDR
1.	HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	EGLN3, PPARA, NT5E	0.000892	0.00343
2.	HNF1A	HNF1 homeobox A	CRP, NT5E	0.00159	0.00343
3.	NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2	KLF6, THRSP	0.00159	0.00343
4.	SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	FASN, THRSP	0.00172	0.00343
5.	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	CRP, PPARA, KLF11	0.00413	0.00661
6.	E2F1	E2F transcription factor 1	HSPA5, NR1P1	0.0374	0.0499
7.	RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	CRP, PPARA	0.15	0.171
8.	SP1	Sp1 transcription factor	P4HA1, NT5E	0.292	0.292

Identyfikacja czynników transkrypcyjnych dla genów związanych ze stresem retikulum endoplazmatycznym (ER) zidentyfikowanych na podstawie analizy ATAC-RNA-seq

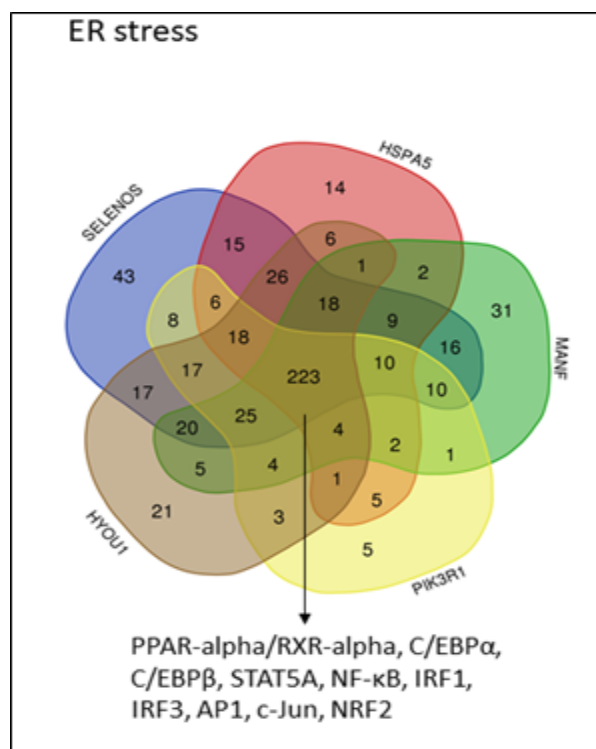
W analizie PROMO v3 uwzględniliśmy DEG, dla których znaleziono sygnały ATAC nakładające się na TSS lub zlokalizowane w regionie promotora <1 kb. Następnie zidentyfikowaliśmy wspólne TF sygnałów ATAC nakładających się na TSS dla DEG, które wzbogaciły ścieżkę stresu ER (tabela 2., rycina 3.). Na rycinie 3. strzałki wskazują TF dla genów związanych z ER, które są kluczowe dla regulacji ekspresji genów w wątrobie związanych z metabolizmem tłuszczów (Steensels i in., 2020). W tabeli 2. wymieniono TF dla genów związanych z ER, które odgrywają istotną rolę w wątrobie podczas odkładania się tłuszczu i adipogenezy, oraz ich udział w określonych procesach lub szlakach molekularnych (Steensels i in., 2020).

Tabela 2. Wspólne TF, dla których znaleziono miejsca wiązania w sygnałach TSS ATAC związanych z DEG związanymi ze stresem ER

Nazwa genu	Ilość motywów dla TF	TF związane z otyłością wątroby	Procesy regulowane
<i>HSPA5</i> , <i>HYOU1</i> , <i>MANF</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>SELENOS</i>	23	PPAR-alpha/RXR-alpha C/EBP-alpha C/EBP-beta STAT5A NF-kB IRF1 IRF3 AP1 Nrf2	Metabolizm lipidów, stany zapalne, zwłóknienie Metabolizm lipidów Metabolizm lipidów Metabolizm lipidów Procesy zapalne Procesy zapalne Procesy zapalne, zwłóknienie Procesy zapalne
<i>HSPA5</i> , <i>HYOU1</i> ,	18	FOXO3a	Homeostaza glukozy

PIK3R1, SELENOS			
HSPA5 PIK3R1 SELENOS	6	XBP1	Stres metaboliczny
HYOU1 MANF	5	FXR	Metabolizm lipidów

Rycina 3. Wspólne TF sygnałów ATAC nakładających się na TSS dla DEG związanych ze stresem ER. Poniżej wskazano TF, które są kluczowe w regulacji ekspresji genów w wątrobie związanych ze tłuszczowymi chorobami wątroby



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 była 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. Badania ze względu na tematykę, podzielono na dwie części.

W pierwszej części badań skupiono się na ocenie wpływu poziomu żywienia preparatem mlekozastępczym, we wczesnym okresie życia cieląt, na procesy biologiczne związane z rozwojem gruczołu mlekowego poprzez zmiany epigenomiczne i transkryptomiczne. Wcześniejsze badania, przeprowadzone na grupie cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych, dowiodły, że żywienie modeluje przebieg zmian anatomicznych gruczołu mlekowego. Dlatego też, w proponowanych badaniach przyjęto następującą hipotezę: „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”.

W drugiej części badań przyjęto nową hipotezę badawczą, a mianowicie: „Suplementacja witaminą D oddziałuje na modyfikacje epigenetyczne i zmiany w poziomie ekspresji genów, prowadząc do poprawy statusu zdrowotnego zwierząt.” Badania dowodzą, że witamina D wykazuje działanie immunomodulacyjne, a niskie stężenie kalcydiolu (25(OH)D) w osoczu łączone jest z patologią wielu chorób. Jednym z potencjalnych celów działania witaminy D jest układ oddechowy. Mimo tego, do tej pory nie przeprowadzono kompleksowych badań określających wpływ tej witaminy na tkankę płuc. Z punktu widzenia hodowców trzody chlewnej zagadnienie to może okazać się ważne, ponieważ infekcje układu oddechowego świń powodują nie tylko spadek dobrostanu zwierząt, ale również straty ekonomiczne. Dlatego celem tego badania jest sprawdzenie jak zmiany w standardowej suplementacji witaminy D wpływają na profile mRNA, miRNA oraz poziom metylacji w zdrowej tkance płucnej świń.

W ramach zagadnienia zostały wykorzystane najnowsze metody analiz epigenetycznych i transkryptomicznych, uwzględniające technikę sekwencjonowania następnej generacji NGS (RNA-seq, RRBS oraz microRNA-seq).

W pierwszej części badań wykorzystano materiał doświadczalny, który stanowiły tkanki pobrane od 16 zwierząt – cieliczki rasy polska holsztyńsko-fryzyjska w okresie wychowu pierwszych dwóch miesięcy życia. Zwierzęta podzielono na trzy grupy żywieniowe: I grupa kontrolna (n=4) – żywienie standardowe, oszacowane na podstawie „Zapotrzebowania Żywnościowego Bydła Mlecznego” (NZP, 2001); grupa R (n=6) – ograniczenie dziennej dawki preparatu mleko zastępczego (MR); grupa AL (n=6) – podawanie MR *ad libitum* 3xdziennie przez 30 min. Analizie molekularnej poddano trzy tkanki: parenchymę (PAR), wyściółkę tłuszczową (MFP) oraz wątrobę (W).

W drugiej części badań dawkowanie witaminy D przebiegało następująco: 1 grupa (grupa kontrolna) – 2000 IU cholekalcyferolu (grower) i 1500 IU cholekalcyferolu; 2 grupa – 3000 IU cholekalcyferolu (grower) i 2500 IU cholekalcyferolu; 3 grupa – 2000 IU cholekalcyferolu+1000 IU kalcydiolu (grower) i 1500 IU cholekalcyferolu+1000 IU kalcydiolu; 4 grupa – 2000 IU kalcydiolu (grower) i 1500 IU kalcydiolu/kg paszy. Do badań molekularnych pobrano od świń próbki mięśni, tkanki tłuszczowej, wątroby, płuc i nerki. Ostatecznie analizy molekularne przeprowadzono na próbkach mięśnia i płuc.

Na początkowym etapie badań przystąpiono do analizy danych NGS uzyskanych dla próbek pozyskanych od cieląt mlecznych. Sekwencjonowanie bibliotek RRBS wygenerowało średnio 28,7 miliona odczytów sekwencyjnych na próbkę. Procent odczytów zmapowanych do genomu referencyjnego wahał się od 93,3% do 96,1% na próbkę, z czego od 45,3 do 59,0% stanowiły sekwencje unikalnie zmapowane do genomu referencyjnego. Do wykrycia globalnych zmian ekspresji genów w analizowanych tkankach zastosowano technikę RNA-Seq. W przypadku tej metody z sekwencjonowania NGS uzyskano średnio 50 milionów odczytów na próbkę, a ponad 41% z nich unikalnie zmapowano do genomu referencyjnego. Z kolei w przypadku bibliotek miRNA uzyskano w sumie ponad 456 milionów odczytów, co dało średnio ponad 9,5 miliona sekwencji na próbkę.

A. Ocena wpływu poziomu żywienia na miRNAom, metylom i transkryptom tkanki parenchymy gruczołu mlekowego

W sumie zidentyfikowano 186, 182 oraz 4 mikroRNA o różnicowej ekspresji (DE miR) (FDR<0,1) odpowiednio pomiędzy grupami R vs I, AL vs I i R vs AL. Wśród nich 98 (52%) oraz 89 (49%) stanowiły mikroRNA o obniżonej ekspresji w grupach żywieniowych R i AL w stosunku do kontroli. Natomiast w grupie R w porównaniu do grupy AL, wszystkie 4 zidentyfikowane DE miRNA wykazały obniżoną ekspresję (100%). Na podstawie analizy danych metylacyjnych uzyskanych

z NGS, zidentyfikowano 3048, 2562 i 268 różnicowo metylowanych miejsc (DMS) ($q < 0,05$) w kontekście CpG pomiędzy odpowiednio, grupą I vs R, I vs AL oraz R vs AL. Hipometylowane DMS stanowiły 84,12% i 86,81% wszystkich DMS w przypadku porównań I vs R i I vs U oraz 51,12% dla porównania grupy R vs AL. Adnotacja DMS według cech genów ujawniła, że większość DMS była zlokalizowana w regionach międzygenowych, następnie w intronach genów i sekwencjach kodujących geny. Co więcej, zidentyfikowano 8817, 7732 i 52 genów o różnicowej ekspresji (DEG) ($FDR < 0,1$) odpowiednio pomiędzy grupami I vs AL, I vs R i R vs AL, w tym 4498 (51,0%) i 4121 (53,3%) stanowiły geny o obniżonej ekspresji obecne w grupach żywieniowych AL i R w stosunku do kontroli i 22 (42,3%) DEG zidentyfikowane w grupie AL w stosunku do próbek grupy R. W badaniach zidentyfikowano także geny potencjalnie deregulowane przez aberrantną metylację w zależności od zastosowanej diety, a więc wykazujące istotne zmiany w metylacji promotora lub ciała genu połączone z istotnymi zmianami poziomu ekspresji. Dla DMS zlokalizowanych w promotorach zidentyfikowano 30 genów wykazujących prawidłową negatywną zależność metylacji i ekspresji. Większość z tych genów ($n=22$), obejmowała DMS hipometylowane i charakteryzowała się podwyższoną ekspresją ($FDR < 0,1$). W przypadku DMS zlokalizowanych w ciałach genów, 409 genów wykazało istotne zmiany w poziomie metylacji i ekspresji. Dla porównania R vs AL nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów wykazujących zróżnicowaną metylację DNA.

B. Ocena wpływu poziomu żywienia na miRNAom, metylom i transkryptom wyściółki tłuszczowej gruczołu mlekowego

W efekcie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 15, 44 oraz 31 DE miR ($FDR < 0,1$) odpowiednio pomiędzy grupami R vs I, AL vs I i R vs AL. Wśród nich 4 (26%) oraz 15 (34%) stanowiły mikroRNA o obniżonej ekspresji w grupach żywieniowych R i AL w stosunku do kontroli. Natomiast w grupie R w porównaniu do grupy AL, 18 zidentyfikowanych DE miRNA wykazało obniżoną ekspresję (58%). W przypadku wyściółki tłuszczowej zidentyfikowano także niższą liczbę DMS w porównaniu do analizowanych wcześniej prób parenchymy. W sumie wykryto 506, 614 i 288 różnicowo metylowanych miejsc ($q < 0,05$) odpowiednio dla porównania grup I vs R, I vs AL oraz R vs AL. Procent hipometylowanych DMS był porównywalny między analizowanymi grupami i był nieznacznie większy niż liczba zidentyfikowanych hipermetylowanych CpG. Z kolei, analiza wyników sekwencjonowania bibliotek cDNA umożliwiła identyfikację 3576, 2997 i 628 DEG ($FDR < 0,1$) odpowiednio pomiędzy grupami I vs AL, R vs AL i I vs R. Procent genów o podwyższonej ekspresji w obrębie badanych grup był porównywalny i wyniósł od 55,6% do 66,7% wszystkich DEG.

W przypadku wyściółki tłuszczowej zidentyfikowano również geny potencjalnie deregulowane przez zmiany poziomu metylacji CpG w zależności od zastosowanej diety. Dla DMS zlokalizowanych w promotorach nie zidentyfikowano genów wykazujących istotne zmiany w metylacji promotora połączone z istotnymi zmianami poziomu ekspresji. W przypadku DMS zlokalizowanych w ciałach genów, 25 genów wykazało istotne zmiany w poziomie metylacji i ekspresji. Większość z tych genów ($n=15$), obejmowała DMS hipermetylowane i charakteryzowała się podwyższoną ekspresją.

C. Ocena wpływu poziomu żywienia na miRNAom, metylom i transkryptom tkanki wątroby

W przypadku tkanki wątroby przeprowadzone analizy ujawniły 49, 30 oraz 5 DE miR ($FDR < 0,1$) odpowiednio pomiędzy grupami R vs I, AL vs I i R vs AL. Zidentyfikowano również znacznie mniejszą liczbę DMS niż w przypadku tkanki parenchymy i wyściółki tłuszczowej. Łącznie wytypowano 608, 732 i 321 DMS ($q < 0,05$) (odpowiednio dla porównań grup I vs R, I vs AL oraz R vs AL).

Odsetek hiper- i hipometylowanych DMS był zbliżony do siebie w obrębie wszystkich analizowanych grup żywieniowych. Przeprowadzona analiza adnotacji zidentyfikowanych różnicowo metylowanych miejsc CpG według cech genów ujawniła, że podobnie jak w przypadku wcześniejszych analiz, większość DMS zlokalizowana była w regionach międzygenowych. Analiza wyników sekwencjonowania bibliotek cDNA umożliwiła identyfikację 382, 776 i 559 DEG (FDR<0,1) odpowiednio pomiędzy grupami I vs AL, I vs R i R vs AL, w tym 72,0% i 61,0% stanowiły geny o podwyższonej ekspresji obecne w grupach żywieniowych AL i R w stosunku do kontroli i 32,0% w grupie AL w stosunku do próbek grupy R. Przeprowadzona analiza integracji danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek RRBS i cDNA umożliwiła identyfikację tylko pięciu genów potencjalnie deregulowane przez aberrantną metylację w zależności od zastosowanej diety. W przypadku DMS zlokalizowanych w sekwencjach promotorowych nie zidentyfikowano genów wykazujących prawidłową negatywną zależność metylacji i ekspresji (FDR<0,1). Trzy wytypowane geny (*ARNTL*, *RAB43* i *ADAMTS14*) charakteryzowały się obecnością hipometylowanych DMS w ciałach genów i obniżonym poziomem ekspresji, natomiast w przypadku dwóch pozostałych genów (*FAM83D* i *KIAA1549*) stwierdzono obecność hipermetylowanych DMS która korelowała z podwyższoną ekspresją.

Z wykorzystaniem programu ShinyGO, w oparciu o geny docelowe dla zidentyfikowanych miRNA o różnicowej ekspresji, DEG, oraz genów zawierających DMS w ciele genu i/lub regionach promotora, przeprowadzono analizę funkcjonalną wyników uzyskanych dla wszystkich tkanek. Podobną analizę przeprowadzono również w celu zbadania potencjalnej biologicznej roli genów, których ekspresja prawdopodobnie jest kontrolowana przez metylację DNA. Wykazały one zmiany w regulacji licznych szlaków biologicznych, zarówno wg klasyfikacji bazy KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) jak i bazy GO (Gene Ontology) (FDR<0,05).

W drugiej części badań oceniono wpływ suplementacji różnymi formami i dawkami witaminy D na metylom, transkryptom oraz ekspresję miRNA tkanki płuc oraz transkryptom tkanki mięśniowej świń.

Ocena wpływu suplementacji różnymi formami i dawkami witaminy D na miRNA tkanki płuc

Do sekwencjonowania miRNA tkanki płuc wykorzystano 39 prób. Grupy I i IV zawierały po 12 prób, z kolei grupa II i III kolejno 7 i 8 prób. Średnia liczba zmapowanych odczytów wyniosła 345 116 na próbkę. Zastosowanie zwiększonej dawki cholekalcyferolu w porównaniu do dawki standardowej (I vs II) spowodowało istotną zmianę ekspresji ($q=0,004$) wyłącznie miR-215-5p. Suplementacja zwiększoną dawką kombinacji cholekalcyferol+kalcydiol (I vs III) spowodowała zmianę ekspresji 13 miRNA. 7 z tych miRNA uległo podwyższonej ekspresji a 6 obniżonej ekspresji. Z kolei zastąpienie standardowej dawki cholekalcyferolu tą samą dawką kalcydiolu (I vs IV) nie wykazało wpływu na profil miRNA. Co więcej, porównanie efektu zwiększonej dawki kombinacji cholekalcyferol+kalcydiol do efektu zwiększonej dawki cholekalcyferolu (II vs III) wykazała zmianę ekspresji 12 miRNA. Porównanie działania standardowej dawki kalcydiolu ze zwiększoną dawką kombinacji cholekalcyferolu+kalcydiolu (IV vs III) wykazało zmianę ekspresji 17 miRNA. Jednocześnie wykazaliśmy, że całkowita zamiana standardowego cholekalcyferolu na kalcydiol nie powoduje istotnych zmian w profilu miRNA. Wyniki analizy funkcjonalnej sugerują, że kombinacja cholekalcyferol+kalcydiol może wpływać na procesy nowotworzenia m.in. poprzez modulację szlaku TGF- β oraz szlaków związanych z metabolizmem i syntezą glikanów.

Ocena wpływu podwyższonej dawkami cholekalcyferolu na metylom i transkryptom tkanki płuc

Do przygotowania bibliotek RRBS wykorzystano 16 prób, 8 prób z grupy I, suplementowanej standardową dawką, oraz 8 z grupy II przyjmującej podwyższoną dawkę cholekalcyferolu. Średnia liczba surowych odczytów na próbkę wyniosła 30,2 mln. Średnia liczba wszystkich odczytów po filtrowaniu wyniosła 29,7 mln, 64,16% stanowiły unikalnie zmapowane odczyty. Do sekwencjonowania mRNA tkanki płuc wykorzystano dziesięć prób. Średnia liczba odczytów wyniosła 11,33 mln. Średnia liczba wszystkich odczytów po filtrowaniu wyniosła 11,32 mln, z czego 10,06 mln (88,35%) stanowiły unikalnie zmapowane odczyty. Łącznie zidentyfikowano 2349 DMS. Spośród wszystkich DMS, 955 (40,66%) uległo hipometylacji, a pozostałe 1394 (59,34%) były hipermetylowane. 1116 (47,51%) zidentyfikowanych DMS było związanych z genami i ich miejscami regulatorowymi. Spośród nich 628 (56,27%) uległo hipermetylacji, a 487 (43,73%) hipometylacji. Większość z zidentyfikowanych DMS znajdowała się w intronach 47,17% i regionach między genowych 34,40%. Natomiast DMS w kodujących częściach genu stanowiły 5,24% ($n=123$). Porównanie profili transkryptomicznych zwierząt otrzymujących standardową i zwiększoną dawkę cholekalcyferolu wykazało, że istotnej statystycznie zmianie ekspresji ($q < 0,05$) uległo 195 genów. Ekspresja 168 (86,15%) genów uległa obniżeniu, a 27 genów (13,85%) wykazywało zwiększoną ekspresję u zwierząt otrzymujących podwyższoną dawkę witaminy D3. Porównanie zestawów genów, których profile ekspresji i metylacji były znacząco zmienione pod wpływem zwiększania dawki cholekalcyferolu, wyłoniło 11 wspólnych genów. Niemal wszystkie zidentyfikowane zmiany w poziomie metylacji zlokalizowane były w intronach. Wyłącznie zmiana metylacji genu *ITIH2* była zlokalizowana w promotorze genu.

Ocena wpływu suplementacji różnymi formami i dawkami witaminy D na mRNA tkanki mięśniowej

Do analizy transkryptomu tkanki mięśniowej wykorzystano 34 próby biologiczne. Średnia liczba odczytów na próbkę wyniosła 16,3 mln, a średnia liczba unikalnie zmapowanych odczytów 11,7 mln. Porównanie profili mRNA świń suplementowanych normalną i zwiększoną dawką cholekalcyferolu (I vs II) wykazało zmianę ekspresji 3 genów. Zwiększenie dawek cholekalcyferolu spowodowało obniżenie ekspresji genów *ENSSSCG00000044439*, *ENSSSCG00000025403* i *SLC 30 A9*. 13 genów, w tym *RBFox2* i *APOA5*, znajdowało się na granicy istotności statystycznej ($q = 0,052$). Porównanie profili mRNA świń suplementowanych zwiększoną dawką cholekalcyferolu i zwiększoną dawką kombinacji cholekalcyferolu i kalcydiolu (II vs III) nie wykazało istotnych różnic. Podobnie jak porównanie ekspresji genów zwierząt otrzymujących standardową dawkę cholekalcyferolu z ekspresją genów zwierząt otrzymujących zwiększoną dawkę kombinacji cholekalcyferolu+kalcydiol (I vs III). Ponadto, również porównanie mRNA świń suplementowanych standardową dawką cholekalcyferolu i świń, u których cholekalcyferol zastąpiono kalcydiolem, nie wykazało żadnych zmienionych genów (I vs IV). Jednakże stwierdzono zmienione geny w porównaniu do mRNA świń suplementowanych zwiększoną dawką cholekalcyferolu i standardową dawką kalcydiolu (II vs IV). Były to geny *TMEM127* i *NDUFC2*.

Reasumując, uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają hipotezę, że poziom odżywienia cieląt we wczesnym okresie życia jest ważny przy definiowaniu profili transkrypcyjnych, metylacyjnych i miRNA tkanek gruczołu mlekowego (parenchymy i tkanki tłuszczowej) oraz wątroby. Co więcej, zaobserwowane różnice w poziomie ekspresji genów, wynikające z zastosowania odmiennych dawek mleka zastępczego u badanych zwierząt, przynajmniej częściowo, są ustalane oraz utrzymywane, poprzez metylację DNA i ekspresję miRNA. Z kolei działanie witaminy D wydaje się być tkankowo specyficzne. Suplementacja diety świń różnymi dawkami i formami witaminy D nie wywołała istotnych zmian w ekspresji genów w tkance mięśniowej. Jednak u tych samych zwierząt w tkance płuc zaobserwowano szereg zmian zarówno

w ekspresji mRNA jak i miRNA, a także w poziomie metylacji DNA. Zmiany te wskazują na kluczową rolę witaminy D w modulowaniu ważnych procesów biologicznych i szlaków metabolicznych w płucach.

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.

Celem głównym zadania jest opracowanie, walidacja i wdrożenie nowych metod laboratoryjnych z zakresu biologii molekularnej, które umożliwiają 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, opracowano kilka 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. Efektem zadania są nowe metody laboratoryjne w ofercie Instytutu Zootechniki PIB, praca magisterska oraz praca doktorska.

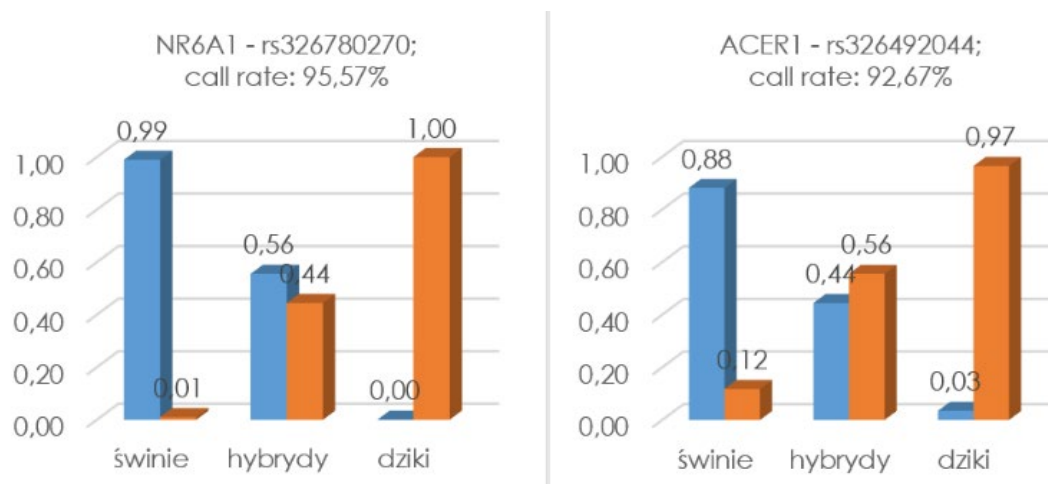
Przeprowadzono analizy różnych ras świń i dzików z zastosowaniem genotypowania real-time PCR na płytkach OpenArray. Analizie poddano 722 różne próbki świń rasy WBP (62 próbki), PBZ (163), pietrain (28), puławska (119), złotnicka (3), duroc (53), hampshire (25), dzików (240), hybryd /świniodziki (6); inne hybrydy (3)/ oraz 20 próbek NTC (kontrola negatywna). Do analiz wybrano 60 markerów SNP znanych z różnych wcześniejszych źródeł, w tym markery zlokalizowane w genach *MC1R* i *NR6A1*, markery mitochondrialne oraz markery w genach uważanych za kluczowe w procesie domestykacji świni domowej. Call Rate zestawów był na poziomie 28-97%.

Analiza danych wykazała, że część wybranych markerów SNP była monomorficzna w całej badanej grupie zwierząt (9), dla dwóch markerów nie zaszła amplifikacja, a w 19 innych zaobserwowano bardzo niski poziom zmienności. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że markery SNP zlokalizowane w genach *NR6A1*, *ACER1*, *PTPRS*, *OPRK1*, *ACSS2* i *SERPINA6* (rycina 1.) mogą być wykorzystywane do rozróżniania podgatunku świni i dzika. Marker w genie *MC1R* również może być stosowany w tym celu, ale nie dla świń rasy duroc. Markery te (7) zebrano w podstawowy panel do rozróżniania tych podgatunków. Pozostałe obiecujące markery (*CD72*, *IGF2*, *PCSK4*, *SAF2B*, *IcnRNA*, *SEMA3D*, *PAPPA2*, *EZH1*, *GSK3B*, *DCAF17*, *TACC1*) mogą zostać włączone do analiz jako dodatkowy panel (11) rozróżniający te podgatunki warunkowo i wymagają dokładniejszych analiz. Żaden z paneli nie nadaje się do rozróżniania hybryd. Panele te są opracowane, zwalidowane i gotowe do użycia.

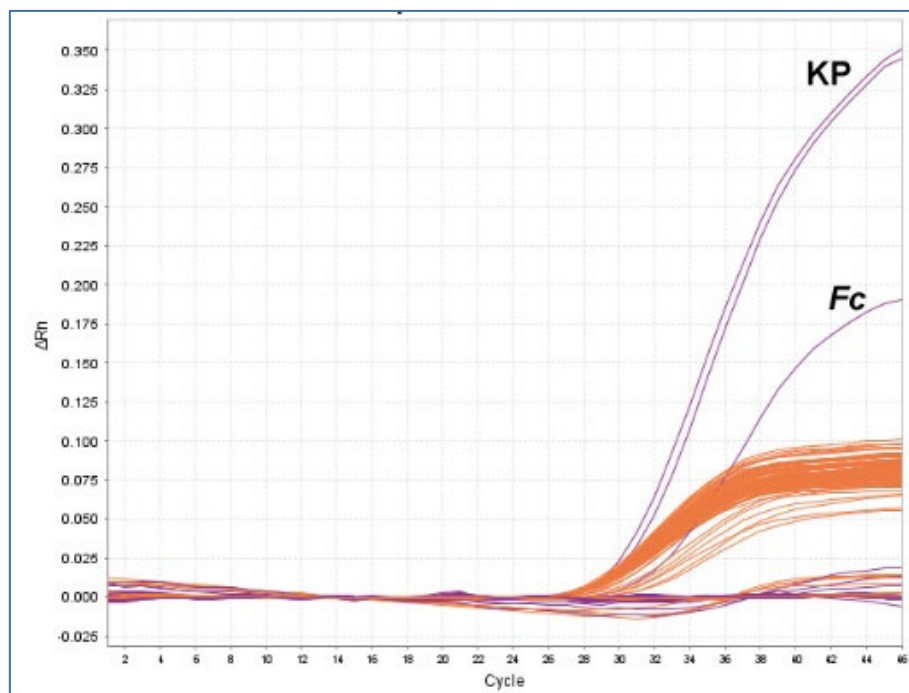
Czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme jest krętek *Borrelia burgdorferi sensu lato* (rodzina Spirochaetaceae). Trzema głównymi gatunkami drobnoustrojów, patogennymi dla ludzi i zwierząt są *B. burgdorferi*, *B. garinii* i *B. afzelii*. Zebrano kolekcję materiału biologicznego – kleszcze, pasożyty zewnętrzne zebrane z powierzchni ciał zwierząt-żywicieli. Z pozyskanych

kleszczy od koni (158 sztuk), psów (29 sztuk) oraz kotów (11 sztuk) wyizolowano DNA, przetestowano i opracowano protokoły na podstawie zestawu *Borrelia* qPCR Detection Kit (EURx) i zmodyfikowanych protokołów producenta. Metoda wykorzystuje fluorescencyjne sondy, które wykrywają obecność DNA *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana* i *Borrelia hermsii* species oraz opiera się na analizie w aparatach typu real-time PCR. Wśród próbek badanych wykryto obecność DNA *Borrelia* sp. tylko u jednego kleszcza pochodzącego od kota (rycina 2.) oraz w próbkach kontroli pozytywnej. Na podstawie przeprowadzonych analiz przygotowano gotową do wykorzystania metodę laboratoryjną.

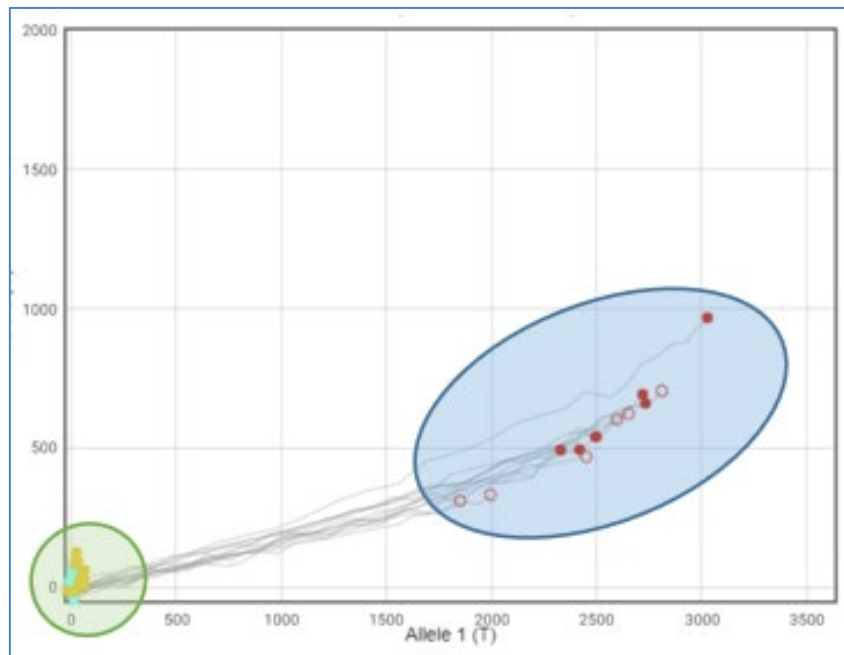
Rycina 1. Przykładowe wyniki dla wybranych markerów SNP do rozróżniania świń i dzików; *allele* 1 (A1) – kolor niebieski; *allele* 2 (A2) – kolor pomarańczowy



Rycina 2. Analiza próbek DNA z kleszczy; kolor pomarańczowy – sonda kontroli poprawności PCR; kolor fioletowy sonda wykrywająca fragment genomu *Borrelia* sp.; KP – próbki kontroli pozytywnej; Fc – próbka wyizolowana z kleszcza wyciągniętego z kota



Rycina 3. Analiza płci sondą zaprojektowaną na chromosomie Y (gen *SRY*) – detekcja *allele* T dla osobników męskich (niebieskie podświetlenie); brak amplifikacji dla osobników żeńskich (zielone podświetlenie)



Nieprawidłowości chromosomowe mogą być przyczyną zaburzeń rozrodczych i stanowią jeden z najczęstszych nieinfekcyjnych powodów niepłodności u koni. Identyfikacja genetyczna markerów powiązanych z płcią koniowatych może stanowić pierwszy etap diagnostyki tych nieprawidłowości. Zaprojektowano primery i sondy do identyfikacji *AmelX*, *SRY*, *AmelY*; wybrane fragmenty zsekwencjonowano, celem potwierdzenia wyników i walidacji. Dla 100 badanych próbek, w analizie dwóch fragmentów genu *Amel*, uzyskano produkty potwierdzające płęć zgodną z zadeklarowaną. Dla sondy zaprojektowanej na chromosomie Y stwierdzono także możliwość rozpoznania płci. Wyniki analiz potwierdzają prawidłowość metody. Identyfikacja genetyczna markerów powiązanych z płcią koniowatych jest gotowa i jest przygotowywana do wdrożenia. Będzie stanowiła głównie narzędzie do weryfikacji płci, gdy wyniki w locus *LEX3* będą niejednoznaczne.

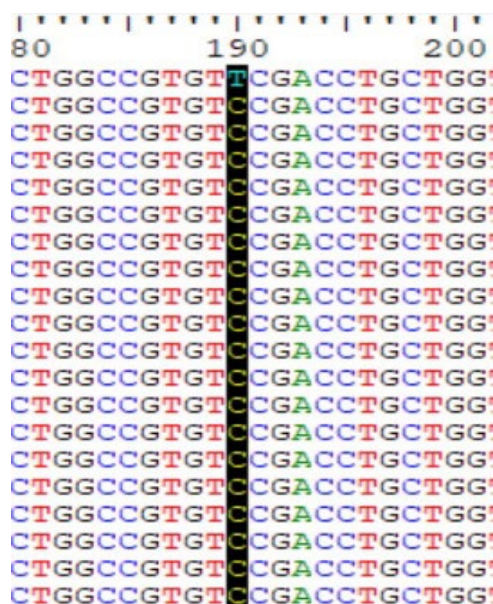
Różnorodność umaszczenia wymusza zapotrzebowanie na wprowadzenie testów diagnostycznych, związanych z ich rozróżnianiem na poziomie genetycznym. Często wynika to z faktu, że dany wzór umaszczenia stanowi jedną z cech-wyznaczników danej rasy. W zakresie analiz umaszczenia podstawowego koni przeprowadzono testy dla 100 próbek o zweryfikowanym umaszczeniu. Przeprowadzono analizy dla fragmentów genów *MC1R*, *ASIP*, *PMEL17*, *MATP*, *KIT* metodą sekwencjonowania. Uzyskane wyniki są zgodne z opisem umaszczenia w przypadku konia domowego. Dla koni Przewalskiego określono warianty genu względem próbek kontrolnych pozytywnych pozyskanych z testu międzynarodowego. Nie zidentyfikowano próbek o niekorzystnym wariantcie dla tego gatunku (rycina 4.). Dla genu *ASIP*, który reguluje gen *MC1R*, zidentyfikowano wariant dominujący, dla próbek osobników zadeklarowanych jako gniade, natomiast osobniki opisane jako kare miały wariant recesywny (indel). Zidentyfikowano też mutacje dla genu *MATP*, nie mające jednak wpływu na fenotyp. Nie stwierdzono mutacji recesywnej powiązanej z umaszczeniem *pearl* w badanych próbkach. Zidentyfikowane polimorfizmy mogą stanowić podstawę do identyfikacji umaszczeń w przypadkach wątpliwych.

Do badań umaszczenia owiec wykorzystano materiał z kolekcji materiału Instytutu Zootechniki PIB – próbki krwi owiec czystorasowe: merynos polski w starym typie (MST), wrzosówka

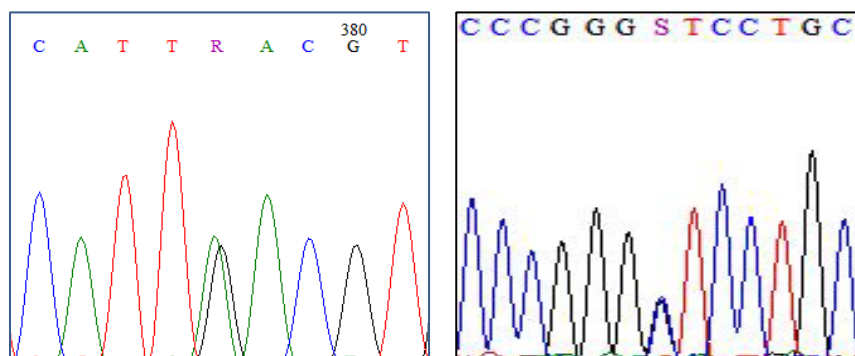
(WRZOS), owca romanowska (ROM), polska owca górska barwna (POGB) i merynos barwny (MPB), po ok. 50 osobników z każdej rasy. Zsekwencjonowano dwa fragmenty genu *MC1R* owiec: region kodujący i fragment regionu promotora genu i na tej podstawie zaprojektowano sondy TaqMan do analizy kodonów D121N (rycina 5.) i M73K. Mutacje, które wg danych literaturowych odpowiadają za dominujący kolor czarny u niektórych ras owiec, były obecne z wysoką częstością u polskiej owcy górskiej barwnej (ponad 93% nosicieli). Na podstawie uzyskanych wyników SNP znaleziono cztery różne haplotypy. Haplotyp C, odpowiadający dominującemu *allelowi* ED, wydaje się być powiązany z brązowym kolorem rasy POGB. Metoda jest opracowana i gotowa, jednak warto by było przebadac większą liczbę osobników, ponieważ mutacje znaleziono również u niektórych osobników rasy POG. Zanalizowano również mutację w genie *TYRP1*: C290F oraz R356stop, potencjalnie powiązane z brązowym umaszczeniem. Obecność *allelu* F w kodonie 290 wykryto wyłącznie u owiec rasy MST (częstość *allelu* 12,8%) i POG (częstość *allelu* 1%). Kodon 356stop występował z częstością 7,7% u rasy MPB i 1,6% u rasy MST.

Wyników nie powiązano z umaszczeniem tych zwierząt. Nie znaleziono również powiązania z umaszczeniem mutacji C126S genu *ASIP*, która występowała u wszystkich badanych ras.

Rycina 4. Analiza porównawcza genu *MC1R* koni Przewalskiego (wariant C) względem próbki referencyjnej pozyskanej z testu międzynarodowego ISAG (wariant T)



Rycina 5. Mutacja D121N genu *MC1R* owiec (od lewej); Mutacja GYS1 u koni (od prawej)



Coraz więcej hodowców świadomie podchodzi do selekcji pod względem eliminacji ze swojej hodowli chorób genetycznych. Przyczyną PSSM jest mutacja w genie *GYS1*, kodującym syntazę glikogenu. Skutkiem mutacji jest nadmierna synteza tego polisacharydu i jego odkładanie w mięśniach zwierzęcia. Z kolei gen *RyR1* uważa się za odpowiedzialny za występowanie hipertermii złośliwej (MH). Badacze donoszą, że wśród zgenotypowanych osobników, stwierdzono zarówno mutacje niezależnie w obu genach, jak również w obu badanych genach jednocześnie. Jednoczesna mutacja w obu genach może prowadzić do przewlekłego mięśniochwatu porażennego o bardzo ostrym przebiegu. Przygotowano primery do identyfikacji *GYS1* i *RyR1*.

Przeprowadzono badania przesiewowe celem identyfikacji mutacji w genach *GYS1* (rycina 5.) oraz *RyR1* w grupie 100 koni. Częstość rzadszego *allelu* była niska, poniżej 1% (0,07% – *GYS1* oraz 0,02% – *RyR1*). Nie zaobserwowano jednoczesnego występowania tych mutacji. Powyższe metody molekularne stanowią narzędzie do identyfikacji nosicielstwa głównie dla koni gorącokrwistych.

Przewlekła choroba wyniszczająca (ang. *Chronic Wasting Disease* – CWD), to śmiertelna choroba należąca do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych, wywoływana przez priony – izoformy naturalnie występującego białka prionowego (PrP^C) o zmienionej, nieprawidłowej konformacji. Dzisiaj wiadomo, że choroba atakuje wiele gatunków jeleniowatych, a niedawno wykryto ją w Europie (Norwegia, Finlandia, Szwecja). W ramach celu przebadano archiwalny materiał z kolekcji IZ PIB (próbki DNA jeleni – 261 osobników). Pozyskano także materiał od łosi pochodzących z różnych części Polski, dzięki współpracy z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym PIB (81 próbek). Opracowano metodę sekwencjonowania całego regionu kodującego genu *PRNP* w oparciu o startery zaproponowane przez Robinson et al. [2019 – za: O'Rourke et al. 1999] oraz według własnego projektu. Biorąc pod uwagę kodony genu *PRNP* istotne pod względem CWD u jeleniowatych (98,168, 226), wszystkie łosie miały genotyp T₉₈P₁₆₈Q₂₂₆. Wykryto jedną mutację cichą w kodonie 20 (60C>T), która występowała u ok. 14% z przebadanych próbek. Zanalizowano również sekwencje 261 próbek jelenia szlachetnego. Znaleziono siedemnaście różnych miejsc polimorficznych, jednak większość mutacji występowała u pojedynczych osobników. Największą zmienność zaobserwowano w kodonach 136 i 226. Najczęstszymi polimorfizmami były 292A>G (T98A), 408C>T (S138N) oraz 676G>C (Q226E). Częstość pozostałych polimorfizmów była poniżej 5%. Zaobserwowano m.in. haplotypy TPE (54,8% osobników), TPQ (27,3%) oraz APQ (12,9%). Opracowana metoda analizy regionu kodującego genu *PRNP* działa z powodzeniem u jeleni, łosi i saren. Została też sprawdzona na pojedynczych próbkach jelenia sika i danieli. Została już wdrożona i jest utrzymywana w laboratorium na wypadek konieczności zastosowania w przypadku diagnostyki CWD.

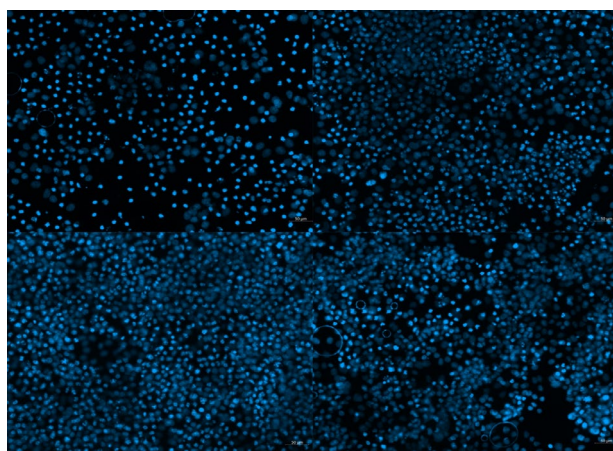
Do przeprowadzenia analizy z wykorzystaniem technik cytogenetycznych niezbędne są płytki metafazowe pochodzące od dzielących się komórek w stadium metafazy, jednak komórki adherentne, w przeciwieństwie do komórek leukocytnych krwi, wykazują niższą częstotliwość wejścia w fazę mitozy i w warunkach *in vitro* często wchodzą w tzw. fazę uśpienia – w fazę G0 cyklu komórkowego, będąc nieaktywne mitotycznie. Zwiększenie populacji komórek w fazie M cyklu komórkowego możliwe jest dzięki zastosowaniu metody synchronizacji cyklu komórkowego, która pozwala na otrzymanie komórek danej populacji w tej samej fazie cyklu komórkowego. Metody badawcze wykorzystywane do synchronizacji cyklu komórkowego pod względem wskaźnika mitotycznego oparto na wykorzystaniu chemicznych inhibitorów cyklu komórkowego: tymidyny (inhibitor syntezy DNA), RO3306 (inhibitor CDK1) oraz Nocodazolu (inhibitor tworzenia się mikrotubul wrzeciona podziałowego). Najwyższy wskaźnik indeksu mitotycznego (MI – z ang. mitotic index) po 30 minutach od uwolnienia z blokowania w fazie G₂/M zaobserwowano w grupie traktowanej pojedynczym blokiem tymidynowym i Nocodazolem.

Ponadto, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą traktowaną pojedynczym blokiem tymidynowym i Nocodazolem, a grupą traktowaną podwójnym blokiem tymidynowym i Nocodazolem. Po 60, 90 oraz 120 minutach od uwolnienia po blokowaniu w fazie G₂/M najwyższy wskaźnik indeksu mitotycznego zaobserwowano dla grupy traktowanej podwójnym blokiem tymidynowym i Nocodazolem. Po 60 minutach po uwolnieniu nie zaobserwowano statystycznych różnic pomiędzy grupą traktowaną pojedynczym blokiem tymidynowym i Nocodazolem oraz grupą traktowaną podwójnym blokiem tymidynowym i Nocodazolem - w przeciwieństwie do komórek uwolnionych spod działania inhibitorów po 90 i 120 minutach, gdzie działanie podwójnego bloku tymidynowego i Nocodazolu skutkowało statystycznie wyższą wartością indeksu mitotycznego ($P < 0,05$). W przypadku komórek traktowanych inhibitorem RO3306 zaobserwowano niższe indeksy mitotyczne oraz brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą traktowaną pojedynczym blokiem tymidynowym a grupą poddaną działaniu podwójnego bloku tymidynowego.

Aby określić optymalną koncentrację tymidyny, celem przeprowadzenia wydajnej synchronizacji, a tym samym otrzymania wysokiego wskaźnika mitotycznego, testowano cztery koncentracje tymidyny: 1mM, 2 mM, 2,5 mM i 5 mM w układzie podwójnego bloku tymidynowego i bloku Nocodazolem. Przeprowadzona analiza optymalizacji koncentracji tymidyny wykazała brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami traktowanymi tymidyną w różnych koncentracjach.

Opracowano komórkowe modele cykli podziałowych, które poprzez odpowiednią detekcję mikroskopową białek biorących udział w cyklu komórkowym pozwalają dostosować warunki hodowli oraz metody synchronizacji cyklu podziałowego.

Rycina 6. Obserwacje mikroskopowe komórek o najwyższym wskaźniku mitotycznym



Import alpak w Polsce rozpoczął się w 2004 roku. Niektóre osobniki fenotypowo odstają od wzorca gatunku alpaka i powstały prawdopodobnie na drodze krzyżowania tego gatunku z lamą. Mieszańce alpaka x lama są niestety płodne i często niemożliwe do odróżnienia w ocenie fenotypowej od osobników z gatunku alpaka. W związku z regulacją hodowli alpak w Polsce, utworzeniem ksiąg hodowlanych oraz zaliczeniem ich do zwierząt gospodarskich, obecność mieszańców alpaka x lama jest zjawiskiem niepożądanym w zachowaniu czystości rasy.

Materiał biologiczny stanowiły cebulki włosowe lub wymazy od alpak i lam, zebranych w gospodarstwach zrzeszonych z SHAiL, PZHA oraz krakowskim i wrocławskim zoo. Łącznie zebrano 216 alpak, 18 lam i jedną hybrydę pierwszej generacji (F1). Zsekwencjonowano region d-loop 235 osobników obu płci (alpak i lam) i gen DBY – 90 osobnikom płci wyłącznie męskiej. Dla DBY znaleziono 4 zmienne miejsca (KY420384:c.112 C>G; KY420384:c.248 G>A; KY4203

84:c.314 G>A; KY420384:c. 345 G>A) i wygenerowano dwa haplotypy. Pierwszy haplotyp zgromadził zwierzęta fenotypowo przynależące do alpaki, natomiast drugi haplotyp skupiał fenotypowe lamy. Podobne wskazanie zaobserwowano w przypadku klastrowania bayesowskiego, gdzie wskazano, że najbardziej prawdopodobna liczba wykrytych klastrow to $K=2$, gdzie pierwszy klastrow stanowiły lamy, a drugi alpaki. W przypadku analizy regionu d-loop zsekwencjonowano osobniki obu płci. Znaleźiono aż 446 miejsc segregacji, co pozwoliło wygenerować 34 haplotypy. Co ciekawe, z 34 wygenerowanych haplotypów aż trzy były mieszane, tzn. znajdowały się w nich osobniki fenotypowo zaklasyfikowane jako alpaki i jako lamy. Niestety nie zaobserwowano żadnych mutacji, które mogłyby posłużyć jako markery diagnostyczne do identyfikacji hybryd, jak i alpaki i lamy. Analiza regionu d-loop wykazała dużą różnorodność wśród alpaki i lamy, w przeciwieństwie do DBY. Poza tym, parametry różnicowania genetycznego wskazały dużą liczbę mutacji i wyraźny dowód przepływu genów oraz brak różnic pomiędzy alpakami i lamami.

Na podstawie badań wywnioskowano, że: mitochondrialne DNA alpaki i lamy wskazuje na introgresję genów między alpakami i lamami; analizując markery matczyne (region d-loop) i ojcowskie (DBY) niemożliwym jest wskazanie konkretnych osobników hybrydowych; w celu opracowania skutecznej metody identyfikacji hybryd potrzebne są większe nakłady finansowe w celu przebadania znacznie większej populacji oraz zastosowanie metod GWAS.

Zadanie 01-18-08-11

Wykorzystanie genetyki molekularnej jako nowoczesnego narzędzia w hodowli koni

kierownik zadania: prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik

Celem zadania jest wykorzystywanie markerów genetycznych do oceny wartości genetycznej pod względem cech użytkowych oraz wprowadzenie i optymalizację selekcji wspomaganą markerami genetycznymi u koni.

W projekcie zbadano podłoże genetyczne wybranych jednostek chorobowych oraz markerów genetycznych związanych z osiąganiem wybitnych wyników w sporcie u koni różnych ras. Na podstawie dokumentacji hodowlanej i danych weterynaryjnych wytypowano osobniki chore i potencjalnych nosicieli, dla których przy użyciu dedykowanych metod genetycznych (PCR-RFLP, sekwencjonowanie Sangera, mikromacierze SNP, RNA-seq) wytypowano markery genetyczne związane z ryzykiem występowania danej choroby. W przypadku markerów chorób genetycznych, uzyskane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy i w których rasach istnieje konieczność monitoringu frekwencji niekorzystanych alleli w celu ich eliminacji. W przypadku markerów dzielności wyścigowej i wytrzymałości rajdowej uzyskane wyniki pozwolą na zaproponowanie panelu genów oraz mutacji umożliwiających celowaną selekcję w kierunku poprawy określonej grupy cech wytrzymałościowych.

Zebrano, opisano i przyjęto do bazy 1444 próbki materiału biologicznego (przystanego przez hodowców), które reprezentowały następujące rasy koni: konie małopolskie, konie śląskie, kuce, kłusaki, konie małopolskie, konie czystej krwi arabskiej, selle francais, konie zimnokrwiste, konie rasy hanover, konie fryzyjskie. W ramach zadania opracowano i zwalidowano metody identyfikacji oraz wydano wyniki hodowcom wielu jednostek chorób genetycznych występujących u koni, m.in.: genetycznego wodogłowa (dedykowana dla koni fryzyjskich); karłowatości (dedykowana dla koni fryzyjskich); genetycznej podstawy typu chodu – gen DMRT3; malformacji kręgów szyjnych o podłożu genetycznym (OAAM); pęcherzowego oddzielania naskórki (JEB1 i JEB2); dziedzicznej miejscowej astenii skóry (HERDA) czy polisacharydowej miopatii (PSSM).

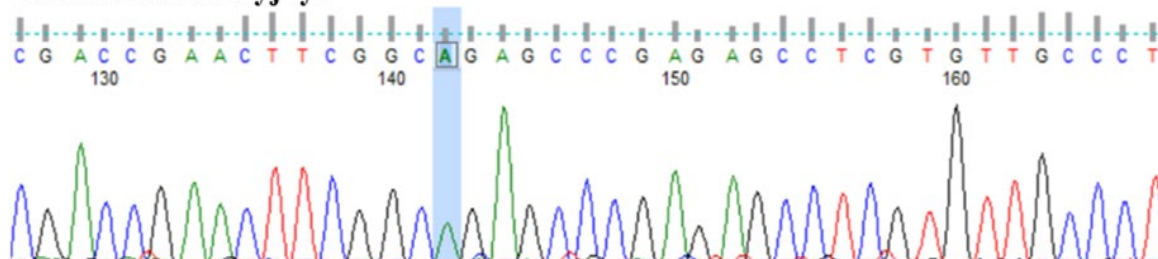
Dla 820 przeanalizowanych koni czystej krwi arabskiej pod kątem występowania atrofii mózdzku (CA) wykazano 41 nosicieli co stanowiło 5% badanej populacji. Zidentyfikowano dwa

osobniki będące nosicielami zespołu SCID oraz nie wykazano obecności w polskiej populacji niekorzystnego wariantu dla LFS. W badaniach dla syndromu PSSM1 ujęto dwie rasy: konie śląskie (n=96) i polskie konie zimnokrwiste, pkz (n=121). Liczba zidentyfikowanych koni heterozygotycznych w rasie pkz wyniosła 45, co stanowiło 37,2% wszystkich badanych osobników. Co ciekawe, 5,8% koni miało genotyp AA posiadający oba allele związane z PSSM1. Częstość występowania rzadszego allele A wynosiła 24%. Populacja koni śląskich była wolna od allele A. Zaobserwowana wysoka częstotliwość allele determinującego PSSM1 potwierdziła konieczność wykonywania badań genetycznych. Uzyskane wyniki dostarczyły danych wskazujących na przydatność monitorowania chorób genetycznych u polskich koni zimnokrwistych w celu uniknięcia strat i ograniczenia występowania allele A w obrębie analizowanej rasy. Analiza genetycznego podłoża syndromu słabego żrebięcia WFFS została wykonana dla 111 koni różnych ras, z czego wykryto 9 nosicieli reprezentujących dwie rasy (selle francais – 5 na 91 badanych koni oraz koń hanowerski – 4 osobniki na 20 badanych osobników).

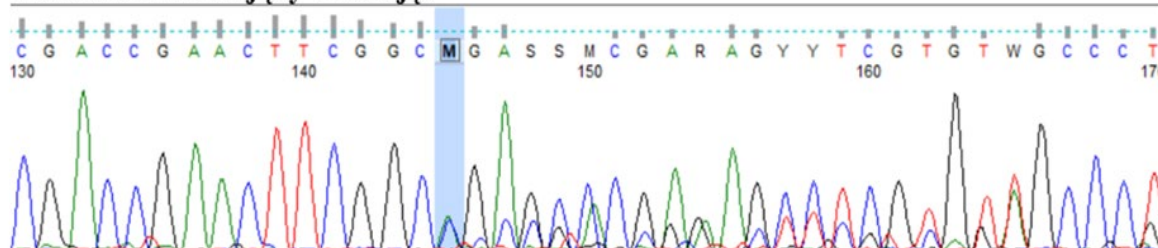
W ramach badań, przeanalizowano fragmenty kodujące genu *DMRT3* pod kątem poszukiwania nowych zmian polimorficznych, potencjalnie związanych z typem chodu u koni. Podstawę prowadzonych badań stanowiła grupa 87 koni, na którą składały się osobniki będące przedstawicielami ras: koń czystej krwi arabskiej, koń małopolski, kłusak francuski, koń islandzki, koń hanowerski oraz walijski kuc górski. Wykazano obecność sześciu mutacji, z których dwie to obecnie znane polimorfizmy: rs1150690013 oraz rs1145162251. Spośród nowo zidentyfikowanych mutacji wyróżniono trzy mutacje typu SNP, oraz jedną typu insercja/delecja, której efektem jest wydłużenie sekwencji DNA o 18 nukleotydów i zmiana jakościowa sekwencji powstającego białka o 6 aminokwasów (rycina 1.). Zmiana insercyjno-delecyjna występowała wyłącznie u rasy kuc walijski.

Rycina 1. Chromatogramy przedstawiające zidentyfikowane warianty genotypów dla sekwencji referencyjnej oraz zmiany typu insercja/delecja

Wariant referencyjny:



Wariant zawierający insercję:



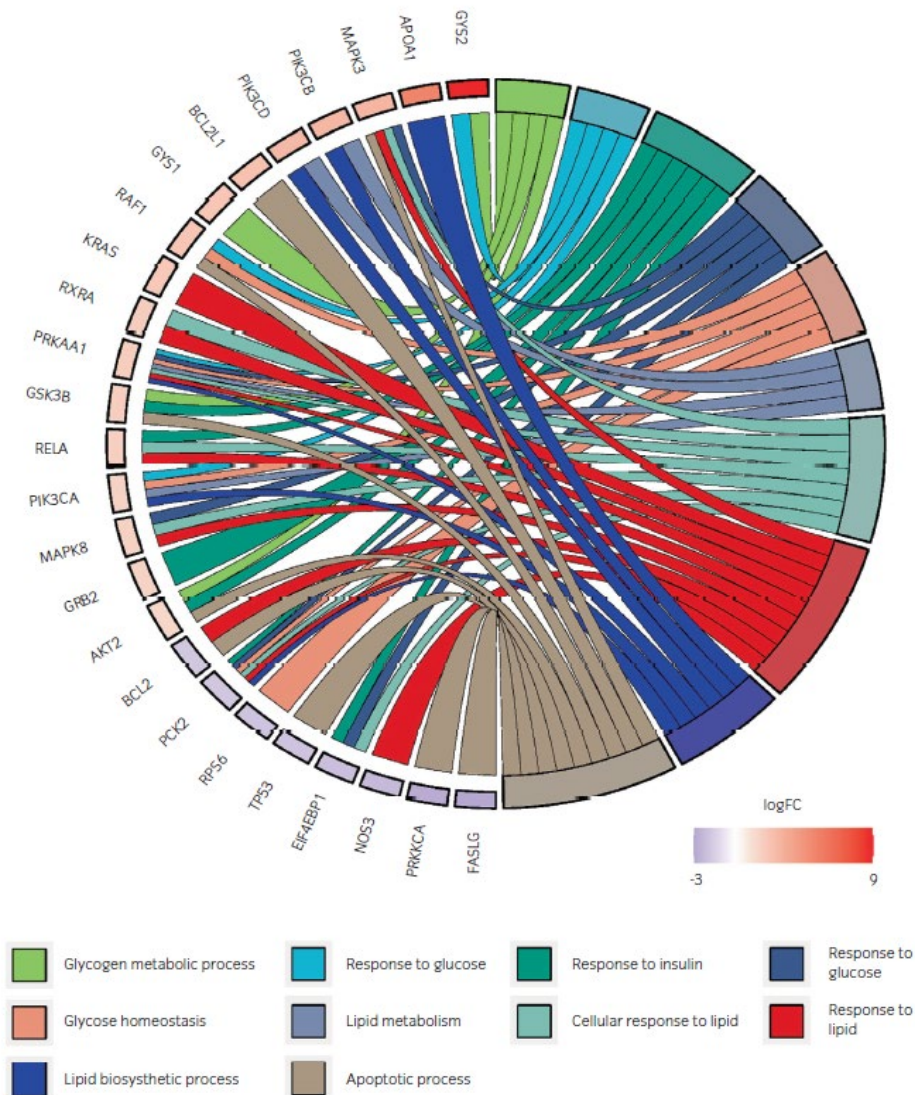
*kolorem niebieskim zaznaczono dokładne miejsce insercji

W ramach prowadzonych badań dotyczących analizy predyspozycji rajdowych zgromadzono materiał w postaci krwi obwodowej od 10 koni arabskich uczestniczących w biegach długodystansowych. Wykonano analizę transkryptomów metodą RNA-seq i porównano profile eks-

presji przed i po rajdzie. Uzyskane wyniki wskazują na fakt, że wysiłek wpływa na regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za homeostazę lipidów, glikogenu i glukozy poprzez modyfikację transportu metabolitów; biosyntezę i odpowiedź komórkową.

Ponadto, te same geny były istotnie zaangażowane w procesy apoptotyczne (FDR <0,00087) (*TP53; BCL2L1; BCL2; FASLG; GSK3B; RAF1; AKT2; MAPK3*) i odpowiedź na ograniczony dostęp do składników odżywczych (FDR <0,00011) (*MAPK3; MAPK8; BCL2; PCK2; PRKAA1*) (rycina 2.).

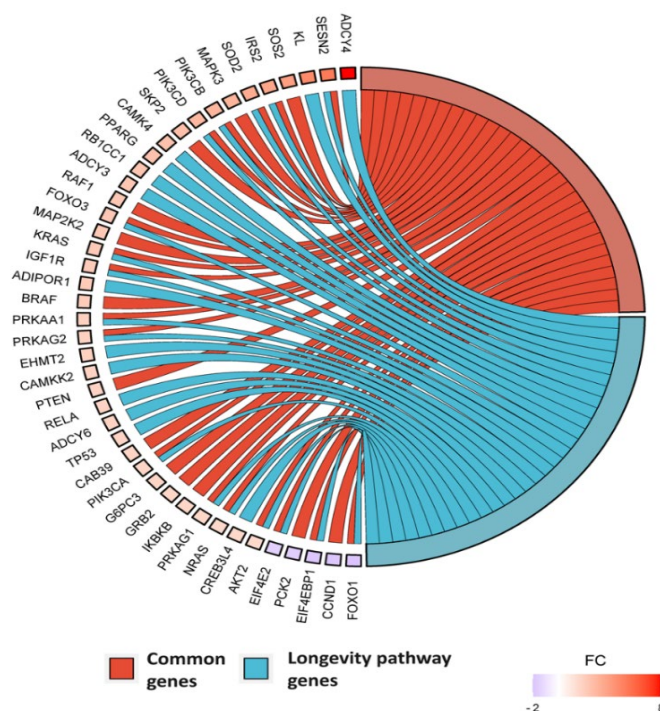
Rycina 2. Zidentyfikowane geny o różnicowej ekspresji przyporządkowane do procesów biologicznych związanych z określonymi funkcjami aktywowanymi lub wyciszzanymi pod wpływem wysiłku wytrzymałościowego (oprogramowanie R)



Wykazano podniesienie poziomu ekspresji wielu genów wchodzących w szlak długowieczności, co może prowadzić do długofalowych skutków dotyczących regulacji cyklu komórkowego, homeostaz glukozy i prawidłowego natlenienia komórek. Ponadto, identyfikacja genów odpowiadających za mechanizmy neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS) mogą stanowić jeden z głównych sposobów zapobiegania uszkodzeniom DNA i komórek podczas długookresowego wysiłku u koni. Na podstawie wyników można zaproponować 3 geny biochemicznych markerów długotrwałej wytrzymałości wysiłkowej: gen *KL*, który można uznać za biomarker

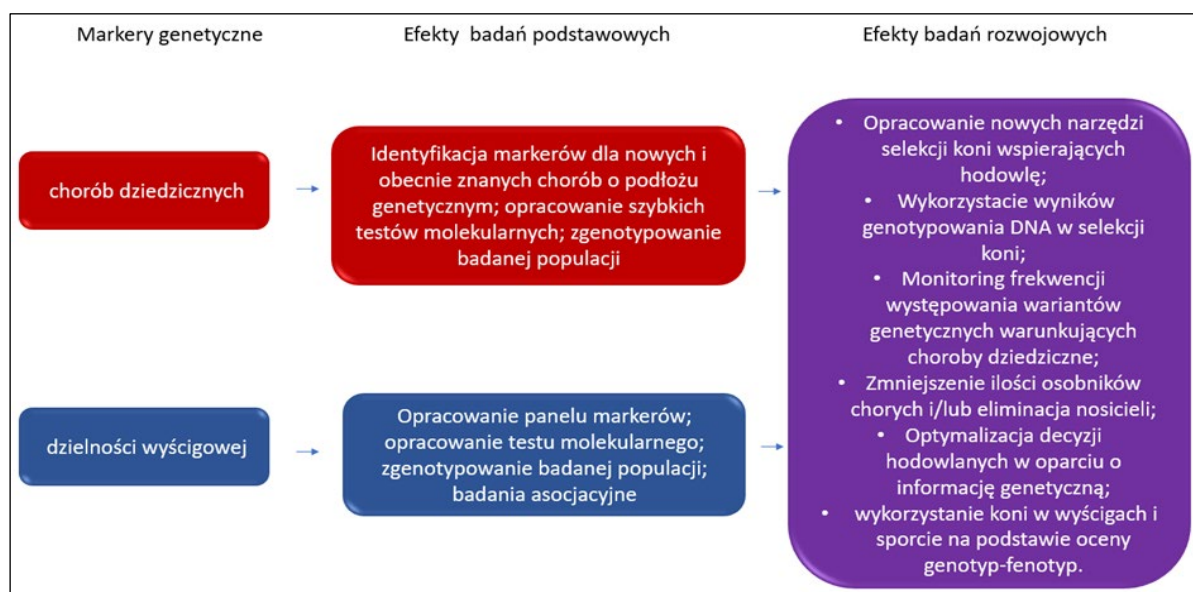
przetrenowania i wyczerpania; gen *SOD2*, którego podniesiona ekspresja jest sygnałem prawidłowego natlenienia i wydajnego oddychania komórkowego oraz gen *SESN2*, którego wysoka ekspresja pozwala na zapobieganie uszkodzeniom oksydacyjnym i neutralizacji ROS (rycina 3.).

Rycina 3. Zaangażowanie 30 zidentyfikowanych genów o różnicowej ekspresji w szlak długowieczności i pozostałe trzy zidentyfikowane szlaki (mTOR, FOXO, AMPK – common genes)



Efektem końcowym projektu jest opracowanie testów diagnostycznych jako nowego narzędzia wspierającego proces selekcji u koni i związanego z dwoma grupami markerów genetycznych (rycina 4.). Drugim niezmiernie ważnym efektem jest rozpropagowanie wiedzy o potrzebie prowadzenia badań DNA i korzyściach hodowlanych płynących z ich zastosowania w praktyce.

Rycina 4. Schematycznie podsumowane wybrane efekty projektu z podziałem na badania podstawowe oraz aplikacyjne



Zadanie 01-18-14-21

Model badawczy odwirusowej neoplazji skóry oraz analiza syntetycznych wysokoimmunogennych białek jako narzędzia do walki z wirusowymi zmianami skórnymi

kierownik zadania: dr inż. Wojciech Witarski

W 2023 roku zostały przeprowadzone dalsze hodowle trójwymiarowe komórek nowotworowych, także w warunkach hipoksji. Tempo wzrostu i charakter kolonii poddano analizie, wykazano wpływ hipoksji na zmiany profilu ekspresji kw. nukleinowych oraz zmianę profilu wybranych białek (dodatkowe analizy zostaną wykonane w 2024 roku). Przeprowadzono proces kotransfekcji komórek HEK293 plazmidami produkującymi białka płaszcza kapsydowego, BPV L-1 oraz L-2, których produkcja, wraz z syntetycznymi immunogennymi białkami, posłużyła analizie IVCAA. Prześledzona została ich zdolność aktywacji, mierzona jako działanie mitogenne. Produkcja kapsydu wraz z uwięzionym w nim plazmidem pEGFP-C1 (Lifeact-EGFP) została wykonana zgodnie z metodyką proponowaną przez Buck C. i wsp. (2004). Komórki HEK293T zostały transfekowane przy pomocy pary plazmidów: pShell (plazmid produkujący białka kapsydu) oraz plazmid kodujący białko EGFP.

Przy pomocy działania antybiotyku i uwzględnieniu pozytywnego sygnału działaniem białka fluorescencyjnego przeprowadzono selekcję najodpowiedniejszego klonu. Miano białek wirusa wykonano na lizatach komórkowych przy pomocy testu ELISA, gdzie poziom wirusa mierzono sygnałem aktywności przeciwciała (#PA5-35416, Thermofisher). Sygnał został amplifikowany i odbierany w urządzeniu Eppendorf platereader AF2200. Analiza IVCAA polegała na poddaniu ekspozycji na białka immunogenne komórek układu odpornościowego wyizolowanych z krwi obwodowej. Do tego celu wykorzystany został zestaw do wirowania w gradencie gęstości, z hamowaniem wirówki, firmy Stemcell – Sepmate-15. Mitogenność mierzono jako funkcję aktywności komórek odpornościowych oraz jako zdolności do agregacji komórek. Tempo podziałów mierzono przy pomocy zestawu Celltiterblue firmy Promega, która wykazała pozytywną korelację pomiędzy mianem białek wirusa (lizaty komórkowe), a tempem podziałów komórek odpornościowych. Testy agregacji nie wykazały istotnych różnic między badanymi próbkami.

Zadanie 01-18-15-11

Zastosowanie markerów STR do identyfikacji przynależności rasowej bydła ras zachowawczych na podstawie bydła rasy polskiej czerwono-białej

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

Identyfikacja gatunkowa miodu techniką real-time PCR

W ramach realizacji badań udoskonalono metodę wykrywania miodu w produktach żywnościowych. Metoda oparta jest na wykryciu DNA specyficznego gatunkowo dla pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) przy zastosowaniu techniki real-time PCR.

Składa się z dwóch etapów: reakcji specyficznej gatunkowo oraz przeprowadzenia krzywej topnienia. Drugi etap służy dodatkowemu potwierdzeniu specyficzności reakcji. Metoda jest specyficzna gatunkowo – specyficzność biologiczna wynosi 100%. W porównaniu do klasycznego PCR-u metoda wykorzystująca real-time PCR jest szybsza i mniej pracochłonna.

Opracowanie metody izolacji DNA z pszczoł

W celu wybrania najlepszej metody izolacji DNA z pszczoł porównano zestawy X-pure genomic DNA i Sherlock w podstawowej wersji oraz z dodatkiem DTT. Próbkę dodatkowo poddano różnej długości inkubacji oraz dodatkowemu przepłukiwaniu etanolem.

Na podstawie przeprowadzonych testów wybrano najlepszy sposób izolacji umożliwiający otrzymanie ekstraktów o najkorzystniejszych parametrach dla dalszej analizy.

Metoda rozróżniania poszczególnych podgatunków pszczoły miodnej

W celu rozróżnienia podgatunków pszczoł żyjących w Polsce: pszczoły miodnej środkowoeuropejskiej (*Apis mellifera mellifera*), kraińskiej (*Apis mellifera carnica*), kaukaskiej (*Apis mellifera caucasica*) oraz włoskiej (*Apis mellifera ligustica*) przeprowadzono testy wykorzystujące wcześniej wyznaczone startery ograniczające miejsca polimorficzne dla tych podgatunków. Do tychczas przeprowadzone badania umożliwiły rozróżnienia podgatunku *Apis m. mellifera* od pozostałych gatunków.

Zadanie 01-18-16-21

Polimorfizm i tkankowo specyficzna ekspresja genów warunkujących mięśność jako kryteria selekcyjne w doskonaleniu cech produkcyjnych gęsi

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

Celem zadania jest zidentyfikowanie markerów genetycznych w postaci funkcjonalnych polimorfizmów determinujących mięśność gęsi, określenie ich tkankowo specyficznej ekspresji oraz poszukiwanie asocjacji z cechami użytkowymi.

Oczekiwany efekt badań będzie ustalenie najbardziej pożądanego genotypu determinującego mięśność, z uwzględnieniem tkankowo specyficznej ekspresji, co pozwoli na selekcję z możliwością modelowania wybranych partii mięśni (piersiowych lub ud) i sterowania cechami jakościowymi mięsa, istotnymi w doskonaleniu cech produkcyjnych gęsi.

Zrealizowane etapy:

1. odchów gęsi landes i białej kołudzkiej®,
2. pobranie materiału do badań jakościowych i molekularnych,
3. analiza jakościowa próbek pobranych w listopadzie 2022 roku (rasy pomorska i biała kołudzka®),
4. izolacja DNA i RNA,
5. izolacja białek,
6. przygotowanie próbek do analizy RNAseq.

- 1) Odchów gęsi landes i biała kołudzka® w IZ PIB ZD Kołuda Wielka: nakład jaj gęsi, wylęg gęsi, odchów ptaków w przedziałach – po 6 przedziałów dla każdej rasy (8 ptaków w przedziale), pomiar ilości zjedzonej paszy, pobranie i zabezpieczenie próbek paszy do analizy chemicznej, zapewnienie jednolitych warunków środowiskowych ptakom z obydwu grup, wykonanie pomiarów masy ciała w 1., 4., 8., 11. i 16. tygodniu życia, długość grzebienia mostka, długość przedramienia i grubość mięśnia przedramienia w 11. t. ż. Ubój gęsi po 15 tygodniach odchowu, pobranie piór do izolacji DNA.

2) Pobranie materiału do badań molekularnych i jakości mięsa.

Wszystkie mieszanki paszowe, zielonki oraz owies, skarmiane w doświadczeniu zostały przekazane do Centralnego Laboratorium IZ PIB w celu określenia wartości pokarmowej i składu chemicznego. Na koniec doświadczenia z każdej grupy wybrano do uboju po 12 gęsi do przeprowadzenia badania ekspresji genów i określenia wydajności poubojowej, jakości mięsa i tłuszczu sadełkowego oraz próbek wybranych tkanek i narządów, w których zachodzą procesy metaboliczne mające wpływ na wzrost i wydajność ptaków oraz cechy jakości mięsa. Pobrano wycinki/całe organy następujących tkanek: mózg, wątroba, serce, jelita, mięsień piersiowy (*pectoralis superficialis*), mięsień dwugłowy uda (*biceps femoris*) i tłuszcz sadełkowy. Wszystkie próbki zostały pobrane i zabezpieczone (schłodzone do temperatury lodówkowej, zanurzone w ciekłym azocie lub schłodzone do -20°C) do dalszych analiz do 20 minut po uboju. Po 24 godzinnym schłodzeniu tuszek w temperaturze 4°C określono kwasowość końcową ($\text{pH}_{24\text{h}}$) w mięśni piersiowym (*pectoralis superficialis*) i dwugłowym uda (*biceps femoris*). Schłodzone tuszki poddane zostały wizualnej 5 punktowej ocenie jakości i następnie uproszczonej analizie rzeźnej. Ponadto, wypreparowane mięśnie piersiowe i mięśnie udowe oceniono pod względem barwy ($L^*a^*b^*$), wycieku swobodnego (24 h i 48 h) i strat termicznych podczas gotowania. Z każdej grupy ptaków pobrano próbki mięśni piersiowych i udowych w celu określenia podstawowego składu chemicznego (sucha masa, białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy), zawartości cholesterolu oraz przeprowadzenia analizy profilu kwasów tłuszczowych tłuszczu mięśniowego.

3) Analiza jakościowa próbek pobranych w listopadzie 2022 roku.

Opierając się na metodyce opisanej w punkcie 2., wyliczona została wartość rzeźna rasy pomorskiej i białej kołudzkiej®.

4) Izolacja DNA z dutek piór gęsi. Przeprowadzono izolację DNA z 20 próbek.

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Sherlock AX (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska).

5) Izolacja białek. Przeprowadzono izolację białek z wątroby i mięśnia uda z grup o uśrednionej masie ciała dla rasy.

Białka zostały poddane homogenizacji mechanicznej, a następnie oczyszczone z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników prep-2-d-cleanup-kit (Bio-Rad). Pomiar koncentracji przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA) w obecności surowicy bydlęcej jako standardu. Przeprowadzono izolację całkowitego RNA z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Total RNA mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) z tkanek mięśnia uda, tłuszczu sadełkowego i wątroby z próbek od ras pomorska i biała kołudzka® (pobrane w 2022 roku). Koncentrację RNA zmierzono w urządzeniu Qubit (Thermo Scientific, USA), jakość izolatów w 2% żelu agarozowym. Stopień integralności RNA (RIN) zmierzono z wykorzystaniem TapeStation (Agilent, Kalifornia, USA). Izolaty o RIN powyżej 6,8 zostały wykorzystane do stworzenia bibliotek z wykorzystaniem TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, USA).

Uzyskane wyniki badań jakościowych wskazują, że poddane kilkudziesięcioletniej selekcji gęsi białe kołudzkie® osiągają istotnie wyższą masę ciała i większą wydajność rzeźną w porównaniu z niselekcjonowanymi gęsiami pomorskimi, przy braku wzrostu u tych pierwszych, udziału procentowego podstawowych elementów tuszki, tłuszczu sadełkowego i podrobów oraz braku

różnic w jakości mięsa pomiędzy rasami. W ramach zadania dopracowano optymalną metodykę izolacji całkowitego białka i RNA z wybranych tkanek gęsi oraz uzyskano biblioteki RNA o ujednoliconej koncentracji.

Zadanie 01-18-17-21

Molekularne tło potencjału komórek chrzęstnych konia w hodowli in vitro po wprowadzeniu fizjologicznych czynników wzrostu

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

Analizie poddano znaczenie metylacji DNA w blokowaniu ekspresji genów chondrocytów końskich stymulowanych trichostatyną A (TSA) – związkiem chemicznym wywołującym niespecyficzną acetylację białek histonowych, który może wspomagać ekspresję tkankowo-specyficznych genów oraz genów mających znaczenie dla metylacji sekwencji regulatorowych DNA. Podstawą tej analizy były dane z badań różnicowej metylacji w skali genomu wykonane metodą RRBS oraz analiz różnic aktywności transkryptomu mRNA (RNAseq), w grupach chondrocytów traktowanych i nietraktowanych TSA.

Integracja danych RRBS i RNAseq pozwoliła zidentyfikować szereg genów wykazujących ujemną zależność między metylacją DNA a ekspresją genów, w wyniku stymulacji TSA chondrocytów końskich. Przykładem jest identyfikacja genów *EXT1*, *IGF2R* oraz *TFB1M*, w loci których wzrost metylacji w regionach sekwencji kodujących oraz intronowych wiązał się ze spadkiem ekspresji wymienionych genów pod wpływem stymulacji TSA. Z kolei spadek metylacji sekwencji intronowych bądź sekwencji promotorowych w locus *GSPT1*, *BAX* i *BLTP3B* wiązał się ze wzrostem ekspresji tych genów pod wpływem stymulacji chondrocytów trichostatyną A.

Integracja danych RRBS i RNAseq pozwoliła pokazać potencjalne znaczenie metylacji DNA w epigenetycznej regulacji ekspresji genów związanych z biologią chrząstki stawowej. Uzyskane wyniki mają znaczenie dla dalszych prac z zakresu biologii regeneracyjnej twardej tkanki łącznej u koni.

Zadanie 01-18-18-11

*Opracowanie procedur badawczych oznaczania pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) oraz rozróżniania jej podgatunków występujących w Polsce*

kierownik zadania: dr Małgorzata Natonek-Wiśniewska

Identyfikacja gatunkowa miodu techniką real-time PCR

W ramach realizacji badań udoskonalono metodę wykrywania miodu w produktach żywnościowych. Metoda oparta jest na wykryciu DNA specyficznego gatunkowo dla pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) przy zastosowaniu techniki real-time PCR. Składa się z dwóch etapów: reakcji specyficznego gatunkowo oraz przeprowadzenia krzywej topnienia. Drugi etap służy dodatkowemu potwierdzeniu specyficzności reakcji. Metoda jest specyficzna gatunkowo – specyficzność biologiczna wynosi 100%. W porównaniu do klasycznego PCR-u metoda wykorzystująca real-time PCR jest szybsza i mniej pracochłonna.

Opracowanie metody izolacji DNA z pszczoł

W celu wybrania najlepszej metody izolacji DNA z pszczoł porównano zestawy X-pure genomic DNA i Sherlock w podstawowej wersji oraz z dodatkiem DTT. Próbkę dodatkowo poddano różnej

długości inkubacji oraz dodatkowemu przepłukiwaniu etanolem. Na podstawie przeprowadzonych testów wybrano najlepszy sposób izolacji umożliwiający otrzymanie ekstraktów o najkorzystniejszych parametrach dla dalszej analizy.

Metoda rozróżniania poszczególnych podgatunków pszczoły miodnej

W celu rozróżnienia podgatunków pszczół żyjących w Polsce: pszczoły miodnej środkowoeuropejskiej (*Apis mellifera mellifera*), kraińskiej (*Apis mellifera carnica*), kaukaskiej (*Apis mellifera caucasica*) oraz włoskiej (*Apis mellifera ligustica*) przeprowadzono testy wykorzystujące wcześniej wyznaczone startery ograniczające miejsca polimorficzne dla tych podgatunków. Dotychczas przeprowadzone badania umożliwiły rozróżnienia podgatunku *Apis m. mellifera* od pozostałych gatunków.

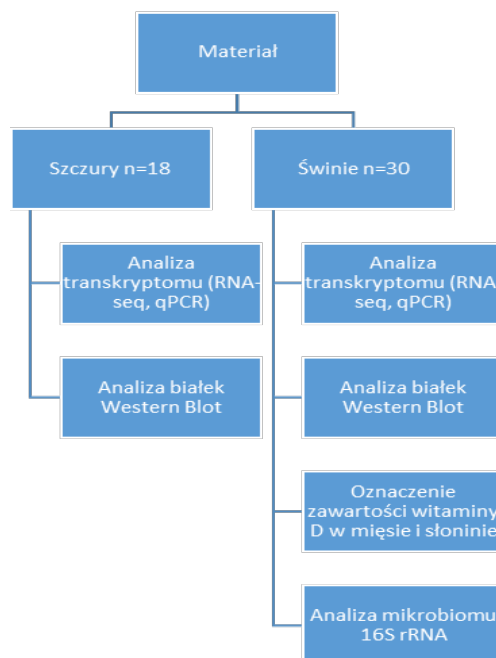
Zadanie 01-18-19-21

Wpływ suplementacji witaminą D3 na ekspresję genów i białek w jelicie cienkim oraz na skład mikroflory jelitowej u zwierząt modelowych

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

Celem badań jest szczegółowa analiza wpływu suplementacji witaminą D3 diety na ekspresję genów i białek w jelicie cienkim szczura i świni, a także na skład mikroflory jelitowej świni. Uzyskane wyniki pozwolą na weryfikację obowiązujących zaleceń odnośnie stosowania witaminy D3 w hodowli zwierząt. Dostarczą również informacji, na ile suplementacja witaminą D3 wpływa na funkcjonowanie jelita, a tym samym może przeciwdziałać schorzeniom powodującym straty w hodowli, jak np. biegunki prosięt.

Figura 1. Założenia metodyczne i schemat planowanych analiz

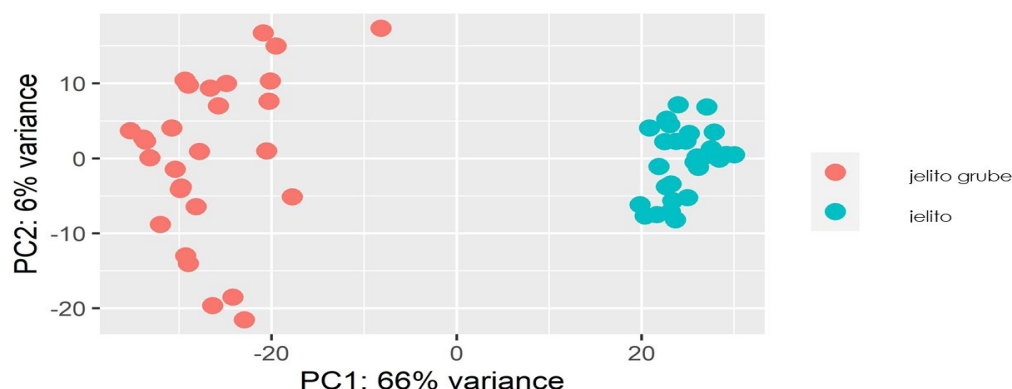


Wyizolowano RNA z próbek jelita grubego (30 próbek) oraz jelita cienkiego (28 próbek) świń otrzymujących w diecie różną dawkę witaminy D3 (grupa I – 0; grupa II – 5000 U witaminy D/kg, grupa III – 10000 U witaminy D/kg). Wyizolowane próbki oceniono pod kątem integralności oraz koncentracji RNA. Następnie utworzono biblioteki cDNA typu 3'Taq mRNA z zastosowaniem

zestawu Colibri 3' mRNA Library Prep Kits for Illumina Systems (ThermoFisher scientific). Biblioteki zsekwencjonowano na aparacie Nextseq 550 firmy Illumina. W wyniku sekwencjonowania uzyskano około 541,80 mln odczytów, co daje średnio około 9,3 mln odczytów na próbkę.

Analiza bioinformatyczna obejmowała ocenę jakości sekwencjonowania, mapowanie do genomu referencyjnego oraz identyfikację genów o zróżnicowanej ekspresji w kilku różnych porównaniach. W porównaniu – jelito cienkie versus jelito grube zaobserwowano 815 genów o podwyższonej ekspresji w jelicie cienkim i 573 geny o podwyższonej ekspresji w jelicie grubym, przy założeniu ($FDR < 0,05$, $\log_2\text{fold change} > 1$, $\text{base mean} > 20$) (figura 2.).

Figura 2. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita grubego i cienkiego świni



Z kolei, porównania pomiędzy grupami otrzymującymi różne dawki witaminy D w diecie, wykazały bardzo niewielką ilość genów przy powyższym założeniu. Dlatego zdecydowano się złączyć próg istotności dla tych porównań i przyjęto następujące wartości $p < 0,05$, $\log_2\text{fold change} > 0,6$, $\text{base mean} > 20$. W obrębie jelita grubego w porównaniu: grupa I vs grupa III zidentyfikowano 828 genów, z czego 320 charakteryzowało się obniżoną a 508 podwyższoną ekspresją u zwierząt otrzymujących 10000 U/kg witaminy D w stosunku do zwierząt bez suplementacji (figura 3.). Geny te w głównej mierze odpowiedzialne są za regulację podziałów komórek. W porównaniu: grupa I vs grupa II zidentyfikowano 341 geny o zmienionej ekspresji, z czego 148 miało ekspresję obniżoną, a 193 podwyższoną w grupie otrzymującej 5000 U/kg witaminy D w paszy (figura 4.). Geny te, podobnie jak w poprzednim porównaniu, związane są z cyklem komórkowym oraz z migracją komórek. Z kolei w porównaniu: grupa II vs grupa III zidentyfikowano 171 genów o obniżonej ekspresji oraz 359 genów o podwyższonej ekspresji u zwierząt otrzymujących wysoką dawkę witaminy D (10000), w stosunku do grupy otrzymującej dawkę 5000 U/kg. Jednak analiza funkcjonalna tych genów nie wykazała wyraźnego wpływu na określone procesy biologiczne.

Figura 3. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita grubego świń otrzymujących w diecie 10000 U/kg witaminy D i bez suplementacji

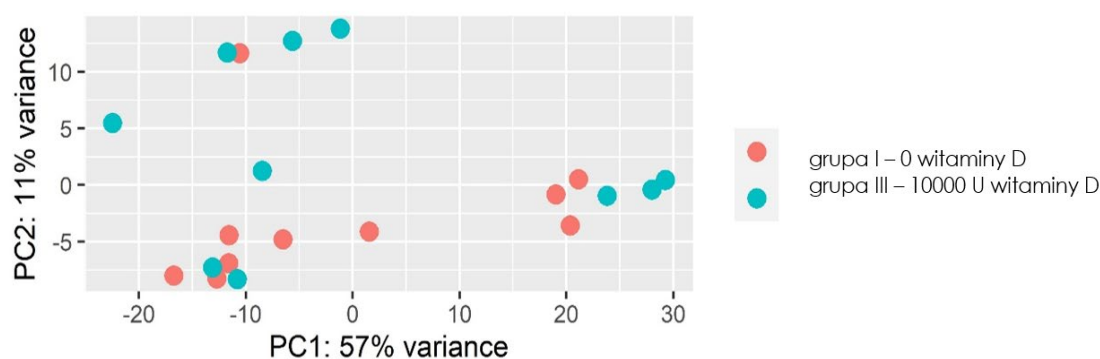
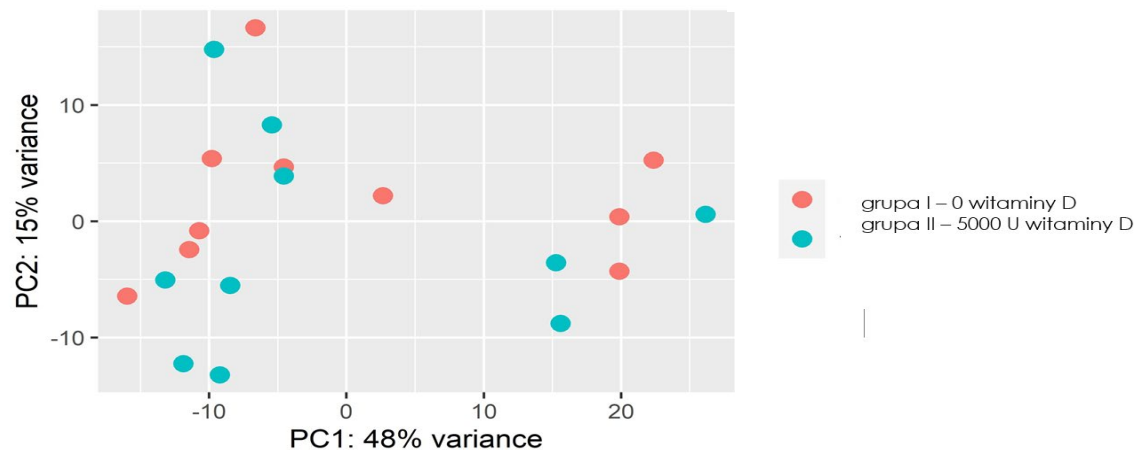


Figura 4. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita grubego świń otrzymujących w diecie 5000 U/kg witaminy D i bez suplementacji



W obrębie jelita cienkiego, w porównaniu grupy I z II zidentyfikowano 89 genów o obniżonej ekspresji oraz 330 genów o podwyższonej ekspresji w grupie otrzymującej dawkę (5000 U/kg) witaminy D w porównaniu z grupą niesuplementowaną (figura 5.). Natomiast, w porównaniu grupy I z grupą III zidentyfikowano 139 genów o obniżonej ekspresji oraz 284 geny o podwyższonej ekspresji w grupie otrzymującej wysoką dawkę (10000 U/kg witaminy D) (figura 6.). Geny zidentyfikowane w obu porównaniach, w przeważającej liczbie regulują biosyntezę steroli oraz procesy związane z odpornością. Z kolei porównanie grupy otrzymującej dawkę 5000U/kg z grupą otrzymującą dawkę podwyższoną witaminy D, pozwoliło na zidentyfikowanie 116 genów o podwyższonej ekspresji i 112 o obniżonej ekspresji u zwierząt otrzymujących 10000 U/kg witaminy D.

Figura 5. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita cienkiego świń otrzymujących w diecie 5000 u/kg witaminy D i bez suplementacji

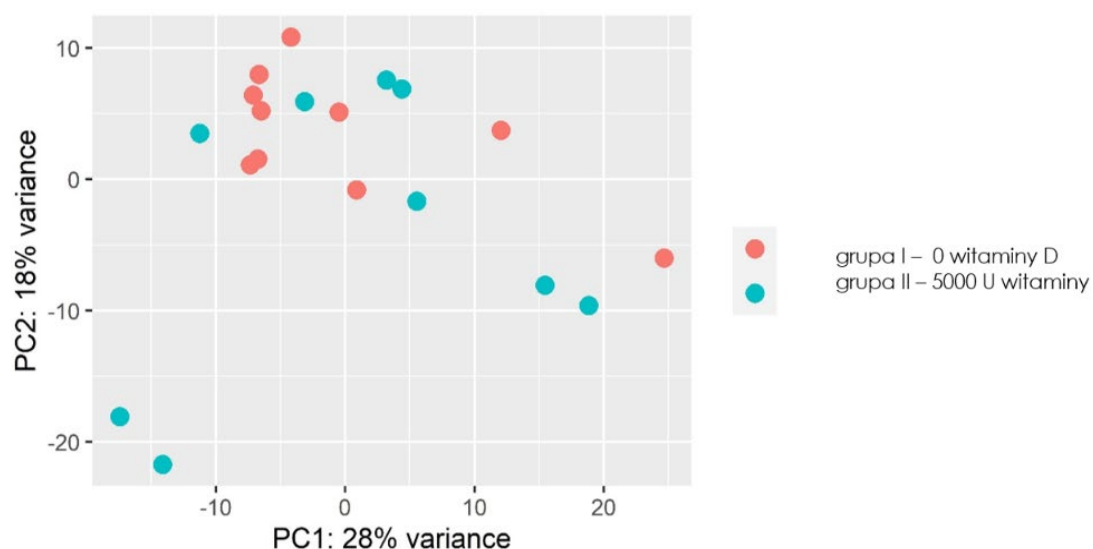
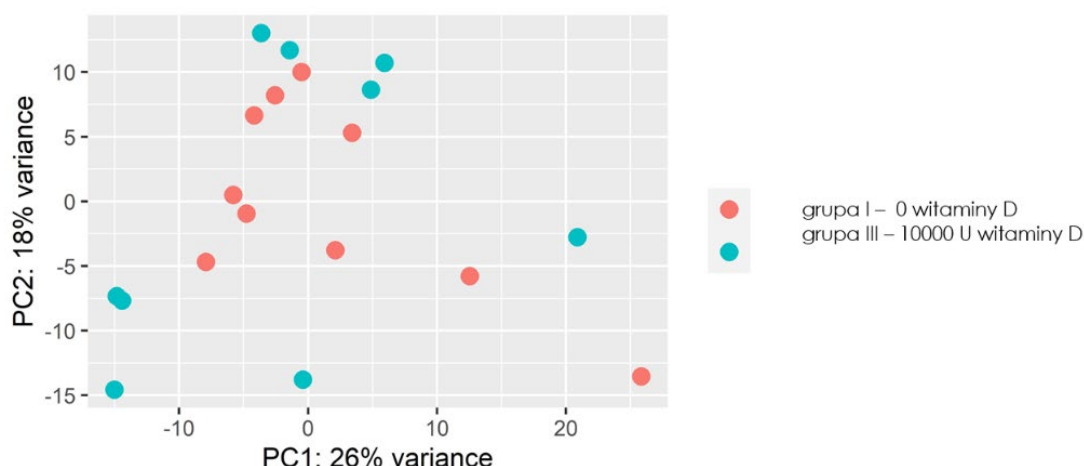


Figura 6. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita cienkiego świń otrzymujących w diecie 10000 u/kg witaminy D i bez suplementacji



Przeprowadzone badania wskazują na odmienną rolę suplementacji diety witaminą D w jelicie grubym i cienkim. W jelicie grubym zaobserwowano zmiany w genach regulujących podziały komórkowe, a więc potencjalnie powiązane z nowotworzeniem, podczas gdy w jelicie cienkim stwierdzono aktywację genów regulujących procesy odpornościowe organizmu. Niemniej jednak, aby ocenić czy zaobserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów są na tyle duże, aby wywołać zauważalną poprawę kondycji zwierząt, potrzebne są dalsze badania.

Zadanie 01-18-20-21

Epigenetyczne modyfikacje genomu indukowane wysiłkiem fizycznym z wykorzystaniem modelu zwierzęcego

kierownik zadania: dr hab. Monika Stefaniuk-Szmukier, prof. IZ PIB

W celu ustalenia i optymalizacji modelu hipoksji w warunkach *in vitro*, maksymalnie zbliżonego do warunków tlenowych występujących w pracujących mięśniach szkieletowych, w pierwszym roku trwania zadania pozyskano i zabezpieczono materiał biologiczny pochodzący z mięśni szkieletowych oraz przetestowano i opracowano metodyki wyprowadzania pierwotnych hodowli komórkowych. U gołębia pocztowego (*C. Livia*), po przeprowadzeniu procedury dyslokacji kręgow u osobnika doświadczalnego, powierzchnię mięśnia *m. pectoralis* pozbawiono piór i zdezynfekowano. W sterylnym pomieszczeniu przeprowadzono dysekcję *m. pectoralis*, pobrano 6 fragmentów tkanki o wadze po około 1g. Próbkę tkanki przepłukano w PBS z antybiotykiem, rozdrobniono przy użyciu nożyczek oraz strawiono poprzez godziną inkubację w 37°C z kolagenazą II. Następnie, komórki przepłukano w medium hodowlanym, zwirowano i przefiltrowano przez 70 µm sitko. Komórki zawieszono w medium hodowlanym, przeniesiono na nieopłaszczoną płytkę. Następnie hodowlę inkubowano przez 1 h w 37°C. Po tym czasie, supernatant przeniesiono na płytkę hodowlaną opłaszczoną 2% roztworem żelatyny. Wypróbowano różne media hodowlane, surowicę oraz temperaturę hodowli (DMEM z niską zawartością cukru/DMEM z wysoką zawartością cukru – płodowa surowica bydlęca (FBS)/mieszanka FBS z surowicą kurzą – 37°C/41°C). Komórki inkubowano przez 72 h w odpowiednim medium oraz temperaturze. Po tym czasie, w zależności od konfluencji, zmieniono medium komórkowe lub przeprowadzono pasaż komórek z użyciem trypsyny na nowe płytki hodowlane, również stosując metodę *pre-platingu* (najpierw inkubacja na nieopłaszczonej płytce w celu oczyszczania populacji komórek z fibroblastów, następnie na płytce opłaszczonej żelatyną). Komórki są w trakcie przeprowadzania przez kolejne pasaża w celu uzyskania czystej hodowli mioblastów.

W celu oszacowania proliferacji komórek miogennych zaprojektowano startery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, obejmujące geny kodujące miogenne czynniki regulatorowe odpowiadające za specjalizację, różnicowanie czy fuzję mioblastów, takie jak: MyoD, miogenina, Myf5, MRF4 oraz czynnik transkrypcyjny Pax-7. Startery dobrano przy użyciu programu Primer3plus na podstawie genomu testowego ColLivia2.1. RNA wyizolowano za pomocą kombinowanej metody z użyciem odczynnika TRI Reagent i kitu do izolacji RNA PureLink. Kontrole endogenne GAPDH i ACTB zaadaptowano w oparciu o wyniki wcześniejszych badań.

Zadanie 01-18-21-21

Analiza profilu proteomicznego plemników knura poddanych procedurom biotechnologicznym

kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Głównym celem zadania była identyfikacja różnic w profilach białkowych (2D żel), plemników knura, traktowanych i nietraktowanych maślanem sodu (NaBu; ang. *sodium butyrate*), należącym do rodziny deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej, a następnie poddawanych procedurze kriokonserwacji. W badaniach, plemniki, niezależnie od zastosowanych procedur biotechnologicznych, są poddawane ocenie: 1) standardowych parametrów za pomocą systemu CASA (ang. *Computer Assisted Semen Analysis*) w celu określenia odsetka plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy; 2) parametrów strukturalno-funkcjonalnych, takich jak: integralności błon komórkowych, uszkodzeń chromatyny plemnikowej, stanu przepuszczalności błon akrosomalnych plemników oraz zmian w mitochondrialnym potencjale transbłonowym ($\Delta\Psi_m$).

Kolejnym celem badań była analiza modyfikacji potranslacyjnych (PTMs; ang. *Post translational modifications*) białek w plemnikach traktowanych NaBu. Każda z grup doświadczalnych zostaje poddana ocenie jakościowej. Dzięki całościowemu ujęciu stanu biologicznego komórek plemnikowych można precyzyjnie określić ich zdolności zapładniające oraz powiązać możliwe modyfikacje potranslacyjne z parametrami strukturalno-funkcjonalnymi plemników.

Niniejsze badania mają pionierski charakter zarówno na poziomie badań podstawowych, jak i translacyjnych. Szerokie spektrum, obejmujące określenie zależności pomiędzy PTMs a markerami jakościowymi plemników poddanych procedurom biotechnologicznym, może być pomocne w lepszym zrozumieniu procesów biologicznych zachodzących w plemnikach.

W roku sprawozdawczym pobrano materiał badawczy w postaci próbek nasienia od 4 knurów rasy PBZ, w dwóch powtórzeniach. Nasienie (frakcja gęsta) po pobraniu została rozrzedzona w rozcieńczalniku Biosolvens Plus (Biocheffa, Polska). Próbkę nasienia traktowano maślanem sodu (NaBu; ang. *sodium butyrate*) w stężeniach: kontrola – brak traktowania NaBu, przechowywane w 0,5mM NaBu, 0,75mM NaBu, 1,0 mM NaBu (96 próbek do analiz białkowych). Dla wszystkich grup, niezależnie od zastosowanych stężeń maślanu sodu, określono: standardowe parametry jakości nasienia, za pomocą systemu CASA (ang. *Computer Assisted Semen Analysis*), w celu określenia odsetka plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy; parametrów strukturalno-funkcjonalnych, takich jak integralności błon komórkowych, uszkodzeń chromatyny plemnikowej, stanu przepuszczalności błon akrosomalnych plemników oraz zmian w mitochondrialnym potencjale transbłonowym ($\Delta\Psi_m$).

Kolejnym etapem zaplanowanych badań była analiza modyfikacji potranslacyjnych (PTMs; ang. *post-translational modifications*) białek w plemnikach traktowanych NaBu oraz grupach kontrolnych. Zastosowano wirowanie w gradiencie Percoll® (Sigma) w celu wyodrębnienia plemników, a następnie izolowano białka w 1000 µl buforu lizującego (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 4% w/v CHAPS, 1% w/v DTT, 2% v/v Biolyte, 1% v/v koktajl inhibitorów proteazy, 0,1%

v/v nukleaza, oraz inhibitory deacetylaz oraz kinaz) przez 60 minut, przy użyciu homogenizatora mechanicznego (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Niemcy). Nierozpuszczalne resztki zostały usunięte przez odwirowanie (4°C, 15 000 g, 15 min.), a supernatant został użyty do oznaczenia stężenia białek w każdej analizowanej próbce. Próbkę po wyizolowaniu została oczyszczona przy użyciu acetonu i zawieszona w buforze rehydratacyjnym. Następnie zostały zamrożone do dalszych analiz.

Tabela.1 Podział na grupy doświadczalne

Grupa	Rodzaj nasienia	Traktowane inhibitorem acetylaz (NaBu)	Etap doświadczenia
I	Świeże	Nie	1
II	Kriokonserwowane	Nie	2
III	Świeże	Tak	3
IV	Kriokonserwowane	Tak	4

W celu analizy modyfikacji potranslacyjnych (acetylacja oraz analiza kinomu) przeprowadzono próby połączenia i wykorzystania metody 2D żeli z analizą Western blot, do identyfikacji pojedynczych białek. W tym celu, zastosowano przeciwciała wykrywające acetylację lizyny (Anti-Ki67 antibody, Abcam) oraz zestaw przeciwciał Phospho-Motif, które reagują z fosforylacją seryny, treoniny i tyrozyny.

Zestaw ten zapewnia strategię immunoblottingu, w celu przeanalizowania złożoności fosfoproteomu i określenia rodzin kinaz, zaangażowanych w regulację różnych procesów fizjologicznych. Korzystając z tej metody można ocenić globalne zmiany w fosforylacji białek, w różnych warunkach eksperymentalnych. Na tym etapie analiz opracowano i zoptymalizowano połączoną metodykę 2D żeli z Western Blot oraz dopracowano stężenia przeciwciał wykorzystywanych w metodyce.

Zadanie 01-18-22-21

Ocena wpływu lncRNA MALAT1 na proces adipogenezy z wykorzystaniem świńskich komórek pierwotnych adipocytów

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

Celem badań była analiza regulacji ekspresji genów przez cząsteczkę długiego niekodującego RNA (long-non coding RNA, lncRNA), zidentyfikowanego u świni domowej, wykazującego wysoką homologię z cząsteczką ludzkiego lncRNA – MALAT1. Ustalono w poprzednim badaniu u świni domowej, że cząsteczka ta ulega różnicowej ekspresji w podskórnej tkance tłuszczowej w zależności od grubości słoniny. U człowieka oraz myszy MALAT1 był wcześniej analizowany w kontekście otyśczenia oraz odkładania tkanki tłuszczowej. Jednak uzyskane wyniki nie odpowiedziały jednoznacznie czy rzeczywiście ma ona wpływ na proces adipogenezy, czy jest obojętna. Poszukiwanie genetycznego podłoża procesów związanych z odkładaniem tkanki tłuszczowej umożliwia dostarczenie nowych informacji pomocnych przy opracowaniu skutecznych narzędzi do regulacji poziomem tkanki tłuszczowej u zwierząt czy człowieka.

W proponowanym projekcie badania przeprowadzono na tkankach i komórkach tłuszczowych pobranych od dwóch loszek prezentujących niski (*Pietrain*) oraz wysoki poziom otyśczenia (złotnicka pstra) oraz na linii unieśmiertelnionych płodowych preadipocytów PSPA wieprzowych. W pierwotnych komórkach adipocytów (preadipocyty) wywołano nadekspresję genu MALAT1 w celu oceny jego wpływu na poziom transkryptomu oraz poziom miRNA i wy-

branych białek. Wybrane oznaczenia wymagają transfekcji komórek preadipocytów świńskich, metod towarzyszących jak sekwencjonowanie metodą Sanger'a i qPCR, niezbędnych do kontroli różnych etapów transfekcji, przygotowania bibliotek RNA i sekwencjonowania w technologii NGS, a także wykonania analizy *Western Blot* dla wybranych białek. Ponadto, oceniono profil ekspresji *MALAT1* w różnych tkankach świni, w tym w tkance tłuszczowej podskórnej, tkance tłuszczowej trzewnej, wątrobie oraz mięśniach szkieletowych. Dzięki takiemu podejściu zweryfikowano czy odpowiedź na podwyższoną ekspresję genu *MALAT1* jest jednako niezależnie od źródła pobranych komórek czy ma to istotny wpływ. Eksperymenty przeprowadzono w Laboratorium Genomiki Instytutu Zootechniki PIB oraz w Ośrodku Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej (OMEii) Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Uzyskanie informacji o wpływie lncRNA *MALAT1* na proces adipogenezy, a bezpośrednio na poziom ekspresji miRNA oraz innych genów dostarcza nowe informacje w zakresie wiedzy związanej z lncRNA oraz procesem odkładania się tkanki tłuszczowej. Projekt umożliwia wskazanie kierunku badań, które mają na celu opracowanie nowych narzędzi pomocnych przy sterowaniu poziomem tkanki tłuszczowej, a także umożliwia nakreślenie pewnej drogi naukowcom zajmującym się badaniem otyłości. Ponadto, w hodowli trzody chlewnej w Polsce od lat trwają prace mające na celu podwyższenie poziomu tkanki tłuszczowej w tuszach, ponieważ radykalnie obniżono go podczas wieloletnich selekcji w kierunku uzyskania bardziej mięsnych tusz. Jednak takie działania doprowadziły do utraty smakowitości mięsa wieprzowego. Z drugiej strony, wybór świni jako modelu badawczego w analizie procesów związanych z otyłością wydaje się wysoce trafny ze względu na analogie występujące między organizmami świni i człowieka.

Wyniki w ramach projektu powinny stanowić wysoką wartość dla naukowców pracujących nad skutecznymi narzędziami regulującymi poziom odtuszczenia organizmu, aby wskazać ścieżki jakie sieci są związane ze sterowaniem procesem adipogenezy, a także opracowaniem markerów genetycznych, które można wykorzystać w hodowli trzody chlewnej. Ponadto, uzyskane wyniki pozwalają na opracowanie wielu ciekawych publikacji, które mogą być złożone w ważnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym dotyczące tematyki zarówno alternatywnych możliwości wykorzystania zwierząt gospodarskich jak i walki z otyłością.

W eksperymencie uwzględniono cztery wieprzki rasy złotnicka pstra i pietrain (świnie eksperymentalne) oraz 2 loszki do testów (1 szt. pbz i 1 szt. wbp). Próbkę od świń testowych zostały pobrane w celu dopracowania metodyki izolacji preadipocytów. Poubojowo, przy wadze około 100 kg, od wieprzków pobrano materiał (tkanka wątrobową, tłuszczową z części brzusznej i grzbietowej, fragment mięśnia polędwicy oraz fragment wątroby) do badania ekspresji lncRNA *MALAT1*, które zostały ustabilizowane w buforze RNeasy lysis buffer oraz w ciekłym azocie kolejno powtórzenie. Od wszystkich świń testowych i eksperymentalnych pobrano materiał do wyprowadzenia hodowli preadipocytów w celu przeprowadzenia różnicowania i późniejszej transfekcji. Próbkę do hodowli komórkowych poddano izolacji na trzy sposoby kitem do izolacji Preadipocyte Isolation kit (ab196988), metodą swim-up oraz metodą enzymatyczną z zastosowaniem kolagenazy I i filtracji na 70 µm nylonowej siatce. Kolejno preadipocyty poddano w kulturach proliferacji i przeniesiono w celu różnicowania. Do różnicowania wybrano kit 3T3-L1 Differentiation Kit (abcam) oraz Preadipocyte Differentiation Medium (C-27436, Sigma Aldrich). Po różnicowaniu poddano ocenie z wykorzystaniem barwienia Lipid Staining Kit (abcam), a także z wykorzystaniem markerów dla adipogenezy (*FASN*, *LPL*, *SCD*, *PPARA*, *ACAA2*, *ALDH2*).

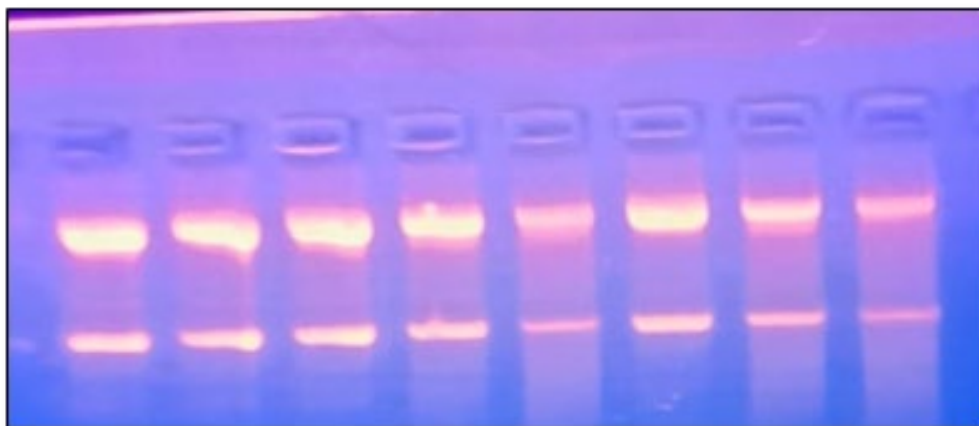
Ocenę profilu ekspresji *MALAT1* przeprowadzono dla różnych tkanek w/w pobranych od świni rasy złotnicka pstra oraz pietrain, uwzględniając izoformy *MALAT1*. Dodatkowo, na próbkach RNA, na których testowano postęp adipogenezy także został oceniony poziom ekspresji genu *MALAT1* z podziałem na izoformy. RNA z tkanek zostało wyizolowane za pomocą Trisol, specjalnego zestawu Synegen do tkanki tłuszczowej oraz zestawu Purelink RNA. Ocenę jakości

i ilości RNA wykonano na urządzeniu Nanodrop2000 oraz TapeStation2200. Następnie RNA zostało poddane odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA™ – Thermo Fisher Scientific. W programie Primer Express oraz Primer 3 zaprojektowano primery i sondy do dwóch izoform lncRNA genu MALAT1 (izoforma 1 – Forward Primer: CGGG AGC-CATGCGATGTG, Reverse Primer: AAACAAAGCAGAACCCACGA, Probe Sequence: GATA-GAGCGTCCTAGAGCGG, izoforma 2-Forward Primer: TCATGGTCTGCGTTTCTCATTATC, Reverse Primer: GCAATACTGCAGATGCAAGTTAACT, Probe Sequence: AAGAGTTGCTTCATATCAT). Kolejno oszacowano względny poziom ekspresji genu MALAT1 (uwzględniając jego izoformy). Ilościowa ocena transkryptu została przeprowadzona na urządzeniu Quant Studio7 flex. Jako kontrolę endogenną wykorzystano geny RPL27, RPS29 i OAZ1. Metoda Sangera posłużyła jako metoda pomocnicza przy ustalaniu obecności poszczególnych izoform. Na kolejnym etapie, w celu oceny świńskiego genu MALAT1 przeprowadzona zostanie ocena jego sekwencji promotorowych z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sangera; dla zidentyfikowania potencjalnych zmian polimorficznych zaprojektowana zostanie metoda szybkiej analizy genotypowania, wyznaczona zostanie frekwencja dla różnych ras świń, zróżnicowanych pod kątem otluszczenia, a także ocena wpływu tych zmian polimorficznych na cechy fenotypowe świń. Wszelkie obliczenia statystyczne w tym ocenę w różnicy poziomów ekspresji genów pomiędzy grupami przeprowadzono w programie SAS Entrepriise.

Ocena izolacji preadipocytów z tkanki podskórnej brzusznej oraz grzbietowej

W pierwszej kolejności uwzględniono świnię do testów (1pbz i 1wbp). Wieprzki eksperymentalne zostaną uwzględnione w kolejnym etapie. Wyizolowywane RNA z kultur preadipocytów poddanych różnicowaniu w 0. i 4. dniu hodowli było wysokiej jakości o dobrej integralności pod jednostek rybosomalnych (figura 1.).

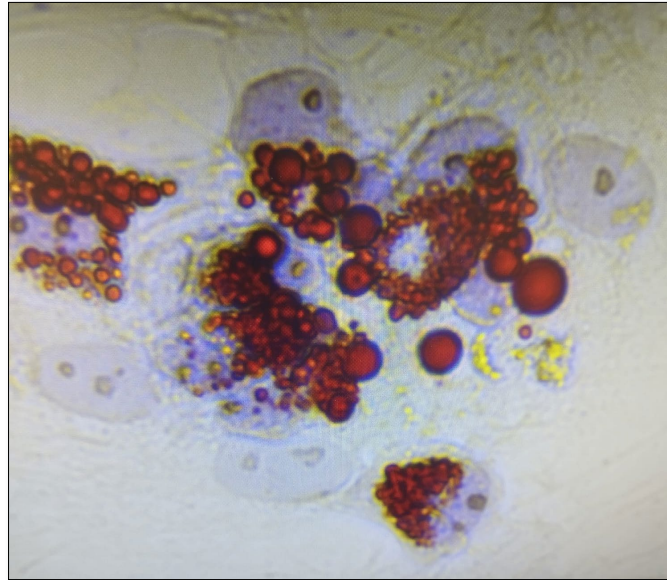
Figura 1. Rozdział elektroforetyczny wyizolowanego RNA z preadipocytów (4 ostatnie) oraz po różnicowaniu adipocytów (4 pierwsze) z tkanki tłuszczowej podskórnej grzbietowej oraz brzusznej



Wybarwienie komórek w 4. dniu hodowli dało pozytywny wynik. Zaobserwowano wyraźne kropki lipidowe wybarwione na czerwono (figura 2.), co świadczy o prawidłowym kierunku adipogenezy. Dodatkowo postęp adipogenezy został potwierdzony z wykorzystaniem markerów dla genów *PPARA*, *LPL*, *FASN*, *SCD*, *SLC27A1*, *ALDH2*. Dla znacznie wyższego poziomu ekspresji dla kultur komórek tłuszczowych pochodzących z tkanki podskórnej grzbietowej w porównaniu z tkanką podskórną brzuszną (figura 3.). Taki wynik świadczy o prawidłowym wyizolowaniu komórek preadipocytów i możliwości przystąpienia do dalszych etapów badania, polegającego

na modyfikacji ekspresji lncRNA *MALAT1* i obserwowaniu zachowania poszczególnych genów związanych z procesem adipogenezy.

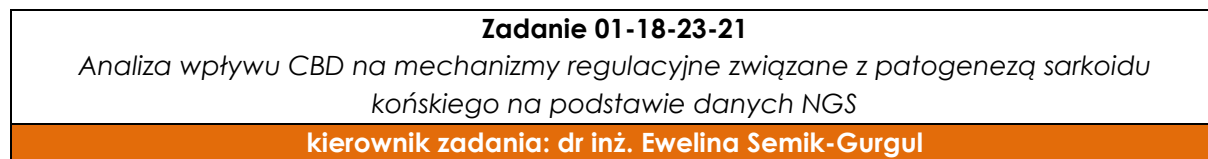
Figura 2. Obraz po barwieniu adipocytów Lipid Staining Kit (abcam) po różnicowaniu w hodowli 4-dniowej, na czerwono widoczne krople lipidowe



Ocena ekspresji genu *MALAT1* podczas adipogenezy oraz w różnych tkankach związanych z przemianami tłuszczowymi

Ocenie poddane zostały tkanki – podskórne tłuszczowe od strony brzusznej i grzbietowej, mięśniowa i wątrobowa. Przetestowana została ekspresja dwóch izoform genu *MALAT1*, izoformy ENSSSCT00000080860 oraz ENSSSCT00000077869. Izoforma ENSSSCT00000080860 ulegała ekspresji we wszystkich badanych tkankach, natomiast ENSSSCT00000077869 tylko w tkance mięśniowej. W tkance podskórnej grzbietowej zaobserwowano istotnie różną ekspresję *MALAT1* ENSSSCT00000077860 pomiędzy badanymi rasami świń: pietrain i złotnicka pstra, różnice te były 5-krotnie wyższe w rasie pietrain w odniesieniu do złotnickiej pstrej. Pomiedzy badanymi rasami nie zaobserwowano więcej istotnych różnic. Co ciekawe w izolatach z tkanki tłuszczowej ekspresja izoformy *MALAT1* ENSSSCT00000077869 była na bardzo niskim poziomie. Natomiast obserwacje poczynione na wyizolowanych preadipocytach wskazały, że izoforma ta ulega w komórkach preadipocytów znacznie wyższej ekspresji (figura 3.), co jest związane z tym, że tkanka tłuszczowa prócz preadipocytów i adipocytów zawiera jeszcze dużo innych rodzajów komórek. Dodatkowo wstępne obserwacje poczynione podczas adipogenezy wskazały na wyższy poziom ekspresji *MALAT1* izoformy ENSSSCT00000080860 w komórkach preadipocytów w odniesieniu do adipocytów po 4 dniu hodowli na podłożu różnicującym w liniach uzyskanych z tkanki podskórnej brzusznej. Natomiast w liniach preadipocytów uzyskanych z tkanki podskórnej grzbietowej dla rasy WBP ekspresja genu *MALAT1*.

Pobrano materiał od czterech świń dwóch ras (pietrain i złotnicka pstra), w tym tkankę tłuszczową wątrobową oraz mięśniową. Z tkanki tłuszczowej podskórnej wyizolowano komórki pierwotne adipocytów i zoptymalizowano warunki izolacji. Preadipocyty zostały zamrożone do dalszych preparatów związanych z transfekcją. W przygotowaniu jest publikacja przeglądowa dotycząca funkcji genu *MALAT1* – „*MALAT1* as a long non-coding RNA with multiple functions and its role in processes associated with fat deposition”.



Hipoteza badawcza zakładała, że podanie CBD spowoduje znaczące zmiany w poziomie transkrypcji wielu genów, a ich intensywność i profil będą zależę od dawki i czasu podania. Zakładano również, że będziemy mogli zaobserwować wyraźny spadek proliferacji komórek nowotworowych i wzrost aktywności apoptotycznej prowadzącej do śmierci komórek. Uzyskane wyniki dostarczają cennych informacji niezbędnych do oceny potencjału i zakresu zastosowań CBD nie tylko w medycynie ludzkiej, ale także w medycynie weterynaryjnej i leczeniu sarkoidów końskich. Stanowią podstawę do dalszych badań dotyczących analizy zmian w epigenomie i proteomie pod wpływem działania kannabidolu.

204

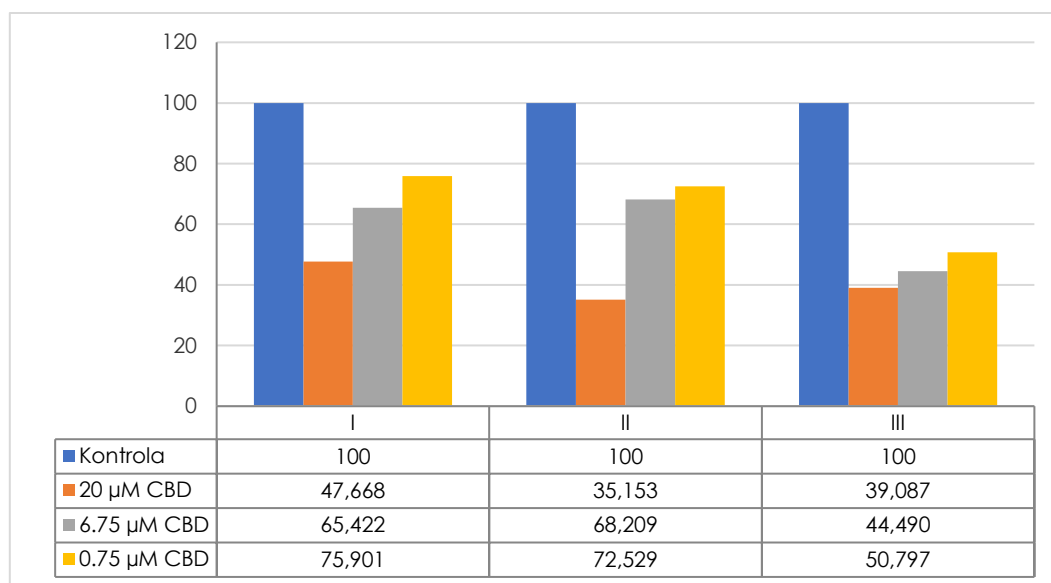
Z pobranych próbek sarkoidów wyprowadzono hodowle pierwotne, a następnie na komórkach trzeciego i czwartego pasażu przeprowadzono doświadczenie oceniające zarówno wpływ różnych dawek CBD (20, 6,75, 2,25 oraz 0,67 μM), jak i różnych czasów inkubacji (6h, 24h, 48h, 72h). Za pomocą testów komórkowych analizowano następujące parametry komórek sarkoidowych: żywotność, cytotoksyczność, stopień apoptozy, aktywność inwazyjną oraz stężenie MMP-2.

Do oceny wpływu CBD na żywotność komórek sarkoidu zastosowano test ApoTox-Glo (Promega), który pozwala na jednoczesne oznaczenie trzech parametrów, tj. żywotności, cytotoksyczności i stopnia apoptozy komórek, w tym samym dołku płytki hodowlanej, dla danych warunków doświadczalnych. Co ciekawe, po 6h inkubacji największą cytotoksyczność wywołała najniższa dawka 0,67 μM CBD (28,5% komórek uległo lizie). Po upływie 24 godzin obserwowano wzrost liczby komórek, które uległy apoptozie. Zależnie od dawki CBD wynosił on odpowiednio: 34,2% (20 μM CBD), 25,2% (6,75 μM CBD), 27,5% (2,25 μM CBD) oraz 25,6% (0,67 μM CBD). Pomiar cytotoksycznego wpływu CBD po 48h wykazał, że dawki 20-2,25 μM CBD spowodowały lizę prawie 60-70% komórek. Po 72 godzinach inkubacji żywotność komórek sarkoidowych nie przekraczała 5%.

Jak wiadomo, potencjał inwazyjny komórek zależy od ich zdolności do degradowania macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Degradacja macierzy jest bezpośrednio związana z wydzielaniem przez komórki zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, czyli metaloproteinaz macierzowych. Dwa główne typy metaloproteinaz, to białka z grupy MMP (*matrix metalloproteinase*) i ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*). Do oceny aktywności inwazyjnej komórek sarkoidowych (analiza komórek wyprowadzonych z trzech różnych sarkoidów) wykorzystano test fluorometryczny QCM Cell Invasion Assay (Milipore) (pomiar oddziaływania komórek nowotworowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej).

Po pierwsze wykazano, że komórki wszystkich trzech sarkoidów posiadają aktywność inwazyjną. Ponadto, wykazano, że po 24 godzinach inkubacji tych komórek z 20 μM CBD istotnie obniża się ich potencjał inwazyjny, średnio o 40,6% (figura 1.). Dodatkowo, oznaczono stężenie MMP-2 (Milipore, ELISA kit) w medium po hodowli komórek sarkoidowych. Odnotowano istotny spadek stężenia tej metaloproteinazy dla komórek inkubowanych, z najwyższym stężeniem CBD po 6, 24 oraz 48 godzinach, czego nie obserwowano dla pozostałych dawek.

Figura 1. Ocena aktywności inwazyjnej komórek sarkoidu końskiego



Na podstawie wyniku testów komórkowych zdecydowano, że do dalszych analiz będą zastosowane trzy dawki CBD (20, 6,75 oraz 0,67 μ M CBD) oraz trzy czasy inkubacji (6h, 24h, 48h). Hodowle przeprowadzono dla trzech prób sarkoidów, dodatkowo w trzech powtórzeniach technicznych, łącznie uzyskując 108 prób biologicznych. Z uzyskanych próbek wyizolowano całkowite RNA z użyciem komercyjnego zestawu AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen). Ocenę jakościową wyizolowanego RNA, przeprowadzono z użyciem aparatu TapeStation (wskaźnik integralności RNA – RIN w zakresie od 8,9 do 10,0), natomiast ocenę ilościową wykonano metodą spektrofotometryczną na aparacie NanoDrop. Materiał zabezpieczono do dalszych analiz.

Zadanie 01-18-24-21

Charakterystyka polimorfizmów SNP w genomie sarkoidów końskich w kontekście ich związków z patogenezą

kierownik zadania: dr inż. Klaudia Pawlina-Tyszko

Cel realizowanego zadania:

- identyfikacja *de novo* polimorfizmów SNP w genomie mitochondrialnym sarkoidów końskich i tkanki zdrowej oraz walidacja zidentyfikowanych uprzednio z wykorzystaniem mikromacierzy polimorfizmów SNP w genomie jądrowym,
- ocena *in silico* potencjalnego wpływu występujących polimorfizmów na strukturę białka oraz poziom ekspresji,
- analiza empiryczna poziomu ekspresji wybranych genów ze zidentyfikowanymi polimorfizmami oraz liczby kopii mitochondrialnego DNA pod kątem zaburzeń występujących podczas procesów onkogenezy zachodzących w sarkoidach.

1. Identyfikacja polimorfizmów SNP

Materiał badawczy stanowiło DNA oraz RNA wyizolowane z 31 próbek sarkoidów oraz 15 próbek tkanki zdrowej i zgromadzone w Laboratorium Genomiki Instytutu Zootechniki PIB.

a) polimorfizmy w genomie jądrowym

W oparciu o dane z mikromacierzy SNP, uzyskane w ramach poprzednich badań wytypowano sześć polimorfizmów SNP, które zlokalizowane były w obrębie następujących genów powiązanych z występowaniem nowotworów: ANO6 (anoctamin 6) G>A, TRPM2 (transient receptor potential cation channel subfamily M member 2) G>T, LPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1) G>A, CNTLN (centlein) A>G, ZDHHC1 (zinc finger DHHC-type containing 1) T>C, AFDN (afadin, adherens junction formation factor) T>C. Startery umożliwiające ich amplifikację zaprojektowano w programie Primer3Plus, na podstawie referencyjnego genomu konia EquCab3.0. Z wykorzystaniem tych starterów oraz polimerazy Hot-Start Taq (Qiagen) przeprowadzono reakcje PCR, a następnie HRM (High Resolution Melting Curve), mające na celu identyfikację występujących w badanych próbkach genotypów, w oparciu o różnice w krzywych topnienia amplikonów DNA dla poszczególnych *alleli*. W tym celu wykorzystano zestaw MeltDoctor HRM Master Mix (Thermo Fisher), zgodnie z protokołem producenta, na urządzeniu QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). W celu określenia genotypów referencyjnych oraz walidacji uzyskanych wyników, wybrane próbki poddano sekwencjonowaniu Sangera z wykorzystaniem aparatu 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uzyskane sekwencje porównano z genomem referencyjnym, z wykorzystaniem narzędzia BLAST (Ensembl), w celu potwierdzenia ich prawidłowości.

b) polimorfizmy w genomie mitochondrialnym

Dla wybranych do analiz genów mitochondrialnych, o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania tych organelli, takich jak: *ND1* (NADH dehydrogenase subunit 1), *ND5* (NADH dehydrogenase subunit 5), *ND6* (NADH dehydrogenase subunit 6), *CYB* (cytochrome-b) oraz *ATP6* (ATP synthase F0 subunit 6) zaprojektowano startery i przeprowadzono amplifikację PCR analogicznie jak w poprzednim etapie. Uzyskane produkty poddano procedurze sekwencjonowania Sangera. W tym celu oczyszczono je z wykorzystaniem zestawu enzymów FastAP/Exo1 (Thermo Fisher Scientific). PCR sekwencyjny przeprowadzono z użyciem zestawu BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific), a oczyszczono zestawem BigDye X-terminator (Thermo Fisher Scientific), wg standardowych protokołów. Elektroforezę kapilarną wykonano na urządzeniu 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sekwencje wynikowe porównano z genomem referencyjnym w celu potwierdzenia ich prawidłowości, wykorzystując narzędzie BLAST (Ensembl).

2. Funkcjonalna analiza zidentyfikowanych SNP

Zidentyfikowane SNP przeanalizowano pod kątem funkcjonalnym, z wykorzystaniem narzędzia Variant Effect Predictor (VEP) (Ensembl) oraz PROMO i bazy danych TRANSFAC, co pozwoliło określić potencjalny wpływ zidentyfikowanych polimorfizmów na strukturę białka oraz wiązanie się czynników transkrypcyjnych. Następnie przeprowadzono ocenę poziomu ekspresji wybranych genów. RNA badanych próbek poddano odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase enzyme (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z protokołem producenta. Reakcje qPCR przeprowadzono z użyciem zestawu PowerTrack Sybr Green PCR miks (Thermo Fisher Scientific), na urządzeniu Quant Studio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific). Relatywny poziom ekspresji badanych genów określono z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta C_t$, w oparciu o wynik dla genu stanowiącego kontrolę endogenną, tj. *UBB* (ubiquitin B). Określono również liczbę kopii mitochondrialnego DNA. W tym celu zastosowano metodę qPCR, w oparciu o matrycę DNA. Reakcje przeprowadzono korzystając z zestawu PerfeCTa SYBR® Green FastMix (Quantabio) i aparatu Quant Studio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific), wg zalecanego protokołu. Liczbę kopii mtDNA oszacowano w odniesieniu do wyników dla genu referencyjnego *HBB* (*hemoglobin subunit beta*), w oparciu o metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Analiza funkcjonalna VEP wykazała, iż wybrane polimorfizmy SNP w genach jądrowych są zmianami sensu, czyli doprowadzają do wprowadzenia innego aminokwasu w strukturę białka, a co za tym idzie mogą wpływać na jego funkcjonowanie. Z wykorzystaniem metody HRM ustalono genotypy poszczególnych próbek, ich frekwencje, frekwencje alleli oraz współczynnik MAF czyli frekwencję rzadszego *allelu* (tabela 1.). Uzyskane wyniki ujawniły brak polimorfizmu SNP genu *LPCAT1* w badanych próbkach sarkoidów i tkanki zdrowej. Dla pozostałych genów zidentyfikowano, zarówno *allele* referencyjne jak i polimorficzne, tworzące wszystkie możliwe genotypy za wyjątkiem genu *AFDN*, dla którego nie zidentyfikowano homozygoty SNP w żadnej z badanych próbek. Porównanie próbek sarkoidów oraz tkanki kontrolnej wykazało zróżnicowane frekwencje poszczególnych *alleli* genów. Największe różnice zaobserwowano dla genu *CNTLN*, dla którego frekwencja *allelu* referencyjnego (A) w próbkach sarkoidu wyniosła 0,11, a w próbkach tkanki zdrowej 0,37. W przypadku tego genu w próbkach sarkoidu nie odnotowano również występowania homozygoty referencyjnej AA.

Tabela 1. Dane na temat frekwencji polimorfizmów SNP zlokalizowanych w genach genomu jądrowego próbek sarkoidów i tkanki kontrolnej

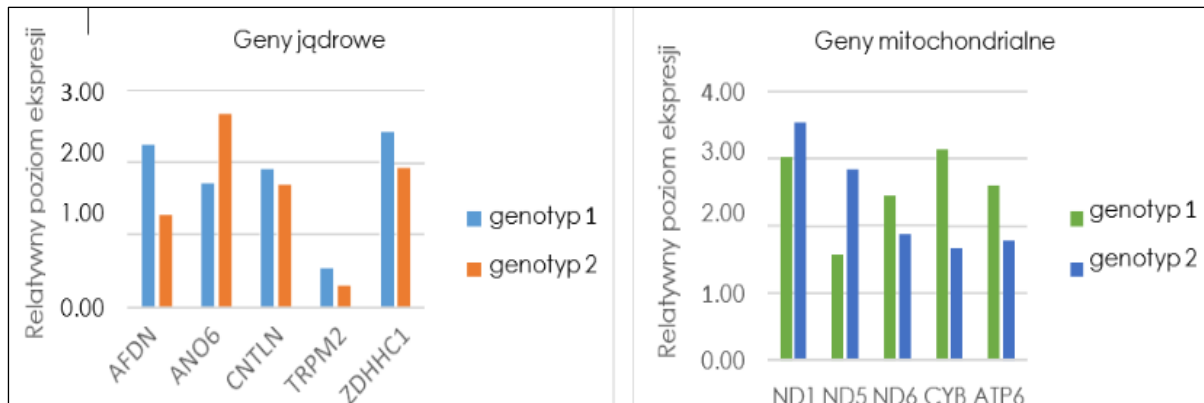
Symbol genu (REF>SNP)	Frekwencja genotypu			Frekwencja <i>allelu</i>		
ANO6 (G>A)	GG	GA	AA	G	A	MAF
sarkoidy	0.35	0.29	0.35	0.50	0.50	0.50
kontrola	0.13	0.47	0.40	0.37	0.63	0.37
TRPM2 (G>T)	GG	GT	TT	G	T	MAF
sarkoidy	0.26	0.39	0.35	0.45	0.55	0.45
kontrola	0.07	0.27	0.67	0.20	0.80	0.20
CNTLN (A>G)	GG	AG	AA	G	A	MAF
sarkoidy	0.77	0.23	0.00	0.89	0.11	0.11
kontrola	0.40	0.47	0.13	0.63	0.37	0.37
ZDHHC1 (T>C)	TT	TC	CC	T	C	MAF
sarkoidy	0.03	0.16	0.81	0.11	0.89	0.11
kontrola	0.00	0.33	0.67	0.17	0.83	0.17
AFDN (A>G)	GG	AG	AA	G	A	MAF
sarkoidy	0.65	0.35	0.00	0.82	0.18	0.18
kontrola	0.87	0.13	0.00	0.93	0.07	0.07

REF – *allel* referencyjny; SNP – polimorfizm typu SNP; MAF – *minor allele frequency*

Dla wybranych do analiz genów mitochondrialnych przeprowadzono identyfikację *de novo* polimorfizmów SNP. Dla żadnej z próbek nie odnotowano różnych genotypów w obrębie jednej sekwencji, co wskazuje na brak zjawiska heteroplazmii mitochondrialnego DNA. Dla każdego z analizowanych genów zidentyfikowano szereg polimorfizmów uprzednio adnotowanych w bazie *Ensembl* oraz trzy nowe. Porównanie próbek sarkoidów oraz kontroli wykazało zróżnicowane frekwencje poszczególnych *allelu*; przy czym dla trzech polimorfizmów występujących w obrębie genu *ND6* w żadnej z próbek nie wykryto *allelu* referencyjnego. Nowe polimorfizmy SNP zostały zidentyfikowane tylko w próbkach sarkoidów. Największą różnicę we frekwencji *allelu* SNP zidentyfikowano dla polimorfizmu 22 w genie *ND1*, który występował 2,77 razy częściej w próbkach zdrowych niż w próbkach sarkoidu. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla polimorfizmów 69 i 89 w genie *ND5*, które wykryto w 1,58 razy większej liczbie próbek sarkoidów niż kontroli.

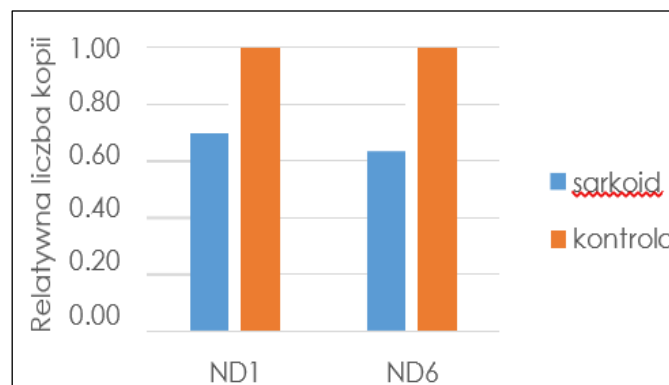
Analiza miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych wykazała potencjalny wpływ badanych polimorfizmów na liczbę wiążących się czynników oraz ich profil. W następnym etapie, w celu empirycznego zwalidowania takiego wpływu, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji badanych genów z wykorzystaniem metody qPCR. Uzyskane profile ujawniły zmiany w ekspresji w zależności od występującego *allelu*. Największe różnice odnotowano dla genów *AFDN* (różnica w ekspresji = 0,97) oraz *ANO6* (różnica w ekspresji = 0,96), których ekspresja była wyższa w próbkach będących homozygotą pod względem SNP. Spośród genów mitochondrialnych, najbardziej podwyższony poziom ekspresji zaobserwowano dla genu *CYB* w próbkach z *allelem* SNP (różnica w ekspresji = 1,47). Najmniejsze różnice ekspresji zidentyfikowano z kolei dla genów *CNTLN* (0,21) oraz *TRPM2* (0,23) (rycina 1., 2.).

Rycina 1. i 2. Wykresy przedstawiające relatywny poziom ekspresji badanych genów zlokalizowanych w genomie jądrowym oraz mitochondrialnym. Dla każdego z genów przedstawiono poziom ekspresji w próbkach o odmiennych genotypach pod względem zidentyfikowanego polimorfizmu SNP



Z uwagi na zidentyfikowane zmiany w poziomach ekspresji genów mitochondrialnych oraz znaczenie mitochondriów w patogenezie nowotworów, w ostatnim etapie badań określono również liczbę kopii mitochondrialnego DNA. Uzyskane wyniki wykazały zmniejszoną liczbę kopii mitochondrialnego w próbkach sarkoidów w porównaniu do kontroli (rycina 3.). Różnice w relatywnej liczbie kopii wyniosły -0,30 oraz -0,37, w oparciu o geny *ND1* i *ND6*, kolejno.

Rycina 3. Wykres przedstawiający średnią relatywną liczbę kopii mitochondrialnego DNA w sarkoidach w odniesieniu do tkanki kontrolnej, w oparciu o analizę dwóch genów mitochondrialnych (*ND1* i *ND6*)



Oszacowane na podstawie uzyskanych wyników frekwencje występowania poszczególnych *alleli* i genotypów nie wskazały na żadne polimorfizmy jako potencjalne mutacje przyczynowe sarkoidów, z uwagi na brak 100% frekwencji w obrębie tylko jednej z badanych grup. Jednakże, porównanie frekwencji ujawniło występowanie pewnych różnic pomiędzy badanymi grupami, zarówno dla genotypów jak i *alleli*, za wyjątkiem genu *LPCAT1*. Wskazywać to może na dużą plastyczność w zakresie ekspresji poszczególnych *alleli* oraz pewien wpływ funkcjonalny zidentyfikowanych zmian. Zmiany te najprawdopodobniej stanowią jeden z kilku elementów zaangażowanych w inicjację i progresję zaburzenia procesów w komórkach nowotworowych sarkoidów.

Jednym z mechanizmów zaangażowanych w wywieranie takiego wpływu może być zmiana w profilu czynników transkrypcyjnych wiążących się w miejscu zidentyfikowanego polimorfizmu, a co za tym idzie, dalsza zmiana poziomu ekspresji genu. Uzyskane wyniki ujawniły zróżnicowanie profilu wiązania czynników transkrypcyjnych oraz poziomu ekspresji w zależności

od obecnego w sekwencji *allelu*, co wskazuje na potencjalny wpływ występujących zmian jako pośrednich regulatorów ekspresji genów.

Przeprowadzona w ostatnim etapie analiza liczby kopii mitochondrialnego DNA wykazała obniżoną liczbę w próbkach sarkoidów, w porównaniu do próbek kontroli. Związane to może być ze zmienionym działaniem maszynerii mitochondrialnej, co odnotowywane jest w procesach transformacji neoplastycznej. Sugeruje to iż zmiany liczby kopii mtDNA mogą być jednym z czynników związanych z onkogenezą sarkoidów i wpływających na poziom ekspresji genów.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczenie zidentyfikowanych polimorfizmów SNP w transformacji neoplastycznej sarkoidów końskich, jako jednego z możliwych elementów zaangażowanych w zaburzenia prawidłowych procesów komórkowych. Przeprowadzone analizy wykazały, iż ich efekt może być wywierany nie tylko poprzez modyfikację struktury białka i jego działania, ale również poprzez zmiany w poziomie ekspresji genów za sprawą czynników transkrypcyjnych. Ponadto, rezultaty przeprowadzonych analiz implikują znaczenie zaburzeń funkcjonowania mitochondriów w patogenezie sarkoidów, co sugeruje obniżona liczba kopii mitochondrialnego DNA w próbkach sarkoidów.

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
kierownik: dr hab. Monika Trzcińska, prof. IZ PIB

Zadanie 01-19-10-21

Określenie potencjalnych markerów jakościowych kriokonserwowanego i liofilizowanego nasienia knura warunkujących skuteczne pozaustrojowe zapłodnienie (ICSI) – badania wstępne

kierownik zadania: dr hab. Monika Trzcińska, prof. IZ PIB

W niniejszym zadaniu badano wpływ technik kriokonserwacji i liofilizacji nasienia knurów na jakość plemników, ocenianą na podstawie profilu proteomicznego oraz stopnia fragmentacji DNA. Jednocześnie, w celu określenia zdolności zapładniających kriokonserwowanego i liofilizowanego nasienia przeprowadzono próby *in vitro* z wykorzystaniem zapłodnienia pozaustrojowego przy użyciu techniki ICSI.

Ogółem, ocenie poddano nasienie pochodzące od pięciu knurów (trzy ejakulatory/knur). Za pomocą modułu *SCA® Motility and Concentration* oceniono w nasieniu świeżym odsetek plemników wykazujących ruch całkowity oraz ruch postępowy, który wynosił odpowiednio $87,5 \pm 3,4$ oraz $81,1 \pm 4,1$.

W oparciu o cytometryczną ocenę stopnia integralności chromatyny jądrowej wykazano, że średni udział procentowy plemników wykazujących fragmentację DNA (DFI) rozkładał się następująco: $1,6 \pm 0,5$ – w nasieniu świeżym; $1,7 \pm 0,3$ – w nasieniu liofilizowanym i $1,7 \pm 0,6$ – w nasieniu kriokonserwowanym. Nie stwierdzono istotnych różnic ($p \geq 0,05$), nie tylko w odsetku plemników z DFI między ejakulatami pochodzącymi od tego samego knura, lecz także w odsetku plemników z DFI między ejakulatami pochodzącymi od 5 poszczególnych osobników – zarówno w odniesieniu do nasienia świeżego, liofilizowanego jak również kriokonserwowanego.

Wyniki analiz proteomicznych przy zastosowaniu metody *Western blot* zaprezentowano w postaci rycin, które przedstawiają wykresy słupkowe obrazujące różnice w relatywnej ekspresji (półilościowym profilu) białek SPACA1, AFAF oraz UQCRC2 w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego, liofilizowanego i mrożonego pobranych z ejakulatów knurów. Przykładowe wyniki dla knura nr 1 oraz nr 2 przedstawiono na rycinie 1., 2. oraz rycinie 3.

Na uwagę zasługuje fakt, że w przypadku trzech z pięciu knurów (knur 1., knur 3. oraz knur 4.) potwierdzono istotną zmianę w relatywnej ekspresji białka SPACA1 w plemnikach kriokonserwowanych w stosunku do plemników w nasieniu świeżym i plemników liofilizowanych. Jednocześnie, w przypadku tego białka, nie zaobserwowano różnic w relatywnej ekspresji między plemnikami w nasieniu świeżym i plemnikami liofilizowanymi. Ponadto, warto podkreślić, że w przypadku knura 2. i knura 5. nie zidentyfikowano statystycznie istotnych zmian w ekspresji białka SPACA1 między próbkami plemników, pochodzących z nasienia świeżego oraz próbkami plemników liofilizowanych i kriokonserwowanych. Biorąc pod uwagę białko AFAF, zaobserwowano istotny spadek jego ekspresji w próbkach plemników liofilizowanych zarówno w przypadku knura 1., jak i w przypadku knura 3. W odniesieniu do knura 2., istotny spadek relatywnej ekspresji tego białka stwierdzono zarówno w próbkach plemników liofilizowanych, jak i kriokonserwowanych. Z kolei, w przypadku knurów 4. i 5., nie stwierdzono istotnych różnic między próbkami plemników pochodzących z nasienia świeżego, jak i próbkami plemników poddanych długoterminowej konserwacji (niezależnie od zastosowanej metody konserwacji). Przykładowe wyniki analizy *Western blot* dotyczące relatywnej ekspresji białka AFAF w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego, plemników liofilizowanych oraz plemników kriokonserwowanych przedstawiono w formie ryciny 1.

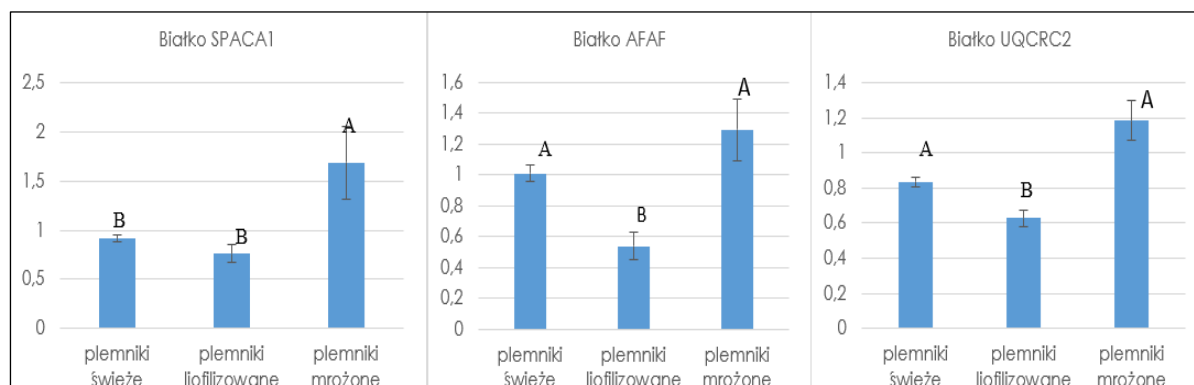
Rycina 1. Przykładowe wyniki analizy *Western blot*, dotyczące relatywnej ekspresji białka AFAP w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego, plemników liofilizowanych oraz plemników kriokonserwowanych (mrożonych). Reprezentatywne prążki wskazujące na ekspresję białka AFAP w poszczególnych próbkach. α -Tubulina stanowi białko referencyjne w odniesieniu do wszystkich analizowanych próbek, pozwalające przy użyciu odpowiednich przeciwciał na określenie półilościowego profilu białka podawanego do rozdziału w każdej ze ścieżek (prążki kontrolne)



Analiza wyników relatywnej ekspresji białka UQCRC2 wykazała istotny spadek poziomu tego białka w przypadku próbek plemników liofilizowanych pochodzących od knura 1. i knura 2. w odniesieniu do plemników z nasienia świeżego.

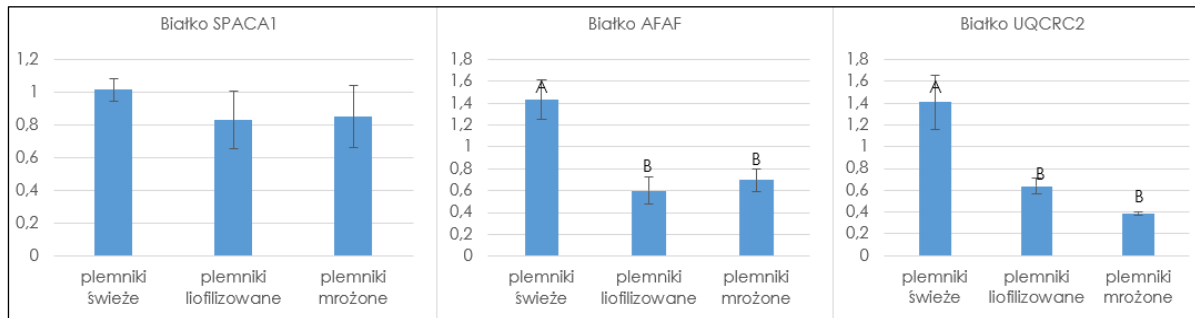
Ponadto, plemniki kriokonserwowane pochodzące od knura 2. charakteryzowały się również znaczącym obniżeniem relatywnej ekspresji białka UQCRC2 w stosunku do tego wskaźnika odnotowanego dla próbek nasienia świeżego. Z kolei, w przypadku knura 3. i knura 4., istotną zmianę (odpowiednio: wzrost i spadek) półilościowego profilu białka UQCRC2 odnotowano w przypadku próbek plemników mrożonych, odnosząc relatywną ekspresję tego białka do poziomu zidentyfikowanego w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego oraz w próbkach plemników liofilizowanych.

Rycina 2. Wyniki analizy *Western blot* zaprezentowane w formie wykresów słupkowych, obrazujących różnice w relatywnej ekspresji (półilościowym profilu) białek SPACA1, AFAP oraz UQCRC2 w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego, liofilizowanego i mrożonego pobranego z ejakulatów knura 1.



Różne oznaczenia literowe a, b oraz A, B wskazują na istnienie różnic statystycznie istotnych między poszczególnymi grupami doświadczalnymi – z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego, odpowiednio: $p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$

Rycina 3. Wyniki analizy Western blot zaprezentowane w formie wykresów słupkowych obrazujących różnice w relatywnej ekspresji (półilościowym profilu) białek SPACA1, AFAF oraz UQCRC2 w próbkach plemników pochodzących z nasienia świeżego, liofilizowanego i mrożonego pobranego z ejakulatów knura 2.



Różne oznaczenia literowe a, b oraz A, B wskazują na istnienie różnic statystycznie istotnych między poszczególnymi grupami doświadczalnymi – z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego, odpowiednio: $p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$.

W kolejnym etapie badań podjęto próby określenia zdolności zapładniających plemników knura z nasienia świeżego oraz nasienia poddanego technikom długoterminowego przechowywania: kriokonserwacji i liofilizacji. W tym celu do zapłodnienia *in vitro* techniką ICSI wykorzystano nasienie knura 4. (3 ejakulatory). Jakość plemników użytych do ICSI oceniono we wcześniejszym etapie badań.

Efektywność zapłodnienia pozaustrojowego oocytów metodą ICSI była oceniana na podstawie parametrów potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków obejmujących ich aktywność podziałową, odsetek uzyskanych morul oraz odsetek uzyskanych blastocyst (tabela 1.). Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku dzielących się zarodków, morul oraz blastocyst w zależności od metody konserwacji plemników użytych do procedury ICSI.

Tabela 1. Wpływ metod konserwacji plemników na potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego techniką ICSI

Plemniki	Liczba dojrzałych <i>in vitro</i> zapłodnionych techniką ICSI	Odsetek dzielących się zarodków (%)	Odsetek morul (%)	Odsetek blastocyst (%)
świeże	31	18/31 (58,1)	8/31 (25,8)	6/31 (19,4)
mrożone	34	22/34 (64,7)	7/34 (20,6)	5/34 (14,7)
liofilizowane	23	15/23 (65,2)	5/23 (21,7)	5/23 (21,7)

W oparciu o zależność parametrów potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków uzyskanych w następstwie zapłodnienia pozaustrojowego techniką ICSI od wskaźników profilu proteomicznego plemników pochodzących z nasienia świeżego, plemników poddanych kriokonserwacji oraz plemników liofilizowanych, wykazano brak korelacji między tymi wynikami w odniesieniu do relatywnej ekspresji białek UQCRC2 oraz SPACA1. Negatywną korelację odnotowano natomiast między poziomem relatywnej ekspresji białka AFAF w plemnikach kriokonserwowanych użytych do procedury ICSI a odsetkiem dzielących się zarodków oraz odsetkiem uzyskanych morul, co może sugerować obniżenie zdolności zapładniających plemników mrożonych, pochodzących od knura 4., będące bezpośrednim następstwem spadku, zależnej od białka AFAF, efektywności procesów kapacytacji i reakcji akrosomalnej.

Wnioski:

1. Nie wykazano negatywnego wpływu metod długoterminowego przechowywania nasienia knurów (kriokonserwacji i liofilizacji) na integralność chromatyny jądrowej plemników.

2. Wykazano dużą zmienność osobniczą między ilościowymi profilami proteomicznymi związanymi z relatywną ekspresją wybranych białek akrosomalnych (AFAF, SPACA1) oraz mitochondrialnych (UQCRC2) plemników, w zależności od zastosowanej metody konserwacji nasienia knurów (mrożenia lub liofilizacji).
3. Stwierdzono obniżenie zdolności zapładniającej kriokonserwowanych plemników knura 4., będące skutkiem wysokiego poziomu przedkapacytacyjnej ekspresji białka AFAF oraz obniżonej zdolności do zużycia przedkapacytacyjnej puli tego białka w mrożonych plemnikach tego knura. Jednakże z uwagi na fakt, że do procedury ICSI wykorzystano jedynie plemniki pochodzące od knura 4., niezbędne jest przeprowadzenie dalszych, szczegółowych badań na określenie częstości występowania różnic międzyosobniczych w zdolnościach zapładniających plemników.

Zadanie 01-19-11-21

Określenie zmian profilu transkryptomycznego, epigenomowego i molekularnego mezenchymalnych komórek macierzystych świni w zależności od różnych ścieżek różnicowania in vitro

kierownik zadania: dr hab. Monika Trzcińska, prof. IZ PIB

Cele zadania:

- izolacja *post mortem*, wyprowadzanie oraz ocena fluorocytochemiczna szpikopochodnych i adipogennych komórek MSCs w stanie nieodróżnionym,
- weryfikacja klasycznych ścieżek różnicowania *in vitro* komórek MSCs w kierunku osteoblastów/osteocytów, chondroblastów/chondrocytów i adipocytów,
- kompleksowa charakterystyka ścieżek cytotydyferencji wewnątrzmezodermalnej oraz transdyferencji mezodermalno-ektodermalnej.

W ramach realizacji zadania pozyskano materiał biologiczny od 28 loch różnych ras. Od każdego osobnika pobrano szpik kostny czerwony (BM) z talerza kości biodrowej oraz biopłaty tkanki tłuszczowej (AT), z których wyizolowano *post mortem* dwa typy mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs):

- szpikopochodne komórki MSCs (BM-MSCs),
- adipogenne komórki MSCs (AT-MSCs).

Wyprowadzono hodowle pierwotne i linie komórek MSCs, posiadające zdolność do samoodnawiania subpopulacji komórkowych w warunkach pozaustrojowych. Następnie, komórki te poddawano weryfikacji immunofluorescencyjnej w kierunku potwierdzenia charakteru macierzystego pod kątem identyfikacji immunofenotypu obejmującego właściwy zakres ekspresji błonowych i transbłonowych markerów powierzchniowych (z rodziny kompleksów różnicowania – CD; ang. *clusters of differentiation*). Weryfikację przeprowadzono w oparciu o analizę cytometryczną ekspresji białek CD14, CD44, CD45, CD90 i CD105.

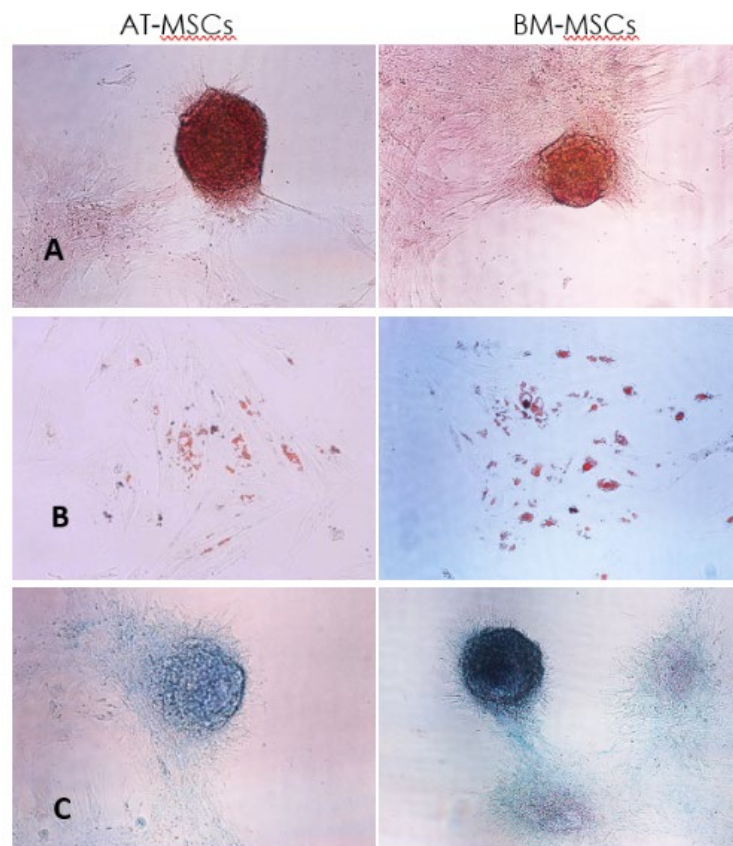
Podczas analiz, mających na celu immunofenotypowanie MSCs pochodzących z BM, stwierdzono, że 86,7% z nich wykazywało ekspresję markera powierzchniowego CD44, 96,3% – CD90, 20,2% – CD105, 12% – CD14 i 14,2% – CD45. Z kolei immunofenotypowanie MSCs, pochodzących z AT, potwierdziło, że około 77,6% komórek wykazywało ekspresję antygenu CD44, 99,4% – CD90, 67,7% – CD105, 20,5% – CD14 i około 30% – CD45 (tabela 1).

Tabela 1. Wyniki analizy cytometrycznej w kierunku określenia profilu ekspresji markerów powierzchniowych CD14, CD44, CD45, CD90 i CD105 w populacjach immunofluorescencyjnie oznakowanych komórek BM-MSCs i AT-MSCs

	CD14	CD44	CD45	CD90	CD105
BM-MSCs	11,96	86,68	14,19	96,31	20,18
AT-MSCs	20,47	77,59	29,91	99,40	67,71

Kolejnym etapem badań była weryfikacja zdolności komórek MSCs do różnicowania w warunkach *in vitro*. W tym celu przeprowadzono identyfikacje klasycznych ścieżek cytodyferencjacji w kierunku osteoblastów/osteocytów, chondroblastów/chondrocytów i adipocytów (rycina 1.).

Rycina 1. Pozytywna weryfikacja klasycznych ścieżek cytodyferencjacji wewnątrzmezo-dermalnej poprzez barwienie zróżnicowanych pochodnych komórek MSCs świni pozyskanych z tkanki tłuszczowej (AT) i szpiku kostnego (BM): A – osteoblasty/osteocyty pozytywnie wybarwione przy użyciu czerwieni alizarynowej (alizaryny S), B – adipocyty pozytywnie wybarwione przy użyciu czerwieni olejowej O, C – chondroblasty/chondrocyty pozytywnie wybarwione przy użyciu błękitu alcjanu



Do analizy profilu ekspresji genów z rodziny adipokin (leptyna, adiponektyna) oraz ich receptorów w niezróżnicowanych komórkach MSCs o potwierdzonym charakterze macierzystym oraz w komórkach tłuszczowych (adipocytach) uzyskanych w wyniku różnicowania adipogenicznego zastosowano metodę RT-qPCR. Oceniono ilościowy poziom aktywności transkrypcyjnej genów adiponektyny (*ADIPOQ*), receptora adiponektyny 1 (*ADIPO1*), receptora adiponektyny 2 (*ADIPO2*), leptyny (*LEP*) i genu receptora leptyny (*LEPR*) i porównywano profil ekspresji transkryptów mRNA między wszystkimi grupami niezróżnicowanych i adipogenicznie zróżnicowanych komórek BM-MSCs i AT-MSCs. Poziom różnic statystycznych weryfikowano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test *post hoc* Tukeya.

Analizie poddano następujące grupy eksperymentalne linii komórkowych pochodzących od 4 osobników żeńskich (loch):

- a) komórki MSCs wyizolowane ze szpiku kostnego (BM-MSCs),
- b) komórki MSCs wyizolowane z tkanki tłuszczowej (AT-MSCs),
- c) adipocyty uzyskane w wyniku zróżnicowania komórek MSCs pozyskanych ze szpiku kostnego,
- d) adipocyty uzyskane w wyniku zróżnicowania komórek MSCs pozyskanych z tkanki tłuszczowej.

Wykazano istotnie wyższy poziom ekspresji transkryptów ADIPOR1 w komórkach AT-MSCs w porównaniu do komórek BM-MSCs i ich adipogennych pochodnych ($p \leq 0,05$). Ponadto, analizy poziomu mRNA LEPR wykazały, że transkrypty te charakteryzują się wyższą ekspresją w adipocytach pochodzących ze zróżnicowanych komórek BM-MSCs w porównaniu do tych pochodzących ze zróżnicowanych komórek AT-MSCs oraz niezróżnicowanych komórek BM-MSCs i AT-MSCs ($p \leq 0,05$). Dodatkowo, nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach transkryptów mRNA dla ADIPOQ, ADIPOR2 lub LEP ($p > 0,05$).

W wyniku hodowli *in vitro* wyizolowano i zbankowano 60 linii komórkowych MSCs pozyskanych ze szpiku kostnego czerwonego (BM-MSCs) oraz 39 linii komórkowych MSCs pozyskanych z biopsatów tkanki tłuszczowej (AT-MSCs). Do analiz wykorzystano w sumie 15 linii komórkowych BM-MSCs oraz 13 linii komórkowych AT-MSCs.

Zadanie 04-19-10-21

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

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

Celem zadania było uzyskanie transgenicznych świń z knock-outem (KO) genu miostatyny (MSTN). Do uzyskania osobników transgenicznych zastosowano metodę CRISPR/Cas9, powodującą knock-out genu miostatyny na poziomie zarodkowym.

Technologia CRISPR/Cas9, intensywnie eksploatowana i ulepszana, umożliwia bardzo precyzyjne i nieporównywalnie wydajniejsze z innymi technikami modyfikacji genomu, uniczynienie (*knock-out*) czy dodanie (*knock-in*) określonego genu. Została ona już z powodzeniem wykorzystana do uzyskania transgenicznych zwierząt na cele hodowlane (np. krowy odporne na *mastitis*, świnię przyjazną środowisku z genem *fitazy*). Technologię tą zastosowano w pracach na potrzeby medycyny translacyjnej (organy genetycznie zmodyfikowanych świń wykorzystywane w ksenotransplantacji) oraz dla biofarmacji – żywe bioreaktory produkujące białka o znaczeniu terapeutycznym. Transgeniczne świnię z *knock-outem* genu miostatyny, charakteryzujące się zwiększoną masą mięśniową, mogą być wykorzystane jako zwierzęta modelowe w badaniach z zakresu genomiki, proteomiki, w badaniach żywieniowych oraz z zakresu medycyny translacyjnej. Wiadomo bowiem, że podwyższony poziom miostatyny występuje w takich chorobach cywilizacyjnych, jak: otyłość, hiperglikemia, cukrzyca typu 1 oraz w nadciśnieniu tętniczym.

Konstrukcja genowa do inaktywacji genu miostatyny świni domowej (KO MSTN I) na poziomie zarodkowym, została opracowana w technologii CRISPR/Cas9, w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu.

Opracowana konstrukcja genowa, przed zastosowaniem do transfekcji zygot świń na drodze mikroiniekcji do przedjądrza zygoty, została przetestowana *in vitro* na wybranych liniach komórek somatycznych. Do transfekcji zygot świńskich, konstrukcję KO-MSTN I użyto

w stężeniu 4 ng/ μ l, które to zostało ustalone jako optymalne na podstawie wyników efektywności transfekcji zygot świń, uzyskanych w innych doświadczeniach z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9.

W celu uzyskania materiału do transfekcji – zapłodnione komórki jajowe świń (zygoty)- zabiegowi superowulacji poddano 166 dojrzałych płciowo loch dawczyń, po pierwszym cyklu rujowym, o wadze do 90 kg. Od 166 superowulowanych loch dawczyń, poddanych pełnej sedacji operacyjnej, stosując chirurgiczną metodę uzyskiwania zarodków (przeptkiwanie jajowodów płynem PBS (Sigma, USA) z 1% dodatkiem albuminy bydlęcej BSA (Sigma, USA) w ilości 20 ml/jajowód, o temperaturze 38°C – uzyskano 2963 komórki jajowe. Uzyskane komórki jajowe, przenoszono pod mikroskopem stereoskopowym do płynu manipulacyjnego – PBS bez jonów wapnia i magnezu (Sigma, USA) z 10% dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej FCS (Sigma, USA). Komórki poddawano wstępnej ocenie morfologicznej. Następnie, pulę komórek jajowych poddawano wirowaniu z siłą 18000g przez 5 minut, w celu uwidocznienia przedjądrzy. Odwirowane komórki jajowe przenoszono do komory manipulacyjnej wypełnionej płynem manipulacyjnym i pod mikroskopem odwróconym (powiększenie 400x) oceniano stadium rozwojowe – czy są zapłodnione. Transfekcji poddawano tylko zapłodnione komórki jajowe (zygoty) – widoczne ciątka kierunkowe, przedjądrza, plemniki na osłonce przejrzystej. Transfekcji – mikroiniekcja wektora do jednego z przedjądrzy – poddano 1615 zygot. Zygoty po transfekcji przenoszono do naczynka ze świeżym płynem manipulacyjnym i ponownie oceniano. Eliminowano zygoty uszkodzone w wyniku mikroiniekcji. Transfekowane zygoty przenoszono chirurgicznie do jednego z jajowodów, zsynchronizowanych z lochami dawczyniami, loch biorczyń będących w pełnej narkozie operacyjnej. Do jajowodów 60 zsynchronizowanych loch biorczyń wprowadzono 1584 transfekowane zygoty (25-36 zygot/jajowód). W rezultacie, przeprowadzonych zabiegów uzyskano 147 żywych, potencjalnie transgenicznych prosiąt. Po odsadzeniu, od prosiąt pobrano biopłaty tkanki usznej, które przestano do Katedry Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu, w celu wykonania analiz molekularnych.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że u loszki nr 393 jeden *allel* genu *MSTN* pozostał prawidłowy, ale drugi ma delecję 3 nt i insercję 8 nt. Suma +5 nt sprawiła, że zmieniła się ramka odczytu i tym samym jeden *allel* został znokautowany.

Po prawej – w środku transgeniczna loszka 393, rodzeństwo – knurek 396, po lewej nietransgeniczna loszka 2 miesiące starsza (Fot. 1 i 2. A. Kuźma)



Zadanie 04-19-11-21

Opracowanie oryginalnej technologii uzyskiwania klonalnych zarodków świni przy wykorzystaniu modulatorów epigenetycznych nowej generacji

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

Cele zadania:

- zastosowanie modulatorów epigenetycznych nowej generacji z grupy selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 do uzyskiwania klonalnych zarodków świni,
- zastosowanie modulatorów epigenetycznych nowej generacji z grupy niespecyficznych inhibitorów deacetylaz histonów chromatyny jądrowej do uzyskiwania klonalnych zarodków świni,
- ocena efektywności pozaustrojowego uzyskiwania zarodków przy wykorzystaniu strategii klonowania somatycznego z użyciem modulatorów epigenetycznych nowej generacji.

Nadrzędnym założeniem w ramach realizacji niniejszego zadania badawczego, było wdrożenie do praktycznej realizacji innowacyjnej metody egzogennej transformacji profilu pamięci epigenetycznej jąder hodowanych *ex vivo* komórek somatycznych, wprowadzonych do cytoplazmy dojrzałych *in vitro* enukleowanych oocytów, a następnie ulegających przeprogramowaniu ich aktywności transkrypcyjnej w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych świni. Do epigenomowej transformacji komórek-dawców jąder wykorzystane zostały selektywne (specyficzne) lub nieselektywne (niespecyficzne) związki biochemiczne nowej generacji z grupy syntetycznych modulatorów procesów epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, tj. deacetylacji/acetylacji bądź demetylacji/metylacji reszt lizyny histonów H3 i H4. Do związków tych należą, odpowiednio: selektywne inhibitory demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 chromatyny jądrowej, takie jak trans-2-fenylcyklopropyloamina (tranylcypromina; 2-PCPA/TCPR) lub niespecyficzne inhibitory deacetylaz histonów chromatyny jądrowej, takie jak tinostamustyna (TNST).

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zgodnie z naszą wiedzą, zarówno trans-2-fenylcyklopropyloamina, jak i tinostamustyna zostały wykorzystane po raz pierwszy w badaniach nad uzyskiwaniem zarodków świni techniką klonowania somatycznego. Ponadto, warto wspomnieć, że tinostamustyna nie była jeszcze nigdy wykorzystana w badaniach z zakresu klonowania ssaków, a trans-2-fenylcyklopropyloamina była zastosowana dotąd tylko w przypadku uzyskiwania zarodków klonalnych jednego gatunku ssaków, jakim jest koza domowa. U pozostałych gatunków ssaków ten modulator epigenetyczny nowej generacji, jak dotąd, nie był wykorzystywany w ramach prac ukierunkowanych na klonowanie techniką transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*). Należy zatem podkreślić oryginalność i pionierski charakter przeprowadzonego panelu kompleksowych prac badawczych.

Udowodniono *a posteriori*, że egzogenna transformacja epigenomowa fibroblastycznych komórek-dawców jąder w procedurze klonowania somatycznego świni przy zastosowaniu wspomnianych wyżej modulatorów epigenetycznych nowej generacji przyczyniła się do podwyższenia zjawiska plastyczności epigenetycznej tych komórek, czego skutkiem jest zwiększenie epigenetycznej przeprogramowalności aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w rozwijających się zarodkach klonalnych. Miarodajnym wskaźnikiem pośrednio potwierdzającym zwiększoną podatność hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder na prawidłowe epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych była znacząca poprawa parametrów ich potencjału rozwojowego

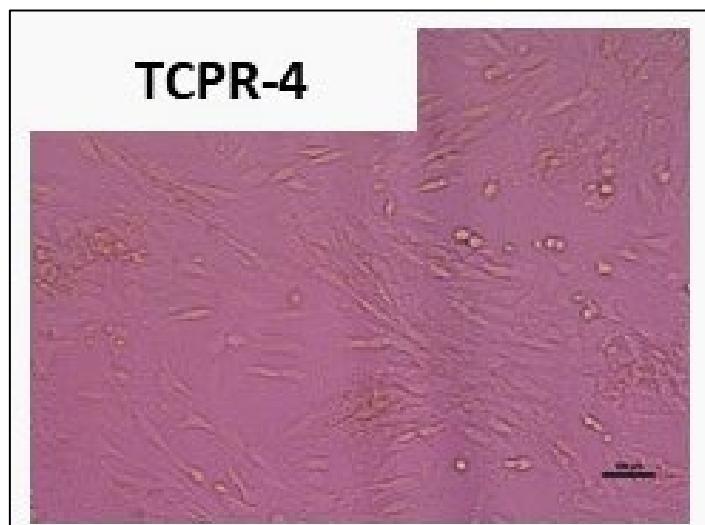
ex vivo. Potwierdzono zatem, że modulacja epigenomowa somatycznych komórek-dawców jąder w procedurze klonowania świń z użyciem zupełnie nowych modyfikatorów epigenetycznych znalazła zatem odzwierciedlenie w ułatwieniu złożonych procesów epigenetycznego przemodelowania chromatyny oraz przeprogramowania genomu jądrowego w przedimplantacyjnej fazie pozaustrojowego rozwoju klonalnych zarodków świni.

Podsumowując, wiodącym nurtem zrealizowanych w ramach niniejszego zadania prac badawczych była ocena wpływu nowatorskich strategii epigenetycznej modulacji aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych na ich epigenetyczną plastyczność i przeprogramowalność w klonalnych zarodkach świni poprzez ewaluację wskaźników potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków świni zrekonstruowanych techniką klonowania somatycznego.

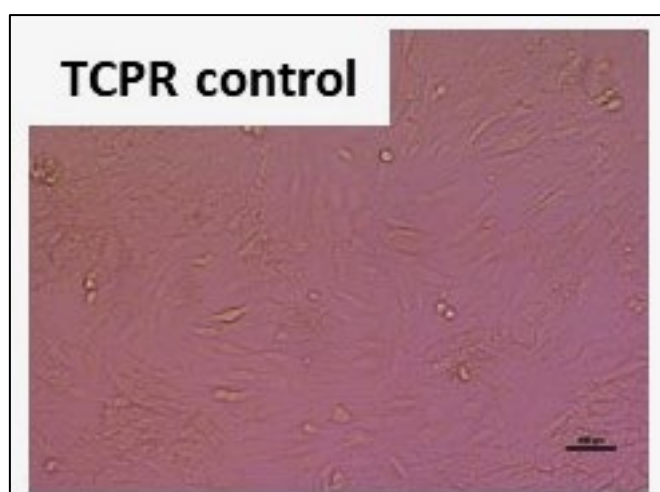
Realizację niniejszego zadania badawczego zainicjowano od rozwinięcia sieci efektywnej współpracy Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB z Zakładem Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ oraz z Zakładem Histologii Collegium Medicum UJ. W ramach współpracy wymienionych naukowych ośrodków biotechnologicznych, biologicznych i biomedycznych stworzono biorezerwuar stabilnych mitotycznie, proteomicznie scharakteryzowanych i zabezpieczonych kriogenicznie linii transgenicznych i nietransgenicznych komórek pochodzenia skórno-powłokowego (fibroblasty, keratynocyty) oraz pochodzenia jajnikowego (komórki macierzyste), które stanowią potencjalne źródło modulowanych lub niemodulowanych epigenetycznie komórek-dawców jąder do zabiegów generowania klonalnych zarodków świni domowej techniką SCNT. W następnej kolejności, z dostępnego biorezerwuaru linii komórkowych o wysokim potencjale proliferacyjnym w warunkach hodowli pozaustrojowych, wyselekcjonowano linie komórek fibroblastycznych pochodzenia skórno-powłokowego do drugiej rundy prac badawczych, których celem było opracowanie oryginalnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni w wyniku rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder ekspandujących ex vivo fibroblastów dermalnych. Zostały one uprzednio poddane 24-godzinnej transformacji epigenomowej, indukowanej za pośrednictwem nowego, dotąd nie stosowanego w klonowaniu somatycznym świń, modulatora epigenetycznego. Transformacja epigenomowa fibroblastycznych komórek-dawców jąder została przeprowadzona przy zastosowaniu przedstawiciela rodziny selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 chromatyny jądrowej – trans-2-fenylocyklopropyloaminy (tranylcyprominy; 2-PCPA/TCPR) w dawce stężeniowej 4 $\mu\text{M/L}$.

Komórki fibroblastyczne, uprzednio poddane 24-godzinnej modulacji epigenetycznej za pośrednictwem 2-PCPA/TCPR (rycina 1.) lub komórki fibroblastyczne, niepodlegające 2-PCPA/TCPR - zależnej modulacji epigenetycznej w warunkach hodowli *in vitro* (rycina 2.; grupa kontrolna), stanowiły źródło dawców jąder w wieloetapowych zabiegach klonowania somatycznego, obejmujących wyrafinowane procedury mikrochirurgiczne na uzyskanych, w wyniku pozaustrojowego dojrzewania meiotycznego, oocytach-biorcach jąder fibroblastów dermalnych, takie jak: enukleacja dojrziałych *in vitro* oocytów; rekonstrukcja enukleowanych oocytów (ooplastów) z jąder komórek somatycznych złożona z mikroiniekcji komórek-dawców jąder do przestrzeni okołozótkowej ooplastów oraz elektrofuzji utworzonych kompleksów ooplast-komórka fibroblastyczna; a także jednoczesna aktywacja elektryczna zrekonstruowanych oocytów (hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych, czyli cybryd klonalnych).

Rycina 1. Hodowane *in vitro* komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, poddane 24-godzinnej modulacji epigenetycznej z użyciem 4 $\mu\text{M/L}$ trans-2-fenylcyklopropyloaminy (transylcyprominy; 2-PCPA/TCPR). Powiększenie $\times 200$



Rycina 2. Komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, niepodlegające 2-PCPA/TCPR-zależnej modulacji epigenetycznej w warunkach hodowli *in vitro*. Powiększenie $\times 200$



W tabeli 1. przedstawiono wyniki dotyczące pozaustrojowych zdolności rozwojowych klonalnych zarodków świni zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów dermalnych, które uprzednio podlegały lub nie podlegały transformacji epigenetycznej zależnej od modulatora nowej generacji – transylcyprominy (2-PCPA/TCPR).

Reasumując, wyniki przeprowadzonych prac badawczych jednoznacznie potwierdzają, że kompetencje jąder komórkowych fibroblastów dermalnych, które poddano 2-PCPA/TCPR-zależnej modulacji epigenetycznej, do pokierowania pozaustrojowym rozwojem klonalnych zarodków świni utrzymywały się na istotnie wyższym poziomie niż kompetencje jąder niemodulowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych.

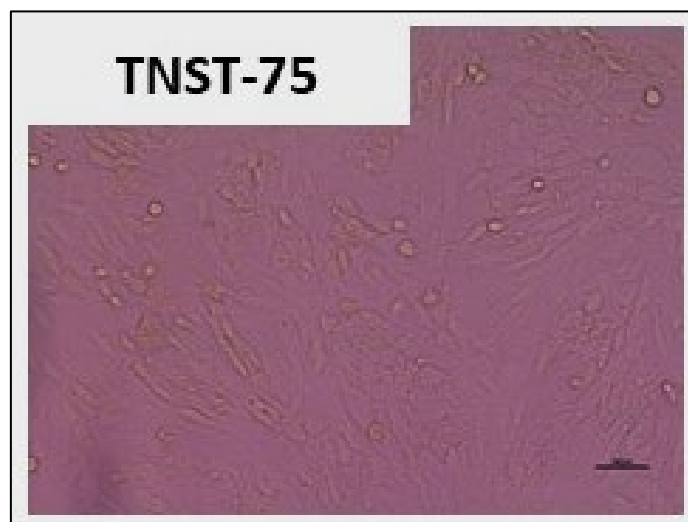
Tabela 1. Wpływ 2-PCPA/TCPR-zależnej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* fibroblastów tkanki skórno-powłokowej małżowin usznych loch/loszek rzeźnych na parametry pozaustrojowego potencjału rozwojowego klonalnych zarodków świni

2-PCPA/TCPR -zależna modulacja epigenomowa komórek-dawców jąder	Liczba rekonstruowanych oocytów	Liczba hodowanych zarodków klonalnych (%)	Liczba dzielących się zarodków (%)	Liczba morul (%)	Liczba blastocyst (%)
+	142	134/142 (94,4) ^a	123/134 (91,8) ^A	97/134 (72,4) ^A	45/134 (33,6) ^A
-	149	132/149 (88,6) ^a	93/132 (70,5) ^B	61/132 (46,2) ^B	20/132 (15,2) ^B

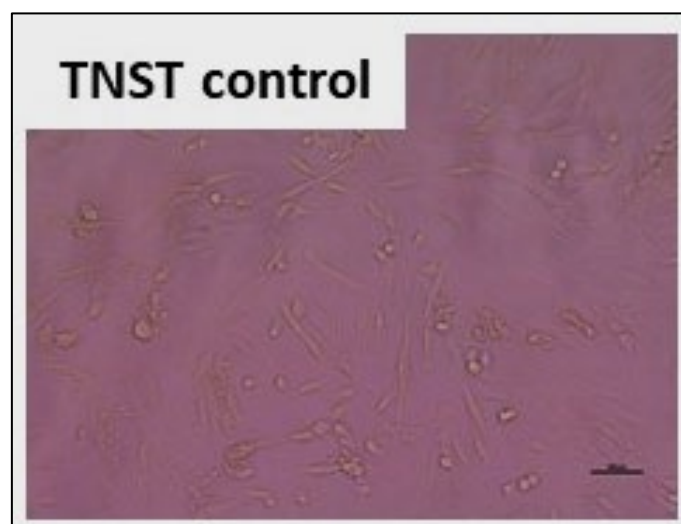
^{a,a} Jednakowe wskaźniki górne (małe litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają brak statystycznie istotnych różnic między grupami doświadczalnymi z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P > 0.05$ (Test χ^2); ^{A,B} Niejednakowe wskaźniki górne (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między grupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P \leq 0.001$ (Test χ^2)

W następnych etapach realizacji niniejszego zadania badawczego rozwijano efektywną sieć współpracy naukowo-badawczej Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB z Zakładem Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ oraz z Zakładem Histologii Collegium Medicum UJ. W ramach sieci współpracy badawczej, prowadzonej przez wymienione naukowe ośrodki rolnicze, biotechnologiczne, biologiczne i biomedyczne stworzono biorezerwar stabilnych mitotycznie oraz transkryptomycznie i proteomicznie scharakteryzowanych linii transgenicznych i nietransgenicznych komórek pochodzenia skórno-powłokowego (fibroblasty dermalne) oraz komórek pochodzenia jajnikowego (komórki wzgórka jajonośnego otaczające dojrzale *in vitro* oocyty), stanowiących potencjalne źródło modulowanych lub niemodulowanych epigenetycznie komórek-dawców jąder do zabiegów generowania klonalnych zarodków świni domowej techniką SCNT. W dalszej kolejności z dostępnego biorezerwuaru linii komórkowych o wysokim potencjale proliferacyjnym *ex vivo* oraz przydatności molekularnej wyselekcjonowano linie komórek fibroblastycznych pochodzenia skórno-powłokowego do kolejnego etapu prac badawczych, których celem było opracowanie oryginalnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni w wyniku rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder hodowanych *in vitro* fibroblastów dermalnych, które zostały uprzednio poddane 24-godzinnej transformacji epigenomowej, indukowanej za pośrednictwem nowego, niestosowanego dotąd w klonowaniu somatycznym świń, modulatora epigenetycznego. Transformacja epigenomowa fibroblastycznych komórek-dawców jąder została przeprowadzona przy zastosowaniu przedstawiciela rodziny niespecyficznych inhibitorów deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej – tinostamustyny (TNST) w dawce stężeniowej 75 nM/L. Komórki fibroblastyczne, uprzednio poddane 24-godzinnej modulacji epigenetycznej za pośrednictwem TNST (rycina 3.) lub komórki fibroblastyczne, niepodlegające TNST-zależnej modulacji epigenetycznej w warunkach hodowli *in vitro* (rycina 4.; grupa kontrolna), stanowiły źródło dawców jąder w wieloetapowych zabiegach klonowania somatycznego, obejmujących wyrafinowane procedury mikrochirurgiczne na uzyskanych, w wyniku pozaustrojowego dojrzewania meiotycznego, oocytach-biorcach jąder fibroblastów dermalnych, takie jak: enukleacja dojrzatych *ex vivo* oocytów; rekonstrukcja ooplastów z jąder komórek somatycznych złożona z mikroiniekcji komórek-dawców jąder do przestrzeni okołożółtkowej ooplastów oraz elektrofuzji utworzonych kompleksów ooplast-komórka fibroblastyczna; a także równoczesna elektroaktywacja cybryd klonalnych.

Rycina 3. Hodowane *in vitro* komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, poddane 24-godzinnej modulacji epigenetycznej z użyciem 75 nM/L tinostamustyny (TNST). Powiększenie $\times 200$



Rycina 4. Komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, nie podlegające TNST-zależnej modulacji epigenetycznej w warunkach hodowli *in vitro*. Powiększenie $\times 200$



W tabeli 2. przedstawiono wyniki dotyczące pozaustrojowych kompetencji rozwojowych klonalnych zarodków świni zrekonstruowanych z jąder komórek fibroblastycznych, które uprzednio poddano lub nie podano modulacji epigenetycznej zależnej od modyfikatora nowej generacji - tinostamustyny (TNST).

Reasumując, wyniki tego panelu prac badawczych wyraźnie wskazują, że zdolności jąder komórkowych fibroblastów dermalnych, które poddano TNST-zależnej modulacji epigenetycznej, do pokierowania rozwojem *ex vivo* klonalnych zarodków świni utrzymywały się na istotnie wyższym poziomie niż kompetencje jąder niemodulowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych.

Tabela 2. Wpływ TNST-zależnej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* fibroblastów tkanki skórno-powłokowej małżowin usznych loch/loszek rzeźnych na parametry pozaustrojowego potencjału rozwojowego klonalnych zarodków świni

TNST – zależna modulacja epigenomowa komórek-dawców jąder	Liczba rekonstruowanych oocytów	Liczba hodowanych zarodków klonalnych (%)	Liczba dzielących się zarodków (%)	Liczba morul (%)	Liczba blastocyst (%)
+	116	112/116 (96,6) ^a	104/112 (92,9) ^A	86/112 (76,8) ^A	43/112 (38,4) ^C
–	140	127/140 (90,7) ^a	88/127 (69,3) ^B	63/127 (49,6) ^B	29/127 (22,8) ^D

^{a,a} Jednakowe wskaźniki górne (małe litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają brak statystycznie istotnych różnic między grupami doświadczalnymi z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P > 0,05$ (Test χ^2); ^{A,B} Niejednakowe wskaźniki górne (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie bardzo wysokie różnice między grupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P \leq 0,001$ (Test χ^2); ^{C,D} Niejednakowe wskaźniki górne (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie wysokie różnice między grupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,001 < P \leq 0,01$ (Test χ^2).

Wymiernym efektem realizacji niniejszego zadania było opracowanie dwóch innowacyjnych i efektywnych strategii zwiększających wydajność technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni, stanowiącej obiecujący instrument badawczy wykorzystywany na potrzeby nowoczesnej hodowli oraz biotechnologii reprodukcyjnej zwierząt gospodarskich. Immanentnymi elementami i nowatorskimi rozwiązaniami w ramach opracowanych strategii są oryginalne procedury rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder hodowanych *in vitro* fibroblastów dermalnych, które zostały uprzednio poddane transformacji epigenomowej, indukowanej: albo za pośrednictwem nowego, niestosowanego dotąd w klonowaniu somatycznym świń, modulatora epigenetycznego, określanego mianem tranilcyprominy (2-PCPA/TCPR), będącej przedstawicielem rodziny selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 chromatyny jądrowej; albo za pośrednictwem nowego, nie stosowanego dotąd w klonowaniu somatycznym świń i innych gatunków ssaków, modyfikatora epigenetycznego o nazwie tinostamustyna (TNST), który reprezentuje rodzinę niespecyficznych inhibitorów deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej. Ponadto, udokumentowanym efektem podjętego kierunku badań są wysoko punktowane publikacje naukowe, które przyczyniły się do poszerzenia wiedzy podnoszącej pozycję polskiego i międzynarodowego sektora naukowego oraz badawczo-rozwojowego w zakresie rolniczej biotechnologii reprodukcyjnej i genomowej inżynierii zarodkowej u zwierząt gospodarskich, a także w zakresie badań interdyscyplinarnych na styku biologii i biotechnologii molekularnej oraz biomedycyny.

Zadanie 04-19-13-11

Optymalizacja metod izolacji i kriokonserwacji komórek zarodkowych kaczek

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

Cele zadania:

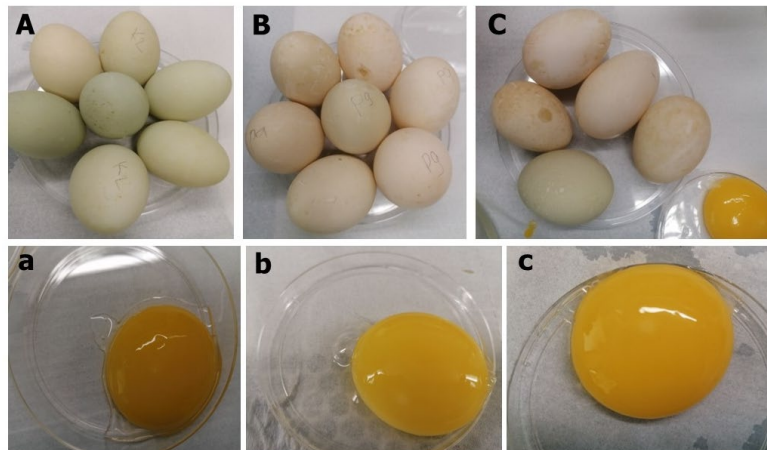
- optymalizacja warunków wyprowadzania zarodkowych komórek macierzystych pochodzenia blastodermalnego (B-ESCs) z zapłodnionych jaj kaczki domowej (*Anas platyrhynchos forma domestica* lub *Cairina moschata f. domestica*) w oparciu o opracowany w badaniach własnych model hodowli *ex ovo* komórek B-ESCs kury domowej (*Gallus gallus domesticus*),
- opracowanie nowej procedury badawczej ukierunkowanej na stworzenie modelu *in vitro* dla potrzeb wyprowadzania *ex ovo* komórek B-ESCs kaczki domowej.

Badania ukierunkowane na wyprowadzanie oraz kriogeniczne zabezpieczanie linii komórkowych pochodzenia zarodkowego stopniowo stają się i mogą stanowić w stosunkowo nieodległej przyszłości, immanentny element biotechnologicznie wspomaganej ochrony *ex situ* oraz genetycznego ratowania różnych gatunków i ras ptaków hodowlanych, w tym kury domowej i kaczki domowej. Niemniej jednak, na obecnym etapie badań, niezbędne jest zarówno przyspieszenie prac nad stworzeniem strategii badawczych będących kamieniami milowymi, które pozwoliłyby na znaczącą poprawę wydajności otrzymywania stabilnych – pod względem potencjału proliferacyjnego i cech pluripotencji – blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej, jak i optymalizacja uprzednio opracowanych metod wyprowadzania i hodowli namnażających komórki B-ESCs, w wielu przypadkach w większym lub mniejszym stopniu suboptymalnych, a także w niedostatecznym stopniu powtarzalnych pod kątem uzyskiwanej efektywności, nie wspominając już o nieistnieniu jakichkolwiek metod poza-jajowego wyprowadzania, namnażania, czy też pluripotentnej stabilizacji komórek B-ESCs innych gatunków ptaków, w tym innych niż kura domowa gatunków drobiu hodowlanego. Dlatego też, należy podkreślić absolutnie nowatorski kierunek badawczo-rozwojowy niniejszego zadania z uwagi na fakt, że według naszej najlepszej wiedzy, dotąd nie były prowadzone – zarówno w skali krajowej jak i światowej – prace badawcze w kierunku stworzenia modeli *ex vivo* wyprowadzania i hodowli namnażających niezróżnicowanych komórek B-ESCs o właściwościach pluripotentnych u udomowionych przedstawicieli taksonomicznych drobiu wodnego takich jak kaczka domowa.

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione agrobiotechnologiczne, biologiczne, zootechniczne oraz gatunkowo-specyficzne uwarunkowania ornitologiczne, nadrzędnym założeniem podjętych prac badawczych było opracowanie i optymalizacja nowych procedur badawczych sprofilowanych na stworzenie modelu *in vitro* dla potrzeb:

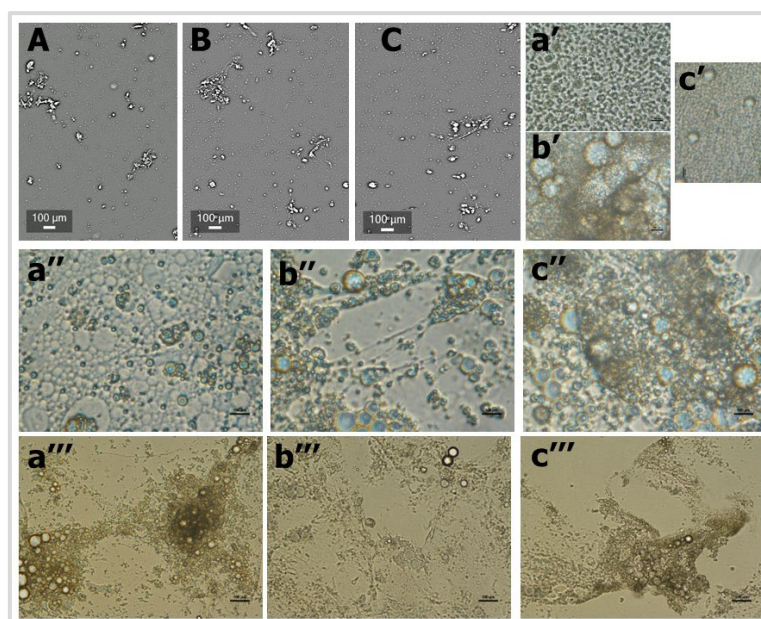
- 1) izolacji komórek BCs z zapłodnionych jaj kaczki domowej,
- 2) wyprowadzania *ex ovo* stabilnych mitotycznie linii komórek ESCs z wyizolowanych subpopulacji komórek BCs,
- 3) namnażającej hodowli *in vitro* wyprowadzonych linii komórek ESCs pochodzenia blastodermalnego (B-ESCs),
- 4) określenia profilu proteomicznego wybranych biomarkerów pluripotencji (Oct-3/4, Sox2) oraz immunolokalizacji fluorocytochemicznej powierzchniowych epitopów błonowych (węglowodanowych, takich jak SSEA-4 i proteoglikanowych, takich jak TRA-1-60), potwierdzającej niezróżnicowany i macierzysty charakter w proliferacyjnie samoodnawiających się subpopulacjach komórek B-ESCs. Dokumentację fotograficzną przygotowania kaczych jaj do mechanicznej izolacji tarczki zarodkowych (embriodysków) przedstawiono w postaci fotogramu zawartego w obrębie ryciny 1.

Rycina 1. Procedura przygotowania kaczych jaj do izolacji tarczek zarodkowych: A,a – jaja rasy/linii K2; B,b – jaja rasy/linii P-9; C,c – jaj rasy/linii Kh0-1



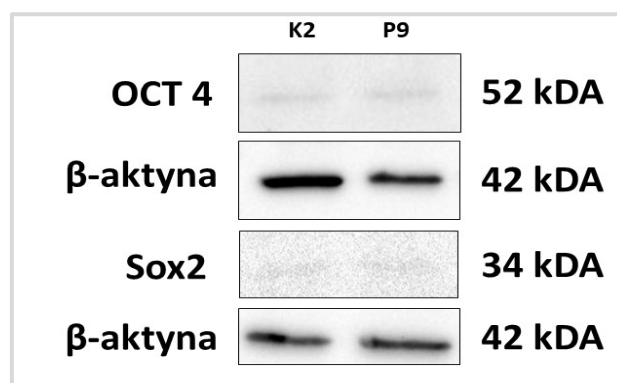
Optymalizacja warunków hodowli *ex ovo* komórek B-ESCs kury domowej, w ramach przeprowadzenia pierwszych 2 serii eksperymentów, pozwoliła na implementację i ekstrapolację opracowanych modeli badawczych warunkujących najwyższy poziom stabilizacji aktywności mitotycznej i tempa proliferacji komórek w kolejnych seriach doświadczalnych obejmujących systemy poza-jajowego wyprowadzania linii blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych wstępnie wyselekcjonowanych ras/linii kaczki domowej (pekin francuski P-9, mieszańiec Kh0-1, kaczka w typie pomniejszonym K-2) (rycina 2.). W systemach tych, mikrośrodkowisko utrzymujące optymalne wskaźniki aktywności mitotycznej i przeżywalności komórek B-ESCs kaczki domowej, stwarzały polistyrenowe szalki hodowlane o średnicy 60 mm, z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) oraz wysokościenne mikropłytki 8-komorowe Ibidi z dnem szklanym powlekany syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine). Aby rozpoznać pluripotenty charakter komórek B-ESCs wybranych ras kaczki domowej (K-2, P-9, Kh0-1), w wyizolowanym białku całkowitym, otrzymanym na skutek ultrasonicznej dezintegracji (lizy) komórek, pochodzących z 14-dniowych hodowli podtrzymujących linii/szczepów komórkowych poddanych minimum 15 pasażom (podwojeniom populacji), wykazano ekspresję wybranych, białkowych markerów pluripotencji (Oct-3/4, Sox-2) (rycina 3). Stwierdzono obecność obydwu homeotycznych czynników transkrypcyjnych, co dowodzi charakteru pluripotentnego komórek B-ESCs pochodzących z tarczek zarodkowych wyizolowanych z jaj obu gatunków ptaków hodowlanych. Po zakończeniu 14-dniowej hodowli *ex ovo* kaczych komórek B-ESCs przeprowadzono analizę immunocytochemiczną na obecność wybranych markerów pluripotencji: Oct4, Sox2, SSEA-4 i TRA-1-60. W oparciu o uzyskane wyniki potwierdzono wyraźną immunolokalizację biomarkerów pluripotencji w namnażanych *in vitro* komórkach B-ESCs wszystkich trzech ras kaczek, co dowodzi ich charakteru macierzystego. Na rycinie 4. zostały przedstawione przykładowe wyniki obrazowania komórek B-ESCs kaczek rasy/linii K-2 z użyciem mikroskopii konfokalnej, w kierunku identyfikacji miejsc ekspresji homeotycznych czynników transkrypcyjnych Oct4 oraz Sox2 w kompartmentach wewnątrzkomórkowych, a także detekcji miejsc ekspresji w monowarstwie zewnątrzkomórkowej błon plazmatycznych w odniesieniu do powierzchniowych determinant antygenowych węglowodanowych glikosfingolipidów (SSEA-4) oraz proteoglikanowych epitopów TRA-1-60, stanowiących sjałilowane cząsteczki proteoglikanów siarczanu keratanu, które formują domeny zewnątrzkomórkowe transbłonowego białka podokaliksyny (PODXL), należącego do grupy polianionowych sjałoprotein glikokaliksu błonowego z rodziny białek transmembranowych CD35.

Rycina 2. Opracowanie modelu wyprowadzania ex ovo blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) z embriodysków wyizolowanych z zapłodnionych jaj wyselekcjonowanych ras/linii kaczki domowej na potrzeby określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych ich izolacji, adhezji oraz proliferacji *in vitro*



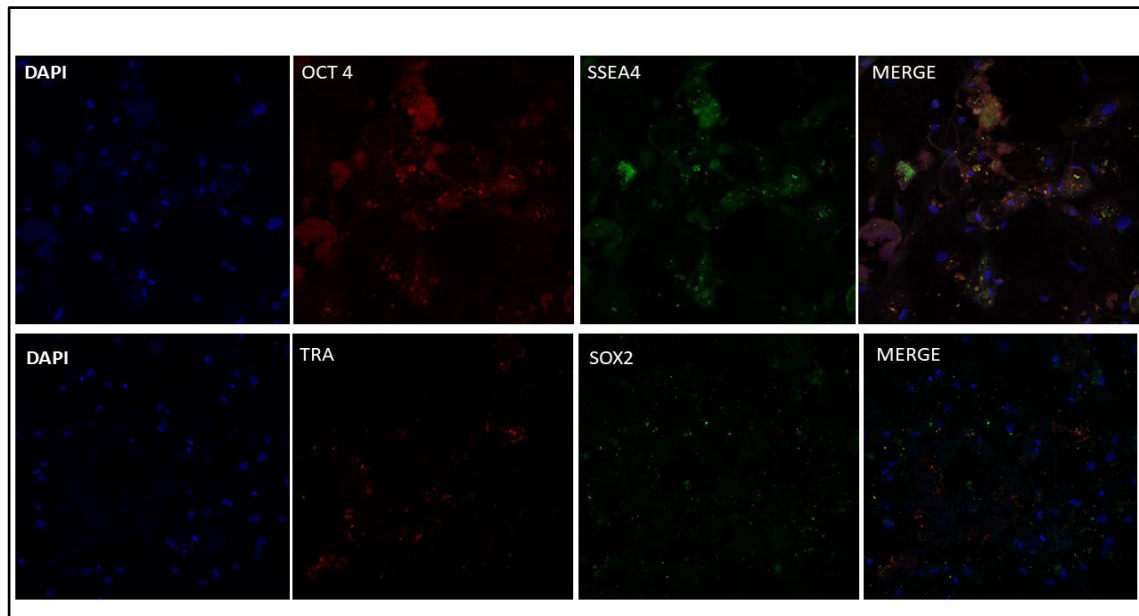
Analiza proliferacyjnego wzrostu oraz ocena cytologiczna prowadzona podczas 14-dniowej hodowli namnażającej blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) pochodzących z jaj różnych ras/linii kaczek. Komórki B-ESCs odznaczają się obecnością dużych jąder, zaś integralną częścią ultrastruktury ich nukleoplazmy są wyraźne jąderka zlokalizowane w przeważającej większości w pobliżu wewnętrznych warstw/blaszek otoczki jądrowej. Komórki początkowo podlegają proliferacji w monowarstwie, w obrębie której granice między poszczególnymi komórkami są zdecydowanie rozróżnialne (do 4 dnia hodowli ex ovo). W dalszych etapach hodowli (powyżej 4 dnia), skupiska kaczyc komórek B-ESCs tworzą zwarte kolonie wielowarstwowych komórek, ułożonych w charakterystyczne cystoidalne ciała zarodkowe. A, a', a'', a''' – komórki B-ESCs rasy/linii K-2; B, b', b'', b''' – komórki B-ESCs rasy/linii P-9; C, c', c'', c''' – komórki B-ESCs rasy/linii Kh0-1 – mikrofotografie wygenerowano, odpowiednio po: 24 godzinach, 72 godzinach, 7 dniach i 14 dniach hodowli poza-jajowej.

Rycina 3. Opracowanie modeli badawczych hodowli ex ovo blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) różnych ras kaczki domowej na potrzeby określenia profilu proteomicznego związanego z relatywną ekspresją czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) warunkujących charakter pluripotentny



Reprezentatywne wyniki analizy półilościowej Western-blot (W-B), wskazujące na relatywną ekspresję biomarkerów pluripotencji Oct-3/4 i Sox-2 na poziomie białka całkowitego wyizolowanego z hodowanych *ex ovo* przez 14 dni komórek B-ESCs wybranych ras kaczek (K-2, P-9).

Rycina 4. Immunofluorescencyjna lokalizacja wybranych biomarkerów pluripotencji (Oct-4, TRA-1-60, SSEA-4 i Sox-2) w blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórkach macierzystych kaczek rasy K2 po 14 dniach namnażającej hodowli *ex ovo*



Mikrofotografie przedstawiają komórki B-ESCs, rosnące w postaci jednej warstwy – detekcja czerwonych sygnałów pochodzących albo od barwnika fluorescencyjnego AlexaFluor 594 albo od fluorochromu Alexa Fluor 555 oznacza, odpowiednio: wewnątrzkomórkową immunolokalizację cząsteczek białka Oct-4 (homeotyczny czynnik transkrypcyjny) – górny panel oraz zewnątrzkomórkową immunolokalizację glikoproteinowego epitopu TRA-1-60 (proteoglikan siarczanu keratanu stanowiący część powierzchniową transbłonowego białka podokaliksyny) – dolny panel. Z kolei, identyfikacja zielonego sygnału pochodzącego od barwnika fluorescencyjnego AlexaFluor 488 wskazuje na powierzchniową immunolokalizację cząsteczek takich biomarkerów jak: SSEA-4 (węglowodanowy epitop błonowy glikosfingolipidów) – górny panel oraz immunolokalizację w kompartmentach/przedziałach wewnątrzkomórkowych cząsteczek białka Sox-2 (homeotyczny czynnik transkrypcyjny) – dolny panel. Na wszystkich zdjęciach niebieski sygnał pochodzi od fluorochromu DAPI, który znakuje DNA jąder komórkowych. Skala: 100 μ m.

Reasumując, na podstawie oceny morfologicznej, półilościowej analizy Western-blot oraz immunofluorescencyjnego obrazowania z użyciem mikroskopii konfokalnej stwierdzono, że wyizolowane frakcje komórek blastodermalnych, z których wyprowadzono stabilne linie zarodkowych komórek macierzystych kury domowej i wybranych ras/linii kaczki domowej, wykazują molekularne cechy fenotypowe dla niezróżnicowanych komórek ESCs, w tym relatywną ekspresję oraz wyraźnie zidentyfikowaną wewnątrzkomórkową immunolokalizację fluorocytochemiczną czynników transkrypcyjnych Oct3/4 oraz Sox2, determinujących charakter pluripotentny. W związku z powyższym, do eksperymentów ukierunkowanych na stworzenie modeli *ex ovo* wyprowadzania stabilnych mitotycznie linii komórek ESCs, pochodzących z blastoderm dyskoblastuli różnych ras kaczki domowej, z powodzeniem mogą być wykorzystywane takie

naczynia hodowlane jak szklane mikro płytki 8-komorowe lub z podłożem powlekany syntetycznym substratem polimerowym - poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine) oraz polistyrenowe szalki hodowlane z dnem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes).

W rezultacie realizacji niniejszego zadania badawczego, stabilne mitotycznie linie komórek zarodkowych o morfologii oraz profilach immunofenotypowych (epitopowych) specyficznych dla komórek macierzystych, które zostały wyprowadzone z blastodermi embriodysków wyizolowanych z zapłodnionych jaj kurzych lub kaczyc w stadium X, były zdolne do utrzymania wysokiej aktywności proliferacyjnej w warunkach długotrwałej hodowli *in vitro*, jednocześnie zachowując cechy typowe dla charakteru macierzystego (ang. *stemness*), przy wsparciu odpowiedniego podłoża naczyń hodowlanych oraz podstawowego medium hodowlanego wzbogaconego jedynie trzema suplementami o właściwościach mitogennych oraz energetyczno-troficznymi (FBS, B-27™ Plus, SCF). Co ciekawe, komórki B-ESCs kury domowej oraz różnych ras/linii kaczki domowej, hodowane przez minimum 15 pasażów w nowo opracowanym przez nasz zespół naukowo-badawczy systemie *ex ovo*, odznaczały się ekspresją wybranych markerów charakterystycznych dla pluripotentnych komórek macierzystych (Oct-3/4 i Sox2) na poziomie proteomicznym.

Opracowany w wyniku realizacji niniejszego zadania badawczego zupełnie nowy model *ex ovo* pozwolił na utrzymanie, w warunkach długoterminowej hodowli *in vitro*, cech znamiennych dla pluripotentnych komórek zarodkowych wybranych gatunków drobiu grzebiącego (kura domowa; *Gallus gallus domesticus*) oraz – po raz pierwszy w skali krajowej i światowej – w przypadku drobiu wodnego z rodziny ptaków blaszkodziobych (kaczka domowa; *Anas platyrhynchos f. domestica* lub *Cairina moschata f. domestica*). Te wysoce zachęcające wyniki będą stanowiły punkt wyjścia do dalszego doskonalenia i postępu w zastosowaniu technologii ptasich komórek B-ESCs.

Najważniejszym atutem i najmocniejszą stroną przeprowadzonych badań ukierunkowanych na opracowanie strategii wyprowadzania stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (pierwotnych komórek zarodkowych) z wyizolowanych komórek blastodermalnych kury domowej i kaczki domowej jest ich pionierski i innowacyjny charakter, który stanowi solidną podstawę programową dla realizacji i powodzenia założeń dalszych, bardziej zaawansowanych prac badawczo-rozwojowych z zakresu: 1) biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej oraz 2) badań interdyscyplinarnych na styku biomedycyny, transgeniki, biologii i biotechnologii molekularnej, a także 3) biotechnologicznie i embriologicznie wspomaganą ochrony *ex situ* i restrykcji ginących lub wymarłych gatunków i ras ptaków hodowlanych i wolnożyjących.

Zadanie 04-19-15-11

Opracowanie metod krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni

kierownik zadania: dr Magdalena Bryła

Poszukiwanie metod krótkoterminowego przechowywania nasienia trutni (konserwacja w dodatnich temperaturach) wynika z konieczności szerszego wykorzystywania materiału biologicznego pochodzącego od szczególnie wartościowych matek, wydłużenia sezonu ich produkcji oraz stworzenia możliwości bankowania i transportu materiału biologicznego. Z kolei, opracowanie efektywnej technologii długoterminowego przechowywania (kriokonserwacja w ciekłym azocie), umożliwiającej zachowanie wysokiej jakości nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania pozwoli na jego wykorzystanie w sztucznym unosiennianiu matek pszczelich i wychowywanie matek-córek o pożądanym genotypach. Pomimo prowadzenia intensywnych badań nad opracowaniem skutecznej metody konserwacji i kriokonserwacji nasienia

trutni nadal nie uzyskano w pełni zadowalających wyników spełniających warunki praktycznego stosowania. Z uwagi na straty w rodzinach pszczół miodnych istotne jest podejmowane działań mających na celu zabezpieczenie materiału biologicznego tego gatunku.

Celem zadania jest opracowanie składu rozcieńczalnika do krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni. Ponadto, przygotowana zostanie kompleksowa technologia kriokonserwacji, pozwalająca na efektywne kriogeniczne zabezpieczenie materiału biologicznego. Planuje się przeprowadzić badania jakości nasienia na poszczególnych etapach technologicznych w oparciu o wybrane parametry strukturalno-funkcjonalne plemników z wykorzystaniem mikroskopu biologicznego i/lub mikroskopu fluorescencyjnego i/lub systemu SCA® CASA Sperm Class Analyzer System i/lub cytometru przepływowego.

Figura 1. Przygotowania do sezonu, więza trutowe, stanowisko do pobierania nasienia trutni. Założenia metodyczne



Figura 2. Założenia metodyczne i plan doświadczenia



W pierwszym roku realizacji zadania, w okresie od kwietnia do lipca roku 2023, opracowywano procedurę manualnego wycinowania aparatu kopulacyjnego samca i pobierania nasienia trutni. Nasienie pobierano od dojrzałych płciowo osobników w wieku 14-21 dni za pomocą szklanej pipety skalibrowanej ze strzykawką Harbo. Pobrane nasienie od około 100 dojrzałych płciowo trutni poddano ocenie pod mikroskopem biologicznym. Analizowano standardowe parametry jakościowe nasienia, tj: konsystencja, marmurkowata struktura, kremowy kolor, widoczny ruch łańcuchów plemników oraz brak zanieczyszczeń. Nasienie rozcieńczano w różnych wariantach rozcieńczalników (Kiev, Harbo, Hopkins) i przechowywano w temperaturze

pokojowej bez dostępu powietrza i światła przez 10 dni. Przeprowadzano ocenę ruchliwości plemników na szkiełku podstawowym w mikroskopie świetlnym według skali od 0 do 5, gdzie 5 – oznaczało co najmniej 95%, 4 – 80%, 3 – 60%, 2 – 40%, 1 – 20%, 0 – 0% plemników ruchliwych.

Całkowita ruchliwość plemników po konserwacji w dodatnich temperaturach wahała się w przedziale 70-72% i nie wykazano różnic pomiędzy nasieniem konserwowanym w testowanych rozcieńczalnikach.