

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 2022 roku kontynuowano charakterystykę opisową dotyczącą danych fenotypowych, genetycznych i rodowodowych gromadzonych w bazach IZ PIB oraz prowadzono analizę genomu. Wyniki tych analiz posłużyły do modyfikacji algorytmu pozwalającego na optymalizację wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego.

W bazie PLOWET zbierano dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zootechnicznych zakładów doświadczalnych IZ PIB.

Spośród ok. 6500 rekordów, najczęściej jako pojedyncza choroba występowało *mastitis* (3019 przypadków), *metritis* (1748 przypadków) oraz cysty jajnika (1472 przypadki). W instytutowej bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 2500 krów z zakładów doświadczalnych. Z tej liczby, ponad 2000 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 inbrodu genomowego (F_{ROH}). Wyniki analizy wskazały na zwiększoną częstość występowania *mastitis*, *metritis* i torbiele jajnika wraz ze wzrostem poziomu zinbredowania. 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 inbrodu 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* i torbiele jajnika i były one dostępne dla około 1500 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Każda z krów została zgenotypowana przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip, zawierającej genotypy 54609 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 46216 SNP. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 72 SNPs statystycznie istotnie związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 21 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, w 2022 roku zwiększono liczbę 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 przyszłym roku.

Kontynuowano prace nad optymalizacją modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych. Komponenty kowariancji 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 10 657 rekordów. W trakcie szacowania komponentów kowariancji wygenerowano 100 000 próbek parametrów. Pierwsze 20 000 próbek usunięto jako tzw. rozruchowe. Na podstawie kolejnych próbek obliczono średnie wartości komponentów kowariancji 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 nie (cechy binarne przyjmujące wartość =1 przy wystąpieniu choroby i 0 przy jej braku). Konwencjonalne wartości hodowlane (ang. *Estimated Breeding Values*, EBV) dla 1,501 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej 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:

$$(DGV)_i \approx \mu + Z_{-1} g_i.$$

Kombinowane wartości hodowlane (ang. *genomically enhanced breeding value*, GEBV) dla osobnika są wyznaczone na podstawie wartości DGV oraz indeksu rodowodowego (ang. *parental index* – PI : *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 IZ 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	76.25	124.16	101.03	5.21
relDGV	0.14	0.14	0.14	0.00
GEBV	74.95	125.38	100.79	5.59
relGEBV	0.17	0.67	0.24	0.07

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

	min.	max	mean	sd
DGV	83.16	127.03	100.13	5.06
relDGV	0.12	0.12	0.12	0.00
GEBV	81.37	128.49	100.07	4.96
relGEBV	0.16	0.62	0.21	0.05

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

	min.	max	mean	sd
DGV	64.72	142.87	103.61	6.84
relDGV	0.18	0.18	0.18	0.00
GEBV	60.71	1139.07	104.11	7.27
relGEBV	0.18	0.73	0.30	1.02

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 01-10-03-11

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Andrzej Żarnecki

W hodowli bydła mlecznego do wczesnych lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku podstawowym celem było doskonalenie cech produkcyjnych. Jednostronna selekcja prowadziła do pogorszenia tzw. cech funkcjonalnych, a co za tym idzie wpłynęła negatywnie na opłacalność hodowli. Z tego powodu w populacjach bydła mlecznego cel hodowlany został rozszerzony o doskonalenie cech płodności, łatwości ocieleni, zdrowotności, pokroju i długowieczności. W przypadku celu hodowlanego, obejmującego wiele cech, podstawowym narzędziem efektywnej selekcji są indeksy selekcyjne.

Stosowane obecnie w wielu krajach indeksy można podzielić na dwa rodzaje:

- konstruowane w sposób „klasyczny”, w których „wagi” przypisywane cechom są przyjmowane na podstawie danych ekonomicznych (w połączeniu z parametrami genetycznymi i fenotypowymi cech),
- oparte na oczekiwaniach hodowców, którzy subiektywnie określają cele swojej pracy hodowlanej. Przykładem tak skonstruowanego indeksu jest używany w Polsce indeks PF dla bydła holsztyńsko-fryzyjskiego i indeks PFsim dla bydła simentalskiego. „Wagi” dla poszczególnych cech przyjęte w indeksach typu negocjowanego odzwierciedlają zatem preferencje hodowców w określaniu długofalowego celu hodowlanego. Ważnym aspektem stosowania indeksu negocjowanego jest opisanie jego ekonomicznej efektywności w małych i średnich oborach.

Istotnym zagadnieniem związanym z wieloletnim stosowaniem indeksów PF i PFsim jest ocena ich ekonomicznej efektywności w małych i średnich oborach. Dane dotyczące ekonomiki produkcji mleka zebrano za pomocą ankiet przeprowadzonych w 50 oborach bydła holsztyńsko-fryzyjskiego, zlokalizowanych w województwie podlaskim oraz w 30 oborach bydła rasy simentalskiej z województwa podkarpackiego. W oborach holsztyńsko-fryzyjskich znajdowało się od 39 do 304 krów. Około 70% obór liczyło do 99 krów, około 26% obór miało obsadę od 100 do 199 krów, a 4% można zaliczyć do dużych obór z ponad 200 krowami. W oborach simentalskich znajdowało się od 12 do 55 krów. Około 37% obór liczyło do 19 krów, około 31,5% od 20 do 29 krów oraz 31,5% ponad 30 krów.

Ankiety, wypełnione przy współpracy ośrodków doradztwa rolniczego dla każdego gospodarstwa, zawierały szczegółowe warunki organizacyjno-produkcyjne i koszty rzeczywiste produkcji mleka w badanym gospodarstwie. Pozyskane dane pozwalają na ustalenie kosztów i dochodowości produkcji oraz powiązania ich z biologicznymi uwarunkowaniami hodowli.

Z systemu SYMLEK wybrano dane 3 629 krów rasy HF i 521 rasy simentalskiej, hodowanych w ankietowanych oborach, urodzonych w latach 2005 – 2019, które posiadały oceny wartości hodowlanej. Utworzony zbiór zawierał dane dotyczące pochodzenia, wartości hodowlanych dla cech produkcyjnych, cech funkcjonalnych wchodzących w skład indeksów PF i PFsim, wartości podindeksów i indeksów PF. W przypadku rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej 61% krów posiadało indeks PF, a 49% krów rasy simentalskiej posiadało indeks PFsim.

Średnia wartość indeksu PF dla krów rasy HF oszacowanych konwencjonalnie (oceny genomowa i kombinowana występują w niewielkiej liczbie) wynosi 101,96. Nieco większe są wartości PF (110,87) buhajów HF – ojców krów. Średnie wartości indeksów PFsim krów simentalskich oraz buhajów, ze względu na bardzo niewielką liczebność i inną bazę standaryzacji, nie powinny być bezpośrednio porównywane z ocenami krów i buhajów HF.

Na podstawie szczegółowych danych zawartych w ankietach, zgodnie z zasadami rachunkowości rolniczej, obliczono nadwyżki bezpośrednie uzyskane z wyprodukowania 1 l mleka przypadającego na 1 krowę. W rasie HF średnia nadwyżka wynosiła 0,72 zł/krowę, w rasie simentaliskiej 0,83 zł/krowę. Równocześnie oszacowano koszty pasz użytych do wyprodukowania 1 l mleka.

Na podstawie danych hodowlanych i ekonomicznych podjęto próbę powiązania średniej wartości genetycznej krów w małych i średnich oborach bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i simentaliskiej z kosztami produkcji mleka i kosztami żywienia. W tym celu obliczono macierz korelacji między wszystkimi badanymi zmiennymi. Wybrano z niej korelacje pomiędzy średnimi wartościami hodowlanymi dla cech produkcyjnych, odstępu między ocieleniami kondycji, wszystkimi składnikami indeksu oraz indeksem PF lub indeksem PFsim a obliczonymi nadwyżkami oraz kosztami paszy.

Najwyższe korelacje stwierdzono między nadwyżką bezpośrednią przypadającą na jedną krowę a WH cech produkcyjnych i indeksem PF. Podobne wartości korelacji, nieco ponad 0,4, znaleziono między nadwyżką bezpośrednią, podindeksem produkcyjnym i podindeksem pokroju. Wielkość korelacji między składnikami indeksu PF a wielkością nadwyżki bezpośredniej (zł/krowę) w dużej mierze odpowiada wielkości „wag” w indeksie PF. W szczególności, dotyczy to podindeksów – produkcyjnego i pokroju. Korelacje nadwyżki bezpośrednio obliczanej na 1 l mleka okazały się być znacznie niższe i w większości ujemne.

Wysokie istotne są ujemne korelacje wartości hodowlanych cech produkcyjnych, podindeksów produkcyjnych i indeksu PF z kosztami pasz w przeliczeniu na 1 l wyprodukowanego mleka (od -0,44 do -0,52).

W rasie simentaliskiej w porównaniu z rasą HF, większość współczynników korelacji okazała się mniejsza, i mniej z nich było statystycznie istotnych, głównie z powodu małej liczebności. W odróżnieniu od rasy HF, w przypadku rasy simentaliskiej nie znaleziono istotnych korelacji WH cech produkcyjnych z obu nadwyżkami. Najwyższą, ujemną korelację stwierdzono między PFsim a ogólnym kosztem pasz. Należy jednak brać pod uwagę, że badania kosztów paszy i nadwyżek dotyczą mlecznej części użytkowości simentali, które są bytlem mleczno-mięsnym.

W celu zbadania wpływu korelacji między zmiennymi niezależnymi, wchodzącymi w skład indeksów PF, obliczono równania regresji wielokrotnej ze zmiennymi zależnymi, tj. nadwyżkami i kosztami paszy. Ze względu na małą liczbę obserwacji przy dużej liczbie zmiennych niezależnych współczynniki regresji cząstkowej okazały się nieistotne i nie wyjaśniły ew. wpływów zależności między składnikami indeksów PF na korelacje ze zmiennymi ekonomicznymi.

Korelacje między wartościami hodowlanymi dla cech produkcyjnych a kosztem paszy zużytej na wyprodukowanie 1 l mleka wykazały, że zwiększenie średniego poziomu genetycznego krów zmniejsza koszty paszy, a zatem koszty produkcji. Ten sam kierunek zależności zaobserwowano u bydła simentaliskiego.

W przypadku rasy HF korelacje wskazują, że nadwyżka przypadająca na jedną krowę jest w największym stopniu zależna od wartości hodowlanej cech produkcyjnych. Korelacja 0,43 podindeksu produkcji z nadwyżką jest podobna do 40% „wagi” tego podindeksu w indeksie PF. W rasie simentaliskiej nie stwierdza się podobnej zależności, jednak oprócz małej liczebności próby, inny obraz ekonomicznych warunków produkcji simentali, może wynikać z dwukierunkowego kierunku użytkowania tego bydła.

Zadanie 01-10-04-11

Ocena dobrostanu cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców.

kierownik zadania: dr inż. Dorota Godyń

Celem zadania było 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 dwóch różnych rodzajach budek/kojców. Zakłada się także, iż wyniki badań wskażą istotność zastosowania małoinwazyjnej metody oceny kortyzolu (badanego w sierści zwierząt) jako wiarygodnego maklera stresu.

W realizacji tego etapu doświadczenia skupiono uwagę na przyrostach masy ciała cieląt oraz wynikach dotyczących poziomu hormonu stresu w próbkach pobranej od zwierząt sierści.

Warto zaznaczyć, iż w bieżącym roku dokonano zakupu kojców pozwalających utrzymać cielęta parami (okres pierwszych dwóch tygodni), a następnie po szybkim demontażu utrzymywać grupę 4 sztuk zwierząt (Fot. 1.). Budki te będą przydatne w dalszych etapach doświadczenia.

Fot. 1. Kojce umożliwiające utrzymywanie czterech cieląt (D. Godyń).



Zwierzęta:

Wraz z pomocą wykwalifikowanych pracowników ZD IZ PIB Kołbacz Sp. z o. o. dokonano wyboru zwierząt do doświadczenia. Badaniami objęto grupę 12 cieląt rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, urodzonych w maju 2022 roku. Doświadczenie rozpoczęło się wraz z umieszczeniem zwierząt w budkach typu *igloo*. Grupę kontrolną stanowiły 4 sztuki, które po odizolowaniu od matek umiejscowione zostały w budkach pojedynczych. Grupę doświadczalną tworzyło 8 sztuk cieląt, które umieszczane były w budkach podwójnych (Fot. 2. Utrzymywanie parami).

Zgodnie ze schematem przyjętym na fermie, zwierzęta utrzymywane są w budkach przez okres dwóch tygodni, po tym czasie cielęta trafiają do kojców grupowych.

Fot. 2. Kojec podwójny (D. Godyń).



Materiały i metody:

Zwierzęta były monitorowane przez dwa tygodnie, od momentu odizolowania od matki i umieszczenia w kojcu z budką. Każde zwierzę objęte doświadczeniem było ważone w dniu umieszczenia w nowym środowisku oraz po dwóch tygodniach przebywania w kojcu. Behawior rejestrowany był przy pomocy kamer.

Przed izolacją młodych od matek pobierana była sierść od wszystkich cieląt objętych badaniem. Materiał pochodził z okolicy nasady ogona. Wycinano niewielką ilość sierści. Dokonywano tego szybko, bez konieczności unieruchomienia zwierząt. Próbkę materiału biologicznego pobierane były również po czternastu dniach przebywania zwierząt w kojcach z budkami.

Przy uwzględnieniu niewielkich modyfikacji, detekcja kortyzolu we włosach została przeprowadzona za pomocą komercyjnego zestawu ELISA zgodnie z wytycznymi producenta (Cortisol Enzyme Immunoassay firmy Arbor Assays).

Okolo 30-60 mg włosów przepłukano w izopropanolu, pocięto nożyczkami oraz rozdrobniono w bulletgrinderze stalowymi kulkami o średnicy 0,9-2 mm. Dodano 1700 ul metanolu i inkubowano wytrząsając w temperaturze pokojowej przez ok. 12 godzin.

Metanолоwy ekstrakt kortyzolu (1 ml) przeniesiono do kolejnej probówki, gdzie w ciągu 2,5 godziny zredukowano nadsącz do osadu w urządzeniu Speedvac (Eppendorf) w temperaturze 37 stopni Celsjusza. Osad zwieszono w 150 ul Assay buffer i postępowano zgodnie z protokołem producenta.

Wyniki badań:

Przyrosty masy ciała.

Zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej, przyrosty masy ciała w pierwszych dwóch tygodniach po odseparowaniu cieląt od matek kształtowały się na podobnym poziomie około 230 g/dzień.

Kortyzol w sierści.

Poziom biomarkera w sierści badanych 12 osobników, utrzymywanych w kojcach (pojedynczych i podwójnych) po okresie 2 tygodni wynosił 533,5, a w przypadku cieląt utrzymywanych parami, kształtował się na poziomie 586,5 pg kortyzolu/mg włosów.

Wnioski:

Wyniki prowadzonych badań wskazują, że cielęta po odizolowaniu od matek, utrzymywane parami, charakteryzują się podobnymi przyrostami masy ciała co osobniki odchowywane w kojcach pojedynczych. Poziom kortyzolu w sierści był wyższy w grupie cieląt utrzymywanych parami. Konieczne są dalsze analizy, prowadzone na większej grupie osobników. Dalsze wyniki przedstawione zostaną w późniejszych sprawozdaniach dotyczących realizacji zadania.

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

Wysoka wartość odżywcza mleka sprawia, iż na całym świecie jest ono jednym z najważniejszych składników pokarmowych diety człowieka. Jest źródłem wysoce przyswajalnych białek, tłuszczów, witamin oraz wielu związków biologicznie czynnych. Coraz częściej odpowiednio zbilansowana i dobrana dieta stosowana jest w profilaktyce, ale również we wspomaganiu leczenia wielu chorób. W ostatnim czasie spożywanie mleka budzi wiele kontrowersji, gdyż może prowadzić do alergii czy nietolerancji pokarmowych. Badania naukowe z zakresu diety coraz częściej dotyczą produktów pochodzenia zwierzęcego, w tym mleka, a zwłaszcza jego białka. Stwierdzono, iż w białku β -kazeiny mogą występować różnice, które są wynikiem mutacji, a najczęstszymi wariantami genetycznymi β -kazeiny (CSN2) są A1 i A2. Sugeruje się, iż podczas trawienia mleka zawierającego formę A1 uwalniane są opioidowe peptydy, które mogą być przyczyną nadwrażliwości lub nasilenia objawów innych chorób (schizofrenia, autyzm, nietolerancje pokarmowe).

Konsumenci coraz częściej wybierają zamienniki mleka krowiego, co może prowadzić do spadku jego spożycia. Dlatego istnieje potrzeba przebadania i promowania mleka pochodzącego od krów o korzystnym typie β -kazeiny A2 oraz ocena składu chemicznego tego mleka i możliwości jego wykorzystania do produkcji napojów fermentowanych.

W ramach tematu „Identyfikacja krów mlecznych rasy simental pod względem zawartości β -kazeiny typu A2 oraz możliwości wykorzystania mleka od nich pochodzącego do produkcji napojów fermentowanych” łącznie pobrano i zidentyfikowano 967 zwierząt, w tym: 568 krów mlecznych, 27 buhajów, 314 cieląt oraz 58 jaiówek. Od krów o zidentyfikowanych genotypach A1A1 i A2A2 pobrano mleko do analiz chemicznych oraz do wykonania na jego bazie produktów fermentowanych. Próbkę mleka pobierano podczas próbnych udojów, trzykrotnie w ciągu roku. Łącznie pobrano i oceniono 60 prób mleka (po 30 z danego wariantu). Analizy 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. Wyniki produkcyjne, a także podstawowego składu chemicznego pozyskano z próbnych udojów.

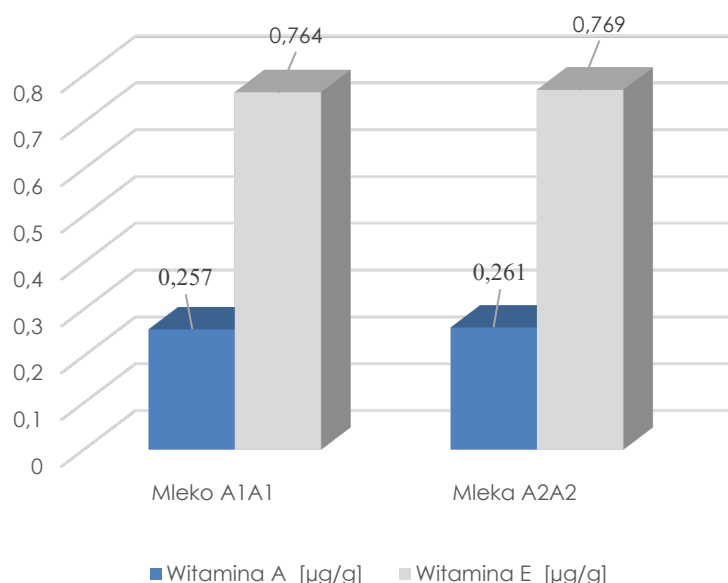
Z pobranego mleka wykonano także produkty fermentowane: jogurt, jogurt probiotyczny, kefir i maślanekę. W wytworzonych produktach określono: skład chemiczny, teksturę, kwasowość, aktywność antyoksydacyjną, mikrobiologię, barwę oraz wykonano ocenę sensoryczną produktów.

Na podstawie wykonanych badań genetycznych stwierdzono, iż w badanym stadzie była frekwencja genotypu A2A2 wynosi 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 stanowi podstawy do prowadzenia dalszej hodowli ukierunkowanej na produkcję mleka A2 w ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o.

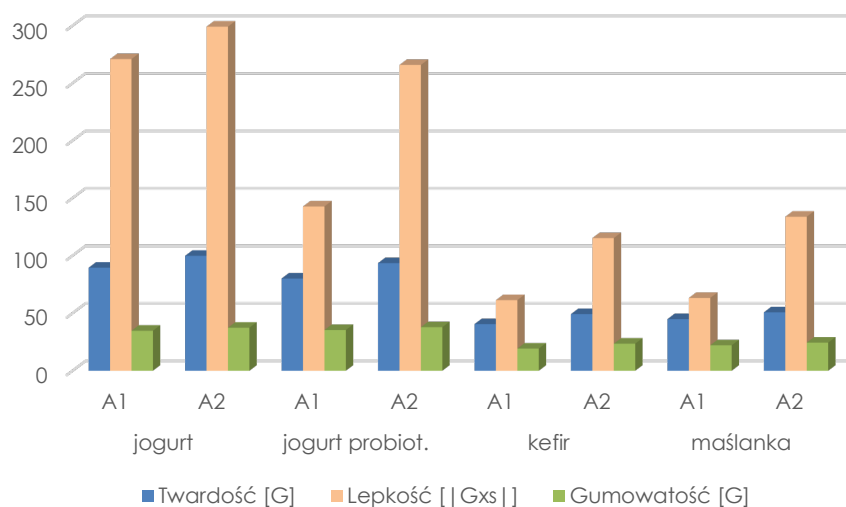
Analiza produkcyjności ze względu na zidentyfikowany genotyp nie wykazała różnic w wydajności mlecznej w zależności od stwierdzonego genotypu. Podobnie nie stwierdzono różnic w podstawowym składzie mleka ze względu na zidentyfikowany rodzaj genotypu. Zawartość białka, tłuszczu, laktozy kształtowała się 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 ze 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 maślanekę. Stwierdzono, że wytworzony jogurt, jogurt probiotyczny i maślanekę wytworzone z mleka A2 cechowały się wyższą twardością, lepkością i gumowatością w porównaniu do produktów wytworzonych na bazie mleka A1. Natomiast wytworzony kefir, powstały z mleka A2, charakteryzował się wyższymi wartościami wszystkich badanych parametrów, tj. wyższą twardością, lepkością, spójnością i gumowatością. W ocenie sensorycznej wytworzone produkty fermentowane uzyskały zróżnicowane oceny. Uzyskane z mleka A2 jogurt i maślanekę zostały najwyżej ocenione, natomiast w przypadku mleka A1 wyżej oceniono jogurt probiotyczny i kefir.

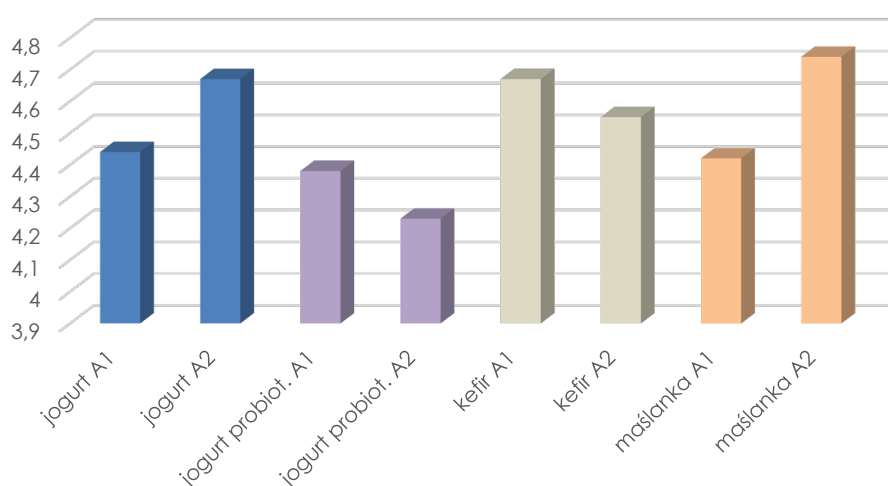
Wykres 1. Zawartość witamin w mleku A1 i A2.



Wykres 2. Ocena produktów fermentowanych wytworzonych na bazie mleka A1 i A2.



Wykres 3. Ogólna ocena sensoryczna napojów fermentowanych wytworzonych na bazie mleka A1 i A2.



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

Nadrzędnym, praktycznym celem zadania było opracowanie nowych podindeksów selekcyjnych, uwzględniających cechy mięsności i płodność dla poprawy ekonomiki produkcji bydła mięsnego. Podindeksy te pozwalają na wybór optymalnego modelu produkcyjnego bydła mięsnego w gospodarstwie.

Cel naukowy zadania, to oszacowanie parametrów genetycznych cech płodności, cech pokroju oraz płodności dla najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce: limousine, charolaise, hereford. Opracowanie podindeksów selekcyjnych uwzględniających cechy płodności oraz wskaźniki wartości opasowej i rzeźnej, oszacowanie mierników efektywności ekonomicznej opasu przy uwzględnieniu zmiennych uwarunkowań rynkowych.

Realizowane etapy badawcze:

1. Kontynuowano i pogłębiono analizę wskaźników opasowych i rzeźnych buhajów ocenianych w Polsce, oraz ich potomstwa.
2. Przeprowadzono ankiety bezpośrednie – pomiędzy hodowcami i zootechnikami – dotyczące ważności zaproponowanych cech w zakresie płodności oraz opasu bydła mięsnego, w kontekście finalnej postaci opracowywanych indeksów selekcyjnych.
3. Kontynuowano monitoring mierników efektywności ekonomicznej opasu na podstawie kolejnych ankiet bezpośrednich przeprowadzonych w gospodarstwach utrzymujących bydło ras mięsnych.

Syntetyczny opis wyników zadania:

W ramach realizacji zadania etapowego, dane obejmujące wyniki rutynowej oceny fenotypowej cech pokroju buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine (LM), charolaise (CH) i hereford (HH), uzupełniono i wzbogacono za 2022 rok. 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 – 3 858, dla CH – 597, a dla rasy HH – 458. Informacje o buhajach (np. dane rodowodowe, oceny cech pokroju) zgromadzono w oparciu o system eBovis2, należący do Polskiego Związku Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego oraz w aplikacji użytkowej – „buhaje mięsne” – pracowników Instytutu Zootechniki PIB prowadzących ocenę wartości hodowlanej buhajów ras mięsnych.

Na podstawie wzbogaconego zbioru 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. Podstawowe informacje dotyczące charakterystyki dostępnych zbiorów danych w kontekście wybranych w poprzednim roku sprawozdawczym cech do utworzenia podindeksu płodności zaprezentowano w Tabelach 1. i 2.

Tabela 1. Liczba dostępnych danych cech płodności w systemie eBovis.

Rasa	LM	CH	HH
Lata oceny	2000 – 2022	2000 – 2022	2000 – 2022
Liczba obserwacji	323 858	54 331	28 218
Liczba ważeń	498 858	67 888	37 950
Liczba wycieleń	265 696	38 704	23 587
Waga urodzeniowa	247 786	35 480	19 468

Tabela 2. Liczebności (N), średnie ($\bar{x}$), wartości minimalne i maksymalne cech związanych z budową zadu planowanych do utworzenia podindeksu płodności (lata oceny 2000 – 2022).

Rasa	Cecha	Liczba ocen cech pokroju (N)	Średnia ($\bar{x}$)	Min.	Max
LM	Długość zadu	187 352	7,41	2	10
	Szerokość w biodrach	191 131	7,53	2	10
	Szerokość w kulszach	184 542	7,29	2	10
	Szerokość zadu	186 517	7,46	3	10
CH	Długość zadu	19 215	7,46	4	10
	Szerokość w biodrach	19 481	7,57	4	10
	Szerokość w kulszach	18 651	7,23	3	10
	Szerokość zadu	17 070	7,40	3	10
HH	Długość zadu	17 098	7,63	5	10
	Szerokość w biodrach	16 862	7,52	4	10
	Szerokość w kulszach	16 437	7,32	3	9
	Szerokość zadu	16 486	7,34	4	9

W Tabeli 2. przedstawiono liczebności (N), średnie oraz wartości minimalne i maksymalne cech budowy zadu, które wytypowano w poprzednim roku sprawozdawczym do utworzenia podindeksu płodności dla najczęściej występujących w Polsce trzech ras bydła mięsnego. Zgromadzone dane pochodzą z oceny przeprowadzonej w latach 2000 – 2022. Dla wszystkich trzech ras oceniano cztery cechy budowy zadu, związane 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 ocen, dla szerokości w biodrach – 191 131 pomiarów, dla szerokości w kulszach – 184 542 oceny, a dla szerokości zadu – 186 517 ocen.

W Tabeli 3. przedstawiono charakterystykę cech pokroju bydła ras mięsnych, związanych z lokomocją, które posłużą do opracowania podindeksu lokomocji. Dla rasy limousine przeprowadzono od 198 243 do 204 811 ocen dla poszczególnych cech budowy nóg oraz kondycji, przyjmując zakres wartości od 1 do 10 punktów w przypadku obwodu nadpęcia.

Tabela 3. Liczebności (N), średnie, wartości minimalne i maksymalne cech związanych z budową nóg planowanych do utworzenia podindeksu lokomocji (lata oceny 2000 – 2022).

Rasa	Cecha	Liczba ocen cech pokroju	Średnia	Min.	Max
LM	Obwód nadpęcia	190 696	7,63	1	10
	Postawa nóg przednich	198 243	7,93	3	10
	Postawa nóg tylnych	197 268	7,89	1	10
	Kondycja	204 811	8,19	1	10
CH	Obwód nadpęcia	19 554	7,88	1	10
	Postawa nóg przednich	19 868	7,85	4	10
	Postawa nóg tylnych	19 601	7,62	3	10
	Kondycja	19 800	7,86	1	10
HH	Obwód nadpęcia	17 992	8,30	1	10
	Postawa nóg przednich	17 557	7,83	3	10
	Postawa nóg tylnych	17 815	7,81	3	10
	Kondycja	17 387	8,70	1	10

Poza obliczeniami i wykonywaniem charakterystyki ocen fenotypowych cech pokroju pracowano również dwutorowo. Pozyskano informacje z Głównego Inspektoratu Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, dotyczące systemu klasyfikacji tusz rzeźnych. Inspektorat dysponuje danymi o uboju bydła w Polsce. W ubiegłym roku ubój bydła w Polsce prowadziło 210 zakładów ubojowych – w tych zakładach poddano ubojowi 1 858 457 sztuk bydła. Ubojnie, które nie podlegają obowiązkowi klasyfikowania tusz wołowych i nie były nadzorowane w tym zakresie (było ich 139) – ubiły 104 804 sztuki bydła.

W celu scharakteryzowania środowiska bytowania zwierząt, przeprowadzono ankiety bezpośrednie w piętnastu wybranych przez zootechników do oceny (PZHBPB) gospodarstwach. Miały one dostarczyć informacje o stosowanych sposobach utrzymania, żywieniu i rozrodzie.

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, związku i naukowców zaangażowanych w hodowlę bydła mięsnego. W celu zgromadzenia odpowiedzi od uczestników dyskusji dotyczącej wag cech przygotowano ankietę, w której poproszono o ustalenie kolejności cech w podindeksach i przyporządkowanie tym cechom odpowiedniej wartości punktowej, tak aby ich suma wynosiła 100. Dotyczyła ona zarówno podindeksu płodności, jak i budowy kończyn. Tabele 4. i 5. przedstawiają liczbę wskazań ankietowanych na kolejność cechy w indeksie oraz liczbę punktów, którą uzyskała dana cecha.

Tabela 4. Kolejność cech w podindeksie płodności oraz liczba punktów, które otrzymała dana cecha w ankietach.

Cecha		Kolejność cechy w indeksie							Liczba punktów
		1	2	3	4	5	6	7	
Waga urodzeniowa	Liczba wskazań cechy	4	6						265
Ocena porodu		6	1				2	1	260
Szerokość w kulszach			1	1	3	4	1		110
Długość okresu międzywycieleniowego				6	1	1	2		96
Szerokość w biodrach				2	1	3	4		93
Długość zadu					1	3	2	4	84
Szerokość zadu			2		5			3	83

Jako najważniejsze cechy w podindeksie płodności zostały wskazane – 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.

Tabela 5. Kolejność cech w podindeksie budowy nóg oraz liczba punktów, które otrzymała dana cecha w ankietach.

Cecha		Kolejność cechy w indeksie			Liczba punktów
		1	2	3	
Postawa nóg tylnych	Liczba wskazań	10			470
Postawa nóg przednich			10		365
Obwód nadpęcia				10	165

Postawa nóg tylnych została wskazana jako najważniejsza cecha w podindeksie budowy kończyn, uzyskując 470 punktów. Jednoznacznie została ona uznana jako najważniejsza dla tego indeksu. Najmniej ważny według ankietowanych okazał się obwód nadpęcia, uzyskując 165 punktów. Cecha ta została wskazana jako trzecia w kolejności – w ostatecznej postaci tego indeksu.

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 jest 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.

Założenia metodyczne:

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 możliwe jest (krok 2.) 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*) nawet do 800 000 SNP (*high density*). Istotnym elementem do uzyskania dokładnej genomowej oceny wartości hodowlanej jest skład populacji referencyjnej.

Aktualnie w wielu krajach, w tym także 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, 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 w tym celu 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.

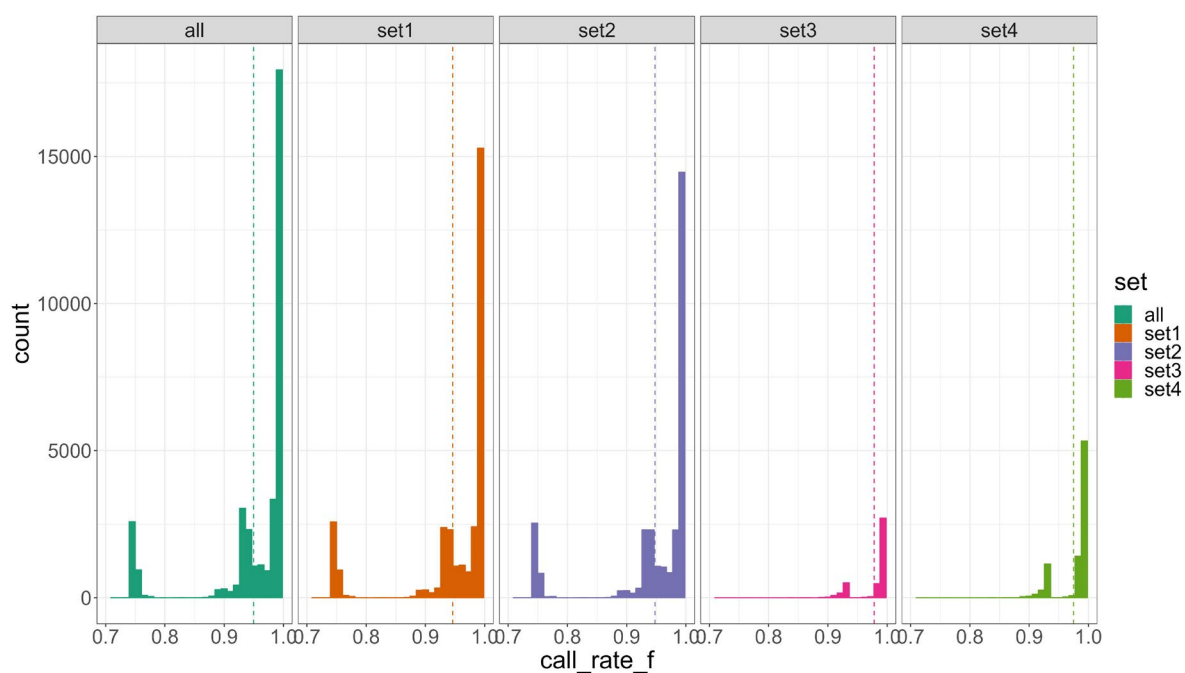
Syntetyczny opis wyników zadania:

W ramach przyjętego harmonogramu prac została wykonana imputacja wszystkich dostępnych genotypów (aktualizacja danych względem 2021 roku) ze szczególnym uwzględnieniem genotypów zwierząt do poszczególnych scenariuszy analizy.

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

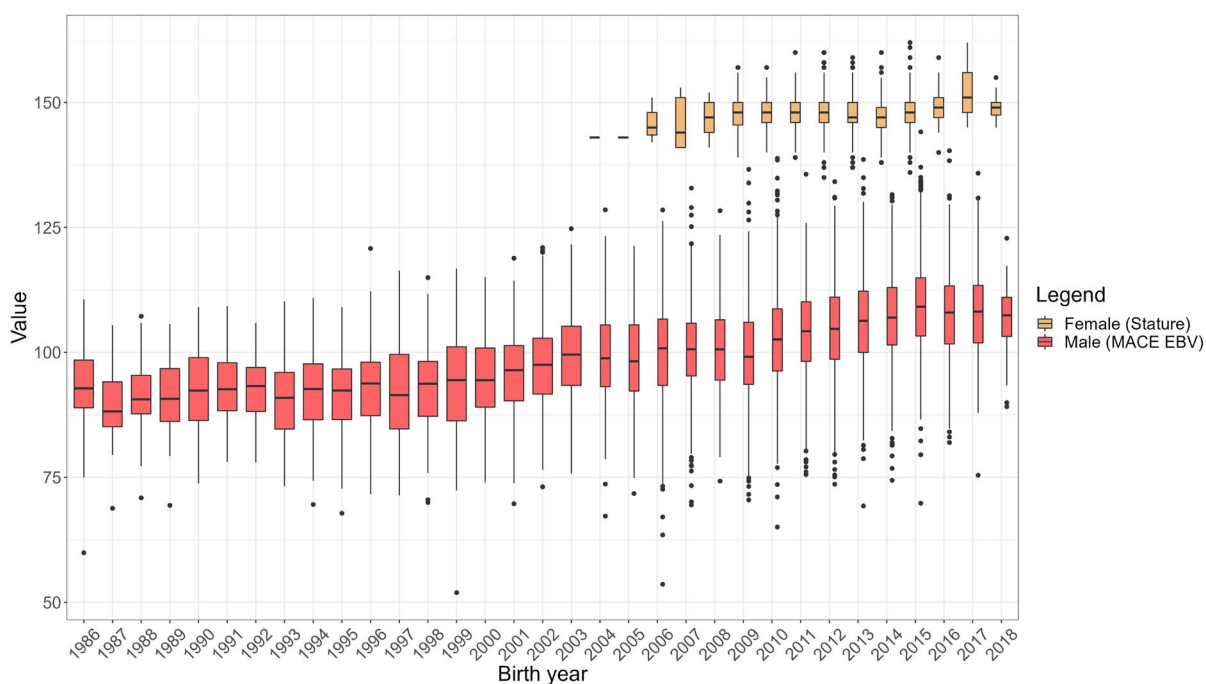
- pełen zestaw danych (ponad 37 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set1 – wykorzystanie tylko materiału męskiego (ponad 32 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set2 – wykorzystanie tylko materiału męskiego z pominięciem buhajów amerykańskich (ponad 30 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set3 – wykorzystanie tylko materiału męskiego z polski (ponad 5 000 buhajów w populacji referencyjnej),
- set4 – wykorzystanie zwierząt z polski (ponad 10 000 buhajów i krów w populacji referencyjnej).

Zwierzęta w każdym z przyjętych scenariuszy genotypowane zostały z użyciem macierzy Illumina BovineSNP50 v2 i charakteryzowały się różnym rozkładem *call rate*, co zostało przedstawione na Wykresie 1.

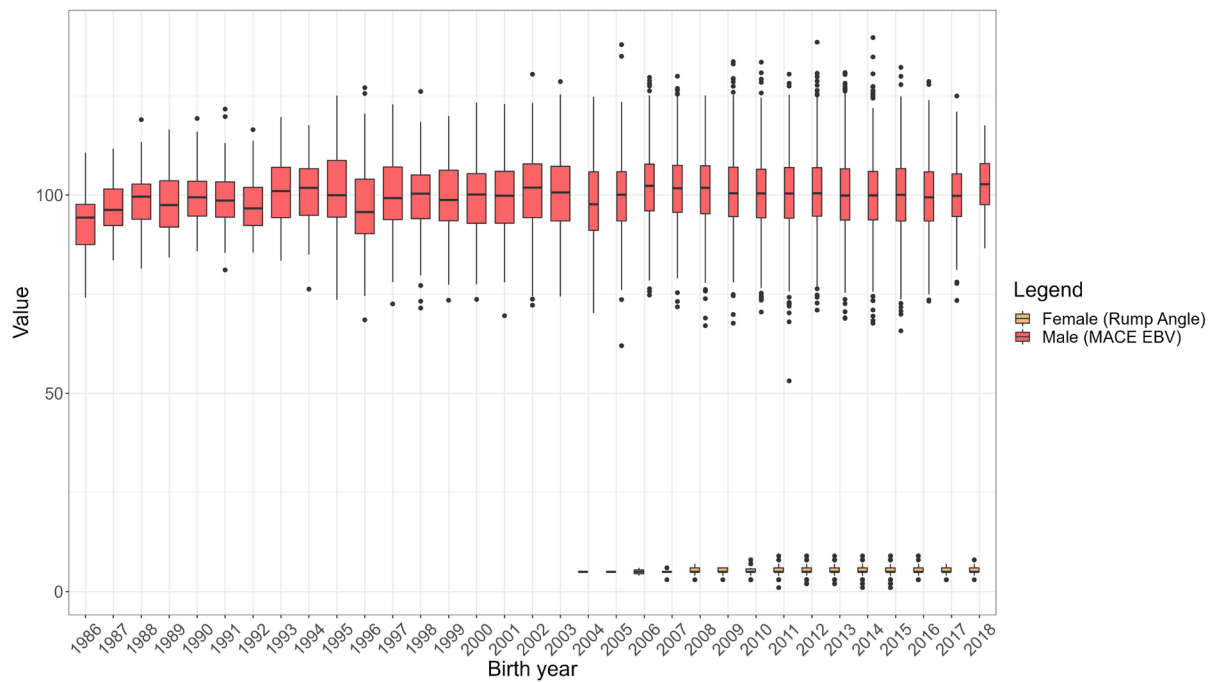
Wykres 1. Rozkład *call rate* w zależności od wybranego zbioru analizy danych w populacji referencyjnej.

Kolejnym krokiem było przeanalizowanie danych fenotypowych wybranych osobników, które zostały przygotowane w oparciu o dane pochodzące z rutynowej oceny wartości hodowlanej bydła mlecznego rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, w grudniu 2022 roku. Został również uszczegółowiony wybór cech do cech pokroju charakteryzujący 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 – 2, ustawienie zadu – 3, racice – 4.

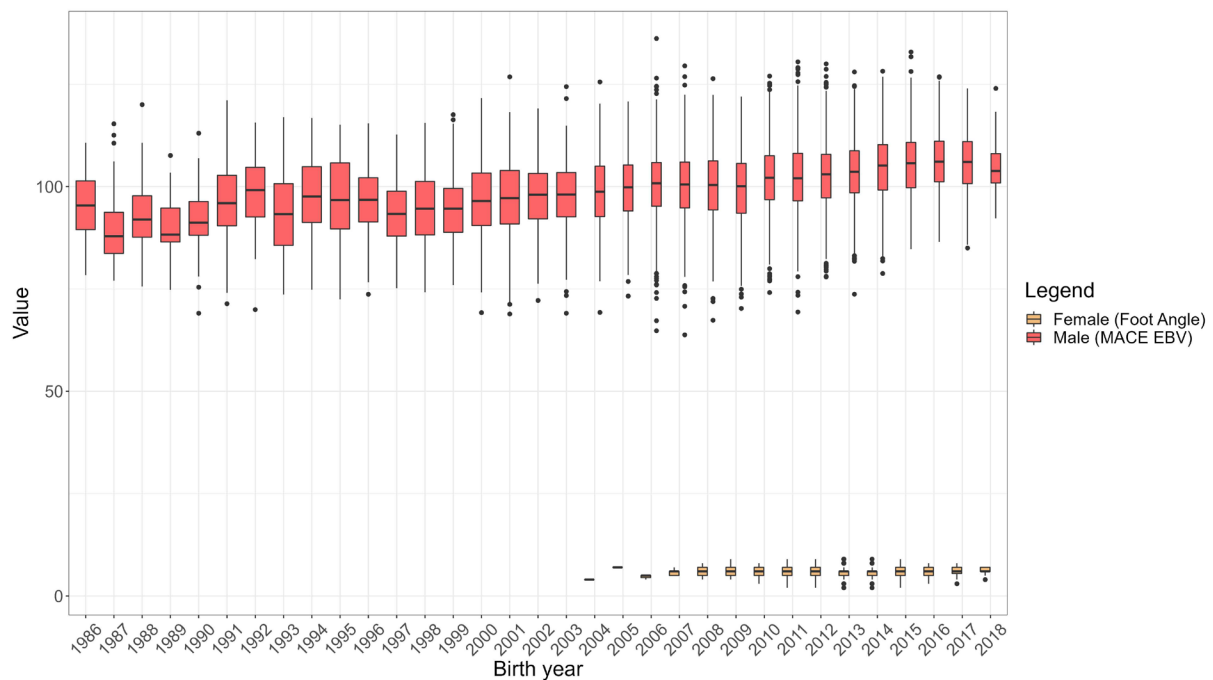
Wykres 2. Rozkład fenotypów dla cechy wysokość w krzyżu.



Wykres 3. Rozkład fenotypów dla cechy ustawienie zadu.



Wykres 4. Rozkład fenotypów dla cechy racice.



Liczebności zwierząt wykorzystanych w analizie zostały przedstawione w Tabeli 1. wraz z podstawowymi statystykami opasowymi – 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 na wartościach 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 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

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. Martyna Małopolska

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

Celem etapu była ocena jakości mięsa, typowanie genów oraz analiza statystyczna.

Założenia metodyczne:

- Zwierzęta w układzie trzygrupowym: knurki niepoddane zabiegowi kastracji; wieprzki poddane chirurgicznej kastracji bez znieczulenia do 7. dnia życia; immunokastraty – dwukrotna iniekcja analogu czynnika uwalniającego gonadotropiny (GnRH).
- Ocena jakości mięsa. Analizie tekstury poddano fragmenty mięśnia najdłuższego grzbietu (*longissimus dorsi*) oraz szynki (*semitembranosus*), pozyskane od wszystkich osobników. Oznaczono ilość tłuszczu śródmięśniowego. Przeprowadzono analizy: siły cięcia, energii cięcia, twardości, sprężystości, spoistości i żujności. Oznaczono zawartość skatolu i androstenonu, a także lotnych związków organicznych (LTO) w mięsie (*longissimus dorsi*) oraz tłuszczu.
- 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 ewentualnym negatywnym efektem immunokastracji.
- Zgromadzone dane poddano analizom statystycznym.

Kompleksowa analiza zagadnienia immunokastracji stwarza szanse do podjęcia prób wprowadzenia tej metody jako zamiennik kastracji chirurgicznej (bez znieczulenia), bądź ukie-
runkowania hodowców, producentów na alternatywne metody kastracji.

Syntetyczny opis wyników badań:

Uzyskane dane przygotowano do przeprowadzenia analiz statystycznych. W tabelach przedstawiono wyniki poszczególnych grup doświadczalnych (wieprzki, immunokastraty, knurki), jak i zestawienie wybranych grup.

Tabela 1. Wybrane cechy użytkowości tucznej i rzeźnej dla połowy analizowanych zwierząt (n=60).

Cecha	Średnia	Odchylenie standardowe
Zużycie paszy w okresie testu (30-120 kg)	230,123	34,347
Dni tuczu	84,062	10,195
Przyrost średni (g)	1060,646	142,901
Pobranie paszy/dzień (kg)	2,741	0,269
Pobranie paszy na 1 kg przyrostu	2,625	0,406
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów	1,506	0,345
Szerokość oka polędwicy	10,980	0,870
Wysokość oka polędwicy	6,537	0,676
Powierzchnia oka polędwicy (cm)	54,645	5,742
IMF	1,776	0,408

Tabela 2. Wybrane cechy użytkowości tucznej i rzeźnej w poszczególnych grupach badawczych (n=60; $\bar{x}$ średnia i σ odchylenie standardowe).

Cecha	Knury		Immunokastraty		Wieprzki	
N	20		20		20	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
Zużycie paszy w okresie testu (30-120 kg)	223,964	37,563	228,214	27,5578	255,222	35,4746
Dni tuczu	82,964	12,143	84,214	8,9788	87,000	6,9101
Przyrost średni (g)	1062,750	165,053	1073,107	125,4418	1015,333	124,2769
Pobranie paszy/dzień (kg)	2,700	0,218	2,721	0,2853	2,931	0,3128
Pobranie paszy na 1 kg przyrostu	2,595	0,412	2,556	0,3048	2,937	0,5501
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów	1,380	0,308	1,518	0,2650	1,858	0,4449
Szerokość oka polędwicy	10,825	0,863	11,118	0,7756	11,033	1,1630
Wysokość oka polędwicy	6,554	0,611	6,432	0,6498	6,811	0,9212
Powierzchnia oka polędwicy (cm)	53,750	4,800	54,825	5,9602	56,867	7,5939
IMF	1,557	0,337	1,891	0,3827	2,152	0,3254

Tabela 3. Androstenon, androstenol i skatol oznaczone w mięsie analizowanych zwierząt (n=60).

Cecha	Średnia	Odchylenie standardowe
SKATOL (ng/g)	74,733	39,977
AN-OL (ng/g)	61,302	25,957
AN-ON (ng/g)	70,598	41,635

Tabela 4. Androstenon, androstenol, indol i skatol oznaczone w tłuszczu analizowanych zwierząt (n=60).

Cecha	Średnia	Odchylenie standardowe
INDol (ng/g)	991,796	185,964
SKATOL (ng/g)	981,642	197,624
AN-OL (ng/g)	855,628	1543,581
AN-ON (ng/g)	2400,245	4186,466

Tabela 5. Androstenon, androstenol, indol i skatol oznaczone w mięsie w poszczególnych grupach zwierząt (n=60).

Cecha	Knury		Immunokastraty		Wieprzki	
N	20		20		20	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
SKATOL (ng/g)	63,362	43,214	79,244	38,5847	101,000	0,0000
AN-OL (ng/g)	67,664	26,999	58,690	23,1223	46,872	26,2175
AN-ON (ng/g)	67,435	47,303	70,477	37,2374	82,033	35,1390

Tabela 6. Androstenon, androstenol, indol i skatol oznaczone w tłuszczu w poszczególnych grupach zwierząt (n=60).

Cecha	Knury		Immunokastraty		Wieprzki	
N	20		20		20	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
INDol (ng/g)	1024,402	14,174	945,667	291,0901	1016,063	8,7877
SKATOL (ng/g)	1030,836	105,329	921,089	283,4521	991,122	6,4317
AN-OL (ng/g)	1776,556	1885,979	49,046	23,2116	52,126	11,9465
AN-ON (ng/g)	5027,954	4987,237	101,000	0,0000	101,000	0,0000

W celu lepszego zrozumienia roli genów zaangażowanych w opóźnienie dojrzewania płciowego poprzez stymulację naturalnego układu odpornościowego świni do produkcji przeciwciał, które hamują czynność jąder, zastosowano metodę sekwencjonowania RNA (RNA-seq) do porównania całych profili ekspresji genów.

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-Nędzka, 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. Z kolei, celem naukowym jest poznanie wpływu opracowanego sposobu żywienia i innowacyjnego dodatku paszowego na status zdrowotny świń oraz szeroko pojętą jakość i trwałość oksydacyjną mięsa

i tłuszczu oraz ocena czy lub w jakim stopniu poprawa tych cech w mięsie przekłada się na jakość i trwałość wyrobów wędliniarskich.

Założenia metodyczne:

Przeanalizowano dane uzyskane w 2021 roku w ramach doświadczenia 2., przeprowadzonego w IZ PIB ZD w Pawłowicach, dotyczącego określenia wpływu innowacyjnego dodatku do paszy *finiszer* na jakość mięsa tuczników rasy złotnickiej pstrej, w zakresie jakości technologicznej i trwałości oraz wartości odżywczej i prozdrowotnej.

Na podstawie składu podstawowego i trwałości oksydacyjnej polędwicy, profilu kwasów tłuszczowych w polędwicy i szynce, siły cięcia oraz profilu tekstury polędwicy i szynki, a także użytkowości tucznej i rzeźnej 60 tuczników rasy złotnickiej pstrej, dokonano oceny wpływu czynnika doświadczalnego na jakość mięsa i parametry wzrostu świń tej rasy. Do analiz wykorzystano program STATISTICA v12 (StatSoft, Inc. (2014)). W oparciu o wyniki analiz z doświadczenia 2. przygotowano metodykę doświadczenia żywieniowego 3. (rasa puławska), w tym wybrano receptury dodatków do mieszanki paszowej *finiszer*, zawierających biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego, mające poprawić wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa bez pogorszenia jego trwałości oksydacyjnej. W doświadczeniu 3., tuczono świnię rasy puławskiej do masy ciała 140 kg z wykorzystaniem mieszanki *finiszer* z trzema rodzajami dodatków paszowych (X, Y, Z), będących mieszaniną suszy ziółowych i/lub owocowych z dodatkiem ekstradowanych nasion Inu.

Doświadczenie 3.:

Dostosowanie składu komponentowego i receptury innowacyjnych dodatków do paszy do tuczu świń rasy puławskiej. Przeprowadzenie tuczu doświadczalnego z wykorzystaniem paszy *finiszer*, zawierających biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego o działaniu antyutleniającym i poprawiającym trwałość oksydacyjną oraz wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa.

Fot. 1. Warchlaki rasy puławskiej (M. Szyndler-Nędzia).



Trzecie doświadczenie wzrostowe objęło 40 tuczników (20 wieprzków, 20 loszek) rasy puławskiej (Fot 1.) o znanym genotypie RYR1 (NN).

W trakcie tuczu wszystkim zwierzętom podawano tę samą mieszankę paszową z bobiem (wariant C z doświadczenia 1.): od 30 do 90 kg masy ciała typu *grower* C, a od 90 kg do 140 kg masy ciała typu *finiszer*. W ostatniej fazie tuczu, tj. od 90 kg masy ciała zwierzęta zostały podzielone na cztery grupy żywieniowe. Grupa kontrolna A – tuczona była mieszanką paszową

finiszer bez dodatku paszowego, a trzy kolejne grupy doświadczalne otrzymały do mieszanki jeden z dodatków ziółowo-owocowych wybranych na podstawie wyników doświadczenia 2. (C, E, F). Układ doświadczenia 3. przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Układ grup w doświadczeniu 3. dla rasy puławskiej.

	Grupa kontrolna A	Grupa doświadczalna C	Grupa doświadczalna E	Grupa doświadczalna F	
Mieszanka	C	C	C	C	Razem
Dodatek (tęcznie około 2% mieszanki)	–	Dodatek X	Dodatek Y	Dodatek Z	
Tucz od 30 do 90 kg – liczba zwierząt	10	10	10	10	
Tucz od 90. do 140. kg mc	10	10	10	10	
Razem zwierząt doświadczalnych	20	20	20	20	

Pobrano próbki pasz doświadczalnych typu *grower* i *finiszer* w celu wykonania analizy składu podstawowego oraz profilu kwasów tłuszczowych paszy i lotnych związków organicznych (LZO) – tylko *finiszer*. Analizy te są wykonywane w Centralnym Laboratorium IZ PIB w Aleksandrowicach (CL). W próbkach paszy oznaczono białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy i suchą masę, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 152/2009, ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz. Analizę kwasów tłuszczowych przeprowadzono metodą chromatografii gazowej aparatem SHIMADZU GC-2010 Plus (Kolumna – Rtx2330, 105 m, 0,32 mm, 0,2 µm) zgodnie z P 015 wydanie 2. z dnia 01.03.2016 roku. Lotne związki organiczne określono metodą rozdziału chromatograficznego na chromatografie gazowym Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, wyposażonym w kwadrupolowy detektor MS (EI, 70 eV, 250°C) skanujący w trybie TIC w zakresie 35-450 m/z oraz niepolarną kolumnę Zebron ZB-5MSi (30 m×0,25 mm I.D.×0,25 µm), a następnie polarną Zebron ZB-WAXplus.

Po uboju zwierząt, które uzyskały masę ciała 140 kg, pobrano próbki krwi oraz określono parametry dysekcji tusz i jakości mięsa zgodnie z metodyką stosowaną w SKURTCh. W próbkach surowicy krwi oznaczono wskaźniki biochemiczne (ZZiP) metodą absorbancji fotometrycznej, z wykorzystaniem automatycznego analizatora BS-180 (Shenzhen Mindray, Chiny) i zestawów diagnostycznych firmy Cormay. We współpracy z UP Lublin rozpoczęto analizy statusu redox organizmu na podstawie wskaźników krwi: dysmutaza nadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GP), dialdehyd malonowy (MDA). Z półtusze pobrano i zamrożono próbki mięsa (polędwica za ostatnim żebrzem – *longissimus lumborum*, mięsień półbłonisty szynki – *Semimembranosus muscles*) w celu wykonania analiz tekstury (ZHTCh), a także do analiz chemicznych (CL). Wybrane elementy półtusze (schab, łopatka) przekazano do zakładu mięsnego, w celu wytworzenia wędlin surowo dojrzewających (polędwica i kiełbasa). Pozyskano próbki wytworzonych wędlin surowo dojrzewających, pochodzących od zwierząt doświadczalnych rasy puławskiej (polędwica, kiełbasa surowo dojrzewające) i przekazano je do dalszych analiz.

Syntetyczny opis wyników:

Na podstawie analizy danych zgromadzonych w ramach doświadczenia 2. na rasie złotnickiej pstrej (Fot. 2.) stwierdzono, że wprowadzenie dodatków żywieniowych do paszy *finiszer* (grupy: B, C, D, E, F), w porównaniu do grupy kontrolnej (A), nie wpłynęło na pobranie paszy na 1 kg przyrostu zwierząt, lecz przede wszystkim na niewielkie zmniejszenie przyrostów dziennych w całym okresie ich tuczu (średnio o 0,057 kg/dzień).

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



Wykazano także, że dodatki żywieniowe stosowane w grupach B (susz ziółowy), C (susz ziółowy+len), D (susz owocowy) poprawiły wartość wskaźników antyoksydacyjnych w krwi i mięsie tuczników, a także wartości wskaźników immunologicznych organizmu tuczników.

Analizując wpływ dodatków paszowych na skład podstawowy mięsa i produktów wykazano, że w porównaniu do grupy kontrolnej, mięso polędwicy i szynki pochodzące od tuczników z grup D i E cechowało się najniższą zawartością tłuszczu. W mięsie polędwicy i polędwicy dojrzewającej stwierdzono zmniejszenie zawartości witaminy E w grupach doświadczalnych D, E, F. Na podstawie analizy profilu kwasów tłuszczowych w mięsie i wyrobach stwierdzono, że największy wpływ stosowanych dodatków, w porównaniu do grupy kontrolnej, był w grupach C, D, E i F, przede wszystkim na zwiększenie zawartości kwasów tłuszczowych z grupy PUFA n-3 w mięsie szynki, polędwicy dojrzewającej i kielbasach surowo dojrzewających.

W przypadku oceny stabilności oksydacyjnej tłuszczu (wskaźniki jakości tłuszczu) wykazano, że najlepszymi parametrami FSI, w porównaniu do grupy kontrolnej, cechowało się mięso polędwicy z grupy E, mięso szynki z grup D i E, polędwice dojrzewające z grupy D i kielbasy z grup C, D i E.

Wartości wskaźników dietetycznych, korzystniejsze z punktu widzenia konsumenta, były w mięsie i produktach pochodzących przede wszystkim z grup doświadczalnych C, E, F, w porównaniu do grupy kontrolnej. 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. Najniższą wartością tego wskaźnika cechowały się kielbasy pochodzące z mięsa tuczników z grup E i F. Mięso polędwicy z grup C, E, F oraz mięso szynki z grup E, F cechowały się ponadto korzystnie mniejszą wartością wskaźnika TI. Wykazano także, że żywienie dodatkiem paszowym zawierającym susz ziółowy + len (E) wpłynęło na korzystne zwiększenie zawartości kwasów hypocholesterolowych (DFA), a tym samym zwiększenia wartości proporcji kwasów hypocholesterolowych do hipercholesterolowych (h/H) w mięsie polędwicy i szynki tuczników.

W oparciu o wyniki analiz z doświadczenia 2. ustalono, że ze względu na korzystny wpływ mieszanek paszowych na jakość mięsa i wyrobów, przede wszystkim pod względem ich wartości dietetycznej dla człowieka (przy zachowaniu dobrej jakości oksydacyjnej), w doświadczeniu 3. zwierzęta (świnie rasy puławskiej) tuczone będą do masy ubojowej 140 kg mieszankami *finisz*: A – kontrola, C (susz ziółowy + len), E (susz owocowy + len) F (susz ziółowy, susz buraka + len).

Do dnia 30 grudnia 2022 roku, w ramach doświadczenia 3. wzrostowego, tucz kontrolny ukończyło 40 sztuk (tj. 100%) świń puławskich. Zebrane próbki mięsa i wyrobów zostały przekazane do analiz.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie zamierzonego celu:

W trzecim roku realizacji zadania przeanalizowano dane uzyskane w ramach doświadczenia 2., przeprowadzonego w 2021 roku. W oparciu o wyniki tych analiz ustalono, że w doświadczeniu 3. świnie rasy puławskiej tuczone będą mieszanką paszową *finiszer* z dodatkiem C, E i F do masy ubojowej 140 kg. Zastosowane dodatki paszowe mają poprawić przede wszystkim wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa, przy zachowaniu jego dobrej trwałości oksydacyjnej. Zastosowano trzy rodzaje dodatków paszowych (X, Y, Z), będących mieszaniną suszy ziołowych i/lub owocowych z dodatkiem ekstradowanych nasion lnu. Przeprowadzono doświadczenie wzrostowe, które objęło 40 tuczników (20 wieprzków, 20 loszek) rasy puławskiej o znanym genotypie RYR1. Na próbkach pasz doświadczalnych typu *finiszer* wykonano analizy składu podstawowego, profilu kwasów tłuszczowych paszy i zidentyfikowano lotne związki organiczne. Do końca grudnia, w ramach doświadczenia 3., tucz doświadczalny ukończyło 100% świń puławskich. Pobrano i przekazano do laboratorium próbki mięsa i wędlin surowo dojrzewających w celu wykonania analiz tekstury i analiz chemicznych (w tym lotnych związków organicznych).

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

Pierwszym celem badań było określenie wpływu żywienia kur ras zachowawczych mieszankami paszowymi z udziałem roślin strączkowych na jakość jaj. Badaniami objęto po 120 kur i 12 kogutów sześciu ras/rodów, tj. leghorn (ród H-22), zielononóżka kuropatwiana (ród Z 11), żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), sussex (S-66), rhode island red (ród R-11) oraz rhode Island white (A-33). Kury podzielono na cztery powtórzenia (po 30♀+3♂). Połowa ptaków każdego rodu żywiona była standardową pełnoporcjową mieszanką paszową (grupa kontrolna – K), a połowa mieszanką, według opracowanej na potrzeby realizacji zadania receptury, w której ograniczony był udział soi na rzecz nasion grochu, bobiku i łubinu (grupa doświadczalna). Mieszanki paszowe zostały zbilansowane, zarówno pod względem zawartości białka jak i energii metabolicznej. Wykonano obliczenia statystyczne wyników analiz jakości jaj zniesionych przez kury obydwu grup w 52. tygodniu życia.

Jak wynika z Tabeli 1. i 2., większe różnice w zakresie jakości jaj stwierdzono między rasami/rodami kur niż między grupami kontrolnymi i doświadczalnymi. Żywienie niosek mieszanką zawierającą dodatek nasion grochu, bobiku i łubinu wpłynęło na lepsze wybarwienie żółtek jaj rodów H-22, Z-11, R-11 i A-33 ($P \leq 0,01$), a we wszystkich rodach na rozjaśnienie barwy skorup ($P \leq 0,01$) oraz obniżenie masy i gęstości skorup ($P \leq 0,01$), co nie wpłynęło istotnie na zmiany ich wytrzymałości na zgniecenie ($P \geq 0,05$).

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że zastępowanie w mieszankach dla kur ras zachowawczych importowanej soi nasionami grochu, bobiku i łubinu w żywieniu nie wpływa istotnie na obniżenie jakości treści jaj, ale nieznacznie pogarsza jakość skorup jaj.

Drugim celem badań było określenie wpływu genotypu kur i pory znoszenia jaj na ich jakość oraz zawartość i aktywność lizozymu w białku. W tym celu, w 56. tygodniu życia, od każdej rasy kur pobrano losowo po 16 jaj zebranych o godz. 7.00 i po 16 jaj zebranych o godz. 13.00, które poddano ocenie jakościowej za pomocą elektronicznej aparatury EQM (Egg Quality Measurements) firmy TSS QCS-II. Badano także zawartość i aktywność lizozymu w białkach jaj.

Podsumowanie badań:

- Wyniki uzyskane w pracy potwierdzają bioróżnorodność kur czterech ras objętych w Polsce programem ochrony. Cechy jakości jaj są zróżnicowane między rodami kur, a zależności między nimi są inne niż w stadach wysokoprodukcyjnych opisanych w literaturze.
- Jaja znoszone przez kury rano wyróżniały się mniejszą o 1,7 g masą całkowitą i masą białka (o 1,7g), większą o 2,4 porów/cm² porowatością skorup oraz wyższymi o 0,15 wartościami pH białka, a niższymi o 0,17 żółtka w porównaniu do znoszonych rano.
- Pora znoszenia badanych jaj nie wpłynęła istotnie na kształtowanie się pozostałych cech jakości jaj, w tym także na poziom i aktywność lizozymu w białku.
- Stwierdzono istotną, ujemną zależność między cechami skorup jaj oraz wysokością białka i JH a zawartością i aktywnością lizozymu w białku.

Tabela 1. Masa jaja oraz cechy jakości treści jaj od kur żywionych różnymi mieszankami paszowymi.

Wyszczególnienie	Grupa	H-22	Z-11	Ż-33	S-66	R-11	A-33	Wpływ (wartość P)		
		$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	rasy/rodu (R)	żywienia (Ż)	R x Ż
Masa jaja [g]	K	65.7±1.03	58.2±0.84	60.7±0.93	62.0±0.83	63.1±0.82	65.0±0.98			
	D	65.2±0.79	60.9±0.85	57.6±0.85	61.7±0.68	62.9±0.96	62.8±0.72			
	Średnia ± s.e.	65.4±0.65	59.5±0.62	59.2±0.66	61.9±0.53	63.0±0.63	63.9±0.62	<0.001	0.219	0.021
Masa żółtka [g]	K	19.0±0.30	17.5±0.18	19.0±0.31	18.6±0.25	18.4±0.14	17.6±0.26			
	D	19.4±0.25	17.8±0.24	18.3±0.25	18.8±0.19	18.9±0.27	17.3±0.20			
	Średnia ± s.e.	19.2±0.19	17.7±0.15	18.7±0.20	18.7±0.16	18.7±0.15	17.5±0.16	<0.001	0.465	0.111
Wysokość białka [mm]	K	8.58±0.25	7.80±0.27	7.48±0.33	7.99±0.23	8.72±0.33	8.21±0.21			
	D	7.78±0.29	7.45±0.22	7.47±0.29	8.03±0.23	8.68±0.29	7.72±0.29			
	Średnia ± s.e.	8.18±0.20	7.63±0.17	7.48±0.22	8.01±0.16	8.70±0.22	7.97±0.18	<0.001	0.082	0.597
Jednostki Haugha [jH]	K	90.5±1.5	88.1±1.6	84.8±2.3	88.4±1.2	91.6±1.9	88.9±1.16			
	D	85.8±1.9	85.5±1.4	85.9±2.1	88.6±1.3	91.3±2.0	86.4±1.59			
	Średnia ± s.e.	88.2±1.24	86.8±1.07	85.4±1.58	88.5±0.89	91.4±1.4	87.6±0.99	0.018	0.145	0.541
Barwa żółtka [pkt.]	K	9.32±0.25	9.2±0.31	9.88±0.26	10.0±0.23	10.2±0.21	9.8±0.21			
	D	10.2±0.21	9.5±0.22	9.88±0.19	9.8±0.22	11.0±0.20	10.4±0.21			
	Średnia ± s.e.	9.74±0.17	9.4±0.19	9.88±0.16	9.90±0.16	10.6±0.16	10.1±0.15	<0.001	0.003	0.106

Objaśnienia: H-22 leghorn; Ż-33 – żółtonóżka kuropatwiana; R-11 – rhode island red; A-33 – rhode island white; Z-11 – zielononóżka kuropatwiana; S-66 – sussex; Grupa K-kontrolna – żywienie mieszanką paszową standardową; grupa D-doświadczalna – żywienie mieszanką z udziałem bobiku, grochu i tufinu.



Tabela 2. Jakość skorupy jaj od kur żywionych różnymi mieszankami paszowymi.

Wyszczególnienie	Grupa	H-22	Z-11	Ż-33	S-66	R-11	A-33	Wpływ		
		$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	$\bar{x} \pm s.e.$	rasy/rodu (R)	żywienia (Ż)	R x Ż
Indeks kształtu [%]	K	75.2±0.41	75.8±1.08	77.0±0.50	75.2±0.74	73.8±0.55	77.0±0.71			
	D	75.7±0.66	76.6±0.98	76.4±0.71	76.6±0.50	73.8±0.67	75.9±0.51			
	Średnia ± s.e.	75.4±0.38	76.2±0.73	76.7±0.43	75.9±0.45	73.8±0.43	76.4±0.44	<0.001	0.711	0.529
Barwa skorupy [%]	K	79.2±0.83	71.7±1.31	64.0±0.78	49.1±1.30	46.2±1.77	32.8±1.3			
	D	81.5±1.19	74.1±0.42	64.9±0.39	52.2±0.40	52.9±0.46	34.5±0.42			
	Średnia ± s.e.	80.3±0.46	72.9±0.70	64.5±0.44	50.6±0.71	49.5±1.02	33.6±0.56	<0.001	<0.001	0.029
Masa skorupy [g]	K	6.93±0.09	6.12±0.10	6.03±0.15	5.98±0.12	6.54±0.12	6.88±0.11			
	D	5.76±0.10	5.65±0.09	5.37±0.07	5.52±0.06	5.51±0.09	5.67±0.06			
	Średnia ± s.e.	6.34±0.11	5.88±0.07	5.70±0.09	5.75±0.07	6.03±0.10	6.28±0.11	<0.001	<0.001	<0.001
Gęstość skorupy [mg/cm ²]	K	84.6±1.2	79.1±1.3	78.6±1.9	77.6±1.6	83.6±1.5	85.8±1.5			
	D	70.7±1.1	71.8±1.3	71.5±9.6	70.0±0.7	69.8±1.3	70.3±0.97			
	Średnia ± s.e.	77.7±1.3	75.5±1.0	75.1±1.1	73.8±1.0	76.7±1.4	78.1±1.4	0.009	<0.001	<0.001
Grubość skorupy [µm]	K	321±2.2	313±2.7	310±3.5	307±2.8	316±3.9	325±3.9			
	D	318±1.4	314±1.6	311±2.4	314±1.8	317±2.5	315±2.0			
	Średnia ± s.e.	320±1.3	314±1.6	311±2.1	311±1.7	317±2.2	320±2.3	<0.001	0.802	0.054
Wytrzymałość skorupy [N]	K	45.4±1.99	42.9±1.81	39.8±1.74	37.8±1.9	41.1±1.99	38.9±2.22			
	D	41.2±2.79	39.1±1.55	41.3±2.62	35.6±2.37	37.4±2.14	38.4±1.65			
	Średnia ± s.e.	42.3±1.72	41.0±1.21	40.5±1.56	36.7±1.51	39.2±1.47	38.6±1.37	0.043	0.078	0.701

Objaśnienia jak w Tabeli 1.

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

W 2022 roku przeprowadzono badania, których celem była ocena efektywności odchowu kurcząt rzeźnych Hubbard JA 957 w warunkach długotrwałego stresu zimna w chowie ekologicznym. Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta kurcząt rzeźnych Hubbard JA 957 – w ogólnej liczbie 300 sztuk.

Doświadczalne ptaki zostały przydzielone do trzech grup:

1. kurczęta rzeźne Hubbard JA 957 utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego w standardowych warunkach termicznych,
2. kurczęta rzeźne Hubbard JA 957 utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. W okresie od 4. do 6. tygodnia poddane działaniu stresu termicznego (temperatura obniżona o 15°C w stosunku do temperatur zalecanych),
3. kurczęta rzeźne Hubbard JA 957 utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. W okresie od 6. do 8. tygodnia poddane działaniu stresu termicznego (temperatura obniżona o 15°C w stosunku do temperatur zalecanych).

Podczas badań zbierano dane dotyczące warunków klimatycznych oraz wyników produkcyjnych kurcząt rzeźnych. 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: 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 oraz wykonano pomiar temperatury ciała ptaków. Określono również stan kończyn, upierzenia oraz przeprowadzono pomiar czasu trwania tonicznego bezruchu (TI). W okresie obniżonych temperatur powietrza przeprowadzono obserwacje behawioralne.

Podsumowanie:

Podsumowując dotychczas opracowane wyniki, stwierdzono, że czynnik doświadczalny nie miał wpływu na końcową masę ciała kurcząt rzeźnych.

Kurczęta rzeźne z grupy 2., którym została w 4.-6. tygodniu odchowu obniżona temperatura powietrza o 15°C w stosunku do zalecanej, charakteryzowały się niższą temperaturą rektalną w 6. i 8. tygodniu doświadczenia oraz niższą temperaturą radiacyjną w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano również u ptaków z tej grupy doświadczalnej wyższy poziom hematokrytu w porównaniu z ptakami utrzymywanymi przez cały okres w zalecanej temperaturze powietrza. Tuszki ptaków z doświadczalnej grupy 2. odznaczały się większym udziałem podrobów oraz żółtka, a mięśnie piersiowe większym poziomem TBARS w stosunku do tuszek ptaków kontrolnych.

Kurczęta rzeźne z doświadczalnej grupy 3., którym została obniżona temperatura powietrza w 6.-8. tygodniu odchowu charakteryzowały się mniejszym procentowym udziałem śledziony w 6. oraz śledziony i torby Fabrycjusza w 8. tygodniu doświadczenia, w porównaniu

z grupą kontrolną. W dwóch ostatnich tygodniach odchowu stwierdzono również u kurcząt z 3. grupy niższą niż u ptaków w grupie 1. temperaturę rektalną i radiacyjną oraz większy poziom hematokrytu we krwi. Tuszki ptaków z doświadczalnej grupy 3. odznaczały się większym udziałem serca oraz żołądka w stosunku do tuszek ptaków z grupy kontrolnej.

Tabela 1. Temperatura ciała (°C) i czas trwania tonicznego bezruchu TB (s) kurcząt rzeźnych.

Wyszczególnienie	Tydzień odchowu	Grupa			SEM
		I kontrola	II 4-6 tyg. obniżona temp. powietrza	III 6-8 tyg. obniżona temp. powietrza	
Temperatura rektalna	4	41,39	41,53	41,37	0,06
	6	41,69 A	41,16 B	41,64 A	0,06
	8	41,71 Aa	41,46 b	41,33 B	0,05
	9	41,68 A	41,49	41,31 B	0,06
Temperatura radiacyjna części opierzonych	4	36,72 B	32,78 Aa	34,27 Ab	0,37
	6	28,97 A	18,14 B	28,09 A	0,96
	8	28,20 A	13,16 B	12,68 B	1,38
	9	25,98 Aa	23,88 Ab	13,62 B	1,05
Temperatura radiacyjna części nieopierzonych	4	37,10 B	34,19 A	36,57 B	0,38
	6	32,29 A	16,00 B	33,46 A	0,64
	8	32,30 A	23,57 B	16,93 C	1,28
	9	34,15 A	33,15 A	13,32 B	1,89
TB	4	251,80	263,90	124,30	37,41
	6	321,10	321,10	220,70	29,49
	8	343,30	362,50	261,20	36,34
	9	212,67	121,60 A	213,37 B	38,24

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 2. Poziom hematokrytu we krwi kurcząt rzeźnych.

Tygodnie odchowu	Grupa			SEM
	I kontrola	II 4-6 tyg. obniżona temp. powietrza	III 6-8 tyg. obniżona temp. powietrza	
4	28,071 a	29,778 b	29,143	0,296
6	28,133	29,474 a	27,800 b	0,306
8	25,600 A	31,895 B	31,632 B	0,552
9	30,706 A	28,211 B	35,053 C	0,513

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. Wyniki analizy rzeźnej kurcząt rzeźnych.

Wyszczególnienie	Grupa			
	I kontrola	II 4-6 tyg. obniżona temp. powietrza	III 6-8 tyg. obniżona temp. powietrza	SEM
Wydajność rzeźna z podrobami	77,453	77,668	77,014	0,241
Wydajność rzeźna bez podrobów	74,311	74,087	73,530	0,240
Mięśnie piersiowe	21,383	21,818	22,440	0,224
Mięśnie nóg	19,886	20,113	20,104	0,223
Kości nóg	5,413	5,395	5,283	0,085
Tłuszcz sadełkowy	2,655	2,221	2,436	0,123
Podroby	4,332 A	4,625 B	4,526	0,043
Wątroba	2,099	2,122	2,076	0,033
Żółtek	1,674 Aa	1,937 Ba	1,813 b	0,027
Serce	0,529 A	0,559 A	0,618 B	0,009

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. pH – mięśni piersiowych i nóg kurcząt rzeźnych.

Wyszczególnienie		Grupa			
		I kontrola	II 4-6 tyg. obniżona temp. powietrza	III 6-8 tyg. obniżona temp. powietrza	SEM
mięśnie piersiowe	pH ₁₅	6,382	6,301	6,302	0,024
	pH ₂₄	5,905	5,869	5,905	0,009
mięśnie nóg	pH ₁₅	6,614	6,621	6,602	0,025
	pH ₂₄	6,238	6,388	6,253	0,031

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

Celem badań była ocena wpływu zabiegu sterylizacji kogutów i żywienia w oparciu o krajowe źródła białka na jakość mięsa.

Materiał doświadczalny stanowiły koguty/kapłony rasy rhode island red (R-11), rhode island white (A-33), sussex (S-66), żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), utrzymywane w systemie ściółkowym. Doświadczenie przeprowadzono w ZD IZ PIB w Chorzeliowie Sp. z o.o. 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 28.04.2021 roku.

Na potrzeby doświadczenia opracowano recepturę mieszanki doświadczalnej, zbożowej, opartej na krajowych źródłach białka. Wszystkie ptaki przez cały okres odchowu i tuczu

miały stały, nieograniczony (*ad libitum*) dostęp do paszy oraz do wody pitnej. W żywieniu zastosowano trójfazowy system żywienia: – od 1. dnia do 10. tygodnia odchowu, – od 11. Do 16. tygodnia tuczu, – od 17. do 24. tygodnia tuczu.

Ptaki utrzymywano z zachowaniem dobrostanu, w optymalnych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 5-7 sztuk/m². Program szczepień obejmował szczepienia przeciwko chorobie: Mareka – rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro oraz kokcydiozie. Zabieg kastracji został przeprowadzony w znieczuleniu miejscowym przez lekarza weterynarii pomiędzy 8. a 9. tygodniem życia ptaków, przy masie ciała ok. 550-600 g. Po zabiegu ptaki zostały przeniesione do czystego pomieszczenia, podano im wodę i paszę.

W 24. tygodniu życia ptaków, tj. po zakończeniu tuczu z każdej grupy wybrano do uboju po 10 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Kapłony przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Czynność uśmiercania została przeprowadzona przez osobę przeszkoloną, metodą dekapitacji. Za pomocą pH-metru CyberScan 10 określono kwasowość mięśni w 15. minucie po uśmierceniu ptaków i ich skrawieniu, a następnie została przeprowadzona standardowa obróbka poubojowa (oparzanie, skubanie, patroszenie). Schłodzone tuszki poddano analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989) po uprzednim określeniu ich barwy, przy użyciu spektrofotometru odbiciowego Minolta CR 310.

Uzyskane wyniki zweryfikowano statystycznie, przy użyciu analizy wariancji (ANOVA). Obliczenia wykonano pakietem statystycznym *Statistica 13.1*.

Fot. 1. Kapłon R-11

Fot. 2. Kapłon A-33

Fot. 3. Kapłon S-66

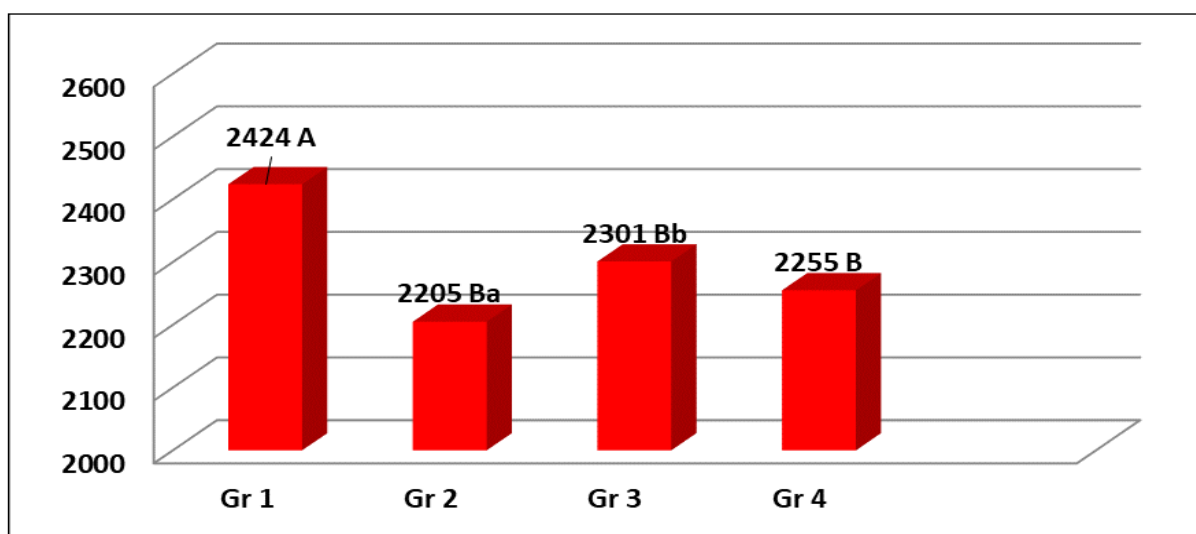
Fot. 4. Kapłon Ż-33



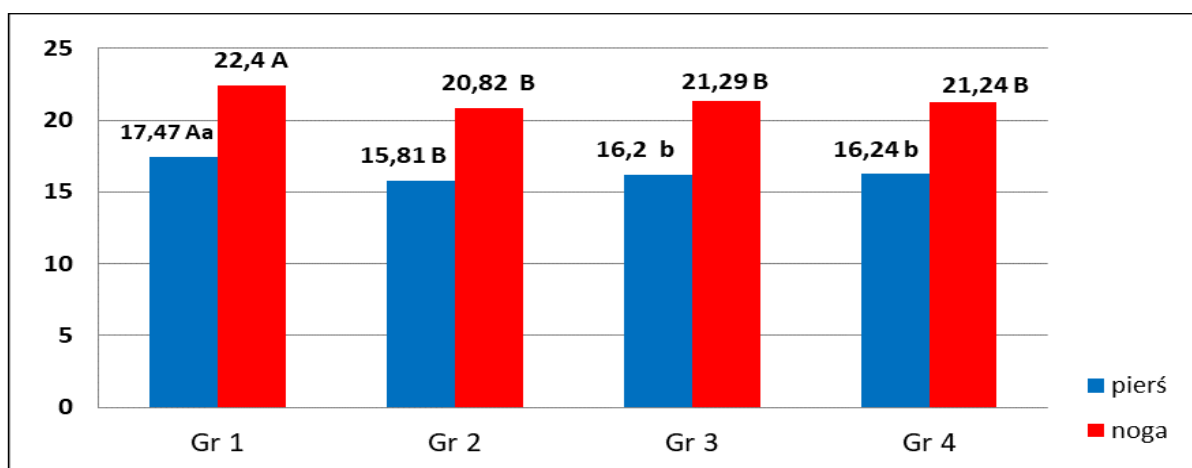
Na fotografiach 1.-4. przedstawiono materiał badawczy, tj. kapłony: R-11, A-33, S-66 i Ż-33 w wieku 24 tygodni. W wyniku zabiegu kastracji zaobserwowano zmiany w wyglądzie i zachowaniu samców, a dotyczyło to drugorzędnych cech płciowych, tj. grzebienia i dzwonków oraz sylwetki ptaków, ptaki były bardziej spokojne i mniej aktywne. Średnia masa ciała w 24. tygodniu życia ptaków była istotnie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$) większa u kapłonów z grupy 1. (2424 g), przy jednocześnie istotnie ($P \leq 0.01$) większej wydajności rzeźnej z podrobami (72,26 %) i bez podrobów (68,42 %). Najmniejszą masę ciała i wydajność rzeźną z podrobami i bez podrobów odnotowano u kapłonów A-33, która była odpowiednio mniejsza o 219 g oraz o 2,79 i 2,48 pkt. proc. Pomiędzy ocenianymi grupami ptaków nie odnotowano różnic w stratach masy tuszek podczas ich schładzania przez 24 h. Również kapłony rasy karmazyn/RIR (R-11) wyróżniały się istotnie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$) większą zawartością mięśni piersiowych (17,47 %) i nóg (22,40%) oraz udziałem kości (6,23 %). W tej grupie ptaków odnotowano również tendencję do większej zawartości podrobów, a zwłaszcza żołądka. Oceniane grupy ptaków nie różniły się pod względem zawartości tłuszczu sadełkowego, która stanowiła od 1,93 (A-33) do 2,24

% (S-66) masy tuszki. W badaniach odnotowano duże zróżnicowanie w zakresie barwy tuszek ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$). Największe wartości L^* odnotowano u kapłonów A-33 ($L^*=72,19$), a istotnie mniejsze u kapłonów z rodów: Ż-33 i R-11 ($L^*=69,95-70,31$). W odniesieniu do barwy czerwonej (a^*) największe wysycenie odnotowano w rodach A-33 i S-66 ($a^*=4,25-4,45$), natomiast w kierunku żółtym (b^*) u kapłonów R-11, A-33 i Ż-33 ($b^*=13,25-15,31$). Oceniane grupy ptaków nie różniły się pod względem pomiarów kwasowości mięśni mierzonych w 15. minucie i 24. godzinie po uboju, a spadek odczynu pH pomiędzy badaniami przyjmował wartości od 0.50 do 0.53 pkt. dla mięśni piersiowych oraz od 0.37 do 0.43 pkt dla mięśni nóg. Najlepsze parametry kruchości wykazywały mięśnie piersiowe kapłonów R-11 (14,65 N) w odróżnieniu od kapłonów A-33 (18,28 N), przy istotnych różnicach statystycznych ($P \leq 0.05$). Kruchość mięśni nóg wahała się od 22,32 (R-11) do 25,51 N (A-33), bez wyraźnych różnic statystycznych.

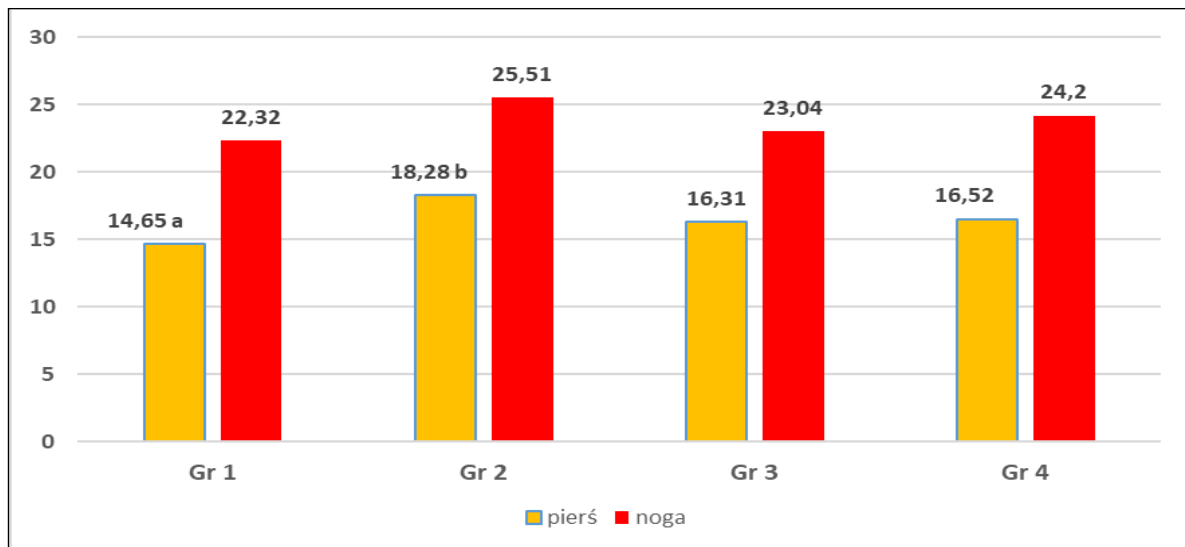
Rycina 1. Masa ciała (g).



Rycina 2. Zawartość mięśni piersiowych i nóg (%).



Rycina 3. Kruchość mięśni piersiowych i nóg (N).



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

Zadanie 04-12-01-11

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 wybranych preparatów bioaktywnych podanych *in ovo* w określonych terminach okresu embriogenezy gęsi na kształtowanie wskaźników wylęgowości, przeżywalności i zdrowotności piskląt.

Materiałem badawczym w realizowanym zadaniu były jaja wylęgowe gęsi białych kołudzkich® (W-31). Ptaki te utrzymywane są w SZGDW IZ PIB ZD Kołuda Wielka.

Fot. 1. Mieszańce towarowe gęsi białych kołudzkich®.



Gęsi, od których pobierano jaja do iniekcji, utrzymywano w jednakowych warunkach środowiskowo-żywniowych. Od ptaków będących w jednakowym wieku pobrano jaja do doświadczalnej inkubacji (dwa powtórzenia). Ogółem doświadczalnej inkubacji, poddano 360 jaj gęsi. Utworzono sześć grup doświadczalnych.

W okresie od maja do czerwca br. przeprowadzono iniekcję:

1. witaminą K (Vitacon/Phytomenadionum, 10 mg/ml, Polfa, Warszawa) w następujących grupach:
 - a) kontrolna – niepoddana iniekcji (K1)*(30 jaj), 13. doba,
 - b) doświadczalna 1 (BK-K1) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
 - c) doświadczalna 2 (BK-K2) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).
2. preparatem lizozymu o aktywności ≥ 40.000 U/ml (1 g, Sigma-Aldrich) w następujących grupach:
 - a) kontrolna – niepoddana iniekcji (K2)*(30 jaj), 20. doba,
 - b) doświadczalna 1 (BK-L1) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml /jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
 - c) doświadczalna 2 (BK-L2) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml /jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

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

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



Fot. 3. Inkubacja jaj doświadczalnych.



Wszystkie doświadczenia i badania zrealizowano w SZGDW IZ PIB ZD Kołuda Wielka ze względu na to, iż na fermie utrzymywane są stada gęsi białych kołudzkich® (W-31), od których pobrano jaja przewidziane do eksperymentów. W tutejszym zakładzie wylęgowym, przeprowadzono zgodnie z przyjętymi w nim standardowymi procedurami, inkubację jaj doświadczalnych oraz iniekcje.

Uzyskane wyniki składające się na ocenę wskaźników wylęgowości, z uwzględnieniem rodzaju zastosowanego preparatu bioaktywnego, 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. Wyniki opracowano w formie sprawozdania rocznego z realizowanego zadania.

Najcięższe jaja nałożone pochodziły z grupy doświadczalnej ptaków (BK-L1) iniekowanej preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml/jajo w 13. dniu inkubacji – 177,3 g. Z kolei, najniższą masę nałożonych jaj odnotowano w grupie BK-K1 (grupa doświadczalna poddana iniekcji witaminą K w dawce 10 mg/jajo w 13. dniu inkubacji) – 175,1 g. W przypadku pozostałych grup doświadczalnych masa w/w jaj mieściła się w przedziale od 175,3 (iniekcja witaminą K w dawce 10 mg/jajo w 20. dniu inkubacji) do 176,8 g (iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 mg/jajo w 20. dniu inkubacji). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

W grupie gęsi iniekowanych preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml/jajo w 20. Dniu inkubacji (BK-L2) wykazano największy stosunek jaj wylężonych do zapłodnionych (85,45%) i wylężonych do przełożonych (92,67%) przy jednocześnie najmniejszej ilości jaj niewylężonych (7,32%), piskląt kalekich (0,41%) i zarodków zamartych (7,79%). Odwrotną sytuację stwierdzono w grupie doświadczalnej K-1 (kontrolna, bez iniekcji/ w 13. dobie), w której odnotowano najmniejszy stosunek jaj wylężonych do zapłodnionych (83,11%) oraz jaj wylężonych do przełożonych (91,48%). Największą ilość jaj niewylężonych (8,52%) i zarodków zamartych (9,15%) wykazano w grupie doświadczalnej K1. Stwierdzono ponadto największą ilość piskląt kalekich (0,52%) w grupie doświadczalnej poddanej iniekcji witaminą K w dawce 10 mg/jajo w 13. dniu inkubacji. Ilość jaj przełożonych zawierała się w granicach od 90,85 (K-1) do 92,20% (BK-L2). 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 mięsa pulard czterech ras żywionych mieszanką zbożową. Doświadczenie przeprowadzono w ZD IZ PIB Chorzelów Sp. z o.o. Procedury były zgodne z wymaganiami lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach.

Ptaki po wylęgu oznakowano i przydzielono losowo do czterech grup:

Grupa I – pulardy Ż-33, ściółkowy system utrzymania, żywienie mieszanką doświadczalną,
 Grupa II – pulardy S-66, ściółkowy system utrzymania, żywienie mieszanką doświadczalną,
 Grupa III – pulardy R-11, ściółkowy system utrzymania, żywienie mieszanką doświadczalną,
 Grupa IV – pulardy A-33, ściółkowy system utrzymania, żywienie mieszanką doświadczalną.

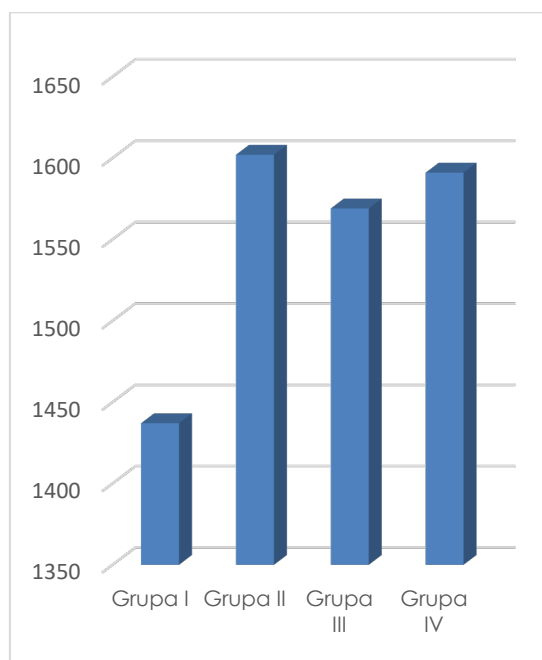
Ptaki utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 sztuk/m². Program obejmował szczepienia przeciwko chorobie: Mareka, rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro oraz kokcydiozie. Przez cały okres odchowu i tuczu kurki/pulardy żywione 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.

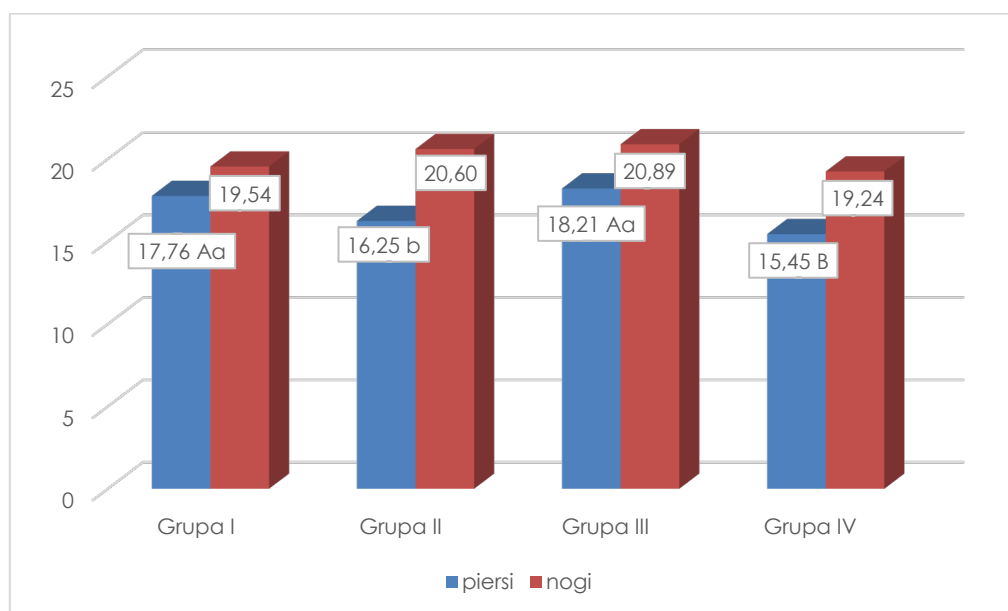
Po zakończeniu doświadczenia, z każdej grupy wybrano do uboju po osiem ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Ptaki przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Po uboju sprawdzono skuteczność przeprowadzonego zabiegu sterylizacji (brak jajnika). Schłodzone tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989), po uprzednim określeniu ich barwy i przy użyciu spektrofotometru odbiciowego Minolta CR 310. Za pomocą pH-metru CyberScan 10 określono kwasowość mięśni w 15. minucie oraz w 24. godzinie po uboju.

Uzyskane wyniki zweryfikowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji (ANOVA). Obliczenia wykonano pakietem statystycznym Statistica 13.3. Spośród pulard wybranych do analizy rzeźnej (Rycina 1. i Tabela 1.) najcięższe były S-66 a najlżejsze Ż-33 ($P \leq 0,01$), średnio różnica między tymi rodami wynosiła 165 g.

Rycina 1. Masa ciała (g).



Rycina 2. Zawartość mięśni piersiowych i nóg (%).



Najwyższą wydajność rzeźną z podrobami (75,51%) i bez podrobów (71,44%) uzyskali ptaki S-66 ($P \leq 0,05$), wartości te były większe odpowiednio o 3,0 i 3,33 punktów procentowych od najniższych. Największe straty masy tuszki (Tabela 1.), podczas ich schładzania przez 24 h zanotowana w rodzie Ż-33. Pulardy rodu R-11 wyróżniały się istotnie ($P \leq 0,05$ i $P \leq 0,01$) większą zawartością mięśni (Rycina 2.) piersiowych (18,21%) i nóg (20,89%) oraz udziałem kości (5,30%).

Największy udział podrobów w tuszce zanotowano w rodzie S-66 ($P \leq 0,05$). Oceniane grupy ptaków różniły się ($P \leq 0,01$) pod względem zawartości tłuszczu sadełkowego. Prawie dwukrotnie większą wartość tego parametru uzyskali ptaki A-33, w porównaniu z pozostałymi badanymi rodami.

Tabela 1. Masa ciała oraz wyniki analizy rzeźnej.

Cecha	Grupa			
	I (Ż-33)	II (S-66)	III (R-11)	IV (A-33)
Masa ciała (g)	1437 ± 47,62 B	1602 ± 73,91 A	1569 ± 77,52 A	1591 ± 75,05 A
Straty masy tuszki (%)	2,07 ± 0,64 a	1,96 ± 0,72 a	1,33 ± 0,41 b	1,36 ± 0,43 b
Wydajność rzeźna z podrobami (%)	73,29 ± 2,62 b	75,51 ± 2,29 a	72,71 ± 1,63 b	72,75 ± 1,79 b
Wydajność rzeźna bez podrobów (%)	69,16 ± 2,69	71,44 ± 2,60 a	68,11 ± 1,80 b	68,73 ± 2,09 b
Mięśnie piersiowe (%)	17,76 ± 1,54 Aa	16,25 ± 1,09 b	18,21 ± 1,19 Aa	15,45 ± 1,66 B
Mięśnie nóg (%)	19,54 ± 1,76	20,60 ± 1,64	20,89 ± 2,07	19,24 ± 2,16
Kości nóg (%)	5,06 ± 0,71	5,05 ± 0,50	5,30 ± 0,61	4,78 ± 0,43
Podroby (%)	5,64 ± 0,45	6,34 ± 0,88 a	5,41 ± 0,69 b	5,53 ± 0,66 b
Tłuszcz (%)	3,10 ± 0,91 B	2,11 ± 1,05 B	2,25 ± 0,60 B	5,00 ± 1,44 A

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

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono statystycznie istotne różnice w barwie tuszek (L^* i b^*). Najbardziej jasne są pulardy rodu S-66 (Tabela 2.), a najmniejszą wartość L^* uzyskali ptaki z rodu Ż-33 ($P \leq 0,01$) oraz A-33 ($P \leq 0,05$). W odniesieniu do barwy żółtej (b^*) największe wysycenie odnotowano w rodzie A-33 (18,63).

Tabela 2. Barwa tuszki.

Cecha	Grupa			
	I (Ż-33)	II (S-66)	III (R-11)	IV (A-33)
L^*	69,42 ± 0,68 B	71,86 ± 1,32 Aa	71,36 ± 1,15 A	70,55 ± 1,33b
a^*	3,18 ± 0,51	4,11 ± 0,94	4,02 ± 1,30	4,00 ± 0,87
b^*	14,84 ± 1,45 A	11,32 ± 2,05 B	13,23 ± 2,05 ABC	18,63 ± 1,93 A

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

Kwasowość mięśni piersiowych i mięśni nóg ptaków mierzona po 15 minutach po uboju oraz po 24. godzinach chłodzenia tuszek, utrzymywała się na podobnym poziomie.

Podsumowując uzyskane wyniki stwierdzono, że najlepszym materiałem wyjściowym do produkcji pulard są kury rhode island red (R-11) – mięśnie piersiowe i mięśnie nóg oraz sussex (S-66) – masa ciała, wydajność rzeźna oraz barwa tuszki.

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

Zadanie 01-13-03-11

Charakterystyka zróżnicowania genetycznego małej populacji na przykładzie rodzimej rasy kóz karpackich.

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

Cel zadania:

- Stworzenie systemu do monitoringu populacji i obsługi ksiąg kóz karpackich.
- Ocena struktury genetycznej odtworzonej rasy kóz karpackich na podstawie informacji z markerów mikrosatelitarnych oraz ocena przydatności tego narzędzia w identyfikacji osobniczej kóz.
- Analiza polimorfizmu genów białek mleka kóz karpackich oraz ocena możliwości wykorzystania w ocenie przydatności technologicznej i dietetycznej surowca.

System do monitoringu populacji i obsługi ksiąg kóz karpackich:

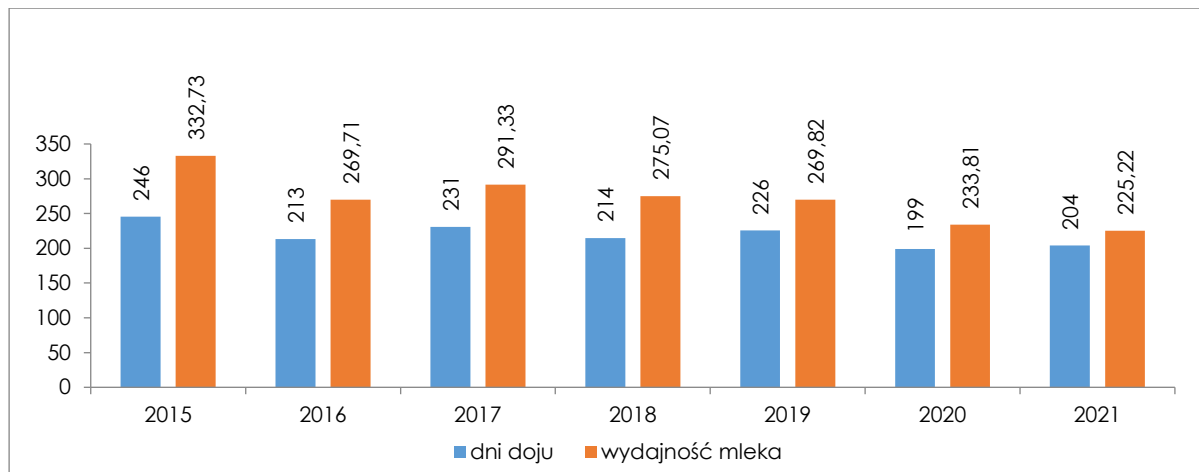
Stworzono system do gromadzenia, przetwarzania i prezentacji danych dotyczących kozy karpackiej (System „Kozy”), służący do koordynowania działań IZ PIB w zakresie ochrony – identyfikacji i lokalizacji każdego zwierzęcia. Pozwala on określić aktualny stan zwierząt objętych programem ochrony zasobów genetycznych oraz służy do wystawiania świadectw wpisu zwierząt do ksiąg kóz karpackich.

Aplikacja została stworzona w języku C# środowiska Visual Studio 2015 z użyciem Net 4.5.1, ReportViewer 12, dapper 1.6. Zawiera interfejs do wprowadzania i modyfikacji danych w bazie oraz pozwala na wystawianie świadectw wpisu do ksiąg.

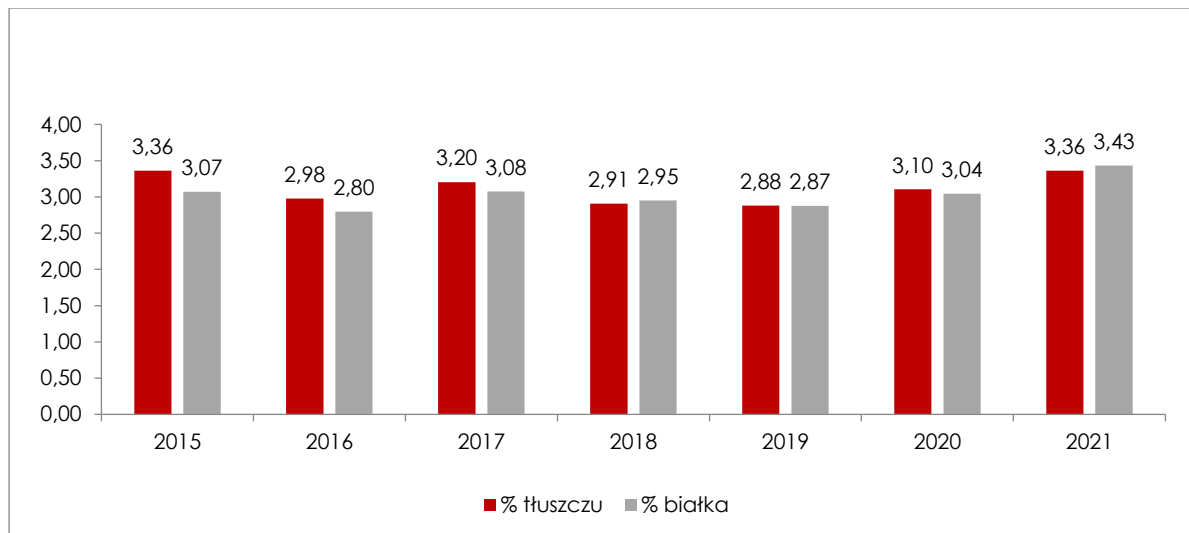
Baza obejmuje dane o zwierzętach urodzonych po 2003 roku i obecnie zawiera informacje o 565 kozach i 103 kozłach. Od 2006 roku prowadzona jest kontrola mleczności kóz karpackich. W 2021 roku oceniono 250 kóz matek z 14 gospodarstw – dój trwał średnio 204 dni (od 154-241 dni), a średnia wydajność mleczna wynosiła 225,22 kg mleka. Najwyższa wydajność mleczna wynosiła 508 kg a najniższa 53 kg. Zawartość tłuszczu mieściła się w przedziale od 1,69-7,35%, średnio wynosząc 3,36%, a zawartość białka w przedziale od 2,59-9,1%, średnio 3,43%. Urodziły się 322 kozłeta, średnio na wykot przypadało 1,2 kozłęcia, z czego 47% stanowiły koziołki, a 53% kózki.

Uzyskane dane pozwalają prześledzić zmiany zachodzące w populacji kóz karpackich. Na przestrzeni ostatnich sześciu lat w ocenianych stadach widać spadek wydajności mleka z 332,7 kg do 225,2 kg w laktacji (Wykres 1.). Związane to było z wejściem do hodowli wielu nowych stad, w których utrzymywane są młode kozy. Procentowa zawartość białka [%] była wyższa niż w 2015 roku. Tendencje wzrostową zaobserwowano też dla zawartości tłuszczu w mleku (Wykres 2.).

Wykres 1. Średnie roczne wydajności mleczne i długości trwania doju dla kóz karpackich w latach 2015 – 2021.



Wykres 2. Średnia roczna procentowa zawartość tłuszczu i białka [%] w mleku dla kóz karpackich w latach 2015 – 2021.



Struktura genetyczna populacji kóz karpackich:

W ramach działań przebadano 249 dorosłych osobników kóz karpackich (samice i samce) w 14 stadach, objętych programem ochrony zasobów genetycznych (Fot. 1.). W badaniu tym przeanalizowano 14 markerów mikrosatelitarnych zalecanych przez *International Society for Animal Genetics (ISAG)* do indywidualnej identyfikacji kóz i testowania ich pochodzenia.

Fot.1. Rozmieszczenie stad kóz karpackich objętych badaniami.



Różnorodność genetyczna w badanych loci mikrosatelitarnych:

W Tabeli 1. przedstawiono szacunki różnorodności genetycznej w 14 loci. W analizowanych mikrosatelitach znaleziono łącznie 128 *alleli*. Ogólna średnia obserwowanej liczby *alleli* wyniosła 9,143, podczas gdy średnia efektywna liczba *alleli* 3,798 (N_e) była niższa. Najbardziej polimorficznym markerem okazał się MAF65 z 13 *allelami* na *locus*. Średnia wartość obserwowanej heterozygotyczności wyniosła 0,671, przy czym najwyższą wartość uzyskano dla markera SRCRSP23 (0,847), a najniższą dla markera INRA063 (0,382), dla którego stwierdzono również najniższą wartość N_e (1,636). Podobne wyniki uzyskano dla oczekiwanej heterozygotyczności, której średnia wyniosła 0,701. Dziesięć z 14 loci wykazało znaczne odchylenia od HWE. Wskaźniki zawarte w parametrach statystyki F wykazały średnią wartość F_{is} z wartością ujemną -0,047, dopasowanie 0,045.

Struktura populacji i związek genetyczny:

Metoda Delta K wykazała, że najlepszym K było K=2 (Wykres 4.). Dane te sugerują istnienie dwóch głównych skupisk w polskiej populacji kóz karpackich (Fot. 1.). Można również zauważyć, że populacja 14 (Bańska Niżna) składa się z innego skupienia niż populacje 4 (Szymbark) i 11 (Kobyłec) – mają one niewielką wzajemną domieszkę. Pozostałe 11 populacji to mieszanki osobników z dwóch klastrow genetycznych.

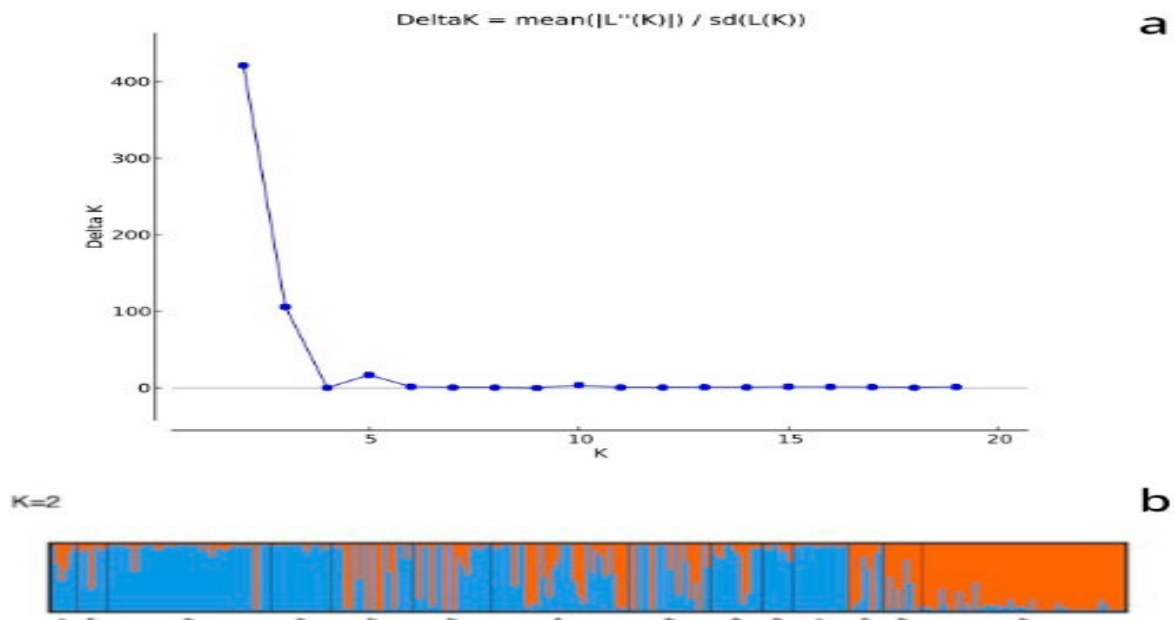
Tabela 1. Różnorodność genetyczna i parametry statystyki F dla 14 markerów mikrosatelitarnych.

Locus	N_a	N_e	H_o	H_e	P	HWE	F_{is}	F_{it}	F_{st}
SRCRSP23	12	7.027	0.847	0.858	0.010	**	-0.089	-0.006	0.076
ILSTS87	11	4.071	0.751	0.754	0.977	ns	-0.093	-0.001	0.084
INRA063	6	1.636	0.382	0.389	0.000	***	-0.050	0.017	0.065
SRCRSP8	10	3.117	0.614	0.679	0.000	***	-0.018	0.090	0.106
OarFCB20	7	3.194	0.679	0.687	0.479	ns	-0.004	0.057	0.061
MAF65	13	3.762	0.667	0.734	0.000	***	-0.032	0.094	0.122
MCM527	7	2.894	0.610	0.654	0.076	ns	0.028	0.131	0.106
CSRD247	10	4.015	0.747	0.751	0.003	**	-0.111	-0.007	0.094

INRA006	12	6.179	0.779	0.838	0.000	***	-0.061	0.065	0.118
ILSTS19	8	4.111	0.719	0.757	0.001	***	-0.036	0.062	0.095
ILSTS008	7	2.297	0.590	0.565	0.013	*	-0.172	-0.101	0.060
INRA005	5	2.992	0.622	0.666	0.142	ns	0.016	0.094	0.079
SRCRSP5	9	4.236	0.695	0.764	0.000	***	0.003	0.093	0.090
INRA023	11	3.640	0.691	0.725	0.000	***	-0.036	0.048	0.081
Mean	9.143	3.798	0.671	0.701			-0.047	0.045	0.088
Total	128								

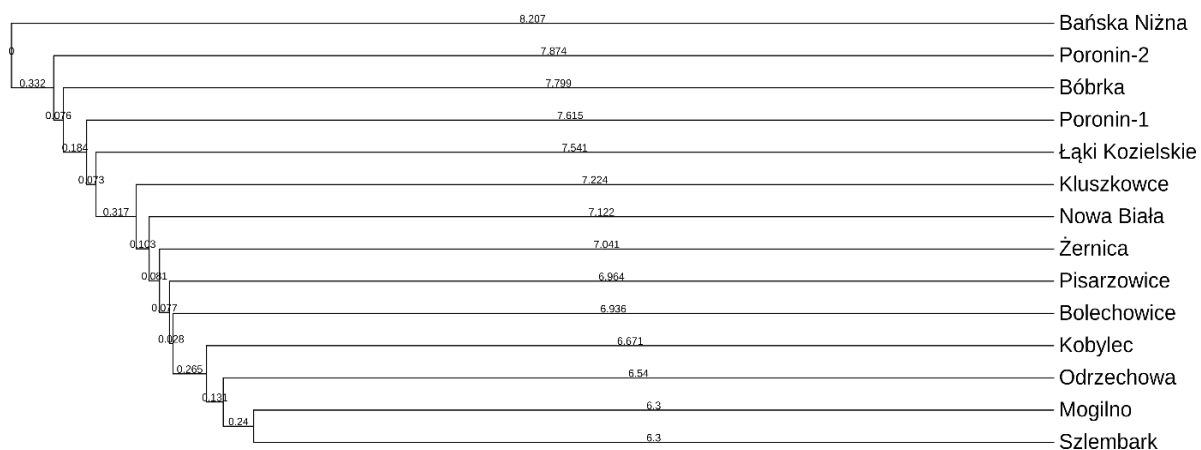
Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001; Na, number of different alleles; Ne, number of effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; P, a deficit of heterozygotes; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; Fis, the inbreeding coefficient within individuals relative to the subpopulation; Fit, the inbreeding coefficient within individuals relative to the total; Fst, the inbreeding coefficient within subpopulations relative to the total.

Wykres 3. Wartości Delta K uzyskane za pomocą STRUCTURE HARVESTER (b) analiza strukturalna dla K=2 uzyskana dla 14 populacji o wartościach od 1 do 14: Bolechowice, Bóbrka, Odrzechowa, Szlembark, Łąki Kozielskie, Żernica, Kluszkowce, Nowa Biała, Piszczowice, Mogilno, Kobylec, Poronin - 1, Poronin - 2 i Bańska Niżna.



Związek genetyczny między czternastoma subpopulacjami pokazano na Wykresie 4. Dendrogram wygenerowany przez UPGMA na podstawie dystansu genetycznego wskazał, że najbardziej odległymi populacjami były Szlembark i Bańska Niżna. Analiza dokumentacji hodowlanej potwierdziła przedstawione zależności: stada Bóbrka, Poronin – 2, Poronin – 1, utworzone w większości z materiału ze stada Bańska Niżna. Kolejne na dendrogramie stada posiadają zwierzęta pochodzące w znacznej części z najstarszego stada Odrzechowa. Stada począwszy od Nowa Biała nie miały kontaktu ze stadem Bańska Niżna.

Wykres 4. Dendrogram odległości genetycznej między wszystkimi osobnikami według algorytmu UPGMA.

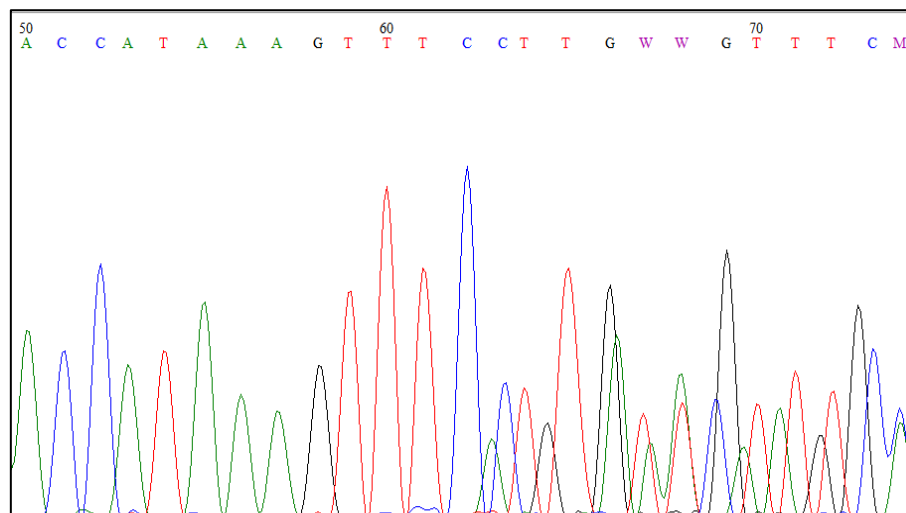


Polimorfizm białek mleka koziego:

Próbki DNA 294 kóz różnych ras (karpacka; anglonubijska; alpejska; barwna; kozy bezrasowe) poddano analizie genetycznej, skupiając się na genach CSN1S1 oraz CSN2. W przypadku genu CSN1S1 podjęto próbę identyfikacji *allelu* F, który warunkuje niski poziom ekspresji kazeiny- α_{s1} . W przypadku genu CSN2, analiza skupiła się na zmienności genetycznej odpowiadającej *allelom* A, A1, C, C1, E, O i O1. DNA wyizolowano z zastosowaniem zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology) według protokołu producenta. Stężenie i jakość wyizolowanego DNA sprawdzono na spektrofotometrze MaestroGen.

Dla genu CSN1S1, na podstawie sekwencji referencyjnej z GenBanku, zaprojektowano (program Primer 3) różne pary starterów do sekwencjonowania fragmentu genu obejmującego odcinek intronu 8. do intronu 11. Nie sposób było zweryfikować dokładnie wariantów *allelicznych* przy zastosowaniu samego sekwencjonowania. Ponadto liczne delecje i insercje w tym odcinku uniemożliwiły precyzyjną analizę zmienności tego fragmentu u badanych zwierząt (Wykres 5.). W analizie skupiono się więc na wykluczeniu obecności niekorzystnego *allelu* F. Zastosowano metodę RFLP, z enzymem XmnI, która umożliwia wykrycie insercji 11 bp (I) w intronie 9. i jednocześnie delecji nukleotydu C w pozycji 23. eksonu 9. (D).

Wykres 5. Insercja 11 nukleotydów w intronie 9 genu CSN1S1 utrudniająca wiarygodną analizę wyników sekwencjonowania.



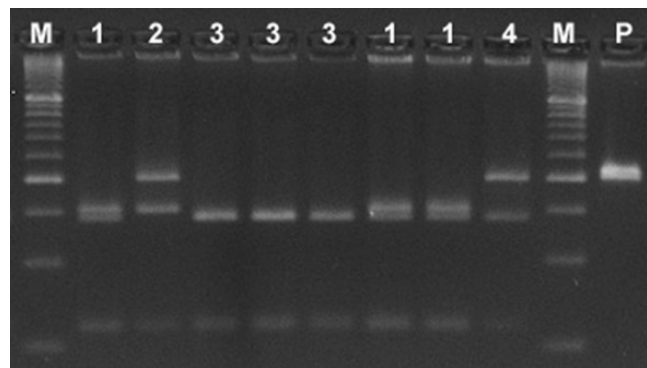
Dla genu CSN2, zastosowano metodę genotypowania z użyciem aparatu StepOne Plus Real time PCR System (Applied Biosystems) i znakowanych sond TaqMan MGB oraz sekwencjonowanie wybranych fragmentów genu na sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500xl (Applied Biosystems). Do projektowania wykorzystano sekwencję referencyjną z GenBanku (AJ011018.3). Zaprojektowano zestawy sond i starterów do trzech pozycji w genie: g.8915C>T, g.8561delA oraz kodonu A177V.

Stosując metodę RFLP zaobserwowano na żelu agarozowym 10 różnych wariantów genotypowych genu CSN1S1, powstałych wskutek różnej kombinacji wariantów *allelicznych*. Metoda pozwala zidentyfikować *allel* F, ale nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie obecności pozostałych wymienionych *alleli*, do identyfikacji których konieczne jest zastosowanie innych metod. W badanej metodą RFLP (Fot. 2.) grupie kóz uzyskano wyniki dla 275 osobników (Tabela. 2.). Znalaziono niemal wszystkie warianty genotypowe pod względem opisanych wyżej delecji i insercji. Aż 37% badanych zwierząt miało genotyp D-I+/D-I-, 28% miało genotyp D-I-/D-I-, a ok. 10% kóz miało genotyp zawierający *allel* D+I+ (tylko 3 osobniki kozy karpackiej w układzie homozygotycznym), który powiązano z *allele*m F genu CSN1S1, odpowiedzialnym za niską ekspresję białka CSN1S1 w mleku.

Tabela 2. Częstość występowania insercji 11 bp (I) w intronie 9. oraz delecji nukleotydu C w pozycji 23. eksonu 9. (D).

Wynik rflp	Częstość wariantu [%]
D+ I+ / D+ I+	1,09
D+ I- / D+ I-	1,82
D- I+ / D- I+	11,64
D- I- / D- I-	28,00
D+ I+ / D+ I-	0,00
D+ I+ / D- I+	3,27
D+ I+ / D- I-	6,18
D+ I- / D- I+	4,73
D+ I- / D- I-	5,82
D- I+ / D- I-	37,45

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



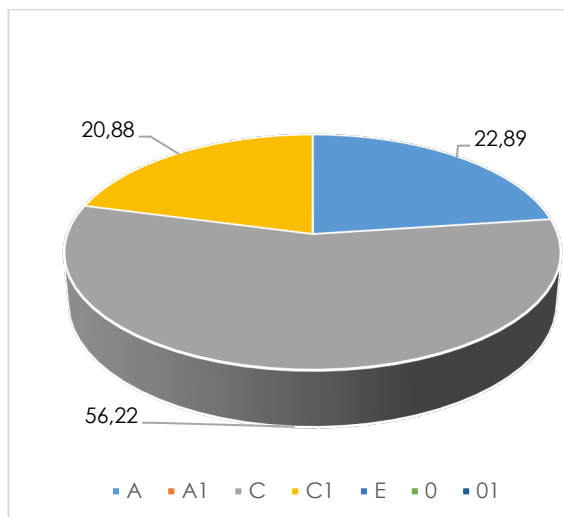
Metoda dyskryminacji *alleli* (genotypowanie na aparacie real-time PCR) pozwala na szybką identyfikację znanych wcześniej mutacji. Występowanie nukleotydu T w pozycji g.8915C>T, powoduje powstanie kodonu stop, co powiązano z niekorzystnym *allele*m 01. Delecja nukleotydu A (g.8561delA) została powiązana z występowaniem niekorzystnego *allelu* 0, gdyż powoduje ona przesunięcie ramki odczytu i powstanie kodonu stop wpływając tym samym na ekspresję białka. W przypadku kodonu 177, występowanie nukleotydu T (GTA) jest charakterystyczne dla *allelu* C, a nukleotydu C (GCA) wiąże się z *allelami* A1, E, 0 i 01.

Stwierdzono, że najczęstszym *allele*m genu CSN2 w badanej populacji kóz karpackich był *allel* C (56,3%), frekwencja *allelu* A wyniosła 22,89%, a *allel* C1 miał częstość około 20,88% (Wykres 6.). Częstość *alleli* przekłada się na częstość obserwowanych genotypów (Wykres 7.). Genotypy CC i AC były najpowszechniej występującymi genotypami w populacji kóz karpackich.

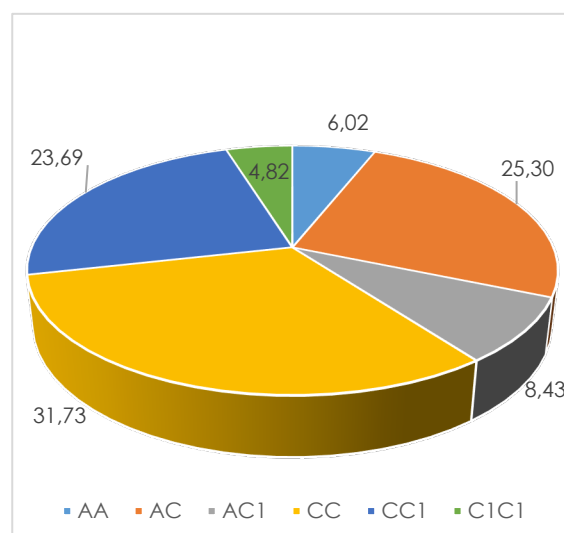
W badanej grupie kóz wszystkie osobniki były homozygotami CC w pozycji g.8915 i homozygotami AA w pozycji g.8561 (brak delecji), co wyklucza obecność *alleli* 01 i 0. Nie znaleziono również u żadnego osobnika *allelu* E, a analiza haplotypów wykazała obecność *alleli* A, C oraz C1 (Wykres 8.). Genotypy CC i AC były najpowszechniej występującymi genotypami w polskiej populacji kóz.

Biorąc pod uwagę poszczególne rasy kóz widać różnice w częstości genotypów CSN2. W rasie karpackiej najczęstszy był genotyp CC (31,7%) i AC (25,3%), w rasie anglonubijskiej 65% osobników miało genotyp AA. Wielu autorów uważa, że zawartość białka w mleku kóz posiadających allele A i C jest porównywalna, a ekspresja białka dla tych alleli jest normalna, niektórzy zaobserwowali najwyższą zawartość białka u kóz rasy Sarda z genotypem AA. Wymaga to dalszych badań w polskiej populacji kóz.

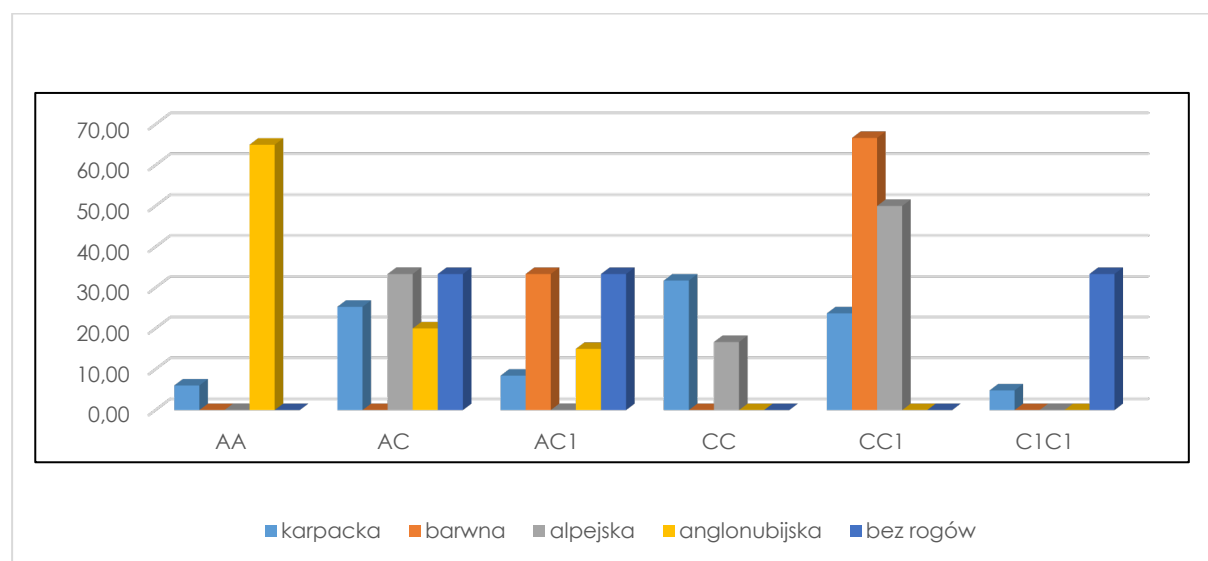
Wykres 6. Częstość alleli genu CSN2 kozy karpackiej [%].



Wykres 7. Częstość genotypów CSN2 w populacji kozy karpackiej [%].



Wykres 8. Częstość genotypów CSN2 w poszczególnych rasach kóz [%].



Wnioski:

W utworzonej w trakcie realizacji zadania aplikacji bazodanowej gromadzono dane dla całej populacji kóz karpackich utrzymywanych w kraju. System służy do koordynowania działań IZ PIB w zakresie ochrony, identyfikacji i lokalizacji każdego zwierzęcia, pozwala określić aktualny stan zwierząt objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Aplikacja daje możliwość generowania „Świadectwa wpisu do ksiąg”, co znacznie ułatwia obsługę ksiąg zwierząt tej rasy i minimalizuje błędy w prowadzeniu dokumentacji hodowlanej.

Niniejsze badania pokazały stan struktury genetycznej odtworzonej populacji kóz karpackich. Uzyskane parametry wskazują na prawidłowość prowadzonej pracy hodowlanej w ramach programu ochrony zasobów genetycznych oraz dają wskazówki do podejmowania kolejnych kroków związanych z hodowlą tej cennej rodzimej rasy.

Kozy karpackie hodowane w Polsce charakteryzowały się stosunkowo dużą różnorodnością genetyczną ze średnią *alleli* na *locus*, wysokimi wartościami heterozygotyczności oraz niskim poziomem współczynnika inbrodu, co świadczy o braku zagrożenia chowem wsobnym w badanej populacji.

Parametry obliczone dla analizy rodzicielskiej wykazały, że użyte markery w zalecanym przez ISAG panelu są przydatne do rutynowej kontroli rodowodów kóz karpackich.

W badanej populacji kóz około 10% osobników posiadało niekorzystny *allel* F genu *CSN1S1*; nie stwierdzono obecności niekorzystnych *alleli* genu *CSN2* (0,01).

Zaobserwowano różnice w częstości genotypów genu *CSN2* pomiędzy rasami, jednak ze względu na nierówną liczebność grup analizy powinny objąć większą populację.

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

Fot. 1. Kozy karpackie (M. Pasternak)



Fot. 2. Owce wrzosówki (A. Kawęcka)

Cel badań:

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. W tym etapie planowane było określenie korzystniejszego udziału fitododatku do paszy treściwej, w celu wyboru optymalnego modelu żywienia.

W ramach tego etapu zrealizowano następujące zadania:

Opracowanie mieszanki ziołowej.

Mieszanki ziołowe (susz) zawierające po cztery komponenty (Tabela 1.) zastosowano jako dodatek do paszy treściwej dla jagniąt, koźląt i kóz.

Tabela 1. Składniki mieszanki ziołowej dla jagniąt i kóz.

Jagnięta i koźlęta	Kozy
Koper włoski	Koper włoski
Jeżówka purpurowa (Echinacea)	Tymianek
Czosnek	Pokrzywa
Tymianek	Ostropest

Ocena wskaźników produkcyjnych.

W Stacji Oceny Tryków w Kociugach w ZD IZ PIB Pawłowice przeprowadzono część doświadczalną zadania. Jagnięta rodzimej rasy owiec wrzosówka (24 sztuki) oraz koźlęta rodzimej rasy kóz karpackich (24 sztuki) ze stad IZ PIB, utrzymywane były w kojcach grupowych. W każdej rasie wyodrębniono trzy grupy, ustalone według założeń metodycznych, po 8 jagniąt w kójcu. Przez cały okres tuczu zwierzęta otrzymywały sporządzoną w ramach eksperymentu mieszankę treściwą.

Pomiary przyżyciowe.

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

Pomiary poubojowe.

Po zakończeniu tuczu jagnięta i koźlęta zostały poddane ubojowi doświadczalnemu. Analiza rzeźna wykonana została według procedur stosowanych w IZ PIB. Ocena poubojowa tuszy objęła 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 (analizy sucha masa, popiół całkowity, tłuszcz wolny, białko ogólne profil WKT z CLA cholesterol, kolagen, aminokwasy).

W Tabeli 2. przedstawiono wyniki analiz chemicznych mięsa jagniąt merynosa polskiego w starym typie oraz merynosa barwnego, żywionych paszą kontrolną oraz z różnym udziałem fitododatku. Analizy te dotyczą prac zaplanowanych na 2021 rok.

Tabela 2. Skład chemiczny mięsa jagnięcego.

Parametr	Sucha masa (%)	Popiół (%)	Tłuszcz (%)	Białko (%)	Cholesterol(mg/l)
Grupa/rasa	merynos polskiego w starym typie				
Kontrola	24,38	1,07	2,56	19,89	0,69
Ziota I	24,0	1,07	1,91	19,96	0,70
Ziota II	23,03	1,04	1,78	19,18	0,70
	merynos barwny				
Kontrola	24,37	1,05	2,21	19,87	0,69
Ziota I	24,52	1,05	1,92	20,29	0,69
Ziota II	24,42	1,05	1,91	20,19	0,67

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.

Ocena wskaźników fizjologicznych.

W celu oceny zdrowotności zwierząt, przed rozpoczęciem pobierania paszy i na zakończenie eksperymentu, przeprowadzono badania krwi – morfologia (leukocyty, erytrocyty, limfocyty, płytki krwi, hemoglobina) oraz biochemia (glukoza, cholesterol, trójglicerydy, fosfolipidy, bilirubina, mocznik, kreatynina, białko całkowite, albuminy, globuliny, AST, ALT).

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

Zadanie 04-14-05-11

Wpływ rolnictwa precyzyjnego na produkcję suma afrykańskiego w obiegu zamkniętym.

kierownik zadania: dr inż. Przemysław Pol

W pierwszym kwartale bieżącego roku wykonano pierwszy cel badawczy: „Projekty, prototypy”, który polegał na wykonaniu prototypów specjalnych urządzeń służących do monitorowania parametrów wody w basenowym obiegu RAS oraz oświetlania filtrów roślinnych. Efektem tego celu jest złożenie dwóch wniosków patentowych: „Uchwyt pływakowy” (numer zgłoszenia P.442864) oraz „Pływakowy uchwyt oświetlenia” (numer zgłoszenia P.443056).

W drugim kwartale 2022 roku wykonano drugi cel badawczy – „Doświadczenie testowe 1”, polegające na przetestowaniu oraz skonfigurowaniu urządzeń do monitorowania parametrów: TDS, pH, temperatury, ORP oraz twardości węglanowej. Urządzenia zostały podłączone do routera pracującego w paśmie 2,4 GHz oraz do jednej cyfrowej platformy, z której można było zarządzać ich pracą i zmieniać ustawienia.

Wszystkie sondy oraz czujniki w liczbie trzech sztuk dla każdego urządzenia, zostały zamontowane na urządzeniach będących wnioskami patentowymi, po czym rozpoczęto testowanie stabilności pływaków w basenie filtracyjnym.

W miesiącu czerwcu zlecono ZD IZ PIB Grodziec Śląski Sp. z o.o. zakup 3 000 sztuk wylęgu suma afrykańskiego wraz z paszą oraz podłączenie do internetu budynku z basenami dla ryb.

W trakcie realizacji tego celu analizowano pracę systemów filtracji oraz łączności urządzeń. Wszelkie nieprawidłowości były na bieżąco korygowane, a urządzenia kalibrowane. Użytkiwane pomiary były z chmury konwertowane na dane do arkusza kalkulacyjnego. Zbierane dane pozwoliły dokonać wstępnej analizy prawidłowej pracy obiegów hodowlanych.

Trzeci cel badawczy „Nowy obieg suma” polegał na dokonaniu odłowienia czterech wybranych, niedojrzałych płciowo osobników. Następnie wypreparowano narządy węchu, elementy układu pokarmowego oraz narządy rozrodcze zostaną wypreparowane. Pocięte na mniejsze fragmenty tkanki zostaną następnie rozdzielone i utrwalone do poszczególnych rodzajów mikroskopów.

W Zakładzie Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa IZ PIB utrwalone tkanki zostały poddane procesowi zatapiania przy użyciu techniki parafinowej. Następnie, przygotowane bloczki zostały pocięte na seryjne skrawki przy użyciu mikrotomu oraz naklejone na szkiełka podstawowe.

Przygotowane preparaty zostały wybarwione barwnikami histologicznymi i histochemicznymi i zamknięte za pomocą specjalnych substancji i szkiełek nakrywkowych. Po wysuszeniu preparaty były oglądane w mikroskopie świetlnym oraz zostały wykonane zdjęcia preparatów.

Zadanie 04-14-02-11

Opracowanie nowego typu klatek dla królików utrzymywanych w warunkach podwyższonego dobrostanu.

kierownik zadania: prof. dr hab. Paweł Bielański

Kilka państw członkowskich UE wprowadziło krajowe przepisy i wymogi prawne dotyczące chowu królików, i we współpracy z sektorem opracowało przewodniki po dobrych praktykach. Mając na uwadze fakt, że w 2012 roku w Austrii zakazano chowu królików w klatkach do celów produkcji mięsa, a w Belgii obowiązują przepisy przewidujące, że do 2025 roku klatki bateryjne

zostaną stopniowo wycofane i zastąpione systemami parkowymi, należy opracować ujednolicone przepisy dotyczące utrzymania królików w warunkach podwyższonego dobrostanu.

Cel badań:

1. Opracowanie nowego typu klatek dla królików utrzymywanych w warunkach podwyższonego dobrostanu oraz wstępne określenie możliwości grupowego utrzymania samic stada podstawowego w okresie rozrodu i odchowu młodych króliczków.
2. Określenie możliwości grupowego utrzymania samic stada podstawowego w różnych systemach realizowano w czterech grupach doświadczalnych:

Grupa I – cztery samice grupowo utrzymywane w kojcu ziemnym przewoźnym z wybiegiem i wstawianym wykotnikiem.



Grupa II – cztery samice grupowo utrzymywane w budce z wybiegiem o pow. 4 m².



Grupa III – cztery samice grupowo utrzymywane w klatce o wymiarach 120x80 cm.



Jako grupa 0 będą rejestrowano wyniki rozrodu i odchowu od samic utrzymywanych pojedynczo.

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

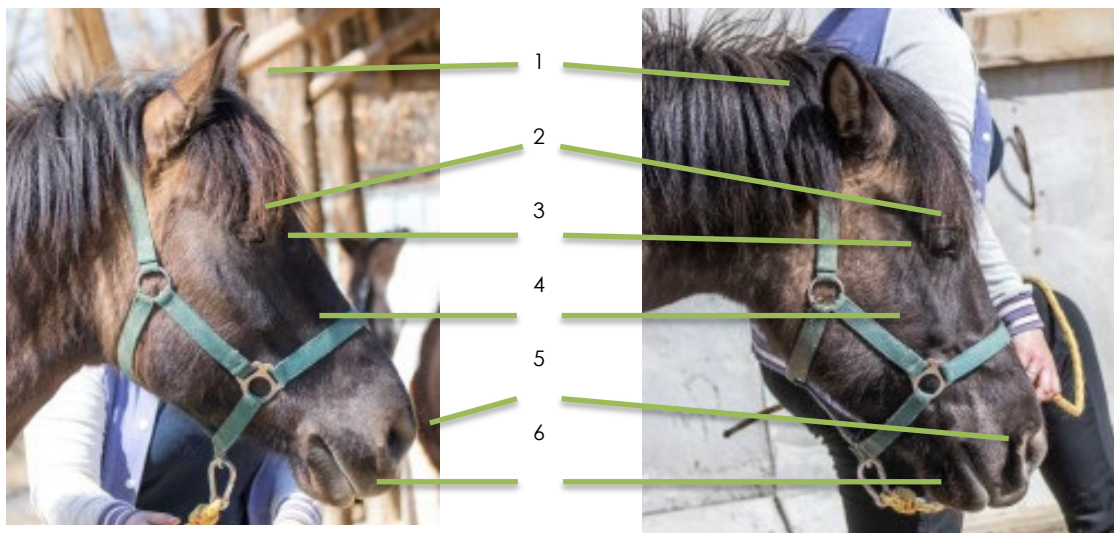
Oceniono dobrostan koni poprzez rozpoznanie sygnałów dyskomfortu i/lub bólu u koni pracujących oraz dotkniętych chorobą alergiczną skóry. Wykonano doświadczenie pilotażowe w celu dopracowania procedur doświadczenia właściwego.

Metodyka:

Habituacja koni do obecności aparatu (wykonanie zdjęć koni na pastwisku, powtarzano do momentu, w którym przestały wykazywać zainteresowanie obecnością aparatu). Następnie wykonano zdjęcia pysków jedenastu koni huculskich w wieku 6-12 lat. Wszystkie konie pracowały regularnie w szkółce jeździeckiej. Wykonano po trzy zdjęcia każdego konia w czterech różnych sytuacjach: dwóch bez siodła – podczas prowadzenia (P) i podczas stania przy schodkach do wsiadania (W) oraz dwóch w siodle – podczas prowadzenia (PS) i podczas stania przy schodkach do wsiadania (WS). Zdjęcia zostały ocenione przez dwóch niezależnych obserwatorów. 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) – Fot. 1.

Przyznano punkty: 0 – niewidoczne, 1 – lekko widoczne, 2 – wyraźnie widoczne.

Fot.1. Koń podczas prowadzenia (po lewej) oraz przy schodkach do wsiadania (po prawej) (I. Tomczyk-Wrona).



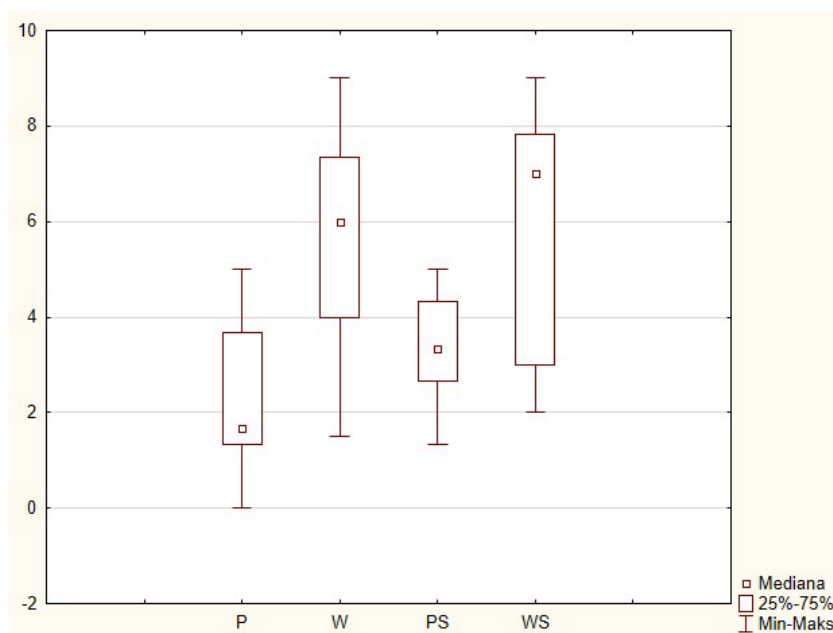
Statystyka:

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. Ze względu na rozkład danych odbiegający od normalnego wykorzystano testy nieparametryczne. Do oceny zgodności oceny pomiędzy obserwatorami wykorzystano korelację rang Spearmana, natomiast różnice pomiędzy P, W, PS, WS sprawdzono testem Wilcoxon.

Wyniki:

Wykres przedstawia medianę [25%, 75%] dla poszczególnych sytuacji, która wynosi: P – 1,6 [1,33; 3,66], W – 6,00 [4,00; 7,33], PS – 3,33 [2,66; 4,33], MS – 7,00 [3,00; 7,83].

Wykres 1. Mediana [25%; 75%] dla P – prowadzenie, W – przy schodkach do wsiadania, PS – prowadzenie w siodle, WS – przy schodkach w siodle.



Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy P– PS ($Z=1,33$, $P=0,18$) oraz W–WS ($Z=0,56$, $P=0,58$), co wskazuje na fakt, że siodło nie było istotnym czynnikiem wpływającym na zachowanie się koni. Wykazano natomiast istotne różnice pomiędzy P–W ($Z=2,8$, $P=0,01$) oraz pomiędzy PS–WS ($Z=2,67$, $P=0,01$).

Wyraz pyska koni zmieniał się istotnie ze 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 jazdą.

Instruktorzy jazdy konnej powinni zwracać większą uwagę na przyjazne koniom dosiadanie i jazdę konną, aby zapewnić wysoki poziom dobrostanu koniom pracującym.

Wyniki te pokazują, że dalsze badania nad dobrostanem koni pracujących są niezwykle istotne.

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 zadania jest uzyskanie wiedzy na temat bezpieczeństwa i wartości pokarmowej nasion krajowej soi n-GMO i produktów ich przetworzenia (ekstrudat i makuch) oraz produktów pochodzenia owadziego (mączka z larw muchy *Hermetia illucens*) – jako komponentów mieszanek paszowych dla zwierząt gospodarskich. Planowane jest 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 silnie antyoksydacyjna astaksantyna, na rozwój fizjologiczny przewodu pokarmowego, status metaboliczny, zdrowotny i oksydacyjny oraz kształtowanie odporności zwierząt gospodarskich.

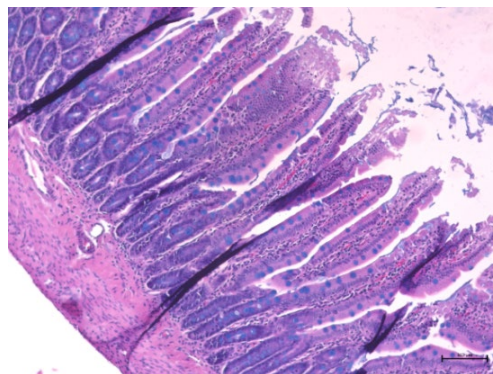
W skład zadania wchodzi 4 cele szczegółowe:

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

Zakres prac:

Kontynuowano prace badawcze na trzech rodzajach zwierząt, tj. na krowach z założoną przetoką dożwaczową, warchlakach i cielętach. Doświadczenia na szczurach zostały już ukończone w poprzednim roku. Aktualnie wykonywane są histometryczne analizy tkanek pobranych z przewodu pokarmowego (jelito cienkie), jak również narządów wewnętrznych (wątroba, nerka, śledziona) szczurów. Ponadto, przygotowywany jest materiał do publikacji podsumowującej badania na zwierzętach modelowych.

Rysunek 1. Wycinek ściany jelita cienkiego szczurów.



Przeprowadzono ocenę wpływu niekonwencjonalnych źródeł białka paszowego pochodzenia krajowego (nasiona soi oraz ekstrudat i makuch z nasion soi) na wskaźniki fermentacji w żwaczu i wskaźniki fizjologiczne krwi krów przetokowanych. Poziomy wskaźników hematologicznych jak i biochemicznych krwi krów mieściły się w normie, chociaż statystycznie istotne różnice między grupami wystąpiły np. w przypadku cholesterolu, trójglicerydów i cholesterolu HDL (Tabela 1.). Poziom frakcji HDL był wyższy w grupach doświadczalnych niż w grupie kontrolnej. Z uzyskanych wyników można wysunąć wnioski, że produkty sojowe nie modyfikowały fermentacji żwaczowej, miały jednak wpływ na wybrane parametry morfologiczne i biochemiczne krwi. Wydaje się, że wyniki należy zweryfikować w warunkach produkcyjnych, gdzie zwierzęta otrzymują większe ilości mieszanek paszowych.

Tabela 1. Wybrane wskaźniki krwi krów.

	Grupa I (kontrolna)	Grupa II nasiona soi	Grupa III makuch sojowy	Grupa IV ekstrudat sojowy
Ilość krwinek białych (WBC)	3,9	4,3	3,5	3,6
Ilość krwinek czerwonych (RBC)	6,7	6,68	6,53	6,66
Poziom hemoglobiny (HGB)	11,7	11,7	11,7	18,2
Hematokryt (HCT)	30,5	30,4	29,4	30,2
Ilość płytek krwi (PLT)	266 ab	239 b	313 a	283 ab
NEFA, mg	1,77	1,60	1,43	2,08
BHBA	0,320	0,323	0,269	0,352
Glukoza	71,8	74,7	71,8	76,3
Mocznik	28,0	22,4	23,1	25,2

Średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$.



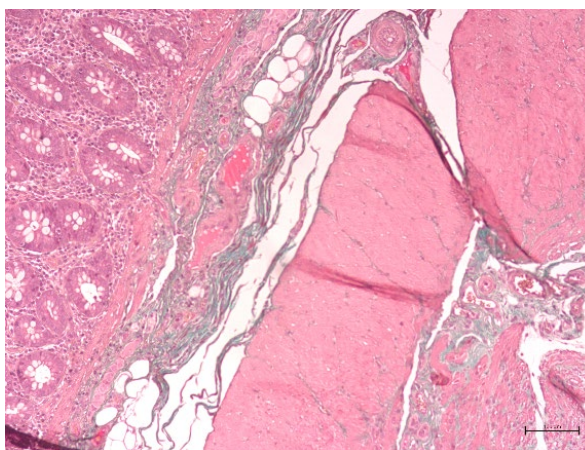
W związku z tym, sugeruje się by zwrócić szczególną uwagę na graniczną zawartość tłuszczu w pobranej suchej masie, ponieważ pełnotłuste nasiona, makuch i ekstrudat zawierają więcej tłuszczu niż śruta poekstrakcyjna.

W ramach realizacji badań określono również wpływ makuchu z nasion krajowej soi n-GMO na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne odsadzonych prosiąt. W badaniach tych oceniano możliwość zastąpienia poekstrakcyjnej śruty sojowej makuchem z nasion krajowej soi, w mieszankach dla odsadzonych prosiąt (wieprzki rasy PBZ).

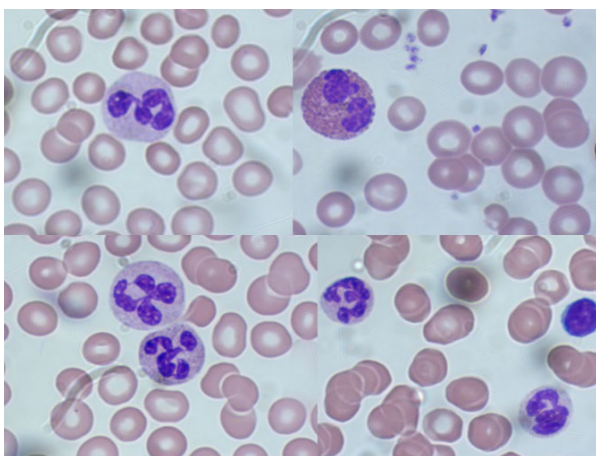
Grupa I (kontrolna) otrzymywała mieszankę paszową, w której głównym źródłem białka była poekstrakcyjna śruta sojowa GMO (16% udział w mieszance), a grupa II (doświadczalna) zamiast śruty poekstrakcyjnej miała w mieszance makuch sojowy z krajowej soi n-GMO (19% udział w mieszance). Mieszanki pełnoporcjowe były izobiałkowe i izoenergetyczne. Przeprowadzone doświadczenie wykazało możliwość całkowitego zastąpienia poekstrakcyjnej śruty sojowej, makuchem z nasion krajowej soi non-GMO, w żywieniu odsadzonych świń. Nie odnotowano statystycznie istotnego wpływu na wskaźniki produkcyjne (przyrosty masy ciała, zużycie paszy) i zdrowotne warchlaków, ale stwierdzono, że obecność makuchu sojowego w paszy może istotnie wpływać na jakość tłuszczu mięsa świń. Makuch z krajowych nasion soi jest paszą, która może zwiększyć dywersyfikację rynku pasz białkowych i/lub zmniejszyć koszt produkcji wieprzowiny, nie wpływając negatywnie na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne świń.

W drugiej części badań na świnich określano wpływ mączki z larw muchy *Hermetia illucens* (HI) na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne odsadzonych prosiąt. Podobnie jak poprzednio, doświadczenie przeprowadzono na odsadzonych prosiątach. Grupa I (kontrolna) otrzymywała mieszankę paszową, w której źródłem białka był makuch sojowy, grupa II otrzymywała dodatek 2,5% mączki z larw *H. illucens* (HI), grupa III – 5% dodatek mączki z larw HI. Mieszanki pełnoporcjowe były izobiałkowe i izoenergetyczne. Wstępne rezultaty badań wykazały, że dodatek mączki HI może przyczynić się do poprawy wchłaniania składników pokarmowych, gdyż w jelicie cienkim świń obserwowano istotnie dłuższe kosmki jelitowe i większy stosunek długości kosmków do głębokości krypt ($P \leq 0,05$) – Tabela 2.

Rysunek 2. Wycinek ściany jelita grubego świni.



Rysunek 3. Mikroskopowy obraz rozmazu pełnej krwi.



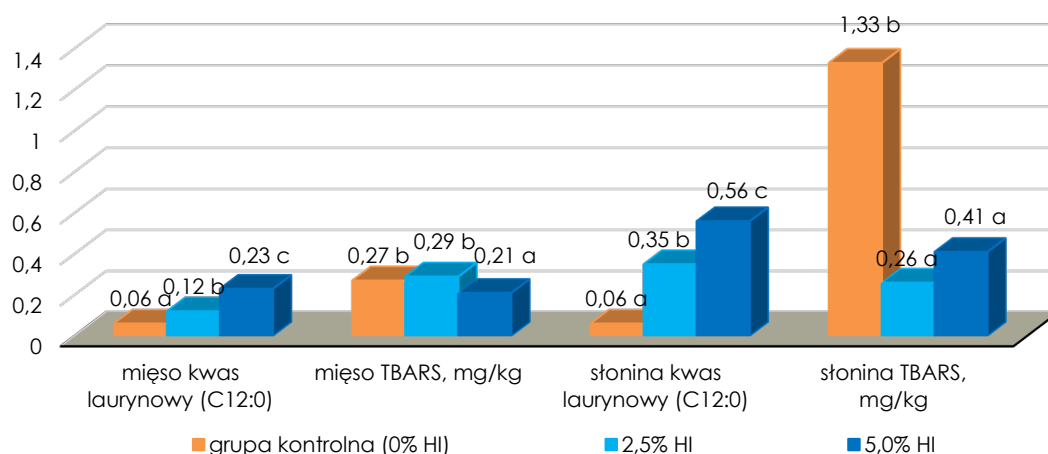
Wysoka zawartość kwasu laurynowego w mączce owadziej HI znalazła odzwierciedlenie zarówno w profilu kwasów tłuszczowych mięsa, jak i stoniny grzbietowej ($P \leq 0,05$). Jako skutek większego stopnia wysycenia tłuszczu tych produktów, stwierdzono niższe wartości liczby jodowej, co przełożyło się na niższe wartości wskaźnika utleniania (TBARS) mierzonego po 3 miesiącach przechowywania mięsa i stoniny w zamrożeniu (-20°C) ($P \leq 0,05$) (Wykres 1.). Wyniki te wskazują, że obecność mączki owadziej w paszy dla świń istotnie zwiększa odporność tłuszczu tkankowego na utlenianie, czyli może poprawiać trwałość produktów pochodzenia zwierzęcego w czasie przechowywania.

Tabela 2. Pomiary histometryczne ścian jelita cienkiego świń.

Badane parametry	Grupa I (kontrolna)	Grupa II (HI 2,5%)	Grupa III (HI 5,0%)	SEM
Długość kosmków, μm	360 a	430 b	468 b	14,71
Szerokość kosmków, μm	145	134	143	4,12
Głębokość krypt, μm	418	431	425	10,25
Stosunek długości kosmków do głębokości krypt	0,78 a	1,01 ab	1,10 b	0,06
Ilość komórek kubkowych, na 100 μm	5,13	4,98	5,33	0,20
Wysokość błony śluzowej, μm	694	710	718	18,07

Średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$.

Wykres 1. Poziom kwasu laurynowego oraz wskaźnika TBARS w tłuszczu mięsa i stoniny grzbietowej świń.



Kolejnym etapem prac badawczych była ocena wpływu innowacyjnych pasz białkowych (makuch z nasion soi z mączką owadzią *Hermetia illucens*, HI) na rozwój i zdrowotność cieląt w okresie odchowu. Materiał doświadczalny stanowiło 40 cieląt (buhajków) rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, przydzielonych do 5 równo liczebnych grup. Żywienie cieląt oparte było na mieszankach treściwych różniących się w poszczególnych grupach źródłem białka. Grupa kontrolna otrzymywała mieszankę, w której głównym źródłem białka była poekstrakcyjna śruta sojowa GMO, natomiast grupy doświadczalne otrzymywały mieszanki, w których poekstrakcyjna śruta sojowa została zastąpiona produktem sojowym pochodzenia krajowego wzbogaconym dodatkiem o działaniu immunostymulującym (astaksantyna). Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić brak wpływu innowacyjnego produktu sojowego i astaksantyny na hematologiczne wskaźniki krwi czy poziom immunoglobulin u cieląt, na pH treści pokarmowej, rozwój poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego (Wykres 2.) i wybranych narządów wewnętrznych. W grupach cieląt żywionych mieszankami treściwymi z udziałem mączki owadziej (grupy III i V) stwierdzono występowanie tendencji ($P=0,06$) do niższej zawartości kwasu masłowego C4 w treści żwacza (Tabela 3.). Wstępnie stwierdzono, że innowacyjny produkt białkowy wzbogacony dodatkiem naturalnego antyutleniacza (astaksantyny) może być dobrym zamiennikiem poekstrakcyjnej śruty sojowej, pozwalającym na całkowite wyeliminowanie jej z mieszanek treściwych dla cieląt.

Wykres 2. Masa poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego cieląt żywionych mieszanką treściwą różniącą się głównym źródłem białka.

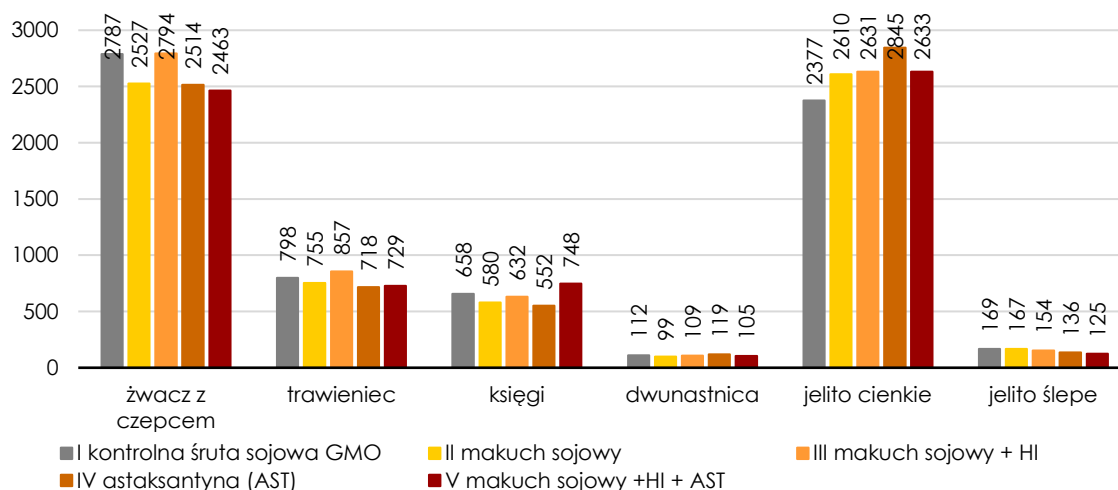


Tabela 3. Produkty fermentacji w treści żwacza cieląt.

	I kontrolna śruta sojowa GMO	II makuch sojowy	III makuch sojowy + HI	IV astaksantyna (AST)	V makuch sojowy +HI +AST
Kwas octowy	65,4	51,1	31,5	52,9	31,4
Kwas propionowy	34,0	33,7	24,7	31,3	19,1
Kwas izo-maśłowy	0,65	0,56	0,53	0,46	0,45
Kwas masłowy	7,85 x	6,83 xy	3,30 y	4,54 xy	3,22 y
Kwas izo-walerianowy	0,83	0,65	0,74	0,60	0,81
Kwas walerianowy	2,67	2,63	1,49	2,33	1,42

Średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$.

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 1. obejmuje 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.

W celu 2. badany jest wpływ uwarunkowań fizjologicznych związanych z rozwojem przewodu pokarmowego i układu enzymatycznego u kurcząt brojlerów w wieku 10, 20 i 30 dni na strawność jelitową aminokwasów nasion krajowych nisko- i wysokotłuszczowych odmian bobiku. Badania zakładają, że: (I) wystąpi korzystny efekt łącznego stosowania kokcydiostatyków (brojlerzy) lub L-karnityny (nioski) i substancji fitobiotycznych na funkcjonowanie wątroby, parametry wydzielnicze przewodu pokarmowego, wskaźniki produkcyjne, jakość i wartość dietetyczną jaj, oraz (II) szczegółowe poznanie strawności jelitowej aminokwasów zawartych w nasionach bobiku krajowych odmian przyczyni się do znaczącej poprawy wiedzy na temat możliwości optymalnego wykorzystania tych nasion w mieszankach paszowych stosowanych w systemie wielofazowego żywienia kurcząt brojlerów.

Cel szczegółowy 1.:

Zgodnie z metodyką i harmonogramem badań kontynuowano długotrwałe doświadczenie na 240 kurach nieśnych zestawu lohmann brown. Miejszem realizacji badań była ferma doświadczalna Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach. Celem doświadczenia było określenie wpływu wybranych dodatków paszowych o działaniu hepatoprotekcyjnym (lub ich mieszaniny) na produktywność, status zdrowotny ptaków, jakość skorupy i wartość dietetyczną treści jaj. Nioski utrzymywano w standardowych warunkach odchowu w klatkach wzbogaconych, przy stałym dostępie do paszy i wody. Doświadczenie wykonano w układzie 1-czynnikowym. Utworzono 10 grup żywieniowych z 12 powtórzeniami w każdej grupie. Kurom podawano izobiałkowe i izoenergetyczne mieszanki paszowe. W grupach eksperymentalnych (2–10), do składu 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 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia na kurach nieśnych.

Grupa	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

W trakcie doświadczenia rejestrowano ilość pobranej paszy i odnotowywano dobową liczbę oraz masę zniesionych jaj. Pomiary tych danych produkcyjnych zostały zakończone, a uzyskane wartości są w trakcie zestawiania i analizowania. Na ich podstawie obliczona zostanie nieśność, dzienne pobranie paszy oraz zużycie paszy w przeliczeniu na 1 kg jaj i na 1 jajo. W trakcie doświadczenia (w 40., 50. i 60. tygodniu życia kur) przeprowadzono badanie parametrów jakości jaj przy użyciu aparatury reflektometrycznej (urządzenie Egg Quality Measurements), z uwzględnieniem takich cech, jak: barwa i masa żółtka, jednostki Haugha, masa, grubość i gęstość skorupy oraz ilość plam krwawych i mięsnych. W tym celu, w każdej z grup przeprowadzono kolekcję 12 jaj (po 1 jajku z powtórzenia). W wymienionych terminach, za pomocą aparatu Instron UTM 5542, określono także wytrzymałość skorup. Analiza statystyczna wartości tych parametrów przeprowadzona w 40. tygodniu życia kur nie wykazała istotnych zmian. Analiza jakości jaj i skorup przeprowadzona w 50. tygodniu życia wykazała istotne różnice jedynie w zakresie wpływu badanych czynników na grubość skorupy jaj (niewielkie pogorszenie w grupie otrzymującej dodatek ekstraktu z ostryżu długiego i L-karnityny względem grupy kontrolnej). Parametry jakości jaj pobranych do analizy w 60. tygodniu życia ptaków są w trakcie analizowania. W 60. tygodniu życia kur wybrano także po 12 jaj z każdej grupy żywieniowej ptaków (po jednym jajku z powtórzenia), w celu określenia zawartości cholesterolu oraz profilu kwasów tłuszczowych w żółtku jaj. Centralne Laboratorium IZ PIB dostarczyło wyniki powyższych analiz na koniec listopada i w grudniu 2022 roku. Dane te są zestawiane i będą poddane analizie statystycznej. Ponadto, po zakończeniu okresu rejestracji danych produkcyjnych z każdej grupy wybrano 12 niosek, od których (po uboju) pobrano krew dla określenia wybranych parametrów biochemicznych, w tym m.in. profilu lipidowego, enzymów wątrobowych, białka całkowitego, glukozy i wapnia. Próbkę surowicy krwi zostały zabezpieczone i są przechowywane w stanie głębokiego zamrożenia do czasu analiz.

Cel szczegółowy 2.:

Zgodnie z harmonogramem realizacji badań przeprowadzono doświadczenie 2. nad oceną wpływu wieku kurcząt (10, 20 lub 30 dni) na pozorną strawność jelitową (PSJ) aminokwasów nasion bobiku z grupy wysokotaninowych odmian krajowych (HTB), połączoną z oznaczeniem PSJ aminokwasów dla poekstrakcyjnej śruty sojowej GMO, jako materiału kontrolnego. Do badań wybrano nasiona odmiany Bobas (Fot. 1.), wyselekcjonowanej przez DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Choryń i wpisanej do KRO w 2002 roku.

Fot. 1. Bobik odmiany Bobas (W. Szczurek).



Analizy laboratoryjne wykazały następujący (Tabela 2.) skład chemiczny nasion badanej odmiany bobiku oraz śruty sojowej.

Tabela 2. Skład chemiczny nasion bobiku i śruty sojowej.

Wyszczególnienie	Bobik Bobas wysokotaninowy (HTB)	Poekstrakcyjna śruta sojowa (SBM)
Sucha masa (SM), %	87,9	90,8
Składniki surowe, g/kg SM		
białko (N x 6,25)	307,9	509,2
tłuszcz	12,3	23,0
włókno	90,1	38,9
popiół	32,7	68,8
Frakcje włókna, g/kg SM		
włókno neutralno-detergentowe (NDF)	163,9	77,3
włókno kwaśno-detergentowe (ADF)	104,6	50,4
lignina kwaśno-detergentowa (ADL)	9,3	2,4
Aminokwasy, g/kg SM ¹		
alanina (Ala)	12,5 (4,1)	22,7 (4,5)
arginina (Arg)	27,2 (8,8)	34,8 (6,8)
asparaginowy kwas (Asp)	34,4 (11,2)	57,5 (11,3)
cysteina (Cys)	3,4 (1,1)	7,2 (1,4)
glutaminowy kwas (Glu)	52,9 (17,2)	90,3 (17,7)
glicyna (Gly)	11,9 (3,9)	19,7 (3,9)
histydyna (His)	8,1 (2,6)	13,7 (2,7)
izoleucyna (Ile)	13,1 (4,3)	23,0 (4,5)
leucyna (Leu)	19,5 (6,3)	40,3 (7,9)
lizyna (Lys)	19,4 (6,3)	33,5 (6,6)
metionina (Met)	2,2 (0,7)	6,8 (1,3)
fenyloalanina (Phe)	13,6 (4,4)	27,1 (5,3)
prolina (Pro)	14,8 (4,8)	27,6 (5,4)
seryna (Ser)	15,9 (5,1)	22,6 (4,4)
treonina (Thr)	11,0 (3,6)	19,6 (3,9)
tyrozyna (Tyr)	10,4 (3,4)	20,4 (4,0)
walina (Val)	14,6 (4,7)	23,1 (4,5)
łącznie 17 aminokwasów ²	284,9 (92,5)	490,0 (96,2)
Aktywność inhibitorów trypsyny ³	3,64	4,07
Taniny		
związki fenolowe ogółem ⁴	9,55	2,01
proantocyjanidyny ⁵	0,86	nd ⁶

¹ Liczby w nawiasach prezentują zawartość aminokwasów w g na 100 g białka surowego.

² Suma zawartości aminokwasów wymienionych powyżej. ³ Wartości wyrażone w mg czystej trypsyny zahamowanej przez g SM próbki. ⁴ Wyrażone w g ekwiwalentu kwasu taninowego w kg SM. ⁵ Wyrażone w g ekwiwalentu katechiny w kg SM. ⁶ Nie wykryto.

W okresie poprzedzającym część eksperymentalną wykonanych badań opracowano receptury i przygotowano wymaganą ilość diet testowych (Tabela 3.), w której nasiona bobiku

HTB lub SBM były jedynym źródłem białka surowego (20,5% w diecie). Całe nasiona bobiku oraz śrutę SBM rozdrabniano przy użyciu młynka nożowego do cząstek o średnicy około 2 mm i łączono w mieszalniku z pozostałymi komponentami: skrobią kukurydzianą, czystą dekstrozą (tj. glukozą krystaliczną otrzymywaną w wyniku enzymatycznej hydrolizy skrobi), olejem rzepakowym (rafinowanym), fosforanem jednowapniowym, kredą paszową, solą spożywczą (NaCl), wodorowęglanem sodu oraz premiksem wprowadzający wyłącznie witaminy i mikroelementy. Tlenek chromu (Cr_2O_3), jako niestrawną substancję wskaźnikową, wprowadzono do diety w ilości 5 g/kg.

Tabela 3. Skład recepturowy diet testowych.

Składnik, g/kg	Bobik Bobas (HTB)	Śruta sojowa (SBM)
Testowany materiał	760	444
Skrobia	75	233
Dekstroza	75	233
Olej	40	40
Fosforan $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	19	19
Kreda paszowa	17	17
Sól	3	3
NaHCO_3	2	2
Premiks min.-wit.	4	4
Tlenek chromu	5	5
Zawartość białka surowego ¹	205	205

¹ z obliczeń N ogólny x 6.25

Właściwe doświadczenie przeprowadzono w brojlerni doświadczalnej zaplecza badawczego IZ PIB w Aleksandrowicach na łącznie 312 kurczętach (kogutki Ross 308). W trakcie wspólnego odchowu na standardowej mieszance paszowej, z początkowej stawki wybierano kolejno 4-, 14- i 24-dniowe ptaki, które przenoszono sukcesywnie do oznaczonych klatek na krótki (adaptacyjny) okres żywienia daną dietą testową do osiągnięcia wieku odpowiednio 10, 20 i 30 dni. Kurczęta przydzielano do sześciu powtórzeń (klatek) o liczebności 12, 8 i 6 osobników w kolejnym wieku. Po 5. dniach nieograniczonego dostępu do diet, wszystkie kurczęta z sukcesywnych grup wiekowych ubijano dla pobrania treści jelitowej. W poszczególnych okresach pobrań treść jelitową wyplukiwano z dystalnego fragmentu jelita biodrowego (odcinek jelita cienkiego między zastawką biodrowo-ślepą i uchyłkiem Meckela) tworząc po 6 prób zbiorczych treści uzyskanej od osobników danej grupy wiekowej w obrębie testowanego materiału paszowego (bobik HTB lub SBM). Doświadczenie zakończono w czerwcu 2022 roku. Próby diet testowych oraz liofilizowaną treść jelitową przekazano w lipcu do Centralnego Laboratorium IZ PIB w celu wykonania niezbędnych (zaplanowanych) analiz obejmujących zawartość amin kwasów, suchej masy, białka surowego oraz chromu dodanego. Większość wyników ww. analiz została dostarczona przez Zleceniobiorcę w grudniu i obecnie trwa opracowywanie przedmiotowych współczynników strawności aminokwasów (PSJ) obu testowanych materiałów paszowych.

Na podstawie danych analitycznych z poprzedniego etapu badań obliczono i opracowano statystycznie wielkości jelitowego przepływu (strat) poszczególnych aminokwasów endogennych (EAA) u kurcząt w wieku 10, 20 i 30 dni. Wartości te (Tabela 4.) będą wykorzystane

do standaryzacji (korekty) współczynników pozornej strawności aminokwasów bobików i SBM w ostatnim (2023) etapie realizacji badań celu 2.

Tabela 4. Jelitowy przepływ aminokwasów endogennych.

Aminokwas	Uśrednione wartości EAA (n = 6)						SEM	Wartość <i>P</i>
	wiek ptaków							
	10 dni		20 dni		30 dni			
	mg/kg pobranej SM							
Ala	327	a	238	b	201	b	13,9	<0,001
Arg	293	a	167	b	150	b	16,1	<0,001
Asp	687	a	457	b	410	c	30,1	<0,001
Cys	223	a	141	b	113	c	11,7	<0,001
Glu	772	a	543	b	418	c	36,8	<0,001
Gly	402	a	275	b	249	b	17,9	<0,001
His	132	a	105	b	100	b	3,9	<0,001
Ile	388	a	283	b	207	c	18,9	<0,001
Leu	441	a	291	b	219	c	23,0	<0,001
Lys	298	a	172	b	168	b	15,4	<0,001
Met	137	a	92	b	104	b	5,4	<0,001
Phe	329	a	197	b	190	b	17,0	<0,001
Pro	432	a	327	b	287	b	16,4	<0,001
Ser	416	a	330	b	317	b	12,4	<0,001
Thr	508	a	358	b	313	c	21,2	<0,001
Tyr	411	a	298	b	244	c	17,5	<0,001
Val	393	a	315	b	273	c	12,6	<0,001
łącznie 17 AA	6589	a	4589	b	3963	c	276,8	<0,001

a, b, c – P<0,05 (test RIR Tukey'a)

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 szczoteczkowego i dojrzewanie śluzówkowego układu immunologicznego oraz parametry produkcyjne i zdrowie rosnących świń.

Doświadczenie zostało wykonane na ogółem 3 miotach (36 prosiątach) pochodzących od loch linii 990 według schematu podanego niżej. Lochy od 100. dnia ciąży do odsadzenia prosiąt utrzymywane były w kojach porodowych. Lochy otrzymywały mieszankę pełnoporcjową dla loch prośnych i karmiących. Prosięta po urodzeniu przebywały wraz z matkami w kojach porodowych do odsadzenia w 28. dniu życia, a następnie do 42. dnia życia, odchów prowadzono w kojach dla prosiąt starszych. Okres właściwy doświadczenia trwał od odsadzenia prosiąt od loch w 28. dniu do 42. dnia życia.

W trakcie odchowu prosiąt stosowano dwa rodzaje mieszanek:

- prestarter wczesny od 7. dnia aż do odsadzenia 28. dnia,
- prestarter odsadzeniowy od 28. dnia do 42. dnia.

Rycina 1. Schemat doświadczenia.

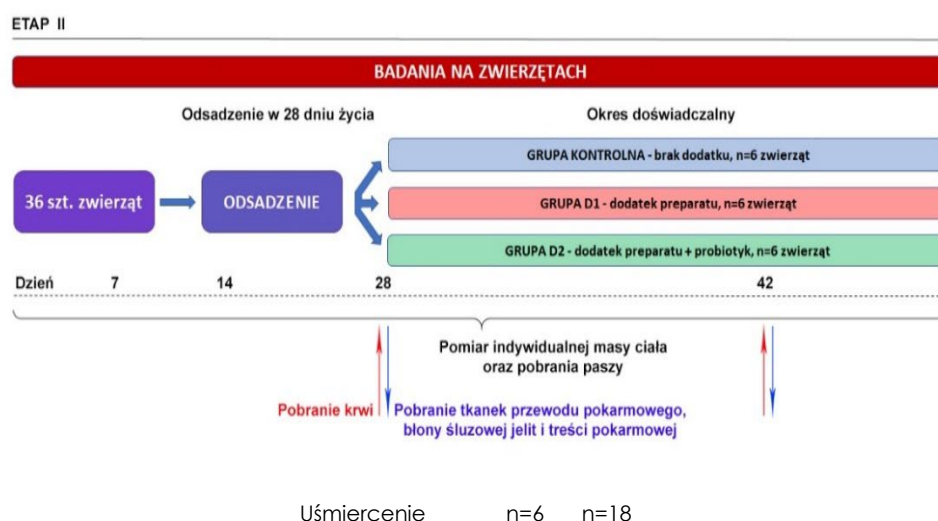


Tabela 1. Schemat suplementacji paszy prosiąt preparatami doświadczalnymi.

Wyszczególnienie	Grupa żywieniowa		
	Kontrola	Grupa D1	Grupa D2
Liczba prosiąt	12	12	12
Okres odchowu (dni)	1-28	1-28	1-28
Zastosowany dodatek	bez dodatku	bez dodatku	bez dodatku
Okres odchowu (dni)	28-42	28-42	28-42
Zastosowany dodatek	bez dodatku	Mrówczan potasu 1,2 kg/tonę	Mrówczan potasu 1,2 kg/tonę Probiotyk JHJ 1,5 kg/tonę

W trakcie trwania całego doświadczenia zbierane były poniższe dane:

- liczba prosiąt żywo urodzonych w miocie,
- masa prosięcia przy urodzeniu oraz w 28. i 42. dniu życia,
- przyrost dzienny od odsadzenia do 42. dnia życia,
- biegunka prosiąt,
- upadki prosiąt i ich przyczyny od odsadzenia (28) do osiągnięcia przez warchlaki (42).

Podczas doświadczenia w karcie zdrowia zwierząt notowano liczbę dni z biegunką, jej przebieg (obserwacje kliniczne) oraz określono stan zdrowotny. W dniu odsadzenia (28. dzień) oraz w 42. dniu życia, od 6 prosiąt z każdego miotu (6 prosiąt z grupy) zostały pobrane próbki krwi do oznaczenia wybranych wskaźników morfologicznych (m.in.: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba czerwonych i białych krwinek) i biochemicznych krwi. W 28. dniu życia (po 2 z każdego miotu – razem 6), a następnie w 42. dniu na zakończenie doświadczenia zostało wytypowanych po 6 osobników z każdego miotu 3♂ i 3♀ – w sumie 18 prosiąt. Prosięta zostały uśmiercone poprzez podanie dootrzewnowo pentobarbituranu, po czym zostały poddane sekcji. Próbkę tkanek przewodu pokarmowego, w tym odźwiernikową część żołądka, dwunastnica, jelito czcze (odcinek proksymalny, środkowy i dystalny) oraz jelito biodrowe (część proksymalną) zostały pobrane i natychmiast utwalone w 10% roztworze zbuforowanego formaldehydu celem analizy morfometrycznej. W czasie sekcji pobrano treść pokarmową z żołądka, dwunastnicy, jelita czczego oraz okrężnicy dalszej w celu określenia pH treści pokarmowej poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego.

Obliczenia statystyczne:

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 $P \leq 0,05$.

Wyniki badań:

Właściwa suplementacja diety prosiąt związkami zdolnymi do modulacji składu mikrobiomu i aktywności jelit jest jednym z najefektywniejszych sposobów na poprawę zdrowotności i produktywności prosiąt. Prezentowane wyniki badań, dają możliwość wykorzystania rozwiązań żywieniowych w odchowie prosiąt w okresie odsadzeniowym.

Parametry wzrostu i pobrania paszy.

W doświadczeniu badano wpływ w/w dodatków na zmniejszenie skutków zakażeń bakteryjnych, w szczególności u młodych zwierząt, łagodzenia skutków odsadzenia od matki i szybkiej adaptacji do nowych warunków środowiskowych, szczególnie do przyswajania paszy stałej. W pierwszym okresie odchovu między 1. a 28. dniem życia prosięta wszystkich grup żywieniowych charakteryzowały się podobnym wzrostem, uzyskując przy odsadzeniu podobne masy ciała, odpowiednio: kontrola – 7,47 kg; D1 – 8,33 kg i 6,72 kg. Obserwacje dotyczące masy ciała prosiąt oraz pobrania i wykorzystania paszy zostały przedstawione w Tabeli 2. i 3. Suplementacja diety prosiąt mrówczanem potasu (gr. D1) oraz mrówczanem potasu i dodatkiem probiotyku (gr. D2) wykazała istotny wpływ na końcową masę ciała zwierząt w grupie D2. W 42. dniu życia, prosięta w poszczególnych grupach żywieniowych, uzyskały następujące masy ciała: K – 9,98 kg; D1 – 8,33 kg; D2 – 9,35 kg ($P \leq 0,05$). Nie stwierdzono istotnych różnic w przyrostach masy ciała prosiąt w okresie od odsadzenia do 42. dnia życia, które wyniosły odpowiednio: kontrola – 0,169 kg, D1 – 0,139 kg i D2 – 0,184 kg. W okresie suplementacji preparatu uwidocznił się istotny wpływ oddziaływania preparatów na pobranie paszy i FCR w grupach doświadczalnych. Stwierdzono istotnie niższe pobranie paszy w grupie D1 i D2 w odniesieniu do kontroli 0,280 i 0,258 kg vs. 0,317 kg ($P \leq 0,0015$). Stwierdzono, istotnie niższe współczynniki wykorzystania paszy FCR w grupach doświadczalnych: D1 – 1,96; D2 – 1,56 vs. Kontrola – 2,15 ($P \leq 0,026$). W trakcie trwania doświadczenia nie odnotowano żadnych upadków wśród zwierząt, nie stwierdzono również przypadków zachorowań zwierząt.

Tabela 2. Masa ciała prosiąt w trakcie doświadczenia (n=6), średnie $\pm$ SD.

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-VALUE
	Kontrola	$\pm$ SD	D1	$\pm$ SD	C 2	$\pm$ SD		
Masa ciała w 21. dniu, kg	5,08	0,970	5,08	0,970	4,92	0,376	0,183	0,921
Masa ciała w 28. dniu	7,47	1,320	6,45	1,208	6,72	0,941	0,279	0,322
Masa ciała w 42. dniu	9,98 ^b	0,783	8,33 ^a	1,219	9,35 ^b	0,625	0,261	0,022

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

Tabela 3. Parametry produkcyjne prosiąt (n=6), średnie $\pm$ SD.

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-VALUE
	Kontrola	$\pm$ SD	D1	$\pm$ SD	D2	$\pm$ SD		
ADG (kg)	0,169	0,064	0,139	0,092	0,184	0,045	0,0125	0,351
ADFI (kg)	0,317 ^B	0,07	0,280 ^{AB}	0,08	0,258 ^B	0,09	0,012	0,0015
FCR (kg/kg)	2,15 ^B	0,09	1,96 ^{AB}	0,08	1,56 ^A	0,04	0,141	0,026

Grupa kontrolna – grupa nieotrzymująca dodatku; Grupa D1 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza; Grupa D2 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza i probiotyk; ADG – przyrosty masy ciała; ADFI – dzienne zużycie paszy; FCR – współczynnik konwersji paszy. a, b – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,05$.

Parametry hematologiczne krwi.

Wyniki analizy hematologicznej krwi prosiąt przedstawiono w Tabeli 4. i 5. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie dla żadnego z analizowanych parametrów pomiędzy okresem początkowym doświadczenia.

Analizując wyniki jako procentową różnicę pomiędzy pierwszym a ostatnim dniem trwania doświadczenia dla poszczególnych grup, stwierdzono, między innymi, istotny wzrost liczby białych krwinek w grupie D1 ($P \leq 0,0462$) oraz wskaźnik RDW, który miał istotnie niższą wartość w grupie D2 ($P \leq 0,0482$). Wartości hematologiczne odnoszące się do parametrów układu białokrwinkowego oraz czerwokrwinkowego mieściły się w granicach wartości referencyjnych dla krwi prosiąt (Winnicka, 2021).

Tabela 4. Analiza hematologiczna krwi prosiąt pobranej pierwszego dnia doświadczenia (28. dzień).

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-VALUE
	Kontrola	$\pm$ SD	D1	$\pm$ SD	D2	$\pm$ SD		
MCV (fL)	40	3,4	42	3,5	47,5	4,70	0,990	0,9435
MCH (pg)	13,0	1,1	14,4	1,3	15,4	1,45	0,443	0,8535
MCHC (g/dL)	32,2	0,25	33,1	0,38	32,4	0,26	0,206	0,3435
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	5,45	0,45	5,66	0,48	5,02	0,42	0,185	0,2903
HCT (%)	22,35	2,4	23,4	3,2	23,95	3,40	0,660	0,2100
HGB (g/dL)	7,2	0,78	8,2	1,14	7,75	0,92	0,225	0,4564
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	18,35	5,6	12,1	4,8	11,8	3,80	1,826	0,0668
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	645	245	593	239	537	132	55,713	0,1832
RDW (fL)	23,15	2,3	24,15	3,2	23,65	2,38	0,485	0,1200
MPV (fL)	9,9	1,0	9,65	1,1	8,95	0,82	0,226	0,2100

Grupa kontrolna – grupa nieotrzymująca dodatku, Grupa D1 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza, Grupa D2 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza i probiotyk. WBC – liczba białych krwinek, RBC – liczba czerwonych krwinek, HGB – ilość hemoglobiny, HCT – hematokryt, MCV – średnia objętość erytrocytów, MCH – zawartość hemoglobiny w erytrocytach, MCHC – stężenie hemoglobiny w erytrocytach, PLT – liczba płytek krwi. RDW to test zawartości czerwonych krwinek we krwi badanego, z uwzględnieniem objętości MPV – objętość płytek krwi. a, b – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,05$.

Tabela 5. Analiza hematologiczna krwi prosiąt pobranej na zakończenie doświadczenia (42. dzień).

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-VALUE
	Kontrola	±SD	D1	±SD	D2	±SD		
MCV (fL)	48,3	4,4	48,0	4,5	48,5	5,72	1,090	0,9841
MCH (pg)	14,9	1,3	15,0	1,5	15,2	1,82	0,343	0,9528
MCHC (g/dL)	30,9	0,3	31,2	0,9	31,4	0,33	0,139	0,2935
RBC (10 ⁶ /μL)	6,40	0,77	6,67	0,42	6,12	0,41	0,135	0,2603
HCT (%)	30,8	2,7	32,1	4,2	29,3	3,08	0,803	0,3802
HGB (g/dL)	9,52	0,81	10,07	1,34	9,18	1,02	0,255	0,3822
WBC (10 ³ /μL)	19,7 ^a	2,6	24,3 ^b	2,8	20,1 ^a	2,85	1,071	0,0462
PLT (10 ³ /μL)	504	230	639	269	386	162	55,713	0,1832
RDW (fL)	22,8 ^{ab}	2,5	23,9 ^b	3,4	20,0 ^b	2,88	0,765	0,0482
MPV (fL)	7,8	1,0	8,9	1,5	8,5	1,23	0,302	0,2976

*Opis jak w Tabeli 4. Pomiary długości poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego wykonane w trakcie przeprowadzenia dysekcji zwierząt nie wykazały statystyczne istotnego zróżnicowania pomiędzy grupami.

Tabela 6. Ocena morfometryczna układu pokarmowego prosiąt w 42. dniu życia.

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe						SEM	p-VALUE
	Kontrola	±SD	D1	±SD	D2	±SD		
Długość dwunastnicy, cm	21,50	7,259	27,00	4,336	20,50	3,271	1,350	0,101
Długość jelita cienkiego, m	9,46	1,043	9,92	1,653	9,92	0,411	0,261	0,735
Długość jelita grubego, m	1,92	0,165	1,75	0,207	1,86	0,206	0,046	0,366

Tabela 7. Pomiar pH treści pokarmowej poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego w 42. dniu życia.

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe				SEM	p-VALUE
	Kontrola	±SD	D1	±SD		
Żołądek	3,46 ^b	0,940	2,19 ^a	0,468	0,218	0,034
Dwunastnica	4,88	1,154	4,55	1,641	0,315	0,707
Jelito cienkie cz. proksymalna	6,64	0,039	6,33	0,454	0,068	0,152
Jelito grube cz. dystalna	6,65 ^A	0,339	6,55 ^A	0,143	0,100	0,001

Grupa kontrolna – grupa nieotrzymująca dodatku; Grupa D1 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza; Grupa D2 – grupa otrzymująca dodatek zakwaszacza i probiotyk. a, b – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0.05$.

Wnioski:

1. Jednoczesne zastosowanie zakwaszacza wraz z probiotykiem daje najlepsze rezultaty zdrowotne w okresie okołoodsadzeniowym prosiąt.
2. Podawanie zakwaszacza wraz z probiotykiem istotnie obniża pobranie paszy i wskaźnik FCR w okresie po odsadzeniu od matki.
3. Podawanie zakwaszacza lub zakwaszcza wraz z probiotykiem w okresie odsadzenia prosiąt istotnie obniża pH treści żołądka oraz jelita grubego.

Zakład Systemów i Środowiska Produkcji
p.o. kierownika: dr inż. Elżbieta Sowuła-Skrzyńska
p.o. kierownika: dr hab. Jacek Walczak (do 30.09.2022)

Zadanie 04-17-05-11

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

kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowuła-Skrzyńska

Głównym celem zadania jest ocena działań i nakładów finansowych skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej na środowisko w obrębie rodzinnych gospodarstw rolnych.

Realizacja celu poprzez:

- analizę przychodów i kosztów produkcji zwierzęcej w ujęciu terytorialnym, uwzględniającą działania na rzecz ochrony środowiska w gospodarstwach rodzinnych,
- optymalizację produkcji zwierzęcej uwzględniającą działania skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań na środowisko,
- określenie barier i szans realizacji wybranych założeń *GREEN DEAL* w gospodarstwach ze zróżnicowaną produkcją zwierzęcą.

W roku sprawozdawczym zaplanowano etap dotyczący gromadzenia danych o produkcyjności, kosztach i przychodach rodzinnych gospodarstw rolnych. W drugim roku prowadzonych badań:

- wytypowano gospodarstwa rodzinne utrzymujące bydło mięsne, bydło mleczne, owce oraz świnie,
- przygotowano kwestionariusz ankiety do gromadzenia danych źródłowych,
- przygotowano arkusz kalkulacyjny do wprowadzenia pozyskanych danych oraz obliczeń,
- zgromadzono dane z zakresu zasobów gospodarstw, które w przyszłości posłużą do wykonania analizy efektywności ekonomiczno-produkcyjnej i optymalizacji produkcji,
- dane źródłowe poddane analizie pochodziły z 218 gospodarstw konwencjonalnych, w tym: 77 gospodarstw utrzymujących krowy mleczne; 65 gospodarstw utrzymujących bydło mięsne; 37 gospodarstw utrzymujących owce oraz 39 gospodarstw utrzymujących świnie.

Gospodarstwa utrzymujące bydło mięsne.

Badaniami zostały objęte gospodarstwa zlokalizowane w trzech województwach: podlaskim (20), dolnośląskim (33) oraz podkarpackim (12).

We wszystkich badanych podmiotach procentowy udział użytków zielonych w stosunku do użytków rolnych był zbliżony i wynosił średnio 49,82%. Największy udział powierzchni do dzierżawionej odnotowano na Podkarpaciu (47,44%), natomiast gospodarstwa w województwie podlaskim gospodarowały w przeważającej części na własnych gruntach – dzierżawa stanowiła zaledwie 10,52%.

Analizując nakłady pracy ogółem w badanych „regionach”, stwierdzono, że średnio wynoszą 1,62 AWU, natomiast najmniejsze są w gospodarstwach województwa podlaskiego,

gdzie wynoszą 1,47 AWU. Wynika to z faktu, że gospodarstwa tego regionu charakteryzują się najmniejszą powierzchnią ogólną (średnio 24,57 ha) spośród badanej populacji. Jest to powierzchnia o około 40% mniejsza niż w gospodarstwach województwa dolnośląskiego (40,57ha). Przeciętna liczba utrzymywanego bydła przypadająca średnio na 1 gospodarstwo wyniosła 36,34 sztuk, w tym 13,24 sztuk krów, co przełożyło się na 32,10 DJP w gospodarstwie. Przeliczając liczbę DJP na 100ha UR ustalono, że średnio stanowi ona 126,87 DJP.

W strukturze kosztów całkowitych produkcji żywca wołowego dominowały koszty (95,98% – podkarpackie; 93,26% – dolnośląskie; 90,82% – podlaskie), głównie pasz własnych. Koszt całkowity produkcji w przeliczeniu na 1DJP wyniósł około 5 163 zł (dolnośląskie), 4 900 zł (podlaskie) oraz 3 840 zł (podkarpackie). Wysokość kosztów pośrednich odnotowano na średnim poziomie ok. 1 904 zł/DJP z rozproszeniem od blisko 904 zł (podkarpackie) do 2 433 zł (dolnośląskie) – Tabela 1. Główną ich składową było utrzymanie i remonty maszyn oraz budynków wykorzystywanych do produkcji żywca wołowego.

Tabela 1. Koszty produkcji w gospodarstwach rodzinnych utrzymujących bydło mięsne.

Wyszczególnienie	Razem – średnio	Podlaskie	Dolnośląskie	Podkarpackie
Przeciętna liczba bydła - ogółem (szt.)	36,34	33,89	34,65	44,08
w tym krowy (szt.)	13,24	8,45	15,19	17,00
Koszty pasz na DJP (zł)	2 540,62	2 767,37	2 322,09	2 636,20
Koszty bezpośrednie na DJP (zł)	2 735,15	3 047,04	2 489,98	2 746,54
Koszty pośrednie na DJP (zł)	1 904,37	1 817,65	2 432,85	903,84
Koszty całkowite na DJP (zł)	4 798,79	4 900,81	5 162,78	3 840,12

Przychody ogółem w gospodarstwach utrzymujących bydło mięsne kształtowały przede wszystkim przychody z tytułu produkcji żywca wołowego. Stanowiły one odpowiednio 51,74% (podlaskie), 37,34% (podkarpackie) i 28,36% (dolnośląskie). Płatności i subsydia, stanowiły najwyższy odsetek w przychodach ogółem gospodarstw zlokalizowanych w województwie podkarpackim (39,20%). W województwie tym również zaobserwowano najniższy odsetek dochodów uzyskiwanych spoza gospodarstwa rolnego.

Gospodarstwa utrzymujące bydło mleczne.

Badaniami zostały objęte gospodarstwa zlokalizowane w trzech województwach: podlaskim (30), dolnośląskim (27) oraz podkarpackim (20).

W badanych gospodarstwach domowych średnio zamieszkiwało ponad 4 osoby, z czego w gospodarstwie rolnym pracowało średnio 2,80 osoby, a średnio 0,56 osoby pozyskiwały dochody z pracy zarobkowej. Biorąc pod uwagę nakłady pracy ogółem w badanych „regionach”, stwierdzono, że średnio wynoszą one 1,98 AWU, natomiast najmniejsze są w gospodarstwach województwa dolnośląskiego, gdzie wynoszą 1,87 AWU. Przedstawione wartości potwierdzają większą zaangażowanie prac w gospodarstwach utrzymujących bydło mleczne w stosunku do gospodarstw z bydłem mięsnym.

Przeciętna liczba utrzymywanego bydła przypadająca średnio na 1 gospodarstwo wyniosła 49,66 sztuk w tym 26,22 sztuki krów mlecznych, co przełożyło się na 43,08 DJP w gospodarstwie (Tabela 2.). Przeliczając liczbę DJP na 100 ha UR ustalono, że średnio stanowi ona 139,04 DJP na 100 ha UR. Największe zagęszczenie zwierząt odnotowano w podlaskich gospodarstwach, gdzie przekroczyło ono 1,66 DJP na ha UR, co w nieznaczny sposób może zaburzyć racjonalne wykorzystanie wytworzonego nawozu naturalnego.

Uzyskiwana wydajność mleczna w badanych 77 gospodarstwach utrzymywała się na stosunkowo wysokim poziomie wynoszącym średnio z 6582,54 l rocznie, co przekładało się na uzyskiwane przychody z produkcji mleka. Średni przychód – czyli wartość produkcji w przeliczeniu na jedną krowę wynosiła średnio 9743,50 zł rocznie. Najniższą wartość produkcji odnotowano na Dolnym Śląsku i wynikała ona z najniższej wydajności mlecznej krow. Niższa wydajność produkcyjna w tym przypadku wymagała mniejszych nakładów pieniężnych – co oznacza, że w tym województwie odnotowano najniższe koszty bezpośrednie produkcji mleka w przeliczeniu na krowę.

Tabela 2. Koszty produkcji w gospodarstwach rodzinnych utrzymujących bydło mleczne.

Wyszczególnienie	Razem – średnio	Podlaskie	Dolnośląskie	Podkarpackie
Razem bydło (szt.)	49,66	56,93	36,76	51,33
w tym krowy (szt.)	26,22	29,82	19,06	27,78
Koszty pasz na 1 krowę	4 403,32	4 811,54	4 029,90	4 166,35
Koszty bezpośrednie na 1 krowę	5 036,98	5 543,57	4 589,07	4 728,27
Koszty pośrednie na 1 krowę	4 056,58	2 963,42	4 289,38	5 415,73
Koszty całkowite na 1 krowę	9 298,34	8 663,01	9 110,15	10 393,79
Koszty pasz na 1 l mleka	0,77	0,84	0,71	0,73
Koszty bezpośrednie na 1 l mleka	0,89	0,98	0,81	0,84
Koszty pośrednie na 1 l mleka	0,71	0,56	0,77	0,88
Koszty całkowite na 1 l mleka	1,64	1,56	1,63	1,76

Gospodarstwa utrzymujące owce.

Badaniami zostały objęte gospodarstwa zlokalizowane w dwóch województwach: podkarpackim (17) oraz podlaskim (20). Prowadziły one produkcję żywca jagnięcego, a działalność ta była dominującym kierunkiem produkcji.

W związku ze zróżnicowaną skalą produkcji odnotowano w analizowanych obiektach różnice w średniej powierzchni gospodarstw. Najmniejsze obszarowo gospodarstwa utrzymujące owce, występowały w grupie posiadającej do 20 matek w stadzie. W województwie podkarpackim blisko 31% gospodarstw posiadało do 10 ha użytków rolnych, dla porównania w województwie podlaskim takich gospodarstw było 14%. Powierzchnia UR w gospodarstwach z produkcją owczarską wynosiła średnio 18,56 ha, w tym: uprawy rolnicze (grunty orne) 9,63 ha, trwałe użytki zielone 8,83 ha (co stanowiło blisko 53,34% UR ogółem).

Przeciętna liczba owiec, przypadająca średnio na 1 gospodarstwo, wyniosła 61,20 sztuk. Największa liczba owiec w przeliczeniu na 1 gospodarstwo została odnotowana na poziomie 170 sztuk (w województwie podkarpackim).

W strukturze kosztów całkowitych produkcji owczarskiej dominowały koszty bezpośrednie produkcji, główną składową kosztów bezpośrednich były koszty pasz (74,15% – podkarpackie; 73,64% – podlaskie), głównie pasz własnych (Tabela 3.).

Koszt całkowity produkcji w przeliczeniu na matkę wyniósł ponad 548 zł (podkarpackie) oraz 611 zł (podlaskie) (Tabela 3.). Wysokość kosztów pośrednich odnotowano na zbliżonym poziomie ok. 65 zł/matkę średnio, w jednym i drugim regionie. Główną jego składową było utrzymanie, remonty maszyn, urządzeń oraz budynków.

Tabela 3. Koszty produkcji w gospodarstwach rodzinnych utrzymujących owce.

Wyszczególnienie	Razem – średnio	Podkarpackie	Podlaskie
Przeciętna liczba owiec matek (szt.)	46,71	40,94	51,22
Koszty pasz na owce matkę (zł)	382,58	358,36	401,53
Koszty bezpośrednie na matkę (zł)	518,01	483,27	545,20
Koszty pośrednie na matkę (zł)	65,62	64,88	66,19
Koszty całkowite na matkę (zł)	583,62	548,14	611,39

Gospodarstwa utrzymujące świnie.

Badaniami zostały objęte wybrane celowo gospodarstwa zlokalizowane w województwie podkarpackim (15), podlaskim (20) oraz dolnośląskim (4). Prowadziły one produkcję świń w cyklu zamkniętym. Działalność ta była dominującą w analizowanych obiektach.

W związku ze zróżnicowaną skalą produkcji odnotowano w analizowanych obiektach różnice w średniej powierzchni gospodarstw. Rolnicy utrzymujący świnie zobligowani są do posiadania odpowiedniej powierzchni użytków rolnych celem właściwego zagospodarowania odchodów zwierzęcych. Mniejsze obszarowo gospodarstwa występowały w województwie podkarpackim o mniejszej obsadzie świń, tj. 31,91 ha, natomiast w województwie podlaskim były średnie większe (o ok. 20%). Średnio, ponad 71% powierzchni gospodarstw stanowił własny areal.

Analiza organizacji produkcji zwierzęcej wykazała, że średni stan loch wyniósł w gospodarstwach 26,49 sztuk. W przypadku województwa podkarpackiego przeciętna liczba loch przypadająca na 1 gospodarstwo wyniosła 13,42 sztuk i była trzykrotnie mniejsza w porównaniu z województwem podlaskim (41,61 szt.), a prawie dwukrotnie większa niż w województwie dolnośląskim.

Koszty bezpośrednie w przeliczeniu na 1 lochę wyniosły 7 678,85 zł (podkarpackie); 6 713,23 zł (podlaskie) oraz 7 096,04 zł (dolnośląskie) – Tabela 4. Stosunkowo niski koszt spowodowany był wysokim udziałem pasz treściwych własnych w żywieniu świń. We wszystkich gospodarstwach najwyższy udział w strukturze kosztów bezpośrednich stanowiły koszty pasz. W strukturze kosztów całkowitych produkcji dominowały koszty bezpośrednie produkcji, a w nich koszty pasz. Natomiast główną składową kosztów pośrednich gospodarstw zajmujących się produkcją żywca wieprzowego były koszty nośników energii.

Tabela 4. Koszty produkcji w gospodarstwach rodzinnych utrzymujących świnie.

Wyszczególnienie	Razem – średnio	Podkarpackie	Podlaskie	Dolnośląskie
Liczba loch (szt.)	26,49	13,42	41,61	7,00
Koszty pasz na lochę (zł)	6 152,44	6 661,58	5 831,80	6 024,50
Koszty bezpośrednie na lochę (zł)	7 114,98	7 687,85	6 713,26	7 096,04
Koszty pośrednie na lochę (zł)	1 992,63	2 544,07	1 462,48	2 647,98
Koszty całkowite na lochę (zł)	9 107,61	10 231,92	8 175,74	9 744,03

Przychody ogółem w przypadku gospodarstw „trzodowych” kształtowała wartość produkcji żywca wieprzowego, która stanowiła odpowiednio 50,42% (podkarpackie); 88,22% (podlaskie) i 28,61% (dolnośląskie). Wysokość płatności w przychodach odnotowano na najwyższym poziomie w województwie dolnośląskim (21,49%).

Najchętniej podejmowanym działaniem, skierowanym na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko, i przyczyniającym się do poprawy odczynu gleby oraz jej żyzności, było wapnowanie i przyorywanie obornika w ciągu 12 godzin od aplikacji na glebę. W badanych gospodarstwach skupiono również uwagę na stosowaniu międzyplonów ozimych, które mają na celu między innymi poprawę jakości gleb. Co ciekawe, przestrzeganie planu nawożenia realizowano w 1/3 gospodarstw. Dobrostanem zwierząt spośród wszystkich badanych gospodarstw zainteresowała się 1/5 rolników, przy czym najczęściej działanie to odnotowywano w gospodarstwach utrzymujących bydło mleczne. W niewielkim zakresie podejmowano działania dotyczące wprowadzania stref buforowych oraz obszarów nieprodukcyjnych. Natomiast spośród przebadanej populacji gospodarstw najmniejsze zainteresowanie było produkcją metodami ekologicznymi.

Zadanie 01-17-03-11

Ewaluacja metod pomiaru emisji i mitygacji GHG w trakcie pastwiskowania.

kierownik zadania: dr hab. Jacek Walczak

Celem zadania jest uzyskanie precyzyjnej, nieinwazyjnej metody pomiaru emisji GHG, w tym emisji metanu z fermentacji jelitowej od bydła mlecznego, utrzymywanego w warunkach fermowych (m.in. na pastwisku), a także określenie przydatności wybranych sposobów mitygacji GHG i amoniaku w trakcie samego pastwiskowania.

Tak postawiony cel główny osiągany jest poprzez realizację celów cząstkowych, do których zaliczają się:

- opracowanie metodologii pomiarów emisji metanu z wykorzystaniem znaczników SF₆ oraz miernika laserowego,
- wyznaczenie najskuteczniejszych metod mitygacji GHG i amoniaku w trakcie pastwiskowania bydła.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań:

W omawianym okresie sprawozdawczym zrealizowano etap zadania obejmujący pomiary emisji z wybranych metod pastwiskowej mitygacji GHG.

Pod względem pierwszego z celów zadania, tj. opracowania metody pomiaru emisji metanu z fermentacji żwaczowej krów przy użyciu traserów SF₆ i miernika laserowego, kontynuowano prace nad konstrukcją prototypowego urządzenia do poboru prób jakim jest traser. Przyjęto 24 godzinny czas pracy tracera. Opracowano dedykowaną konstrukcję zbiornika o kształcie półobraczy zawieszanej na obręczy barkowej zwierzęcia, wykonanej z klejonych rur i kształtek PCV o średnicy ¾. Przetestowano sposób stabilizacji tracera na zwierzęciu, ustalając konieczność wykorzystania do tego celu pasa zapinanego za przednimi kończynami oraz kantar zapinanego na łbie, do którego również mocowane będą przewody pomiarowe.

W dalszym ciągu prac porównywano różne materiały do wykonywania bolusów uwalniających sześćfluorek siarki umieszczany w żwaczu krowy. Ze względu na ciężar i konieczność toczenia, zrezygnowano z bolusów mosiężnych na rzecz polietylenu HDPE. Kolejnym krokiem było opracowanie niezbędnej wielkości bolusów kapsuł zamykanych nakrętką z membraną wykonaną z PTFE. W tym celu zastosowano pojemniki o objętości 15; 25; 35; 45 i 55 ml. Pojemniki napełniano gazowym SF₆ przy pomocy strzykawki gazowej i mierzono w odstępach 1 godziny, czas uwalniania gazu do otoczenia przy pomocy Miernika MultiPID w temperaturze 38°C. Uzyskane wyniki ilustruje Tabela 1.

Tabela 1. Średni czas uwalniania SF₆ w zależności od objętości bolusa.

Objętość bolusa (ml)	Czas uwalniania gazu (min.)/Powtórzenie		
	1.	2.	3.
15	475	480	490
25	800	780	790
35	1130	1110	1120
45	1450	1430	1440
55	1780	1750	1760

Za wystarczającą do dobowych pomiarów uznano objętość bolusa wynoszącą 55 ml. Aktualnie trwają prace nad doбором wielkości przepływów z użyciem baterijnie zasilanej pompy i przewodów witonowych do samlpowania prób powietrza wydechowego. Zasadniczym problemem jest skorelowanie ilości magazynowanego powietrza (objętość zbiornika) z wydajnością stale pracującej mikropompy oraz średnicą i długością przewodów zasilających – ustalenie niezbędnej wielkości podciśnienia w układzie. Kontynuowano również prace nad weryfikacją przydatności zdalnych mierników laserowych w porównaniu do mierników klasycznych wyposażonych w cele pomiarowe i detektory laserowe lub podczerwone. Pomiarów dokonano łącznie na grupie 300 krów HF pastwiskowanych 6 godzin/dzień w przedziałach 3 minut. Klasyczne mierniki dokonywały pomiaru w sposób ciągły, a przenośny miernik laserowy samlpował przez 3 minuty w interwałach co 1 s. Pomiarów zdalnych dokonywano z odległości 1 m od zwierzęcia, a pomiarów klasycznych bezpośrednio z okolic śluzawicy przy pomocy sondy ręcznej. Uzyskane wyniki ilustruje Tabela 2.

Porównanie wyników pomiarów wskazuje na wysoką istotność różnic między miernikami klasycznymi a zdalnymi laserowymi. W związku z dużą częstotliwością samlpowania przez zdalny miernik laserowy (odstęp 1 s) w porównaniu do ciągłego zasysania powietrza do celów pomiarowych w klasycznych miernikach, te ostatnie okazały się być wręcz nieprzydatne do pomiarów polowych.

Tabela 2. Porównanie wyników pomiarów koncentracji metanu w wydychanym powietrzu w trakcie pastwiskowania krów przy wykorzystaniu różnych metod pomiarowych (ppm).

Powtórzenie	Rodzaj pomiaru		
	Klasyczny laserowy	Klasyczny w podczerwieni	Laserowy zdalny
1.	2206,45Aa	2210,91Ab	3321,53Bc
2.	2217,12Aa	2222,32Ab	3325,32Bc
3.	2224,43Aa	2228,21Ab	3332,61Bc

ab – różnice istotne przy $P \geq 0.05$;

Pod względem wyznaczenia najskuteczniejszych metod mitygacji GHG i amoniaku w trakcie pastwiskowania bydła materiał doświadczalny stanowiło 120 krów mlecznych rasy HF pozostających w pierwszej fazie laktacji w grupie żywionej na zapotrzebowanie produkcyjne 7 000 l mleka. Zwierzęta żywione były metodą PMR z udziałem kiszonki z kukurydzy i runi pastwiskowej w systemie kwaterowym. Czas przebywania na pastwisku wynosił 6 godzin dziennie. W trzech seriach całodobowych, obejmujących łącznie pięć dni pomiarów, określone zostały emisje metanu od każdej ze sztuk przy pomocy zdalnego laserowego miernika metanu.

Emisje, metanu podtlenku azotu i amoniaku z gleby pastwiska i zdeponowanych na niej

odchodów, dokonywano przy pomocy metody mikrotuneli aerodynamicznych i klasycznych mierników Tiger, Horiba oraz MultiPID. Grupę kontrolną stanowił klasyczny termin spasanie pastwiska (faza kłoszenia). Grupy doświadczalne stanowiły wypas wcześniejszy o 2 tygodnie w stosunku do klasycznego terminu spasania pastwiska (faza kłoszenia), spasanie późniejsze o 2 tygodnie w stosunku do klasycznego terminu, spasanie runi pastwiskowej z podsiewem szybko rosnących traw hybrydowych (40%). Uzyskane wyniki emisji metanu z fermentacji jelitowej ilustruje Tabela 3. Wyniki pomiarów emisji z gleb pozostają jeszcze w trakcie analizy statystycznej.

Jak widać z uzyskanych danych, najniższą emisję z fermentacji jelitowej wykazywały krowy żywione z udziałem wysokostrawnych traw hybrydowych. Następną w kolejności była grupa o przyspieszonym o 2 tygodnie terminie spasania, a najwyższą emisję metanu wykazano dla opóźnionego o 2 tygodnie wypasu. Uzyskane zróżnicowanie wynikało wprost z różnego stopnia strawności runi w tym zawartości włókna.

Tabela 3. Porównanie średnich emisji metanu w trakcie różnych sposobów pastwiskowania krów (kg/szt./rotację).

Rotacja kwatery	Grupa			
	Trawy hybrydowe	Wcześniejszy wypas	Klasyczny wypas	Późniejszy wypas
1.	38,45a	42,91b	53,53c	67,32d
2.	49,12a	53,32b	57,32c	61,42d
3.	56,43a	60,21b	64,61c	65,98d

a, b – różnice istotne przy $P \geq 0.05$;

Podsumowanie wyników:

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzić można, że istotności różnic w pomiarach dokonywanych różnymi metodami, wskazuje na większą precyzję pomiarów emisji metanu z fermentacji jelitowej w przypadku zastosowania zdalnego miernika laserowego. Niemniej, także w jego przypadku, ważnymi elementami pomiarowymi jest stały punkt umiejscowienia wiązki oraz zachowanie tej samej odległości od mierzonego zwierzęcia. Klasyczne mierniki z wykorzystaniem cel pomiarowych nie różnią się znacząco między sobą w precyzji pomiarów, lecz czas samplowania jest tu zbyt długi, aby precyzyjnie uchwycić rzeczywiste stężenie metanu w oddechu. Są one wysoce przydatne do badań w komorach czy tunelach aerodynamicznych, gdzie nie sprawdza się miernik zdalny.

Odnosnie użycia SF₆ do polowych pomiarów emisji metanu od zwierząt, to już na etapie konstruowania prototypowego zestawu, pojawia się wiele wyzwań technicznych, związanych z budową bolusa i właściwego doboru tempa uwalniania znacznika gazowego. W porównaniu do użycia zdalnego miernika laserowego metoda ta wydaje się bardziej skomplikowana i czasochłonna, niemniej jest ona nadal stosowana w kilku ośrodkach naukowych.

Pod względem porównania emisji metanu z fermentacji jelitowej krów wypasanych w różnych fazach dojrzałości runi pastwiskowej oraz jej zmiennego składu, zasadnicze znaczenie wydaje się mieć strawność zielonki, a zwłaszcza stopień zdrewnienia tkanek. Najniższą emisję metanu z fermentacji jelitowej wykazano natomiast dla runi z podsiewem wysoko strawnych traw hybrydowych. Emisja rosta również wraz z kolejną rotacją.

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

Zadanie 01-18-05-21

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

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

Celem 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 zwisłoucha – dwie główne rasy wykorzystywane jako komponent matczyny w polskiej hodowli, posiadają IMF na poziomie ok. 1%, czyli około dwa razy mniejszym 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 świni 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 nieznane mechanizmy regulacji ekspresji genów.

Dopełnieniem analizy ATAC-seq będzie ocena transkryptomyczna (RNA-seq) tkanki wątrobowej i tłuszczowej. Umożliwi to trafne wskazanie procesów metabolicznych wysoce istotnie powiązanych z regulacją odkładania tkanki tłuszczowej.

Założenia metodyczne:

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 Cellcouteru 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 Generich. 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).

Dodatkowo, przeprowadzono identyfikację wariantów genów (analiza *variant calling*) na podstawie wyników RNA-seq, w której wykorzystano narzędzie GATK v. 4.1.9. Różnice w dystrybucji poszczególnych alleli zostały zidentyfikowane z wykorzystaniem testu χ^2 pomiędzy osobnikami o wysokim (WPT) i niskim stopniu otyśczenia (NPT). Po analizie *variant calling*, na bazie RNA seq z tkanki tłuszczowej, zostały wytypowane cztery interesujące warianty genu *BSCL2* (rs346079334, rs341493267, rs330154033 i rs81333153) należące do regionu poniżej genu - downstream (ds) oraz do mutacji zmiany sensu (ms). Warianty te zostały wybrane ze względu na występowanie dużych różnic w dystrybucji *alleli*/genotypów według testu χ^2 . Dodatkowo, zidentyfikowane warianty ms *BSCL2* analizowano za pomocą narzędzia GERP [22] i narzędzia SIFT, które określały szkodliwość tych mutacji dla funkcji białka. Ponadto, zostały one zweryfikowane przez sekwencjonowanie Sangera na poziomie DNA.

Wyniki:

ATAC-seq.

Próbki akceptowalne wykazywały żywotność zbliżoną do 80%. Preparaty mikroskopowe pokazano na Rycinie 1. A ze wskazanymi niebieskimi, martwymi jądrami. W niniejszym badaniu biblioteki ATAC przygotowano w oparciu o nowy zestaw TruPrep (Vazyme), zawierający zintegrowaną transpozazę Tn5. Ten zestaw nigdy nie był używany w tego rodzaju zastosowaniach, dlatego podczas przygotowywania biblioteki ATAC zastosowaliśmy liczne etapy kontroli jakości. Na podstawie obliczeń Qubit Fluorometer (Invitrogen) i systemu TapeStation 2200 przetestowano ilość i jakość tych bibliotek (Rycina 1. B i C). Biblioteki ATAC wykazały stężenie w zakresie 15-33 $\mu\text{g/ml}$. Kontrola fazy lizy (1) przebiegła pomyślnie, nie uzyskano żadnych fałszywych bibliotek. Kontrola wzbogaconego regionu promotora GAPDH (2) przebiegła prawidłowo, pułstynne produkty DNA otrzymano tylko w bibliotekach genomowych i dla wyizolowanego DNA, a amplikon PCR dla promotora GAPDH uzyskano we wszystkich próbkach (Figura 1. E). Długość wstawki we frakcjonowanych bibliotekach ATAC przedstawiono na Rycinie 1. D.

Narzędzie Genrich zidentyfikowało sygnały dla każdej próbki osobno, gdzie zidentyfikowano co najmniej 5000 sygnałów. Wszystkie sygnały zostały przypisane wzdłuż ich lokalizacji do regionów 5'UTR, 3'UTR, powyżej i poniżej sekwencji kodującej oraz do intronów. Ponadto, wszystkie sygnały sprawdzono, czy pokrywają się z miejscem startu transkrypcji (TSS). Wstępna analiza statystyczna wykazała, że w grupie NPT zaobserwowano znacznie więcej sygnałów zmapowanych do regionów 5'UTR niż u świń WPT (Figura 4.), podobnie dla sygnałów ATAC związanych z intronem i regionem międzygenowym. Ponadto, sprawdziliśmy długość sygnału i liczbę genów, które nakładały się na TSS, i nie wykryto żadnych znaczących różnic między grupami.

Figura 1. Testy kontroli jakości. A. Wizualizacja mikroskopowa testu żywotności przeprowadzonego przez barwienie jąder błękitem 0,4% trypanu blue (Sigma Aldrich). Strzałki pokazują komórki z niebieskimi jądrami. B. Wykresy TapeStation po elektroforezie przedstawiające długość bibliotek ATAC i DNA. C. Wykresy TapeStation po elektroforezie przedstawiające biblioteki ATAC po frakcjonowaniu. Frakcja odpowiadająca regionom wolnym od nukleosomów (NFR) (rozmiar biblioteki 175–250 bp, wstawka >150 bp), a B zawiera fragmenty mono-, di i tri-nukleosomy (wielkość biblioteki 250–625 bp, insert ~ 200, 400, 500 bp). D. Długość wstawki wykryta po przetworzeniu danych ATAC seq dla frakcji A i B. E. Test PCR na wzbogacenie regionu promotora w bibliotekach ATAC na podstawie genu GAPDH i braku amplikony dla pustynnego regionu DNA.

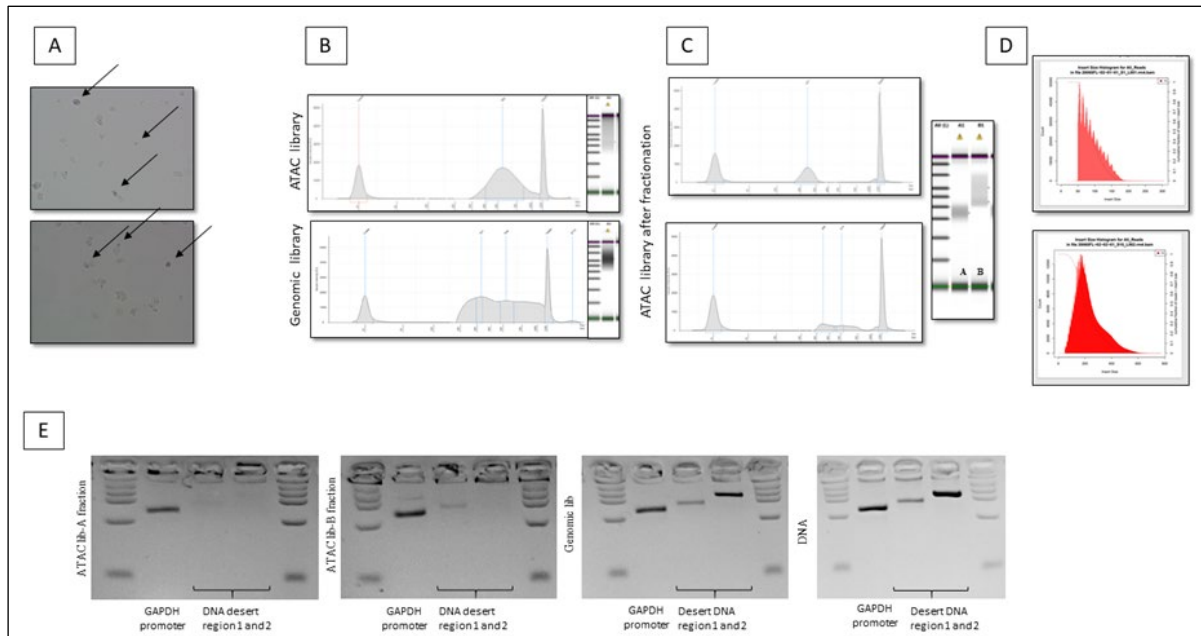
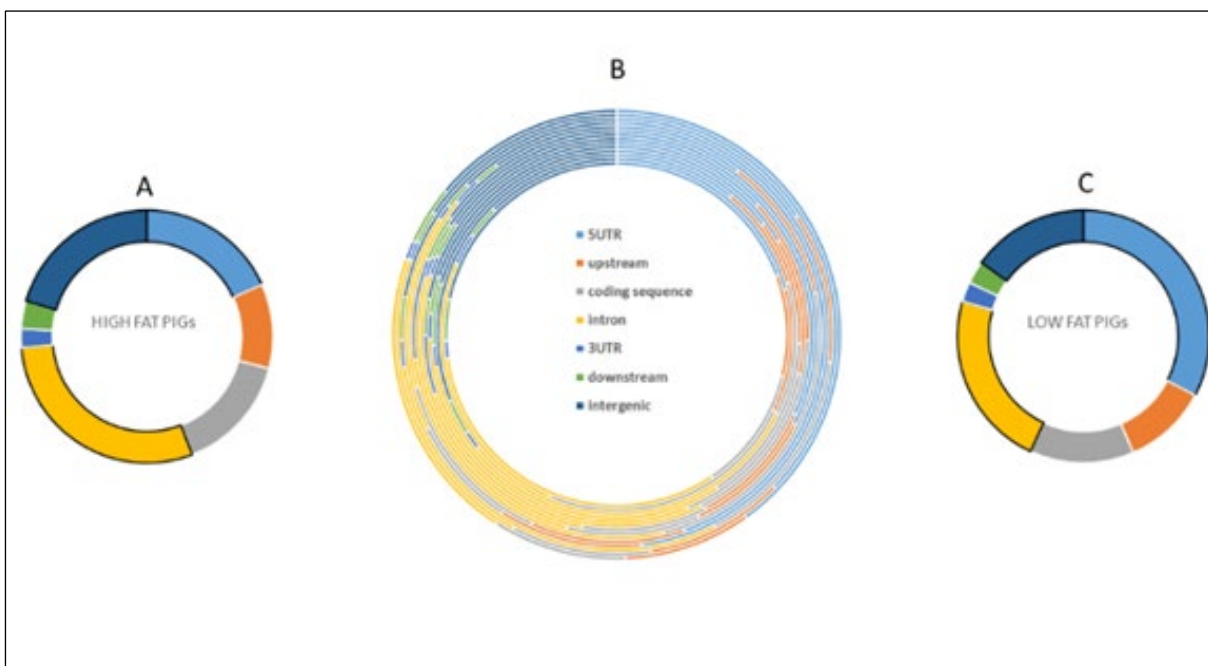
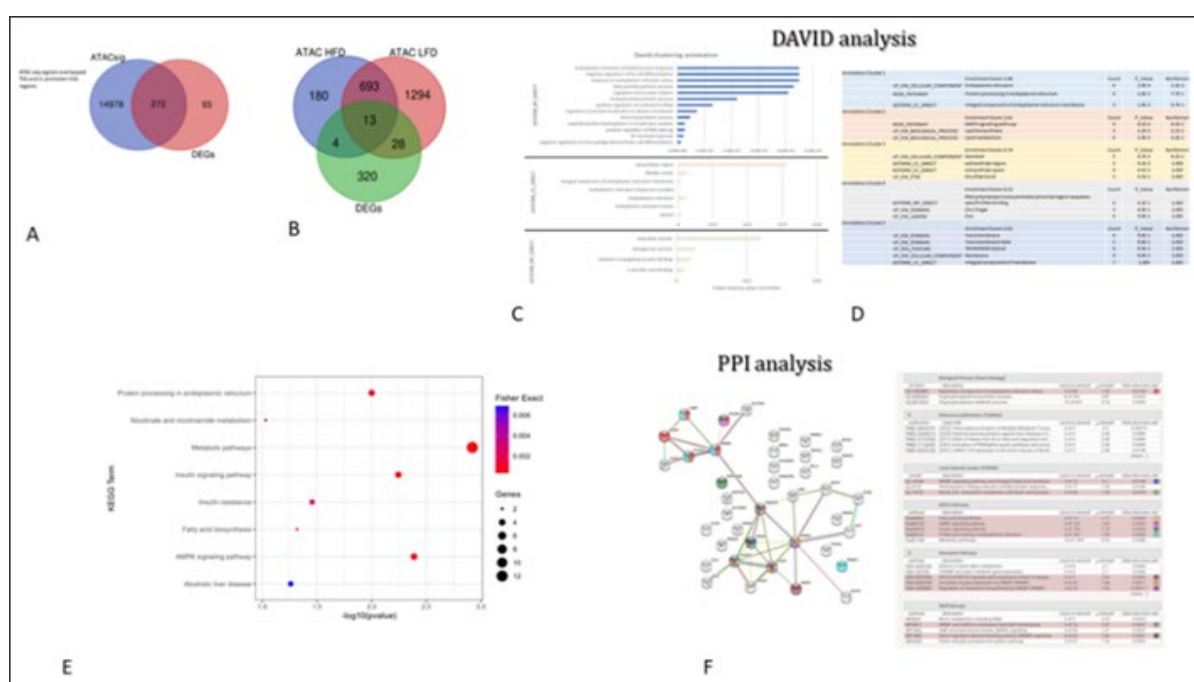


Figura 2. Mapowanie sygnałów ATAC do genomu świni Sscrofa11.1.100. A. Średni procent sygnałów ATAC zmapowanych do poszczególnych regionów genomu świni w grupie WPT. B. Procent sygnałów ATAC zmapowanych do poszczególnych regionów genomu świni dla każdej próbki. C. Średni procent sygnałów ATAC zmapowanych do poszczególnych regionów genomu dla świń NPT. Czarnymi ramkami zaznaczono średnie procentowe, które były istotne według testu ANOVA pomiędzy analizowanymi grupami.



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). Analiza, w tym wszystkie piki ATAC, związane z regionami promotora TSS i <1 kb, pokrywała się z 272 DEG (Rycina 3. A).

Figura 3. Analiza sygnałów zidentyfikowanych na podstawie danych ATAC-seq i nakładających się z genami o różnicowej ekspresji (DEG) w zależności od stopnia otyłszczenia. A. Venn diagram, sygnały ATAC pochodzące z TSS i <1kb promotora ATAC nakładały się DEG. B. Diagram Venn dla wspólnych dla poszczególnych badanych grup świń sygnałów TSS i <1 kb promotora ATAC pokrywały się DEG. C. Analiza ontologii GO przeprowadzona w DAVID: funkcjonalne narzędzie do adnotacji. D. Analiza skupień przeprowadzona w DAVID: narzędzie do adnotacji funkcjonalnych dla zidentyfikowanych 45 ATAC-DEG E. Wzbogacone ścieżki KEGG wygenerowane w DAVID: narzędzie do adnotacji funkcjonalnych dla 45 ATAC-DEG F. Analiza PPI przedstawiona przez STRING: funkcjonalne sieci asocjacji białek dla 45 ATAC-DEG DEG. FD – odkładanie się tłuszczu, DEG – geny o zróżnicowanej ekspresji.

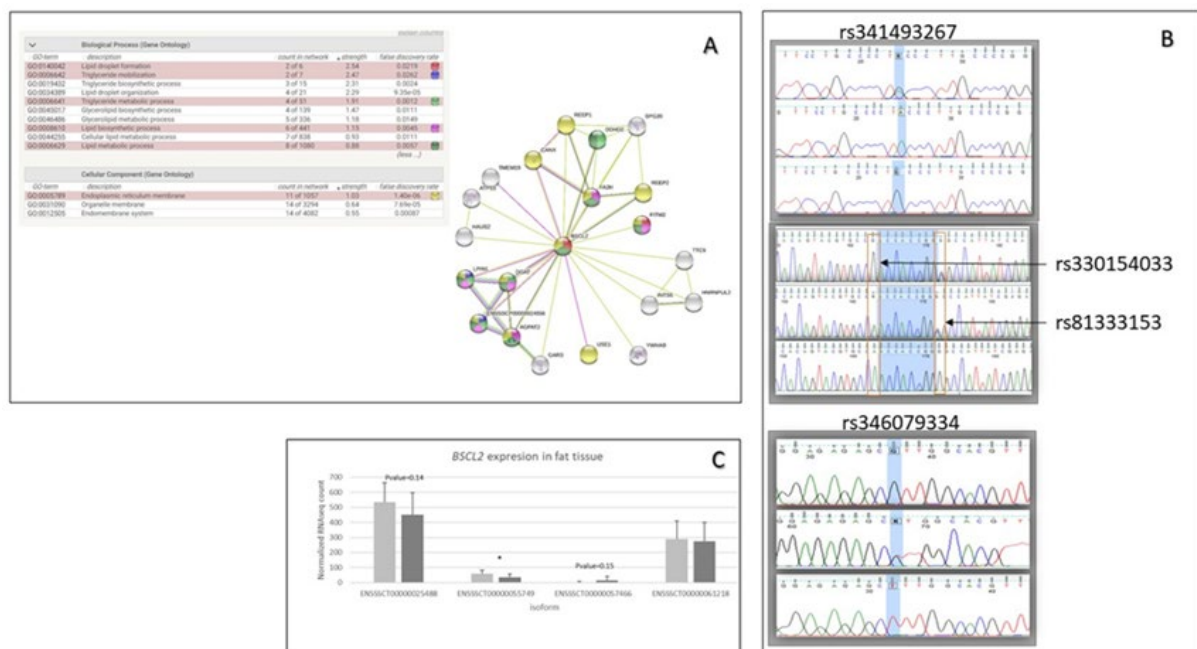


Niemniej jednak, wspólnych sygnałów ATAC, które były obecne we wszystkich próbkach (w grupie WPT lub NPT), było znacznie mniej. Naszym zdaniem wskazanie wspólnych pików ATAC zawęża obszar badań do najważniejszej regulacji ekspresji genów. Z drugiej strony, niektóre sygnały ATAC były zlokalizowane w regionach zachodzących na regiony TSS i promotora <1 kb (Rycina 3. B), więc piki TSS i promotora <1 kb zostały 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 piki ATAC wyłoniły 45 genów (Rycina 3. B). Analiza z wykorzystaniem narzędzia Davida GO wykazała, że geny te wzbogaciły procesy związane z destynacją komórek tłuszczowych, stresem oksydacyjnym zachodzącym w siateczce śródplazmatycznej (ER) oraz wpływem cholesterolu (Rycina 3. C). Analiza klastrowania wskazała pięć klastrow, m.in. związane z ER i biosyntezą lipidów (Rycina 3. D). Analiza PPI (STRING) potwierdziła tę obserwację (Rycina 3. E).

Analiza wywołania wariantów na danych RNA-seq uzyskanych po sekwencjonowaniu całego transkryptomu tkanki tłuszczowej i wytypowanie potencjalnego markera selekcyjnego.

W teście chi2 najlepsze wyniki (najniższe p-Value) uzyskał wariant genu BSCL2, który zmienia sens aminokwasowy dla białka bscl2, dlatego też kilka mutacji związanych właśnie z genem BSCL2 poddano dalszej analizie (Rycina 4. B) asocjacyjnej. Analiza PPI wykazała kluczowe zaangażowanie genu BSCL2 w procesy regulacyjne silnie związane z tworzeniem kropelek lipidów (Rycina 4. A). Porównanie poziomu ekspresji izoform genu BSCL2 w zależności od stopnia odfuszczenia w tuszy wieprzowej wykazało znaczące różnice i trendy (Rycina 4. C). Może to być konsekwencją tego, że prawdopodobnie izoformy te pełnią różne role molekularne. Badania asocjacyjne mutacji w genie *BSCL2* z cechami użytkowymi świń także wykazało wiele zależności.

Figura 4. Informacje o genie BSCL2. A. Analiza PPI dla genu BSCL2 przy użyciu narzędzia STRING B. Chromatogramy przedstawiają wyniki sekwencjonowania Sangera dla 3 mutacji zmiany sensu (rs341493267, rs330154033, rs81333153) i jednego wariantu zlokalizowanego poniżej genu BSCL2 (rs346079334). Chromatogramy wizualizowano za pomocą narzędzia FinchTV vs 1.4.0 (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). C. Ekspresja izoform genu BSCL2 zależna od odkładania się tkanki tłuszczowej. Jasnoszary grupa NTP, ciemnoszary grupa WTP.



Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu:

Przeprowadzono częściową analizę bioinformatyczną wyników ATAC-seq i przygotowano tabele i figury do publikacji. Ponadto, na bazie wyników RNA-seq w tkance tłuszczowej przeprowadzono analizę wywołania wariantów, wytypowano potencjalne markery selekcyjne w genie *BSCL2* i przeprowadzono badania asocjacyjne dla mutacji *BSCL2*, uwzględniając rasę polska biała zwiśtoucha, wielka biała polska i złotnicka biała. W 2023 roku dokończona zostanie ocena bioinformatyczna wyników ATAC-seq.

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. Ze względu na tematykę, badania podzielono na dwie części.

W pierwszej części skupiono się na ocenie wpływu poziomu żywienia preparatem mleko-zastępczym, 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. Pomiar anatomiczny potwierdził, że u cieliczek żywionych do woli wystąpił wzrost masy całego gruczołu mlekowego, tkanki mięsowej i żłobowej w porównaniu do tych cech określonych u cieliczek żywionych restrykcyjnie. Na tej podstawie stwierdzono, że mechanizm regulacji rozwoju gruczołu mlekowego jest modulowany poziomem żywienia. Dlatego też, w proponowanych badaniach przyjęto 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. Pomimo 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. Witamina D, jako środek stosunkowo niedrogi i łatwo dostępny, może zapobiegać infekcjom górnych dróg oddechowych wywołanym przez patogeny oraz zanieczyszczeniu powietrza. 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 badaniu tym określamy wpływ zwiększania standardowej dawki cholekalcyferolu, zastosowania zwiększonej dawki kombinacji cholekalcyferol + kalcydiol, a także całkowite zastąpienie cholekalcyferolu kalcydiolem w diecie świń.

Założenia metodyczne:

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, zgromadzony przez prof. dr hab. Barbarę Niwińską. Stanowiły go tkanki pobrane od 16 zwierząt – cieliczki rasy polska holsztyńsko-fryzyjska w okresie wychowu w pierwszych dwóch miesiącach życia. Zwierzęta podzielono na trzy grupy żywieniowe: I grupa kontrolna (n=4) – żywienie standardowe, oszacowane na podstawie Zapotrzebowania Żywieniowego Bydła Mlecznego (NZP, 2001); grupa R

(n=6) – ograniczenie dziennej dawki preparatu mlekozastępczego (MR); grupa AL (n=6) – podawanie MR *ad libitum* 3 razy dziennie przez 30 minut. Analizie molekularnej poddano trzy tkanki: parenchymę (PAR), wyściółkę tłuszczową (MFP) oraz wątrobę (W).

W drugiej części badań wykorzystano materiał doświadczalny zgromadzony przez prof. dr hab. Małgorzatę Świątkiewicz. Stanowiły go tkanki płuc pobrane od 39 świń suplementowanych różnymi dawkami i formami witaminy D₃.

Dawkowanie witaminy D przebiegało następująco:

1. grupa (grupa kontrolna) – 2000 IU cholekalcyferolu (grower) i 1500 IU cholekalcyferolu/kg paszy (finiszer);
2. grupa – 3000 IU cholekalcyferolu (grower) i 2500 IU cholekalcyferolu/kg paszy (finiszer);
3. grupa – 2000 IU cholekalcyferolu + 1000 IU kalcydiolu (grower) i 1500 IU cholekalcyferolu+ 1000 IU kalcydiolu/kg paszy (finiszer);
4. grupa – 2000 IU kalcydiolu (grower) i 1500 IU kalcydiolu/kg paszy (finiszer).

W badaniu miRNA wykorzystano wszystkie 39 próbek. Z kolei w badaniach mRNA oraz poziomu metylacji użyto po 5 próbek z grupy 1. oraz 2.

Syntetyczny opis wyników zadania:

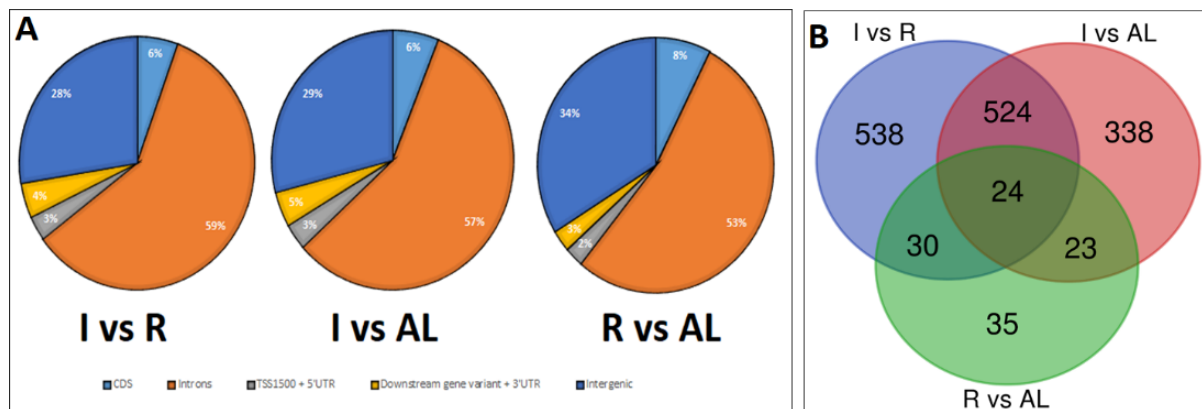
W bieżącym roku, w pierwszej części badań, przeprowadzono wstępną analizę wyników sekwencjonowania transkryptomu i metylomu oraz bibliotek miRNA. Sekwencjonowanie bibliotek RRBS wygenerowało średnio 28,7 milionów odczytów na próbkę. Odsetek odczytów zmapowanych do genomu odniesienia wahał się od 93.3% do 96.1% na próbkę, z czego 37.0% do 49.0% stanowiły sekwencje unikalne. Łącznie zidentyfikowano od 6 098 do 269 różnicowych miejsc metylacyjnych (DMS) w kontekście CpG między poszczególnymi grupami żywieniowymi (Tabela 1.). Adnotacja do funkcjonalnych cech genu ujawniła, że większość DMS znajdowała się w regionach międzygenowych, a następnie intronach genów i sekwencjach kodujących genu.

Tabela 1. Liczba zidentyfikowanych DMS w kontekście CpG między badanymi grupami.

	I vs R	I vs AL	R vs AL
Parenchyma	6 098	2 563	269
Wyściółka Tłuszczowa	507	615	289
Wątroba	609	733	322

Największą liczbę różnic w poziomie metylacji między badanymi grupami stwierdzono w obrębie tkanki parenchymy. Analiza wyników dla tej tkanki wykazała łącznie 25 genów (z DMS w ciałach genów i regionach powyżej TSS1500) wspólnych dla wszystkich porównań, a także 538, 338 i 35 unikalnych genów dla I vs R, I vs AL i R vs AL, odpowiednio (Rysunek 1.).

Rysunek 1. Przykładowy odsetek zidentyfikowanych DMS w różnych regionach genomu na podstawie danych uzyskanych dla tkanki parenchymy (A). Diagram Venna do porównania genów z DMS w parenchymie, które są unikalne lub wspólne dla porównywanych grup.



W celu identyfikacji zmian w transkryptomie zastosowano technikę RNA-seq. Średnia liczba odczytów na próbkę wynosiła 5,2 milionów. Odsetek odczytów dopasowanych do genomu referencyjnego wahał się od 77.2% do 84.4% na próbkę. Geny z $p < 0.1$ (Benjaminiego Hochberga) uznano za geny różnicowe (DEG) i uwzględniono w dalszej analizie. Łącznie zidentyfikowano od 8 817 do 73 DEG. Niezależnie od typu tkanki, we wszystkich grupach większy odsetek stanowiły DEG charakteryzujące się podwyższoną ekspresją, wyjątek stanowiło porównanie RvsAL w parenchymie, gdzie przeważały geny down regulowane (Tabela 2.).

Tabela 2. Liczba zidentyfikowanych DEGs między badanymi grupami.

	I vs R		I vs AL		R vs AL	
	up	down	up	down	up	down
Parenchyma	4121	3611	4498	4319	22	51
Wyściółka tłuszczowa	419	209	2039	1537	1668	1329
Wątroba	471	305	275	107	180	379

Następnie, z użyciem oprogramowania MethGET, porównano zmiany w ekspresji genów i zmiany metylacji DNA w regionie promotora, ciała genu, intronów i eksonów, odpowiednio między grupami I, AL i R – z uwzględnieniem podziału na tkanki. Korelacja między zmianami poziomu metylacji a zmianami ekspresji genów była istotna, ale słaba. Przykłady omawianej korelacji dla parenchymy i porównania I vs R wynosiła: w promotorze ($R = -0.107$, $P = 1.44e-41$), ciele genu ($R = -0.070$, $P = 4.94e-23$), intronach ($R = -0.054$, $P = 5.83e-13$) i dla egzonów ($R = -0.002$, $P = 8.18e-01$). Łącznie wytypowano od 128. do 455. genów charakteryzujących się korelacją pomiędzy zmianami w ekspresji i w metylacji DNA (Tabela 3.).

Tabela 3. Liczba zidentyfikowanych genów charakteryzujących się korelacją pomiędzy zmianami w ekspresji i w metylacji DNA.

	I vs R				I vs AL				R vs AL			
	Promotor	Ciało genu	Intron	Egzon	Promotor	Ciało genu	Intron	Egzon	Promotor	Ciało genu	Intron	Egzon
Parenchyma	295	285	245	244	250	264	241	226	362	378	311	335
Wyściółka tłuszczowa	378	399	335	348	369	381	311	335	143	143	128	128
Wątroba	170	172	154	167	369	433	356	375	399	455	391	386

W ramach realizowanych badań przeprowadzono również analizę wyników sekwencjonowania bibliotek miRNA. Średnia liczba odczytów wynosiła 9,5 miliona na próbkę. miRNA, charakteryzujące się różnicami w ekspresji między poszczególnymi grupami z $p < 0.1$, uznano za miRNA różnicowe i uwzględniono w dalszej analizie. Łącznie zidentyfikowano od 187 do 2 różnicowych miRNA. W przypadku tkanki parenchymy i wątroby większość zidentyfikowanych miRNA odznaczało się obniżoną ekspresją, w przeciwieństwie do wyściółki tłuszczowej, gdzie większy odsetek stanowiły up-regulowane miRNA (Tabela 4.).

Tabela 4. Liczba zidentyfikowanych miRNA między badanymi grupami.

	I vs R		I vs AL		R vs AL	
	up	down	up	down	up	down
Parenchyma	87	100	27	36	0	2
Wyściółka tłuszczowa	14	4	30	15	15	14
Wątroba	27	36	7	21	3	1

W zakresie drugiej części badań, wykonano analizę wpływu zmian w suplementacji witaminy D na profile miRNA. W przypadku tego sekwencjonowania średnia liczba zmapowanych odczytów wyniosła 345 116,7 na próbkę. Do analizy bioinformatycznej wykorzystano 38 z 39 próbek. Jedna z próbek została odrzucona ze względu na zbyt niską liczbę odczytów (8569 odczytów).

Uzyskane wyniki wskazują, że zwiększenie dawki cholekalcyferolu w diecie świń w stosunku do dawki standardowej (2vs1) powoduje istotną zmianę ekspresji 5 miRNA. Spośród zmienionych, 3 miRNA uległy silnej downregulacji ($\log_2FC < -23$), natomiast 2 pozostałe upregulacji ($\log_2FC$ 2,295 i 19,545). Z kolei zastosowanie zwiększonej dawki kombinacji cholekalcyferol+kalcydiol (3vs1) spowodowało istotną zmianę ekspresji 14 miRNA. W tym przypadku, 6 miRNA uległo upregulacji (dla 2 miRNA wartość $\log_2FC > 22$, dla pozostałych $< 1,7$), a 8 downregulacji (dla 4 wartość $\log_2FC < -23$, dla pozostałych $> -2,6$). Ponadto, porównanie grupy otrzymującej zwiększoną dawkę cholekalcyferolu z grupą otrzymującą zwiększoną dawkę cholekalcyferolu+kalcydiol (3vs2) wykazało zmianę ekspresji 12 miRNA. Wśród nich 9 uległo upregulacji, a 3 downregulacji. Ostatnia ze zmian w suplementacji czyli całkowite zastąpienie standardowej dawki cholekalcyferolu kalcydiolem (4vs1) spowodowało zmianę ekspresji jedynie 5 miRNA. W tej grupie, 3 miRNA uległo downregulacji ($\log_2FC < -23$), natomiast pozostałe 2 upregulacji ($\log_2FC > 22$).

Dalsza analiza wykazała pewne analogie w uzyskanych wynikach. Po pierwsze, 4 (miR-708-5p, miR-708-3p, miR-223, miR-30e-3p) z 5 miRNA, zmienionych pod wpływem zwiększenia dawki cholekalcyferolu (2vs1), uległo również zmianie pod wpływem kombinacji cholekalcyferol + kalcyferol (3vs1), jak również pod wpływem zastąpienia cholekalcyferolu kalcydiolem (4vs1). Co ciekawe, każde z wymienionych wyżej miRNA charakteryzowało się bardzo dużym $\log_2FC$ (> 20 lub < -20). Po drugie, zauważono, że istnieje pula miRNA wspólna dla porównań z grupą przyjmującą kombinację cholekalcyferol + kalcydiol (grupa 3). Co więcej, zestawienie wyników porównań grupy 3 z grupami przyjmującymi sam cholekalcyferol (3vs1 i 3vs2) wykazało 5 wspólnych miRNA. W przypadku 3 z tych miRNA (miR-194-5p, miR-574-3p, hsa-miR-95-3p) zmiana nasila się wraz ze wzrostem dawki cholekalcyferolu.

Tabela 5. Istotnie zmienione miRNA wspólne dla porównań z grupą przyjmującą cholekalcyferol+kalcydiol.

	3 vs 1	3 vs 2	4 vs 3		3 vs 1	3 vs 2	4 vs 3
miRNA	log2FC	log2FC	log2FC	miRNA	log2FC	log2FC	log2FC
hsa-miR-194-5p	-24,520	-26,202		hsa-miR-885-5p		2,348	-1,961
hsa-miR-193a-5p	1,263	1,157	-1,346	hsa-miR-381-3p	-2,582		2,482
hsa-miR-574-3p	1,678	2,060	-1,522	hsa-miR-101-3p	-1,228		1,504
hsa-miR-145-5p	1,118	1,327		hsa-miR-96-5p	-1,647		1,349
hsa-miR-95-3p	23,168	33,042					

W zakresie realizacji drugiej części badań, wykonano również sekwencjonowanie mRNA oraz RRBS. W obu przypadkach sekwencjonowanie przebiegło prawidłowo. W przypadku bibliotek mRNA średnia liczba odczytów na próbkę wyniosła 13.5 miliona. Wstępna różnicowa analiza ekspresji mRNA wykazała, że istotnej zmianie uległo 205 genów (padj<0.05). W puli tej, 186 genów uległo downregulacji a pozostałe 19 upregulacji.

Z kolei analiza poziomu metylacji umożliwiła identyfikację 2349 DMS. Adnotacja do funkcjonalnych cech genu ujawniła, że większość ze zidentyfikowanych DMS znajdowała się w intronach genów, a następnie w regionach międzygenowych i sekwencjach kodujących genu.

Podsumowanie:

Dane te potwierdzają hipotezę, że poziom odżywienia we wczesnym okresie życia oraz odpowiednia suplementacja witaminą D, jest ważna w określaniu profili transkrypcyjnych oraz że różnice te są ustalane i utrzymywane, przynajmniej częściowo, przez metylację DNA i ekspresję cząsteczek miRNA.

Zadanie 01-18-07-11

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

kierownik zadania: dr Agata Piestrzyńska-Kajtoch

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

Celem głównym zadania jest opracowanie, walidacja i wdrożenie nowych metod laboratoryjnych z zakresu biologii molekularnej, które umożliwią także badania populacyjne polskich populacji zwierząt oraz poszerzą ofertę Instytutu Zootechniki PIB dla hodowców zwierząt, inspektoratów i lekarzy weterynarii, producentów pasz i żywności oraz przemysłu. W ramach zadania planowane jest opracowanie kilku metod, tj.: rozróżnianie gatunkowe mięsa i jego produktów pochodzących od dzika (*Sus scrofa*), świni domowej (*Sus scrofa domestica*), wykrywanie krętków *Borrelia* sp. u zwierząt gospodarskich i towarzyszących, identyfikacja mieszańców lama x alpaka, identyfikacja genetyczna markerów powiązanych z płcią koniowatych, identyfikacja markerów umaszczenia podstawowego i wariantów umaszczenia koniowatych i innych gatunków zwierząt, identyfikacja markerów chorób spichrzeniowych koniowatych, genotypowanie/analiza polimorfizmu genu *PRNP* jeleniowatych oraz metody analizy kariotypu komórek adherentnych. Efektem zadania będą nowe metody laboratoryjne w ofercie Instytutu Zootechniki PIB oraz praca doktorska.

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

Przeprowadzono analizy populacyjne różnych ras świń i dzików z zastosowaniem genotypowania real-time PCR na płytках OpenArray (60 markerów SNP). Analizie dotychczas poddano 480 różnych próbek, w tym 243 dziki, 147 świń rasy pbz, 49 świń rasy duroc, 17 świń rasy wbp, 6 świń rasy puławskiej, 5 świń rasy pietrain, 3 świnie rasy złotnicka pstra oraz 10 próbek NTC (kontrola negatywna). Analiza danych wykazała, że część wybranych markerów SNP była monomorficzna w całej badanej grupie zwierząt. Dla kilku markerów nie zaszła amplifikacja. Wykluczono je z analiz. Wytypowano markery kandydujące do panelu różnicującego te gatunki, m.in.: SNPy w genach ACER1, NR6A1, SAFB2, OPRK1, lcnRNA, SEMA3D, PAPPA2 i GHRL. Badania są kontynuowane.

Kleszcze i pasożyty zewnętrzne zebrane ze skór zwierząt pozyskano od koni, psów oraz kotów. Materiał opisano i skatalogowano, wyizolowano DNA z kleszczy. Dalej nie udało się pozyskać kleszczy od owiec i bydła. Przeanalizowano dostępne na rynku testy celem wyboru odczynników o lepszych parametrach niż testowane uprzednio. Rozpoczęto testowanie kolejnego komercyjnego zestawu odczynników do wykrywania borelioz.

Wytypowane fragmenty genomu konia poddane zostały testom molekularnym w kierunku badania płci. Przeprowadzono analizy bioinformatyczne fragmentów genu SRY oraz Amel. Zaprojektowano sondy TaqMan do identyfikacji płci. Rozpoczęto testowanie i walidację nowych metod analizy.

W zakresie badania umaszczenia podstawowego koni przeprowadzono testy dla fragmentów genów: MC1R, ASIP, PMEL17, MATP, KIT; sekwencje zanalizowano są za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Rozpoczęto analizę bioinformatyczną dla umaszczeń rekomendowanych przez ISAG, m.in. *tobiano* czy *leopard complex*.

Wyizolowano i przygotowano DNA od większej grupy owiec różnych ras (ok. 500). Na podstawie przeprowadzonego wcześniej sekwencjonowania zaprojektowano sondy TaqMan do analizy genu MC1R, do badań przesiewowych (Rycina 1.). Badania populacyjne z wykorzystaniem tych sond są w trakcie realizacji. Rozpoczęto analizy genów ASIP i TYRP owiec z wykorzystaniem sond TaqMan MGB i analizy sekwencjonowania. Zaprojektowano i rozpoczęto stosowanie metodyki do testowania mutacji typu indel oraz tandem duplication genu ASIP.

Wykonano badania przesiewowe prób koni gorącokrwistych, aby dokonać identyfikacji nosicielstwa zespołu abiotrofii mózdzku. Nie znaleziono jednak mutacji w genie TOE1. Przeprowadzono badania przesiewowe celem identyfikacji mutacji w genach GYS1 oraz RYR1; częstość rzadszego *allelu* była niska, poniżej 1% (0,07% oraz 0,02% odpowiednio). W zakresie rekomendowanych przez ISAG testów diagnostycznych w kierunku chorób genetycznych koni, przeprowadzono badania przesiewowe z użyciem zaprojektowanych starterów. Wyniki analiz podlegają analizom bioinformatycznym i weryfikacji z danymi rodowodowymi.

Pozyskano materiał od łosi pochodzących z różnych części Polski dzięki współpracy z PIW-eł PIB Puławy. Zsekwencjonowano fragment genu PRNP łosi i przeprowadzono analizę wyników dla wszystkich pozyskanych próbek. Uzyskano wiarygodne wyniki sekwencjonowania dla 81 próbek. 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. Znalezione siedemnaście różnych miejsc polimorficznych, jednak większość mutacji występowała u pojedynczych osobników. Największą zmienności zaobserwowano w kodonach 136 i 226. Najczęstszymi polimorfizmami były 676G>C (częstość *allelu* C ok. 42%), 408C>T (częstość *allelu* T ok. 41%) oraz 292A>G (częstość *allelu* G ok. 14,5%). Częstość pozostałych polimorfizmów była poniżej 5%. Zaobserwowano m.in. haplotypy TPE (54,8% osobników), TPQ (27,3%) oraz APQ (12,9%) (Wykres 1.). Próbkę są nadal analizowane.

Metody badawcze wykorzystywane do synchronizacji cyklu komórkowego pod względem wskaźnika mitotycznego oparto na wykorzystaniu chemicznych inhibitorów cyklu komórkowego (Rycina 2.). Tymidyna, inhibitor syntezy DNA, została zastosowana w pojedynczych lub podwójnych blokach celem zsynchronizowania adherentnych komórek – ludzkich komórek nowotworowych HTB-35 w fazie G₁/S, stanowiących dogodny materiał do analiz ze względu na łatwość prowadzenia hodowli komórkowych. Następnie, w celu zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₂/M, zastosowano RO3306 (inhibitor CDK1) oraz Nocodazol (inhibitor tworzenia się mikrotubul wrzeciona podziałowego) po pojedynczym lub podwójnym bloku tymidynowym. 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.

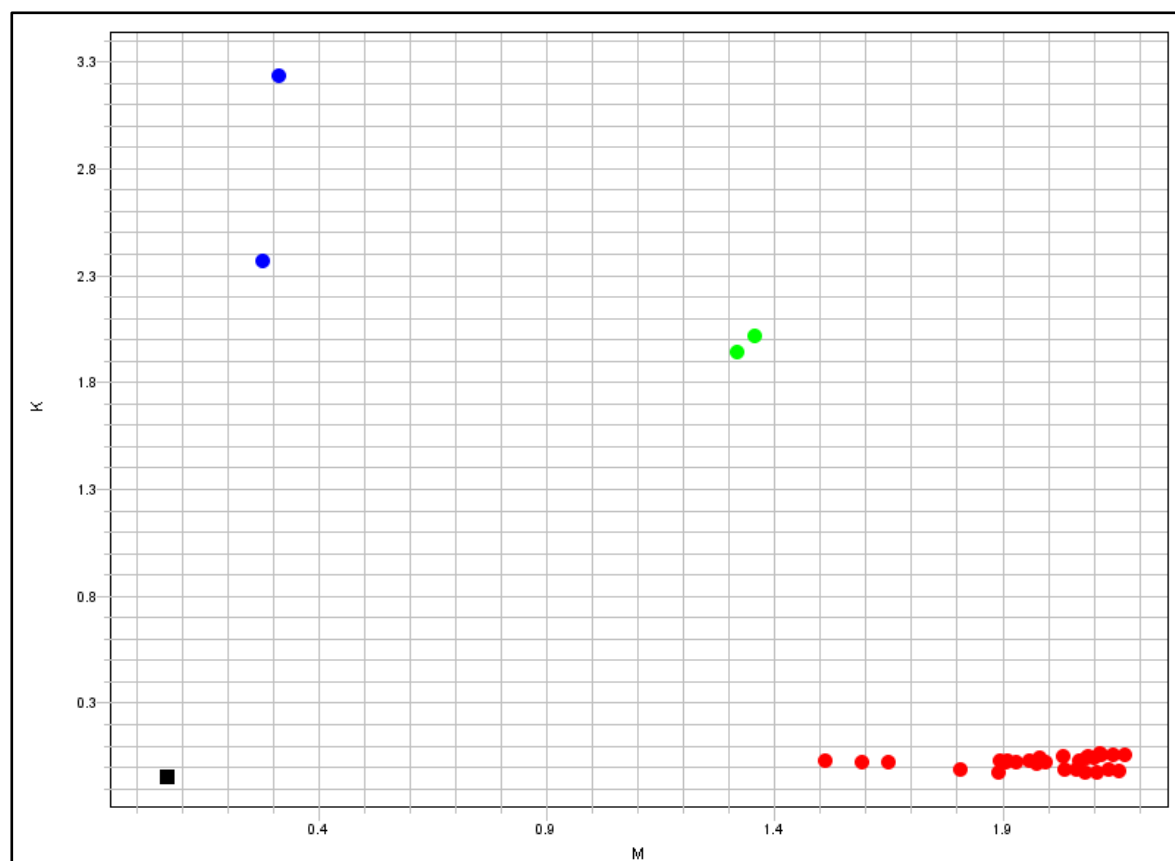
Aby określić optymalną koncentrację tymidyny, celem przeprowadzenia wydajnej synchronizacji, a tym samym otrzymania wysokiego wskaźnika mitotycznego, testowano cztery koncentracje tymidyny: 1mM, 2 mM, 2,5 mM i 5 mM w układzie podwójnego bloku tymidynowego i bloku Nocodazolem. Przeprowadzona analiza optymalizacji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

Zsekwencjonowano region d-loop 235 osobników obu płci (alpak i lam) i gen DBY – 90 osobnikom płci wyłącznie męskiej. Na podstawie wykonanych analiz molekularnych regionu d-loop i genu DBY, oszacowano różnorodność genetyczną alpak i lam hodowanych w Polsce (Tabela 1.).

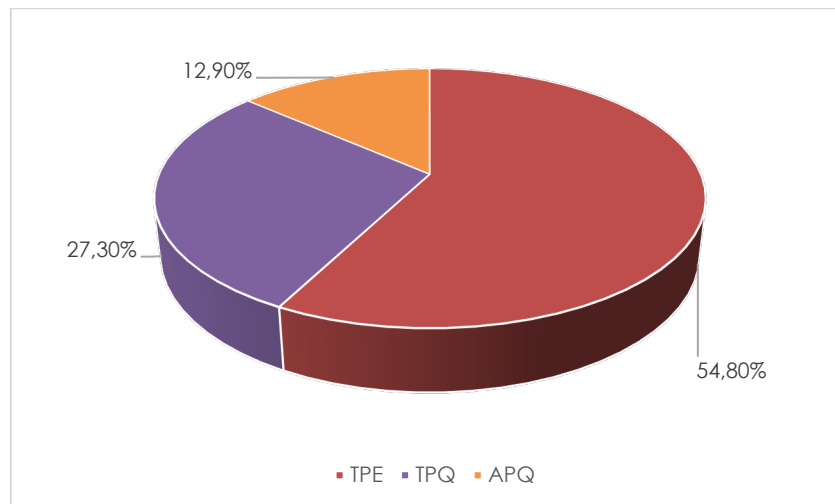
Badania w ramach wszystkich celów szczegółowych są kontynuowane.

Tabela 1. Różnorodność genetyczna alpak i lam hodowanych w Polsce.

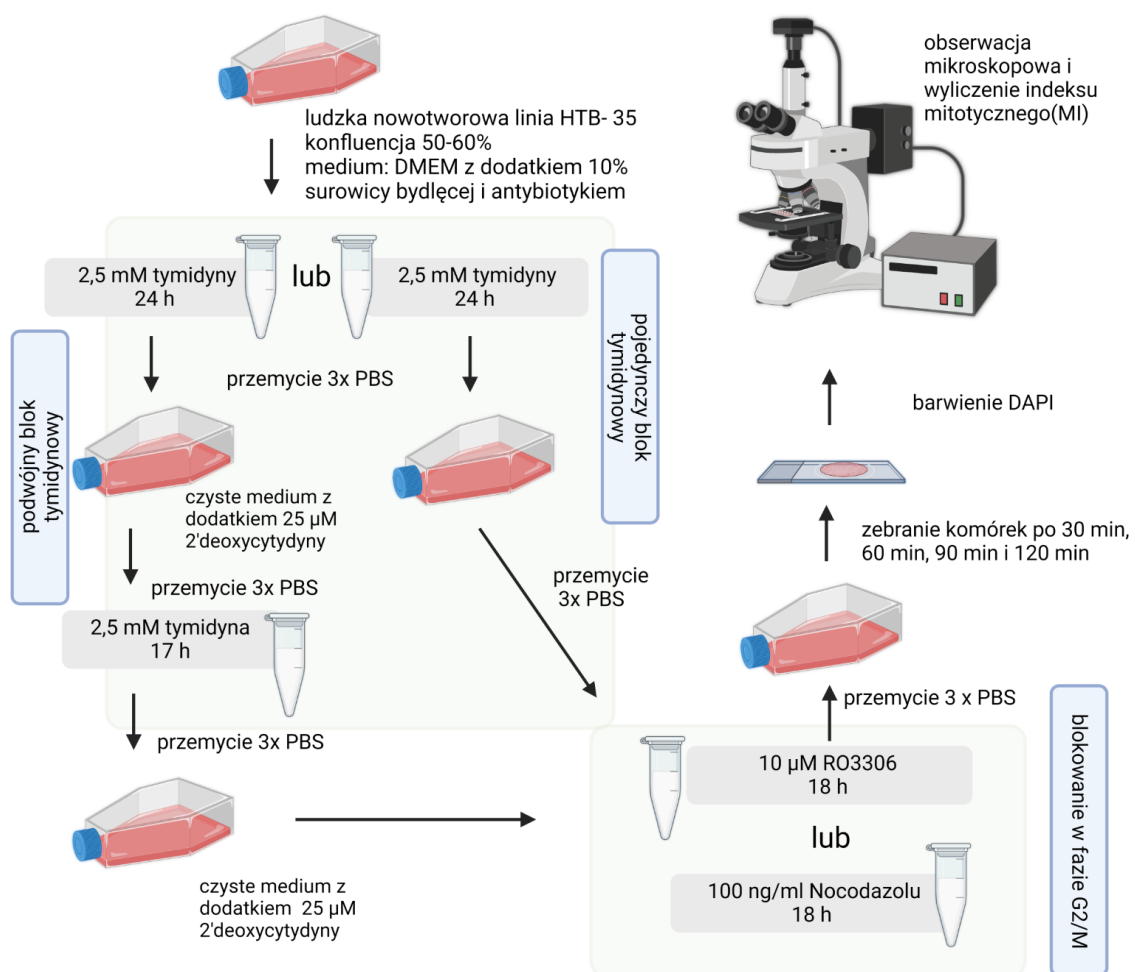
Region	Osobniki	Liczba prób [n]	Liczba haplotypów [H]	Miejsca segregacji [S]	Różnorodność haplotypów [Hd]	Różnorodność nukleotydów [π]	Średnia liczba różnic nukleotydów [K]
D-loop (mtDNA)	Alpaki	216	28	446	0.919	0.116	77.346
	Lamy	18	9	25	0.882	0.009	5.987
	Razem	234	34	446	0.925	0.110	72.926
DBY (Y chromosome)	Alpaki	79	1	0	0.000	0.000	0.000
	Lamy	11	1	0	0.000	0.000	0.000
	Razem	90	2	4	0.217	0.002	0.868

Rycina 1. Polimorfizmu genu MC1R (M73K) u owiec metodą dyskryminacji *alleli*; niebieskie kropki – homozygoty KK; zielone kropki – heterozygoty MK; czerwone kropki – homozygoty MM.

Wykres 1. Częstość haplotypów *PRNP* u jelenia szlachetnego.



Rycina 2. Metodyka synchronizacji cyklu komórkowego komórek adherentnych.



Zadanie 01-18-08-11

Wykorzystanie genetyki molekularnej jako nowoczesnego narzędzia w hodowli koni.

kierownik zadania: dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ PIB

Wykorzystywanie markerów genetycznych do oceny wartości genetycznej pod względem cech użytkowych oraz wprowadzenie i optymalizacja selekcji wspomaganej markerami genetycznymi u koni.

Założenia metodyczne:

Planuje się zbadanie podłoża genetycznego wybranych jednostek chorobowych oraz markerów genetycznych, związanych z osiągnięciem wybitnych wyników w sporcie u koni różnych ras i koniowatych. Na podstawie dokumentacji hodowlanej i danych weterynaryjnych zostaną wytypowane osobniki chore i potencjalni nosiciele, dla których przy użyciu dedykowanych metod genetycznych (PCR-RFLP, sekwencjonowanie Sangera, mikromacierze SNP, RNA-seq) zostaną wytypowane markery genetyczne potencjalnie związane z ryzykiem występowania danej choroby. Następnie, frekwencja występowania wykrytych *alleli* zostanie zbadana na większej populacji, a przeprowadzona asocjacja statystyczna pozwoli wytypować markery przyczynowe, sprzężone z analizowanymi cechami/obawami chorobowymi. 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 uzyskane wyniki pozwolą na zaproponowanie panelu mutacji umożliwiających celowaną selekcję w kierunku poprawy określonej grupy cech wytrzymałościowych.

Syntetyczne omówienie wyników zadania:

Zebrano, opisano i przyjęto do bazy 227 próbek materiału biologicznego (przystanych przez hodowców), które reprezentowały następujące rasy koni: konie małopolskie, ślązaki, kuce, kłusaki, konie arabskie, selle francais, hanover, konie zimnokrwiste. Łączna ilość próbek zgromadzonych w bazie wyniosła 1243 sztuki. Ze zgromadzonego materiału wyizolowano DNA i dla wybranych ras wykonano badanie genotypowania pod kątem występowania wariantów genetycznych dla chorób dziedzicznych – abiotrofii mózdzku (CA), SCID, WFFS, PSSM1 oraz markeru typu chodu – DMRT3.

Dodatkowo opracowano i zwalidowano metodę detekcji dla:

- dziedzicznej miejscowej astenii skóry koni (HERDA),
- genetycznej junctional epidermolysis bullosa typu 1 i 2 (JEB1 oraz JEB2).

W ramach prowadzonych badań dotyczących analizy predyspozycji rajdowych zebrano materiał od 10 koni arabskich uczestniczących w biegach długodystansowych (materiał pobrano przed i po 120 km rajdzie; n=20).

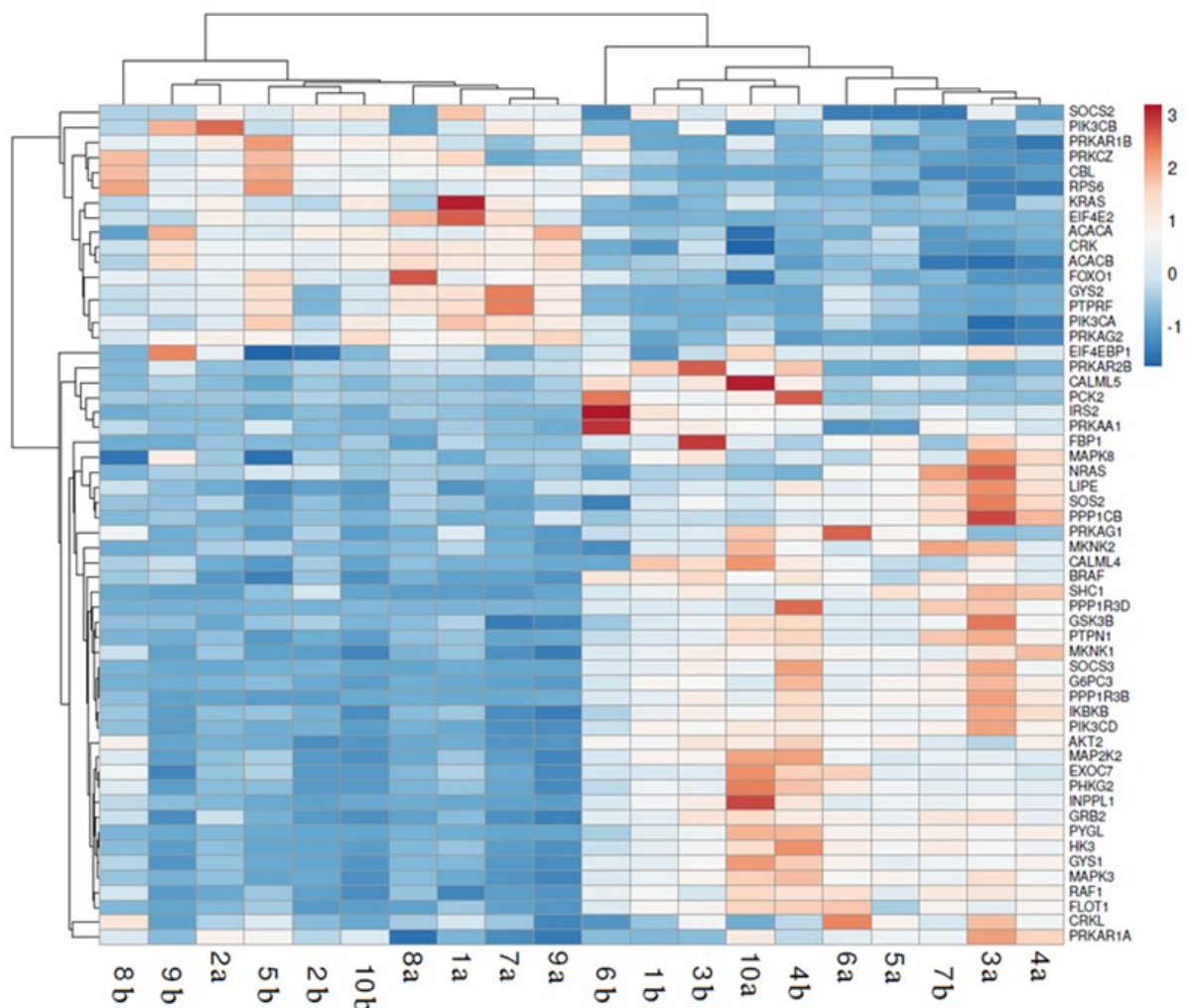
Ze zgromadzonego materiału wyizolowano RNA oraz przygotowano biblioteki do sekwencjonowania NGS. Sekwencjonowanie wykonano na aparacie NovaSeq Illumina (Illumina) w 150bp dwukierunkowych cyklach.

Wstępne wyniki, w tym analizy szlaków sygnałowych KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) oraz ontologii genów GO (Gene Ontology), pozwoliły na identyfikację genów najbardziej up-regulowanych – ARV1, DGAT2, LIPE, APOA2, MOGAT1, MOGAT2, GYS1, GYS2 i down-regulowanych – ACACA, ACACB, FADS1, FADS2. Powyższe geny zaangażowane

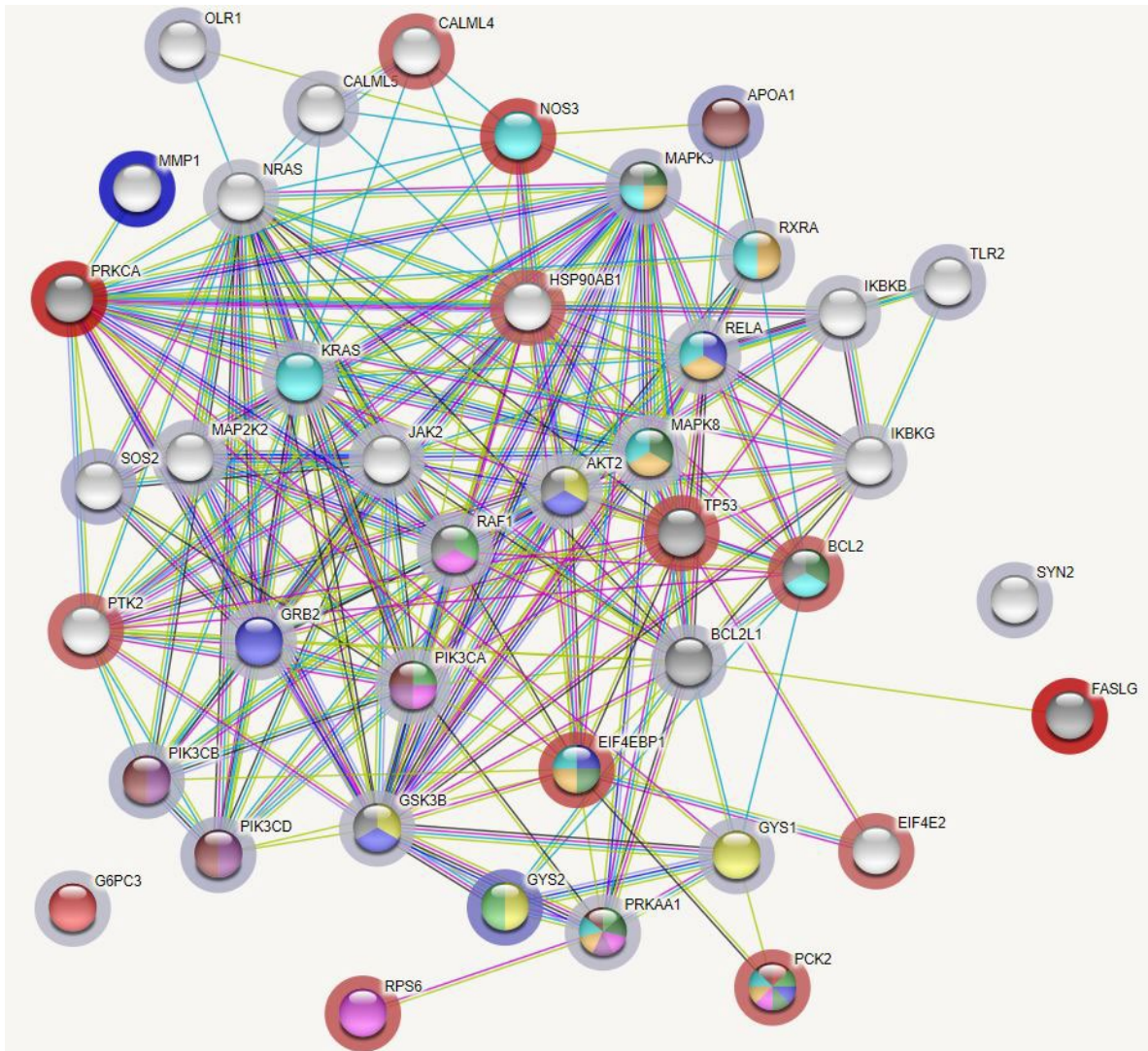
są w metabolizm węglowodanów i lipidów. Wykazano również zwiększoną ekspresję genów RAF1, KRAS i NRAS zaangażowanych w szlak Insulinowy (Rycina 1.) oraz PI3K-Akt.

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). Największe krotności zmian pomiędzy analizowanymi grupami stwierdzono dla: genów MMP1 (FC=20,34) i GYS2 (FC=9,21), obu up-regulowanych w warunkach wysiłku wytrzymałościowego oraz dwóch genów down-regulowanych: FASLG (FC=-2,74) i PRKCA (FC=-2,55) (Rycina 2.).

Rycina 1. Heatmapa przedstawiająca ekspresję genów zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny (ecb04910) i zidentyfikowanych istotnie regulowanych pod wpływem wysiłku wytrzymałościowego (oprogramowanie R).



Rycina 2. Sieć interakcji pomiędzy genami zidentyfikowanymi jako istotnie zaangażowane w wysiłek długodystansowy u koni arabskich (kolorem niebieskim zaznaczono geny o podniesionej aktywności; kolorem czerwonym o obniżonej aktywności transkrypcyjnej) (oprogramowanie String).



Zadanie 01-18-09-21

Molekularne aspekty epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji wybranych miRNA w tkance mózgowej świni.

kierownik zadania: dr inż. Klaudia Pawlina-Tyszko

Celem zadania jest określenie wzorca ekspresji, zidentyfikowanych w poprzednich badaniach *alleli* rodzicielskich, miR-15b, -19b, -20b, -23a, -130a, -146b, -326, -378-2 oraz -2483 w tkance mózgowej świni z wykorzystaniem metody klonowania molekularnego oraz określenie ich profilu metylacji DNA.

Materiał i metody:

Analiza wzorca ekspresji.

RNA tkanki mózgowej 21 świń, przechowywane w Laboratorium Genomiki, poddano reakcji odwrotnej transkrypcji z uwzględnieniem reakcji kontrolnej bez odwrotnej transkryptazy, w celu

wykluczenia zanieczyszczenia izolatów śladowymi ilościami DNA. Dla wybranych do analiz mikroRNA (miR-15b, -19b, -20b, -23a, -130a, -146b, -326, -378-2, -2483) zaprojektowano startery umożliwiające amplifikację sekwencji ich prekursorów na podstawie genomu *Sscrofa* 11.1, z użyciem programu Primer3. Reakcje PCR przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy HotStart Taq (Qiagen) a obecność produktów zweryfikowano w 2% żelu agarozowym. Uzyskane produkty oczyszczono z wykorzystaniem zestawu MinElute PCR Purification kit (Qiagen), a następnie wklonowano do wektora plazmidowego z użyciem kitu TOPO TA Cloning™ (Invitrogen), wg protokołu producenta. Pojedyncze kolonie w liczbie 24/próbkę /miRNA poddano amplifikacji metodą PCR a następnie sekwencjonowaniu Sangera wg standardowego protokołu. Elektroforezę kapilarną przeprowadzono na urządzeniu 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analiza profilu metylacji DNA.

Dla badanych genów kodujących wybrane mikroRNA, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem programu Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems Software), w celu identyfikacji wysp CpG będących miejscami potencjalnej metylacji DNA oraz zaprojektowania starterów je flankujących. Izolaty DNA z tkanki mózgowej świni poszczególnych osobników poddano konwersji bisulfitowej z użyciem odczynników EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). Następnie, przeprowadzono reakcje PCR z wykorzystaniem polimerazy HotStart Taq (Qiagen) oraz zaprojektowanych starterów. Uzyskane produkty poddano sekwencjonowaniu Sangera według standardowego protokołu. Odczyt sekwencji przeprowadzono na urządzeniu 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Zbiorcza analiza wyników:

Wyniki sekwencjonowania Sangera z obu analiz oceniono jakościowo z wykorzystaniem programu FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) oraz porównano z genomem referencyjnym świni (*Sscrofa* 11.1), z wykorzystaniem narzędzia BLAST (Ensembl). Dla każdej próbki i każdego analizowanego miRNA określono liczbę klonów z danym *allele*m rodzicielskim, dzięki posiadanej informacji o polimorfizmie SNP występującym u rodziców badanych osobników. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu chi-kwadrat. Analiza poziomu metylacji DNA została przeprowadzona w aplikacji FinchTV oraz edytorze sekwencji GeneDoc. Jej celem było poszukiwanie miejsc metylowanych cytozyn oraz określenie poziomu metylacji w badanych fragmentach DNA. Wizualizację sekwencji przeprowadzono z użyciem programu BISMA. Normalność rozkładu uzyskanych wyników oceniono testem Shapiro-Wilka, a analizę istotności uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem testu Mann-Whitney'a.

Wyniki:

Dla dwóch z dziewięciu wybranych mikroRNA (miR-19b, miR-20b) nie udało się uzyskać specyficznych produktów reakcji PCR. W celu zapewnienia odpowiedniej wiarygodności uzyskanych wyników sekwencje te zostały wykluczone z dalszych analiz. Uzyskane profile pozostałych mikroRNA ujawniły wahania w ekspresji poszczególnych *alleli* rodzicielskich w badanych próbkach. Ulegały one nierównomiernej ekspresji zarówno w obrębie osobnika jak i w obrębie miRNA (Rycina 1).

W przypadku mir-15b oraz -378-2, profil nie wykazywał jednoznacznych przesunień w stronę żadnego *allelu* rodzicielskiego. Dla mir-15b ekspresja *allelu* ojcowskiego wahała się od 29% do 71% klonów, natomiast dla mir-378-2 od 38% do 71% klonów (Rycina 1). Analiza

statystyczna wykazała, iż fluktuacje te nie odbiegają istotnie od ekspresji biallelicznej. Podobne wahania odnotowano dla mir-326 (29% do 79% *allelu* ojcowskiego), jednak były one istotne statystycznie (p value=0.04). Istotność statystyczną wykazały również zaobserwowane poziomy ekspresji dla mir-146b (33% do 88% *allelu* ojcowskiego) oraz mir-23a (13% do 58% *allelu* ojcowskiego) – Tabela 1. W przypadku tych dwóch miRNA zaobserwowano niewielkie przesunięcie ekspresji w stronę jednego z *alleli* rodzicielskich, tj. *allelu* ojcowskiego w przypadku mir-146b (średnia ekspresja *allelu* ojcowskiego w analizowanych próbkach wyniosła 66%) oraz *allelu* matczynego w przypadku mir-23a (średnia ekspresja *allelu* matczynego w analizowanych próbkach na poziomie 64%). Wyniki uzyskane dla mir-2483 oraz mir-130a ujawniły bardziej jednorodny profil ekspresji poszczególnych *alleli* w analizowanych próbkach, tj. 58%-79% *allelu* ojcowskiego dla mir-2483 oraz 83%-96% *allelu* ojcowskiego dla mir-130a (Rycina 1.), jednak statystycznie istotnie odbiegający od oczekiwanego (Tabela 1). Ponadto, dla tych miRNA, zaobserwowano wyraźną tendencję w kierunku *allelu* ojcowskiego dla każdej z analizowanych próbek (średnia ekspresja *allelu* ojcowskiego wyniosła 72% dla mir-2483 oraz 88% dla mir-130a).

Tabela 1. Wyniki analizy statystycznej z użyciem testu chi kwadrat wartości obserwowanych ekspresji w porównaniu do wartości oczekiwanych.

Nazwa miRNA	mir-15b	mir-326	mir-2483	mir-23a	mir-378-2	mir-146b	mir-130a
p value	0.06	0.04	0.0002	0.0002	0.18	2.83E-06	1.52E-21

Rycina 1. Wykresy przedstawiające procentowy udział ekspresji poszczególnych *alleli* rodzicielskich w puli 24 przeanalizowanych klonów. Na osi x przedstawiono nazwy badanych próbek.

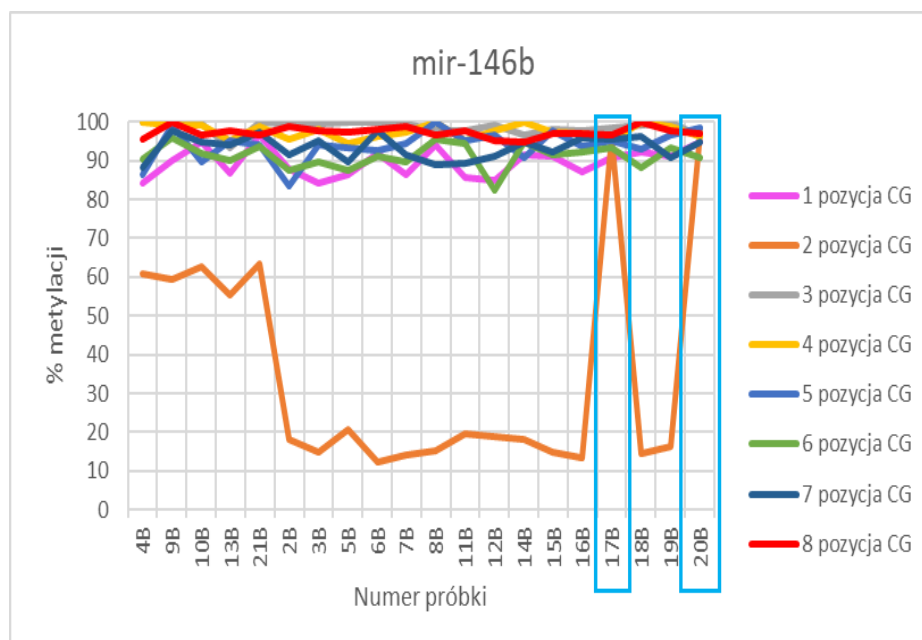


Do dalszych analiz wybrano mikroRNA, dla których zidentyfikowano statystycznie istotne różnice w profilu ekspresji poszczególnych *alleli*. Analiza z wykorzystaniem programu Methyl Primer Express® Software v1.0 pozwoliła zidentyfikować wyspy CpG w 2 z 5 takich sekwencji (mir-146b oraz mir-130a; Rycina 2.), w związku z czym zostały one zakwalifikowane do określenia poziomu metylacji DNA. Analiza poziomu metylacji wykazała hipermetylację (~95%) o jednorodnym profilu w obrębie genu mir-146b we wszystkich analizowanych próbkach i pozycjach CG. Wyjątek stanowiła 2. pozycja CG, dla której zidentyfikowano niejednorodny, zróżnicowany profil metylacji w zależności od genotypu próbki. Obniżony poziom metylacji wystąpił w próbkach heterozygotycznych (~60%) oraz homozygotach CC (~16%); natomiast homozygoty TT charakteryzowały się metylacją na poziomie 95%. Dla tej pozycji oraz dla całej wyspy różnice te były statystycznie istotne (Rycina 2., Tabela 2.).

W obrębie genu mir-130a zidentyfikowano 2 wyspy CpG. Wyspa pierwsza charakteryzowała się zróżnicowanym poziomem metylacji pomiędzy poszczególnymi pozycjami CG, który wynosił od 1 do 80%. Średni poziom metylacji dla całej wyspy CpG oscylował w okolicach 50%, we wszystkich analizowanych próbkach. Analiza statystyczna wykazała, iż różnica pomiędzy średnim poziomem metylacji tej wyspy u heterozygot w porównaniu do homozygot, która wyniosła 7.25%, jest istotna statystycznie (Rycina 2., Tabela 2.).

Istotne statystycznie zróżnicowanie w poziomie metylacji DNA pomiędzy heterozygotami a homozygotami odnotowano dla pozycji CG 2. Średni poziom metylacji w próbkach heterozygotycznych wynosił 32%. Homozygota AA miała metylację na poziomie 68%, a homozygoty GG na poziomie ~2% (Rycina 2., Tabela 2.). Wyniki dla wyspy drugiej nie były statystycznie istotne.

Rycina 2. Wykresy przedstawiające poziom metylacji DNA w obrębie poszczególnych pozycji CG tworzących wyspy CpG zlokalizowane w genach mir-146b oraz mir-130a. Czerwoną ramką zaznaczono próbki heterozygotyczne pod względem badanego SNP. Poza czerwoną ramką są próbki homozygotyczne, przy czym niebieska ramka oznacza przeciwną homozygotę.



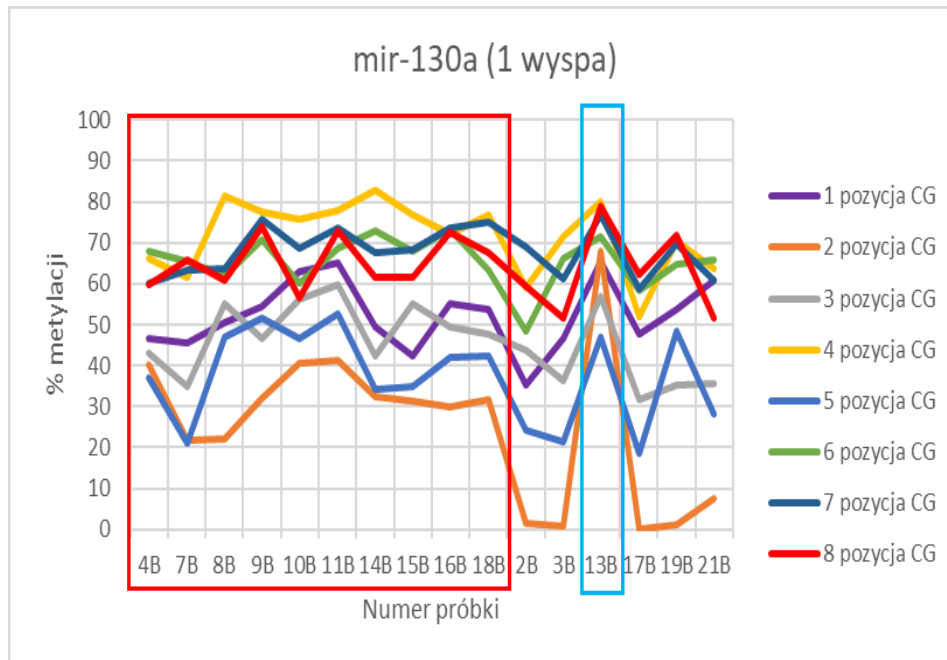


Tabela 2. Informacje o zidentyfikowanych statystycznie istotnych różnicach w metylacji w sekwencji analizowanych miRNA pomiędzy osobnikami heterozygotycznymi a homozygotycznymi (test Mann-Whitney'a).

Nazwa genu miRNA	Mir-146b	Mir-130a
Numer istotnej statystycznie pozycji CG	2/8	2/8 (wyspa 1)
Średnia różnica w metylacji w istotnej pozycji CG	33.31%	19.15%
P value	0.015	0.031
Średnia różnica w metylacji całej wyspy	4.64%	7.25%
P value	0.015	0.042

Wnioski:

Zaobserwowane profile ekspresji nie wskazały na wystąpienie imprintingu genetycznego w przypadku analizowanych mikroRNA ze względu na ekspresję obu *alleli* rodzicielskich. Natomiast – w przypadku mir-326, mir-146b, mir-23a, mir-2483 oraz mir-130a zidentyfikowano dużą dynamikę ekspresji poszczególnych *alleli*, odbiegającą od klasycznej ekspresji *biallelicznej*, co wskazuje na wystąpienie zjawiska zwanego ekspresją zależną od *allelu* (ASE, Allele Specific Expression).

Analiza poziomu metylacji DNA wykazała, iż może być ona epigenetycznym mechanizmem odpowiedzialnym za regulację poziomu ekspresji poszczególnych *alleli* mir-146b oraz mir-130a. Ponadto, zróżnicowany profil ASE w obrębie badanej grupy dla mir-146b implikuje zaangażowanie dodatkowych mechanizmów regulacyjnych. W przypadku pozostałych miRNA, tj. mir-2483, mir-326 oraz mir-23a, regulacja ekspresji poszczególnych *alleli* znajduje się najprawdopodobniej pod kontrolą innych mechanizmów.

Uzyskane wyniki wskazują na dużą plastyczność w zakresie ekspresji badanych mikroRNA w tkance mózgowej świni, co może wynikać z mechanizmów adaptacyjnych organizmu do zmieniających się warunków środowiskowych. Co więcej, sugerują one, iż jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za tę plastyczność może być metylacja DNA.

Zadanie 01-18-10-21

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

kierownik zadania: dr inż. Wojciech WitarSKI

Celem zadania było opracowanie innowacyjnego modelu trójwymiarowej hodowli organotypowej jelita cienkiego świni oraz ocena możliwości jej wykorzystania w badaniach żywieniowych. Model organoidu jelita cienkiego świni poprawia możliwości badań żywieniowych u zwierząt hodowlanych. Tego rodzaju trójwymiarowy model *in vitro* pozwoli na zbadanie molekularnych mechanizmów działania poszczególnych metabolitów i związków aktywnych na wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych jelita, a co za tym idzie wpływ tych procesów na wzrost zwierząt. Wydaje się to być niezwykle istotne z uwagi na obowiązującą od kilku lat ustawę o ochronie zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach naukowych, mającą na celu zastąpienie, ograniczenie oraz udoskonalenie badań, w których są one wykorzystywane. Opracowanie oraz ewaluacja organoidów jelita cienkiego świni pozwoli zatem na ograniczenie liczby grup doświadczalnych zwierząt, zmniejszając jednocześnie koszt dalszych etapów badań na modelu zwierzęcym.

Wykorzystując opracowany model organoidów jelita cienkiego świni, planuje się przeanalizować wpływ na ich parametry fenotypowe i czynnościowe oraz profil transkryptomowy komórek. Dane otrzymane z wykorzystaniem organoidów jelita cienkiego świni mogłyby zatem w przyszłości posłużyć do opracowania funkcjonalnych dodatków paszowych mających na celu poprawę parametrów wzrostu i zdrowia zwierząt. Ponadto, opracowana hodowla organoidów jelita świni będzie mogła zostać poddana kriokonserwacji i zostać wykorzystana w innych eksperymentach w przyszłości.

Stymulacja maślanem sodu.

Analizę wysokoprzepustowej ekspresji RNA komórek organoidów przeprowadzono na organoidach pochodzących od czterech różnych zwierząt, które zostały stymulowane przez 24 godziny 1 mM maślanem sodu, po czym przystąpiono do wysokoprzepustowych analiz.

W wyniku eksperymentu uzyskano wykaz genów o różnicowej ekspresji, który następnie poddano analizie bioinformatycznej. Po obróbce danych uzyskano 1743 geny o różnicowej ekspresji spełniające kryteria, z czego w grupie traktowanej zwiększonej ekspresji uległo 986 genów, a zmniejszonej ekspresji względem grupy kontrolnej 757 genów. Analizy typu Enrichment wykazały 20 szlaków, które zostały zmodyfikowane poprzez traktowanie maślanem sodu w sposób istotny statystycznie. Zaliczyć do nich możemy: szlaki metaboliczne argininy i proliny, szlaki apoptozy, procesy fagocytozy, lizosomowe szlaki, szlaki regulacji MAPK-kinazy oraz procesy sygnalizacyjne białka TNF oraz inne. Zauważono zmiany w genach regulujących procesy metabolizmu (167 genów), w tym metabolizm kwasów tłuszczowych i inne, wliczając metabolizm aminokwasów.

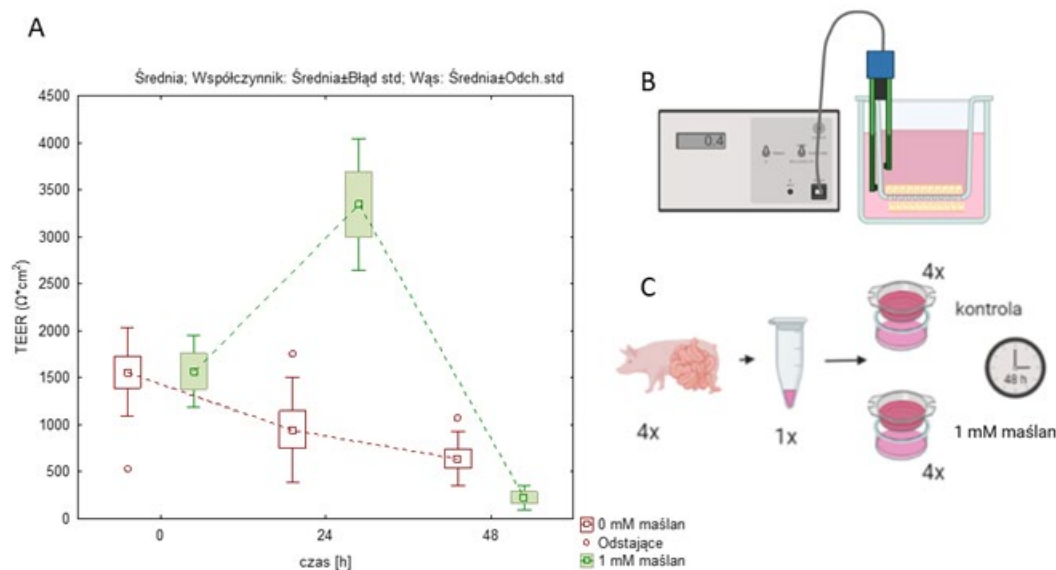
Enzymy upregulowane biorące udział w syntezie kwasów tłuszczowych: ACAA2; acetyl-CoA acyltransferase 2 CPT1A; carnitine palmitoyltransferase 1A ACADSB; acyl-CoA dehydrogenase short/branched chain FADS1; fatty acid desaturase 1 HACD4; 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 4 ELOVL4; ELOVL fatty acid elongase ELOVL6; ELOVL fatty acid elongase 6. Do ciekawych obserwacji należą także zmiany w metabolizmie argininy oraz proliny, gdzie poziom wszystkich istotnych statystycznie genów w traktowanej grupie jest podwyższony.

Enzymy upregulowane biorące udział w syntezie kwasów tłuszczowych: SAT2, spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2, HOGA1, 4-hydroxy-2-oxoglutarate

te aldolase 1, L3HYPDH, trans-L-3-hydroxyproline dehydratase; CKB, creatine kinase B, ALDH2, aldehyde dehydrogenase 2 family member, GAMT; guanidinoacetate N-methyltransferase; GATM; glycine amidinotransferase; P4HA3, prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3.

Aktywacji uległo szereg istotnych szlaków sygnalizacyjnych jak szlaki MAP kinazy oraz szlaki sygnalizacyjne propagowane przez białko Notch, odpowiadające za interakcje komórka-komórka, biorące udział m.in w procesach rozwoju osobniczego czy utrzymania niszy komórek macierzystych.

Wykres 1. Wyniki stymulacji 1 mM maślanem sodu na zmianę siły wiązań pomiędzy komórkami nabłonka mierzony jako spadek oporu elektrycznego powierzchni hodowlanej (TEER). Wykres sporządzony w programie Statistica (Statsoft) dla średniej oraz średniej $\pm$ błąd standardowy (box), średniej $\pm$ odchylenie standardowe (wąs); dla różnych punktów czasowych. B. Schemat układu pomiarowego gdzie napięcie pomiędzy elektrodami mierzone jest przez nabłonek. C. Schemat eksperymentu.



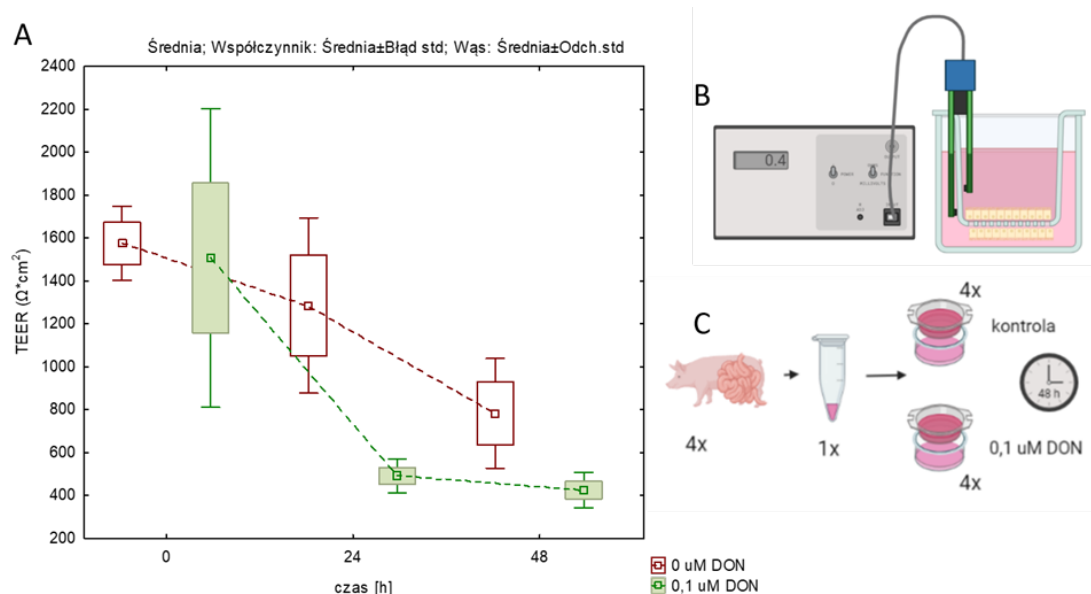
Stymulacja nabłonka 1mM maślanem sodu wykazała wysoce istotny wzrost integralności nabłonka (wzrost oporu elektrycznego trans-nabłonkowego).

Stymulacja deoksyniwalelem.

Analizę wysokoprzepustowej ekspresji RNA komórek organoidów przeprowadzono analogicznie do doświadczenia prezentowanego powyżej na organoidach pochodzących od czterech różnych zwierząt, które zostały stymulowane przez 24 godziny 0,1 μM deoksyniwalelem, po czym przystąpiono do wysokoprzepustowych analiz. Po analizie bioinformatycznej uzyskano 711 genów o różnicowej ekspresji, z czego w grupie traktowanej (w odniesieniu do grupy kontrolnej) liczba statystycznie istotnych genów, o podwyższonej ekspresji, wynosiła 554 (157 o obniżonej ekspresji). Analizy Enrichment wykazały 20 szlaków, które zostały zmodyfikowane poprzez traktowanie grupy eksperymentalnej 0,1 μM deoksyniwalelem. Na uwagę zasługuje obecność procesów zawiadujących aktywnością cytokin oraz szlaków odpowiedzi immunologicznej, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi.

Analiza zmian poziomu ekspresji genów w obrębie szlaków sygnalizacyjnych MAPK, FOXO, Hippo, białka p53 może wskazywać na ich aktywację, dodatkowo aktywacja genów downstream względem białka p53 wskazuje na proapoptyczny charakter oddziaływania deoksyniwalelu w koncentracji oraz w czasie ekspozycji zastosowanych w eksperymencie.

Wykres 2. Wyniki stymulacji 0,1 μM deoksyniwaleolem na zmianę siły wiązań pomiędzy komórkami nabłonka mierzonej jako spadek oporu elektrycznego powierzchni hodowlanej (TEER). Wykres sporządzony w programie Statistica (Statsoft) dla średniej oraz średniej $\pm$ błąd standardowy (box), średniej $\pm$ odchylenie standardowe (wqs); dla różnych punktów czasowych. B. Schemat układu pomiarowego, gdzie napięcie pomiędzy elektrodami mierzone jest przez nabłonek, C. Schemat eksperymentu.



Eksperymenty TEER wykazały gwałtowny spadek integralności nabłonka w czasie 24 godzin trwania eksperymentu. Część zachodzących zmian może być wynikiem zmian profilu ekspresji. Geny związane z regulacją, oraz wchodzące w skład *zonula occludens*, podlegają regulacji ekspresji przez ekspozycję komórek na deoksyniwaleol.

Zadanie 01-18-11-21

Analiza genów związanych z przemianami tłuszczowymi wpływającymi na różnice w profilach kwasów tłuszczowych u gęsi.

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

Celem badań było poszukiwanie genetycznych uwarunkowań różnic w metabolizmie kwasów tłuszczowych między trzema rasami gęsi, poprzez:

- analizę zmian ekspresji genów związanych z przemianą kwasów tłuszczowych,
- sekwencjonowanie wybranych genów i analizę asocjacji zidentyfikowanych polimorfizmów z różnicami w składzie kwasów tłuszczowych poszczególnych ras (na podstawie danych uzyskanych z literatury naukowej).

Materiał do badań:

Materiałem do badania ekspresji genów były fragmenty tkanek wątroby i tłuszczu sadełkowego pobrane od trzech ras gęsi (kielecka, KI; kołudzka®, K; landes, L), po 5 próbek z każdej rasy. Materiał do badań sekwencji genów stanowiły pióra z dutkami od gęsi ras: kielecka, n=112, kołudzka®, n=131, landes, n=145.

Wyniki:

Ekspresja genów.

W oparciu o genom gęsi Pink-footed goose (ASM259213v1) dostępny w bazie Ensemble zaprojektowano sondy TaqMan MGB probes (Invitrogen, USA).

Przetestowano sondy dla dwóch genów jako potencjalne kontrole endogenne: RPL4 (NXHY01000053.1) i GAPDHS (NXHY01000705.1) oraz dla badanych genów: ACSL (NXHY01000046.1), ME (NXHY01000018.1), ELOVL6 (NXHY01000124.1).

Dla cDNA z wątroby uzyskano wyniki ekspresji dla wszystkich badanych genów (ACSL, ME, ELOVL) ras kołudzka®, kielecka i landes. Dla cDNA z tłuszczu uzyskano wyniki ekspresji dla wszystkich genów u ras kołudzka® i landes. Analizę ekspresji wybranych genów przeprowadzono stosując test relatywnej kwantyfikacji (RQ assay) z podziałem na grupy zwierząt (grupa badawcza odpowiadała rasie zwierząt)

Wyniki ekspresji poddano jednoczynnikowej analizie wariancji. Dla wyliczenia statystycznych różnic między badanymi grupami (trzy rasy) dla jednej cechy (masa ciała przed ubojem) zastosowano test studenta. Ponadto, zastosowano test post hoc test Bonferroniego do wyliczenia poziomu istotności dla mało liczebnych grup (Wykres 1. i 2.).

Sekwencjonowanie genów.

W oparciu o genom gęsi Pink-footed goose (ASM259213v1), dostępny w bazie Ensemble, zaprojektowano startery do PCR i sekwencjonowania genów (ELOVL1, ME, ACSL1, SCD). Uzyskano sekwencje fragmentów wybranych genów (ELOVL1, ME, ACSL1, SCD) u wszystkich badanych ras. Analizę sekwencji przeprowadzono z wykorzystaniem programu BioEdit oraz aplikacji Clustal W. Nie znaleziono polimorfizmów w analizowanych sekwencjach (Rycina 1.).

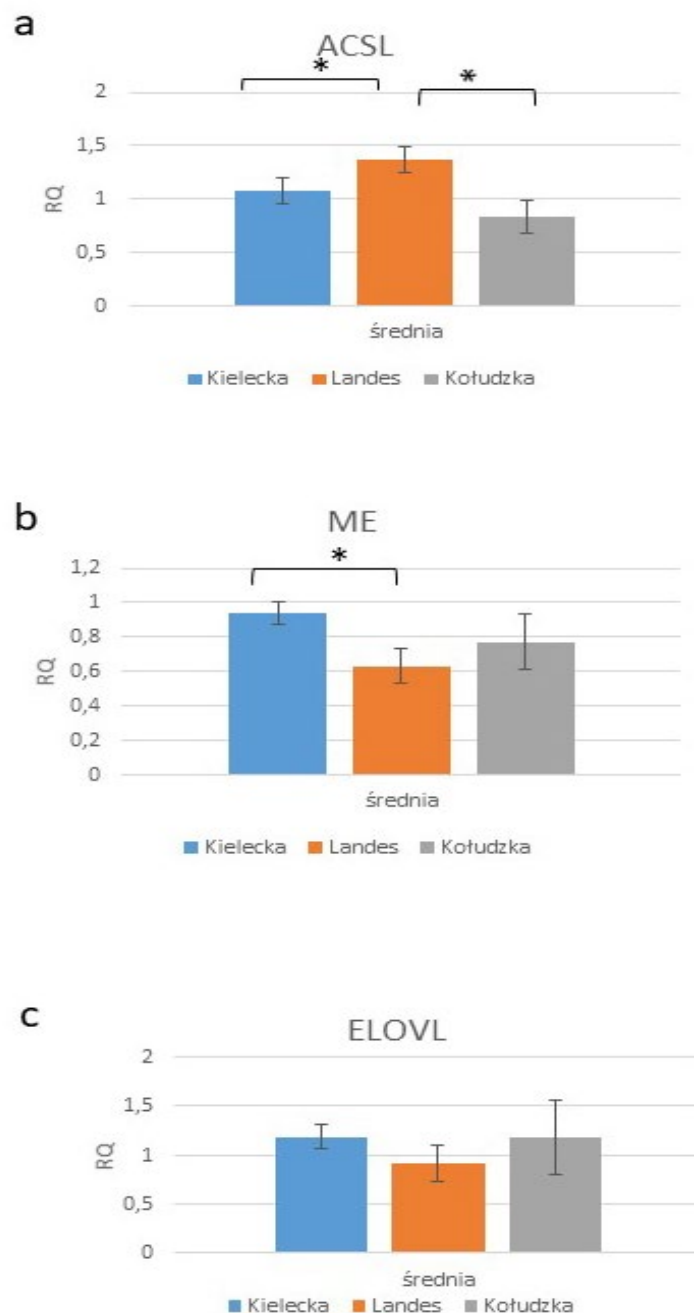
Wnioski i dyskusja:

ACSL katalizuje zależne od ATP acylowanie kwasów tłuszczowych w długotańczuchowe acylo-CoA (LCA-CoA). Jest to pierwszy etap metabolizmu lipidów po wejściu kwasów tłuszczowych do komórki. LCA-CoA mogą następnie ulec utlenianiu w celu uzyskania energii lub dalszej estryfikacji do fosfolipidów, estrów cholesterolu i trójglicerydów. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że ekspresja genu ACSL1 różni się statystycznie między landes i kołudzką® oraz landes i kielecką, osiągając najwyższy poziom w grupie landes. Interesujący jest fakt, że rasa ta przez wiele lat była hodowana w celu uzyskania „foie gras”, s tłuszczzonej wątroby uznawanej za przysmak. Aktualnie rasa ta hodowana w SZGDW Instytutu Zootechniki PIB w Dworzyskach została objęta Programem Ochrony Zasobów Genetycznych w Polsce i nie jest hodowana w celu uzyskania s tłuszczzonej wątroby. Niemniej jednak można przypuszczać, że posiada pewne genetyczne uwarunkowania do skutecznego gromadzenia trójglicerydów w hepatocytach.

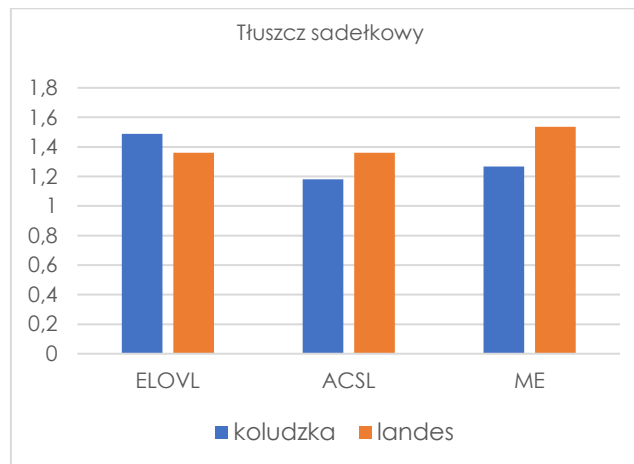
ELOVL1 wykazuje aktywność elongazy acetylo-CoA specyficznej dla długich łańcuchów (C22 do C24 i C26 nasycone i jednonienasycone kwasów tłuszczowych) i jego aktywność istotnie wpływa na skład kwasów tłuszczowych w tkankach. Stwierdzono, że ekspresja genów biorących udział w biosyntezie UFA, jak np. ELOVL1, jest większa u ras o większej masie ciała i masie wątroby. Wyniki przedstawionych tu badań nie potwierdzają jednak tych obserwacji. W badaniach przeprowadzonych u rasy kołudzkiej®, kieleckiej i landes nie stwierdzono różnic w ekspresji ELOVL1 w wątrobie.

U ptaków proces lipogenezy zachodzi poprzez NADPH zależne od ME, a nie jak u ssaków od dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD). Aktywność ME jest najlepszym wskaźnikiem zdolności lipogenicznej wątroby u różnych gatunków ptaków (Hermier, 1997). W przeprowadzonych badaniach, ekspresja ME różniła się statystycznie między rasą landes i kielecką. Niższy poziom ekspresji u landes, może świadczyć o słabszym stłuszczeniu wątroby u tej rasy. W przeciwieństwie do wyników ekspresji genów, na poziomie sekwencji DNA, wszystkie rasy cechuje konserwatyzm. Analiza sekwencji genów nie wykazała różnic w badanych rasach, stąd nie zostały przeprowadzone badania asocjacyjne.

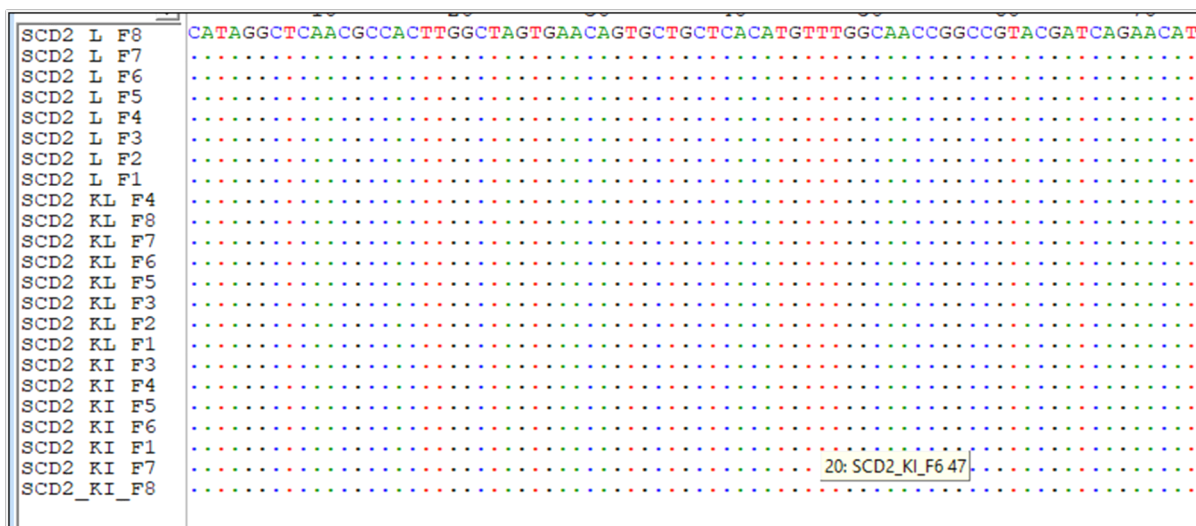
Wykres 1. Porównanie ekspresji genów w wątrobie: a) ACSL, b) ME1, c) ELOVL1 u ras kielecka, landes, kołudzka®.



Wykres 2. Porównanie ekspresji genów w tłuszczu sadełkowym: a) ACSL, b) ME1, c) ELOVL1 u ras kielecka, landes, kołudzka®.



Rycina 1. Porównanie fragmentu sekwencji genu SCD między rasami landes (L), kołudzka® (KL) i kielecka (KI).



Zadanie 01-18-12-21

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

kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Celem niniejszych badań była identyfikacja różnic w profilu białkowym pomiędzy próbkami mięsa pochodzącymi od świń ras charakteryzujących się różną jakością mięsa (puławska, pbz), a także pomiędzy próbkami mięsa pochodzącymi od bydła ras limousine, oraz analiza ich związków z parametrami jakości mięsa.

Metodyka:

Materiałem do analizy były fragmenty mięśnia najdłuższego grzbietu – *longissimus dorsi*, pobrane od 20 tuczników z dwóch ras świń (10 sztuk puławska, 10 sztuk pbz). Próbki mięsa zostały poddane analizie jakości pod kątem zawartości tłuszczu śródmięśniowego (IMF), odczynu pH mięsa (pH 45, pH 24), barwy (L^*ab), tekstury (siła i energia cięcia, profil TPA) oraz analizie proteomicznej (2D gel, LC/MS).

W przypadku mięsa wołowego materiałem do analizy profilu białkowego były wykorzystane fragmenty mięśnia – *longissimus dorsi* pobrane od bydła mięsnego rasy limousine, o udokumentowanym pochodzeniu i będące pod stałą kontrolą użytkowości. Próbkę do analizy zostały pobrane od każdej ze sztuk w trzech okresach: 48 h, 5 dni oraz 10 dni po uboju. W poszczególnych okresach były przeprowadzone analizy dotyczące jakości mięsa (pomiar pH, pomiar barwy mięsa L^*, b^*, a^*) ubytki masy w czasie obróbki cieplnej, ocena organoleptyczna mięsa po obróbce cieplnej. Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB Chorzów Sp. z o.o., jak również w wytypowanych gospodarstwach indywidualnych.

Analizy proteomiczne obejmowały: izolację białek, oczyszczanie wyizolowanych białek oraz oznaczanie ich stężenia, analizy białkowe żeli 2D, ogniskowanie izoelektryczne (IEF), SDS-PAGE, wybarwienie białka oraz analizę komputerową skanów otrzymanych żeli, analizę LC-MS.

Wyniki prac badawczych:

Analiza mięsa wieprzowego.

Analizy proteomiczne wskazały na podwyższoną aktywność enzymów glikolitycznych w mięśniu najdłuższym grzbietu u świń rasy puławskiej, w porównaniu z drugą analizowaną rasą świń (pbz), która z kolei charakteryzowała się większą ilością białek strukturalnych. U świń rasy puławskiej zwiększona ekspresja białka G3PD (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) może wpływać na produkcję glicerolowych substratów do lipogenezy, co jest istotne w przypadku ilości tłuszczu śródmięśniowego u rasy puławskiej i statystycznej różnicy pomiędzy badanymi rasami. Nadekspresja białka PGM (Phosphoglucumutase-1) mogła wpłynąć na pH24 oraz pH45, które było znacznie niższe u świń rasy puławskiej w porównaniu z pbz. Zwiększone poziomy GAPDH i białek szoku cieplnego były już związane z jakością mięsa wieprzowego, a w szczególności ze zjawiskiem apoptozy, które może determinować kruchość mięsa. Badania proteomiczne podkreślają pozytywną korelację pomiędzy nadekspresją niektórych enzymów glikolitycznych (tj. TPI1) a kruchością mięsa. Wyniki te są zgodne z obserwacjami Zullo i wsp. o niskiej wartości czasu żucia dla mięsa świń rasy casertana [1]. W przeprowadzonych badaniach nadekspresja TPI1 była zauważona u świń rasy puławskiej i była znacznie mniejsza. Nie zauważono statystycznej różnicy pomiędzy rasami. W przypadku świń rasy pbz większość białek różnicowanych u tej rasy świń stanowiły białka strukturalne, takie jak izoforma lekkich łańcuchów miozyny (MYL1), aktyna (ACTA1) oraz białka tropomiozyny (TPM1) i miozyny-1 (MYOZ1).

Analiza proteomiczna mięsa wołowego.

W przedstawionych wynikach skupiono się na różnicy w ilości białek pomiędzy próbkami mięsa, analizowanych w różnym czasie od uboju. W toku przeprowadzonych analiz wytypowano 10 białek, które różniły się pomiędzy analizowanymi próbkami. Białka podzielono na kilka grup w zależności od głównych funkcji, jakie pełniły w organizmie.

Białka biorące udział w metabolizmie.

Mutaza fosfoglicerynianowa 2 (PGAM2) bierze udział w konwersji 3-fosfoglicerynianu do 2-fosfoglicerynianu. Uczestniczy również w uwalnianiu tlenu z hemoglobiny. Stężenie tego enzymu wzrasta w ciągu pierwszych 10 minut, natomiast stężenie jego fragmentów wzrasta po 48 h *post mortem* w bydlęcym mięśni. Nasze wyniki sugerują spadek PGAM2 w mięśni LD bydła podczas ogólnego dojrzewania, prawdopodobnie dlatego, że enzym ten nie jest potrzebny *post mortem*, kiedy ustaje transfer tlenu do mięśnia. A-enolaza i b-enolaza to dwie izoformy

enolazy, które katalizują konwersję 2-fosfoglicerynianu do fosfolipirogronianu podczas glikolizy. W szczególności α -enolaza (ENO1) jest wszechobecna w cytoplazmie komórek, natomiast izoforma β (ENO3) występuje głównie w tkance mięśniowej. W dostępnej literaturze wykazano, że w różnym czasie po uboju nastąpił wzrost ENO3 – w ciągu pierwszych 30 min. W mięśniach LT bydła. Przy przedłużonym dojrzewaniu do 21 dni wykazano wzrost fragmentów ENO3 w mięśniach LT bydła wskazując na spowolnienie procesu glikolitycznego. W prezentowanych badaniach stwierdziliśmy większą ilość enolaz w próbkach pobranych po 10 dniach od uboju, co jest zgodne z badaniami innych autorów. Kinaza kreatynowa M (CKM) jest związana z przeniesieniem grupy fosforanowej z fosfokreatyny na ADP w celu wygenerowania ATP. Modulacja tego białka podczas dojrzewania została już zidentyfikowana w mięśniach bydłowych LT, wykazując wzrost ilości fragmentów CKM podczas starzenia się mięsa. W prowadzonych badaniach zwiększona ilość CKM może być powiązana ze wzrostem ilości fragmentów CKM, a nie całego enzymu – szczególnie po długim okresie dojrzewania. Prawdopodobnie otrzymany wynik może wiązać się z degradacją CKM pośmiertnie, i to przyczynia się do wyczerpania ATP w komórkach. Łańcuch A dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) katalizuje konwersję L-mleczanu i NAD^+ do pirogronianu i NADH w ostatnim etapie glikolizy beztlenowej. LDHA występuje głównie w tkance mięśniowej, a jej zwiększona aktywność tuż po uboju koreluje ze spadkiem pH spowodowanym nagromadzeniem mleczanu w tkance, podczas gdy zmniejszona aktywność LDHA 12 h po uboju może być związana z wyczerpaniem glikogenu i ATP oraz początkiem sztywności. W naszych analizach stwierdziliśmy, że więcej LDHA znajduje się w próbkach pobranych po 10 dniach od uboju. W tym przypadku niezbędne są dalsze badania, aby dokładnie zbadać wpływ LDHA na pH mięsa.

Białka strukturalne.

Alfa-aktyna (ACTA) jest głównym składnikiem aparatu kurczliwego w tkance mięśniowej. Stwierdzono, że ACTA ulega modulacji podczas dojrzewania mięśni bydła. W szczególności zmniejsza się jej nieuszkodzona forma, podczas gdy jej fragmenty wzrastają. W naszych analizach większą intensywność prążku, zidentyfikowanego jako aktyna, uzyskaliśmy w próbce pobranej 48 h po uboju, co może świadczyć o rozpadzie alfa aktyny w komórkach mięśniowych. Miozyny należą do rodziny ATP – zależnych białek motorycznych, które biorą udział w wielu procesach ruchowych. W szczególności miozyna II jest odpowiedzialna za skurcz mięśni i składa się z dwóch łańcuchów ciężkich (MYH) oraz czterech łańcuchów lekkich (MYL lub MLC). Ponadto fragmentacja łańcucha ciężkiego miozyny w wołowym LD koreluje z kruchością po 7 dniach. W naszym podejściu stwierdziliśmy, że łańcuchy ciężkie (MYH1) miozyny II mają zmienioną liczebność, w szczególności większość pofragmentowanych łańcuchów gromadzi się podczas dojrzewania mięsa.

Zadanie 01-18-13-21

Modyfikacja i walidacja zestawów markerów mikrosatelitarnych DNA do kontroli pochodzenia owiec, świń i psów do zastosowania sekwenatora 3500xl.

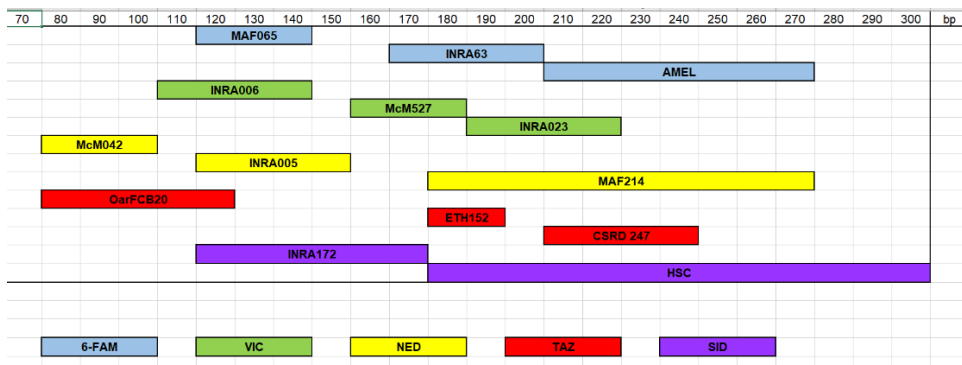
kierownik zadania: dr hab. Anna Radko, prof. IZ PIB

Celem zadania jest przearanżowanie obecnie stosowanych barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych do znakowania sekwencji starterowych, zalecanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt - ISAG do kontroli rodowodów owiec, świń i psów. Zmodyfikowane metody analizy pozwolą na kontynuację badań rodowodowych owiec, świń i psów. Utrzymanie akredytacji metody psów oraz wykonywanie badań na zlecenie hodowców.

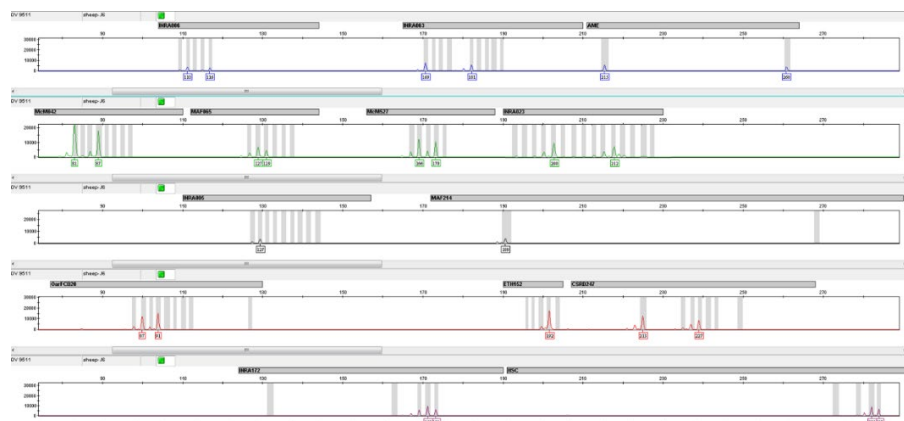
Analiza stosowanych zestawów markerów STR wykonywana jest w sekwenatorach kapilarnych *Applied Biosystems*, przy zastosowaniu do reakcji PCR barwników fluorescencyjnych, które umożliwiają jednoczesne testowanie od kilku do kilkunastu markerów STR. Przeprowadzone w ramach zadania badania pozwoliły na wprowadzenie do kontroli pochodzenia owiec, świń i psów sekwenatora kapilarnego typu 3500xl, umożliwiającego wykorzystanie do reakcji PCR 5 barwników fluorescencyjnych: FAM, VIC, NED, TAZ i SID.

Do weryfikacji rodowodów psów jako zestaw podstawowy ISAG zaleca aż 22 markery STR. Zastosowanie 5 barwników fluorescencyjnych do znakowania sekwencji starterowych pozwoliło na zaprojektowanie jednej mieszaniny reakcyjnej PCR, która umożliwiła analizę wszystkich markerów, podczas jednego rozdziału elektroforetycznego. Pozwala to na znaczne zmniejszenie kosztów badań, skrócenie czasu przebiegu analizy oraz zmniejszenie ryzyka popełnienia błędów wynikających z konieczności dwukrotnej analizy próbki od jednego psa. W przypadku kontroli pochodzenia świń dotychczas wykorzystywano 14 STR z panelu 15 podstawowych markerów rekomendowanych przez ISAG do weryfikacji pochodzenia świń. Zastosowanie dodatkowego barwnika fluorescencyjnego SID umożliwiło włączenie do zestawu stosowanego w LGM markera S0005 i testowanie wszystkich zalecanych markerów w celu potwierdzenia pochodzenia. Podobnie w przypadku badań dotyczących kontroli pochodzenia owiec, prowadzone badania modyfikacji metody analizy 13 markerów STR stosowanych dotychczas do rutynowej weryfikacji pochodzenia owiec z zastosowaniem piątego barwnika fluorescencyjnego SID, pozwoliły na włączenie do zestawu dodatkowego markera - HSC i ustalenie do badań rodowodowych owiec panelu STR 14-plex (Rysunek 1., Rysunek 2.).

Rysunek 1. Projekt oznakowania barwnikami fluorescencyjnymi sekwencji starterowych do reakcji PCR w badaniach rodowodowych owiec.



Rysunek 2. Rozdział elektroforetyczny 14-plex stosowany do kontroli pochodzenia owiec.



Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalenie warunków reakcji PCR multipleks, co umożliwiło amplifikację wszystkich markerów STR stosowanych w badaniach rodowodowych, w reakcjach multipleksowych. Uzyskane, dobrej jakości, produkty PCR pozwoliły na identyfikację i standaryzację *alleli* z poszczególnych *loci*. Opracowanie zestawu rozkładu *alleli* - „bin set” dla każdego zestawu markerów w programie GeneMapper. Obecnie planuje się uczestnictwo w testach międzynarodowych i weryfikację uzyskiwanych wyników.

Zadanie 01-18-14-21

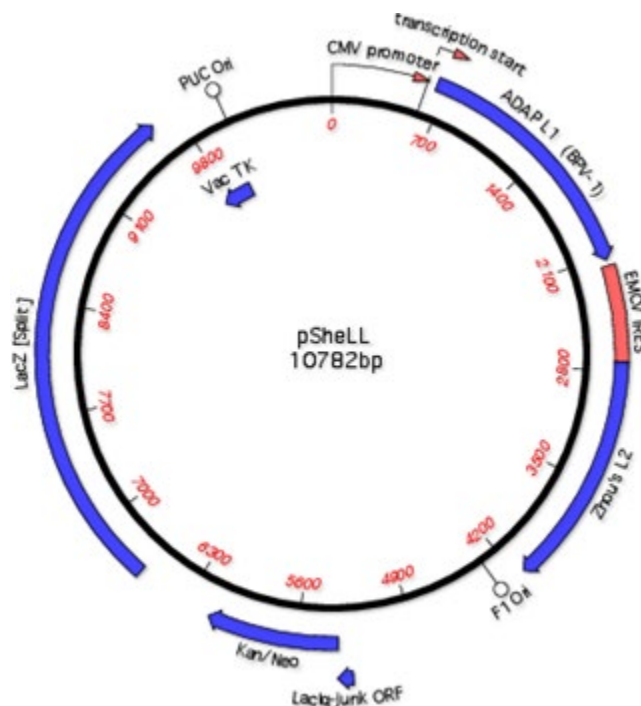
Model badawczy odwirusowej neoplazji skóry oraz analiza syntetycznych wysokoimmunogennych białek jako narzędzia do walki z wirusowymi zmianami skórnymi.

kierownik zadania: dr inż. Wojciech Witarski

Celem pracy jest stworzenie modelu badawczego chorób skóry na przykładzie neoplazji skóry konia, wywoływanej wirusem z rodziny *papillomaviridae*. W niektórych przypadkach choroba może zaowocować powstaniem nowotworu. Badania te poszerzą wiedzę na temat interakcji wirus-gospodarz w tkance skóry. W przypadku obiecujących wyników kolejnym etapem mogą być testy *in vivo*, zakończone uzyskaniem produktu leczniczego.

W toku badań uzyskano szereg klonów o zdolności do ekspresji wskazanych genów kapsydowych. Do zadania wykorzystano komercyjny wektor pSheLL (Buck et al. 2004) z pełnymi sekwencjami białek L1 oraz L2. Transfekcję przeprowadzono poprzez lipofekcję, używając Lipofectamine 2000 (Thermofisher). Do selekcji wykorzystano rezystencję antybiotykową, nakierowaną na neomycynę [bakterie] oraz kanamycynę (g418) [eukarionty].

Wykres 1. Sekwencja plazmidu pSHELL wraz z opisem miejsc kodujących.



Przeprowadzono wysokoprzepustową analizę sekwencjonowania następnej generacji RnaSeq na 4 tkankach zdrowych oraz na 8 tkankach sarkoidu końskiego, ułożonego w profilach ekspresji – spodziewanym profilu ekspresji łagodnej neoplazji skóry oraz zbliżonym do tkanek kontrolnych. W skrajnych grupach uzyskano po kilka tysięcy genów podlegających różnicowej ekspresji. Przy porównaniu grupy tkanek sarkoidowych oraz kontrolnych, zbliżonych do

siebie profilem ekspresji, uzyskano jedynie 162 DEG. Otrzymane w eksperymencie geny zawiadywały szeregiem szlaków sygnalizacyjnych w organizmie, w tym tych, które odpowiadają za procesy transformacji nowotworowej.

Kolejnym etapem eksperymentalnym projektu było wytworzenie immunogennych białek wirusowych E6, regulowanych operonem tetracyklinowym. Sekwencja białka wirusowego w postaci natywnej (pE6wt) oraz ze znacznikami białkowymi (pE6met- sekwencje c-myc oraz histag) została transfekowana techniką lipofekcji do komórek fibroblastów, które następnie poddano selekcji antybiotykowej. Uzyskane linie komórkowe poddano analizie na sprawność systemu transfekcji, poprzez detekcję transkryptu oraz samych białek wirusowych. Tego ostatniego dokonano dzięki eksperymentom w technikach ELISA oraz Western Blot przy wykorzystaniu przeciwciał anty-histag. W przypadku techniki Western Blot obecność białek wirusowych pE6met koncentrowano przy użyciu kulek magnetycznych.

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

Celem zadania jest ustalenie profili DNA w oparciu o genotypowanie 12 mikrosatelitarnych *loci*, oraz wykorzystanie zidentyfikowanych *alleli* w poszczególnych *loci* do opracowania testów, pozwalających na precyzyjne genetyczne określanie przynależności rasowej rasy polskiej czerwono-białej.

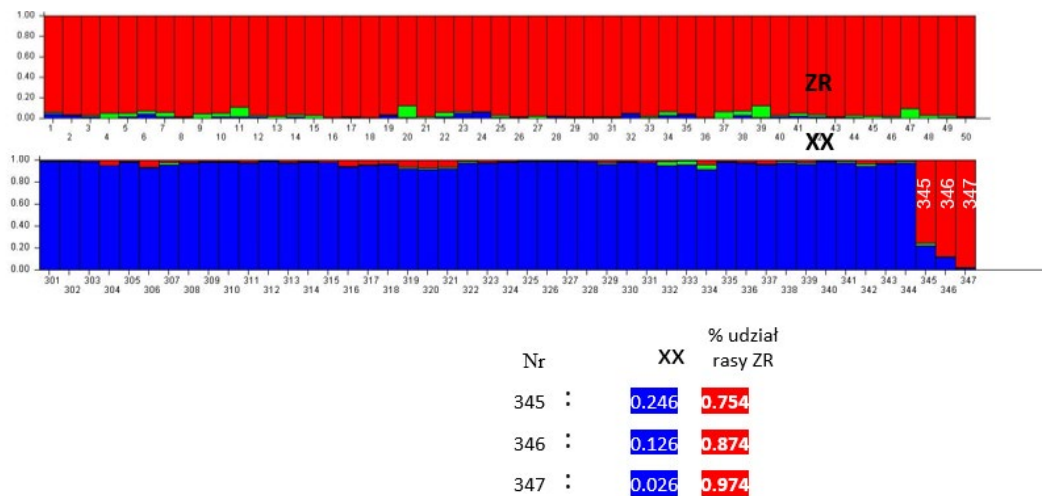
Analizę struktury genetycznej bydła rasy polskiej czerwono-białej (ZR) przeprowadzono na podstawie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA w 12 *loci*, rekomendowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG. Wykonano ją przy zastosowaniu reakcji PCR multiplex (Type-it Microsatellite PCR Kit - Qiagen) oraz fluorescencyjnie znakowanych sekwencji mikrosatelitarnych (barwniki: FAM, VIC, NED, PET). Otrzymane produkty PCR poddano elektroforezie pionowej w sekwenatorze Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer. Wynik rozdziału elektroforetycznego oraz określanie profili DNA przeprowadzono w programie GeneMapper® Software.

Na podstawie analizy określonych profili DNA dla 400 osobników bydła o deklarowanej rasie polskiej czerwono-białej na podstawie bayesowskiej metody Monte Carlo, opartej na łańcuchach Markowa – MCMC, przy użyciu programu STRUCTURE 2.3.4, ustalono populację referencyjną dla rasy polskiej czerwono-białej. W oparciu o dane populacji referencyjnej przeprowadzono analizę struktury genetycznej dla wybranych 150 osobników bydła rasy polskiej czerwono-białej objętej programem zasobów genetycznych.

Wyniki analizy ustalonych profili DNA dostarczyły informacji na temat struktury genetycznej polskiego rodzimego bydła rasy ZR, natomiast zastosowanie symulacji bayesowskiej pozwoliło na określenie stopnia domieszki genetycznej innych ras.

Metoda ta oraz otrzymane wyniki mogą przyczynić się do opracowania zasad selekcji genetycznej bydła ras rodzimych/zachowawczych w kwalifikowaniu do ksiąg hodowlanych oraz programów ochrony.

Rysunek 1. Ustalenie % udziału rasy polskiej czerwono-białej dla trzech osobników ZR objętych programem ochrony zasobów genetycznych.



Zadanie 01-18-16-21

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

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

W ramach zadania przeprowadzono następujące etapy badań:

1. Odchów gęsi w ZD IZ PIB Kołuda Wielka:

- nakład jaj gęsi pomorskiej i kołudzkiej®,
- wylęg gęsi,
- odchów ptaków w przedziałach, po sześć 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 (przygotowanie do uboju, zapewnienie warunków uboju zgodnych ze standardami sanitarno-weterynaryjnymi),
- pobranie piór do izolacji DNA.

2. Pobranie materiału do badań genetycznych i jakości mięsa.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta (samce) gęsi białej kołudzkiej® ojcowskiego rodu W33 oraz gęsi pomorskiej. Wszystkie ptaki utrzymywano do 115. dnia życia (16,5 tyg.) w jednakowych, optymalnych warunkach środowiskowych i żywiono zgodnie z technologią tuczu owsianego. Podczas odchowu i tuczu owsianego kontrolowano indywidualną masę ciała, spożycie paszy oraz liczbę ptaków padłych. Wszystkie mieszanki paszowe, zielonki oraz owies skarmiane w doświadczeniu zostały przekazane do Centralnego Laboratorium IZ PIB w celu określenia wartości pokarmowej.

Na koniec doświadczenia, z każdej grupy wybrano do uboju po 12 gęsi, w celu przeprowadzenia badania ekspresji genów i określenia wydajności poubojowej, jakości mięsa i tłuszczu sadełkowego oraz pobrania krwi i próbek wybranych tkanek i narządów, w których zachodzą procesy metaboliczne mające wpływ na wzrost i wydajność ptaków oraz cechy jakości

mięsa: przysadka mózgowa, podwzgórze, wątroba, serce, jelita, mięsień piersiowy (*pectoralis superficialis*), mięsień dwugłowy uda (*biceps femoris*) i tłuszcz sadełkowy. Wszystkie próbki zostały pobrane i zabezpieczone do dalszych analiz do 20 min. po uboju. Po 24 godzinnym schłodzeniu tuszek w temperaturze 4°C określono kwasowość końcową (pH_{24h}) w mięśni piersiowym (*pectoralis superficialis*) i w dwugłowym uda (*biceps femoris*). Schłodzone tuszki poddane zostały wizualnej 5-punktowej ocenie jakości i następnie uproszczonej analizie rzeźnej.

Na podstawie uzyskanych danych została wyliczona wydajność rzeźna bez podrobów, procentowy udział piersi i nóg w schłodzonej tuszce, mięśni piersiowych i mięśni nóg ze skórą i tłuszczem podskórnym, samych mięśni piersiowych i mięśni nóg skóry z tłuszczem podskórnym, tłuszczu sadełkowego oraz podrobów (żołądka, wątroby i serca) w tuszce.

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. Przeprowadzono instrumentalną ocenę kruchości gotowanego mięsa na podstawie maksymalnej siły cięcia trójkątnym nożem Warner'a-Bratzler'a oraz oceniono parametry tekstury (TPA) podczas testu podwójnego ściskania mięśni piersiowych. Badania wykonano przy pomocy maszyny wytrzymałościowej TA-XT Plus.

Podczas dysekcji, 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.

Uzyskane wyniki po wstępnych obliczeniach poddano weryfikacji statystycznej. Wyniki oceny jakościowej zostaną wykorzystane do badań asocjacyjnych.

3. Izolacja DNA z dutek piór gęsi. Przeprowadzono izolację DNA z 20 próbek.

4. Izolacja białek. Przeprowadzono testową izolację białek z wątroby, z każdej grupy wybierając do uboju po 12 gęsi.

Wyniki:

Badania wykazały istotny wpływ rasy gęsi na masę ciała i masę tuszki oraz na wydajność rzeźną (Tabela 1.) i wyniki analizy rzeźnej (Tabela 2.). Średnia ubojowa masa ciała gęsi pomorskich utrzymywanych zgodnie z technologią chowu owsianego była o blisko 2 kg niższa w porównaniu z owsianymi gęsiami białymi kołudzkimi®. Równocześnie gęsi pomorskie charakteryzowały się niższą masą tuszki ($\leq 0,01$) oraz niższą wydajnością rzeźną ($\leq 0,01$).

Tabela 1. Charakterystyka tuszek gęsi.

Cecha	Gęś pomorska	Gęś biała kołudzka®	SEM
Masa ciała przed ubojem (g)	5282 A	7245 B	296,8
Masa tuszki ciepłej bez podrobów (g)	3528 A	4913 B	209,4
Masa tuszki schłodzonej (g)	3469 A	4857 B	210,1
Straty masy tuszki podczas schładzania (%)	1,69	1,15	0,16
Wydajność rzeźna z podrobami (%)	71,84 A	73,16 B	0,26
Wydajność rzeźna bez podrobów (%)	65,67 A	67,04 B	0,27

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami A, B różnią się przy $P \leq 0,01$.

Tabela 2. Masa elementów tuszki oraz ich udział w masie tuszki patroszonej z tłuszczem podskórnym.

Cecha	Gęś pomorska	Gęś biała kołudzka®	SEM
Piersi całe – mięśnie ze skórą z tłuszczem podskórnym (g)	821,67 A	1080,00 B	40,85
Piersi całe – mięśnie ze skórą z tłuszczem podskórnym (%)	23,69 a	22,24 b	0,38
Mięśnie piersiowe (g)	620,00 A	743,33 B	22,99
Mięśnie piersiowe (%)	17,88 A	15,30 B	0,54
Całe nogi – mięśnie ze skórą z tłuszczem, podskórnym i kośćmi (g)	793,33 A	1103,33 B	47,65
Całe nogi – mięśnie ze skórą z tłuszczem podskórnym i kośćmi(%)	22,88	22,72	0,27
Mięśnie nóg (g)	488,33 A	641,67 B	24,91
Mięśnie nóg(%)	14,09	13,21	0,30
Skrzydła (g)	501,67 A	670,00 B	26,36
Skrzydła(%)	14,47	13,80	0,23
Szyja ze skórą (g)	290,00 A	410,00 B	19,12
Szyja ze skórą(%)	8,37	8,44	0,16
Tłuszcz sadełkowy (g)	186,12 A	290,42 B	20,96
Tłuszcz sadełkowy (%)	5,35	5,97	0,35

Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami a, b różnią się przy $P \leq 0,05$; A, B przy $P \leq 0,01$.

Zadanie 01-18-17-21

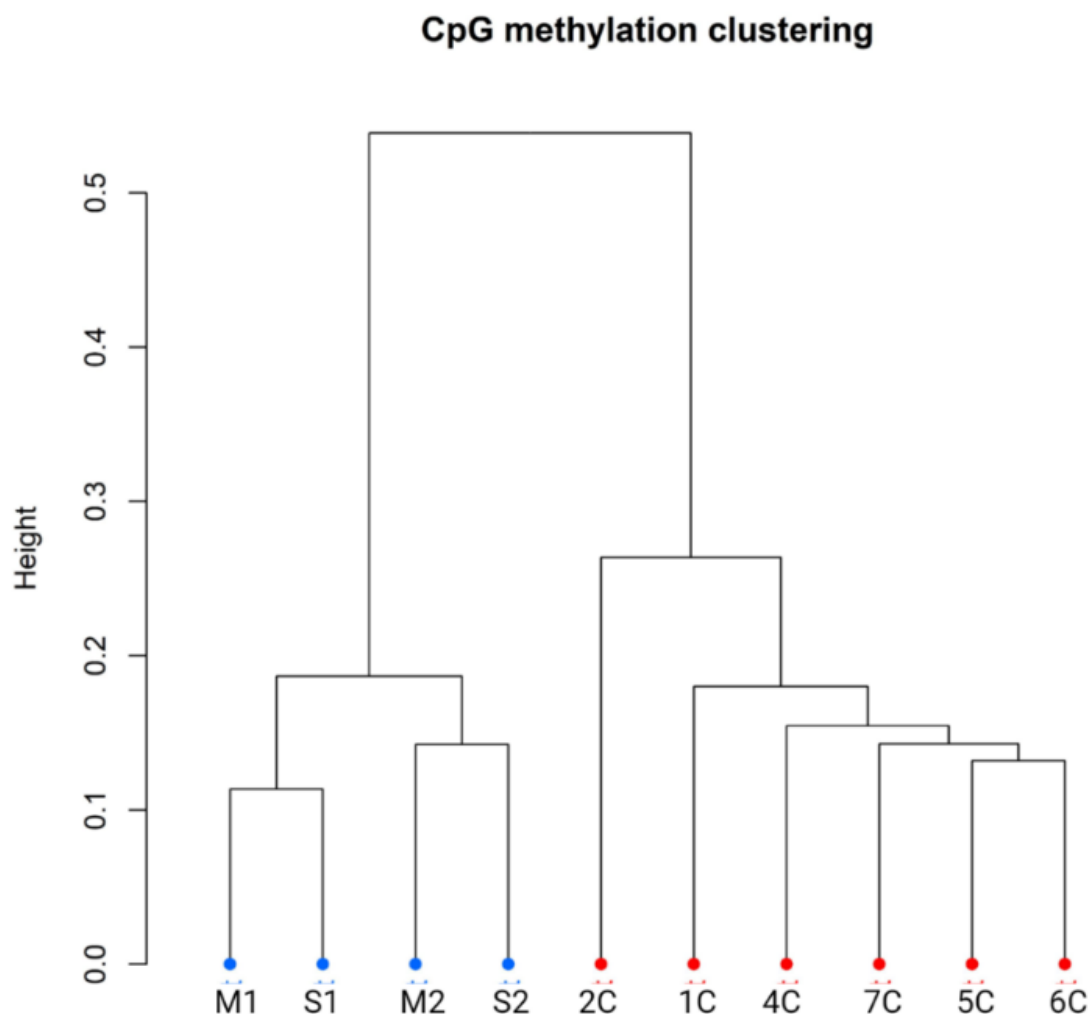
Molekularne tło potencjału komórek chrzęstnych konia w hodowli in vitro po wprowadzeniu fizjologicznych czynników wzrostu.

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

W ramach prac nad adnotacją sekwencji regulatorowych genomu konia, wykorzystano dane z analizy metylacji w skali genomu, wykonane metodą RRBS w celu ustalenia potencjalnych miejsc DNA „funkcjonalnie” różnicujących tkankę chrząstki stawowej koni oraz kości. Materiałem porównawczym były tkanki trzonu kości długich i kości sesamoidalnej od koni pełnej krwi angielskiej oraz wycinki chrząstki stawu pęcinowego od koni zimnokrwistych. Uzyskano znaczne różnice w poziomie metylacji DNA w skali genomu, w postaci oddzielnych klastrów próbek reprezentujących tkankę chrzęstną i kostną (Rysunek 1.). Zidentyfikowano łącznie 3348 odmiennie metylowanych miejsc CpG (DMS) oraz 4788 fragmentów DNA o różnicowej metylacji (DMR) między dwoma rodzajami twardej tkanki łącznej. Funkcjonalna adnotacja genów związanych z występowaniem miejsc DMS i DMR ujawniła obecność grupy genów istotnych dla rozwoju twardej tkanki łącznej oraz metabolizmu kości.

W ramach tych badań określono również znaczenie odmiennie metylowanych fragmentów DNA dla miejsc wiązania białek czynników transkrypcyjnych (TF) istotnych dla rozwoju i biologii tkanki chrzęstnej i kostnej. Funkcjonalna analiza *in-silico* dla białek TF wykazujących powinowactwo do sekwencji nukleotydowych odmiennie metylowanych miejsc CpG wykazała, że wspomniane białka są istotnie zaangażowane w procesy biologiczne specyficzne dla kości (rozwój układu kostnego i angiogeneza) oraz tkanki chrzęstnej (morfogeneza kończyn dolnych). Zastosowanie metody RRBS pozwoliło zidentyfikować różnice epigenetyczne w sekwencjach DNA stanowiących potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, funkcjonalnie różnych dla tkanki chrzęstnej i kostnej, co zostanie wykorzystane w dalszych pracach z zakresu biologii regeneracyjnej z wykorzystaniem komórek twardej tkanki łącznej u koni.

Rysunek 1. Wynik hierarchicznego grupowania próbek RRBS kości (M i S) oraz chrząstki stawowej (C) obrazujący wielkość różnic w wartości metylacji DNA w skali genomu między obydwoma rodzajami twardej tkanki łącznej.



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 pozostałości miodów w żywności dla wegan:

W ramach realizacji badań opracowano i walidowano metodę wykrywania miodu w produktach żywnościowych. Metoda oparta jest na wykryciu DNA specyficznego gatunkowo dla pszczoły miodnej (*Apis Mellifera*).

Sprawdzono działanie metody w zależności od rodzaju miodu oraz jego ilości zawartej w gotowym produkcie. Granica wykrywalności dla metody wynosiła od 0,1 do 1% w zależności od rodzaju miodu. Metoda jest specyficzna gatunkowo, specyficzność biologiczna wynosi 100%. Izolacja DNA jest powtarzalna, ale wydajność izolacji oraz jej czystość dla próbek czystego miodu jest dość niska: $c < 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $A_{26/280} < 1,7$.

W celu poprawienia parametrów izolacji DNA zmodyfikowano wcześniej opracowaną metodę (z użyciem PBS), służącą do ekstrakcji z próbek czystego miodu. Otrzymane w ten sposób izolaty mają korzystniejsze parametry dla dalszej analizy

Opracowanie schematu identyfikacji podgatunków pszczoł:

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*) wyznaczono miejsca polimorficzne w ich sekwencjach nukleotydowych, a następnie zaprojektowano startery pozwalające na ich rozróżnienie:

Zaproponowane startery dają *in-silico* produkty PCR o zróżnicowanej długości dla wybranych podgatunków.

Tabela 1. Różnicowanie podgatunków *Apis mellifera*.

Nazwa startera	Podgatunki pszczoł identyfikowane za pomocą danego startera	Długość otrzymanego produktu PCR
Apism_m_108bp	<i>Apis mellifera mellifera</i>	108 bp
Apis_carn111_cauc127	<i>Apis mellifera ligustica</i> <i>Apis mellifera caucasica</i> <i>Apis mellifera carnica</i>	116 bp
Apis_lig_Apismell_116	<i>Apis mellifera caucasica</i> <i>Apis mellifera carnica</i>	127 bp 111 bp

Rozróżnianie poszczególnych podgatunków wymaga użycia od jednej do trzech par starterów w zależności od podgatunku. Opracowane startery dadzą krótkie produkty PCR przez co mogą być przydatne również dla oznaczania produktów przetworzonych.

Zadanie 01-18-19-21

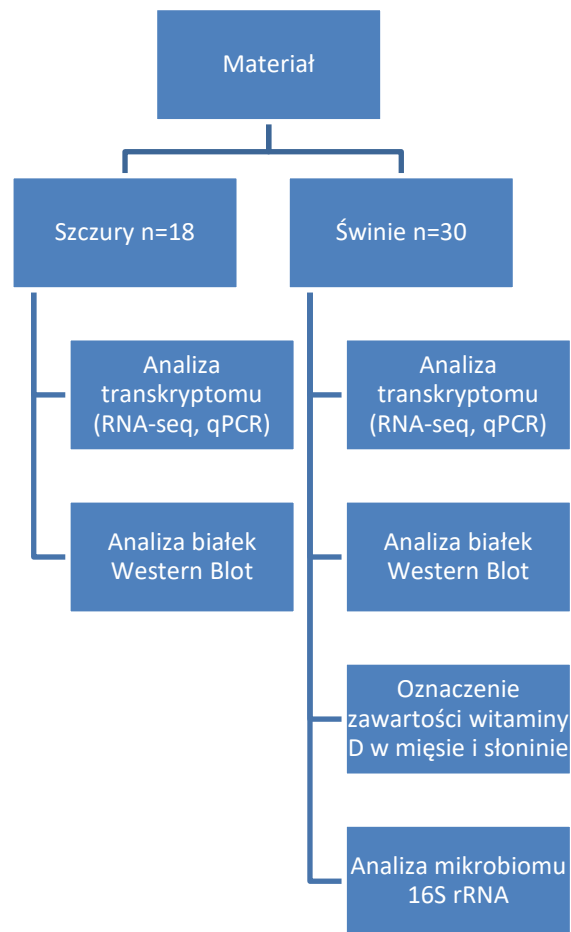
Wpływ suplementacji witaminą D3 na ekspresję genów i białek w jelicie cienkim oraz na skład mikroflory jelitowej u zwierząt modelowych.

kierownik zadania: dr hab. Maria Oczkiewicz, 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.

Założenia metodyczne:

Figura 1. Założenia metodyczne i schemat planowanych analiz.



Syntetyczny opis wyników zadania:

W ubiegłym roku przeprowadzono szczegółową analizę mikrobiomu z treści jelitowej świń otrzymujących różną dawkę witaminy D3 w paszy. Z próbek treści jelitowej wyizolowano bakteryjne DNA z zastosowaniem zestawu Purelink Microbiome DNA Purification Kit (Thermofisher Scientific). Następnie, za pośrednictwem firmy weSEQ.it utworzono biblioteki 16 S RNA, które poddano *Sekwencjonowaniu Następnej Generacji*. Uzyskane wyniki analizowano bioinformatycznie w programach: Trimmomatic, cutadapt 1.9.1, dada2, QIIME2, KRONA v2.6., Mothur, R.

Analiza bioinformatyczna nie wykazała istotnego wpływu witaminy D3 na parametry określające bioróżnorodność mikrobiomu (alfa diversity), takich jak Shannon index czy ACE index (Figura 2., Figura 3.).

Figura 2. Wartości Shannon index w poszczególnych grupach zwierząt: A- brak suplementacji, B – suplementacja 5000 U witaminy D3, C – suplementacja 10000 U witaminy D3.

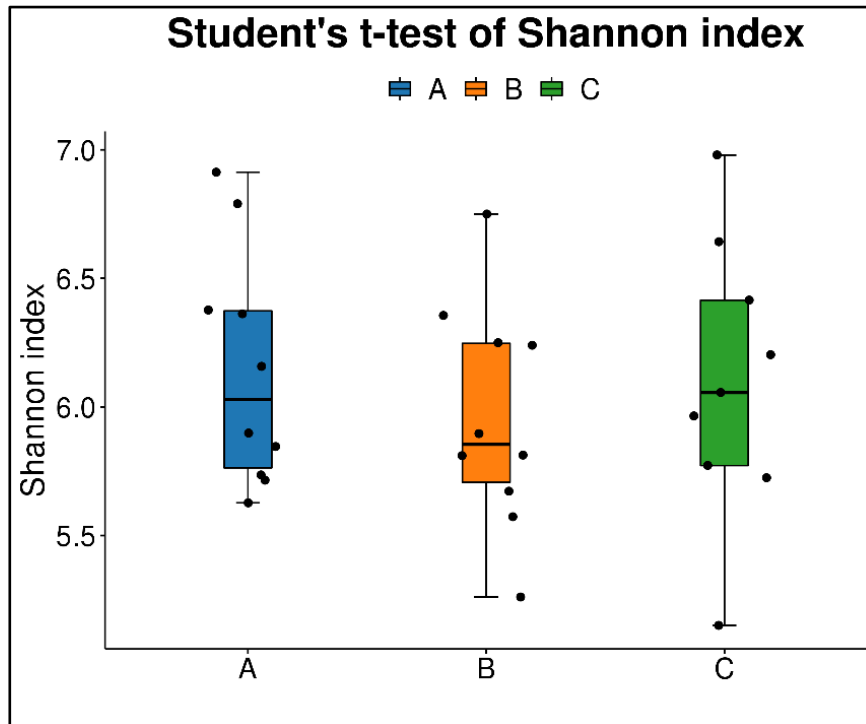
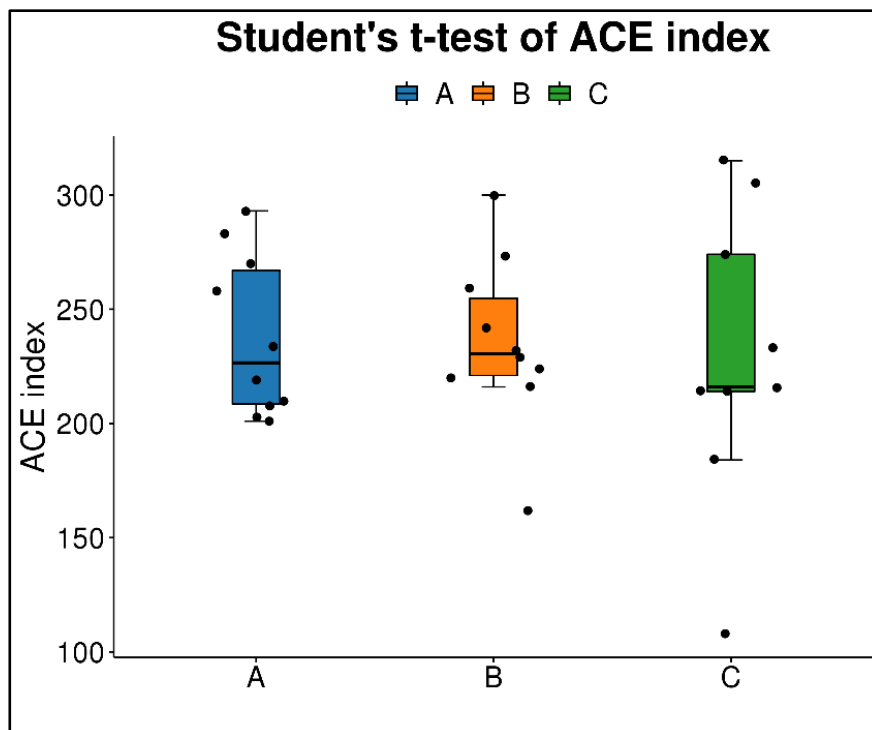


Figura 3. Wartości ACE index w poszczególnych grupach zwierząt: A – brak suplementacji, B – suplementacja 5000 U witaminy D3, C – suplementacja 10000 U witaminy D3.



Analiza ANOVA nie wykazała istotnych różnic pomiędzy zawartością mikrobiomu w analizowanych grupach na żadnym z badanych poziomów taksonomicznych: Phylum - Typ, Class - Gromada, Order - Rząd, Family - Rodzina, Genus - Rodzaj, Species - Gatunek.

Figura 4. Relatywna ilość wykrytych organizmów w zależności od suplementacji witaminą D3 na poziomie Typu: A – brak suplementacji, B – suplementacja 5000 U witaminy D3, C – suplementacja 10000 U witaminy D3.

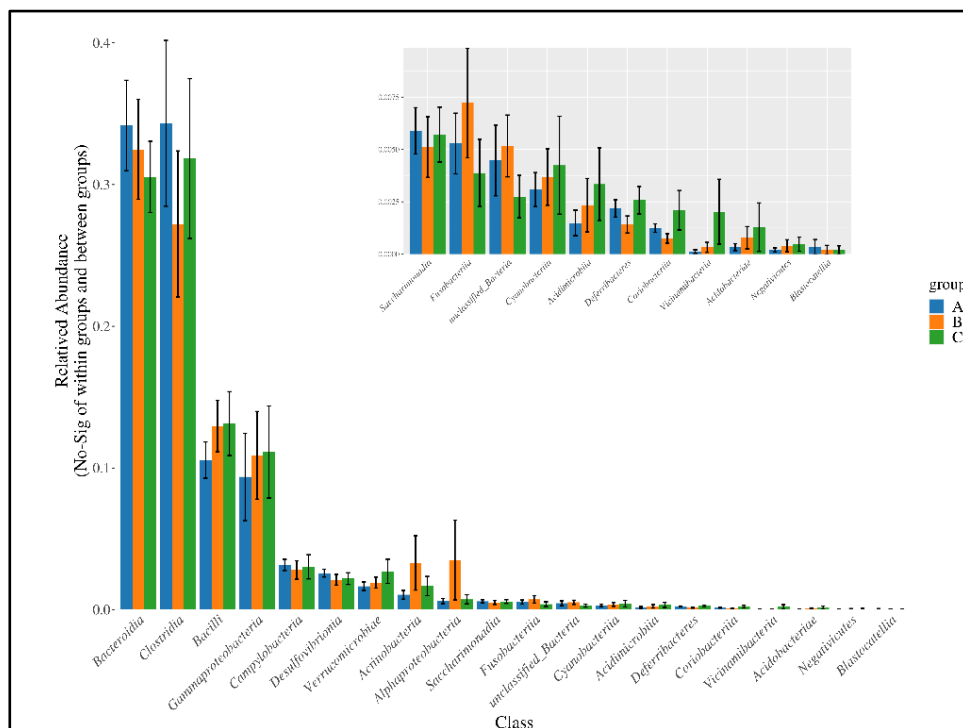
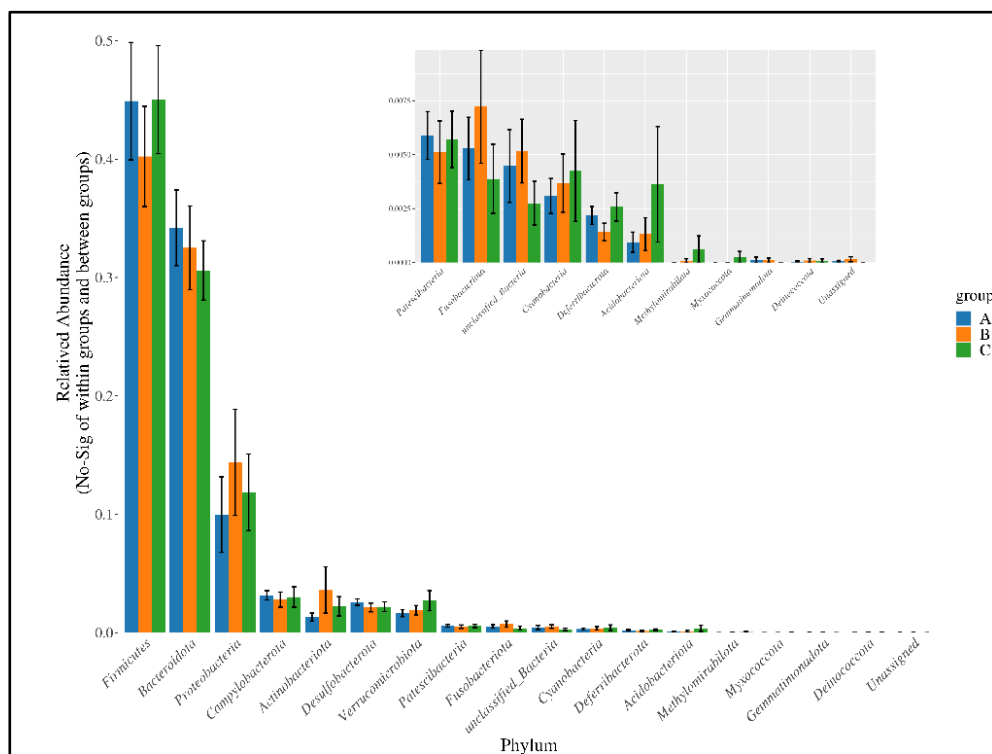


Figura 5. Relatywna ilość wykrytych organizmów w zależności od suplementacji witaminą D3 na poziomie Gromady: A – brak suplementacji, B – suplementacja 5000 U witaminy D3, C – suplementacja 10000 U witaminy D3.



Z kolei analiza Metastats wykazała szereg istotnych różnic w relatywnej ilości wykrytych organizmów na każdym z badanych poziomów taksonomicznych.

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
kierownik: dr hab. Monika Trzcińska

Zadanie 01-19-08-21

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

kierownik zadania: dr inż. Katarzyna Poniedziałek-Kempny

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

W pierwszym etapie badano wpływ forskoliny, siarczanu fenazyny oraz L-karnityny jako dodatków do pożywki do dojrzewania oocytów świni. W ramach przeprowadzonych badań ustalano stężenie forskoliny, L-karnityny oraz siarczanu fenazyny w pożywce do dojrzewania *in vitro* oocytów oraz przeprowadzono ocenę jakościową i ilościową lipidów w dojrzałych oocytach świni. Ponadto, oznaczano poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w dojrzałych oocytach. Na podstawie wstępnych badań dokonano wyboru wariantu doświadczalnego – suplementu forskoliny o koncentracji 15 μ M – w celu zastosowania w dalszych etapach badań.

W drugim etapie realizacji zadania przeprowadzono zapłodnienie *in vitro* oocytów świni, uzyskanych po dojrzewaniu z wybranym wariantem doświadczalnym, tj. dodatkiem 15 μ M forskoliny oraz hodowlę pozyskanych zygot do osiągnięcia stadium blastocysty.

W ostatnim etapie badań oceniano jakość oraz przeżywalność kriokonserwowanych oocytów i zarodków. Wyniki badań przedstawiono w Tabelach 1.-12. oraz na Rycinie 1.

Tabela 1. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w pożywce z dodatkiem forskoliny o koncentracji 10 i 15 μ M (metodą DAPI).

Forskolina	Liczba oocytów ocenionych/ liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 μ M	93/7	77,9
10 μ M	97/7	78,6
15 μ M	89/7	71,7

Test K-W, $p=0,466$

Tabela 2. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w pożywce z dodatkiem L-karnityny o koncentracji 0,5 i 1 mg (metodą DAPI).

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 mg	93/7	77,9
0,5 mg	105/8	78,8
1 mg	85/7	87,5

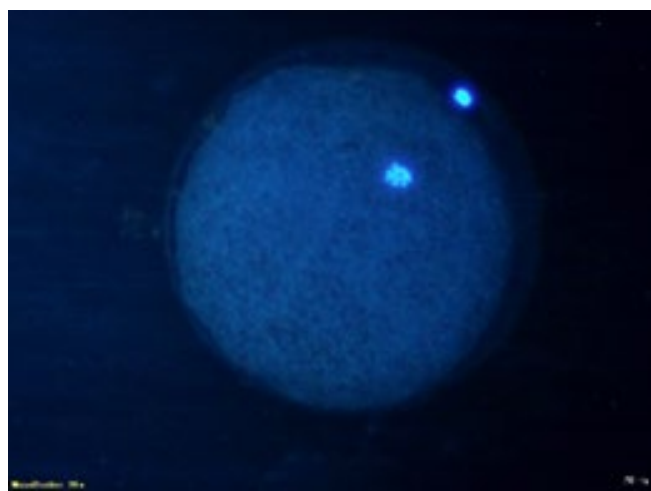
Test K-W, $p=0,2765$

Tabela 3. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w pożywce z dodatkiem siarczanu fenazyny o koncentracji 0,025 i 0,05 μM (metodą DAPI).

Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych / liczba powtórzeń	Oocyty z pierwszym ciałkiem kierunkowym (M II) (%)
0 μM	93/7	77,9
0,025 μM	100/7	77,1
0,05 μM	84/7	76,9

Test K-W, $p=0,8262$

Fot. 1. Oocyt dojrzały w stadium metafazy II w pożywce z dodatkiem forskoliny. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym, po wybarwieniu DAPI.

Tabela 4. Poziom reaktywnych form tlenu w oocytach dojrzałych z dodatkiem forskoliny o koncentracji 10 i 15 μM .

Forskolina	Liczba oocytów ocenionych / liczba powtórzeń	Średni poziom ROS w oocytach (a.u.)
0 μM	60/5	8,38 ^a
10 μM	50/5	16,49 ^b
15 μM	61/5	15,84 ^c

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do reaktywnych form tlenu.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya.

a, b- $p=0,0000001$; a, c- $p=0,0000001$

Tabela 5. Poziom reaktywnych form tlenu w oocytach dojrzałych z dodatkiem L-karnityny o koncentracji 0,5 i 1 mg.

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych / liczba powtórzeń	Średni poziom ROS w oocytach (a.u.)
0 mg	60/5	8,38 ^a
0,5 mg	58/5	10,39
1 mg	67/5	11,51 ^b

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do reaktywnych form tlenu.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya.

Aa, b- $p=0,032$

Tabela 6. Poziom reaktywnych form tlenu w oocytach dojrziałych z dodatkiem siarczanu fenazyny o koncentracji 0,025 μM i 0,05 μM .

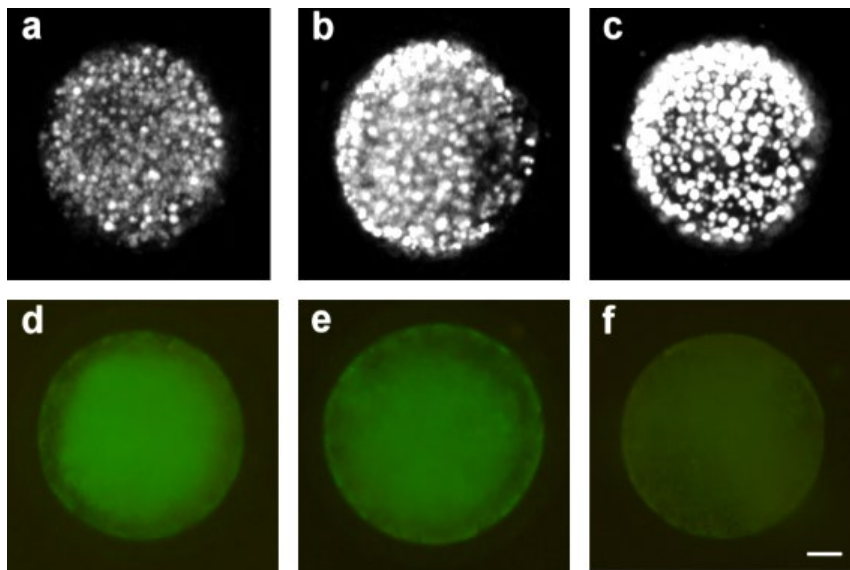
Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	Średni poziom ROS w oocytach (a.u.)
0 μM	60/5	8,38 ^a
0,025 μM	52/5	17,99 ^b
0,05 μM	58/5	20,20 ^c

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do reaktywnych form tlenu.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA test Tukeya

a, b-p=0,0000001; a, c-p=0,0000001

Fot. 2. Lipidy i reaktywne formy tlenu w dojrziałych oocytach świni.



Górny poziom: lipidy w oocytach wybarwione czerwienią Nilu (a) 15 μM FSK, (b) 10 μM FSK (c) grupa kontrolna.

Dolny poziom: reaktywne formy tlenu wybarwione CM-H2DCFDA (d) FSK 15 μM and (e) FSK 10 μM (f) grupa kontrolna.

Tabela 7. Całkowita zawartość lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem forskoliny (o koncentracji 10 i 15 μM).

Forskolina	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	Średnia zawartość lipidów w oocytach (a.u.)
0 μM	60/5	1,000 ^a
10 μM	49/5	0,886 ^b
15 μM	49/5	0,797 ^c

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do zawartości wszystkich lipidów.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya; a, b- p=0,049370; a, c- p=0,000097

Tabela 8. Całkowita zawartość lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem L-karnityny o koncentracji 0,5 i 1 mg.

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	Średnia zawartość lipidów w oocytach (a.u.)
0 mg	60/5	1,000 ^a
0,5 mg	49/5	0,895 ^b
1 mg	49/5	0,656 ^c

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do zawartości wszystkich lipidów.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya; a, c-p=0,000023; b, c-p=0,000022

Tabela 9. Całkowita zawartość lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem siarczanu fenazyny o koncentracji 0,025 μM i 0,05 μM .

Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	Średnia zawartość lipidów w oocytach (a.u.)
0 μM	60/5	1,000 ^a
0,025 μM	52/5	0,995 ^b
0,05 μM	47/5	0,750 ^c

a.u. – arbitrary unit, jednostki względne w odniesieniu do zawartości wszystkich lipidów.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya; a, c-p=0,000024; b, c-p=0,000025

Tabela 10. Zawartość poszczególnych typów lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem forskoliny (o koncentracji 10 i 15 μM).

forskolina	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	TRI	PH	CH
0 μM	60/5	0,4024 ^a	0,2992 ^d	0,2585 ^g
10 μM	49/5	0,3757 ^b	0,2907 ^e	0,1660 ^h
15 μM	49/5	0,3380 ^c	0,2280 ^f	0,1960 ⁱ

TRI – trójglicerydy, PH – fosfolipidy, CH – cholesterol.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya.

a, c-p=0,000024; b, c-p=0,010625; d, f-p=0,002650; e, f-p=0,009948; g, h-p=0,000022; g, i-p=0,001030

Tabela 11. Zawartość poszczególnych typów lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem L-karnityny o koncentracji 0,5 i 1 mg.

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	TRI	PH	CH
0 mg	60/5	0,4024 ^a	0,2992 ^d	0,2585 ^g
0,5 mg	45/5	0,3838 ^b	0,2744 ^e	0,1860 ^h
1 mg	47/5	0,2885 ^c	0,1968 ^f	0,1315 ⁱ

TRI – trójglicerydy, PH – fosfolipidy, CH – cholesterol.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya.

a, c-p=0,000022; b, c-p=0,000022; d, f-p=0,000022; e, f-p=0,000365; g, h-p=0,000060; g, i-p=0,000022; h, i-p=0,003081

Tabela 12. Zawartość poszczególnych typów lipidów w oocytach dojrziałych z dodatkiem siarczanu fenazyny o koncentracji 0,025 μM i 0,05 μM .

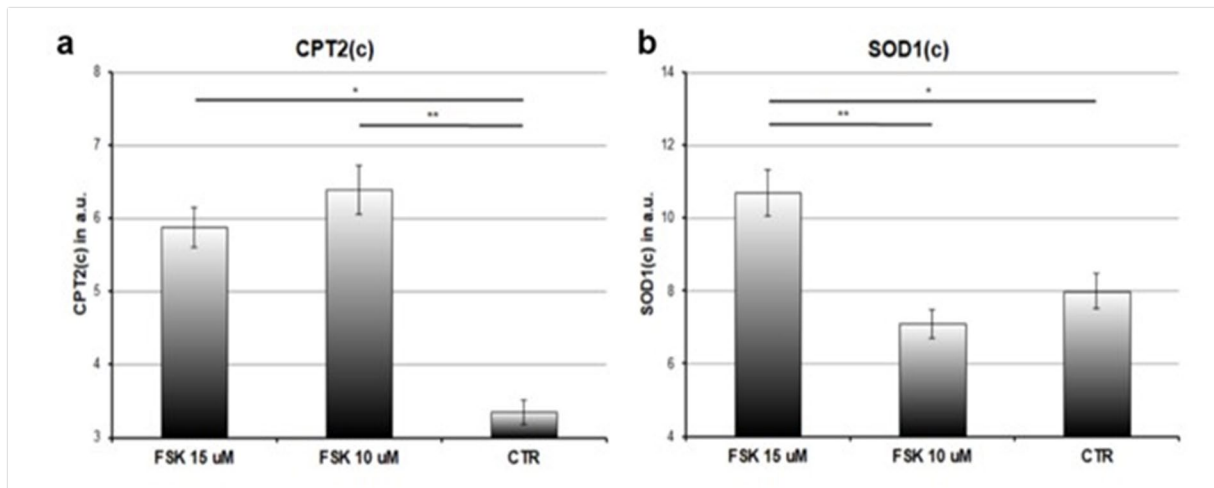
Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych /liczba powtórzeń	TRI	PH	CH
0 μM	60/5	0,4024 ^a	0,2992 ^d	0,2585 ^g
0,025 μM	52/5	0,4402 ^b	0,2887 ^e	0,1754 ^h
0,05 μM	47/5	0,2873 ^c	0,2371 ^f	0,1956 ⁱ

TRI – trójglicerydy, PH – fosfolipidy, CH – cholesterol.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) test Tukeya

a, c-p=0,000022; b, c-p=0,000022; d, f-p=0,005758; e, f-p=0,028173; g, h-p=0,000022; g, i-p=0,000161

Rycina 1. Ekspresja białek CPT2 oraz SOD1 w oocytach świni.



Oceniając rozwój zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* oocytów dojrzewających z dodatkiem 15 μ M forskoliny, wykazano statystycznie istotnie niższy odsetek zarodków dzielących się ($p < 0,05$) oraz moru (p<0,01) w grupie doświadczalnej (+FRS), tj. odpowiednio 34,6% i 24,7% w porównaniu do grupy kontrolnej (40,8% i 40,2%).

W ostatnim etapie badań przeprowadzono ocenę przeżywalności *in vitro* wityfikowanych oocytów po dojrzewaniu z dodatkiem forskoliny, L-karnityny, siarczanu fenazyny i z grupy kontrolnej oraz blastocyst, uzyskanych w wyniku zapłodnienia oocytów dojrzewających z dodatkiem forskoliny i bez tego suplementu. Wityfikacji poddano oocyty z grupy forskoliny (33), L-karnityny (45), siarczanu fenazyny (47) oraz z grupy kontrolnej (41). Po rozmrożeniu i ocenie morfologicznej do IVF przeznaczono 24 oocyty z grupy forskoliny, 39 z grupy L-karnityny, 39 siarczanu fenazyny oraz 32 z grupy kontrolnej. W wyniku zapłodnienia *in vitro* uzyskano pojedyncze zarodki. Jednocześnie wityfikacji poddawano blastocysty z grupy doświadczalnej i kontrolnej. Rozmrożone blastocysty z grupy kontrolnej (6) nie podjęły dalszego rozwoju w hodowli *in vitro*. Ocenie jakości metodą TUNEL poddano jedynie blastocysty z grupy kontrolnej. Wyniki badań dotyczące oceny jakości wityfikowanych blastocyst metodą TUNEL potwierdziły zaawansowaną apoptozę.

W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono istotnego wpływu forskoliny, L-karnityny oraz siarczanu fenazyny na efektywność dojrzewania *in vitro* oocytów świni. Jednocześnie suplementacja pożywki do dojrzewania oocytów świni forskoliną, L-karnityną lub siarczanem fenazyny spowodowała istotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w hodowanych *in vitro* oocytach. Natomiast, w oocytach dojrzewających w pożywce z dodatkiem forskoliny, L-karnityny lub PES udało się istotnie obniżyć poziom lipidów w porównaniu do oocytów dojrzewających w grupie kontrolnej. Suplementacja pożywki do dojrzewania oocytów forskoliną skutkowała obniżeniem wskaźników potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego. Dodatkowo suplementacja pożywki do dojrzewania oocytów świni forskoliną skutkowała wzrostem ekspresji CPT2, który jest wynikiem wzrostu metabolizmu lipidów. Z kolei zastosowanie wyższej koncentracji forskoliny w pożywce do dojrzewania oocytów świni skutkowało wzrostem ekspresji genu SOD1.

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

W dobie zmian klimatycznych istotne jest tworzenie rezerw materiału biologicznego w postaci nasienia zwierząt gospodarskich. Jedynymi metodami pozwalającymi na długoterminowe zabezpieczenie materiału biologicznego jest kriokonserwacja i liofilizacja plemników. Zastosowanie tych metod biotechnologicznych daje możliwość zabezpieczenia materiału na wypadek pojawienia się epidemii lub pandemii chorób zwierzęcych. Ponadto, wykorzystanie technik wspomaganego rozrodu (ARTs, ang. *Assisted Reproductive Techniques*) umożliwia użycie kriokonserwowanych i liofilizowanych plemników do odtworzenia ras a nawet gatunków wymarłych zwierząt.

Cel zadania i założenia metodyczne:

Celem badań było określenie potencjalnych markerów jakościowych nasienia knura, pozwalających na jego efektywne długoterminowe przechowywanie. Jednocześnie określano zależności pomiędzy jakością nasienia a skutecznością pozaustrojowego zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI (ang. *Intracytoplasmic Sperm Injection*) u świń.

Wyniki:

Prace doświadczalne przeprowadzono na nasieniu dwóch knurów rasy wielka biała polska (WBP) (6 ejakulatów/knur), pochodzących ze Stacji Eksploatacji Knurów w Czerminie (Oddział MCB Krasne Sp. z o.o.). Oocyty świni pozyskiwano poubojowo z jajników loszek w Zakładach mięsnych „Tur” oraz „Wieprz”. Nasienie (frakcja gęsta) po pobraniu rozrzedzono w rozcieńczalniku *Biosolwens Plus* i transportowano do Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB. Następnie, nasienie poddano procedurze kriokonserwacji i liofilizacji według metod własnych. Zarówno nasienie świeże, liofilizowane jak i kriokonserwowane poddane zostało cytometrycznej ocenie parametrów jakościowych plemników. Ponadto, przygotowane próbki nasienia świeżego, liofilizowanego i kriokonserwowanego zostały przekazane do Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w celu analiz proteomicznych. Oocyty pozyskiwano poprzez aspirację jajników i poddawano II- stopniowemu dojrzewaniu *in vitro* według metody opracowanej przez Samiec i Skrzyszowska (2012). Tylko dojrzałe *in vitro* oocyty pozbawione komórek wzgórka jajonośnego, posiadające widoczne ciążko kierunkowe przeznaczono do zapłodnienia *in vitro* (ICSI). Po wykonaniu iniekcji (nasienie świeże, liofilizowane lub kriokonserwowane) oocyty poddano elektroaktywacji dwoma impulsami elektrycznymi 1,2 kV/cm przez 60 μ s w komorze do elektroporacji. Hodowlę *in vitro* zarodków prowadzono w inkubatorze, w temperaturze 39°C, 5% zawartości CO₂ i O₂ w powietrzu i maksymalnej wilgotności. Czas trwania hodowli wynosił 6-8 dni. Zarodki oceniano pod względem morfologicznym co 24 godziny. Ponadto, zarodki w stadium blastocysty ekspandującej oceniano przy zastosowaniu metody TUNEL. Wyniki doświadczeń przedstawiono w Tabelach 1.-6.

Tabela 1. Ocena jakości nasienia świeżego knurów rasy WBP przeznaczonego do zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI.

Nr knur/ l. ejakulatów	Chromatyna plemnikowa (SCSA)		Integralność błon komórkowych SYBR-14/PI			Integralność błon komórkowych (YO-PRO-1/PI)		
	prawidłowa	uszkodzona	Plemniki żywe	Plemniki zamierające	Plemniki martwe	Plemnik żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki martwe
	%							
I/6	97,2±2,9	2,8±2,9	87,9±4,2	5,1±0,5	7,0±3,9	85,2±8,7	6,3±6,2	8,5±11,6
II/6	98,9±0,4	1,1±0,4	82,6±7,5	5,4±1,7	12,0±7,0	84,7±16,9	3,0±2,1	12,4±18,0

Tabela 2. Ocena jakości nasienia kriokonserwowanego i liofilizowanego knura nr 1 (3 ejakulatory/knur) rasy WBP przeznaczonego do zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI.

Procedura przechowywania	Chromatyna Plemnikowa (SCSA)		Integralność błon komórkowych SYBR-14/PI		Integralność błon komórkowych (YO-PRO-1/PI)			
	prawidłowa	uszkodzona	Plemniki żywe	Plemniki zamierające	Plemniki martwe	Plemnik żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki martwe
	%							
Kriokonserwacja	93,9±5,1	2,4±1,7	68,6±2,2	2,6±1,4	28,8±0,9	69,3±3,2	1,2±1,4	29,6±4,9
Liofilizacja	98,4±0,1	1,57±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	4,7±3,7	0,1±0,1	95,2±3,8

Tabela 3. Rozwój *in vitro* potencjalnych zygot świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI nasieniem świeżym, pochodzącym od knurów rasy WBP.

Knur	I. oocytów do IVM /l. powtórzeń	I. oocytów do ICSI	I. zarodków dzielących się (%)	I. morul (%)	I. blastocyst (%)
I	84/6	61	40 (65,6)	10 (25,0)	6 (15,0)
II	84/6	49	28 (57,1)	5 (17,9)	2 (7,1)

Tabela 4. Rozwój *in vitro* potencjalnych zygot świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI nasieniem mrożonym, pochodzącym od knura rasy WBP.

Knur	I. oocytów do IVM /n powtórzeń	I. oocytów do ICSI	I. zarodków dzielących się (%)	I. morul (%)	I. blastocyst (%)
I	45/3	34	22 (64,7)	6 (27,2)	5 (22,7)

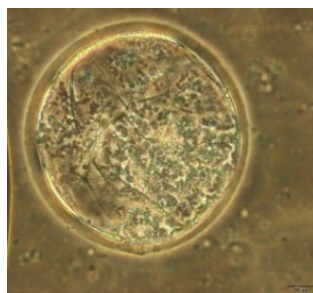
Tabela 5. Rozwój *in vitro* potencjalnych zygot świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI nasieniem liofilizowanym, pochodzącym od knura rasy WBP.

Knur	I. oocytów do IVM/ l. powtórzeń	I. oocytów do ICSI	I. zarodków dzielących się (%)	I. morul (%)	I. blastocyst (%)
I	30/3	23	15 (65,2)	5 (33,3)	5 (33,3)

Tabela 6. Poziom apoptozy oraz liczba jąder komórkowych w blastocystach ekspandujących uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* metodą ICSI z wykorzystaniem nasienia knura rasy WBP.

Nasienie	Liczba ocenionych blastocyst	Liczba jąder apoptotycznych w blastocystach (średnia±SD)	Liczba jąder komórkowych w blastocystach (średnia±SD)	Indeks apoptotyczny (%)
Świeże	6	0,3±0,8	24,2±5,2	1,38
Kriokonserwowane	4	0,3±0,5	40,5±18,5	0,61
Liofilizowane	5	0,6±0,9	31,2±5,3	1,93

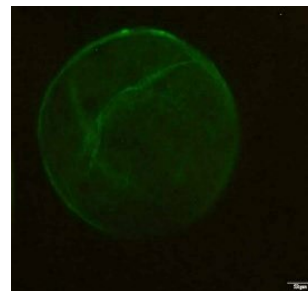
Fot. 1. Blastocysta ekspandująca uzyskana w wyniku ICSI z wykorzystaniem nasienia kriokonserwowanego oceniana z zastosowaniem metody TUNEL.



A) Światło widzialne



B) Ocena całkowitej liczby jąder komórkowych



C) Barwienie TUNEL

Zadanie 04-19-10-21

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

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

Celem zadania było uzyskanie stawki potencjalnie transgeniczných prosiąt, urodzonych z zygot poddanych transfekcji konstrukcją powodującą knock-out genu miostatyny.

Konstrukcja modyfikująca została przygotowana w technologii CRISPR/Cas 9, opracowana, przygotowana i przetestowana na komórkach somatycznych w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu. Konstrukcję wprowadzano do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej świni przy zastosowaniu techniki mikroiniekcji. Zygoty do transfekcji uzyskiwano od superowulowanych samic dawczyń. Po transfekcji zygoty wprowadzano do jajowodów loch biorczyń.

W rezultacie przeprowadzonych prac uzyskano 40 potencjalnie transgeniczných prosiąt. Po odsadzeniu, od prosiąt pobrano biopsję tkanki usznej. Pobrane biopsje przekazano do Katedry Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu, w celu wykonania analiz molekularnych na obecność wprowadzonej modyfikacji genetycznej.

Screening wykonany na DNA wyizolowanym z 40 przekazanych biopsji nie wykazał integracji/ekspresji wprowadzonej modyfikacji.

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

Celem zadania było zastosowanie modulatorów epigenetycznych nowej generacji z grupy niespecyficznych inhibitorów deacetylaz histonów chromatyny jądrowej na potrzeby opracowania innowacyjnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni domowej.

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników:

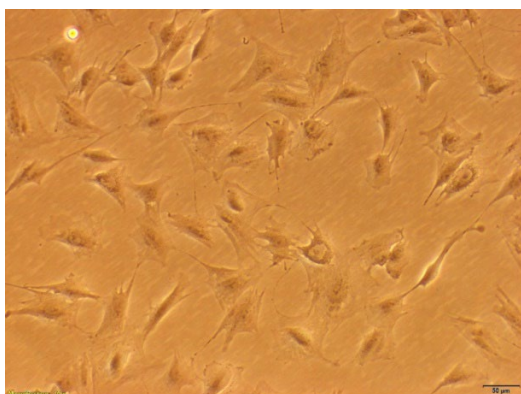
W drugim etapie realizacji niniejszego zadania badawczego rozwijano efektywną sieć współpracy naukowo-badawczej Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB z Zakładem Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ oraz z Zakładem Histologii Collegium Medicum UJ.

W ramach sieci współpracy badawczej, prowadzonej przez wymienione naukowe ośrodki rolnicze, biotechnologiczne, biologiczne i biomedyczne stworzono biorezerwuar 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 transplantacji jąder komórkowych do enukleowanych oocytów (SCNT, ang. *somatic cell nuclear transfer*).

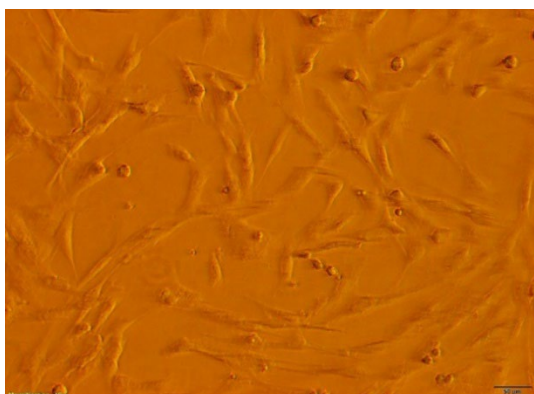
W następnej kolejności, z dostępnego biorezerwuaru linii komórkowych o wysokim potencjale proliferacyjnym *ex vivo* oraz przydatności molekularnej, wyselekcjonowano linie komórek fibroblastycznych pochodzenia skórno-powłokowego do kolejnego etapu prac badawczych, których celem było opracowanie oryginalnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni w wyniku rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder hodowanych *in vitro* fibroblastów dermalnych. Zostały one uprzednio poddane 24-godzinnej transformacji epigenomowej, indukowanej za pośrednictwem nowego, niestosowanego dotąd w klonowaniu somatycznym świń i innych gatunków ssaków, 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 1.) lub komórki fibroblastyczne, niepodlegające TNST-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 mejoetycznego, oocytach-biorcach jąder fibroblastów dermalnych, takie jak: 1) enukleacja dojrziałych *in vitro* oocytów; 2) rekonstrukcja enukleowanych oocytów (ooplastów) z jąder komórek somatycznych złożona z mikroiniekcji komórek-dawców jąder do przestrzeni okołozółtkowej ooplastów oraz elektrofuzji utworzonych kompleksów ooplast-komórka fibroblastyczna; a także 3) jednoczesna aktywacja elektryczna zrekonstruowanych oocytów (hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych, czyli cybryd klonalnych).

W wyniku enukleacji, rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder transformowanych epigenetycznie fibroblastów dermalnych oraz sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów wygenerowano ogółem 112 zarodków klonalnych, które następnie hodowano *in vitro* przez 6 do 7 dni. Spośród 112 hodowanych zarodków klonalnych, aktywność podziałową wykazywało łącznie 104 (92,9%) zarodków, a do stadiów moruli i blastocysty rozwinęło się, odpowiednio: 86 (76,8%) oraz 43 (38,4%) zarodków. W grupie kontrolnej, w następstwie enukleacji, rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder nietransformowanych epigenetycznie fibroblastów dermalnych oraz sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów uzyskano łącznie 127 zarodków klonalnych, których potencjał rozwojowy charakteryzował się następującymi parametrami: 1) zdolność bruzdkowania: 88/127 (69,3%), zdolność do osiągnięcia stadium moruli: 63/127 (49,6%) oraz zdolność do osiągnięcia stadium blastocysty: 29/127 (22,8%). Wyniki przeprowadzonych prac badawczych potwierdzają, że zdolności jąder komórkowych fibroblastów dermalnych, które poddano TNST-zależnej modulacji epigenetycznej, do pokierowania rozwojem *ex vivo* klonalnych zarodków świni utrzymywały się na znacząco wyższym poziomie niż kompetencje jąder niemodulowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych.

Rycina 1. Hodowane *in vitro* komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, poddane 24-godzinnej modulacji epigenetycznej za pośrednictwem TNST.



Rycina 2. Komórki fibroblastyczne tkanki skórno-powłokowej świni, niepodlegające TNST-zależnej modulacji epigenetycznej w warunkach hodowli *in vitro*.



Podsumowanie i wnioski:

Wymiernym efektem realizacji niniejszego zadania było opracowanie innowacyjnej i efektywnej technologii uzyskiwania klonalnych zarodków świni jako obiecującego instrumentu wykorzystywanego na potrzeby nowoczesnej hodowli oraz biotechnologii reprodukcyjnej zwierząt gospodarskich. 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 04-19-12-11

Opracowanie kompleksowego systemu okresowej oceny nasienia buhajów przechowywanego w zasobach banków kriogenicznych.

kierownik zadania: dr hab. Monika Trzcńska

Celem zadania było przeprowadzenie badań jakościowych, przechowywanego w Banku Materiałów Biologicznych (BMB) nasienia buhajów, w oparciu o zastosowanie panelu metod obejmującego standardowe parametry, jak również ocenę integralności błon komórkowych plemników, fragmentacji DNA, potencjału błon mitochondrialnych oraz poziomu ATP w plemnikach. Ponadto, przygotowano wstępny projekt witryny internetowej BMB na której planowane

jest umieszczanie informacji dotyczących wyników oceny jakości zgromadzonego materiału biologicznego.

Ogółem, oceniono 147 dawek nasienia pochodzących od 49 buhajów rasy polska czerwona (RP) oraz polska czarno-biała (ZB) (3 ejakulatory/buhaj) pobieranych i kriokonserwowanych w latach 1966 – 1989. Średnia całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu wahała się w przedziale od $13,7 \pm 5,7\%$ do $88,7 \pm 9,5\%$ odpowiednio dla buhajów rasy polskiej czerwonej: Napoleon II oraz Balaton. Odsetek plemników żywych w nasieniu buhajów obserwowano na poziomie od $10,2 \pm 3,9\%$ do $79,7 \pm 8,8\%$ odpowiednio dla buhaja Napoleon II oraz Domal rasy polskiej czarno-białej. W nasieniu wszystkich badanych buhajów stwierdzono odsetek plemników z fragmentacją DNA na poziomie niższym niż 3,5%. Najwyższy odsetek plemników apoptotycznych ($11,8 \pm 1,5\%$; $10,8 \pm 1,6\%$ oraz $10,3 \pm 1,3\%$) stwierdzono odpowiednio w nasieniu buhaja Funt (ZB), Napoleon II (RP) oraz nasieniu buhaja Pedant (ZB). Najniższy poziom ATP w plemnikach zaobserwowano u dwóch buhajów rasy ZB ($26,2 \pm 1,7$ pMol; $29,7 \pm 6,6$ pMol) i jednego RP ($26,8 \pm 7,9$ pMol).

Podsumowanie i wnioski:

1. Analiza ruchliwości za pomocą systemem CASA wykazała odsetek plemników o ruchu całkowitym poniżej 30% u dwóch buhajów spośród 49 badanych (4%).
2. Ocena parametrów strukturalno-funkcjonalnych plemników wykazała podwyższony odsetek plemników ze zmianami apoptotycznymi i niski odsetek plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym w nasieniu buhajów, u których ruchliwość plemników została oceniona poniżej 30%.
3. Obniżone parametry strukturalno-funkcjonalne, tj. odsetek plemników żywych z integralną błoną komórkową, odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym i poziom ATP obserwowano w nasieniu buhaja Pedant (ZB) pomimo stwierdzonego odsetka plemników ruchliwych powyżej 30%.
4. Fragmentacja DNA plemników stwierdzona u wszystkich badanych buhajów na poziomie niższym niż 3,5% świadczy o wysokiej stabilności chromatyny plemnikowej materiału biologicznego przechowywanego w BMB.
5. Kontrola izolowanego materiału buhajów Napoleon II (RP), Pedant (ZB) oraz Funt (ZB) wykazała obniżone parametry jakościowe nasienia wykluczające ich użycie w standardowej inseminacji, lecz pozwalające na ich zastosowanie do zapłodnienia *in vitro* (metoda ICSI).
6. Opracowany kompleksowy system oceny nasienia buhajów przechowywanego w Banku Materiałów Biologicznych Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB pozwala na precyzyjne szacowanie wartości biologicznej przechowywanego materiału i jego wykorzystanie w rozrodzie bydła.

Zadanie 04-19-13-11

Optymalizacja metod izolacji i kriokonserwacji komórek zarodkowych kaczek.

kierownik zadania: dr hab. Marcin Samiec, prof. IZ PIB
(do 31.01.2022 roku dr hab. Mirosław Lisowski)

Celem zadania było opracowanie nowej procedury badawczej ukierunkowanej na stworzenie modelu *in vitro* dla potrzeb wyprowadzania *ex ovo* zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) pochodzenia blastodermalnego z zapłodnionych jaj kaczki domowej (*Anas platyrhynchos ferus domesticus* lub *Cairina moschata domestica*).

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników:

Podjęcie prac badawczych w ramach zadania wiązało się z opracowaniem i optymalizacją zupełnie od nowa metod: 1) izolacji komórek blastodermalnych (BCs; ang. blastodermal cells); 2) wyprowadzania stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (ESCs; ang. embryonic stem cells) z wyizolowanych subpopulacji komórek BCs; oraz 3) hodowli *in vitro* i kriokonserwacji wyprowadzonych linii komórkowych ESCs.

W pierwszym okresie realizowanego zadania, wyselekcjonowano 60 samic-dawczyń zapłodnionych jaj spośród 120 osobników płci żeńskiej tworzących stada zarodowe następujących ras kaczki domowej, objętych ochroną zasobów genetycznych: pekin krajowy P-33 i/lub pekin angielski linia syntetyczna Ls-A i/lub pekin duński P-8 i/lub pekin francuski P-9 i/lub mieszaniec Kh0-1 i/lub kaczka w typie pomniejszonym K-2. Selekcja pozytywna samic wymienionych ras kaczek była ukierunkowana na weryfikację wydajności nieśnej (stopnia nieśności), długości okresu nieśności oraz stopnia zapłodnialności jaj zniesionych przez kaczki w następstwie ich naturalnego unasienienia/zaplemnienia przez zaklasyfikowane do kopulacji kaczory. Określenie stopnia zapłodnialności jaj będzie stanowić podstawę do późniejszej ich kwalifikacji jako biorezerwuaru komórek tarczki zarodkowej (blastodermi), które w jajach poli- i telolecytalnych ptaków prowadzą do powstania w wyniku bruzdkowania częściowego tarczkiowego (meroblastycznego) – w obrębie bieguna animalnego (twórczego) jaj – zarodków w stadiach blastuli/dyskoblastuli lub gastruli. Z wyizolowanych komórek blastodermi wyprowadzane będą linie zarodkowych komórek macierzystych, tj. pierwotnych komórek zarodkowych kaczki domowej (*Anas platyrhynchos ferus domesticus* lub *Cairina moschata domestica*).

Z uwagi na fakt, że sezon nieśności stad zarodowych następujących ras kaczki domowej, objętych ochroną zasobów genetycznych (pekin krajowy P-33, pekin angielski linia syntetyczna Ls-A, pekin duński P-8, pekin francuski P-9, mieszaniec Kh0-1, kaczka w typie pomniejszonym K-2) jest ograniczony do kilku miesięcy w roku, podjęto efektywne działania mające na celu opracowanie nowej procedury badawczej ukierunkowanej na stworzenie modelu *in vitro* wyprowadzania zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) kury domowej pochodzenia blastodermalnego na potrzeby:

1. określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, migracji oraz proliferacji *ex ovo* komórek ESCs kaczki domowej (Rycina 1.), przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biotechnologii reprodukcyjnej oraz embriologii eksperymentalnej i stosowanej – w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej;
2. określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji przez komórki ESCs kaczki domowej (Rycina 2.), przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biotechnologii i biologii molekularnej – w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej.

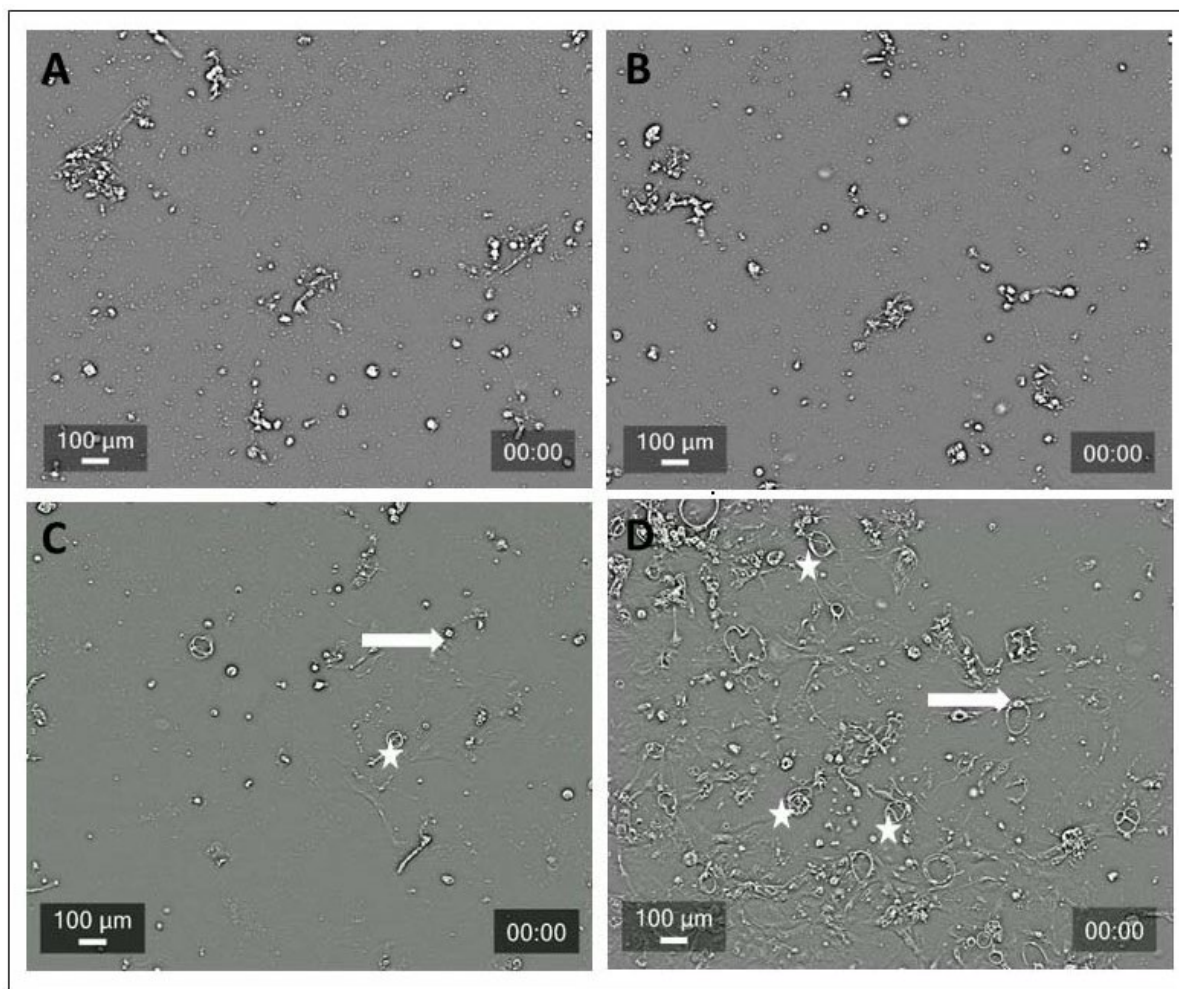
W ramach przeprowadzonych eksperymentów, zapłodnione jaja przechowywano do czasu izolacji komórek BCs w pomieszczeniu schłodzonym do temperatury 17-18°C. Bezpośrednio przed izolacją komórek BCs, jaja przemywano 70% etanolem, w celu zachowania warunków jałowych. Tarczki zarodkowe izolowano z jaj w X stadium rozwoju embrionalnego, z wykorzystaniem krążków bibułki filtracyjnej. W każdym z 3 powtórzeń eksperymentalnych użyto 15 zapłodnionych jaj. Po izolacji, tarczki słuکیwano do sterylnych 15-mL probówek typu Falcon przy użyciu 1×PBS (bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺; CMF-PBS; ang. calcium/magnesium-free phosphate-buffered saline; pH 7.2). Wykorzystując jałowe pipetki pasteurowskie, mechanicznie roz-

praszano komórki w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Następnie, uzyskaną zawiesinę komórkową wirowano przez 10 minut ze względnym przyspieszeniem odśrodkowym $90 \times g$, w temperaturze pokojowej. Po usunięciu supernatantu, uzyskany precypitat komórkowy zawieszano w 5 mL pożywki hodowlanej Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), wzbogaconej 1,5% surowicy płodów bydłych (FBS), 2% (v/v) suplementu B-27TM Plus (wolny od surowicy, zdefiniowany chemicznie suplement nowej generacji zawierający m.in. antyoksydanty i składniki troficzno-energetyczne, który zapewnia najwyższy wskaźnik przeżywalności *in vitro*, a także zachowanie wysokiej aktywności proliferacyjnej oraz zdolności do samoodnawiania i utrzymania nieodróżnicowanego statusu zarodkowych komórek macierzystych w warunkach hodowli jednowarstwowej), 2 μ L/mL SCF (polipeptydowy czynnik wzrostu komórek macierzystych; ang. stem cell factor) oraz koktajlem antybiotykowym penicyliny i streptomycyny (Penistrep). Koncentrację wysiewanych komórek w 1 mL zawiesiny określano przy użyciu elektronicznego licznika komórek TC20™ Automated Cell Counter. Komórki blastodermalne wysiewano do naczyń hodowlanych w gęstości 3×10^5 komórek/mL, zakładając/inicjując hodowlę pierwotne komórek BCs, z których po przeprowadzaniu pasaży prowadzących do podwojenia subpopulacji komórkowych, wyprowadzano linie/szczepy zarodkowych komórek macierzystych (ESCs). Hodowle komórkowe prowadzano w inkubatorze o ściśle określonych warunkach termiczno-atmosferycznych (38°C, 5% CO₂ w powietrzu, maksymalna wilgotność względna) albo przez 96 godzin albo przez 14 dni.

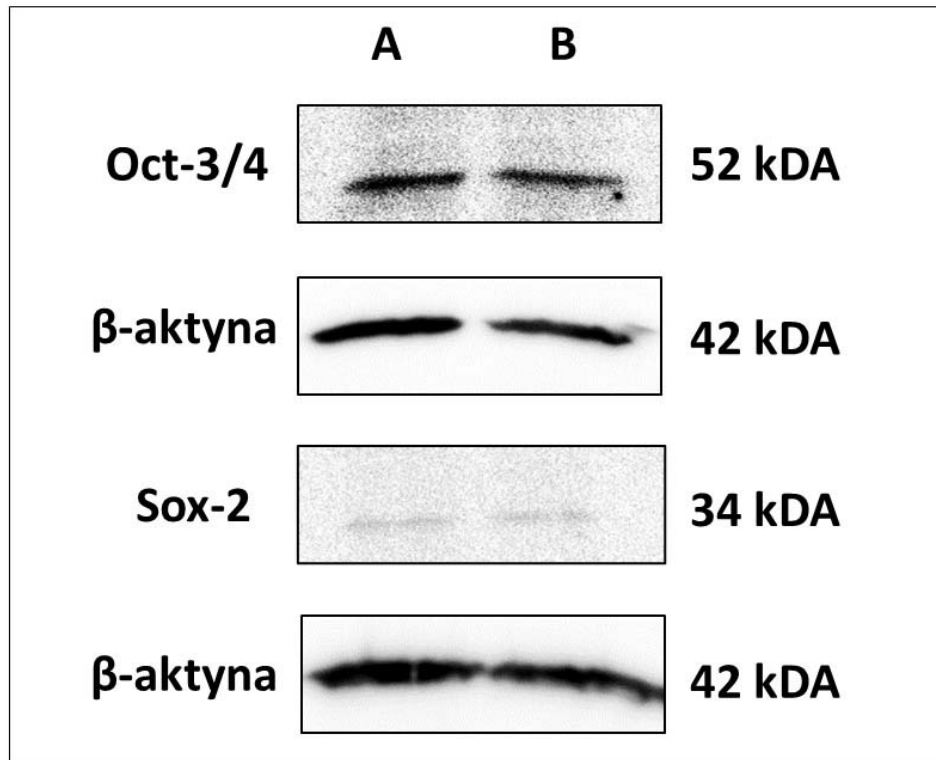
W celu ustalenia optymalnych warunków hodowli wykorzystano różne naczynia hodowlane oraz różne typy substratów pokrywających denne części naczyń hodowlanych. Dlatego też, układ doświadczalny obejmował dwie serie eksperymentów. W pierwszej serii eksperymentów, hodowle komórkowe były zakładane i przeprowadzane w następujących naczyniach hodowlanych: i) butelki hodowlane SPL Life Sciences Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym (Rycina 1. A); ii) butelki hodowlane Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ , zwiększającej adherentność i siły przyciągania elektrostatycznego komórek do podłoża (Rycina 1. B); oraz iii) sterylne, wysokościenne mikro płytki 8-komorowe Ibidi z dnem szklanym powlekany syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine) (Rycina 1. C). Z kolei, w drugiej serii eksperymentów, hodowle komórkowe były zakładane i przeprowadzane w polistyrenowych szalkach hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (Rycina 1. D). Dokumentację mikrofotograficzną hodowanych komórek ESCs prowadzono w mikroskopie odwróconym (Nikon Ti-U), wyposażonym w kamerę Nikon DS-Fi1c-U3 (Tokio, Japonia).

Stwierdzono, że po 96 godzinach hodowli z wykorzystaniem polistyrenowych butelek hodowlanych SPL Life Sciences oraz Nunc™EasYFlask™ (z podłożem typu Δ), pomimo wcześniej zaobserwowanej progresji w procesach adhezji, migracji i proliferacyjnego wzrostu *in vitro*, komórki BCs zaczęły masowo odklejać się od podłoża. Natomiast, po 14 dniach hodowli podtrzymującej komórki blastodermalne z wykorzystaniem szklanych mikro płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany syntetycznym substratem polimerowym - poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine) oraz plastikowych szalek hodowlanych powlekanych kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) wyizolowano białko całkowite, w kierunku określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych warunkujących pluripotencję wyprowadzonych linii komórek ESCs, poprzez przeprowadzenie analizy Western-blot (W-B) białek markerowych komórek pluripotentnych: Oct3/4 (ang. octamer-binding transcription factor 3/4) oraz Sox2 (ang. sex-determining region Y (SRY)-box 2) (Rycina 2.).

Rycina 1. Opracowanie modelu *in vitro* wyprowadzania zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) kury domowej pochodzenia blastodermalnego na potrzeby określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, migracji oraz proliferacji *ex ovo* komórek ESCs kaczki domowej. Analiza proliferacyjnego wzrostu oraz ocena cytologiczna blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) kury domowej w mikroskopie skanującym CELLCYTE X (CELLINK Life Science) po 7 dniach hodowli *in vitro* z wykorzystaniem: A) butelek hodowlanych SPL Life Sciences Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym; B) butelek hodowlanych Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ; C) szklanych mikro płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany syntetycznym substratem polimerowym - poli-L-lizyną (μ-Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) oraz D) polistyrenowych szalek hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes). W adherentnych hodowlach prowadzonych z wykorzystaniem polistyrenowych szalek hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (D) zaobserwowano blastodermalno-pochodne komórki ESCs proliferujące w monowarstwie. Zarówno w hodowlach prowadzonych z wykorzystaniem szklanych mikro płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany poli-L-lizyną (μ-Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) (C), jak i z wykorzystaniem szalek hodowlanych typu SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes (D) komórki ESCs posiadają charakterystyczne duże jądra (oznaczone gwiazdkami); w ultrastrukturalnym obrazie nukleoplazmy jąder komórkowych można zidentyfikować również jąderka – najczęściej zlokalizowane blisko wewnętrznej warstwy otoczki jądrowej (oznaczone strzałkami).



Rycina 2. Opracowanie modelu *in vitro* wyprowadzania zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) kury domowej pochodzenia blastodermalnego na potrzeby określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji *ex ovo* przez komórki ESCs kaczki domowej. Analiza półilościowa Western-blot (W-B) biomarkerów pluripotencji Oct-3/4 i Sox-2 na poziomie białka całkowitego, wyizolowanego z blastodermalno-pochodnych komórek ESCs po 7 dniach ich hodowli *in vitro* z wykorzystaniem szklanych mikroptytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) (A) oraz z wykorzystaniem polistyrenowych szalek hodowlanych z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (B).



Podsumowanie i wnioski:

Na podstawie analizy morfologicznej oraz półilościowej W-B stwierdzono, że wyizolowane frakcje komórek blastodermalnych, z których wyprowadzono stabilne linie zarodkowych komórek macierzystych (Rycina 1. C i 1. D), wykazują cechy fenotypowe dla nieodróżnionych komórek ESCs, w tym obecność czynników transkrypcyjnych Oct3/4 oraz Sox2, determinujących charakter pluripotentny (Rycina 2.). W związku z powyższym, do dalszych eksperymentów ukierunkowanych na stworzenie modeli *in vitro* wyprowadzania stabilnych mitotycznych linii komórek ESCs (Rycina 1. C i 1. D), pochodzących z blastodermi dyskoblastuli kaczki domowej, z powodzeniem mogą być wykorzystywane zarówno szklane mikroptytki 8-komorowe Ibidi z podłożem powlekany syntetycznym substratem polimerowym - poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine), jak i polistyrenowe szalki hodowlane z dnem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes). Dodatkowym atutem tych wstępnych badań ukierunkowanych na opracowanie strategii wyprowadzania stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (pierwotnych komórek zarodkowych) z wyizolowanych komórek blastodermalnych kaczki domowej jest ich pionierski i innowacyjny charakter, który stanowi solidną podstawę programową dla realizacji i powodzenia założeń dalszych, bardziej zaawansowanych prac badawczych z zakresu biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej oraz badań interdyscyplinarnych na styku biomedycyny, transgeniki oraz biologii i biotechnologii molekularnej.