

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

Cel badań:

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

Założenia metodyczne:

Podstawowy materiał doświadczalny będzie stanowić populacja krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, utrzymywanych w fermach należących do zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. W ww. gospodarstwach od kilku lat jest realizowany szczegółowy monitoring krów obejmujący stosowanie zabiegów profilaktycznych, prewencyjnych, medycznych oraz występowanie schorzeń, a także jest przeprowadzane regularne genotypowanie części krów. Materiał kliniczny (tkanka gruczołu mlekowego, endometrium oraz cysty jajnika, względnie próbki mleka, krew) do badania profilu ekspresji genów dla każdej jednostki chorobowej zostanie pobrany od 12 krów (6. o stwierdzonej, najwyższej podatności na występowanie *mastitis*, *metritis* i występowanie torbieli jajnika oraz grupy kontrolne krów, obejmujące zwierzęta, które nigdy nie chorowały). Zwierzęta zostaną wytypowane na podstawie wyników analizy fenotypowej, rodowodowej i genetycznej uzyskanej z systemu baz danych PLOWET oraz w bazach Afifarm i Afifarm Net. Biopsje tkanki gruczołu mlekowego będą wykonywane w ubojniach na zwierzętach brakowanych w gospodarstwach zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Planuje się również pozyskać komórki somatyczne z mleka krów o najwyższej podatności na występowanie *mastitis* oraz grupy kontrolnej krów. W ramach badań zostanie przeprowadzone genotypowanie krów, od których pobrano materiał do analiz RNA-seq. Dodatkowy materiał doświadczalny będą stanowiły genotypy buhajów oraz krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej zdeponowane w bazie genotypów SNP Instytutu Zootechniki PIB, które genotypowano z wykorzystaniem mikromacierzy SNP Illumina EuroG LD (przynajmniej w wersji 8). Na podstawie informacji zgromadzonych w instytutowych bazach danych oraz materiału pobranego od wytypowanych zwierząt zostanie wykonanych szereg analiz: genomu (np. GWAS, CNV), transkryptomu (analiza różnicowej ekspresji genów, analiza ontologii genów, analiza szlaków metabolicznych, identyfikacji lncRNAs, ekspresji specyficznej dla *allelu*), meta analiza danych, a także analizy z zakresu genetyki populacji. Wyniki posłużą do opracowania zindywidualizowanych, molekularno-populacyjnych indeksów (wskaźników) selekcyjnych, ułatwiających pracę hodowlaną w zakresie ww. cech zdrowotnych w wysokoprodukcyjnych stadach bydła mlecznego.

Syntetyczny opis wyników zadania:

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

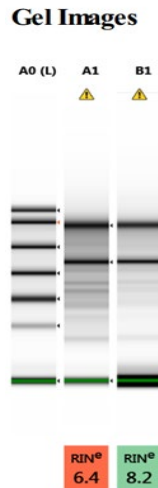
W 2021 roku, w bazie PLOWET gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB. Spośród ok. 5000 rekordów, najczęściej jako pojedyncza choroba, występowało *mastitis* (2356 przypadków), *metritis* (1492 przypadków) oraz cysty jajnika (1127 przypadków). W Instytucyjnej bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 2100 krów z zakładów doświadczalnych. Z tej liczby ponad 1500 krów znajduje się na liście zwierząt odnotowanych w bazie PLOWET.

Na podstawie danych, rodowodowych i genomowych, przeprowadzono analizę struktury genetycznej populacji krów. W tym celu, w oparciu o identyfikację powtórzeń krótkich odcinków homozygotyczności w genomie, obliczono współczynniki inbredu genomowego (F_{ROH}). Wyniki analizy wskazały na zwiększoną częstość występowania *mastitis*, *metritis* i torbieli jajnika wraz ze wzrostem poziomu zimbredowania. W związku z tym, przy opracowywaniu algorytmu optymalizującego wybór zwierząt, poza wynikami analizy fenotypowej, wartości hodowlanych i spokrewnień krów – kandydatek do pobierania materiału biologicznego, uwzględniono także efekt inbredu genomowego. Na tej podstawie wytypowano zwierzęta, od których pobierano materiał do badań. Regresja na inbred (jako istotny efekt) została także uwzględniona w trakcie opracowywania modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych.

W roku sprawozdawczym kontynuowano również badania z zakresu analizy genomu, m.in. analizę asocjacyjną (GWAS) pomiędzy markerami genetycznymi SNP a ww. cechami (schorzeniami). Do analizy użyto wartości fenotypowych cech: *mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika i były one dostępne dla około 5000 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Każda z krów została zgenotypowana przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip, zawierającej genotypy 54 609 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) lub Illumina BovineLD Genotyping BeadChip zawierającej genotypy 7931 SNP. Genotypy osobników zgenotypowanych, przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineLD Genotyping BeadChip, zostały zimputowane do gęstości mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip. W dalszej analizie wykorzystano polimorfizmy o minimalnej wartości $MAF > 1\%$ oraz minimalnej jakości genotypowania $> 99\%$. Kryteria te spełniło 46 216 SNP. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 54 SNPs statystycznie istotnie związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 19 genów kandydujących związanych z występowaniem tych schorzeń. W 2021 roku wystąpiły okresowe utrudnienia w pobieraniu tkanek do badań molekularnych od części wytypowanych zwierząt (szczególnie w pierwszym półroczu i czwartym kwartale), związane z brakiem możliwości współpracy z ubojniami i/lub lekarzami weterynarii wynikającymi z nałożonych kwarantann. Sytuacja ta wymaga zwiększenia liczby zwierząt, od których, zgodnie z harmonogramem zadania, będą pobierane tkanki w 2022 roku. Pobrany materiał badawczy posłużył m.in. analizie jakościowej i optymalizacji metody izolacji RNA. Z próbek tkanek w ilości 0,5 cm x 0,5 cm zamrożonych w ciekłym azocie pobierano około 1/3 tkanki – w pierwszym przypadku oraz około 1/6 tkanki – w drugim przypadku i wyizolowano RNA z wykorzystaniem kitu do izolacji PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) według załączonej procedury. Izolat poddano ocenie pod kątem jakości i ilości z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™) oraz aparatu TapeStation 2200 (Agilent). Użytkowano odpowiednio około 123,8 ng/μl, oraz 20,3 ng/μl RNA, co świadczy o dostatecznej ilości

i jakości RNA pozyskiwanego z tkanek do prawidłowej realizacji badań. Jednak w próbkach, gdzie do izolacji wykorzystano 2 razy więcej materiału wejściowego uzyskano niższy współczynnik RIN (6.4), świadczący o wyższym stopniu zdegradowania uzyskanego RNA, co uzasadnia prowadzenie izolacji z wykorzystaniem tylko 1/6 pobranego materiału.

Figura 1. Rozdział elektroforetyczny na urządzeniu TapeStation 2200. A0 marker wielkości, A1 i B1 próbki.



Rozpoczęto prace nad opracowaniem optymalnego modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych. Komponenty (ko) wariancji szacowano za pomocą programów zaimplementowanych w pakiecie BLUPF90, autorstwa prof. Ignacego Misztala. Parametry genetyczne i fenotypowe szacowano za pomocą modeli liniowych i progowych, wykorzystując programy renumf90 i gibbsf90 z zaimplementowaną metodą Bayesa. W trakcie szacowania komponentów (ko) wariancji wygenerowano 100 000 próbek parametrów. Pierwsze 20 000 próbek usunięto jako tzw. rozruchowe. Na podstawie kolejnych próbek obliczono odziedziczalności cech zdrowotności oraz współczynniki korelacji genetycznej i fenotypowej między nimi. Wszystkie czynności, związane z szacowaniem parametrów genetycznych powtarzano wielokrotnie, uwzględniając różną kombinację efektów statycznych i losowych. Weryfikację optymalizacji zastosowanych modeli obserwacji prowadzono w oparciu o wyniki statystyk bayesowskich.

Podsumowanie:

W bazie PLOWET gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB oraz genotypowano zwierzęta.

Przeprowadzono szczegółową charakterystykę fenotypową, genetyczną i rodowodową danych oraz wstępną analizę genomu. Wyniki tych analiz posłużyły do opracowania algorytmu pozwalającego na prowadzenie optymalnego, z punktu widzenia realizacji zadania, wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego, potrzebnego do realizacji kolejnych etapów zadania. Przeprowadzono także analizę optymalizacji izolacji RNA z tkanek oraz podjęto prace nad opracowaniem optymalnego modelu obserwacji do szacowania parametrów genetycznych i fenotypowych cech zdrowotności.

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 okresie sprawozdawczym przeprowadzono badania terenowe dotyczące kosztów produkcji w 50 oborach hodujących bydło rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w regionie podlaskim i 30 oborach hodujących bydło rasy simentalskiej w regionie podkarpackim. Tabela 1. podaje średnie liczby krów w oborach objętych badaniem.

Tabela 1. Liczba krów oraz ogólna liczba bydła w badanych oborach.

Rasa						
	holsztyńsko-fryzyjska			simentalaska		
	średnia	min.	max	średnia	min.	max
Krowy	75,00	40	269	22,0	8	53
Bydło	146,94	71	489	43,7	11	108

W ankietach, zbieranych w poszczególnych oborach, uwzględniono m.in. warunki organizacyjno-produkcyjne, liczbę krów pod kontrolą, wskaźniki reprodukcyjne krów, długość użytkowania krów, długość laktacji, wiek zacielenia, liczbę zabiegów inseminacyjnych. Uwzględniono ogólną ilość wyprodukowanego mleka, białka i tłuszczu. Ustalono koszty pasz objętościowych i treściwych własnych i z zakupu, koncentratów i dodatków do pasz. Oszacowano koszty po średnie wyprodukowania 1 l mleka/krowę, 1 kg białka i 1 kg tłuszczu oraz koszty całkowite wyprodukowania 1 l mleka, 1 kg białka i 1 kg tłuszczu.

Tabela 2. Koszty całkowite wyprodukowania mleka i jego składników.

	Rasa					
	holsztyńsko-fryzyjska			simentalaska		
	(N=50)			(N=30)		
	średnia	min.	max	średnia	min.	max
Koszty całkowite wyprodukowania 1 l mleka (zł/l)	0,87	0,53	1,15	1,08	0,61	1,49
Koszty całkowite wyprodukowania 1 kg białka w mleku (zł/kg)	25,05	15,72	35,84	31,22	18,49	45,14
Koszt całkowite wyprodukowania 1 kg tłuszczu w mleku (zł/kg)	21,28	13,03	29,40	26,01	14,53	35,47

Koszt wyprodukowania 1 l mleka był wyższy o 21 gr w oborach simentalskich niż w oborach holsztyńsko-fryzyjskich, koszt wyprodukowania 1 kg białka był odpowiednio wyższy o 6,17 zł i tłuszczu o 4,73 zł (Tabela 2.).

Dla krów hodowanych w badanych oborach, i podlegających kontroli użytkowości, pobrano z systemu SYMLEK dane obejmujące ich wartości hodowlane. Utworzono zbiory wartości hodowlanych 4948 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z 48 obór z regionu podlaskiego oraz 439 krów rasy simentalskiej z 30 obór na Podkarpaciu. Zbiory uwzględniały wartości hodowlane wszystkich cech wchodzących w skład indeksu selekcyjnego PF.

Wartości indeksów PF złożonych z cech ocenionych konwencjonalnie miały dla obu ras podobne średnie wartości, jednak ze względu na różnice w konstrukcji indeksów stosowanych w obu rasach, nie powinno się ich bezpośrednio porównywać.

W przypadku obu ras wartości hodowlane wszystkich trzech cech wydajności są ujemnie skorelowane z kosztami ich produkcji i mieszczą się w granicach od -0,541 do -0,391. Ujemne

korelacje wskazują na mniejsze koszty produkcji krów o wyższej wartości hodowlanej. Procentowe zawartości białka i tłuszczu są skorelowane dodatnio z kosztami, co sugeruje, że podniesienie wartości hodowlanej dla tych cech może wiązać się ze wzrostem kosztów. W większości przypadków korelacje między kosztem całkowitym produkcji a wartościami hodowlanymi są nieco wyższe u rasy simentalskiej.

Zadanie 01-10-04-11

Ocena dobrostanu cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców.

kierownik zadania: dr inż. Dorota Godyń

Cel zadania:

Określenie wpływu utrzymywania cieląt parami w budkach zewnętrznych typu igloo, w okresie po odpojeniu siałą, 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 igloo. Zakłada się także, iż wyniki badań wskażą istotność zastosowania małoinwazyjnej metody oceny kortyzolu (badanego w sieci zwierząt), jako wiarygodnego markera stresu.

W realizacji wstępnego etapu doświadczenia skupiono uwagę na osiąganych przez zwierzęta przyrostach masy ciała (w zależności od systemu utrzymania), jak również na walidacji metody oceny hormonu stresu w próbkach pobranej od cieląt sierści.

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 okresie 17–20 października 2021 roku. Doświadczenie rozpoczęło się wraz z umieszczeniem zwierząt w budkach typu igloo. Grupę kontrolną stanowiły 4 sztuki, które po odpojeniu siałą, w kojcach indywidualnych zlokalizowanych w porodówce, umiejscowione zostały w budkach pojedynczych (Fot. 1.). Grupę doświadczalną stanowiły cielęta (8 sztuk), które umieszczane były w budkach podwójnych (Fot. 2.) i utrzymywane parami. Zgodnie ze schematem przyjętym na fermie, zwierzęta utrzymywane są w budkach przez okres dwóch tygodni, po tym czasie cielęta trafiają do kojców grupowych.

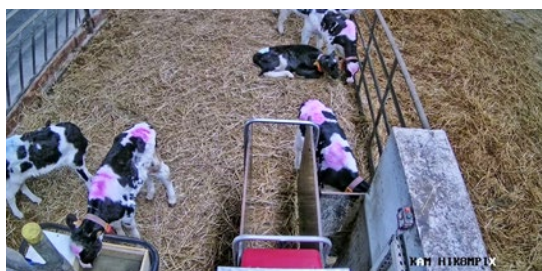
Fot. 1. Budki pojedyncze (D. Godyń).



Fot. 2. Budka podwójna (D. Godyń).



Fot. 3. Kojec grupowy (D. Godyń).



Materiały i metody:

Zwierzęta były monitorowane przez okres dwóch tygodni od momentu wstawienia do budek. Każde zwierzę objęte doświadczeniem było ważone w dniu umieszczenia w nowym środowisku oraz po dwóch tygodniach przebywania w budkach. Obserwacje behawioralne, dokonywane dzięki zapisom kamer, oraz masa ciała zwierząt, kontrolowana była także w późniejszym etapie odchowu, kiedy to cielęta były przenoszone z budek do kojca grupowego.

Przed wprowadzeniem cieląt do budek, pobierana była sierść od wszystkich cieląt objętych badaniem. Materiał uzyskiwany był z okolicy nasady ogona. Wycinano niewielką ilość sierści. Dokonywano tego szybko, bez konieczności unieruchomienia zwierząt. Próbkę materiału biologicznego pobierane były także po dwóch tygodniach przebywania zwierząt w budkach.

Ekstrakcję kortyzolu z włosów przeprowadzano na podstawie modyfikowanego protokołu producenta i składała się ona z następujących etapów:

- naważenie i przemycie próbek włosów,
- dezintegracja włosów przy pomocy homogenizatora i 2 mm stalowych kulek,
- całonocna ekstrakcja kortyzolu metanolem,
- odparowanie metanolu w urządzeniu Speedvac [Eppendorf].

Analizę ELISA przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, firmy Arbor Assays, bez odstępstw.

Wyniki badań:

Przyrosty masy ciała.

Wstępna analiza wyników dotyczy przede wszystkim przyrostów masy ciała, uzyskanych przez zwierzęta w badanym okresie. Wyniki te zostały przedstawione w Tabeli 1. Należy zaznaczyć, iż po przeniesieniu zwierząt do kojców grupowych stwierdzono 2 upadki w grupie objętej doświadczeniem. Były to cielęta utrzymywane wcześniej, zarówno w budce pojedynczej (1 sztuka), jak i podwójnej (1 sztuka). Ponadto stwierdzono, że 1 sztuka w grupie doświadczalnej charakteryzowała się niską zdrowotnością. Wyniki przedstawione w Tabeli 1. nie uwzględniają danych dotyczących tego chorego zwierzęcia ani cieląt padłych.

Tabela 1. Przyrosty masy ciała cieląt w zależności od systemu utrzymania.

	System utrzymania			
	budki pojedyncze	budki podwójne	budki pojedyncze	budki podwójne
Okres monitorowania przyrostów (dni)	14		63	
Liczba sztuk (n)	3	6	3	6
Średni dobowy przyrost masy ciała (g)	238	304	828	827

Kortyzol w sierści.

Dokonano wstępnej analizy poziomu kortyzolu na włosach cieląt dla walidacji metodyki detekcji przy użyciu komercyjnego zestawu DirectX Cortisol kit firmy Arbor Assays. Ustalono, że waga 40+/-10 miligramów włosów na próbkę/osobnika jest optymalna, po ekstrakcji kortyzolu, do wykorzystania w zestawie Elisa i mieści się w przedziale detekcji zestawu.

Wnioski:

Wstępne wyniki badań wskazują, że cielęta utrzymywane parami charakteryzują się wyższymi przyrostami, niż osobniki odchowywane w kojcach pojedynczych. Dotyczy to pierwszego okresu odchowu (14 dni). Średnie dobowe przyrosty uzyskiwane w późniejszym stadium produkcji były na podobnym poziomie u osobników z obydwu badanych grup. Przyjęta metoda 40+/-10 miligramów włosów na próbkę/osobnika jest optymalna dla detekcji kortyzolu przeprowadzonej metodą Elisa.

Zadanie 04-10-08-11

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

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

W ostatnim czasie duże zainteresowanie, ze względów zdrowotnych, wzbudza rodzaj β -kazeiny występujący w mleku. Istnieje 12 genetycznych wariantów β -kazeiny, jednak najczęściej występującymi wariantami genetycznymi β -kazeiny (CSN2) są A1 i A2. Badania wykazały, iż powstająca w wyniku trawienia kazeiny typu A1 β -kazomorfina-7, będąca ważnym bioaktywnym peptydem o silnej aktywności opioidowej, może wpływać na rozwój niektórych ważnych chorób u ludzi. Wykazano, że BCM-7 może być czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, miażdżycy tętnic, cukrzycy typu 1 i zespołu nagłej śmierci niemowląt. Wykazano także, iż spożycie mleka zawierającego kazeinę A1 daje objawy podobne do nietolerancji laktozy, powoduje stany zapalne żołądkowo-jelitowe, opóźniony tranzyt bodźców oraz zmniejszenie szybkości i dokładności przetwarzania poznawczego.

Intensywna hodowla bydła mlecznego mogła przyczynić się do uwydatnienia genetycznego wariantu mleka, który ma niekorzystne skutki u ludzi, dlatego też konieczne są dalsze badania na zwierzętach oraz testy kliniczne na ludziach. „Mleko A2” przede wszystkim dedykowane jest dla osób autystycznych oraz alergików. Jest to potencjalna grupa odbiorców, stanowiąca niszę sprzedażową dla mleczarni, które część lub całość swojej produkcji chciałyby w przyszłości skierować na rynek dla tej grupy konsumentów. Coraz częściej konsumenci wybierają zamienniki mleka krowiego, co może prowadzić do spadku jego spożycia. Dlatego też mleko A2 może być ciekawą ofertą, jednak skierowaną do wąskiej grupy odbiorców i mającą ograniczony rynek zbytu.

Celem prowadzonych badań była identyfikacja genetyczna zwierząt pod względem *allelu* genu β -kazeiny A2. Dokonano także oceny wydajności oraz składu chemicznego tego mleka.

Założenia metodyczne:

Badania prowadzono w ZD IZ PIB w Odrzechowej. W ramach tematu kontynuowano pobieranie materiału biologicznego (sierści) do badań genetycznych, w celu oznaczenia genu β -kazeiny. Materiał pobrano od 315 zwierząt, głównie krów mlecznych oraz cieląt. Wykonano oznaczenia w próbach pobranych i przygotowanych do wykonania oznaczeń w 2020 roku. Łącznie, w trakcie dwóch lat badań, pobrano i zidentyfikowano 967 zwierząt, w tym: 568 krów mlecznych, 27 buhajów, 314 cieląt oraz 58 jałówek.

Allele CSN2 oszacowano stosując *Allelic Discrimination* z sondami TaqMan MGB, znakowanymi VIC i FAM (system OneStep Real-Time PCR).

W trakcie doświadczenia określano wydajność krów, ze względu na wariant β -kazeiny (A1A1 i A2A2), a także system utrzymania (grupa I – utrzymywana i żywiona pastwiskowo, grupa II – żywiona w systemie TMR). Wyniki wydajności oraz podstawowego składu chemicznego uzyskano na podstawie danych z próbnych udojów w okresie od maja do września. Mleko podczas próbnych udojów pobierano także do wykonania szczegółowych analiz chemicznych: oznaczeń makroelementów, NNKT, frakcji białek oraz zawartości aminokwasów. Analizy mleka wykonano zgodnie z przyjętą metodyką w Dziale Analityki Laboratoryjnej – Centralnym Laboratorium IZ PIB oraz w Małopolskim Centrum Monitoringu Żywności (MCMŻ) – Wydział Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Syntetyczny opis wyników:

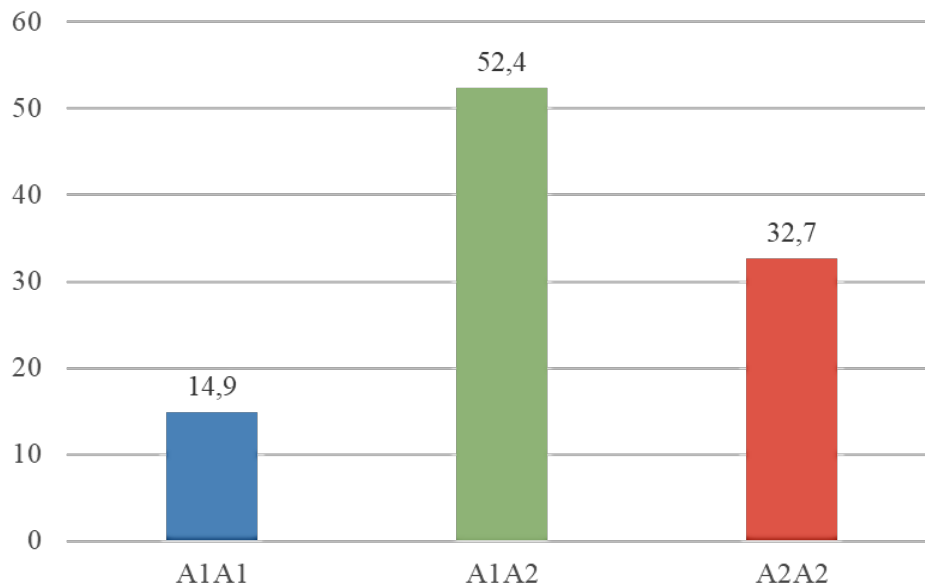
Przeprowadzona identyfikacja genetyczna pod względem genów kodujących β -kazeinę wykazała, iż w populacji była w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB w Odrzechowej, ok. 15% stanowią homozygoty A1A1, 52,4% to heterozygoty A1A2, natomiast 32,7% zwierząt to homozygoty A2A2.

Uwzględniając podział na poszczególne grupy zwierząt stwierdzono, że najwięcej homozygot A2A2 jest w grupie cieląt oraz jałówek i jest bardzo korzystne dla prowadzenia dalszych prac hodowlanych w kierunku pozyskania jednolitego stada pod względem frekwencji genów kodujących β -kazeinę i produkcji mleka A2.

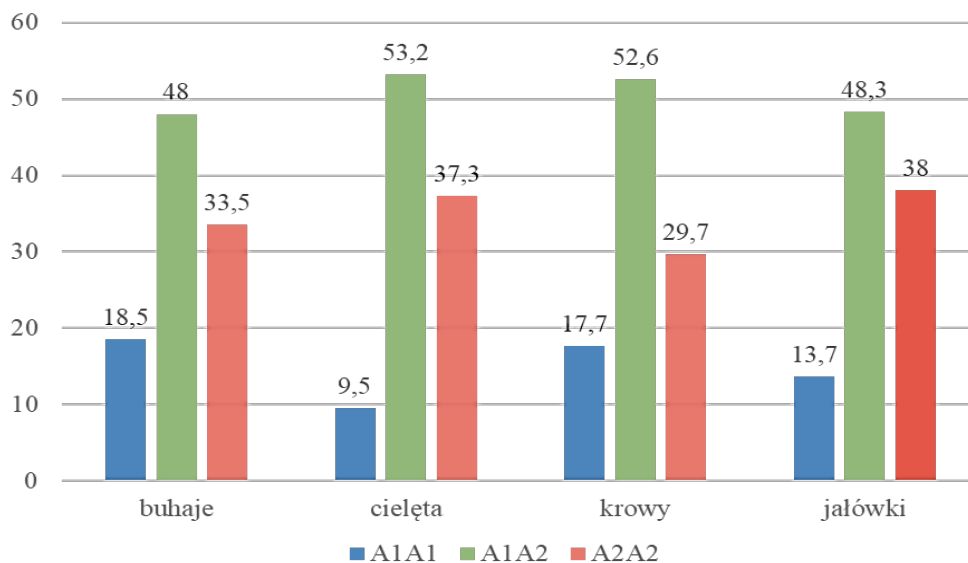
Tabela 1. Ilość pobranych prób materiału do badań genetycznych i liczba zidentyfikowanych zwierząt pod względem wariantu genu β -kazeiny.

Wyszczególnienie	Buhaje	Cielęta	Krowy	Jałówki	Suma
Liczba zgenotypowanych zwierząt	27	314	568	58	967
A1A1	5	30	101	8	144
A1A2	13	167	299	28	507
A2A2	9	117	168	22	316

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



Wykres 2. Procentowy udział genu β -kazeiny (A1A1, A1A2 i A2A2) w poszczególnych grupach bydła w ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o.



Na podstawie gromadzonych danych odnośnie wydajności krów, nie stwierdzono różnic uwzględniając wariant β -kazeiny (A1A1, A2A2) – występowały jedynie różnice ze względu na system utrzymania. Także w przypadku pozostałych oznaczanych składników (białko, tłuszcz laktoza, makroelementy, NNKT, aminokwasy, frakcje białkowe) różnice występowały zważywszy na system utrzymania, a nie wariant β -kazeiny.

Podsumowanie:

Wyniki uzyskane na obecnym etapie badań przyczynią się do poszerzenia wiedzy na temat frekwencji poszczególnych genotypów β -kazeiny w stadzie bydła mlecznego Zakładu Doświadczalnego IZ PIB Odrzechowa oraz wytypowaniu i wydzieleniu krów homozygot pod względem genów kodujących β -kazeinę i produkujących mleko A2.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż różnice zarówno w wydajności jak i w składzie chemicznym mleka, wynikały głównie z zastosowanego systemu utrzymania, a nie ze względu na występujący wariant β -kazeiny (A1A1 i A2A2) w mleku.

Otrzymane wyniki wskazują zatem, iż prace hodowlane w kierunku uzyskania stada jednolitego pod względem wariantu β -kazeiny A2 nie niosą z sobą ryzyka związanego z obniżeniem wydajności mlecznej czy zawartości składników w mleku.

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 celem trzyletniego zadania jest podjęcie się opracowania nowych podindeksów selekcyjnych w hodowli bydła mięsnego w Polsce, uwzględniających wskaźniki wartości opasowej i rzeźnej oraz cechy płodności.

Cel naukowy zadania:

- oszacowanie parametrów genetycznych cech opasowych i rzeźnych oraz płodności bydła mięsnego dla rasy limousine, charolaise i hereford,
- określenie związku pomiędzy wskaźnikami oszacowanymi przyżyciowo, dotyczącymi opasu ze wskaźnikami poubojowymi,
- opracowanie wariantów podindeksów selekcyjnych, uwzględniających cechy płodności oraz wskaźniki wartości opasowej i rzeźnej,
- oszacowanie mierników efektywności ekonomicznej opasu przy uwzględnieniu zmiennych uwarunkowań rynkowych.

Cel praktyczny zadania:

Celem praktycznym zadania jest zaproponowanie nowych podindeksów selekcyjnych, uwzględniających cechy mięsności i płodności w aspekcie poprawy ekonomiki produkcji bydła mięsnego. Otrzymane wyniki pozwolą na wybór optymalnego modelu produkcyjnego bydła mięsnego na poziomie gospodarstwa.

Etapy badawcze realizowane w roku sprawozdawczym, w każdym z celów badawczych:

1. Analiza wskaźników opasowych i rzeźnych buhajów ocenianych w Polsce i ich potomstwa.
2. Przeprowadzenie ankiet bezpośrednich w gospodarstwach utrzymujących bydło ras mięsnych – próba oszacowania mierników efektywności ekonomicznej opasu.
3. Pozyskanie danych z GIJHRS, dotyczących ubojów bydła i klasyfikacji półtuszy w ubojniach w Polsce.

W ramach realizacji zadania etapowego zgromadzono materiał doświadczalny, obejmujący wyniki rutynowej oceny fenotypowej cech pokroju buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce – limousine (LM), charolaise (CH), hereford (HH). Dla każdej z wybranych ras został przygotowany zbiór danych skonstruowany na podstawie informacji o buhajach, ocenianych pod względem cech pokroju i mięsności. Informacje o buhajach (np. dane rodowodowe, oceny cech pokroju) zostały zgromadzone na podstawie informacji zawartych w systemie eBovis2 – Polskiego Związku Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego oraz w aplikacji użytkowej – „buhaje mięsne” – pracowników Instytutu Zootechniki PIB, odpowiedzialnych za ocenę wartości hodowlanej buhajów ras mięsnych.

Utworzono bazę danych zawierającą dane fenotypowe bydła. W oparciu o te dane przeprowadzono charakterystykę fenotypową cech płodności oraz cech pokroju związanych z lokomocją. Do edycji danych i przeprowadzania operacji na zbiorach danych opracowano własne oprogramowanie napisane w języku R oraz przy wykorzystaniu programu MS Excel. Oprogramowanie to zostanie wykorzystane w dalszych etapach realizacji badań i umożliwi szybką aktualizację danych. Liczebność i struktura danych spełniają warunki niezbędne do realizacji tego etapu badań.

Na etapie wstępnym, w celu opracowania podindeksu selekcyjnego cech płodności, przeprowadzono przegląd literatury i przystąpiono do wyboru cech najczęściej stosowanych w rekomendowanych w literaturze naukowej podindeksach selekcyjnych płodności w krajach, w których takie indeksy już są stosowane w hodowli. Najczęściej występującymi cechami w literaturze i możliwymi do zaimplementowania w polskim systemie oceny były: łatwość wycieleń, ocena porodu, waga urodzeniowa oraz podobnie jak w niektórych krajach, cechy pokroju związanych z budową zadu (szerokość w kulszach, długość zadu, szerokość w biodrach). Podstawowe informacje dotyczące charakterystyki dostępnych zbiorów danych w kontekście wybranych cech do utworzenia podindeksu płodności zaprezentowano w Tabelach 1. i 2. Zgromadzone dane pochodzą z oceny przeprowadzonej w latach 2000–2021.

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

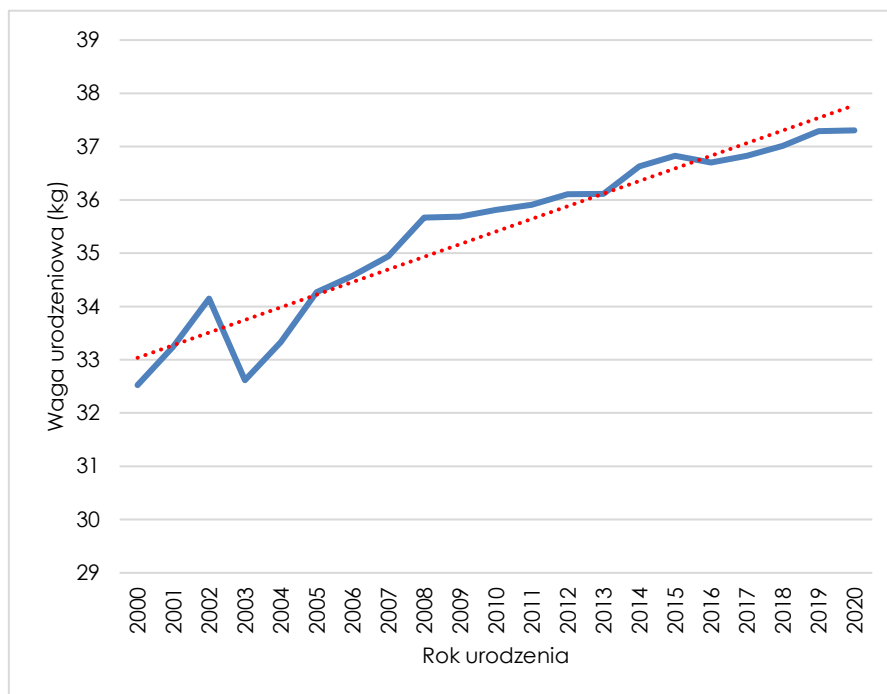
Rasa	LM	CH	HH
Lata oceny	2000–2021	2000–2021	2000–2021
Liczba obserwacji	322 582	53 661	29 818
Liczba ważeń	487 788	66 748	36 900
Liczba wycieleń	256 966	37 704	22 387
Waga urodzenia	237 776	34 480	18 068

Tabela 2. Liczebności (N), średnie, wartości minimalne i maksymalne cech związanych z budową zadu planowanych do utworzenia podindeksu płodności (lata oceny 2000–2021).

Rasa	Cecha	Liczba ocen cech pokroju (N)	Średnia	Min.	Max.
LM	Długość zadu	186 352	7,39	2	10
	Szerokość w biodrach	190 131	7,54	2	10
	Szerokość w kulszach	183 542	7,28	2	10
	Szerokość zadu	185 517	7,36	3	10
CH	Długość zadu	18 215	7,36	4	10
	Szerokość w biodrach	18 481	7,47	4	10
	Szerokość w kulszach	17 651	7,13	3	10
	Szerokość zadu	18 070	7,30	3	10
HH	Długość zadu	16 098	7,53	5	10
	Szerokość w biodrach	15 862	7,42	4	10
	Szerokość w kulszach	15 437	7,22	3	9
	Szerokość zadu	15 486	7,24	4	9

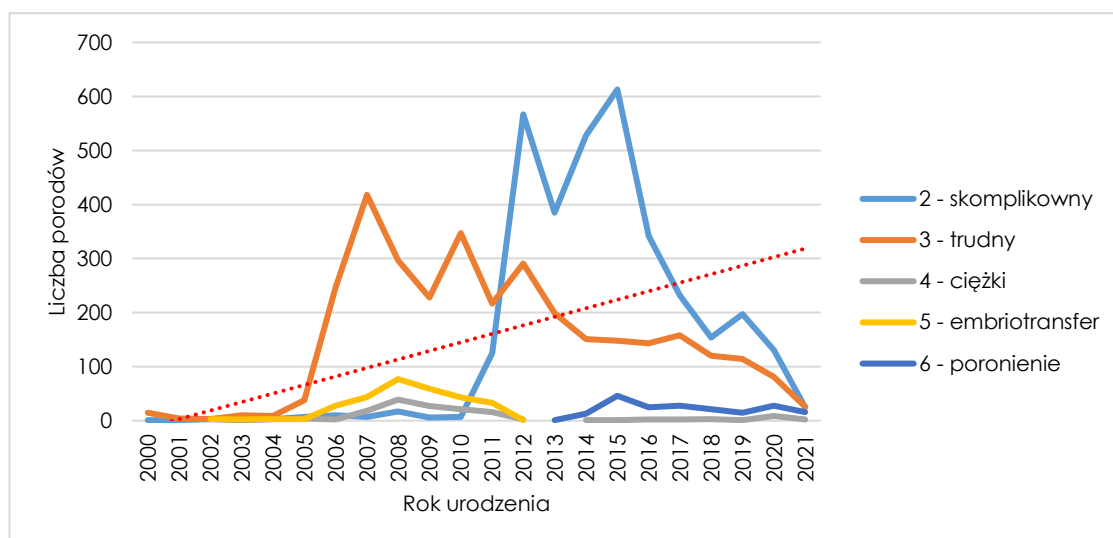
Przeprowadzono również analizę trendów cech płodności do roku urodzenia. Dla każdej z analizowanych cech trendy są pozytywne. Świadczy to o postępie hodowlanym w polskiej populacji bydła ras mięsnych i możliwości dalszego doskonalenia cech w populacji (Wykres 1.- 3.).

Wykres 1. Regresja liniowa średniej wagi urodzeniowej w zależności od roku urodzenia.



Na podstawie danych przedstawionych na Wykresie 1. można stwierdzić przejściowe wahania masy urodzeniowej cieląt w początkowych latach agregowanych danych (2000–2002), natomiast od 2003 roku waga urodzeniowa zwierząt systematycznie i dynamicznie wzrastała, osiągając w 2008 roku średnią wartość około 35,8 kg – nastąpił więc wzrost masy urodzeniowej cieląt wynoszący około 3 kg. W kolejnych latach, dynamika wzrostu uległa spowolnieniu – zwierzęta urodzone pomiędzy latami 2009 a 2021 charakteryzowała waga urodzeniowa od 35,8 kg (2009 rok) do około 37 kg (2020 rok).

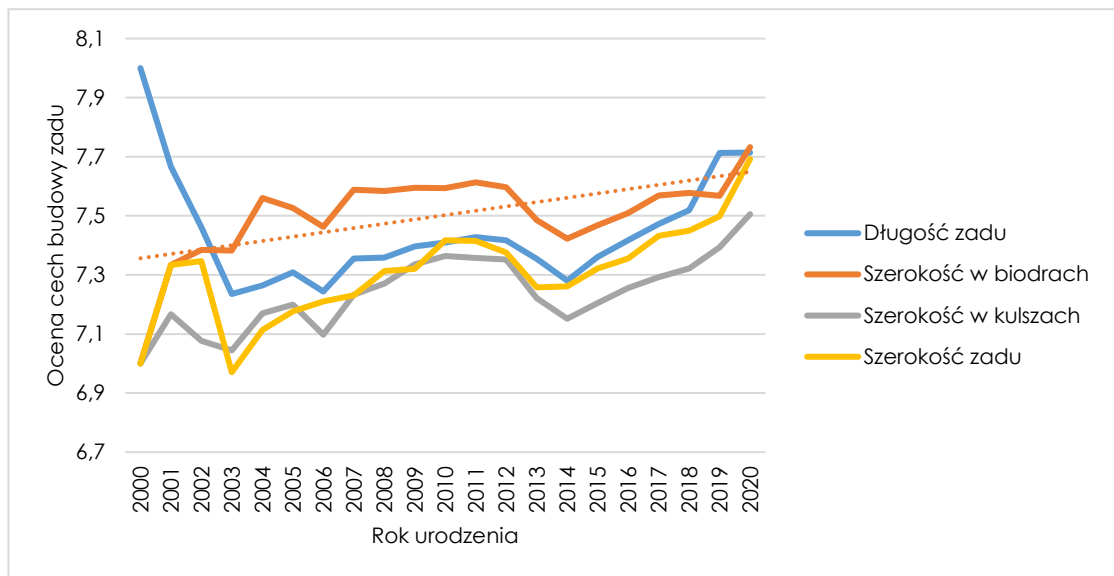
Wykres 2. Liczba porodów (oceny od 2 do 6) w zależności od roku urodzenia.



Wykres 2. przedstawia liczbę porodów z rozróżnieniem ich na kategorie, w zależności od roku urodzenia zwierząt. Każdemu z rodzajów porodów przypisano ocenę od 2 do 6, gdzie 2 to poród skomplikowany, 3 – poród trudny, 4 – poród ciężki, 5 – poród z embriotransferu oraz 6 oznaczono jako poronienie.

Podobnej analizie poddano cechy pokroju ocenianych zwierząt, takie jak długość i szerokość zadu, szerokość w guzach biodrowych i kulszowych, włącznie z określeniem trendów dla poszczególnych cech (Wykres 3.).

Wykres 3. Regresja liniowa cech związanych z budową zadu w zależności od roku urodzenia.



Badano również zależności dotyczące cech budowy kończyn oraz kondycji (Tabela 3.), aby określić ich potencjalną przydatność do utworzenia podindeksu lokomocji. W tym celu ustalono wielkość bazy danych, a następnie scharakteryzowano najważniejsze cechy (tj. obwód nadpęcia, postawa nóg przednich i tylnych oraz kondycja) metodą regresji liniowej wraz określeniem trendów.

Tabela 3. Liczebności (N), średnie, wartości minimalne i maksymalne cech związanych z budową nóg planowanych do utworzenia podindeksu lokomocji (lata oceny 2000–2021).

Rasa	Cecha	Liczba ocen cech pokroju	Średnia	Min	Max
LM	Obwód nadpęcia	189696	7,53	1	10
	Postawa nóg przednich	197243	7,83	3	10
	Postawa nóg tylnych	196268	7,79	1	10
	Kondycja	203811	8,09	1	10
CH	Obwód nadpęcia	19254	7,78	1	10
	Postawa nóg przednich	19168	7,75	4	10
	Postawa nóg tylnych	18601	7,52	3	10
	Kondycja	19700	7,96	1	10
HH	Obwód nadpęcia	17532	8,20	1	10
	Postawa nóg przednich	16957	7,93	3	10
	Postawa nóg tylnych	16915	7,91	3	10
	Kondycja	18387	8,60	1	10

Następnym etapem badań w temacie badawczym będzie oszacowanie parametrów genetycznych cech płodności oraz cech pokroju, a kolejnym krokiem opracowanie podindeksów selekcyjnych płodności oraz lokomocji.

Równocześnie z etapem obliczeniowym i wykonywaniem charakterystyki ocen fenotypowych cech pokroju, pozyskano informacje z Głównego Inspektoratu Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, dotyczące systemu klasyfikacji tusz rzeźnych. GIJHARS dysponuje danymi o uboju bydła w Polsce. W 2020 roku, ubój bydła w Polsce prowadziło 209 zakładów ubojowych. W zakładach tych poddano ubojowi 1 871 457 sztuk bydła. Ubojnie, które nie podlegają obowiązkowi klasyfikowania tusz wołowych i nie były nadzorowane w tym zakresie – było ich 140 – ubiły 105 804 sztuk bydła. W zakresie klasyfikacji tusz wołowych, w systemie EU-ROP, nadzorowano 69 ubojni bydła, w których klasyfikowano tusze wołowe. W ubojniach nadzorowanych, ubojowi poddano 1 765 653 sztuk bydła, klasy jakości nadano 1 740 502 tuszom wołowym.

W celu scharakteryzowania środowiska bytowania zwierząt została przygotowana ankieta bezpośrednia, której poddane zostały wybrane gospodarstwa (15 sztuk), utrzymujące bydło podanych ras (objęte oceną prowadzoną przez PZHiPBM). Ankieta dotyczyła informacji o stosowanych sposobach utrzymania, żywieniu, rozrodzie, utrzymywanych rasach bydła. Dokonano również szczegółowej charakterystyki ankietowanych gospodarstw pod względem zasobów ziemi, struktury zatrudnienia.

W analizach statystycznych materiału pochodzącego z ankiet dokonano podziału gospodarstw pod kątem ilości utrzymywanych zwierząt. Do analiz wykorzystano 15 ankiet, co odpowiada tej samej liczbie gospodarstw. Wybrane gospodarstwa podzielono ze względu na liczbę utrzymywanych zwierząt od 35 do 100 sztuk, w ilości 8 sztuk oraz gospodarstwa utrzymujące ponad 100 sztuk bydła w ilości 7 sztuk. Dokonano ogólnej charakterystyki gospodarstw, jak również analizy istniejących systemów żywienia, utrzymania, rozrodu i dobrostanu.

Zadanie 04-10-10-11

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

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Cel zadania:

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:

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

Wprowadzenie do populacji referencyjnej krów:

- imputacji genotypów,
- 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 (w modelach dwustopniowych) jest oszacowanie efektów markerów SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. Single Nucleotide Polymorphism – w skrócie SNP), związanych z daną ocenianą cechą (krok 1.). Na podstawie oszacowań efektów SNP (krok 2.) możliwe jest uzyskanie dokładnej oceny wartości hodowlanej już dla bardzo młodych osobników (praktycznie zaraz po urodzeniu). Dane fenotypowe zwierząt populacji referencyjnej pochodzą z konwencjonalnej oceny wartości hodowlanej i są estymowane, w zależności od grupy cech, z wykorzystaniem różnych modeli statystycznych. Profil genetyczny zwierząt w „erze genomowej” określa się najczęściej z wykorzystaniem mikromacierzy SNP, które winny zawierać ponad 50 000 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Mikromacierze są wtedy określane mianem chipów średniego pokrycia (medium density lub MD), przy czym w badaniach naukowych oraz w rutynowych zadaniach dedykowanych dla bydła mlecznego wykorzystywane są mikromacierze od 3 000 do 10 000 SNP (low density), a nawet 800 000 SNP (high density). Istotnym elementem do uzyskania dokładnej genomowej oceny wartości hodowlanej jest skład populacji referencyjnej. Aktualnie, w wielu krajach w tym w Polsce, wykorzystuje się populację referencyjną składającą się głównie z buhajów. W celu jak najlepszego scharakteryzowania wszystkich zależności występujących w genomie wraz z ich wpływem na cechy oceniane rutynowo do populacji referencyjnej wybiera się wszystkie użytkowane buhaje posiadające wysoką liczbę córek w ocenie WH, 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 czółowe 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:

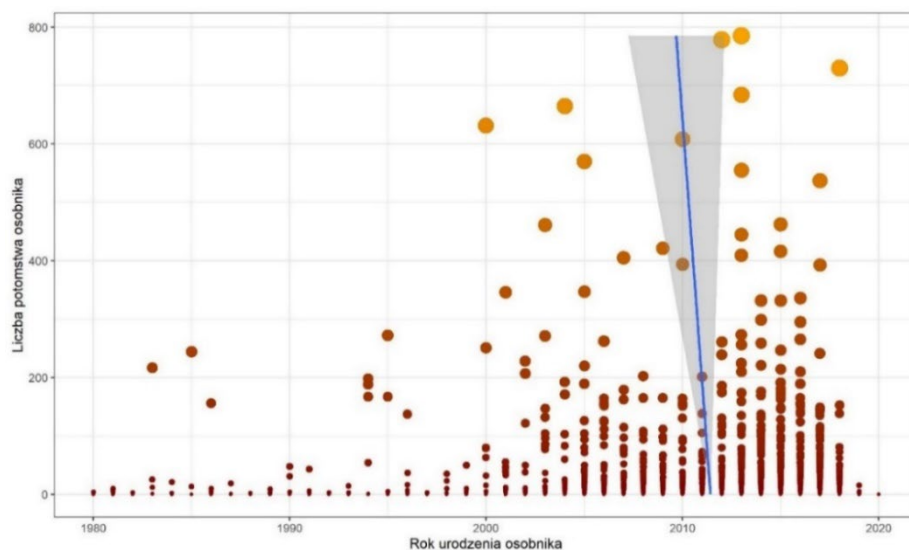
W ramach przyjętego harmonogramu prac została przeanalizowana oraz oceniona aktualna struktura populacji referencyjnej. Liczebność populacji referencyjnej zależąca od modelu badawczego jest zmienna w zależności od analizowanych cech. Dla zwierząt ocenianych rutynowo, w ramach genomowej oceny wartości hodowlanej liczebność ta może wynosić od ponad 5 tysięcy buhajów (cechy pokroju oraz cechy płodności przy wykorzystaniu krajowej populacji referencyjnej) do ponad 35 tysięcy buhajów (cechy produkcyjne oraz wybrane cechy pokroju przy wykorzystaniu referencyjnej populacji EuroGenomics).

Analiza roku urodzenia osobników (głównie ojcowie) w zależności od wielkości potomstwa wykazała, że najwięcej osobników posiadających największą liczbę potomstwa urodziło się po 2000 roku (Wykres 1.). Należy zwrócić uwagę na charakterystyczną linię odcięcia (po

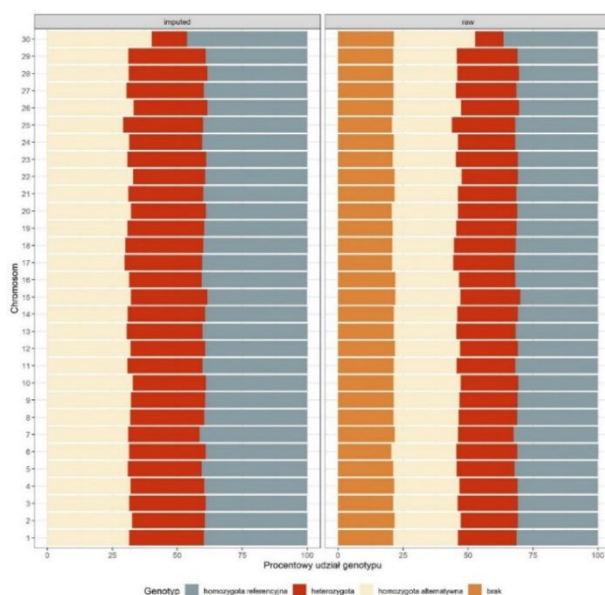
2010 roku), od kiedy rutynowo zaczęto wykorzystywać buhaje selekcjonowane genomowo i to one w chwili obecnej tworzą główną część populacji referencyjnej użytkowanej w Polsce.

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

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



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



Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu:

Cele zadania zostały w pełni zrealizowane. Zbiory danych wykorzystywane w kolejnych krokach analiz przygotowane i zdeponowane na serwerze Instytutu Zootechniki PIB.

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 jakości mięsa jako alternatywa dla metody chirurgicznej.

kierownik zadania: dr inż. Martyna Małopolska

Cel zadania:

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

Cele etapu:

- typowanie materiału zwierzęcego do badań,
- ocena tuczna, rzeźna świń,
- ocena morfometryczna jąder,
- gromadzenie danych oraz materiału biologicznego do oznaczeń laboratoryjnych, morfometrycznych, genetycznych, dobrostanowych oraz parametrów jakościowych mięsa wieprzowego,
- określenie poziomu kortyzolu u zwierząt doświadczalnych,
- kontynuacja oznaczeń dotyczących tekstury i jakości mięsa.

Założenia metodyczne:

Ocena tuczna przeprowadzona w Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) w układzie 3 grupowym:

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

W 2021 roku badaniom poddano 60 osobników (po 20 w każdej grupie):

- Dysekcja póltusz oraz ocena morfometryczna jąder (jeśli występują). Zostały zgromadzone i przeanalizowane cechy użytkowości tucznej i rzeźnej dla 60 osobników. Przeprowadzono analizy morfometryczne jąder, które obejmowały masę, długość, szerokość jąder pozyskanych od knurków i immunokastratów. Ponadto, analizowano gruczoły dodatkowe – cewkowo-opuszkowe i pęcherzykowe.
- Określenie poziomu kortyzolu w szczecinie świń. Pobieranie szczeciny następowało dwa tygodnie po przeprowadzonym zabiegu kastracji u wieprzków i knurków (grupa kontrolna), następnie dwa tygodnie po każdej iniekcji preparatu Improvac (immunokastraty) i u knurków (grupa kontrolna).
- Przeprowadzenie oceny tekstury mięsa u 60 osobników.
- Ocena sensoryczna mięsa – określenie barwy, marmurkowatości, zapachu, soczystości, kruchości i smakowości mięsa surowego i gotowanego.

Dodatkowe założenia metodyczne:

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

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

Syntetyczny opis wyników badań:

Badania wykonano na knurkach i wieprzkach rasy polska biała zwisłoucha pochodzących od hodowcy z województwa małopolskiego. Pierwsze pobranie szczeciny u prosiąt wykonywano u hodowcy. Po uzyskaniu odpowiedniej masy ciała, świny zostały przewiezione do Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) w Chorzeli, gdzie nastąpiły kolejne etapy doświadczenia. Zwierzęta utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywienie odbywało się w systemie *ad libitum* drobno granulowaną mieszanką o znanym i stałym składzie zadawaną z automatów. Ilość pobieranej paszy była ściśle kontrolowana. Pozostałe warunki utrzymania i postępowania ze zwierzętami były zgodne z dotychczasową metodyką oceny w stacjach kontroli. W okresie sprawozdawczym przekontrolowano 60 osobników. W tabelach poniżej przedstawiono wyniki poszczególnych grup doświadczalnych jak i zestawienie całej grupy badawczej (118 osobników – dwa osobniki w trakcie doświadczenia padły).

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

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
N	40	38	40
Przyrost dzienny w teście (g) (30–120 kg)	988,95 $\pm$ 141,68	1013,16 $\pm$ 111,51	995,48 $\pm$ 118,84
Zużycie paszy w teście (kg)	231,3 $\pm$ 42,87	239,97 $\pm$ 31,81	261,03 $\pm$ 32,51
Dzienne pobranie paszy (kg)	2,67 $\pm$ 0,24	2,71 $\pm$ 0,24	2,91 $\pm$ 0,30
Zużycie paszy na 1 kg przyrostu (kg)	2,75 $\pm$ 0,43	2,70 $\pm$ 0,39	2,97 $\pm$ 0,48
Dni tuczu (dni)	86,6 $\pm$ 13,29	88,6 $\pm$ 8,42	89,78 $\pm$ 7,57

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

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
N	40	38	40
Wydajność rzeźna (%)	74,37 $\pm$ 2,05	75,45 $\pm$ 1,61	76,60 $\pm$ 1,91
Masa polędwicy (kg)	6,97 $\pm$ 0,84	7,37 $\pm$ 0,66	7,92 $\pm$ 0,85
Masa szynki zadniej (kg)	11,39 $\pm$ 0,99	11,75 $\pm$ 0,67	11,91 $\pm$ 1,04
Masa szynki właściwej (kg)	9,78 $\pm$ 0,88	9,98 $\pm$ 0,69	9,92 $\pm$ 0,97
Szerokość oka polędwicy (cm)	10,94 $\pm$ 0,78	11,24 $\pm$ 0,75	11,01 $\pm$ 0,83
Wysokość oka polędwicy (cm)	6,51 $\pm$ 0,62	6,43 $\pm$ 0,63	6,46 $\pm$ 1,11
Powierzchnia oka polędwicy (cm ²)	53,22 $\pm$ 4,93	54,70 $\pm$ 5,74	53,74 $\pm$ 10,96
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm)	1,29 $\pm$ 0,34	1,51 $\pm$ 0,34	1,74 $\pm$ 0,36

Wykonano badanie sensoryczne mięsa wybranych knurów, immunokastratów, wieprzków oraz loszek, które zostały poddane ubojowi w zbliżonym czasie.

Tabela 3. Parametry oceny sensorycznej mięsa wieprzowego przedstawiona w skali pięciopunktowej (5 – bardzo dobry; 1 – zły).

	Knurki	Immunokastraty	Wieprzki	Loszki
Barwa	1,68	1,86	2,16	1,98
Marmurkowatość	1,4	1,78	1,95	1,74
Zapach mięsa	2,64	3,75	3,87	3,46
Ocena barwy – mięso gotowane	1,9	2,1	2,3	2,01
Smakowitość	3,12	3,27	3,75	3,0
Kruchosc	3,4	3,43	3,65	3,3
Soczystość	2,76	3,20	3,08	3,4

Ocenę morfometryczną jąder przeprowadzono poubojowo w SKURTCCh w Chorzelowie.

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

	Knury		Immunokastraty	
Jądro	Prawe	Lewe	Prawe	Lewe
Masa jądra (kg)	0,25 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,04
Masa najjądra (kg)	0,07 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,12	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
Długość jądra (cm)	13,17 $\pm$ 1,81	13,46 $\pm$ 1,59	8,57 $\pm$ 1,60	8,50 $\pm$ 1,95
Szerokość jądra (cm)	7,85 $\pm$ 1,61	7,95 $\pm$ 1,43	4,89 $\pm$ 1,26	5,20 $\pm$ 1,48
Obwód jądra	19,16 $\pm$ 1,90	19,32 $\pm$ 2,08	12,02 $\pm$ 2,52	11,85 $\pm$ 2,27

Wstępne analizy kortyzolu w szczecinie badanych zwierząt wskazują na obniżenie długotrwałego stresu u osobników, u których zastosowano immunokastrację, natomiast najwyższy poziom kortyzolu odnotowano u wieprzków – osobników kastrowanych chirurgicznie bez znieczulenia.

Androstenon, androstenol, indol i skatol zostały określone w mięsie i tłuszczu pozyskanym od zwierząt doświadczalnych. Dane są w dalszym ciągu pozyskiwane i w następnym roku zostaną poddane analizom statystycznym.

Zadanie 01-11-04-11

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

kierownik zadania: dr hab. Magdalena Szyndler-Nęcza

Cel zadania:

Celem praktycznym zadania jest opracowanie szczegółowej procedury tuczu świń rasy złotnickiej pstrej, uwzględniającej dedykowane pełnoporcjowe mieszanki paszowe z udziałem krajowych komponentów białkowych i innowacyjnego dodatku, które wraz ze wskazaniem właściwej ubojowej masy ciała, będą podstawą produkcji wysokojakościowego produktu, w postaci wieprzowego surowca rzeźnego o prozdrowotnej dla człowieka jakości. Celem naukowym jest poznanie wpływu opracowanego sposobu żywienia i innowacyjnego dodatku paszowego na status zdrowotny świń oraz szeroko pojętą jakość i trwałość oksydacyjną mięsa i tłuszczu oraz ocena, czy lub w jakim stopniu poprawa tych cech w mięsie przekłada się na jakość i trwałość wyrobów wędliniarskich.

Założenia metodyczne:

W 2021 roku przeanalizowano dane uzyskane w ramach doświadczenia pierwszego, przeprowadzonego w ZD IZ PIB w Pawłowicach w 2020 roku, dotyczącego określenia optymalnego składu mieszanki paszowej opartej o krajowe źródła białka i końcowej (ubojowej) masy ciała tuczników. Na podstawie składu podstawowego i trwałości oksydacyjnej polędwicy, profilu kwasów tłuszczowych w polędwicy i szynce, siły cięcia oraz tekstury polędwicy i szynki, a także użytkowości tucznej i rzeźnej, 96 tuczników rasy złotnickiej pstrej, dokonano oceny wpływu czynników doświadczalnych na jakość mięsa i parametry wzrostu świń tej rasy. Do analiz wykorzystano program STATISTICA v 12 [StatSoft], Inc. (2014). W oparciu o wyniki analiz z doświadczenia 1. przygotowano metodykę doświadczenia żywieniowego 2., w tym opracowano receptury dodatków do mieszanki paszowej finiszera, zawierających biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego, mające poprawić trwałość oksydacyjną oraz wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa. Zastosowano trzy rodzaje dodatków paszowych (X, Y, Z), będących mieszaniną suszy ziołowych i/lub owocowych. Ponadto, do dwóch grup doświadczalnych dodano dodatkowo ekstradowane nasiona lnu.

Doświadczenie drugie:

Opracowanie składu komponentowego i receptury innowacyjnych dodatków do paszy, zawierających biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego o działaniu antyutleniającym i poprawiającym trwałość oksydacyjną oraz wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa.

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



Drugie doświadczenie wzrostowe, objęło 60 tuczników (30 wieprzków, 30 loszek) rasy złotnickiej pstrej o znanym genotypie RYR1. W trakcie tuczu wszystkim zwierzętom podawano tę samą mieszankę paszową z bobikiem (wariant C z 1. dośw.): od 30. do 90. kg masy ciała typu grower C, a od 90. do 140. kg masy ciała typu finiszier. W ostatniej fazie tuczu, tj. od 90. kg masy ciała zwierzęta zostały podzielone na 6 grup żywieniowych. Grupa kontrolna A tuczona była mieszanką paszową finiszier bez dodatku paszowego, a pięć kolejnych grup doświadczalnych (B-F) otrzymało do mieszanki jeden z dodatków ziółowo-owocowych. Układ doświadczenia 2. przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Układ grup w doświadczeniu 2. dla rasy złotnickiej pstrej.

	Grupa kontrolna A	Grupa doświadczal. B	Grupa doświadczal. C	Grupa doświadczal. D	Grupa doświadczal. E	Grupa doświadczal. F	Razem
Mieszanka	C	C	C	C	C	C	
Dodatek (łącznie ok. 2% mieszanki)	-	Dodatek X	Dodatek X+	Dodatek Y	Dodatek Y+	Dodatek Z	
Tucz od 30. do 90. kg – liczba zwierząt	10	10	10	10	10	10	6060
Tucz od 90. do 140. kg mc	10	10	10	10	10	10	60
Razem zwierząt doświadczalnych	10	10	10	10	10	10	60

+ oznacza mieszankę paszową zawierającą dodatek paszowy oraz ekstrudowane nasiona Inu.

Pobrano próbki pasz doświadczalnych typu grower i finiszier w celu wykonania analizy składu podstawowego oraz profilu kwasów tłuszczowych paszy i lotnych związków organicznych (LZO) – tylko finiszier. Analizy te są wykonywane w Dziale Analityki Laboratoryjnej – Centralnym Laboratorium IZ PIB. W próbkach paszy oznaczono białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół surowy i suchą masę zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 152/2009, ustanawiającym metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz. Analizę kwasów tłuszczowych przeprowadzono metodą chromatografii gazowej aparatem SHIMADZU GC-2010 Plus (Kolumna – Rtx2330, 105 m, 0,32 mm, 0,2 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 mm), a następnie polarną Zebron ZB-WAXplus.

Po uboju zwierząt, które uzyskały masę ciała 140 kg, pobrano próbki krwi, a następnie określono parametry dysekcji tusz i jakości mięsa zgodnie z metodyką stosowaną w SKURTC.

W próbkach surowicy krwi oznaczono wskaźniki biochemiczne (ZZiP) metodą absorancji 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 ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GP), dialdehyd malonowy (MDA). Z półtusza pobrano i zamrożono próbki mięsa (polędwica za ostatnim żebrzem – Longissimus lumborum, mięsień półbłoniasty szynki – Semimembranosus muscles) w celu wykonania analiz tekstury (ZHTCh), a także do analiz chemicznych (CL). Wybrane elementy półtusza (schab, łopatka) przekazano do zakładu mięsnego w celu wytworzenia wędlin surowo dojrzewających (polędwica i kiełbasa). Dodatkowo, zakupiono surowiec wieprzowy (polędwice, szynki i łopatki) pochodzący od świń produkcyjnych (nieznana rasa, dalej zwane mięsa handlowe) w celu wykonania analiz chemicznych (CL) i tekstury (ZHTCh) – polędwice i szynki – a także do wytworzenia w tym samym zakładzie mięsnym analogicznych wędlin surowo dojrzewających. Pozyskano próbki wytworzonych wędlin surowo dojrzewających pochodzących od zwierząt doświadczalnych rasy zółta i z mięsa handlowego (polędwica, kiełbasa surowo dojrzewające) i przekazano je do dalszych analiz.

Syntetyczny opis wyników:

Na podstawie analizy danych zgromadzonych w ramach doświadczenia 1. stwierdzono, że zwierzęta tuczone mieszkanką doświadczalną C (z bobikiem) do masy ubojowej 140 kg cechowały się, w porównaniu do zwierząt z pozostałych grup doświadczalnych A – kontrola, B – tubin, D – groch, mięsem polędwicy o najkorzystniejszych wartościach w zakresie:

- wskaźnika trwałości oksydacyjnej mięsa (TBARS) - wartość najniższa, statystycznie istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej A,
- profilu tekstury polędwicy - najmniejszą twardość (Hardness), statystycznie istotnie mniejsza w porównaniu do grupy doświadczalnej B,
- proporcji kwasów tłuszczowych PUFA n6/n3 - najniższa wartość, statystycznie istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej A.

Zwierzęta te (grupa dośw. C, masa ubojowa 140 kg) charakteryzowały się również najlepszymi (najniższymi) wartościami parametrów szynki w zakresie: wycieku termicznego, siły cięcia (firmness, toughness) oraz profilu tekstury tego wyrębu (Hardness, Chewiness). Jednak wartości te były statystycznie istotnie niższe tylko w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych.

W przypadku użytkowości tucznej i rzeźnej zwierząt nie stwierdzono wpływu grupy doświadczalnej na analizowane parametry. Zgodnie z oczekiwaniem największy wpływ na te cechy miała masa ubojowa (120, 130, 140 kg). Zwierzęta o ubojowej masie ciała 140 kg cechowały się statystycznie istotnie największym pobraniem paszy (kg), przyrostem dziennym w czasie tuczu, większą grubością słoniny grzbietowej, masą poszczególnych wyrębów, długością tuszy oraz mniejszą mięsnością tuszy. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy analizowanymi grupami w wykorzystaniu paszy na 1 kg przyrostu.

Na podstawie powyższych wyników ustalono, że w doświadczeniu 2. zwierzęta tuczone będą mieszkanką paszową C, do masy ubojowej 140 kg.

W ramach doświadczenia 2., w pobranych próbkach mieszanek paszowych Grower i Finisher określono skład podstawowy, a w mieszance finisher dodatkowo profil kwasów tłuszczowych. Sumy kwasów tłuszczowych w mieszankach doświadczalnych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Sumy kwasów tłuszczowych w mieszankach doświadczalnych finiszer (g na 100g wszystkich oznaczonych kwasów tłuszczowych).

kwas	Finiszer A	Finiszer B	Finiszer C	Finiszer D	Finiszer E	Finiszer F
SFA	25,40	24,20	17,07	23,15	17,15	17,44
UFA	74,60	75,80	82,93	76,85	82,85	82,56
MUFA	24,82	26,49	22,07	27,88	22,02	21,08
PUFA	49,78	49,31	60,86	48,97	60,83	61,48
PUFA-n6	41,84	41,49	27,53	36,95	26,01	27,53
PUFA-n3	7,93	7,82	33,33	12,02	34,82	33,95
DFA	76,58	77,89	86,00	79,08	85,96	85,57
UFA/SFA	2,94	3,13	4,86	3,32	4,83	4,73
MUFA/SFA	0,98	1,09	1,29	1,20	1,28	1,21
PUFA/SFA	1,96	2,04	3,57	2,12	3,55	3,53
PUFA n6/n3	5,27	5,31	0,83	3,07	0,75	0,81

Do dnia 30 grudnia 2021 roku, w ramach doświadczenia wzrostowego, tucz kontrolny ukończyło 35 sztuk (tj. 60%) świń złotnickich pstrych. Zebrane próbki zostały przekazane do analiz.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie zamierzonego celu:

W ramach drugiego roku realizacji zadania, przeanalizowano dane uzyskane z doświadczenia pierwszego przeprowadzonego w 2020 roku. W oparciu o wyniki tych analiz ustalono, że w doświadczeniu 2. zwierzęta tuczone będą mieszanką paszową C – do masy ubojowej 140 kg. Przygotowano metodykę doświadczenia żywieniowego, w tym opracowano receptury dodatków do mieszanki paszowej finiszer, zawierających biologicznie aktywne substancje pochodzenia roślinnego, mające poprawić trwałość oksydacyjną oraz wartość dietetyczną (prozdrowotną) mięsa. Zastosowano trzy rodzaje dodatków paszowych (X, Y, Z), będących mieszaniną suszy ziółowych i/lub owocowych. Ponadto, do dwóch grup doświadczalnych dodano dodatkowo ekstradowane nasiona Inu.

Przeprowadzono doświadczenie wzrostowe, które objęło 60 tuczników (30 wieprzków, 30 loszek) rasy złotnickiej pstrej o znanym genotypie RYR1. Na próbkach pasz doświadczalnych typu finiszer wykonano analizy składu podstawowego, profilu kwasów tłuszczowych paszy i zidentyfikowano lotne związki organiczne. Do dnia 30 grudnia, w ramach doświadczenia 2., tucz doświadczalny ukończyło 60% świń złotnickich pstrych. Po uboju zwierząt określono parametry dysekcji ich tusz i jakości mięsa oraz pobrano 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 01-12-05-11

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

kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnówka-Czajka

W 2021 roku zakończono badania, których celem było określenie wpływu dodatku do paszy immunostymulatorów na kształtowanie się odporności kur rasy zielononóżka kuropatwiana oraz rhode island red, utrzymywanych zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego. Na badania składały się zasadniczo dwa doświadczenia mające na celu określenie wpływu dodatków ziołowych oraz kwasu askorbinowego na status zdrowotny kur rasy zielononóżka kuropatwiana Z-11 (doświadczenie 1.) oraz rhode island red R-11 (doświadczenie 2.). Kury w obu doświadczeniach utrzymywano na certyfikowanej fermie kur nieśnych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że czynniki doświadczalne (mieszanka ziół o działaniu immunostymulującym oraz kwas askorbinowy) nie miały istotnego wpływu na wyniki produkcyjne kur rasy zielononóżka kuropatwiana (Z-11) oraz rhode island red (R-11). Mieszanka ziół o działaniu immunostymulującym korzystnie wpłynęła na układ odpornościowy doświadczalnych kur Z-11, o czym świadczy większy procentowy udział śledziony oraz grasicy w porównaniu z grupą kontrolną oraz ptakami otrzymującymi do paszy dodatek kwasu askorbinowego. Dodatek do paszy kwasu askorbinowego wpłynął na wyższy poziom leukocytów oraz kompleksu immunoglobulinowego w przypadku kur rasy zielononóżka kuropatwiana, co przełożyło się także na wyższy poziom immunoglobulin we krwi piskląt wyklutych z jaj zebranych od tych kur.

Zaobserwowano niższy poziom glukozy we krwi kur rasy rhodei island red otrzymujących do paszy dodatek mieszanki ziołowej oraz kwasu askorbinowego, co może świadczyć o mniejszym zestresowaniu i lepszym dobrostanie kur z grup doświadczalnych. Obserwowano także niższy poziom glukozy we krwi piskląt wyklutych z jaj od kur otrzymujących do diety mieszankę z ziół o działaniu immunostymulującym.

Odnotowano wpływ czynników doświadczalnych na jakość jaj wylęgowych. Dodatek do paszy dla kur rasy zielononóżka kuropatwiana kwasu askorbinowego pozytywnie wpłynął na masę oraz gęstość skorupy jaj. Obserwowano także korzystny wpływ czynników doświadczalnych na masę żółtka oraz poziom witaminy E w jajach kur rasy rhode island red.

W przypadku kur rasy RIR dodatek do paszy mieszanki z ziół obniżył jednakże jakość skorupy jaj wylęgowych (grubość, gęstość, wytrzymałość), a dodatek kwasu askorbinowego wpłynął na niższy poziom w żółtkach jaj PUFA, PUFA-6 oraz PUFA-3 w porównaniu z grupą kontrolną oraz drugą grupą doświadczalną.

Nie stwierdzono istotnego wpływu dodatku do paszy mieszanki z ziół oraz kwasu askorbinowego na wyniki wylęgu piskląt rasy Z-11 oraz R-11.

Wyniki z przeprowadzonych badań wskazują na odmienną reakcję organizmu kur różnego pochodzenia na zastosowane czynniki doświadczalne.

Zadanie 01-12-08-11

Wpływ czynników środowiskowych na poprawę efektywności chowu kur ras zachowawczych.

kierownik zadania: prof. dr hab. Józefa Krawczyk

Cel badań:

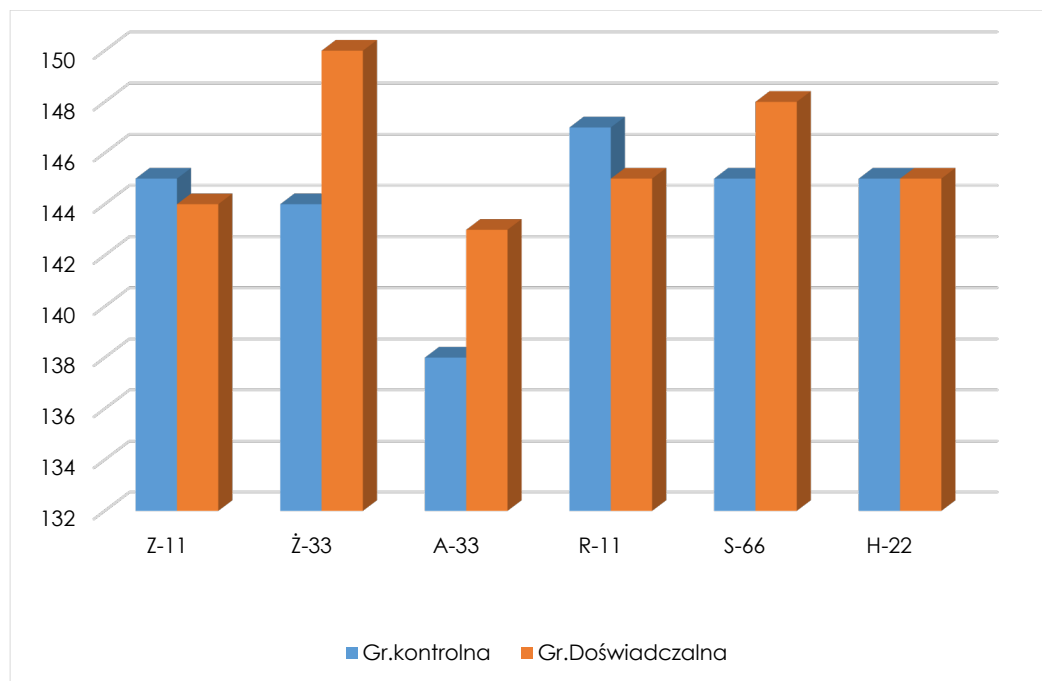
Celem badań było określenie wpływu żywienia kur ras zachowawczych mieszankami paszowymi z udziałem roślin strączkowych na wyniki produkcyjne i jakość jaj.

Badaniami objęto po 120 kur i 12 kogutów 6 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 podzielone będą 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.

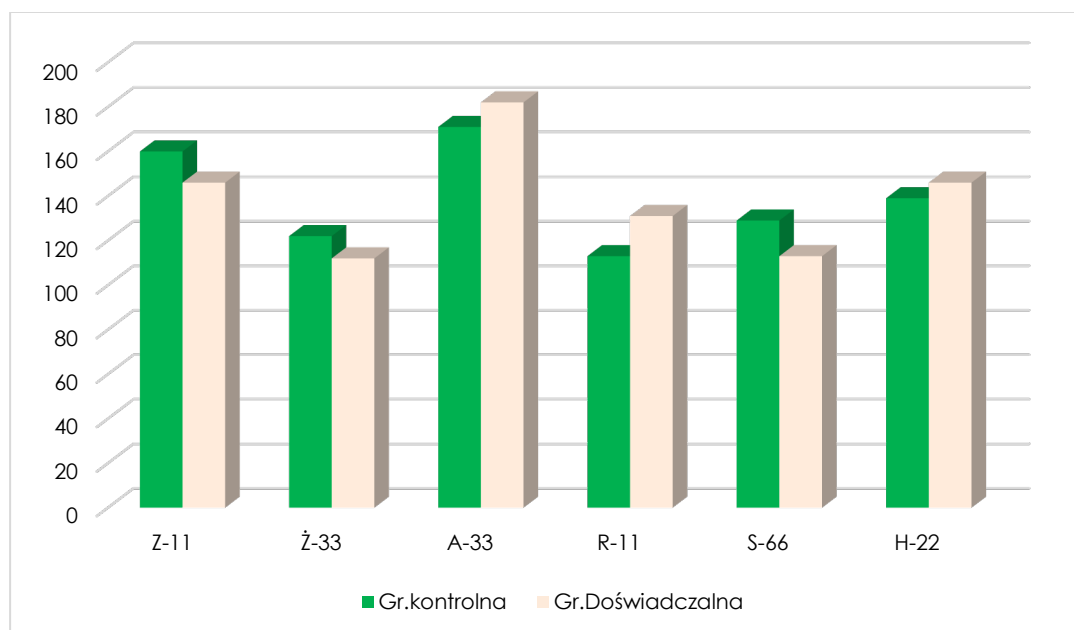
Zebrano i obliczono wyniki produkcyjne kur tj. spożycie paszy (Rycina 1.) oraz liczbę jaj (Rycina 2.), wykonano analizy jakości jaj zniesionych przez kury obydwu grup w 52. tygodniu życia. Pobrano także próbki jaj do analiz chemicznych w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w spożyciu paszy oraz ilości zniesionych jaj między kurami z grup kontrolnych a doświadczalnych (Rycina 1.-2.).

W badaniach jakości jaj stwierdzono większe różnice 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 ($P \leq 0,01$), 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 ($P \geq 0,05$).

Rycina 1. Spożycie paszy (g/dzień/szt.).



Rycina 2. Liczba jaj (sztuk/nioskę).



Podsumowanie:

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że zastępowanie w mieszankach dla kur ras zachowawczych importowanej soi nasionami grochu, bobiku i łubinu żywieniu nie obniża nieśności i nie wpływa na obniżenie jakości jaj.

Zadanie 01-12-09-11

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

kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnowka-Czajka

Cel badania:

Celem badania była ocena efektywności odchovu kurcząt rzeźnych rasy lokalnie zaadaptowanej rhode island red w warunkach długotrwałego stresu zimna w chowie ekologicznym.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta rasy rhode island red (RIR), pochodzące od kur nieśnych ekologicznych (w ogólnej liczbie 300 sztuk), przydzielone do trzech grup: grupa I – kontrolna, grupa II – kurczęta w okresie od 6. do 9. tygodnia, które poddano działaniu stresu termicznego (temperatura obniżona o 15°C w stosunku do temperatur zalecanych) oraz grupa III – zastosowano ten sam czynnik doświadczalny w późniejszym okresie odchovu, tj. od 9. do 12. tygodnia życia ptaków. Wszystkie kurczęta były utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego i odchowywane do 12. tygodnia życia.

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 C i E oraz wskaźnika TBA. W 6., 9., 10. i 12. tygodniu odchovu pobrano krew od 10 ptaków z grupy,

w surowicy krwi oznaczono całkowity poziom immunoglobulin, glukozę, hormony tarczycy, hematokryt, dysmutazę ponadtlenkową (SOD), dialdehyd malonowy (MDA) oraz poziom kortykosteronu. W ww. 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. W okresie obniżonych temperatur powietrza przeprowadzono obserwacje behawioralne.

Podsumowując dotychczas opracowane wyniki, stwierdzono, że czynnik doświadczalny nie miał wpływu na końcową masę ciała kurcząt rzeźnych. Kurczęta rzeźne z grupy II, którym została obniżona temperatura powietrza w 6.-9. tygodniu odchowu charakteryzowały się niższą temperaturą radiacyjną w 6., 9. oraz 10. tygodniu odchowu oraz dłuższym trwaniem zniechęcenia tonicznego w 9. tygodniu odchowu w porównaniu z grupą kontrolną. Tuszki ptaków z grupy II odznaczały się natomiast mniejszym udziałem tłuszczu sadełkowego, podrobów oraz wątroby w stosunku do tuszek ptaków z grupy kontrolnej. W przypadku kurcząt rzeźnych z II grupy doświadczalnej odnotowano także niższe pH mięśni piersiowych oraz mniejszy wyciek mięśni nóg w porównaniu z grupą I. Kurczęta rzeźne z grupy III, którym została obniżona temperatura powietrza w 9.-12. tygodniu odchowu charakteryzowały się większym procentowym udziałem śledziony oraz serca, niższą temperaturą ciała w 10. oraz 12. tygodniu doświadczenia oraz lepszymi wynikami analizy rzeźnej w porównaniu z grupą I. Mięso kurcząt z grupy III odznaczało się natomiast niższym pH₂₄ oraz mniejszym wyciekiem mięśni nóg w stosunku do grupy kontrolnej.

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

Wyszczególnienie	Tydzień odchowu	Grupa			SEM
		I kontrolna	II 6-9 tyg. obniżona temp. powietrza	III 9-12 tyg. obniżona temp. powietrza	
Temperatura rektalna	6	41,64	41,74	41,62	0,06
Temperatura radiacyjna OP*		34,62 a	32,87 A	37,75 Bb	0,60
Temperatura radiacyjna NOP**		30,63	29,38	30,41	0,40
Toniczny bezruch		96,20	94,10	147,30	16,22
Temperatura rektalna	9	41,31	41,53	41,30	0,12
Temperatura radiacyjna OP*		29,17 A	19,88 B	28,13 A	0,98
Temperatura radiacyjna NOP**		30,06 A	15,83 B	29,65 A	1,32
Toniczny bezruch		186,11 a	392,40 b	160,20 a	40,37
Temperatura rektalna	10	41,63	41,78	41,58	0,08
Temperatura radiacyjna OP*		29,48 A	18,53 B	16,31 B	1,22
Temperatura radiacyjna NOP**		32,62 A	12,12 B	13,53 B	1,78
Toniczny bezruch		180,70	126,80	193,90	27,44
Temperatura rektalna	12	42,00 a	41,87	41,52 b	0,08
Temperatura radiacyjna OP*		28,95 Aa	30,41 Ab	16,41 B	1,19
Temperatura radiacyjna NOP**		31,74 A	35,86 B	10,99 C	2,04
Toniczny bezruch		335,00	200,60	227,50	62,04

* Temperatura radiacyjna OP – temperatura radiacyjna opierzonych części ciała kurczęcia.

** Temperatura radiacyjna NOP – temperatura radiacyjna nieopierzonych części ciała kurczęcia.

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. Wyniki analizy rzeźnej kurcząt rzeźnych.

Wyszczególnienie (%)	Grupa			SEM
	I kontrola	II 6-9 tyg. obniżona temp. powietrza	III 9-12 tyg. obniżona temp. powietrza	
Wydajność rzeźna z podrobami	72,26	71,96 a	73,49 b	0,27
Wydajność rzeźna bez podrobów	67,39	67,66	68,56	0,30
Mięśnie piersiowe	14,86 A	15,23 a	16,23 Bb	0,21
Mięśnie nóg	19,01	19,17	19,45	0,18
Kości nóg	7,03	7,03	7,08	0,12
Tłuszcz sadełkowy	1,73 A	1,52 a	0,83 Bb	0,12
Podroby	6,62 A	5,98 Bb	6,42 a	0,09
Wątroba	2,40 A	2,08 B	2,21 B	0,03
Żółtek	3,56	3,23	3,50	0,07
Serce	0,67	0,72	0,71	0,01

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. pH – mięśni piersiowych i nóg kurcząt rzeźnych.

Wyszczególnienie		Grupa			SEM
		I kontrola	II 6-9 tyg. obniżona temp. powietrza	III 9-12 tyg. obniżona temp. powietrza	
Mięśnie piersiowe	pH ₁₅	6,09 A	5,94 B	6,04	0,05
	pH ₂₄	6,26 A	6,17 A	5,98 B	0,02
Mięśnie nóg	pH ₁₅	6,35	6,59	6,44	0,03
	pH ₂₄	6,69A	6,52 a	6,14 Bb	0,08

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

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

Zadanie 04-12-03-11

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

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

Cel zadania:

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

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

Materiał doświadczalny stanowiły pobrane i zabezpieczone w poprzednich etapach badań mięśnie piersiowe powierzchniowe (*pectoralis superficialis*) szybko i wolno rosnących

kurcząt brojlerów, przydzielone do grup na podstawie oceny makroskopowej, w zależności od braku lub wystąpienia miopatii WS (*white stripping*) z uwzględnieniem stopnia jej nasilenia.

Grupę 0 stanowiły mięśnie normalne, w których nie obserwowano wady, natomiast do grup 1 i 2 przydzielono mięśnie o odpowiednio małym i średnim jej nasileniu. Wśród analizowanych mięśni nie odnotowano przypadków dużego nasilenia badanej miopatii.

Zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w zamrażarce (-87°C) próbki pocięto w kriostacie (HR-Slee) na skrawki o grubości 10 µm, w temperaturze -25°C, i poddano reakcji na wykrywanie dehydrogenazy NADPH (diaforazy) metodą Pearsa oraz reakcji na aktywność ATP-azy miozynowej zgodnie z metodyką Brooke i Kaiser (1970) oraz Guth i Samaha (1972). W celu określenia tłuszczu śródmięśniowego przeprowadzono także barwienie czerwieni olejową (*Oil red*). Badania zostały przeprowadzone przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon E600 oraz programu analizy obrazu Multi Scan 95.

Wyniki badań mikrostruktury mięśni piersiowych kurcząt wskazują, że wystąpienie miopatii WS istotnie wpłynęło na procentowy udział włókien mięśniowych o prawidłowej budowie (Tabela 1.). Nie potwierdzono natomiast wpływu badanej miopatii na ich średnicę. Najczęściej obserwowaną zmianą histopatologiczną mięśni piersiowych kurcząt był przerost włókien mięśniowych (włókna olbrzymie). Ich udział był istotnie większy w mięśniach o średnim nasileniu miopatii WS (grupa 2.) w porównaniu do grupy normalnej (grupa 0). Inną obserwowaną zmianą patologiczną w mięśniach piersiowych kurcząt obarczonych WS była atrofia (zanik włókien mięśniowych). Jednak w tym przypadku, różnic w procentowym udziale włókien atroficznych pomiędzy badanymi grupami mięśni nie potwierdzono statystycznie. Badania wykazały również obecność zmian w postaci martwicy z fagocytozą. Największy potwierdzony statystycznie udział włókien objętych tą wadą stwierdzono w grupie 2., najmniejszy zaś w grupie mięśni normalnych. Procesowi martwiczemu towarzyszyły także zmiany zwyrodnieniowe takie jak ujednolicenie struktury włókna mięśniowego lub jego rozpad. Nasilaniu się miopatii WS mięśni piersiowych kurcząt towarzyszyły także zmiany związane z przerostem tkanki łącznej. W mięśniach piersiowych grupy 2. stwierdzono znaczny wzrost udziału zrębu łącznotkankowego w strukturze mięśni oraz sporadyczne nacieki limfocytów.

Tabela 1. Średnica włókien mięśniowych prawidłowych oraz procent zmian histopatologicznych w mięśni piersiowym szybko rosnących kurcząt w zależności od nasilenia miopatii WS.

Cecha	0	1	2	SEM
Włókna prawidłowe (%)	99,68 a	96,58	92,46 b	0,03
Włókna prawidłowe (µm)	59,67	60,62	62,78	0,08
Włókna olbrzymie (%)	0,07 a	2,55	4,77 b	0,10
Włókna atroficzne (%)	0,25	0,41	0,78	0,05
Martwica z fagocytozą (%)	0,02 a	0,66	1,99 b	0,13
Przerost tkanki łącznej (%)	-	+	++	0,02
Zmiany zapalne	-	-	+	0,01

Ponadto, w obrazie mikroskopowym mięśni piersiowych zakwalifikowanych do grupy 2., w przeciwieństwie do mięśni normalnych, zaobserwowano nagromadzenie ziaren tłuszczu śródmięśniowego, przy czym wyniki te były zbieżne z wynikami analizy składu chemicznego mięsa.

Tabela 2. Średnica włókien mięśniowych prawidłowych oraz procent zmian histopatologicznych w mięśni piersiowym wolno rosnących kurcząt w zależności od nasilenia miopatii WS.

Cecha	0	1	2	SEM
Włókna prawidłowe (%)	100	100	-	0,06
Włókna prawidłowe (µm)	51,27	51,62	-	0,15

Analiza mikrostruktury mięśni piersiowych kurcząt wolno rosnących nie wykazała różnic w wielkości prawidłowych włókien mięśniowych pomiędzy grupą normalną (grupa 0) a mięśniami o małym nasileniu wady WS (grupa 1.). Nie stwierdzono też obecności włókien olbrzymich ani innych zmian histopatologicznych w strukturze mięśni tych ptaków (Tabela 2.), przy czym mięśnie piersiowe kurcząt wolno rosnących w większości przypadków kwalifikowane były jako normalne, zaś występująca u nich sporadycznie miopatia WS występowała jedynie w małym nasileniu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że choć małe lub średnie nasilenie miopatii białych smug (WS) nie wpływa na wydajność poubojową i technologiczną jakość mięsa, może jednak determinować jego wartość odżywczą oraz niektóre wyznaczniki jakości sensorycznej i przez to zmniejszyć jego akceptację wśród konsumentów.

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

Cel badań:

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

Materiał doświadczalny stanowiły koguty i kaptony rasy karmazyn/rhode island red (K-22), utrzymywane w systemie ściółkowym. Doświadczenie przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB w Chorzeli Sp. z o.o. Ptaki po wylęgu zważono i oznakowano znaczkami, a następnie przydzielono losowo 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.

Wszystkie ptaki przez cały okres odchowu i tuczu miały stały, nieograniczony (*ad libitum*) dostęp do paszy oraz do wody pitnej. Na potrzeby doświadczenia opracowano receptury mieszanek paszowych – mieszanek kontrolną (zbożową z poekstrakcyjną śrutą sojową) oraz mieszanek doświadczalną (zbożową opartą na krajowych źródłach białka).

Ptaki utrzymywano z zachowaniem dobrostanu, w optymalnych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 sztuk/m². Program szczepień obejmował szczepienia przeciwko chorobie Mareka – rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro oraz kokcydiozie. Zabieg kastracji został przeprowadzony w znieczuleniu miejscowym przez lekarza weterynarii w 8. tygodniu życia ptaków, przy masie ciała ok. 580 g. Po zabiegu ptaki zostały przeniesione do czystego pomieszczenia, gdzie podano im wodę i paszę. Po zakończeniu tuczu, tj. w 24. tygodniu życia ptaków, z każdej grupy wybrano do uboju po 10 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Kogutki i kaptony przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Czynność uśmiercania została przeprowadzona przez osobę przeszkoloną metodą dekapita-

cji. Za pomocą pH-metru CyberScan 10 określono kwasowość mięśni w 15. minucie po uśmierceniu ptaków i ich skrawaniu, a następnie została przeprowadzona standardowa obróbka poubojowa (oparzanie, skubanie, patroszenie). Skontrolowano skuteczność przeprowadzonego zabiegu (brak jader). 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*.

Po wykonaniu zabiegu kastracji, w wyniku niedoboru testosteronu w dość krótkim czasie obserwuje się zmiany w wyglądzie i zachowaniu samców, co również zaobserwowano w badaniach własnych (Fot. 1.-2.). Dotyczyło to drugorzędnych cech płciowych, tj. grzebienia i dzwonek, które stały się bladożółte i w ciągu kilku tygodni ulegały uwsteczniению. Ptaki po przeprowadzonym zabiegu stały się bardziej spokojne i mniej aktywne.

Fot. 1. Kapłon karmazyn/RIR – K-22.

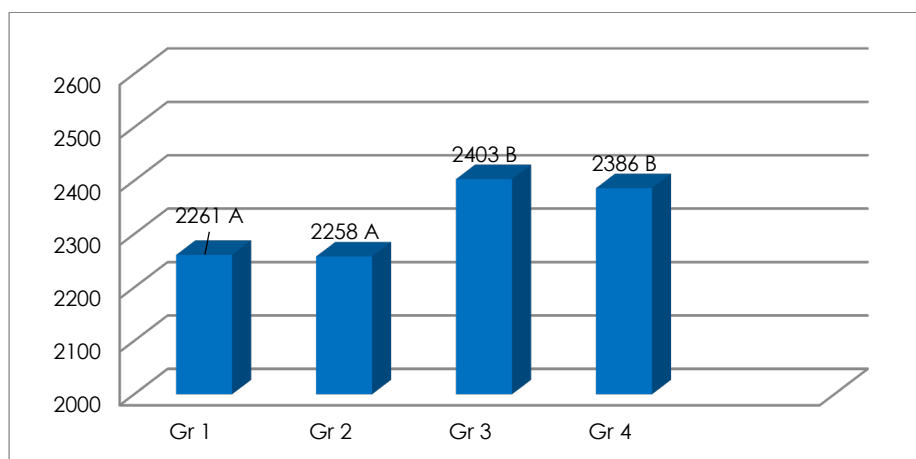


Fot. 2. Kogut karmazyn/RIR – K-22.

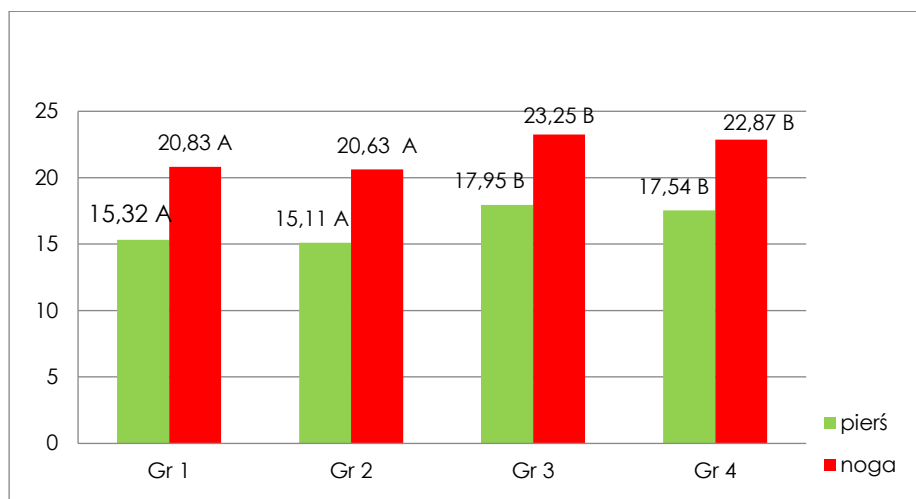


W 24. tygodniu życia ptaków, średnia masa ciała była istotnie większa w grupie III i IV ($P \leq 0.01$), czyli u kastrowanych ptaków, przy jednocześnie istotnie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$) mniejszych stratach masy tuszek podczas ich przechowywania (o 0,54 pkt. proc.). Kapłony wyróżniały się także istotnie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$) większą wydajnością rzeźną z podrobami (średnio o 0,82 pkt. proc.) i bez podrobów (średnio o 0,56 pkt. proc.) oraz zawartością mięśni piersiowych (17,54-17,95%). Również zawartość mięśni nóg była istotnie ($P \leq 0.01$) większa u kapłonowanych ptaków (22,87-23,25%). W grupach kastrowanych ptaków odnotowano istotnie ($P \leq 0.05$) większy udział narządów wewnętrznych, a w tym szczególnie wątroby ($P \leq 0.01$) oraz tendencje do większej zawartości żołądka i serca. W badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w procentowym udziale kości nóg. Natomiast kogutki i kapłony różniły się istotnie ($P \leq 0.01$) pod względem zawartości tłuszczu sadełkowego, stanowiącego odpowiednio w grupie I i II: 1,35 i 1,29% oraz w grupie III i IV: 2,31 i 2,21% masy tuszki. Oceniane grupy ptaków różniły się także istotnie ($P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$) w zakresie barwy tuszek oraz ocenianych partii mięśni. Tuszki kapłonów wyróżniały się istotnie ($P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$) jaśniejszą (L^*) i bardziej żółtą (b^*) barwą przy mniejszym jej wysyceniu w kierunku czerwonej (a^*). Podobne zależności zaobserwowano u kastrowanych ptaków w mięśniach piersiowych i nóg. Pomiar kwasowości pH mięśni wskazują, że zabieg kapłonowania nie wpłynął na zakwaszenie ocenianych mięśni po uboju i ich schłodzeniu. Generalnie, w przeprowadzonych analizach nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy ocenianymi grupami ptaków w zależności od zastosowanych mieszanek paszowych.

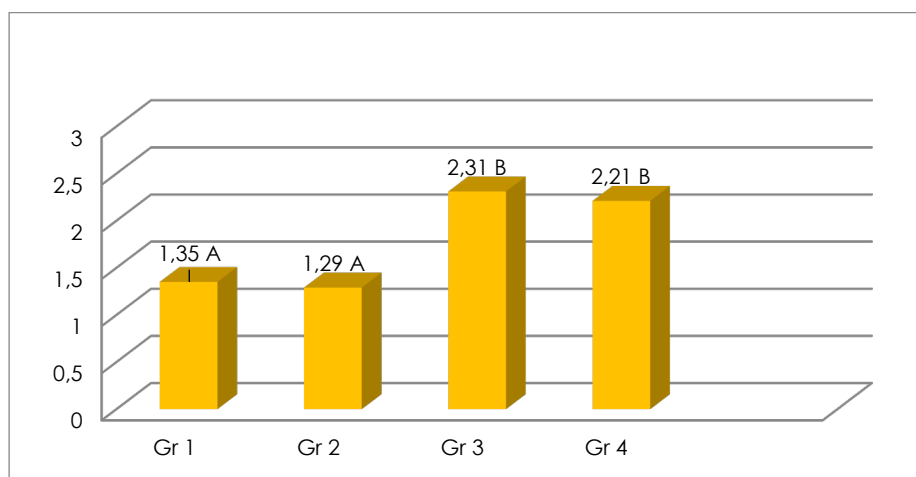
Rycina 1. Masa ciała (g).



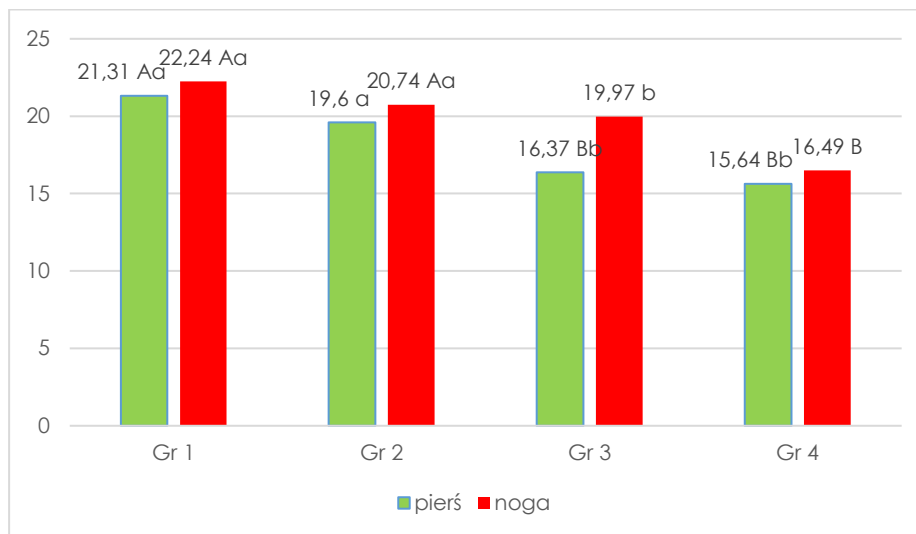
Rycina 2. Zawartość mięśni piersiowych i nóg (%).



Rycina 3. Zawartość tłuszczu sadełkowego (%).



Rycina 4. Kruchość mięśni piersiowych i nóg (N)

**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

Cel zadania:

Celem badań było określenie wpływu wybranych preparatów bioaktywnych podanych *in ovo*, w określonych terminach okresu embriogenezy kaczek, na kształtowanie wskaźników wylęgowości, przeżywalności i zdrowotności piskląt.

Materiałem badawczym w realizowanym zadaniu były jaja wylęgowe kaczek, pochodzące ze stada hodowlanego D-11 (kaczka dworka), przeznaczonego do chowu przydomowego. Ptaki te utrzymywane są w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego Instytutu Zootechniki PIB ZD Kołuda Wielka.

Fot. 1. Kaczki dworki (D-11).



Kaczki, 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 kaczek.

W okresie od maja do czerwca 2021 roku przeprowadzono iniekcję witaminą K (Vitacon/Phytomenadionum, 10 mg/ml, Polfa, Warszawa) i preparatem lizozymu o aktywności ≥ 40.000 U/ml (1 g, Sigma-Aldrich).

Utworzono sześć grup doświadczalnych:

- grupa 1. – kontrolna niepoddana iniekcji (K1)* (30 jaj) (12 doba),
- grupa 2. – doświadczalna 1 (D1-K1) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 12. dniu inkubacji (30 jaj),
- grupa 3. – doświadczalna 2 (D2-K2) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj),
- grupa 4. – kontrolna niepoddana iniekcji (K2)* (30 jaj) (20. doba),
- grupa 5. – doświadczalna 1 (D1-L1) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml /jajo w 12. dniu inkubacji (30 jaj),
- grupa 6. – doświadczalna 2 (D2-L2) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml /jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

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



Fot. 3. Oznaczanie jaj i iniekcja do komory powietrznej świeżo przygotowanego roztworu wit. K.



Wszystkie doświadczenia i badania zrealizowano w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, Instytut Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Kołuda Wielka. W tutajszym Zakładzie Wylęgowym przeprowadzono zgodnie z przyjętymi w nim standardowymi procedurami inkubację doświadczalnych jaj 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 iniekowanej witaminą K w dawce 10 mg/jajo w 20. dniu inkubacji – 92,78 g. Z kolei najniższą masę nałożonych

jaj odnotowano w grupie K2 (grupa kontrolna niepoddana iniekcji/20. doba) – 87,90 g. W przypadku pozostałych grup doświadczalnych kaczek masa ww. jaj mieściła się w przedziale od 89,48 (iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml/jajo w 20. dniu inkubacji) do 92,49 g (iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 12. dniu inkubacji). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

W grupie kaczek iniekowanych preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml /jajo w 20. dniu inkubacji (D2-L2) wykazano największy stosunek jaj wylężonych do zapłodnionych (90,40%) i wylężonych do przełożonych (94,40%), przy jednocześnie najmniejszej ilości jaj nie wylężonych (5,60%), piskląt kalekich (0,37%) i zarodków zamartych (4,23%). Odwrotną sytuację stwierdzono w grupie doświadczalnej K-2 (kontrolna, bez iniekcji – 20. doba), w której odnotowano najmniejszy stosunek jaj wylężonych do zapłodnionych (86,14%) oraz jaj wylężonych do przełożonych (91,99%). Stwierdzono także największą ilość jaj niewylężonych (8,00%), ilość piskląt kalekich (0,86%) i zarodków zamartych (8,16%). Ilość jaj przełożonych zawierała się w granicach od 91,83 (K-2) do 95,77% (D2-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

Cel zadania:

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

Ptaki po wylęgu oznakowano i przydzielono losowo do czterech grup:

- grupa I – kurki bez sterylizacji; system utrzymania – ściółkowy; żywienie – mieszanka standard,
- grupa II – kurki bez sterylizacji; system utrzymania – ściółkowy; żywienie – mieszanka doświadczalna,
- grupa III – pulardy; system utrzymania – ściółkowy; żywienie – mieszanka standard,
- grupa IV – pulardy, system utrzymania – ściółkowy; żywienie – mieszanka doświadczalna.

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

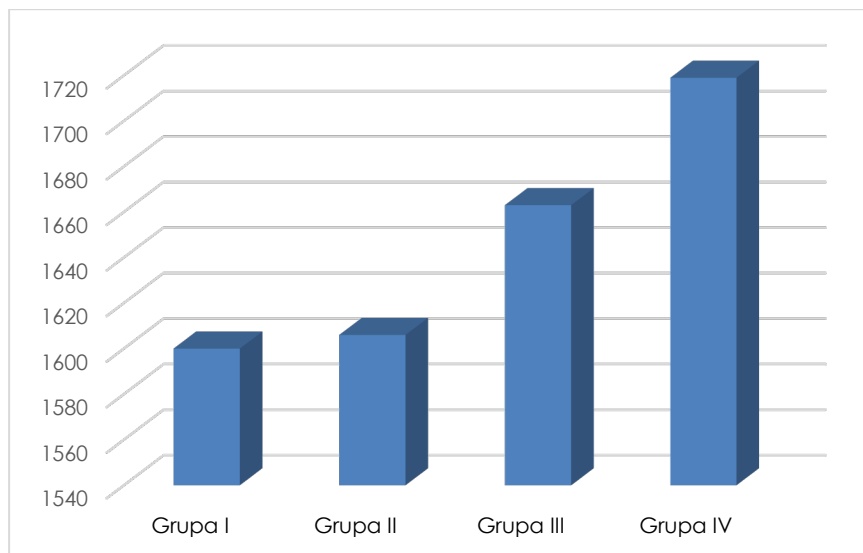
Po zakończeniu doświadczenia, z każdej grupy wybrano do uboju po 8 ptaków, o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Ptaki przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Po uboju sprawdzono skuteczność przeprowadzonego zabiegu sterylizacji (brak jajnika).

Schłodzone tuszki poddano uproszczonej analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989) po uprzednim określeniu ich barwy, 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 12.

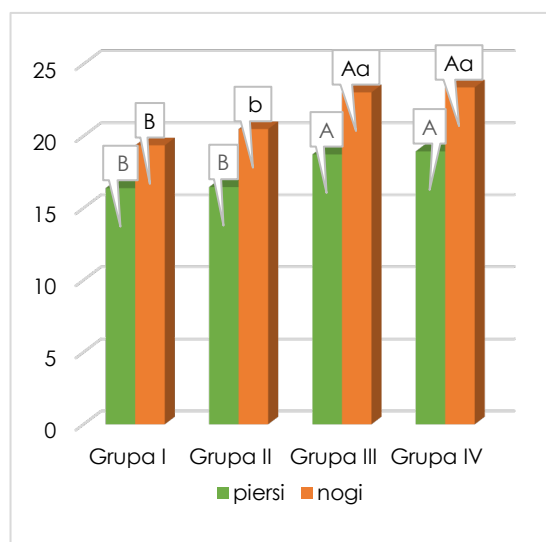
W okresie od 10. do 24. tygodnia życia, pulardy wyróżniały się większą masą ciała niż kurki. Ostatecznie, masa ciała 24-tygodniowych, sterylizowanych ptaków żywionych mieszanką doświadczalną wyróżniała się szczególnie w porównaniu z kurkami żywionymi tą samą paszą (Rycina 1.).

Rycina 1. Masa ciała (g).

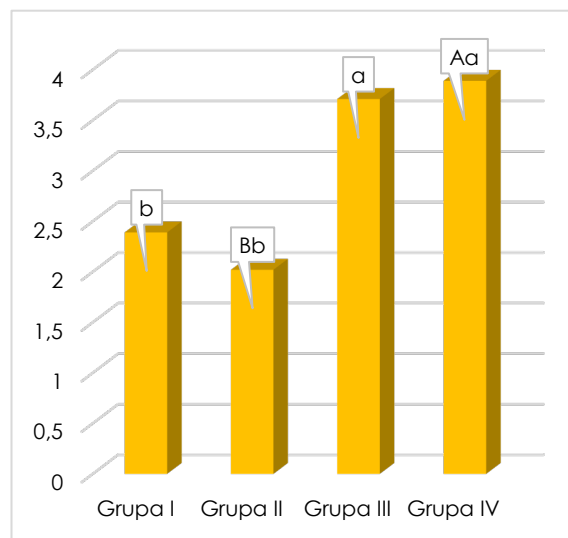


Jak można zauważyć na Rycinie 2. pulardy wyróżniały się również istotnie ($P \leq 0,01$) większą zawartością mięśni piersiowych jak i nóg ($P \leq 0,05$). Ptaki z grupy I-II oraz III-IV różniły się istotnie $P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$ pod względem zawartości tłuszczu sadełkowego (Rycina 3.).

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



Rycina 3. Zawartość tłuszczu sadełkowego (%).



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 15 minutach po uboju oraz po 24 godzinach chłodzenia tuszek, utrzymywała się na podobnym poziomie, zarówno między kurkami a pulardami żywionymi tymi samymi mieszankami. Biorąc pod uwagę barwę tuszki

(Tabela 1.), wartości różniły się istotnie $P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$. Pulardy cechowały się jaśniejszą barwą, były bardziej żółte i mniej czerwone w porównaniu z kurkami.

Tabela 1. Barwa tuszki w skali: $L^*a^*b^*$.

Wyszczególnienie	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
L^*	$68,21 \pm 1,10Bb$	$68,25 \pm 1,52Bb$	$70,36 \pm 1,18a$	$70,88 \pm 1,22A$
a^*	$4,29 \pm 0,22A$	$4,23 \pm 0,28A$	$3,62 \pm 0,48B$	$3,40 \pm 0,42B$
b^*	$11,37 \pm 2,14b$	$13,57 \pm 1,58b$	$15,74 \pm 2,52A$	$18,13 \pm 2,40 A$

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

Podsumowując, zabieg sterylizacji kurek wpłynął korzystanie na masę ciała i umięśnienie tuszki. Pomiedzy ocenianymi grupami ptaków odnotowano także zróżnicowanie w zakresie wybarwienia tuszki, która u pulard była jaśniejsza (L^*) i bardziej żółta (b^*), natomiast u kurek bardziej czerwona (a^*). Pod względem wszystkich badanych cech lepsze wyniki uzyskały pulardy żywione paszą doświadczalną.

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

Fot. 1. Kozy karpackie (M. Pasternak).



Realizacja zadania uwzględnia cele szczegółowe:

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

Rysunek 1. Rozmieszczenie stad kóz karpackich objętych badaniami.



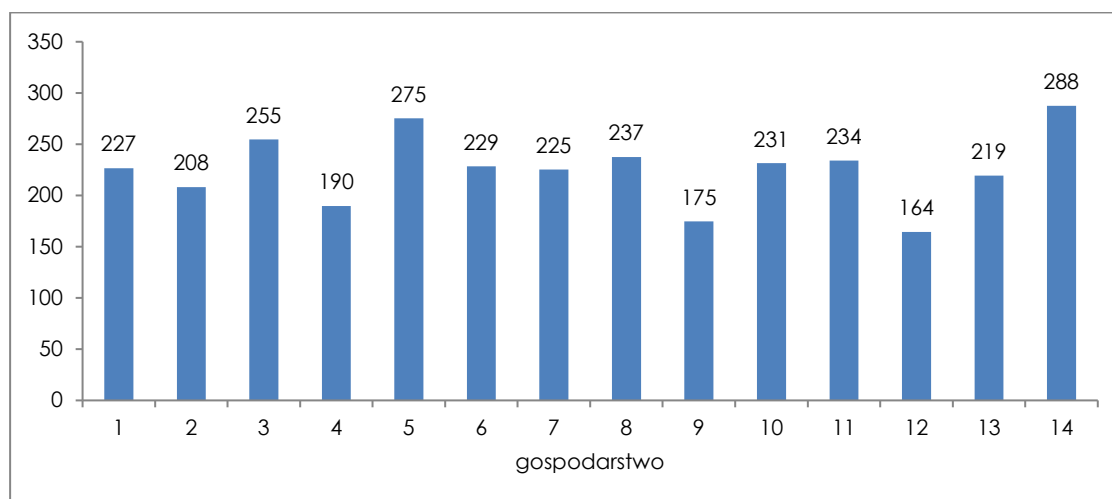
Baza danych:

W okresie sprawozdawczym, w utworzonej w trakcie realizacji zadania aplikacji bazodanowej, gromadzono dane dla całej populacji kóz karpackich. Uaktualniona baza danych zawiera informacje o 330 kozach i 72 kozłach. Aplikacja ta posiada następujące możliwości: edycja/dodawanie nowych zwierząt wraz z walidacją danych przed zapisem wyświetlanie danych hodowców wraz z filtrowaniem, edycja/dodawanie hodowców wraz z walidacją danych przed zapisem oraz generowanie „Świadectwa wpisu do ksiąg”.

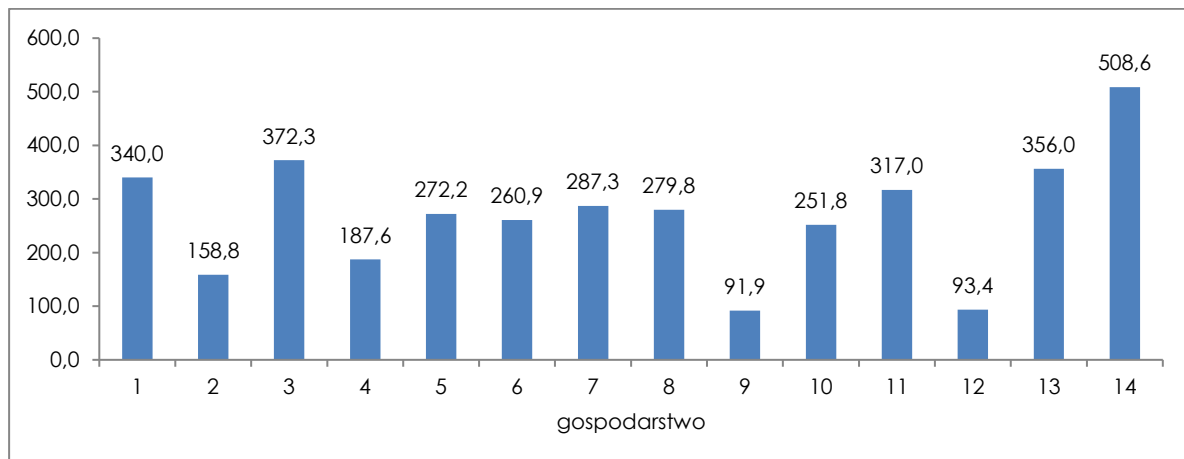
Świadectwa dla kóz rasy karpacka przyznawane są od stycznia 2010 roku. Do końca 2019 roku świadectwo uzyskały 324 kozy i 63 kozły. Gospodarstwa znajdowały się na terenie województw: dolnośląskiego, lubelskiego, łódzkiego, małopolskiego, opolskiego, podkarpackiego, śląskiego, świętokrzyskiego i wielkopolskiego. Najwięcej świadectw wystawiono w 2017 roku dla kóz (91), a w 2018 roku dla kozłów (16).

Kozy z analizowanych gospodarstw były pod kontrolą użytkowości mlecznej i rozplodowej. Oceniono 148 kóz matek – dój trwał średnio 227 dni (od 111-300 dni), a średnia wydajność mleczna wynosiła 269,7 kg mleka. Najwyższa wydajność mleczna wynosiła 508 kg, najniższa 92 kg. Zawartość tłuszczu mieściła się w przedziale od 1,24-5,04%, średnio wynosząc 2,8%, a zawartość białka w przedziale od 1,77-3,89%, średnio 2,9%. Urodziło się 216 kozłąt, średnio na wykot przypadało 1,5 kozłęcia, z czego 46% stanowiły koziołki, a 54% kózki.

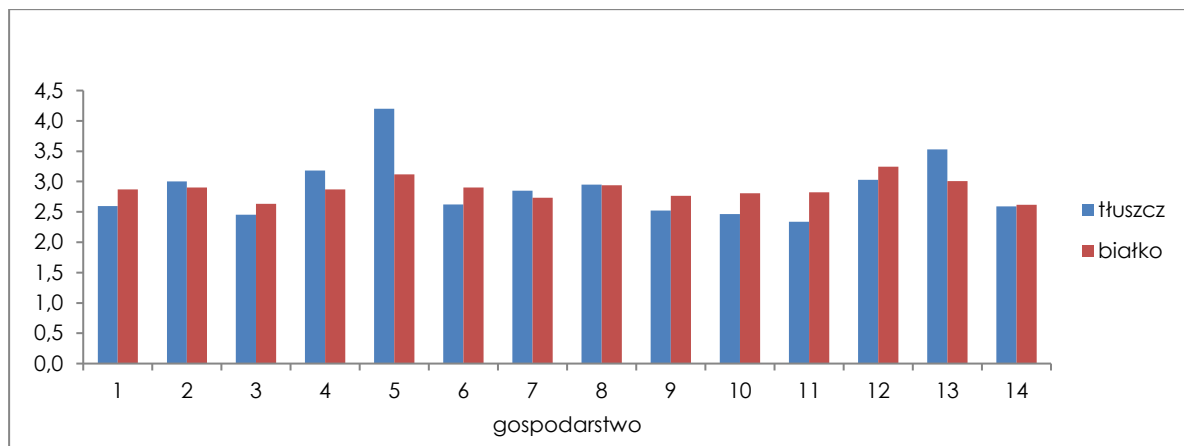
Wykres 1. Średnia długość doju (dni).



Wykres 2. Średnia wydajność mleka (kg).



Wykres 3. Zawartość tłuszczu i białka w mleku (%).



Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych:

W roku sprawozdawczym zakończono analizę polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. W ramach tych działań przebadano 249 dorosłych osobników kóz karpackich (samice i samce) w 14 stadach objętych programem ochrony zasobów genetycznych (Rysunek 1.). W badaniu tym przeanalizowano 14 markerów mikrosatelitarnych zalecanych przez International Society for Animal Genetics (ISAG) do indywidualnej identyfikacji kóz i testowania ich pochodzenia.

Stwierdzono, że kozy karpackie hodowane w Polsce, charakteryzowały się stosunkowo dużym zróżnicowaniem genetycznym, ze średnią *alleli* na *locus*, wynoszącą 9,143. W analizowanych stadach, średnia liczba *alleli* w *locus* wahała się w zakresie od 3 do 8.214. Wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej przyjmowały wartości od najniższych (odpowiednio $H_o=0.439$ i $H_e=0.467$) do najwyższych ($H_o=0.802$ i $H_e=0.743$) w zależności od stada. Współczynnik inbrodu (F) wahał się od -0,166 do 0,046, pozostając na stosunkowo niskim poziomie, co świadczy o braku zagrożenia chowem wsobnym w badanej populacji.

Tabela 1. Charakterystyka 14 stad kóz karpackich na podstawie loci mikrosatelitarnych.

Stado	N	Na	Ne	Ho	He	F
1.	6	3.000	2.401	0.560	0.538	-0.042
2.	7	2.714	2.034	0.439	0.467	0.046
3.	38	5.071	3.062	0.656	0.632	-0.031
4.	14	3.214	2.450	0.622	0.526	-0.166
5.	19	5.857	3.175	0.647	0.667	0.022
6.	18	5.214	3.468	0.690	0.658	-0.050
7.	32	5.857	3.254	0.670	0.655	-0.027
8.	19	5.643	3.405	0.662	0.659	0.001
9.	12	4.786	3.224	0.708	0.661	-0.065
10.	7	3.286	2.664	0.653	0.551	-0.193
11.	13	3.571	2.754	0.687	0.607	-0.127
12.	8	5.286	3.715	0.688	0.685	-0.006
13.	9	6.429	4.269	0.802	0.743	-0.080
14.	47	8.214	4.468	0.714	0.733	0.025

N – liczba osobników; Na – liczba *alleli*; Ne – liczba efektywnych *alleli*; Ho – obserwowana heterozygotyczność; He – oczekiwana heterozygotyczność; F – współczynnik inbredu.

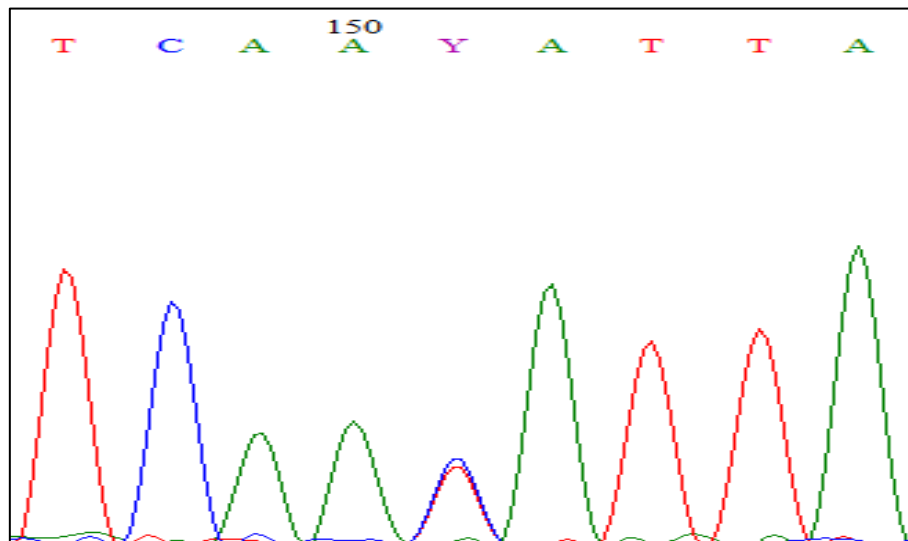
Polimorfizm białek mleka koziego:

W ramach zadania, w roku sprawozdawczym, próbki DNA 294 kóz różnych ras (karpackich, anglonubijskich, alpejskich i mieszanców) poddano analizie genetycznej genu CSN2. Gen CSN2 o długości ok. 9 tys. nukleotydów, składa się z 8 eksonów i koduje białko kazeinę-β. Według różnych danych literaturowych posiada od 8-13 różnych *alleli*, z których niektóre można rozróżnić wyłącznie na poziomie analiz białkowych (np. *allele* B i D). Kozy z *allelami* A, A1, B, C, C1, D i E mają ekspresję białka CSN2 normalną. Kozy z *allelami* 0 i 01 w układzie homozygotycznym nie mają w mleku białka CSN2. Niektóre z *alleli* były obserwowane wyłącznie w lokalnych populacjach.

Potwierdzono metodą sekwencjonowania otrzymane wcześniej wyniki genotypowania z użyciem aparatu real-time PCR (dyskryminacja *alleli*) i znakowanych sond TaqMan MGB dla *alleli* 01, 0 i C. W tym celu dla wyselekcjonowanych osobników (22) przeprowadzono dwie reakcje sekwencjonowania wybranych fragmentów genu obejmujących miejsca polimorficzne analizowane sondami MGB. Wyniki sekwencjonowania dały identyczny wynik jak w przypadku metody dyskryminacji *alleli* tym samym potwierdzając poprawność działania metody genotypowania z użyciem aparatu real-time PCR.

Po przeprowadzeniu reakcji PCR i sekwencjonowania dwóch kolejnych fragmentów genu CSN2 u wszystkich badanych osobników, w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności *alleli* A, A1, C, C1 oraz E, uzyskano wyniki dla 281 osobników. W badanej populacji nie znaleziono *allelu* E u żadnego osobnika, a analiza haplotypów wykazała obecność *alleli* A, C oraz C1. Dalsza analiza statystyczna pozwoli na dokładne oszacowanie częstości poszczególnych genotypów.

Rysunek. 2. Jedno z analizowanych miejsc polimorficznych w eksonie 9 genu CSN2, pozwalające odróżnić *allele* C od C1.



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

Cel zadania:

Celem podjętych badań jest zbadanie wpływu wybranych dodatków paszowych na zdrowotność i wyniki produkcyjne jagniąt i kózł ras rodzimych oraz na wyniki użytkowości mlecznej kóz karpackich. Zwierzęta otrzymywały mieszankę ziołową, w postaci dodatku suszu z ziół do paszy treściwej. W pierwszym roku doświadczenia planowane było określenie korzystniejszego udziału fitododatku do paszy treściwej, w celu wyboru optymalnego modelu żywienia. W ramach tego etapu zrealizowano poniższe zadania:

Opracowanie mieszanki ziołowej:

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



Tabela 1. Składniki mieszanki ziołowej dla jagniąt i kóz.

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

Ocena wartości pokarmowej pasz:

Analizę chemiczną pasz przeprowadzono w Dziale Analityki Laboratoryjnej – Centralnym Laboratorium IZ PIB. Określono zawartość suchej masy, popiołu, białka ogólnego, tłuszczu

surowego, włókna detergentowego neutralnego (NDF); określono profil wyższych kwasów tłuszczowych.

Ocena wskaźników produkcyjnych:

W Stacji Oceny Tryków w Kociugach w ZD IZ PIB Pawłowice przeprowadzono część doświadczalną zadania. Jagnięta rodzimych ras owiec – merynos polski w starym typie oraz merynos barwny ze stad IZ PIB, utrzymywane były w kojcach grupowych. W każdej rasie wyodrębniono 3 grupy (grupa kontrolna oraz dwie grupy otrzymujące paszę o różnym udziale dodatku ziołowego).

Pomiary przyżyciowe:

W czasie doświadczenia wykonano pomiary przyżyciowe (masa ciała, pomiary USG powierzchni *m.l.dorsi*, kontrola pobrania paszy). Na początku i końcu tuczu pobrano krew od wszystkich jagniąt i przestano do laboratorium w celu oceny wskaźników fizjologicznych.

Pomiary poubojowe:

Po zakończeniu tuczu jagnięta 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. W Tabelach 2.-4. przedstawiono wybrane wyniki oceny tucznej i rzeźnej jagniąt rasy merynos polski w starym typie.

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).

Fot. 1. Tryczki rasy merynos barwny w stacji oceny tryków w ZD IZ PIB Pawłowice (W. Malanek).



Tabela 2. Wybrane parametry oceny tucznej i rzeźnej jagniąt.

Grupa	Czas trwania tuczu (dni)	Masa końcowa (kg)	Przyrosty dobowe (g)	Zuż. paszy/kg przyrostu	Masa tuszy zimnej (kg)
Kontrolna	69,5	43,8	344,8	4	19,4
Ziota I	69,6	43,8	339,4	4,5	19,4
Ziota II	68,9	43,0	347,2	4,2	18,7

Tabela 3. Masa wybranych wyrębów (kg).

Grupa	karkówka	antrykot	comber	udziec
Kontrolna	0,398	0,725	0,698	3,153
Ziota I	0,429	0,787	0,754	3,324
Ziota II	0,409	0,777	0,721	3,096

Tabela 4. Wyniki przyżyciowych pomiarów USG m.l.d.

Grupa	Grubość tłuszczu nad m.l.d. (cm)	Powierzchnia m.l.d. (cm ²)
Kontrolna	0,36	8,81
Ziota I	0,30	9,34
Ziota II	0,35	8,69

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.

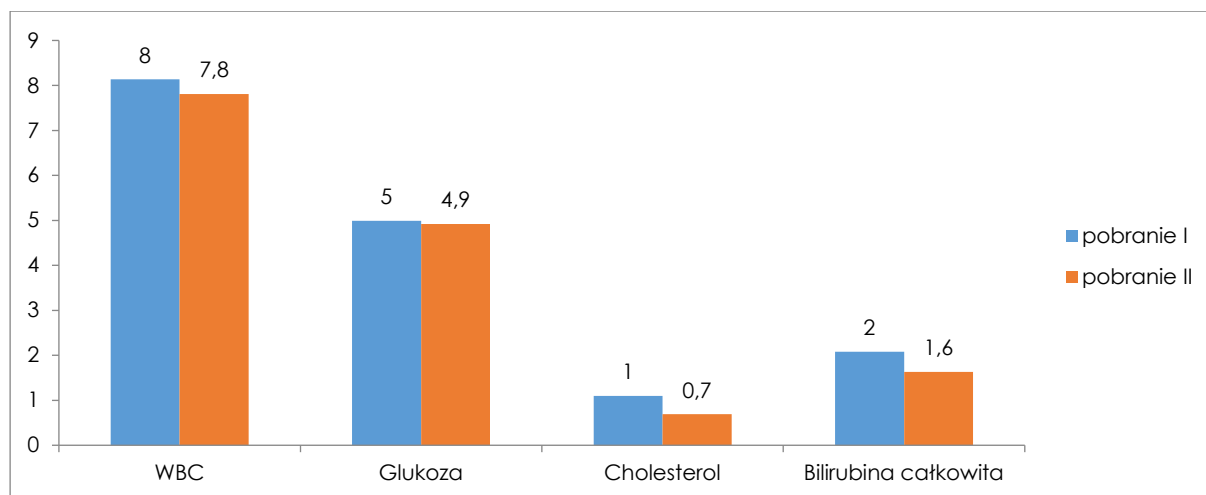
Fot. 2. Kozą karpacką
(<https://odrzechowa.com.pl/zaklad/kozy/kozy.html>).



Ocena wskaźników fizjologicznych:

W celu oceny stanu fizjologicznego 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). Wybrane wskaźniki analiz dla jagniąt merynosa polskiego w starym typie przedstawiono na Wykresie 1.

Wykres 1. Wybrane parametry morfologii i biochemii krwi jagniąt po podaniu dodatku ziołowego II.



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

Zadanie 04-14-02-11

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Paweł Bielański

Cel zadania:

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

W ramach prowadzonych badań zostanie opracowana technologia chowu, dostosowana do nowych wymogów UE, zapewniających królikom możliwość dostępu do wybiegów i terenów zielonych.

Grupy doświadczalne (utworzone w trzecim etapie):

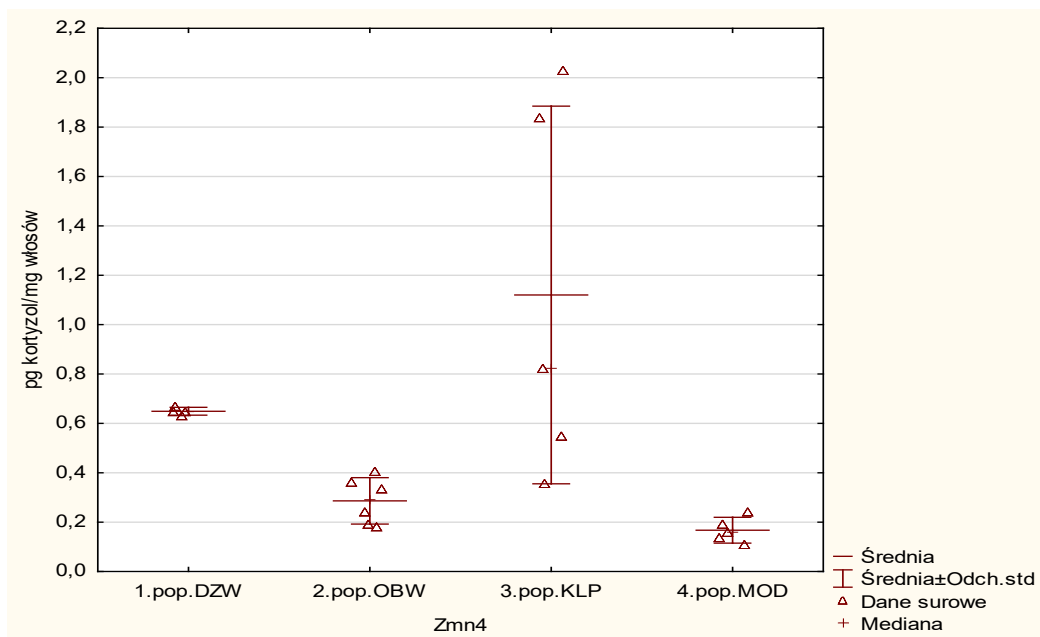
- grupa 0 – budka z wybiegiem o pow. 2 m² (6 samic),
- grupa I – budka z wybiegiem o pow. 4 m² (6 samic),
- grupa II – kojec ziemny z wybiegiem (6 samic),
- grupa III – kojec ziemny z wybiegiem powiększonym (6 samic).

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

Wyniki analizy poziomów kortyzolu we włosach (związany ze stresem przewlekłym, z etapu poprzedniego z następującym podziałem (Wykres 1.):

1. króliki popielniańskie utrzymywane w domku z wybiegiem,
2. króliki popielniańskie utrzymywane w kojcu z wybiegiem,
3. króliki popielniańskie utrzymywane w klatce zlokalizowanej w pomieszczeniu,
4. króliki popielniańskie utrzymywane w klatce zmodyfikowanej zlokalizowanej w pomieszczeniu.

Wykres 1. Wyniki analizy poziomów kortyzolu we włosach.



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



Zadanie 04-14-03-11

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

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

Cel zadania:

Na wyspecjalizowanych polskich fermach towarowych lądowego, jadalnego ślimaka szarego (*Cornu aspersum*) produkowanych jest, a także w dużej części przetwarzanych w celach eksportowych średnio 2 tys. ton ślimaków, w całej Europie co najmniej 40 tys. ton. Polska jest również jednym z głównych, światowych eksporterów ślimaka winniczka (*Helix pomatia*).

Tematyka badań dotyczących wydajności mięsnej, wartości odżywczej i pokarmowej mięsa ślimaków nie jest jeszcze wystarczająco omówiona w dostępnych publikacjach. Dlatego pierwszym z równoważnych celów przeprowadzonych badań była ocena wpływu różnych poziomów intensywności produkcji jadalnego ślimaka szarego (*Cornu aspersum*) na cechy biometryczne dojrzałych ślimaków towarowych i ich wydajność mięsną oraz wartość odżywczą mięsa surowego i gotowanego. Następnym celem było zbadanie wartości pokarmowej białka gotowanego mięsa ślimaków oraz zbadanie strawności i przyswajalności wapnia z ich muszli poprzez przeprowadzenie doświadczeń bilansowych na szczurach dotyczących wartości biologicznej (białka – BV, strawności rzeczywistej – TD i wykorzystania białka netto - NPU) mięsa dwóch podgatunków ślimaka *Cornu aspersum* z populacji hodowlanych, tj. ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum*) i ślimaka dużego szarego (*Cornu aspersum maxima*), a także ślimaka winniczka (*Helix pomatia*) z populacji naturalnej.

Celem pozostałych doświadczeń na szczurach było zbadanie bilansu wapnia z muszli ślimaków, co pozwoliło ocenić możliwość wykorzystania muszli w suplementacji diety zwierząt i ludzi, w zależności od wyników oceny strawności i przyswajalności zawartego w nich wapnia.

Założenia metodyczne:

Badania przeprowadzono na utrzymywanych od 25 lat, na fermie doświadczalnej IZ PIB, hodowlanych populacjach ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum*) i dużego szarego (*Cornu aspersum maxima*), na towarowych ślimakach dojrzałych jesienią, w wieku 0+, a w badaniach strawnościowych, również na reproduktorach w wieku 1+.

W celach porównawczych, odpowiednie, węższe badania, w zakresie składu i strawności składników odżywczych mięsa, przeprowadzone zostały również na dojrzałym ślimaku winniczku (*Helix pomatia*) w wieku 2+ i >2+ z lokalnej populacji naturalnej. Doświadczalne, sześciomiesięczne cykle produkcyjne ślimaka szarego przeprowadzono w ziemnych, polowych zagrodach doświadczalnych zasiedlanych w maju, wylęgiem wiosennym na poziomie ekstensywnym (200 szt./m²), standardowym (300 szt./m²) i intensywnym (400 szt./m²). Jesienią pobierano próby ślimaków dojrzałych w tych warunkach, a próby zbiorcze ich tuszy, z podziałem na nogi i worki trzewiowe, zbierano do odrębnych badań chemicznych dotyczących wartości odżywczej surowych i gotowanych nóg ślimaków oraz doświadczeń na szczurach. Mięso ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum*), w wieku 0+ do doświadczenia I. na szczurach, było pozyskiwane w połowie września z doświadczalnego bloku zagród polowych o powierzchniach 4 m² każda. Natomiast ślimak winniczek w wieku 2+ i >2+ był pozyskiwany na wiosnę z populacji naturalnej.

Następnie, do badań bilansowych nóg i worków trzewiowych ślimaków, zastosowana została metoda bilansowa Thomasa-Mitchella w modyfikacji Egguma (1973). Zwierzętami doświadczalnymi były rosnące albinotyczne szczury-samce szczepu Wistar-W. Jedyne źródło

białka w dietach stanowiła mączka z gotowanego i liofilizowanego mięsa ślimaków z partii nogi i worka trzewiowego. Ze względu na dużą, spowodowaną suszą presję gryzoni na ślimaki z niektórych zagród, poniesiono duże straty w zagrodach ekstensywnych, udało się natomiast z powodzeniem zrealizować badania porównawcze w systemach standardowym i intensywnym, najczęściej stosowanych w technologii towarowej produkcji ślimaków. W przypadku danych, dotyczących pomiarów metrycznych i wydajności mięsnej, przeprowadzono statystyczne analizy istotności różnic, natomiast skład chemiczny badano na próbach zbiorczych.

Podsumowanie dotyczące wydajności mięsnej i składu chemicznego mięsa ślimaków:

Zwiększenie zagęszczenia obsady zagród polowych wylęgiem wiosennym ze standardowej wartości 300 szt./m² do 400 szt./m² powodowało, na ogół w sposób statystycznie istotny ($p < 0,05$) lub wysoko istotny ($p < 0,01$), obniżenie wartości parametrów morfometrycznych ciała oraz wydajności mięsnej u dojrzałych osobników z obu podgatunków ślimaka szarego, z towarowego zbioru jesiennego.

Ślimaki winniczki z młodszej grupy wiekowej (2+) miały wyższą wydajność mięsną, niż winniczki ze starszej grupy wiekowej (>2+). Zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu surowego, wapnia, fosforu i cholesterolu w ugotowanych próbach zbiorczych nóg obu podgatunków ślimaka szarego była wyraźnie wyższa niż w nogach surowych. Wzrost zawartości poszczególnych składników odżywczych w workach trzewiowych po ich ugotowaniu był mniej wyraźny niż w nogach obu podgatunków ślimaka szarego, i nie dotyczył białka surowego. W gotowanych nogach i workach trzewiowych ślimaka winniczka z młodszej grupy wiekowej zawartość białka ogólnego i kolagenu była wyższa, a tłuszczu surowego niższa niż w odpowiednich częściach tuszy winniczków ze starszej grupy wiekowej.

Na podstawie dotychczas zebranych wyników analiz prób zbiorczych mięsa nie stwierdzono wpływu stopnia intensywności produkcji ślimaków towarowych na podstawowe parametry wartości odżywczej obu części tuszy ślimaka szarego.

Stwierdzono natomiast następujące różnice w wartości odżywczej pomiędzy nogami surowymi a ugotowanymi:

- udziały poszczególnych frakcji wyższych kwasów tłuszczowych w ich profilu różniły się w zależności od roku poboru prób, po ugotowaniu nóg obu podgatunków ślimaka szarego, wzrosły w ich profilach WKT udziały frakcji MUFA i proporcja PUFA6/PUFA3, a zmalały udziały PUFA6 i PUFA3,
- po ugotowaniu worków trzewiowych obu podgatunków ślimaka szarego, silnie wzrosły w ich profilach udziały PUFA6 i PUFA3,
- powyższe zmiany udziałów wymienionych frakcji UFA, tj. MUFA, PUFA3 i PUFA6 w ich profilach po ugotowaniu obu części tuszy ślimaka szarego były znacznie większe u ślimaków dojrzałych, pochodzących z warunków większej intensywności produkcji (400 szt./m²), niż z mniejszej (300 szt./m²),
- w młodszej grupie wiekowej (2+) ślimaka winniczka, zarówno w profilu WKT ugotowanych nóg jak i worków trzewiowych, udział frakcji PUFA6 był wyższy, a PUFA3 znacznie niższy niż w starszej grupie wiekowej (>2+). W starszej grupie wiekowej, w porównaniu z młodszą, dużo większa była proporcja PUFA6/PUFA3.

Powyższe wyniki mogą być przydatne, w charakterze wskazówek, dla producentów ślimaków, zajmujących się również ich przetwórstwem spożywczym.

Podsumowanie wyników doświadczeń na szczurach:

Pod względem zawartości aminokwasów egzogennych mięso ślimaków jest wysokowartościowe, przy czym białko winniczka (*Helix pomatia*) jest bogatsze w aminokwasy niezbędne niż białko ślimaków hodowlanych rodzaju *Cornu*. Białko ślimaków posiada wysoką wartość biologiczną (BV) i wysoką strawność rzeczywistą (TD). Białko ślimaków hodowlanych charakteryzuje się wyższą wartością biologiczną i lepszym wskaźnikiem wykorzystania białka netto (NPU) niż ślimaka winniczka. Zgodnie ze wskaźnikiem CS (Chemical Score) aminokwasem ograniczającym wartość biologiczną białka w mięsie ślimaków jest metionina. Białko worków trzewiowych ślimaka szarego małego (*Cornu aspersum aspersum*) i ślimaka winniczka ma nieco niższą wartość pokarmową niż mięso z partii nogi. W przypadku ślimaka dużego szarego (*Cornu aspersum maxima*) wartość pokarmowa białka w obu partiach mięsa jest równie wysoka.

System chowu ma istotny wpływ na wartość pokarmową białka w mięsie ślimaków hodowlanych *Cornu*. Stwierdzono niższą wartość biologiczną (BV) białka w mięsie, zarówno z partii nogi jak i worków trzewiowych, u ślimaków z chowu intensywnego, w stosunku do ślimaków z chowu standardowego.

Ze względu na skład chemiczny i wysoką wartość pokarmową białka, worki trzewiowe ślimaka winniczka i ślimaków hodowlanych jako produkt odpadowy mogą stanowić dodatkowe źródło wartościowego białka i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w paszach dla zwierząt. W celu lepszego wykorzystania białka konieczne będzie uzupełnienie mieszanek syntetyczną metioniną.

Wapń w muszlach ślimaków małego szarego i dużego szarego charakteryzuje wyższa strawność i retencja w organizmie szczurów niż wapń pochodzący z muszli ślimaka winniczka i węglanu wapnia, standardowo stosowanego w dietach dla zwierząt modelowych.

System utrzymania, w przypadku ślimaka małego szarego, nie wpływa istotnie na przyswajalność wapnia z muszli w organizmie szczurów.

Wapń w muszlach ślimaka dużego szarego z chowu intensywnego był istotnie lepiej przyswajalny niż wapń pochodzący z muszli ślimaka tego gatunku z chowu standardowego. Muszle ślimaków hodowlanych stanowią wartościowe źródło dobrze przyswajalnego wapnia i po odpowiednim przygotowaniu mogą być wykorzystywane jako suplement w diecie człowieka i w paszach dla zwierząt.

Wybrane wyniki szczegółowe:

Tabela 1. Różnice pomiędzy parametrami morfometrycznymi ślimaka małego szarego (*Cornu aspersu aspersum*) w wieku 0+ i wskaźnikami jego wydajności mięsnej przy dwóch zagęszczeniach obsad.

Obsada szt./m ²	Średnica muszli (mm)	Masa muszli (g)	Masa ciała (g)	Masa tuszy (g)	Masa nogi (g)	Masa worka trzew. (g)	Masa tuszy/ Masa ciała (g. %)	Masa nogi/ Masa ciała (g. %)	Masa nogi/ Masa tuszy (g. %)	Masa nogi/ Masa worka trzew. (g. %)
2019 r.										
300	26,2	1,9	8,4	6,5	3,6	2,9	76,9	42,9	56,0	124,1
2020 r.										
300	26,2	1,7 ^a	8,4 ^a	6,4 ^a	3,4 ^a	2,7	76,0	40,6	53,5	125,9
400	25,9	1,55 ^b	8,0 ^b	6,2 ^b	3,1 ^b	2,6	76,9	38,8	50,4	119,2
2021 r.										
300	26,0	1,74 ^a	8,2 ^a	6,5 ^a	3,6 ^a	2,9	78,9 ^a	44,1 ^a	55,9 ^a	126,8 ^A
400	25,6	1,86 ^b	7,8 ^b	6,0 ^b	3,1 ^b	2,9	76,3 ^b	39,5 ^b	51,7 ^b	107,3 ^B

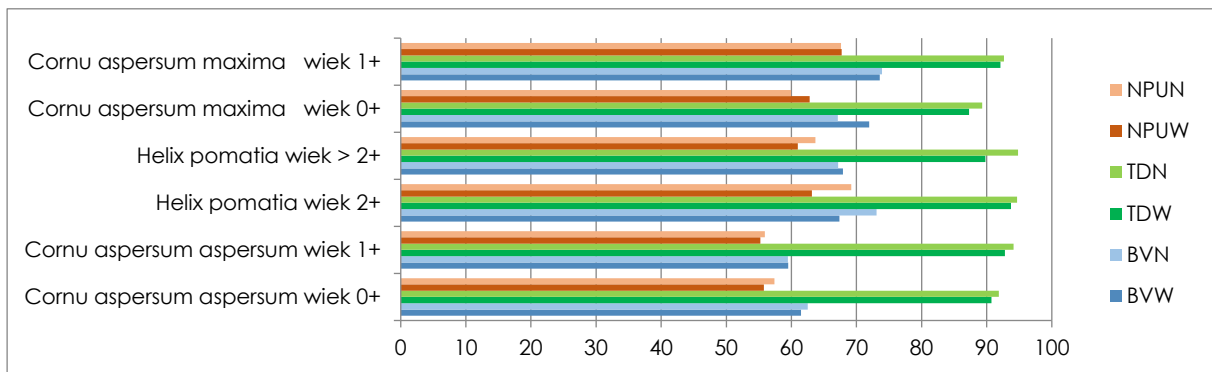
a, b – różnice statystycznie istotne (P<0,05); A,B – różnice statystycznie wysoko istotne (P<0,01).

Tabela 2. Różnice pomiędzy parametrami morfometrycznymi ślimaka dużego szarego (*Cornu aspersum maxima*) w wieku 0+ i wskaźnikami jego wydajności mięsnej przy dwóch zagęszczeniach obsad.

Obsada szt./m ²	Średnica muszli (mm)	Masa muszli (g)	Masa ciała (g)	Masa tuszy (g)	Masa nogi (g)	Masa worka trzew. (g)	Masa tuszy/ Masa ciała (g, %)	Masa nogi/ Masa ciała (g, %)	Masa nogi/ Masa tuszy (g, %)	Masa nogi/ Masa worka trzew. (g, %)
2019 r.										
300	32,7	3,7	15,8	12,0	6,4	5,6	76,3	40,8	53,5	114,3
2020 r.										
300	33,2 ^a	3,6 ^A	16,9 ^A	12,9 ^A	6,5 ^A	5,4 ^A	76,15	38,4	50,4	114,3 ^a
400	31,5 ^b	3,4 ^B	15,5 ^B	11,9 ^B	5,9 ^B	4,9 ^B	76,3	38,1	49,6	120,4 ^b
2021 r.										
300	32,0 ^A	3,0 ^A	14,4 ^A	11,4 ^A	6,7 ^A	4,7 ^A	79,2 ^A	46,3 ^a	58,6 ^A	141,5 ^A
400	30,1 ^B	3,7 ^B	12,9 ^B	9,2 ^B	5,7 ^B	3,5 ^B	71,3 ^B	44,5 ^b	62,3 ^B	165,8 ^B

a, b – różnice statystycznie istotne ($P < 0,05$); A, B – różnice statystycznie wysoko istotne ($P < 0,01$).

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



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

Wykres 2. Zestawienie wartości pokarmowej białka mięsa dojrzałych ślimaków *Cornu aspersum* w wieku 0+ z partii nóg i worków trzewiowych, z dwóch systemów produkcji.



Zadanie 04-14-04-11

Pilotażowy program wykonania prototypu systemu retencji i filtracji wody poprodukcyjnej pochodzącej z obiektów hodowlanych suma afrykańskiego.

kierownik zadania: dr inż. Przemysław Pol

Produkcja rybacka, oparta o chów i hodowlę ryb w obiegach zamkniętych, co roku przynosi duże dochody producentom. Obiekty takie wyposażone są w dopływ wody, baseny hodowlane, systemy filtracji oraz odpływ wody. W ciągu tygodnia wymiana wody w obiegach nie powinna być mniejsza niż 5% całkowitej objętości wody w hodowli. W kontekście zmian klimatycznych i wzrostu populacji akwakultura odgrywa ważną rolę w bezpieczeństwie żywnościowym, zatrudnieniu i rozwoju gospodarczym. Intensywne, recyrkulacyjne systemy akwakultury (RAS) umożliwiają oczyszczanie i recykling ścieków rybnych w celu obniżenia stężenia odpadów w wodzie odpływowej, zmniejszając tym samym zanieczyszczenie środowiska. Odprowadzanie ścieków jest istotnym problemem funkcjonowania obiegów recyrkulacyjnych, gdzie brudna woda bez oczyszczania spuszcza jest bezpośrednio do kanalizacji lub wód gruntowych. Taka woda często posiada znacznie przekraczające normy stężenia azotu ogólnego, amonowego, azotanowego, azotynowego oraz fosforanów, które w znaczącym stopniu przyczyniają się do eutrofizacji wód gruntowych oraz zakwitów sinic. Niestety w zakładach produkcyjnych sumów afrykańskich, w żaden sposób nie jest monitorowany dzienny wpływ świeżej wody oraz wielkość odpływu ścieków z systemu RAS. Wprowadzone przez Radę Ministrów rozporządzenia w sprawie opłat za podwyższone i przekroczone wartości w/w substancji powoduje, że obiekty hodowlane już obecnie mogą liczyć się z karami za każdy kilogram przekroczonej substancji w ściekach. Dodatkowo, wprowadzony przez Radę Ministrów „Program działań mających na celu zmniejszenie zanieczyszczenia wód azotanami pochodzącymi ze źródeł rolniczych oraz zapobieganie dalszemu zanieczyszczeniu”, nie dotyczy bezpośrednio produkcji rybackiej opartej o systemy recyrkulacyjne, jednak pokazuje, że w ciągu najbliższych lat również ryby mogą zostać objęte w/w rozporządzeniem.

W związku z powyższym, koniecznym wydaje się powzięcie działań mających na celu opracowanie nowoczesnego systemu filtracji wód produkcyjnych i ściekowych pochodzących z produkcji rybackiej opartej o recyrkulację wody.

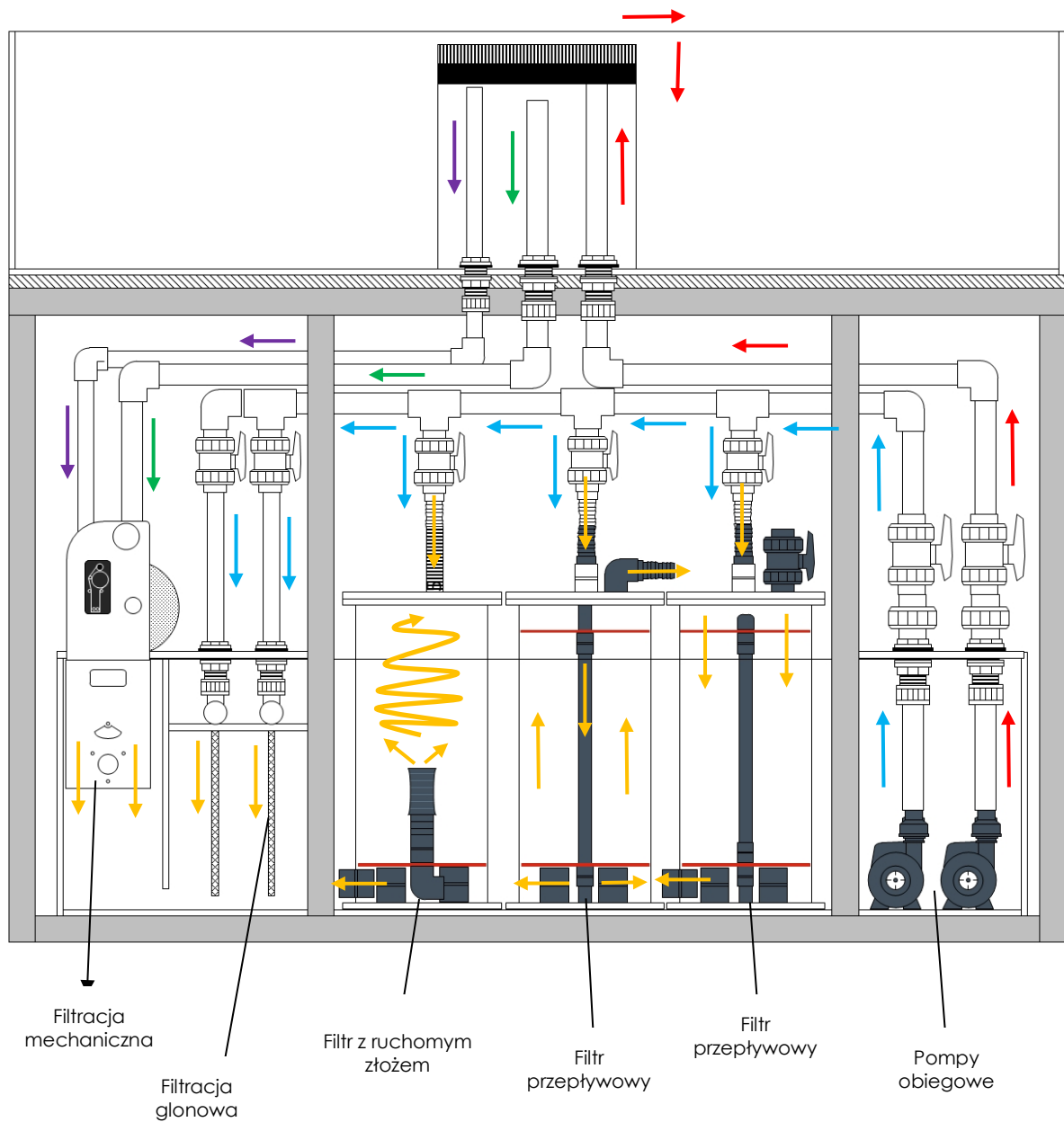
Cel badań:

Celem podjętych badań było zaprojektowanie, wykonanie oraz przetestowanie prototypowej wczesnej wersji systemu retencji i filtracji wody poprodukcyjnej.

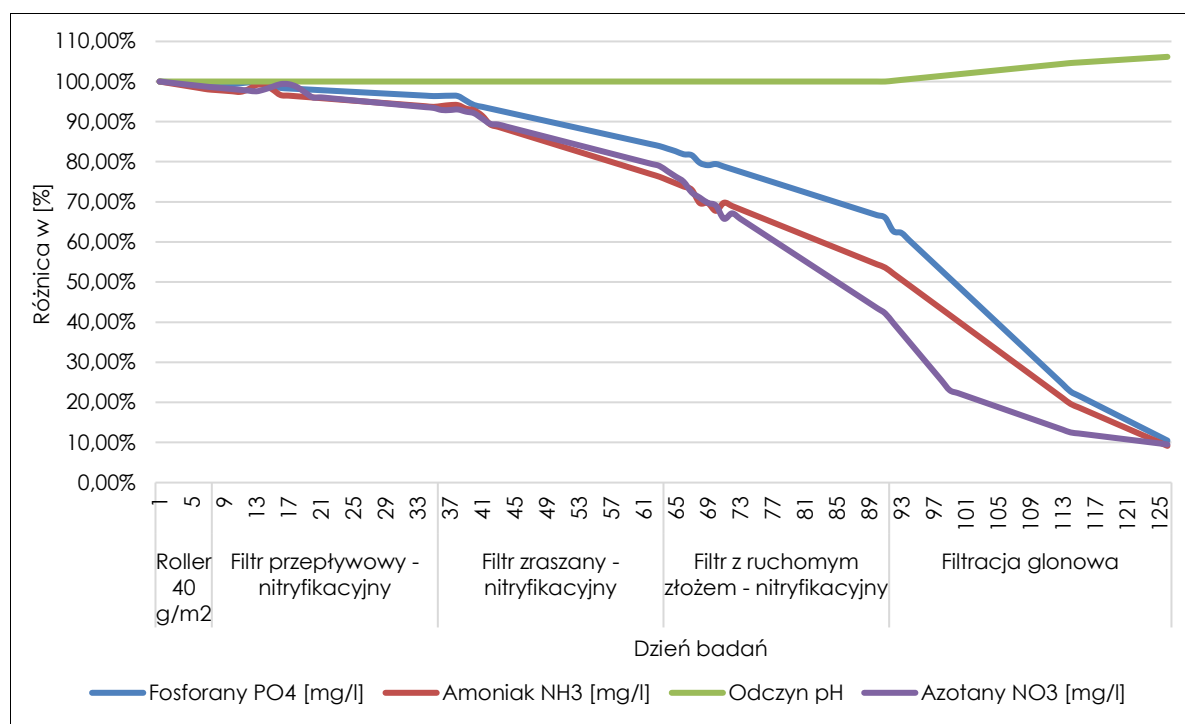
Woda do testów została pobrana z jednego z zakładów produkujących suma afrykańskiego, w liczbie 30 ton rocznie. Badania zostały podzielone na trzy cele badawcze, z których pierwszy został podzielony na cztery etapy.

Pierwszy cel: *projekty, prototypy* – polegał na wykonaniu rysunków technicznych dotyczących dokładnego wyglądu sump, układu i połączeń hydrauliki, rysunków projektowanych systemów filtracji. System ten został podzielony na dwa zbiorniki: górny oraz dolny, pełniący rolę otwartego systemu filtracji. Zbiornik został wykonany ze szkła typu float o grubości 12 mm i wymiarach 160x60x37 cm (Rycina 1.). W zbiorniku tym, poziom wody ustawiono na 34 cm, co dało łączną objętość netto 308 dm³. Otwarty zbiornik filtracyjny, tzw. sump, został wykonany z szyby typu float o grubości 10 mm i wymiarach 150x50x40 cm. Poziom wody w pierwszej komorze został ustalony na poziomie 21 cm, w drugiej 20,5 cm, w trzeciej 20 cm, a w czwartej 19 cm. Objętość wody w ww. zbiorniku wynosiła 142 dm³, co dało łącznie 450 dm³ wody w obiegu.

Rycina 1. Wygląd systemu do filtracji wody poprodukcyjnej. Zielonymi strzałkami pokazano przepływ wody spustowej ze zbiornika głównego do filtra otwartego. Fioletowe strzałki, przedstawiają przepływ wody poprzez rurę rewizyjną. Czerwone strzałki wskazują kierunek przepływu wody powrotnej z systemu filtracji do zbiornika głównego. Niebieskie strzałki obrazują przepływ wody do testowanych filtrów. Pomarańczowe strzałki pokazują przepływ wody przez filtry.



Rycina 2. Wyniki pomiarów parametrów wody.



Umieszczenie wody poprodukcyjnej z obiegów RAS, w odpowiednio zaprojektowanych basenach wyposażonych w filtrację mechaniczną, biologiczną oraz glonową, przyczynia się do bardzo szybkiej redukcji związków azotowych oraz fosforowych z wody (Rycina 2.). Tak przefiltrowana woda może zostać użyta ponownie do podmiany wody w basenach z rybami, nawadniania pól z roślinami, lub po wykonanej sterylizacji, może być podawana innym zwierzętom gospodarskim. Zastosowanie filtrów glonowych w systemach filtracji obiegów opartych o RAS, może przyczynić się do poprawy warunków fizycznych wody, umożliwiając tym samym poprawę dobrostanu zwierząt.

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

Zadanie 01-15-01-11

Opracowanie metody oceny budowy i funkcjonalności aparatu ruchowego koni.

kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

Zmiana charakteru użytkowania koni związana z postępem cywilizacyjnym spowodowała, że praca hodowlana jako fragment procesu ewolucyjnego zmierza bardziej drogą eksterieru niż zdrowia i prawidłowej funkcji poszczególnych części ciała konia. Istnieje realne zagrożenie, że populacja koni, podobnie jak populacja psów, w obrębie niektórych ras stanie przed problemem dalszej egzystencji.

W zakresie utrzymywania koni i jakiegokolwiek formy ich użytkowania kluczową rolę odgrywają kończyny. Fenomen tego zwierzęcia opiera się na specyficznym funkcjonowaniu aparatu ruchu, w porównaniu z innymi zwierzętami. Koniowate zaszły najdalej w ewolucyjnym procesie strącania palców. Zjawisko to umożliwiło gwałtowne zwiększenie dynamiki ruchu w porównaniu z innymi formami kontaktu kończyn z podłożem. Kluczem jest tu punktowe podparcie koń-

czynny, co pozwala na maksymalne skrócenie czasu fazy opierania kończyny oraz magazynowanie części energii kinetycznej związanej z natarciem na kopyto, w formie energii sprężystej wykorzystanej za chwilę przy wybiciu z kończyny.

Obecnie forma utrzymywania i użytkowania koni powoduje widoczny regres w zakresie osobniczego rozwoju kopyt i poprawności postaw. Duży niekorzystny wpływ ma także brak selekcji koni przeznaczonych do hodowli na podstawie kryteriów poprawności aparatu ruchu. Co prawda, ruch jako pojęcie samo w sobie podlega ocenie w kontekście całego zwierzęcia, ale brak obiektywnych szczegółów pomiarowych i brak norm w zakresie poprawności fizjologicznej poszczególnych części kończyn powoduje, że ta ocena często jest niedoskonała. W wielu opracowaniach naukowych i badawczych podejmowany jest temat poprawności kończyn konia, jednak nieliczne prace uwzględniają ważny kontekst teoretycznego, docelowego ewolucyjnie podparcia kończyny konia w jednym punkcie.

Punkt ten, według hipotezy badawczej omawianego zadania, znajduje się w obrębie rzutu kości kopytowej na podłoże i dodatkowo leży na prostopadłej względem podłoża osi, obejmującej również punkt w obrębie głowy kości ramieniowej w kończynie przedniej oraz głowy kości udowej w kończynie miednicznej.

Cel badań:

Celem badań było wyznaczenie teoretycznej, fizjologicznej osi podparcia kończyny przedniej i tylnej konia oraz wykorzystanie jej do opracowania metody oceny budowy kończyn, scharakteryzowania wad pokrojowych i przyczyn ich występowania. W następnej kolejności doświadczalne wyznaczenie zakresu odchyłań fizjologicznych teoretycznego punktu podparcia na podstawie badań populacji koni prymitywnych, utrzymywanych w warunkach najbardziej zbliżonych do pierwotnych. Uzyskane wyniki będą wykorzystane do opracowania algorytmu matematyczno-informatycznego, w celu zastosowania do diagnostyki, zapobiegania oraz profilaktyki wad postawy oraz doboru metod korekty kopyt. Wdrożenie i upowszechnienie opracowanej metody pozwoli na wykorzystanie w praktyce przez hodowców, podkuwaczy-kowali, selekcjonerów, weterynarzy.

Populacje objęte doświadczeniem:

- koniki polskie – osobniki w różnym wieku od źrebiąt do koni dorosłych, różnych płci w SK Sieraków oraz hodowlach prywatnych na terenie Małopolski i Podkarpacia,
- hucuty – osobniki w różnym wieku, od źrebiąt do koni dorosłych, różnych płci w SK Gładyszów Regietów, ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o. , SK Izby, GR Owczary, hodowle prywatne na terenie Małopolski,
- konie innych ras: śląskie, małopolskie oraz krzyżówki dla określenia tła populacyjnego.

Układ stawowo-kostny u koni podlega znaczącym przeciążeniom w wyniku użytkowania koni podczas pracy w zaprzęgu lub pod jeźdźcem. Jednopunktowe podparcie kończyny sprawia, że cały nacisk spowodowany siłą uderzenia, np. podczas skoku, musi być zamortyzowany przez skomplikowany układ połączeń kości i stawów oraz ścięgien i mięśni. Na podstawie wieloletnich obserwacji wysunięto tezę, że kończyna kompensując odchylenia od normy w zakresie dużych stawów dąży dystalną częścią do osiągnięcia podparcia w punkcie teoretycznym. Na przykład przy zbliżeniu się prawego i lewego stawu skokowego do siebie, kopyta rozstawiają się na zewnątrz w okolicę punktów podparcia wyznaczonych przez oś – mimo nieprawidłowości w zakresie budowy wszystkich stawów kończyn, punkty podparcia dążą do fizjologii. Jest to

warunkiem zrównoważenia kończyny i wytworzenia funkcji zastępczych. Podczas realizacji zadania, prowadzono badania służące do wyznaczenia teoretycznej fizjologicznej osi podparcia kończyny przedniej i tylnej konia.

Wykorzystując wcześniejsze doświadczenia własne opracowano nieinwazyjną metodę wyznaczania punktów na skórze. Łącznie pozwoliło to zdefiniować 20 punktów i wykonać pomiary zgodnie z opracowaną metodyką doświadczenia.

Przeprowadzone badania i pomiary dotyczyły w szczególności określenia następujących zależności:

- pole powierzchni styku kopyta z podłożem; oznaczenie anomalii w obrębie krawędzi korowej i pięt,ek,
- pole powierzchni rzutu całej podeszwy,
- kąt ściany przedniej (grzbietowej) kopyta do podłoża – przód, tył – kątomierz, wynik w stopniach kątowych,
- masa konia i rozkład ciężaru na przednie i tylne kończyny – pomiar za pomocą dwóch wag platformowych, przy ustawieniu kończyn przednich na jednej i tylnych na drugiej; wyniki posłużą do zdefiniowania współczynników, np. rozmieszczenie ciężaru przód-tył w procentach, pole powierzchni podeszwy/podparcia do ciężaru dla pojedynczego kopyta i całego konia,
- pomiary kątów pomiędzy liniami poprowadzonymi przez punkty na tylnej kończynie (linia 1. krętarz większy, część doczaszkowa i nadkłykieć boczny kości udowej; linia 2. nadkłykieć boczny kości udowej i kostka boczna kości piszczelowej; linia 3. kostka boczna kości piszczelowej i dołek więzadłowy kości skokowej; linia 4. dołek więzadłowy kości skokowej i rzut grota strzałki na krawędzi bocznej kopyta); pomiary ze zdjęcia,
- pomiary odległości między punktami na kończynach tylnych prawej i lewej (dół podkolanowy, kostka przyśrodkowa kości piszczelowej, guz piętowy, rowek między piętami); zdjęcie w linii strzałkowej od tyłu, umieszczony odcinek o znanej długości dla wyskalowania pomiarów,
- kąt pomiędzy liniami poprowadzonymi przez bruzdę pośrodkową strzałek kończyn przednich i tylnych – wynik w stopniach kątowych.

Wstępna analiza zgromadzonego materiału wykazała, że bez względu na rasę u koni przeważa postawa rozbieżna, zarówno przednich jak i tylnych kończyn. Postawa równoległa praktycznie nie występuje. Potwierdzają to wyniki uzyskane podczas mierzenia kątów według opracowanej metody. Kończyny przednie podlegają większej ewolucji rozwojowej, ponieważ wraz z poszerzaniem się klatki piersiowej konia, postawa staje się coraz mniej rozbieżna. Dla utrzymania równowagi ciała, podczas naprzemiennego spoczywania kończyn tylnych punkty podparcia kończyn przednich muszą być odpowiednio rozstawione. U źrebiąt z wąską klatką piersiową stawy pęcino-we i nadgarstkowe ulegają odwiedzeniu, aby punkty podparcia były rozstawione jak najdalej od siebie. Z wiekiem, klatka piersiowa się rozrasta, a w prawidłowych warunkach punkty podparcia zmiierają w kierunku osi całej kończyny. W warunkach idealnych osie strzałkowe przednich kopyt powinny być równoległe, ale rzadko dochodzi do takich stanów. Ważne jest uwzględnienie tych mechanizmów przy korekcji i podkuwaniu koni w okresie rozwoju osobniczego.

Stwierdzono, że generalnie pole powierzchni styku kopyta z podłożem jest małe w stosunku do masy zwierząt oraz niepokojące są coraz częściej występujące bardzo krótkie, schowane strzałki w kopcyie. Kopyta są także często pozbawione ścian wsporowych. Podczas badań i obserwacji zauważono korelację między odbijaniem się strzałek w śladzie a częstością

występowania kulawizn. Im mniejsza i głębiej osadzona strzałka, tym kulawizn mniej. To kolejne zagadnienie, będące przedmiotem dalszych badań.

Konie małe, hucuty i koniki polskie, charakteryzowały się dużo bardziej płaskimi kopytami, zarówno przednimi jak i tylnymi, w porównaniu do grupy innych koni, wśród których były duże konie rasy śląskiej, małopolskiej i krzyżówki również dużych koni. Generalnie, różnica między średnimi kątami przednich kopyt i tylnych kopyt była nieistotna. Konie huculskie miały minimalnie bardziej strome tylne kopyta niż przednie.

Zauważalna jest również zmiana stosunku długości poszczególnych części kończyny względem siebie. Dotychczasowe pomiary wskazują na zaburzenie równowagi między stosunkiem długości pięciny do nadpęcia oraz długości nadpęcia do długości kości ramieniowej.

Kolejnym problemem zdrowotnym, którego podstawy leżą w chowie koni, jest osteochondroza. Trzeba zwrócić uwagę na przyczyny występowania problemu i wdrożyć profilaktykę, a nie skupiać się wyłącznie na usuwaniu skutków. Badania wykazały występowanie korelacji pomiędzy akceleracją wzrostową a występowaniem osteochondrozy rozwarstwiającej (OCD). Zaskakujące jest, że dotyczy to ras prymitywnych, które do tej pory uchodziły za wolne od tego schorzenia. Wyniki badań są dowodem na poparcie tezy, że OCD jest konsekwencją błędów w chowie, a nie problemem genetycznym. Ścisła korelacja z długością kości pięcino-wej a częstotliwością występowania OCD w różnych stawach dowodzi wspólnej przyczyny akceleracji wzrostowej i częstości występowania OCD. Konieczne jest wdrożenie odpowiednich metod żywienia i utrzymania, aby zapobiec powstawaniu tych zjawisk.

Pojęcie dobrostanu nabiera nowego znaczenia i coraz częściej oznacza „zrobienie kroku w tył”. Nadmiar żywienia, tak jak jego niedobór, jest naruszeniem dobrostanu. Podobnie jest z brakiem lub nadmiarem ruchu. Badania wykazały, że nieprawidłowe żywienie i warunki utrzymania koni wydają się mieć fundamentalne znaczenie w powstawaniu i ugruntowywaniu się nieprawidłowej postawy kończyn.

Liczne obserwacje pozwoliły na postawienie kolejnych tez naukowych, które wymagają dalszej weryfikacji. Wyniki badań dają podstawę dla zrozumienia wielu problemów wieku rozwojowego współcześnie hodowanych koni, a także rzucają światło na ich najczęstszą obecność, wspólną przyczynę – nadmierny, źle pojmowany dobrostan.

Zadanie 01-15-02-11

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

kierownik zadania: dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona

We współczesnej hodowli coraz częściej bierze się pod uwagę aspekt ekonomiczny. Każda wada zmniejsza wartość użytkową zwierzęcia, a co za tym idzie jego wartość rynkową. Ma to bardzo istotne znaczenie zwłaszcza w hodowli koni, gdzie odstęp międzypokoleniowy sięga od 11 do 14 lat, co ma ogromny wpływ na prowadzenie i rozwój hodowli. Możliwość wcześniejszego zdiagnozowania wystąpienia wady lub możliwość wcześniejszego wyeliminowania przyczyny zmniejszającej wartość zwierzęcia jest w hodowli koni bardzo istotna. W zakresie utrzymywania koni i jakiegokolwiek formy ich użytkowania kluczową rolę w pierwszej kolejności odgrywa brak zasadniczych wad pokroju. Ale nie bez znaczenia jest również zdolność do rozrodu i odchovu zdrowego potomstwa. Fenomen tego zwierzęcia opiera się na specyficznym funkcjonowaniu aparatu ruchu w porównaniu z innymi zwierzętami, i to stanowi jego najważniejszą, wyróżniającą spośród innych gatunków zwierząt gospodarskich cechę. Obecne formy utrzymywania, już od źrebaka i dalszego użytkowania koni, powodują widoczny regres w zakresie osobniczego rozwoju, szczególnie kończyn i poprawności postaw. Duży, niekorzystny wpływ, ma także brak selekcji koni przeznaczonych do hodowli na podstawie kryteriów poprawności

budowy i ruchu oraz cech funkcjonalnych. Co prawda ruch, jako pojęcie samo w sobie, podlega ocenie w kontekście całego zwierzęcia, na poszczególnych etapach selekcji, ale brak obiektywnych norm powoduje, że taka ocena często jest niedoskonała. W wielu opracowaniach naukowych i badawczych podejmowany jest temat oceny uzyskanego wyniku, jednak nieliczne prace uwzględniają ważny kontekst analizy przyczyn i podłoża uzyskiwania niekorzystnych wyników, często nawet eliminujących konie z hodowli lub dalszego użytkowania.

Zmiana charakteru użytkowania koni związana z postępowaniem cywilizacyjnym spowodowała, że obecnie praca hodowlana zmierza bardziej drogą eksterieru i ładnego wyglądu konia niż jego zdrowia i prawidłowego funkcjonowania oraz wykorzystania zgodnie z przeznaczeniem danej rasy. Istnieje realne zagrożenie utraty najwartościowszych cech tego gatunku, jakim jest przystawione „końskie zdrowie”, wytrzymałość i zdolność do dużego wysiłku fizycznego. Coraz większego znaczenia nabiera również utrata cech funkcjonalnych, takich jak długowieczność, płodność, a co za tym idzie zdolność uzyskania i odchowu dobrego potomstwa oraz charakter umożliwiający posiadanie i współpracę z końmi nie tylko zaawansowanej grupy ludzi mających wysokie kwalifikacje w obchodzeniu się z koniem. Obecnie potrzebny jest koń o spokojnym i zrównoważonym charakterze oraz o cechach pozwalających na jego wszechstronne użytkowanie, a także niestwarzający problemów, np. zdrowotnych w chowie i hodowli.

W związku z tym ważne jest prowadzenie prac badawczych w opisywanym zakresie i wykorzystanie uzyskanych wyników w celu jak najwcześniejszej oceny wartości użytkowej koni i przeznaczania ich do dalszej hodowli. Możliwość wcześniejszego zdiagnozowania wystąpienia wady lub możliwości wcześniejszego wyeliminowania przyczyny zmniejszającej wartość zwierzęcia jest kluczowa ze względów ekonomicznych jak i hodowlanych.

Cel badań:

Celem badań było określenie i zdefiniowanie wad i przyczyn eliminacji koni z hodowli na różnych etapach ich rozwoju, na przykładzie wybranych populacji ras rodzimych utrzymywanych w Polsce. Celem o znaczeniu ekonomicznym była próba określenia podłoża (genetyczne, środowiskowe) występowania niekorzystnych cech oraz wytypowania materiału do dalszych, już wybiórczych badań genomicznych. Upowszechnienie opracowanych wyników pozwoli na wykorzystanie ich w hodowli koni w praktyce.

Materiał do analiz stanowiły dane dotyczące cech i wad oraz przyczyn eliminacji koni na różnych etapach ich rozwoju dla wybranych populacji ras rodzimych utrzymywanych w: ZD IZ PIB Odrzechowa Sp. z o.o., spółkach KOWR hodujących konie oraz wybranych stadninach prywatnych na terenie całego kraju. Dane zbierane były podczas przeglądów selekcyjnych oraz udostępnione przez wybrane ośrodki i związki hodowców koni. Badania dotyczyły populacji pięciu lokalnych ras koni: huculskiej, konika polskiego, małopolskiej, śląskiej i wielkopolskiej. Zebrany materiał obejmował lata 2015–2021.

Ze względu na ograniczenia związane z pandemią Covid-19 większość planowanych przeglądów hodowlanych i selekcyjnych w 2021 roku nie odbyła się. W związku z tym, że pozyskany w 2021 roku materiał nie był zbyt liczny i nie był reprezentatywny, szczegółową analizę w ramach prowadzonych badań wykonano za okres 2015–2020.

Na podstawie zapisów ustawy o hodowli zwierząt gospodarskich oraz zapisów w programach hodowli dla poszczególnych ras, dotyczących kwalifikacji koni do hodowli, zbierano dane dotyczące następujących cech:

1. Wady budowy i pokroju:

- a) wady dyskwalifikujące: obustronna ślepota; nieprawidłowa budowa szczęki – karpiowaty lub szczupaczy zgryz; jedno- lub obustronne wnetrostwo; szpat kostny; uzyskanie mniej niż połowy maksymalnej liczby punktów przy ocenie za co najmniej jeden z następujących elementów podstawowej oceny bonitacyjnej: kłody, kończyn przednich, kończyn tylnych, kopyt i w ocenie za ruch.

Szpat kostny zwany włogacizną należy do najpoważniejszych wad stawu skokowego i często najtrudniejszych do zdiagnozowania.

- b) wady pokroju i budowy obniżające wartość użytkową: wadliwa budowa i postawa kończyn przednich lub tylnych; wadliwa budowa kłody; wadliwe ustawienie głowy i szyi; brak lub odstępstwa od typu rasowego; brak lub odstępstwa od typu płciowego; brak lub odstępstwa od wzorca rasowego.

2. Cechy rozrodcze:

- obniżona płodność, jałowienie,
- obniżona żrebność, poronienia,
- obniżona zdolność odchowu żrebiąt,
- obniżona skuteczność krycia, puste krycia,
- liczba urodzonego potomstwa,
- liczba odchowanego potomstwa hodowlanego,
- liczba potomstwa niehodowlanego,
- wady rozwojowe potomstwa (szczególne przypadki, niedorozwój organów).

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

Do wad dyskwalifikujących zaliczono: szpat kostny, zajęczak, wady zgryzu, obustronna ślepota, wnetrostwo, porażenie krętni.

Do wad obniżających wartość użytkową zaliczono: brak standardu typu rasy, brak standardu biometrycznego rasy, wady pokroju, wykluczenie pochodzenia, niezaliczona próba dzielności.

Następnym badanym zagadnieniem były cechy rozrodcze, takie jak płodność, żrebności, obniżona skuteczność krycia, ze szczególnym zwróceniem uwagi na wady rozwojowe potomstwa. Do cech podlegających ocenie i dalszej analizie należały również pomiary biometryczne oraz szczegółowa punktacja bonitacyjna w odniesieniu do zgodności z wzorcem rasowym badanej populacji. Podstawowym miernikiem pracy hodowlanej prowadzonej w obrębie poszczególnych ras jest również liczba koni wpisanych do księgi stadnej, prowadzonej odrębnie dla każdej z ras. Badania zostały szczególnie ukierunkowane na rodzime lokalne rasy koni występujące w Polsce, tj: konie huculskie, koniki polskie, konie małopolskie, śląskie i wielkopolskie.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że bez względu na rasę, najwięcej koni eliminowanych jest z hodowli z powodu wadliwej budowy i nieprawidłowej postawy kończyn. Daje się zauważyć niepokojący wzrost i nasilenie tych wad. Natomiast niegdyś częste anomalie, dotyczące wadliwego zgryzu czy obustronnej ślepoty, należą obecnie do rzadkości. Nielicznie również występował szpat kostny oraz wady rozwojowe potomstwa. Prowadzona systematyczna praca selekcyjna doprowadziła do zmniejszenia tych wad o podłożu genetycznym. Niepokój natomiast budzi dość częste występowanie braku standardu typu rasowego i braku standardu

wzorca biometrycznego, pomimo prowadzenia selekcji w obrębie programów hodowli poszczególnych ras. Potwierdza to przyjęte założenie badawcze, że niekorzystne zmiany sposobu utrzymania i wykorzystania koni, będące zmianami środowiskowymi mają bardzo duży wpływ na częstsze występowanie wad pokroju i budowy. Procent wykluczeń z powodu niepotwierdzonego pochodzenia wahał się w granicach 1-2%.

Wstępna analiza statystyczna wykazała występowanie istotnych różnic statystycznych między rasami, szczególnie dotyczyło to rasy koni śląskich. Należy zwrócić uwagę, że rasa ta była najliczniej reprezentowana w prowadzonych badaniach. Nie wykazano różnic statystycznych badanych cech między analizowanymi latami w okresie prowadzenia doświadczenia.

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

Cel zadania:

Celem zadania jest uzyskanie wiedzy na temat bezpieczeństwa i wartości pokarmowej nasion soi n-GMO odmian uprawianych w kraju i produktów ich przetworzenia oraz produktów pochodzenia owadziego – 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 przeprowadzonych w drugim roku badań:

1. Doświadczenie bilansowe na zwierzętach modelowych.

W 2021 roku wykonano drugie z zaplanowanych doświadczeń bilansowych na 36 szczurach szczepu Wistar-W (samce w wieku ok. 6 tygodni, o masie ciała 90-100 g), podzielonych na 6 grup (po 6 sztuk).

Układ doświadczenia:

grupa I – ekstrudat z nasion soi odmiany Erica, grupa II – makuch z nasion soi odmiany Erica, grupa III – ekstrudat z nasion soi odmiany Petrina, grupa IV – makuch z nasion soi odmiany Petrina, grupa V – ekstrudat z nasion soi odmiany Viola, grupa VI – makuch z nasion soi odmiany Viola. Wszystkie odmiany soi pochodziły z krajowych upraw (nGM). Doświadczenie bilansowe trwało 10 dni – 5 dni okres wstępny oraz 5 dni okres kolekcji kału i moczu.

Uzyskane wyniki:

Najwyższą wartością biologiczną (BV) białka spośród analizowanych materiałów paszowych charakteryzował się makuch z soi Viola, zawierający najwięcej aminokwasów egzogennych, co potwierdził indeks aminokwasów egzogennych EAAI oraz najwyższy poziom aminokwasów ograniczających CS (Met + Cys). Również białko z makuchu z soi Erica odznaczało się wysoką wartością biologiczną, porównywalną z BV białka z makuchu Viola i śrutą sojową poekstrakcyjną. Najniższe BV zanotowano w przypadku ekstrudatów z soi Viola i Petrina ($P < 0.01$). W przypadku tej ostatniej strawność białka, zarówno w ekstrudacie jak i makuchu, była najwyższa, przy czym istotną statystycznie różnicę stwierdzono jedynie w stosunku do ekstrudatu sojowego Erica ($P < 0.05$). Wykorzystanie białka netto (NPU) w makuchach z soi Erica i Viola było istotnie wyższe niż w pozostałych materiałach sojowych ($P < 0.05$). Analiza składu aminokwasowego białka wykazała wysoką zawartość aminokwasów egzogennych, wyższą w makuchach w porównaniu z ekstrudatami. Prawdopodobnie wynikało to z podwyższenia zawartości białka w makuchach, po wyłoczeniu części tłuszczu. Stwierdzono stosunkowo niewielką ilość metioniny i cystyny oraz wysoką zawartość lizyny.

Fot. 1. Klatka do badań bilansowych na szczurach.



Tabela 1. Wartość pokarmowa białka badanych materiałów paszowych w doświadczeniu bilansowym na szczurach.

Źródło białka	BV	TD	NPU	CS	EAAI
Śruta sojowa poekstr.	76,9C	89,4a	69,1b	53,20	88,15
Ekstrudat z soi Erica	72,6B	89,1 a	64,8 a	51,07	84,52
Makuch z soi Erica	75,6C	90,6 ab	68,6 b	52,29	84,53
Ekstrudat z soi Petrina	69,6A	92,8 b	64,6 a	43,01	83,71
Makuch z soi Petrina	70,6A	92,4 b	65,5 a	48,39	84,17
Ekstrudat z soi Viola	69,7A	90,8 ab	63,2 a	45,89	84,24
Makuch z soi Viola	78,0C	90,9 ab	70,9 b	53,20	84,78

2. Doświadczenie na krowach przetokowanych

Celem badania realizowanego w 2021 roku było porównanie wpływu źródła białka na przebieg fermentacji żwaczowej i parametry krwi krów. Doświadczenie przeprowadzono na trzech przetokowanych dożwaczowo krowach rasy PHF, w układzie dwóch kwadratów łacińskich.

Układ doświadczenia:

grupa I – poekstrakcyjna śruta sojowa GMO, grupa II – pełnotłuste nasiona soi nGMO, grupa III – makuch sojowy, grupa IV – ekstrudowane pełnotłuste nasiona soi. Każde powtórzenie trwało 16 dni (14 dni adaptacji i 2 dni zbierania danych).

Uzyskane wyniki:

Dla wartości pH płynu żwacza zaobserwowano niewielkie wahania (max $\pm 3\%$). Zawartość azotu amonowego była średnio o 6-8% niższa dla grup otrzymujących nasiona, makuch lub ekstrudat, w stosunku do grupy kontrolnej. Zawartość kwasu octowego była wyższa niż w grupie kontrolnej – o 3% w grupie otrzymującej nasiona, o 2% w otrzymującej makuch, a niższa o 1% w grupie otrzymującej ekstrudat. Najwyższe (o 11%) stężenie tego kwasu zaobserwowano w grupie z makuchem. Zawartość kwasu propionowego była taka sama w grupie otrzymującej nasiona, natomiast niższa o 5-6% w grupach otrzymujących makuch lub ekstrudat, w stosunku do grupy kontrolnej. Najniższe (o 9%) stężenie tego kwasu w grupie otrzymującej nasiona lub ekstrudat, natomiast o 5% niższa w grupie otrzymującej makuch, w stosunku do grupy kontrolnej. Również najniższe (o 7%) stężenie tego kwasu zaobserwowano w grupie z makuchem. Zawartość kwasu walerianowego w grupie otrzymującej nasiona, makuch lub ekstrudat była niższa niż w grupie kontrolnej o 6-10%.

Tabela 2. Średnie wartości parametrów płynu żwaczowego (azot amonowy [mg/ml], lotne kwasy tłuszczowe [mmol/L]).

Parametr	pH				Azot amonowy				Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas masłowy				Kwas walerianowy			
Grupa	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder	Kontrolna	Nasiona	Makuch	Ekstruder
Średnia	6,500	6,490	6,510	6,440	0,108	0,102	0,100	0,099	113,4	116,8	116,0	112,3	20,03	19,99	19,05	18,77	11,93	11,94	11,36	11,94	1,176	1,108	1,059	1,055

3. Doświadczenie na prosiętach.

Doświadczenie przeprowadzono na odsadzonych prosiętach (wieprzki) rasy PBZ, podzielonych na 6 grup po 10 sztuk i otrzymujących izobiałkowe i izoenergetyczne mieszanki paszowe różniące się rodzajem pasz białkowych (poekstrakcyjna śruta sojowa lub makuch sojowy), z dodatkiem lub bez pełnotłustej mączki z larw muchy BSF i antyutleniacza astaksantyny.

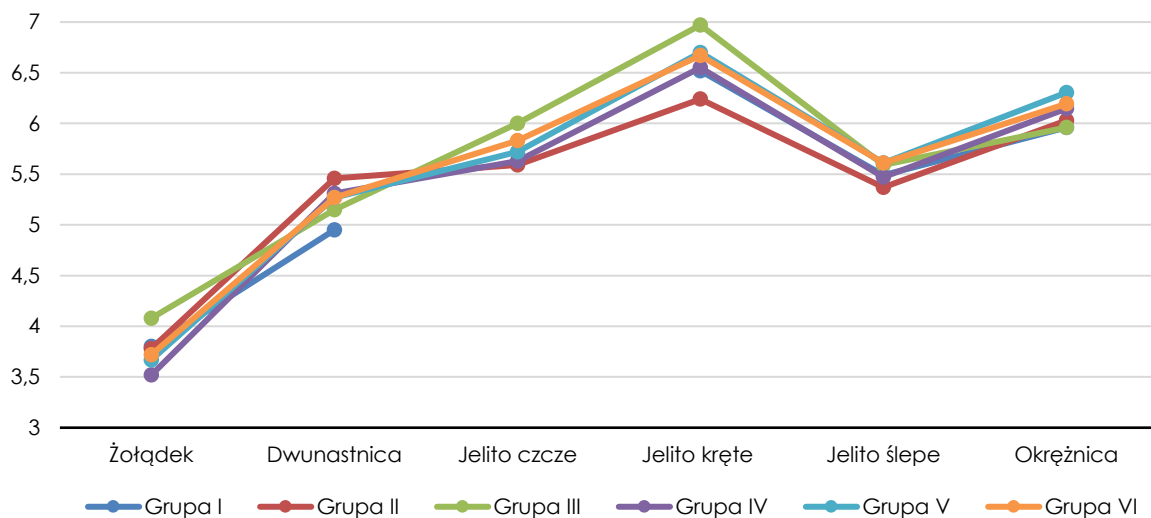
Fot. 2. Krowa z przetoką wprowadzoną do żwacza oraz woreczki z próbkami pasz po inkubacji w żwaczu.



Układ doświadczenia:

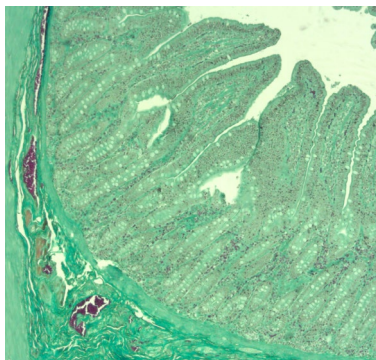
grupa I – mieszanka paszowa z udziałem poekstrakcyjnej śruty sojowej GMO; grupa II – mieszanka paszowa z udziałem makuchu sojowego n-GMO (jako zamiennika śruty sojowej GMO); grupa III – mieszanka paszowa z udziałem makuchu sojowego n-GMO + 5% dodatek mączki z larw muchy BSF; grupa IV – mieszanka paszowa z udziałem makuchu sojowego n-GMO + 2,5% dodatek mączki z larw muchy BSF; grupa V – mieszanka paszowa z udziałem makuchu sojowego n-GMO + 5% dodatek mączki z larw muchy BSF + astaksantyna; grupa VI – mieszanka paszowa z udziałem makuchu sojowego n-GMO + 2,5% dodatek mączki z larw muchy BSF + astaksantyna.

Wykres 1. Poziom pH treści w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego świń.

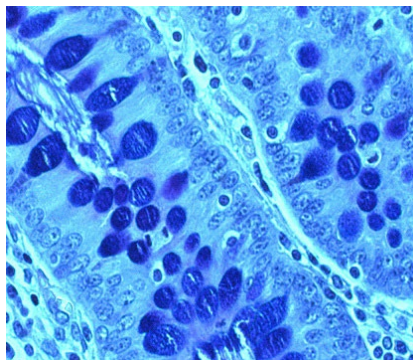
Uzyskane wyniki:

W listopadzie 2021 roku zakończono prowadzenie doświadczenia żywieniowego i zbieranie próbek materiałów biologicznych (krew, kał, treść pokarmowa i wycinki tkankowe poszczególnych odcinków jelit, próbki wybranych narządów). Wykonano analizy hematologiczne w pełnej świeżej krwi oraz analizy biochemiczne w surowicy krwi. Rozpoczęto badania histomorfometryczne – preparaty z 5 odcinków jelit i wątroby barwiono przy użyciu metody Pas-Alcian (P-A) i trichromowego Massona-Goldnera (tM-G). Rozpoczęto wykonywanie pomiarów histometrycznych (szerokość i długość krypt, liczba komórek kubkowych, liczba enterocytów, długość i szerokość kosmków).

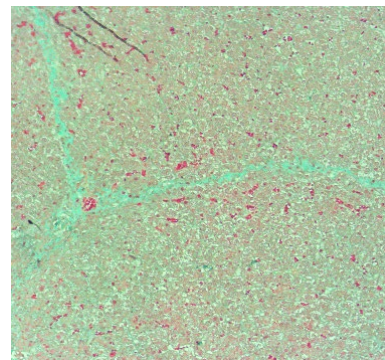
Rysunek 1. Kosmki jelita cienkiego (barwienie tM-G).



Rysunek 2. Krypty jelita grubego z komórkami kubkowymi (barwienie P-A).



Rysunek 3. Zraziki wątroby z triadą (barwienie tM-G).



4. Doświadczenie na cielętach

Materiał doświadczalny stanowi 40 cieląt (buhajków) rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, przydzielonych do 5 grup, po 8 sztuk. Żywienie cieląt oparte było na mieszankach treściwych różniących się w poszczególnych grupach źródłem białka.

Układ doświadczenia:

Grupa I (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 (II – nGMO), z dodatkami o działaniu immunostymulującym, tj. mączka z larw muchy BSF (III – IPS), astaksantyna (IV-AXT), mączka i astaksantyna (V-IPS+AXT).

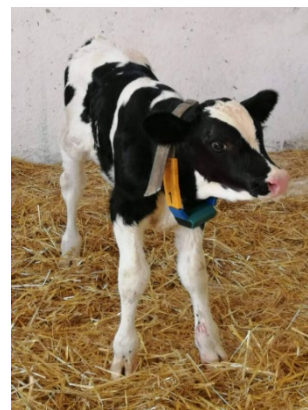
Uzyskane wyniki:

Odchów cieląt zakończono w listopadzie 2021 roku. W terminach – 1., 7., 14., 28., 56., 70. oraz 90. dzień życia pobierano krew. Cielęta w 90. dniu życia zostały poddane ubojowi w celu przeprowadzenia pomiarów i pobrania próbek do analiz. Wstępne wyniki produkcyjne wskazują, iż w drugim okresie odchowu (56.-90. dzień życia), kiedy to zakończył się okres odpajania preparatem mlekozastępczym i wzrosło pobranie pasz stałych, stwierdzono, że zwierzęta z grup, gdzie stosowano IPS charakteryzowały się najwyższą końcową masą ciała i najwyższymi dziennymi przyrostami, a także najlepszym wykorzystaniem mieszanki treściwej za cały okres doświadczenia. Jednak uzyskane wyniki nie były statystycznie istotne ($P \geq 0.05$).

Ponadto, wstępne wyniki wskazują, iż poekstrakcyjna śruta sojowa może zostać zastąpiona w zbilansowanych mieszankach treściwych dla cieląt produktem sojowym nGMO, uzyskiwanym z krajowych odmian soi (22% poekstrakcyjnej śruty sojowej zostało zastąpione przez 27% produktu sojowego).

Zastosowanie dodatków immunostymulujących w postaci mączki owadziej czy też astaksantyny nie wykazywało wpływu na uzyskiwane przez buhajki przyrosty masy ciała, nie odnotowano także synergistycznego ich oddziaływania.

Fot. 3. Jednodniowe cielę rasy pHF.



Podsumowanie przeprowadzonych badań:

Aktualnie większość danych uzyskanych w badaniach na prosiętach, krowach i cielętach jest jeszcze analizowanych i opracowywanych, formułowane są wnioski końcowe. Prowadzony jest również przegląd literatury naukowej, dotyczącej badanych zagadnień, niezbędny do właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Zadanie 01-16-07-21

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

kierownik zadania: dr inż. Wojciech Witarski (od 01.07.21),

dr inż. Paulina Szczurek-Janicka (do 30.06.21)

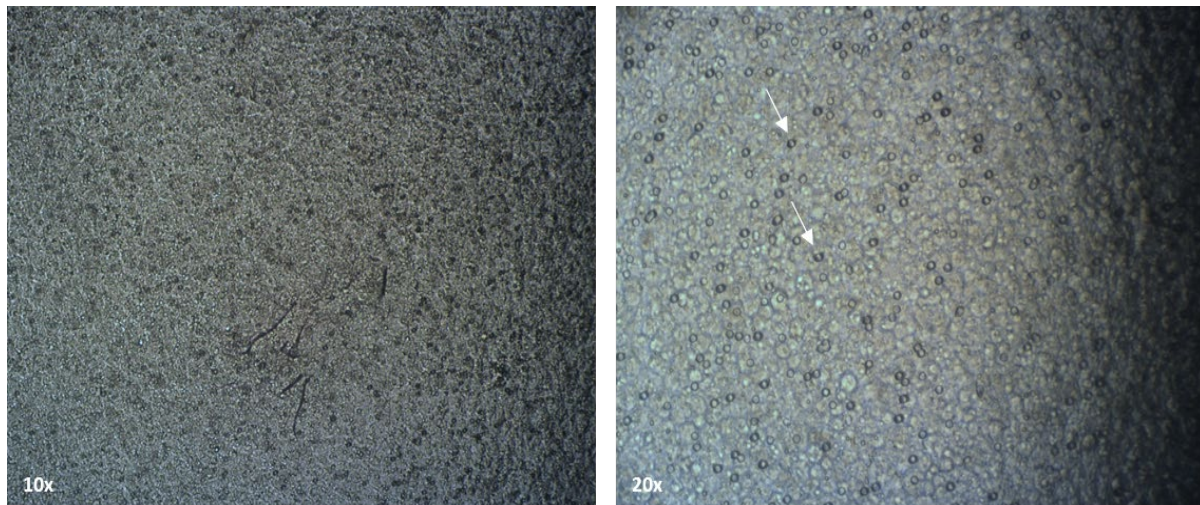
Cel badań:

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

Dawki maślanu sodu, taninianu żelatyny oraz deoksyniwalenolu przeznaczone do traktowania wyznaczono eksperymentalnie na komórkach CaCO₂ przy wykorzystaniu krzywej koncentracji stymulantów i zestawu do detekcji zmian tempa metabolizmu: CellTitter Blue (Promega) oraz detekcji aktywności kaspaz 3 i 7 (zestaw ApoOne 3/7 Promega). Optymalne dawki wyznaczona dla vomiktoksyna 0,1 uM – w przedziale czasowym 24 godziny, maślan sodu – pomiędzy 0,2 a 2 mM. Taninian żelaza nie wykazywał istotnych efektów toksycznych.

Dla potrzeb analiz zmian fenotypowych opracowano model hodowli organoidów w formie płaskiego nabłonka na porowatych nośnikach, gdzie poddano aktywacji szlak notch poprzez inhibicję gamma-sekretazy. Wstępne analizy przepuszczalności nabłonka, przy pomocy urządzenia Millicell ERS-2, wykazywały TEER na poziomie 100-200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, co w porównaniu z literaturowymi danymi odnośnie wartości fizjologicznych (50-100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, David F. Transport Processes in Pharmaceutical Systems. Informa Healthcare; 1999. Biological Transport Phenomena in the Gastrointestinal Tract), wyróżnia to podejście na tle stosowanych modeli przy użyciu komórek CaCO₂. Oporność określonego fragmentu nabłonka była wyznaczona ze wzoru: $TEER = (R_{\text{nablonka}} [\Omega] - R_{\text{blank}} [\Omega]) * M_{\text{powierzchni eksperymentalnej}} [\text{cm}^2]$.

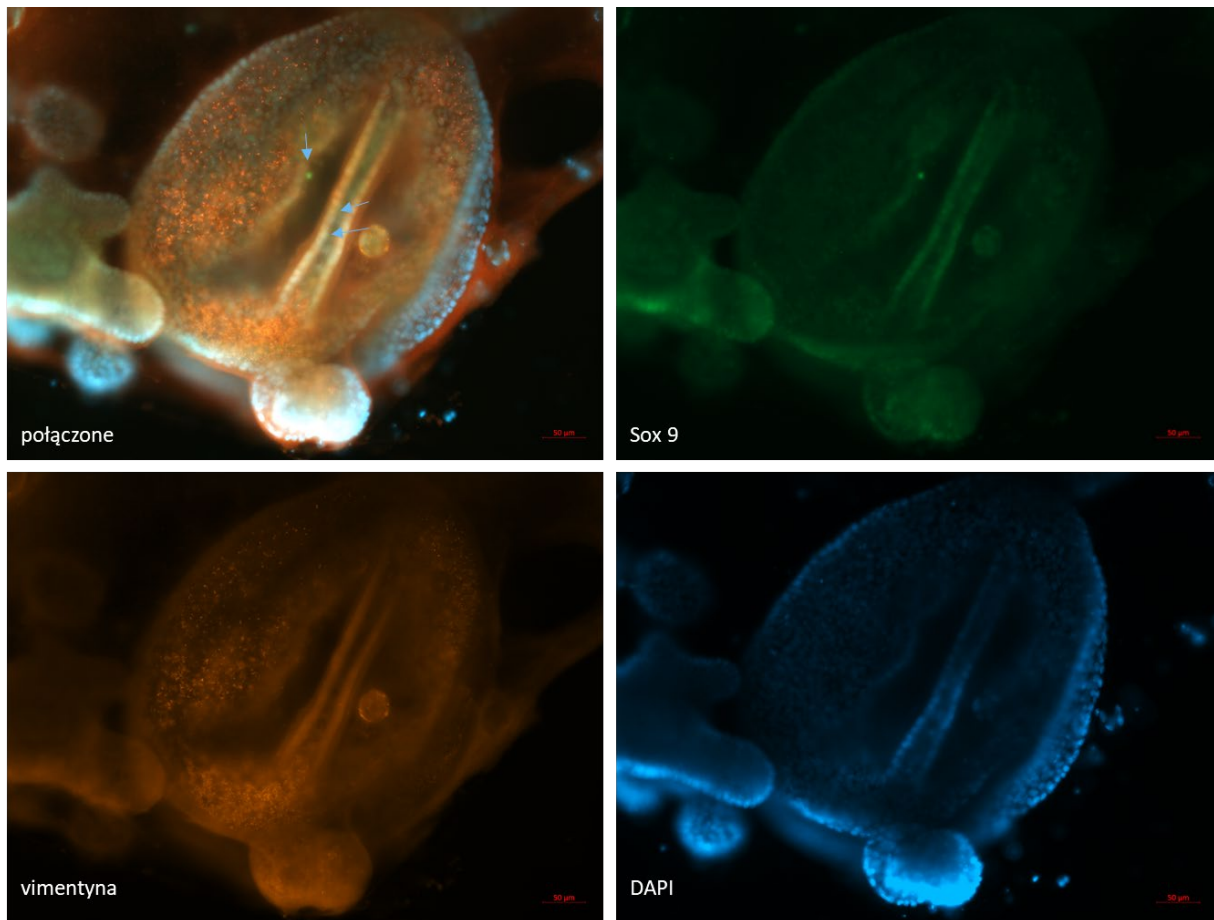
Fot. 1. Pseudo-nabłonek jelitowy skomponowany z komórek wyprowadzonych z organoidów jelitowych świni (mieszanina komórek 4 różnych osobników), inkubowanych przez 2 tygodnie w naczyniach transwell (Corning) o szerokości pora 8 μM (biała strzałka). Komórki utrzymywano w 100 μl medium różnicującego Organoid Growth Medium (Stemcell) z dodatkiem DAPT (5 μM). Dolna komora była zasilona 400 μl 10% serum DMEM. Obie kompozycje medium hodowlanego zostały wzbogacone o antybiotyki Primocin (Invivogen).



Analizowano zmiany ekspresji genów dla organoidów, wykorzystując porównawczą analizę ekspresji genów markerowych dla poszczególnych typów komórek techniką Real-time PCR. Geny CGHA (enteroendokrynne komórki), LGR5 (marker komórek macierzystych), MUC2 (marker komórek gobletowych), EPHB (marker komórek Panetha oraz macierzystych), FZD5 (enterocyty), PCNA (komórki dzielące się) analizowano względem kontroli. Organoidy dodatkowo analizowano przy użyciu techniki immunofluorescencyjnej z zastosowaniem przeciwciał przeciwko białkom Muc2, PCNA, Sox9. Badania wykazały, że optymalne warunki dla utrzymywania organoidów w postaci maksymalnie zróżnicowanej formy pod względem komórkowym i dominującej obecności komórek macierzystych wymagają stymulacji poprzez medium hodowlane oraz stosowanie hodowli zawieszinowych w formie opracowanych technik z wykorzystaniem macierzy pozakomórkowej (Geltrex Thermofisher).

Z punktu widzenia składu komórkowego, wraz z kolejnymi pasażami populacja organoidów przechodzi z postaci heterogennej w mieszaninę homogennych organoidów o różnej kompozycji składu komórkowego w zależności od pojedynczego organoidu.

Fot. 2. Immunofluorescencyjna analiza jelitowych organoidów świńskich, ukazująca przestrzenną organizację oraz komórkową heterogeniczność. Technikami klasycznego barwienia immunofluorescencyjnego uzyskano obraz białka Sox 9 (ab5535 Millipore, marker komórek macierzystych i pokrewnych, także Lgr5^{high}) przedstawiony na zielono oraz ukazany strzałkami, vimentyny (pa10003 Thermofisher, składnik filamentów pośredniczących cytoszkieletu), na pomarańczowo oraz barwione na niebiesko jądra przy pomocy barwnika DAPI (Sigma).



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

Rozpoczęte badania dotyczą zagadnień nowoczesnej produkcji drobiarskiej – intensywnie odchowywanych kurcząt rzeźnych (brojlerów) oraz intensywnie użytkowanych kur nieśnych.

W ramach zadania realizowane są dwa cele badawcze. Cel 1. obejmuje określenie wpływu dodatków preparatów ziółowych (i ich interakcji z kokcydiostatykami stosowanymi w paszy dla brojlerów) w kontekście oddziaływania na produktywność kurcząt i niosek, status zdrowotny ptaków, jakość produktów oraz ich bezpieczeństwo dla konsumenta. W celu szczegółowym 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: (1) wystąpi korzystny efekt łącznego podawania kokcydiostatyków jonoforowych i substancji fitobiotycznych na funkcjonowanie wątroby, parametry produkcyjne i wydzielnicze przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów oraz (2) 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.

W okresie sprawozdawczym wykonano doświadczenie na kurczętach brojlerach (łącznie 378 kogutków Ross 308) nad określeniem skuteczności dodatków ziołowych w warunkach ciągłego stosowania kokcydiostatyku salinomycyny. W pierwszym dniu życia ptaki przydzielono do 7 grup doświadczalnych z 6 powtórzeniami po 9 sztuk i odchowywano w boksach ściółkowych z uwzględnieniem dwóch okresów żywienia: od 1. do 21. dnia życia – standardową mieszanką typu starter, a od 22. do 42. dnia – standardową mieszanką typu grower-finisher. Mieszanki paszowe dla kurcząt z grupy 1. nie zawierały dodatku kokcydiostatyku (kontrola negatywna). W pozostałych grupach doświadczalnych mieszanki paszowe, w tym grupa kontrolna pozytywna, zawierały salinomycynę (Sacox®120 microGranulate). Zgodnie ze schematem zamieszczonym w Tabeli 1., do mieszanek paszowych z salinomycyną wprowadzono dodatek ziołowy (2 g/kg mieszanki paszowej).

Tabela 1. Schemat doświadczenia.

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

W trakcie doświadczenia kontrolowano masę ciała kurcząt, spożycie paszy oraz liczbę padnięć. W celu wykonania analizy rzeźnej, a także określenia udziału mielca, wątroby oraz narządów limfoidalnych (śledziony i torebki Fabrycjusza), po zakończeniu doświadczenia wzrastowego z każdej grupy ubito po 6 kurcząt. Wstępna analiza danych wskazuje, że zastosowanie ostropestu (grupa 5.) pozwoliło na uzyskanie najwyższych przyrostów masy ciała (PMC), a wyniki uzyskane w tej grupie różniły się istotnie w odniesieniu do obu grup kontrolnych oraz grupy otrzymującej karczoch. PMC uzyskane na mieszankach zawierających ekstrakt z czosnku różniły się istotnie w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej negatywnej. Nie obserwowano jednak istotnych różnic pomiędzy grupami otrzymującymi dodatki paszowe (grupy 2.–4.) w zakresie efektywności wykorzystania paszy. Najniższą względną masę (% masy ciała) torebki Fabrycjusza stwierdzono w grupie kontrolnej negatywnej, natomiast kurczęta otrzymujące w diecie dodatek ekstraktu z czosnku lub karczocha charakteryzowały się najwyższym udziałem tego narządu w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej negatywnej i grupie ptaków otrzymujących w diecie ekstrakt z oregano. Metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas oznaczono pozostałości kokcydiostatyku w wątrobie. Maksymalne, oznaczone poziomy nie przekroczyły wartości 2,72 µg/kg. Górny limit pozostałości salinomycyny w wątrobie wynosi aktualnie 150 µg soli sodowej salinomycyny/kg wątroby, zatem stwierdzone w doświadczeniu pozostałości kokcydiostatyku są znikome i nie stanowią żadnego zagrożenia dla konsumenta.

W 2021 roku rozpoczęto również długoterminowe doświadczenie na kurach nieśnych lohmann brown. Nioski utrzymywane są w klatkach wzbogaconych, w standardowych warunkach mikroklimatu pomieszczenia, przy stałym dostępie do paszy i wody. Utworzono 10 grup eksperymentalnych z 12 powtórzeniami, złożonymi z 2 kur utrzymywanych we wspólnej klatce. Do składu podstawowej mieszanki paszowej zastosowano dodatki ekstraktów ziołowych (2 g/kg), w tym: ostropestu plamistego (OP), karczocha (K), ostryżu długiego (OD) i/lub L-karnityny (300 mg/kg paszy), według następującego schematu: kontrola, L-karnityna, OP, K, OD, OP + K, OP + L-karnityna, K + L-karnityna, OD + L-karnityna, OP + K + L-karnityna.

Cel szczegółowy 2.

Zgodnie z harmonogramem realizacji badań, przeprowadzono doświadczenie nad oceną wpływu wieku kurcząt (10, 20 lub 30 dni) na pozorną jelitową strawność aminokwasów nasion bobiku, z grupy niskotaninowych odmian krajowych, połączoną z określeniem wielkości podstawowego przepływu jelitowego aminokwasów endogennych (tj. nie pochodzących z paszy, EAA), z wykorzystaniem techniki krótkotrwałego żywienia dietą bezbiałkową (PFD). Do badań wybrano nasiona odmiany Amigo (Fot. 1.). Jest to odmiana wyhodowana przez Hodowlę Roślin Strzelce Sp. z o.o. i wpisana do KRO w 2016 roku.

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



Analizy laboratoryjne wykazały następujący skład chemiczny badanych nasion bobiku (g/kg): sucha masa – 859,2; białko surowe – 270,0; tłuszcz surowy – 10,0; popiół surowy – 27,7; włókno surowe – 74,0; włókno neutralno-detergentowe (aNDF) – 237,0; włókno kwaśno-detergentowe (ADF) – 106,0; lignina kwaśno-detergentowa (ADL) – 1,4; związki fenolowe ogółem – 2,460; proantocyjandyny – 0,064. Oznaczony analitycznie profil aminokwasowy białka surowego (BS) badanych nasion przedstawia poniższa tabela:

Tabela 2. Zawartość aminokwasów w 100 g białka surowego bobiku Amigo.

Aminokwas		g/100 g BS
Kwas asparaginowy	Asp	10,26
Treonina	Thr	3,30
Seryna	Ser	4,43
Kwas glutaminowy	Glu	15,85
Prolina	Pro	3,98
Glicyna	Gly	3,98
Alanina	Ala	3,80
Walina	Val	4,31
Izoleucyna	Ile	4,32
Leucyna	Leu	5,60
Tyrozyna	Tyr	3,14
Fenylalanina	Phe	4,00
Histydyna	His	2,56
Lizyna	Lys	5,93
Arginina	Arg	8,59
Cystyna	Cys	1,04
Metionina	Met	0,79

W okresie poprzedzającym część eksperymentalną badań opracowano recepturę i przygotowano wymaganą ilość diety testowej, w której nasiona bobiku (Amigo) były jedynym źródłem białka (20,3% BS w diecie, przy udziale nasion w powietrznie suchej masie diety wynoszącej 75%). Całe nasiona 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 (niejodowaną) oraz premiksem wprowadzającym wyłącznie witaminy i mikroelementy. Tlenek chromu (Cr_2O_3), jako niestrawną substancję wskaźnikową, wprowadzono do diety w ilości 5 g/kg. Dietę bezbiałkową (PFD) sporządzono według receptury sugerowanej w literaturze metodologicznej. Jej głównymi składnikami były skrobia kukurydziana, dekstroza, olej rzepakowy rafinowany (dodatek oleju eliminował pylistość diety), fosforan jednowapniowy, kreda paszowa (36% Ca), sól spożywcza niejodowana oraz premiks zawierający wyłącznie witaminy i mikroelementy na nośniku w postaci węglanu wapnia. Tlenek chromu, jako substancję wskaźnikową, wprowadzano w ilości 5 g/kg diety. Do składu tej diety wprowadzano również oczyszczoną celulozę i tlenek magnezu, a także wodorowęglan sodu i chlorek potasu jako dodatkowe źródła jonów Na^+ , K^+ , Cl^- niezbędnych do utrzymania odpowiedniej równowagi kwasowo-zasadowej. Właściwe doświadczenie wykonano w brojlerni doświadczalnej zaplecza badawczego Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach na łącznie 324 kurczętach (kogutki Ross 308), utrzymywanych od 1. dnia życia w klatkach grupowych. W trakcie wspólnego odchowu na standardowej mieszance paszowej, z początkowej stawki wybierano kolejno 156 – 4-dniowych, 108 – 14-dniowych i 60 – 24-dniowych ptaków, które przenoszono sukcesywnie do oznaczonych klatek na krótki (adaptacyjny) okres żywienia dietą testową (z bobikiem) oraz dietą bezbiałkową (PFD) do osiągnięcia wieku odpowiednio 10, 20 i 30 dni. Dla oznaczeń strawności (pozornej) aminokwasów kurczęta przydzielano do sześciu powtórzeń (klatek) o liczebności 12, 8 i 4 szt., a dla pomiaru przepływu EAA do 6-ciu powtórzeń (klatek) o liczebności 14, 10 i 6 osobników w kolejnym wieku. Po 5 dniach nieograniczonego dostępu do diet, wszystkie kurczęta z kolejnych grup wiekowych ubijano (metoda asfiksji w CO_2 lub głuszenia elektrycznego i skrawawienia) dla pobrania treści jelitowej. W kolejnych okresach pobrań (10., 20. i 30. dzień życia kurcząt) treść jelitową wyptakiwano z dystalnego fragmentu jelita biodrowego (odcinek jelita cienkiego między zastawką biodrowo-ślepą i uchyłkiem Meckela), tworząc po 6 prób zbiorczych materiału uzyskanego w obrębie każdej grupy wiekowej. Pobrany materiał, po zamrożeniu, poddano procesowi liofilizacji, a następnie homogenizacji do postaci mąki o wielkości cząstek około 200 μm . Próby diet oraz materiał biologiczny (liofilizowana treść jelitowa) przekazano do Centralnego Laboratorium IZ PIB w celu wykonania niezbędnych (zaplanowanych) analiz obejmujących zawartość aminokwasów, suchej masy, białka surowego oraz chromu dodanego. Pełny zestaw wyników ww. analiz został dostarczony przez zleceńbiorcę pod koniec roku sprawozdawczego. Komplet tych danych jest aktualnie opracowywany do kalkulacji współczynników pozornej strawności jelitowej poszczególnych aminokwasów nasion bobiku, a obliczone wartości liczbowe EAA będą wykorzystane do standaryzacji (korekty) tych współczynników w kolejnym etapie realizacji badań w ramach celu szczegółowego 2.

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 ocena wpływu dodatku paszowego o właściwościach buforujących, ograniczającego rozwój bakterii o charakterze patogennym i mającego wpływ

na stabilizację mikroflory jelit u odsadzonych prosiąt oraz parametry produkcyjne i zdrowie rosnących świń.

Doświadczenie zostało wykonane na ogółem 18 miotach (ok. 200 prosiąt), pochodzących od loch linii 990, według schematu zamieszczonego na Rycinie 1. Prosięta pochodziły od loch wieloródek (3.-4. laktacja), gdzie średnia ilość prosiąt żywo urodzonych wynosiła minimum 12 sztuk. Lochy, od 100. dnia ciąży do odsadzenia prosiąt, utrzymywane były w kojcach porodowych. Lochy otrzymywały mieszankę pełnoporcjową dla loch prośnych i karmiących (Tabela 1.). Prosięta po urodzeniu przebywały wraz z matkami w kojcach porodowych do odsadzenia w 28. dniu życia, a następnie do 70. dnia życia, odchów prowadzony był w kojcach dla prosiąt starszych. Okres właściwy doświadczenia trwał od 28. dnia do 70. dnia życia prosiąt.

Rycina 1. Schemat doświadczenia.

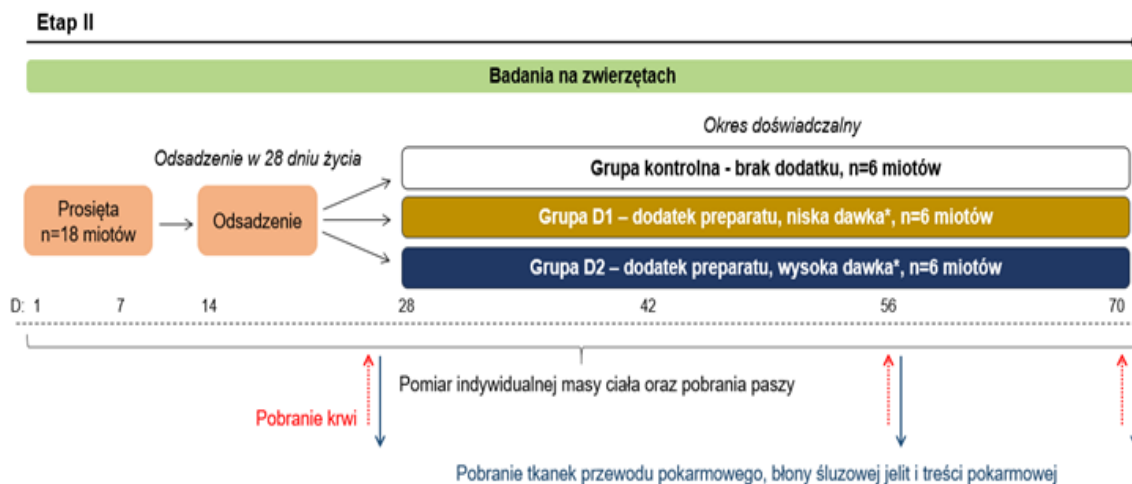


Tabela 1. Wartość pokarmowa mieszanki LK dla loch wysokoprośnych i karmiących.

Wyszczególnienie	Zawartość w 1 kg
Energia metaboliczna, MJ	13,0
Białko ogólne, g	160
Włókno surowe, g	40
Lizyna, g	9
Metionin+Cystyna, g	5,4
Treonina, g	5,8
Tryptofan, g	1,8
Wapń, g	8,0
Fosfor, g	5,0
Sód, g	2,0

W trakcie odchowu prosiąt były stosowane trzy rodzaje mieszanek (Tabela 2.):

- prestarter wczesny od 7. dnia aż do odsadzenia 28. dnia,
- prestarter odsadzeniowy od 28. dnia do 42.,
- starter w okresie od 42. dnia do 70. dnia życia.

Wartość pokarmową mieszanek dla prosiąt zamieszczono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartość pokarmowa mieszanek dla prosiąt.

Wyszczególnienie	j.m.	Prestarter wczesny	Prestarter odsadzeniowy	Starter
Energia metaboliczna	MJ	13,8	13,4	13,0
Białko ogólne	g	210	190	180
Włókno surowe	g	30	40	40
Lizyna	g	13,5	12,5	12,0
Metionina+Cystyna	g	7,2	6,6	6,4
Treonina	g	8,5	8,0	7,6
Tryptofan	g	2,7	2,3	2,2
Wapń	g	9,0	8,0	8,0
Fosfor	g	6,0	5,5	5,0
Sód	g	1,5	2,0	2,0

Pierwszego dnia okresu doświadczalnego (28. dzień życia) prosięta zostały losowo przydzielone do 3 grup żywieniowych według Ryciny 1. Preparaty doświadczalne dodawane były do mieszanki prestarter odsadzeniowy i starter według schematu (Tabela 3.).

W trakcie trwania całego doświadczenia zbierane były wskaźniki odchowu prosiąt: ilość prosiąt w miocie, masa ciała w 28., 42. i 70. dniu życia, przyrosty dzienne, pobranie paszy, wskaźnik wykorzystania paszy FCR, śmiertelność prosiąt i ich przyczyny.

Obliczenia statystyczne:

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą modelu dwuczynnikowej analizy kowariancji, gdzie zmienną towarzyszącą był wiek w dniu odsadzenia wykorzystując pakiet statystyczny Statgraphics 12.0.

Wyniki badań:

Odpowiednie żywienie jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania przewodu pokarmowego, a właściwa suplementacja diety prosiąt związkami zdolnymi do modulacji składu mikrobiomu i aktywności jelit jest jednym z najefektywniejszych sposobów na poprawę zdrowotności i produktywności prosiąt.

Na podstawie wyników laboratoryjnych wykonanych w 2020 roku sporządzono preparat, który został zastosowany w doświadczeniu żywieniowym na 186 prosiątach pochodzących od 18 loch linii 990, podzielonych na trzy grupy żywieniowe (6 miotów w każdej grupie). Okres właściwy doświadczenia trwał od odsadzenia prosiąt w 28. dniu do 70. dnia życia. Prosięta w okresie przebywania przy losie do 28. dnia nie dostawały preparatów doświadczalnych. Dawkowanie rozpoczęło po odsadzeniu prosiąt i podzielono na okresy 28-42 i 42-70 według ilości zamieszczonych w Tabeli 3.

W doświadczeniu badano wpływ w/w dodatków na zmniejszenie skutków zakażeń bakteryjnych, w szczególności u młodych zwierząt, poprawę ich wskaźników odchowu i zmniejszenie emisji azotu do środowiska.

W pierwszym okresie odchowu, między 1. a 28. dniem życia, prosięta wszystkich grup żywieniowych charakteryzowały się podobnym wzrostem, uzyskując przy odsadzeniu podobne masy ciała, odpowiednio: kontrola 6,49 kg; D1 6,99 kg i 6,77 kg.

W okresie suplementacji preparatu uwidocznił się istotny wpływ oddziaływania preparatu zastosowanego w niższej dawce (gr. D1) na parametry odchowu prosiąt. W krytycznym dla prosiąt okresie poodsadzeniowym między 28. a 42. dniem stwierdzono istotnie wyższe przyrosty masy ciała w grupie D1 vs. Kontroli 143 vs. 81 g ($P \leq 0,01$) i istotnie wyższą masę ciała prosiąt

w 42. dniu życia w grupie D1 9,00 kg vs. K 7,62 kg ($P \leq 0,01$). Istotnie wyższe przyrosty masy ciała w grupie doświadczalnej D1 utrzymały się do końca doświadczenia. W 70. dniu życia prosięta w poszczególnych grupach żywieniowych uzyskały następujące masy ciała: K 16,72 kg (0%); D1 22,28 kg (+33,2%); D2 18,09 kg (+23,1%) ($P \leq 0,01$). Istotne różnice w końcowej masie ciała miały odzwierciedlenie w istotnie wyższych przyrostach masy ciała prosiąt w okresie od odsadzenia do 70. dnia życia, zwłaszcza w grupie doświadczalnej D1, w porównaniu do kontroli, 244 g (+0%) vs. D 364 g (+49%). Prosięta z grup doświadczalnych D1 i D2 pobierały więcej paszy, w porównaniu do kontroli, odpowiednio: D1 1149 g; D2 1016 vs. K 846 g zwłaszcza w okresie po 3. do 6. tygodniu po odsadzeniu.

Na uwagę zasługuje fakt niższej śmiertelności prosiąt w grupach doświadczalnych, szczególnie w grupie D1, gdzie wyniósł 1,7% w D2 8,4%, a w kontroli 11,0%.

Tabela 3. Ilość prosiąt (szt.) w poszczególnych fazach doświadczenia.

Grupa	Przy odsadzeniu	Po 2 tygodniach od odsadzenia	Po 6 tygodniach od odsadzenia
Kontrolna	66	62	59
D1	61	60	60
D2	60	60	55

Tabela 4. Średnia masa ciała prosiąt (w kg) w poszczególnych fazach doświadczenia.

Grupa	Przy odsadzeniu	Po 2 tygodniach od odsadzenia	Po 6 tygodniach od odsadzenia
Kontrolna	6,49	7,62 ^A	16,72 ^A
D1	6,99	9,00 ^B	22,28 ^B
D2	6,77	7,54 ^{AB}	18,09 ^{AB}

A, B – wartości oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie ($P < 0,01$).

Tabela 5. Średnie dzienne przyrosty masy ciała (w gramach) w poszczególnych okresach doświadczenia.

Grupa	Do odsadzenia	W okresie 2 tygodni po odsadzeniu	W okresie 6 tygodni po odsadzeniu	W okresie 3.-6. tydzień po odsadzeniu
Kontrolna	194	81 ^A	244 ^A	325 ^A
D1	215	143 ^B	364 ^B	474 ^B
D2	208	54 ^{AB}	270 ^{AB}	370 ^{AB}

A, B – wartości oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie ($P < 0,01$).

Tabela 6. Średnie dzienne pobranie paszy (w gramach/prosię/dzień) w poszczególnych okresach w badanych grupach żywieniowych (zużycie na podstawie danych dla 6 miotów w każdej grupie żywieniowej).

Grupa	w okresie 2 tygodni po odsadzeniu	W okresie 3.-6. tydzień po odsadzeniu
Kontrolna	213	846
D1	270	1149
D2	192	1016

Wnioski:

Zastosowanie octanu sodu i maślanu sodu w dawce odpowiednio: 1,0 kg/t i 1,0 kg/t paszy w okresie okołoodsadzeniowym, wpływa korzystnie na parametry odchowu prosiąt m.in. przyrosty masy ciała, pobranie paszy, a także na istotne zmniejszenie śmiertelności prosiąt. Podwojona dawka preparatów nie daje zadawalających rezultatów.

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

Cel zadania:

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

Cel ten jest realizowany 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 „Zielonego Ładu” w gospodarstwach ze zróżnicowaną produkcją zwierzęcą.

Zaplanowano etap dotyczący opracowania założeń metodycznych w zakresie konstrukcji kwestionariuszy badawczych oraz identyfikację działań skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej na środowisko w obrębie rodzinnych gospodarstw oraz pozyskiwanie informacji z zakresu zasobów gospodarstw.

W pierwszym roku badań:

- wytypowano gospodarstwa rodzinne utrzymujące bydło mięsne, bydło mleczne oraz owce i świnie,
- przygotowano kwestionariusz ankiety do gromadzenia danych źródłowych w terenie,
- 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,
- zgromadzono dane określające działania skierowane na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko w obrębie gospodarstw rolnych,
- dane źródłowe poddane analizie pochodziły z 247 gospodarstw rodzinnych, zlokalizowanych w województwach podlaskim, podkarpackim i dolnośląskim, w tym: 71 gospodarstw utrzymujących krowy mleczne, 73 gospodarstwa utrzymujące bydło mięsne, 50 gospodarstw utrzymujących owce oraz 53 gospodarstwa utrzymujące świnie.

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

produkcyjnych w rolnictwie nie zawsze idzie w parze z celami środowiskowymi. Jednak na uwagę zasługuje fakt, że w przeważającej większości właściciele objętych badaniami gospodarstw mają świadomość o istotności działań dostosowawczych produkcji rolnej, mających na celu ochronę środowiska naturalnego.

Tabela 1. Działania skierowane na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko w obrębie gospodarstw rodzinnych, utrzymujących różne gatunki zwierząt gospodarskich (%).

Wyszczególnienie	bydło mięsne n=73	bydło mleczne n=71	owce n=50	świnie n=53
Liczba gospodarstw	73	71	50	53
Wapnowanie gleby	75,34	74,65	70,00	83,02
Przyorywanie obornika w ciągu 12 godzin od aplikacji na glebę	46,58	53,52	40,00	52,83
Ekstensywny wypas na TUZ z obsadą zwierząt	43,84	35,21	36,00	3,77
Odpowiednie zmianowanie roślin	36,99	40,85	28,00	32,08
Stosowanie międzyplonów ozimych	34,25	43,66	20,00	20,75
Przestrzeganie planu nawożenia	32,88	43,66	18,00	39,62
Poprawa dobrostanu zwierząt	21,92	33,80	14,00	13,21
Zimowe pożytki dla ptaków	20,55	11,27	14,00	7,55
Rozlewanie gnojowicy innymi metodami niż rozbrygowo, aplikacja dogłębowa nawozów na bazie mocznika	16,44	22,54	0,00	18,87
Wsiewki śródplonowe	15,07	12,68	12,00	9,43
Korzystna struktura upraw	15,07	26,76	14,00	13,21
Produkcja integrowana	13,70	12,68	4,00	7,55
Uproszczone systemy uprawy	12,33	16,90	6,00	16,98
Retencjonowanie wody na trwałych użytkach zielonych	10,96	8,45	0,00	0,00
Obszary z roślinami miododajnymi	9,59	16,90	0,00	7,55
Produkcja metodami ekologicznymi	6,85	1,41	2,00	0,00
Obszary nieprodukcyjne – mikrosiedliska ptaków w uprawach zbożowych – „luki skowronkowe”	5,48	1,41	6,00	1,89
Strefy buforowe na gruntach ornych wzdłuż wód powierzchniowych	5,48	4,23	4,00	0,00

Najchętniej podejmowanym działaniem przyczyniającym się do poprawy odczynu gleby i jej żyzności było wapnowanie, które wpisuje się w ekoschemat „Opracowanie i przestrzeganie planu nawożenia z wykorzystaniem narzędzia FaST”. Działanie to realizowane było w 70% w gospodarstwach owczarskich do ponad 83% utrzymujących świnie.

Innym, często stosowanym zabiegiem, było przyorywanie obornika w ciągu 12 godzin od jego aplikacji (od 40% do 53,52% gospodarstw), mające na celu ograniczenie emisji amoniaku. Stosując obornik na gruntach ornych można to osiągnąć poprzez doskonalenie metod aplikacji nawozów naturalnych, np. poprzez orkę lub płytką uprawę, niemniej jednak za najbardziej efektywną strategię ograniczania emisji amoniaku ze stosowania obornika uważa się skrócenie czasu jego przebywania na powierzchni pola. Wynika to z faktu, że większość amoniaku jest uwalniania z obornika

Istotnym działaniem prośrodowiskowym wśród badanych gospodarstw było zmianowanie roślin (najczęściej w gospodarstwach „mlecznych” 40,85%) oraz praktykowanie międzyplonów ozimych (43,66%), jak również korzystna struktura upraw (gdzie udział zbóż nie przekracza 50% w strukturze zasiewów, a udział roślin okopowych nie przekracza 25%). Działania te są bardzo istotne, gdyż różnorodność odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu dobrego poziomu produktywności agrosystemu, żyzności gleby i glebochronnej funkcji roślin. Uprawa wielu gatunków roślin wzbogaca różnorodność biologiczną gruntów ornych i krajobrazu. Natomiast specjalizacja, koncentracja i intensyfikacja produkcji ogranicza liczbę gatunków uprawianych roślin, prowadząc w wielu przypadkach do upraw monokulturowych i monotonii krajobrazu.

Aplikacja płynnych nawozów naturalnych innymi metodami niż rozbryzgowo realizowana była najczęściej w gospodarstwach utrzymujących bydło i świnie w województwie podlaskim (33,33%).

Analizując dane zwrócono uwagę, że badane gospodarstwa w minimalnym zakresie wyodrębniają strefy buforowe na gruntach ornych czy też obszary nieprodukcyjne.

Pośród przebadanej populacji gospodarstw najmniejsze zainteresowanie jest rolnictwem ekologicznym (średnio 2,56%). Gospodarstwa utrzymujące świnie nie były zainteresowane ekologicznymi metodami produkcji, jedynie w około 7% przebadanych gospodarstw utrzymujących bydło mięsne odnotowano zainteresowanie tym systemem produkcji.

Producenci wyjaśniają ten fakt tym, iż głównym czynnikiem hamującym rozwój gospodarstwa rolnego są niskie ceny zbytu produktów rolnych wytwarzanych metodami ekologicznymi. Dużym problemem są zawiłe oraz niespójne przepisy i zbyt duża biurokracja. Ilość dokumentacji, do której prowadzenia zobligowani są ekologiczni rolnicy, liczba przeprowadzanych kontroli jakim są poddawani, ale i niestabilność przepisów powodująca trudności w ich interpretacji. Jedną z barier jest mała liczba przetwórci ekologicznych, szczególnie mięsnych, ale i paszowych, co przekłada się na konieczność sprzedaży surowca ekologicznego po cenach konwencjonalnych, co wpływa negatywnie na opłacalność produkcji.

Reasumując należy podkreślić, że idea współczesnego rolnictwa musi być gospodarowanie zrównoważone, zapewniające stabilną, opłacalną i akceptowaną społecznie produkcję niezagrożającą środowisku naturalnemu.

Zadanie 04-17-03-11

Ewaluacja metod pomiaru emisji i mitygacji GHG w trakcie pastwiskowania.

kierownik zadania: dr hab. Jacek Walczak

Cel pracy:

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.

Założony cel główny osiągnięty zostanie poprzez realizację celów cząstkowych:

- opracowanie metodologii pomiarów emisji metanu z wykorzystaniem znaczników SF₆ oraz miernika laserowego,
- określenie efektywności pomiarów opracowanych metodologii w stosunku do badań realizowanych w komorach mikroklimatycznych,
- wyznaczenie najskuteczniejszych metod mitygacji GHG i amoniaku w trakcie pastwiskowania bydła.

Celem gospodarczym badań jest opracowanie najefektywniejszych metod redukcji emisji GHG z pastwiskowania krów i przekazanie ich do upowszechnienia, jako elementu realizacji strategii niskoemisyjnej gospodarki oraz osiągnięcia celów klimatycznych.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników badań w etapie:

W omawianym okresie sprawozdawczym zrealizowano początkowy etap zadania, dotyczący porównania metod pomiaru emisji metanu z fermentacji żwaczowej krów przy użyciu tracerów SF₆ i miernika laserowego. Opracowano i wykonano prototypowe tracery/wskaźniki SF₆. Porównywano różne elementy konstrukcji, jak: rodzaj i pojemność zbiorników na gaz (stal, PCV, akryl), sposób mocowania zbiorników (kark, bark) i przewodów doprowadzających gaz, parametry robocze tracera, ciśnienie robocze i wielkość przepływu, sposób filtracji gazów, mocowanie i typu zaworów wy/we, tempo uwalniania SF₆ oraz stosunek oznaczonych stężeń SF₆/CH₄. Przyjęto 24 godzinną funkcjonalność tracera. W przypadku miernika laserowego ustalone zostały parametry metodyczne – temperatury robocze, zakres odległości pomiaru, miejsca pomiaru.

Materiał doświadczalny stanowiło 12 krów mlecznych rasy HF, pozostających w pierwszej fazie laktacji, w grupie żywionej na zapotrzebowanie produkcyjne 7 tys. l mleka. Zwierzęta żywione były metodą TMR z udziałem kiszonki z kukurydzy, a utrzymywane w systemie wolnostanowiskowym. W trzech seriach całodobowych, obejmujących łącznie pięć dni pomiarów i cztery kwatery/pastwiska, określone zostały emisje metanu od każdej ze sztuk przy pomocy dwóch rodzajów mierników-tracerów SF₆ i laserowego miernika metanu.

Tabela 1. Średnie wartości parametrów mikroklimatycznych w trakcie realizacji pomiarów.

Parametr	Kwarta nr 1	Kwarta nr 2	Kwarta nr 3	Kwarta nr 4
Temperatura (°C)				
– powtórzenie 1.	16,2±1,9	16,8±2,3	19,2±2,1	18,9±2,9
– powtórzenie 2.	16,3±2,9	16,1±2,4	16,8±1,8	16,9±2,9
– powtórzenie 3.	17,4±2,6	17,5±2,3	17,8±1,6	17,1±2,3
Wilgotność wzgl. (%)				
– powtórzenie 1.	73,2±4,1	71,5±3,8	72,1±5,2	73,4±4,6
– powtórzenie 2.	65,6±4,1	64,2±4,3	67,5±3,4	68,6±3,5
– powtórzenie 3.	74,2±3,1	73,3±2,1	75,2±2,3	76,3±3,8
Prędkość ruchu powietrza (m/s)				
– powtórzenie 1	0,18±0,03	0,21±0,02	0,19±0,05	0,19±0,04
– powtórzenie 2	0,15±0,04	0,14±0,05	0,15±0,04	0,16±0,04
– powtórzenie 3	0,22±0,04	0,21±0,04	0,22±0,04	0,23±0,04

Tabela 2. Porównanie średnich emisji metanu z pastwiskowania krów, przy wykorzystaniu różnych metod pomiarowych (kg/szt./rok).

Powtórzenie	Rodzaj pomiaru/nr kwatery							
	Kwata nr 1		Kwata nr 2		Kwata nr 3		Kwata nr 4	
	Laserowy	Tracer	Laserowy	Tracer	Laserowy	Tracer	Laserowy	Tracer
1.	108,45a	112,91b	123,53c	127,32d	114,5b	118,61e	129,33d	133,22f
2.	119,12a	123,32b	127,32c	131,42d	124,64b	117,82b	128,41c	132,53d
3.	126,43a	130,21b	134,61c	137,98d	131,43a	124,91b	130,53c	134,32d

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

W trakcie realizacji badań zbierano następujące rodzaje danych:

- dobową emisję metanu w przeliczeniu na 1 szt. przy użyciu tracerów,
- dobową emisję metanu w przeliczeniu na 1 szt. przy użyciu miernika laserowego,
- stężenia metanu w środowisku – tło przy użyciu miernika laserowego,
- warunki mikroklimatyczne (temperatura, wilgotność, prędkość ruchu powietrza).

Dane poddano analizie statystycznej metodą wariancji.

Uzyskane wyniki pomiarów ilustrują Tabele 1. i 2. W całej rozciągłości widoczne jest w nich, statystycznie istotne zróżnicowanie pomiarów realizowanych przez dwa mierniki jednocześnie. Ze względu na warunki klimatyczne, a zwłaszcza temperaturę powietrza i powiązaną z nią prężność par, wyniki emisji od zwierząt z poszczególnych kwater różnią się istotnie między sobą w obrębie pomiarów tą samą metodą. Podobne stwierdzenie odnosi się również w stosunku do kolejnych powtórzeń na tych samych kwaterach, gdzie dodatkowo nakłada się efekt większego udziału włókna, postępujący wraz z kolejnością odrostu.

Podsumowanie wyników:

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzić można, że pomimo istotności różnic w pomiarach dokonywanych różnymi metodami, rząd wielkości emisji od pojedynczej sztuki bydła, zostaje zachowany. W skali roku różnice te sięgają do kilku kg/szt., co przy łącznym poziomie emisji 110-130 kg CH₄/szt./rok, nie wydaje się w skali szacunków dla całości krajowego pogłowa dużą zmianą jakościową. Mimo to, koniecznym będzie dalsze dopracowanie skalowania metody tracerów jako tej docelowej, pozwalającej nie tylko na wielogodzinne pomiary, ale uwzględniającej różne inne czynniki, jak choćby ruch, czy zmienne żywienie, wpływające na wielkość emisji metanu. Ze względu na fizyczny charakter pomiarów miernikiem laserowym, metoda ta wydaje się mniej precyzyjna, zwłaszcza na interwałowy charakter próbkowania.

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

Cel zadania:

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

Założenia metodyczne:

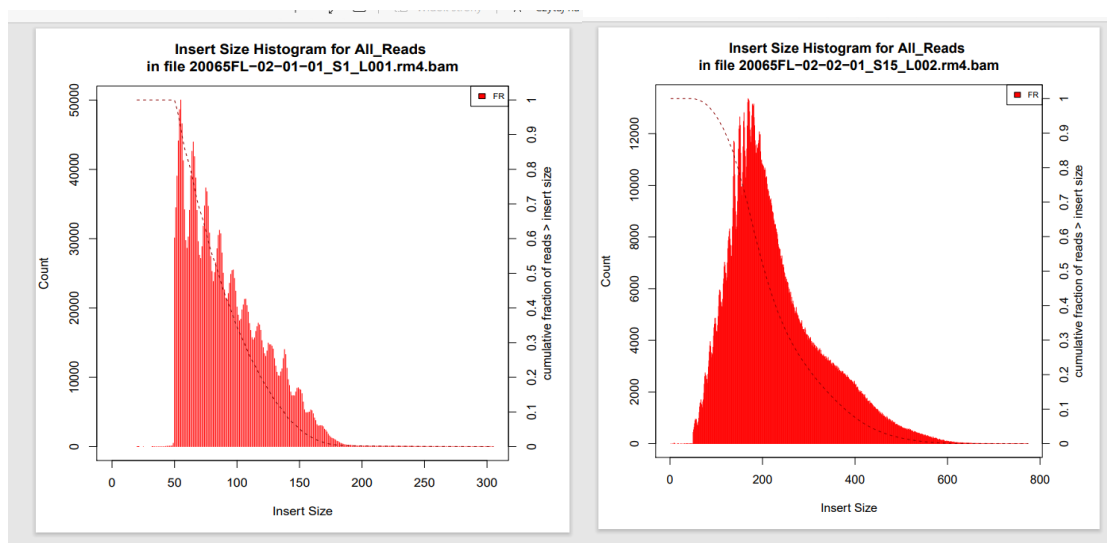
Identyfikację aktywnych procesów molekularnych w tkance tłuszczowej oraz wątrobowej, związanych z podwyższonym poziomem otyłości u świń, badano z wykorzystaniem technik opartych na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS), w tym techniki RNA-seq oceniającej poziom poszczególnych transkryptów oraz techniki ATAC-seq wskazującej transkrypcyjnie czynną chromatynę. Do badań wybrano loszki pochodzące z rasy złotnicka biała, charakteryzujące się skrajnie niskim oraz wysokim poziomem tkanki tłuszczowej w tuszy. Od osobników zostały pobrane próbki wątroby, które umieszczono w odpowiednim medium, aby zachować żywotność komórek. Komórki wątroby (hepatocyty) w laboratorium zostały specjalnie przygotowane i wolno zamrożone w -80°C. Po rozmrożeniu hepatocyty poddano analizie na żywotność. Próbkę wykazującą żywotność powyżej 80% wykorzystano do przygotowania bibliotek ATAC-seq. Sekwencjonowanie bibliotek przeprowadzono w firmie zewnętrznej. Z kolei, z wykorzystaniem wyników RNA-seq, uzyskanych w 2020 roku przeprowadzono analizę wywołania wariantów przy pomocy narzędzia GATK v 4.1.9.

Wyniki:

Wstępna analiza po sekwencjonowaniu bibliotek ATAC-seq.

Po sekwencjonowaniu i przeprowadzeniu obróbki surowych danych zaobserwowano, że średnia wielkość insertu dla frakcji A (fragmenty otwartej chromatyny nienawinięte na nukleosomy) to 78 bp z kolei dla frakcji B 232 bp (fragmenty otwartej chromatyny nawinięte na jeden lub dwa nukleosomy) (Figura 1.).

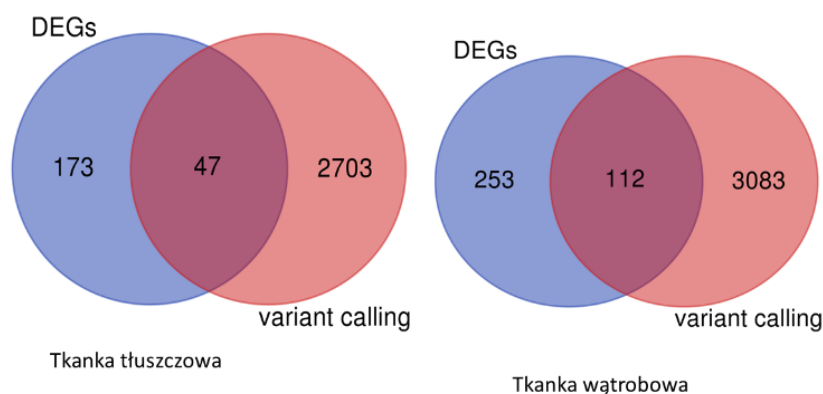
Figura 1. Wielkości insertów po sekwencjonowaniu biblioteki ATAC-seq dla frakcji A i B.



Analiza wywołania wariantów na danych RNA-seq uzyskanych po sekwencjonowaniu całego transkryptomu tkanki wątrobowej i tłuszczowej dla grup zróżnicowanych pod względem poziomu otyśczenia.

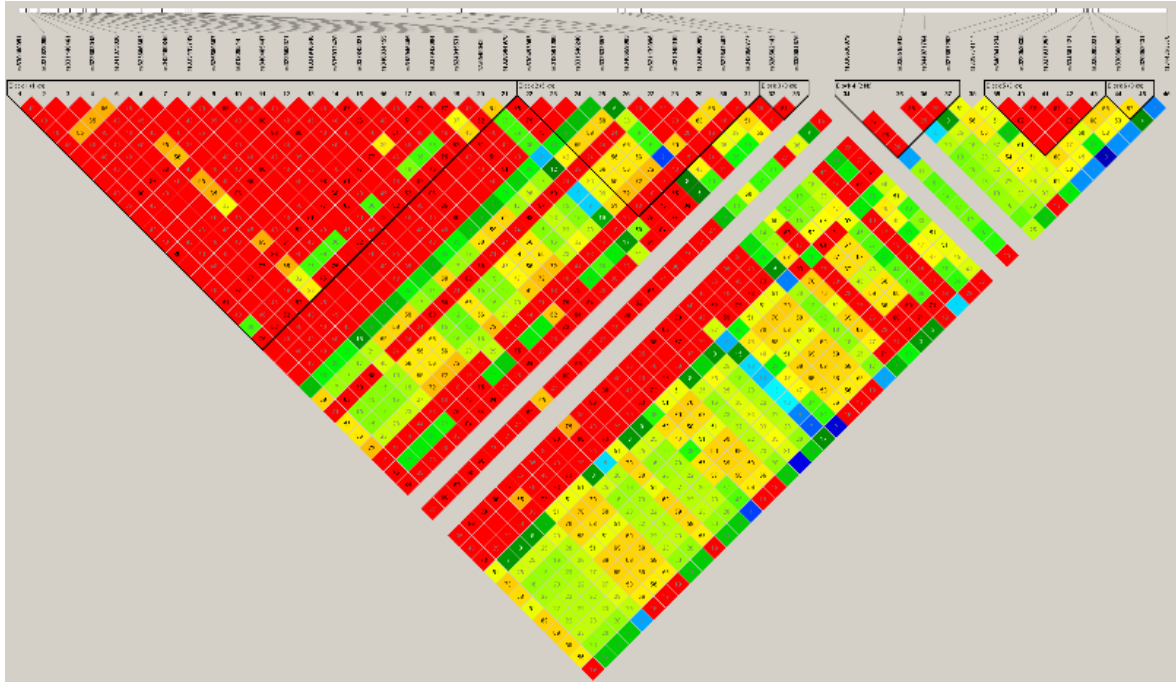
Po sekwencjonowaniu transkryptomu dla próbek wątroby oraz tłuszczu średnio otrzymano 62 276 008 surowych odczytów i po filtracji 61 480 178. Średnio 71% zostało zmapowane do eksonów dla genomu Sscrofa11.1 GCA_000003025.6. Na danych RNA-seq tkanki tłuszczowej oraz wątrobowej przeprowadzono analizę wywołania wariantów (*variant calling*). Analiza wywołania wariantów wykazała, że wśród genów ulegających ekspresji w wątrobie najistotniejsze zmiany polimorficzne względem testu χ^2 występowały w genach: MTUS1, PDGFRL, FGL1, nowym genie (ENSSSCG00000045843), PCM1, ASAH1, SMAD2, ANGPTL3 oraz DOCK7. Z kolei, w genach ulegających ekspresji w tkance tłuszczowej zmiany polimorficzne wykazujące istotnie różny rozkład genotypów pomiędzy badanymi grupami zostały zidentyfikowane w genach: BSCL2, UBXN1, UQCC3, ASPH i CLVS1. Natomiast analiza nałożenia genów o różnicowej ekspresji w tkance wątrobowej oraz tłuszczowej i genów charakteryzujących się obecnością wariantów polimorficznych istotnych względem testu χ^2 wskazała w tkance tłuszczowej 47 genów oraz w tkance wątrobowej 112 genów (Figura 2.).

Figura 2. Analiza nałożenia genów o różnicowej ekspresji (DEGs) w tkance tłuszczowej oraz wątrobowej i genów, w których test χ^2 wskazał istotny rozkład genotypów pomiędzy badanymi grupami świń.



Analiza wywołania wariantów wskazała gen FGL1 jako gen charakteryzujący się wieloma mutacjami ściśle związanymi z jednym z fenotypów czyli wykazującymi bardzo niskie p-Value w teście χ^2 . W sumie zidentyfikowano w tym genie 114 mutacji, głównie w regionie 3'UTR, ale także w intronach i egzonach (ciche mutacje). Analiza haplotypów oraz sprzężeń pomiędzy mutacjami genu FGL1 została przedstawiona na Figurze 3.

Figura 3. Blok analizy sprzężeń 54 mutacji SNP genu FGL1.

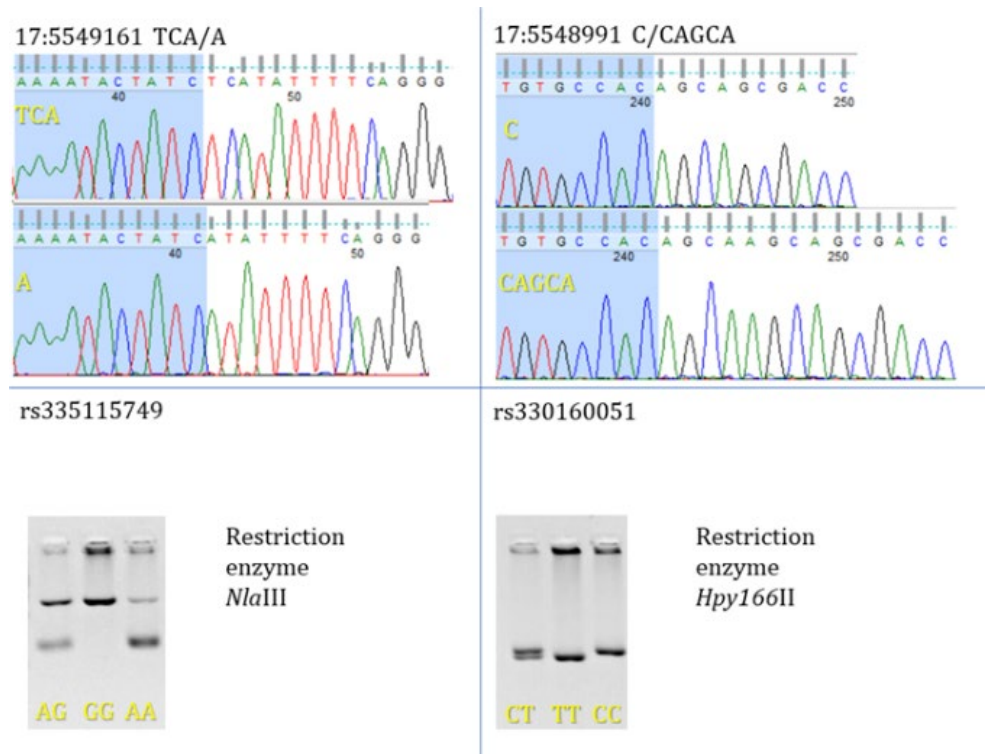


Spośród mutacji regionu 3'UTR cztery zostały wytypowane do analizy oceny wpływu na cechy fenotypowe świń, głównie związane z poziomem odtłuszczenia tuszy (SNP: rs340465447, rs330 493 983 and INDEL: NC_010459.5:g.5548991-5548992del and NC_010459.5:g. 554916 1insC AGCA) (Figura 3.) w rasie złotnicka biała. Nowe mutacje typu INDEL zostały złożone do publicznej bazy genów GenBank pod numerem akcesyjnym MW827172.

Analiza GLM, oceniająca wpływ mutacji genu FGL1 na cechy użytkowe świń.

Genotypowanie dwóch zmian polimorficznych w genie FGL1 przeprowadzono z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP (Figura 4). Analiza asocjacyjna badanych mutacji z cechami użytkowymi świń wykazała wpływ rs340465447 (G/A) i NC_010459.5:g.5548991-5548992del (TCA/A) na poziom IMF, oraz innych cech związanych z odkładaniem tłuszczu podskórnego. Loszki o genotypie AA charakteryzowały się wyższym 24%, 23%, 32% IMF, ABT i masą słoniny połędwicy, odpowiednio. Ocena efektu addytywnego wskazała, że zmiana A→G prowadzi do -0.24 cm ($p < 0.01$) ABT, +2.90 cm² ($p < 0.01$) powierzchni oka połędwicy, i +9dni ($p < 0.05$) dla dnia uboju. Z kolei, polimorfizm rs340465447 wpływał na zmianę w ilości dziennego przyjmowania paszy oraz pH połędwicy i szynki mierzonej po 24 h od uboju.

Figura 4. Sposoby detekcji czterech mutacji w regionie 3' UTR genu FGL1. 17:5549161 i 17:5548991 były identyfikowane z wykorzystaniem metody sekwencjonowania Sangera z kolei rs335115749 i rs330160051 z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP.



Mutacja NC_010459.5:g.5548991-5548992del (TCA/A) wpływała zarówno na cechy związane z odtuszczeniem jak i z mięsnością, jak masa szynki oraz polędwicy, procent mięsa w tuszy, powierzchnia oka polędwicy, masa wyrębów podstawowych, średnia grubość słoniny. Efekt dominacyjny NC_010459.5:g.5548991-5548992del (TCA/A) mutacji wskazał, że "zamiana" genotypu ins/del→ins/ins prowadzi do podwyższenia procentu mięsa w tuszy +2.04% ($p<0.01$), podwyższenia masy szynki +280 g ($p<0.05$) oraz zmniejszenia grubości słoniny w punkcie K1-0.32cm ($p<0.01$). Świnie o genotypie del/del względem tej mutacji były nieliczne, więc obliczenia statystyczne względem ich grupy nie miały dużej mocy statystycznej.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu:

W 2021 roku zsekwencjonowano biblioteki ATAC-seq i częściowo przetworzono uzyskane wyniki. Z kolei, w ramach 3. celu szczegółowego w oparciu o wyniki RNA-seq wątroby oraz tkanki tłuszczowej, przeprowadzono analizę wywołania wariantów (*variant calling*) typującą potencjalne markery związane z cechami odtuszczenia u świń. Wyniki uzyskane w ramach analizy ATAC-seq oraz analiza wywołania wariantów dla tkanki tłuszczowej zostaną opracowane i odpowiednio przygotowane do publikacji w następnym roku.

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

Cel zadania:

Zamierzeniem zadania jest analiza zmian epigenetycznych na poziomie metylomu oraz w poziomie ekspresji cząsteczek mikroRNA, i związanych z nimi zmianami w poziomie ekspresji genów, które mogą wynikać z zastosowanej diety we wczesnym okresie życia i suplementacji witaminy D. Wcześniejsze badania, przeprowadzone na grupie cieliczek wysokowydajnych ras mlecznych, dowiodły, że żywienie modeluje przebieg zmian anatomicznych gruczołu mlekowego. Pomiar anatomiczny potwierdził, że u cieliczek żywionych do woli wystąpił wzrost masy całego gruczołu mlekowego, tkanki mięsowej i zrębowej 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”.

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

Połączenie wyników porównawczej analizy profilu metylacji DNA w skali genomu z badaniami różnicowej ekspresji na poziomie transkryptomu i zmianami w profilu mikroRNA, może być interesujące pod względem ustalenia udziału określonych grup genów w molekularnych mechanizmach prowadzących do obserwowanych zmian w układzie odpornościowym i anatomicznym, wynikających z zastosowanej diety w okresie wczesnego wychowu i suplementacji witaminą D. Proponowane badania, w aspekcie zwierząt gospodarczych jak dotąd nie były realizowane na świecie. W przypadku zwierząt hodowlanych taka wiedza może przynieść wymierne korzyści ekonomiczne dzięki zastosowaniu odżywiania, stymulującego osiągnięcie prawidłowego rozwoju anatomicznego i sprzyjającego prawidłowemu funkcjonowaniu układu immunologicznego.

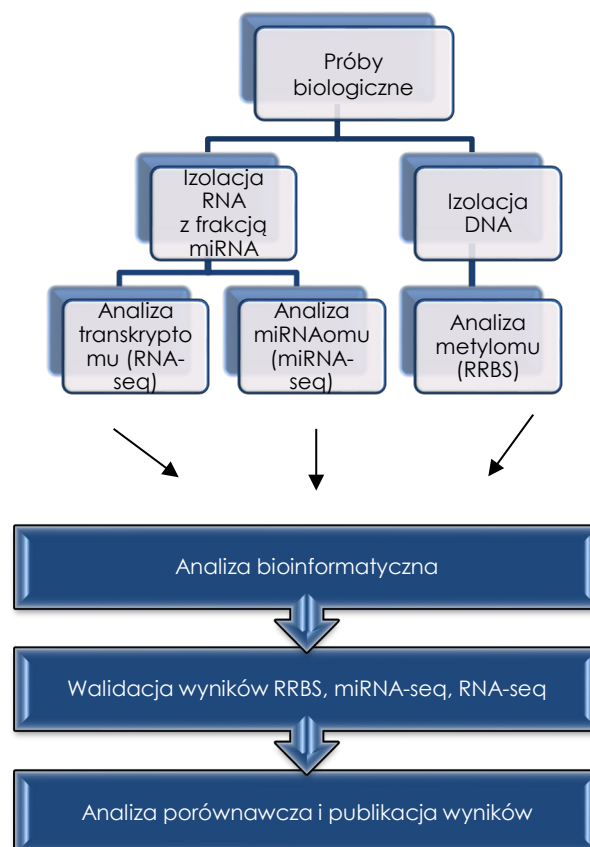
Założenia metodyczne:

W ramach zagadnienia są wykorzystane najnowsze metody analiz epigenetycznych, uwzględniające technikę sekwencjonowania następnej generacji NGS (RNA-seq, RRBS oraz miRNA-seq).

W pierwszej części badań wykorzystany zostanie materiał doświadczalny, zgromadzony przez prof. dr hab. Barbarę Niwińską, w ramach tematu pt. „Czynniki żywieniowe warunkujące wydajność i zdrowotność zwierząt przeżuujących.” Stanowią go tkanki pobrane od 18 zwierząt – cieliczki rasy polska holsztyńsko-fryzyjska w okresie wychowu pierwszych dwóch miesięcy życia. Wszystkie cieliczki do 14. dnia życia otrzymywały codzienne dawki paszy preparatu mleko-zastępczego, w ilościach pokrywających zapotrzebowanie. We wszystkich grupach cieliczki miały stały dostęp do paszy treściwej oraz wody.

Z kolei, w drugiej części badań wykorzystany zostanie materiał doświadczalny, zgromadzony przez prof. dr hab. Małgorzatę Świątkiewicz, w ramach tematu pt. „Wpływ różnych dawek oraz form witaminy D w paszy na wskaźniki reprodukcyjne loch i wyniki odchovu prosiąt oraz jakość mięsa tuczników” w poprzednich latach, i przechowywany jest w laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt. Stanowią go tkanki pobrane od 24 świń (potomstwo urodzone i odchowywane na fermie, z loch pbz x wbp pokrytych knurem (duroc x pietrain), suplementowanych różnymi dawkami i formami witaminy D3.

Wykres 1. Schemat układu doświadczenia.



Syntetyczny opis wyników zadania:

W bieżącym roku, z 48 prób biologicznych (16 próbek parenchymy, 16 próbek tkanki tłuszczowej oraz 16 próbek wątroby) pobranych od cieliczek rasy polska holsztyńsko-fryzyjska, przygotowano 48 bibliotek cDNA z zastosowaniem kitu Swift Rapid RNA Library Kit (Biosciences). Ocenę jakościową uzyskanych bibliotek cDNA przeprowadzono z użyciem aparatu TapeStation, natomiast ocenę ilościową wykonano metodą fluorymetryczną na aparacie Qubit. Biblioteki doprowadzono do koncentracji 10 nM i połączono w jedną pulę. Przygotowane biblioteki cDNA zsekwencjonowano na aparacie NovaSeq (Illumina), stosując opcję podwójnego odczytu o długości 150 nukleotydów. Przygotowane w ubiegłym roku biblioteki miRNA i RRBS zsekwencjonowano z dodatkiem kontrolnego DNA (PhiX) na aparacie Nextseq 550 (Illumina), stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 75 nukleotydów. Parametry sekwencjonowania uwzględniały automatyczne mapowanie odczytów pochodzących z DNA wirusa PhiX, w celu kontroli jakości otrzymywanych wyników w czasie rzeczywistym.

W drugim etapie prowadzonych badań dotyczących analiz transkryptomu tkanki płuc oraz tkanki mięśniowej świń przyjmujących różne dawki cholekalcyferolu i 25(OH)D, w bieżącym roku przeprowadzono sekwencjonowanie NGS bibliotek cDNA. W tym celu przygotowano biblioteki cDNA z 34 próbek RNA z tkanki mięśnia oraz 51 próbek tkanki płuc, wykorzystując zestaw QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen). Przygotowano również 39 bibliotek miRNA z tkanki mięśniowej świń używając zestawu NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (BioLabs). Ocenę jakościową uzyskanych bibliotek cDNA przeprowadzono z użyciem aparatu TapeStation, natomiast ocenę ilościową wykonano metodą fluorymetryczną na aparacie Qubit. Sekwencjonowanie bibliotek przeprowadzono na urządzeniu NextSeq550 (Illumina), stosując opcję pojedynczego odczytu o długości 75 nukleotydów. We wszystkich przypadkach sekwencjonowanie przebiegło prawidłowo.

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 i wiarygodne testy, oparte na metodach biologii molekularnej, ciągle rośnie. Ich opracowanie wymaga badań, a komercjalizacja walidacji.

Cel zadania:

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*) oraz 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 częściowo skolekcjonowany. Materiał genetyczny pozyskiwany był głównie metodami izolacji opartymi o kolumnienki. W projekcie wykorzystano lub planuje się wykorzystać, takie techniki jak: PCR, sekwencjonowanie, RFLP, genotypowanie na płytках OpenArray, dyskryminacja *alleli*, analiza markerów mikrosatelitarnych, analiza ekspresji genów, wyprowadzanie linii komórkowych, hodowle komórkowe.

Przeprowadzono próbę rozróżnienia świni od dzika na podstawie polimorfizmu SNP w genie *NR6A1* (748 nt w sekwencji AB248749) przy użyciu techniki Real Time PCR ze specyficznymi sondami. Zsekwencjonowano fragment genu *NR6A1*, zawierającego miejsce gdzie położony jest SNP g.748C>T. Na podstawie przeprowadzonych wstępnych badań stwierdzono, że jest on efektywnym markerem pozwalającym na rozróżnienie świń i dzików. Aby wzmocnić efekt metody i nie polegać wyłącznie na jednym markerze, wybrano geny i regiony mtDNA, które wg różnych źródeł literaturowych i baz (np. Ensembl, NCBI) różnią się u świń i dzików. Wykorzystano 60 różnych zestawów sond TaqMan MGB i starterów do wybranych genów (m.in. *NR6A1*) na płytках OpenArray do przesiewowego testowania populacji w zakresie wybranych markerów. Analizie poddano dotychczas 133 świnię i 102 dziki, i na tej podstawie wytypowano kolejne markery kandydujące do panelu różnicującego te gatunki, m.in. SNPy w genach *ACER1*, *NR6A1* (Rycina 1.), *SAFB2*, *OPRK1*, *IcnRNA*, *SEMA3D*, *PAPPA2* i *GHRL*. Badania są kontynuowane.

Z kleszczy pozyskanych od koni, psów oraz kotów wyizolowano DNA. Wykonano test metody badawczej detekcji fragmentu genu *FLA* w układzie nested PCR. Nie udało się pozyskać kleszczy od owiec i bydła. Optymalizacja metody badawczej detekcji fragmentu genu *FLA* w układzie nested PCR nie powiodła się, więc wytypowano inne metody badawcze. Zaprojektowano i przetestowano sondy TaqMan MGB do dwóch genów specyficznych dla rodzaju *Borrelia* (*FLA*, *OSPA*), korzystając z danych literaturowych. Zakupiono i rozpoczęto testowanie dwóch komercyjnych zestawów odczynników do wykrywania boreliozy.

Wytypowane fragmenty genomu konia poddano testom molekularnym w kierunku badania płci. Przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentów genu *SRY* oraz *Amel*. Analizy fragmentu dla *SRY* nie dały zadowalających rezultatów, wymagają analiz bioinformatycznych oraz szczegółowych analiz laboratoryjnych. Dla dwóch fragmentów *Amel* uzyskano produkty sekwencjonowania, dla których wyniki (warianty *alleliczne*) są zgodne z płcią wynikającą z dokumentacji hodowlanej.

Przeprowadzono analizy regionu *MC1R* koniowatych (koń domowy oraz koń Przewalskiego). Uzyskane wyniki są zgodne z opisem umaszczenia w przypadku konia domowego. Dla koni Przewalskiego określono warianty genu względem prób kontrolnych pozytywnych, pozyskanych z testu międzynarodowego. Nie zidentyfikowano prób o niekorzystnym wariacie dla tego gatunku – dla wszystkich koni Przewalskiego uzyskano wariant dominujący C. W zakresie umaszczenia zsekwencjonowano także fragmenty genów *ASIP*, *PMEL17*, *MATP*, *KIT*. Wyniki poddano analizie za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Dla genu *ASIP*, który reguluje gen *MC1R*, zidentyfikowano wariant dominujący, dla prób osobników zadeklarowanych jako gniade, natomiast osobniki opisane jako kare miały wariant recesywny (indel). Zidentyfikowano też mutacje dla genu *MATP*, niemające jednak wpływu na fenotyp (rs1149941869 (synonymous variant) oraz rs395963939 (intron variant)).

Zsekwencjonowano region kodujący i fragment regionu promotora genu *MC1R* owiec ras: merynos polski w starym typie, wrzosówka, owca romanowska, polska owca górska barwna, merynos barwny, czarnogłówka. Zanalizowano wyniki. W badanej sekwencji znaleziono 8 różnych miejsc polimorficznych, z których dwa były zlokalizowane w regionie flankującym gen od strony 5', a trzy były to mutacje zmiany sensu. Dwie ze znalezionych mutacji były

nowe – nie znaleziono o nich żadnych wzmianek w literaturze. Mutacje, które według danych literaturowych odpowiadają za dominujący kolor czarny u niektórych ras owiec, były obecne wyłącznie u polskiej owcy górskiej barwnej. Na podstawie uzyskanych wyników SNP znaleziono cztery różne haplotypy. Haplotyp C, odpowiadający dominującemu allelowi E^D, wydaje się być powiązany z brązowym kolorem rasy POGB. Rozpoczęto analizy genów *ASIP* i *TYRP*.

Wytypowano fragmenty genomu konia, które będą podlegały testom molekularnym pod względem diagnostyki chorób spichrzeniowych MH (hipertermia złośliwa) oraz PSSM. Zanalizowano fragmenty sekwencji genów *GYS1* (PSSM) oraz *RYR1* (MH). Zidentyfikowano mutacje w pojedynczych próbkach (Rycina 2.).

Pozyskano materiał od kilkunastu łosi dzięki współpracy z PIWet PIB Puławy. Ze względu na fakt, iż metoda opracowana w zeszłym roku dla jeleni i saren niezbyt dobrze działała u łosi, zamówiono startery specyficzne wyłącznie dla tego gatunku. Przetestowano wiele różnych par starterów w celu znalezienia optymalnego zestawu. Ostatecznie opracowano, przetestowano i zweryfikowano metodę analizy genu *PRNP* u łosi. Zsekwencjonowano fragment genu *PRNP* łosi i przeprowadzono analizę wyników dla wszystkich pozyskanych próbek. Sekwencje, poza jedną, były monomorficzne, jednak różniły się w kilku loci od sekwencji referencyjnej z GenBanku. Sekwencja *PRNP* jednego z łosi odbiegała znacząco od pozostałych – znaleziono wiele miejsc polimorficznych, w tym prawdopodobnie mutację typu indel. Wymaga to dalszej weryfikacji.

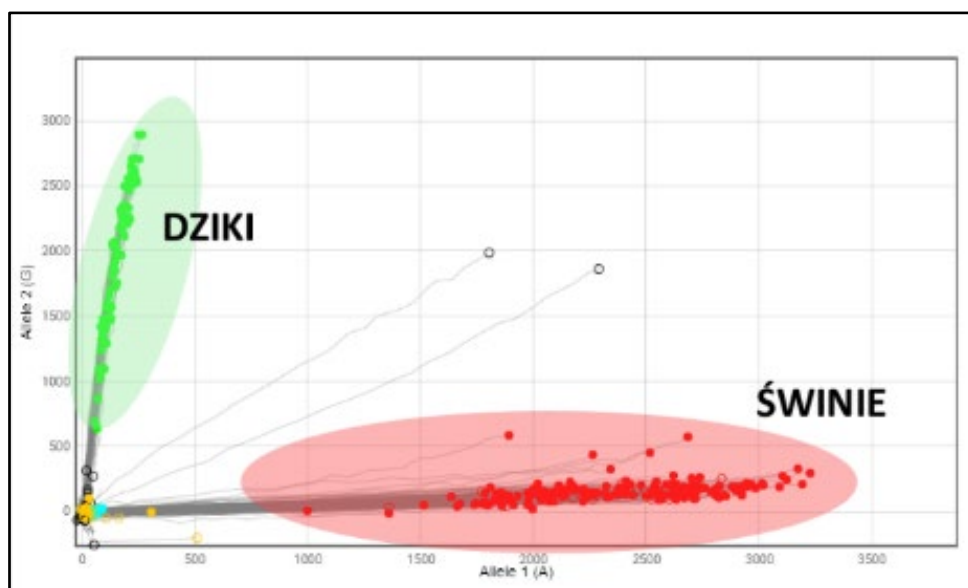
Dla indukowanej ekspresji sensorów cyklu podziałowego w komórkach wykorzystany został system ES-FUCCI, opracowany przez firmę Sladitschek i wsp. 2015, wykorzystujący działanie bikierunkowego primera PGK z sześcioma elementami „enchancer”, który indukuje ekspresję białek fuzyjnych: citrine-geminin oraz mCherry-cdt1. Dzięki inhibicji zwrotnej pomiędzy APCCdh1 a SCFSkp2 białko geminin akumuluje się w fazach: S, G2, M; białko Cdt1 w fazie G1 oraz spoczynkowej G0. Pomiędzy cyklami G1 a S następuje nałożenie kolorów. Komórki nowotworowe w stanie konfluencji ok. 70% poddano lipofekcji celem wprowadzenia do komórek plazmidu ES-FUCCI – z wykorzystaniem lipidu kationowego Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher). Komórki CaCo-2 (gruczolakorak jelita grubego; Rycina 3.), HeLa oraz HBT-35 (oba rak płaskonabłonkowy szyjki macicy) posiano i hodowano w naczyniach hodowlanych do momentu uzyskania konfluencji około 70%, w medium DMEM z dodatkiem 10% FBS i antybiotyku. Przeprowadzono selekcję antybiotykową (hygromycyna B) w celu uzyskania jedynie komórek, które pozytywnie przeszły proces transfekcji. Pierwotne fibroblasty w stanie konfluencji ok. 70% poddano lipofekcji z wykorzystaniem lipidu kationowego Lipofectamine 3000 (ThermoFisher). Przeprowadzono selekcję antybiotykową – przy zastosowaniu hygromycyny B.

Celem opracowania technik synchronizacji komórek wykorzystano inhibitor kinazy CDK1 – RO3306. Komórki rosnące w naczyniach hodowlanych w stanie konfluencji około 50-60% zostały poddane dwuetapowej procedurze blokowania w celu synchronizacji podziałów komórkowych. Pierwszym etapem procedury była blokada w fazie G1/S (single thymidine block), a następnie blokada w fazie G2/M przy użyciu inhibitora RO3306 hamującego kinazę CDK1. Synchronizacja przyniosła poprawę otrzymywanej w procedurach liczby płytek metafazowych o średnio 30%, co ze względu na charakter stosowanych linii komórkowych, uznano za wynik akceptowalny. Zgodnie z harmonogramem, w 2022 roku, planowane są dalsze eksperymenty podnoszące jeszcze wydajność metody.

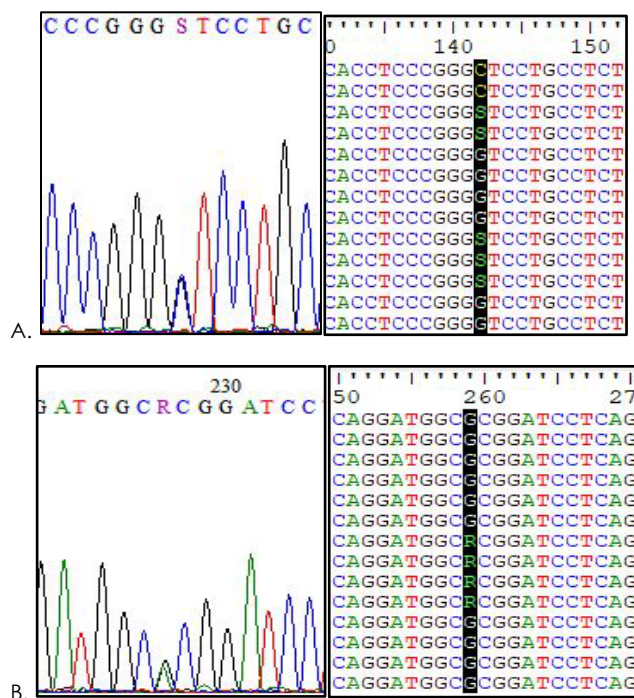
Zsekwencjonowano region *d-loop* 235 osobników obu płci (alpak i lam) i gen *DBY* – 90 osobnikom płci wyłącznie męskiej. W regionie *d-loop* wygenerowano 34 haplotypy, z których 6 zebrało wyłącznie osobniki z gatunku lama, 3 były mieszane, a 25 należało do alpak. 34 haplotypy zbankowano w bazie GenBank: OL456726-OL456762. W regionie *d-loop* nie znaleziono markerów diagnostycznych, które mogłyby posłużyć do identyfikacji hybryd alpaka × lama. Region *d-loop* wykazał znacznie większą różnorodność genetyczną niż *DBY*. W genie *DBY*

wygenerowano jedynie 2 haplotypy: jeden dla alpak i jeden dla lam. Dodatkowo znaleziono 4 miejsca w sekwencji, które mogą posłużyć jako markery diagnostyczne do genetycznego rozróżniania alpak, lam i hybryd płci męskiej. Na podstawie otrzymanych sekwencji została również wykonana analiza filogenetyczna i klastrowanie bayesowskie (Rycina 4.). Region *d-loop* wykazał wysoką introgresję mtDNA między alpakami i lamami w przeciwieństwie do *DBY* na chromosomie Y. Niestety użycie *d-loop* i *DBY* nie pozwala na identyfikację konkretnych osobników hybrydowych. Badania w ramach wszystkich celów szczegółowych są kontynuowane.

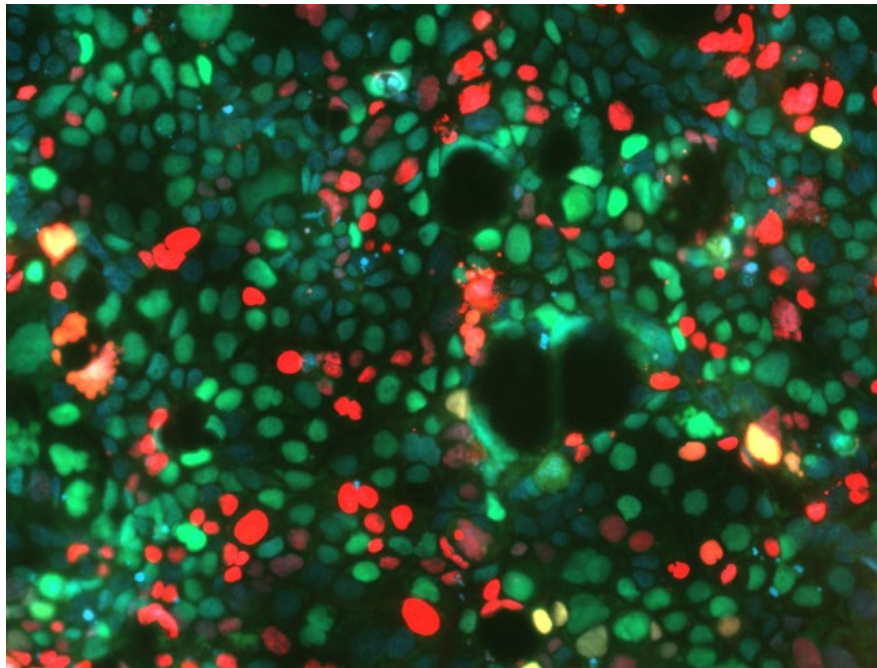
Rycina 1. Genotypowanie real-time PCR na płycie OpenArray genu NR6A1.



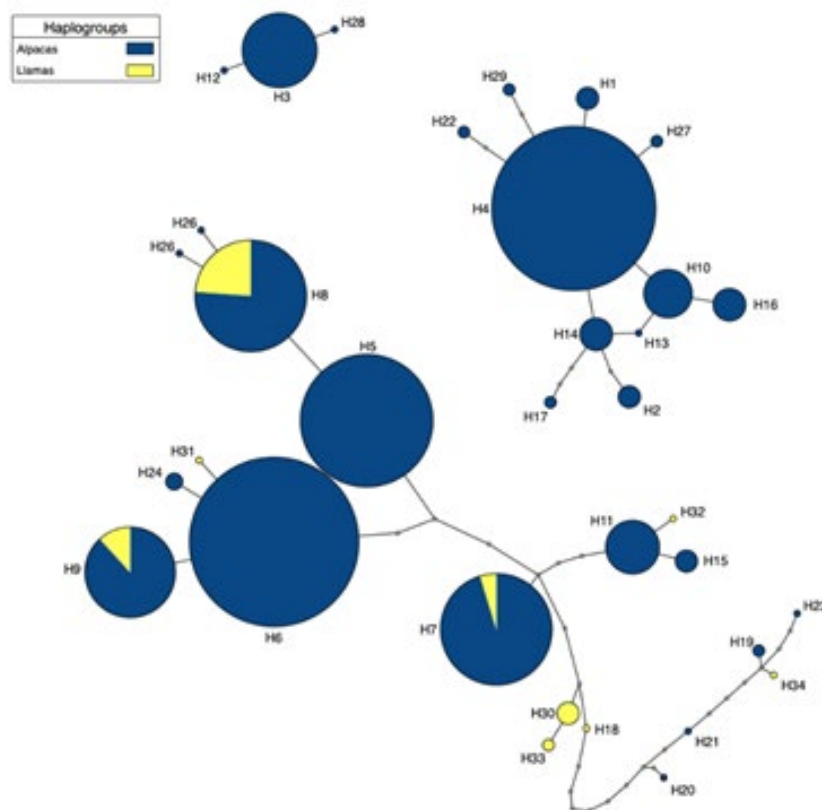
Rycina 2. Analiza porównawcza fragmentów sekwencji genów *Gys1* (A) i *Ryr1* (B) koni wraz z chromatogramami potwierdzającymi obecność polimorfizmu; czarnym kolorem podświetlono miejsca występowania polimorfizmu (S – heterozygoty G/C; R – heterozygoty A/G).



Rycina 3. Komórki CaCo2 poddane transfekcji plazmidem ES-FUCCI, a następnie poddane selekcji antybiotykowej; kolor czerwony – jądra komórkowe, oznaczające wejście komórki w cykl G1 bądź G0; kolor zielony – jądra komórkowe w fazach S, G2 oraz M; kolor żółty – jądra komórkowe w trakcie przejścia między fazą G1 a S.



Rycina 4. Rozkład haplotypów regionu d-loop alpak i lam ze wszystkich 235 osobników.



Zadanie 01-18-08-11

Wykorzystanie genetyki molekularnej jako nowoczesnego narzędzia w hodowli koni.

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

Cel zadania:

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

Założenia metodyczne:

W projekcie planuje się zbadanie podłoża genetycznego wybranych jednostek chorobowych oraz markerów genetycznych związanych z osiąganiem 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/objawami chorobowymi. W przypadku markerów chorób genetycznych uzyskane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy i w których rasach istnieje konieczność monitoringu frekwencji niekorzystnych *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:

W 2021 roku opracowano ankietę dla hodowców, zawierającą szczegółowe dane o chorobach badanego zwierzęcia wraz z informacjami o innych potencjalnych chorobach genetycznych występujących u danego osobnika, bądź to w jego rodzinie.

Zebrano, opisano i przyjęto do bazy 1016 próbek materiału biologicznego (przystanego przez hodowców), które reprezentowały następujące rasy koni: konie małopolskie, ślązaki, kuce, kłusaki, konie arabskie, selle francais, konie zimnokrwiste. Ze zgromadzonego materiału wyizolowano DNA i dla wybranych ras wykonano genotypowe pod kątem występowania wariantów genetycznych dla abiotrofii mózdzku (CA), ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID), Polysaccharide Storage Myopathy (PSSM), syndromu słabego żrebięcia (WFFS).

Opracowano i zwalidowano metodę detekcji dla:

- genetycznego wodogłowania (dedykowana dla koni fryzyjskich),
- karłowatości (dedykowana dla koni fryzyjskich),
- genetycznej podstawy typu chodu – gen DMRT3 ,
- malformacji kręgów szyjnych o podłożu genetycznym – OAAM.

W ramach tematu nawiązano współpracę naukową z Uniwersytetem w Bejaia w Algierii (Department of Environment and Biological Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Bejaia 06000, Algeria), dotyczącą wymiany próbek materiału genetycznego od

koni arabskich, a także koni innych ras. Jak dotąd, otrzymane próbki przeanalizowano pod kątem obecności mutacji chorób genetycznych – CA, LFS, SCID.

Badania pozwoliły na identyfikację pięciu nosicieli abiotrofi mózdzku spośród 177 badanych koni reprezentujących trzy rasy (koni arabskie, koni berberyjskich – Barb horses oraz koni Arabian-Barb) (Tabela 1.). Dodatkowo, w badanej populacji zidentyfikowano 10 koni będących nosicielami 5-nukleotydowej delecji w genie *PRKDC* związanej z występowaniem ciężkiego złożonego niedoboru odporności SCID (Rycina 1.).

Rycina 1. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu fragmentu genu *PRKDC*, zawierający miejsce delecji motywu TCTCA; próbka pierwsza – osobnik bez mutacji; próbka druga – nosiciel mutacji.

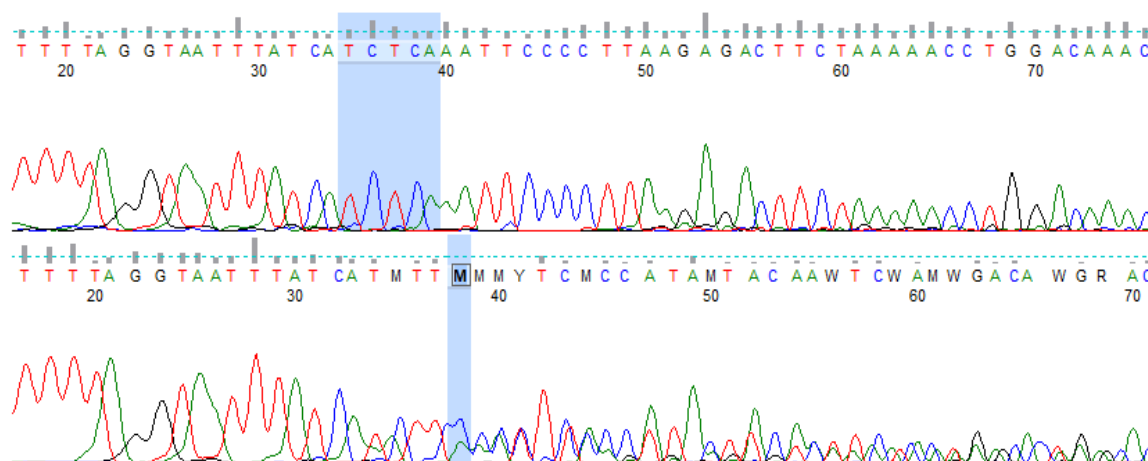


Tabela. 1. Frekwencja genotypów i alleli polimorfizmu rs397160943 SNP w genie *TOE1* związanym z występowaniem amiotrofii mózdzku – CA (Cerebellar Abiotrophy).

	Genotypy (N/%)			Allele	
Rasa	CC	CT	TT	C	T
Barb	41	-	-	1	
	100%				
Arab Barb	56	-	-	1	
	100%				
Arabian	75	5	-	0,94	0,06
	93,7%	6,3%			
Suma	172	5	-	0,99	0,01
	97,2%	2,8%			

Zadanie 01-18-09-21

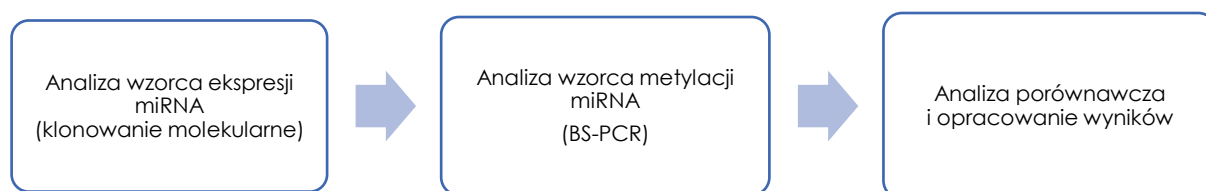
Molekularne aspekty epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji wybranych miRNA w tkance mózgowej świni.

kierownik zadania: dr inż. Klaudia Pawlina-Tyszko

Cel zadania:

W dotychczasowych badaniach własnych zidentyfikowaliśmy potencjalnie imprintingowane mikroRNA, dla których brak jest dostępnych danych literaturowych mogących potwierdzać uzyskany wynik. Dlatego też celem niniejszych badań jest przeprowadzenie dodatkowych analiz, a co za tym idzie określenie wzorca ekspresji (imprinting czy ekspresja zależna od *allelu*) oraz metylacji dziewięciu wybranych na podstawie wcześniejszych badań mikroRNA (miR-15b, -19b, -20b, -23a, -130a, -146b, -326, -378-2, -2483), co pozwala potwierdzić lub wykluczyć wcześniejsze wyniki. Ponadto, uzyskane wyniki umożliwiają dogłębną charakterystykę tych mikroRNA w tkance mózgowej świni pod kątem mechanizmów ich ekspresji i jej regulacji.

Materiał i metody:



Analiza wzorca ekspresji miRNA :

Na wstępie, RNA tkanki mózgowej świń, przechowywane w Laboratorium Genomiki, zostanie poddane odwrotnej transkrypcji, a następnie zostaną zaprojektowane startery umożliwiające amplifikację badanych sekwencji. Reakcje PCR i rozdział ich produktów na żelu agarozowym pozwolą ustalić czy możliwe jest uzyskanie specyficznych produktów amplifikacji o wysokiej jakości. Takie produkty zostaną następnie wklonowane do wektora plazmidowego i namnożone z wykorzystaniem zestawu TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning (Thermo Fisher). Wyizolowane plazmidowe DNA zostanie poddane amplifikacji, oczyszczone, a następnie zsekwencjonowane z zastosowaniem metody Sanger (około 40 klonów PCR), w celu ustalenia ilościowych proporcji poszczególnych klonów. Uzyskane chromatogramy przeanalizowane będą w aplikacji FinchTV.

Analiza wzorca metylacji miRNA:

W drugim etapie określony zostanie profil metylacji wybranych genów mikroRNA, dla których uprzednio zostanie zidentyfikowany imprinting. Próbkę DNA badanych świń, przechowywane w Laboratorium Genomiki, zostaną poddane konwersji bisulfitowej z zastosowaniem odczynników EpiTect Bisulfite Kit firmy Qiagen. Następnie zostaną opracowane warunki reakcji BS-PCR, a analizowane DNA będzie zamplifikowane starterami zaprojektowanymi w regionach flankujących wyspy CpG, zlokalizowanych powyżej badanych genów miRNA. Jakość produktów reakcji BS-PCR poddana zostanie ocenie w żelu agarozowym. Oczyszczone produkty zostaną zsekwencjonowane metodą Sanger z wykorzystaniem sekwenatora kapilarnego (Applied Biosystems). Analiza sekwencji produktów BS-PCR zostanie przeprowadzona w aplikacji FinchTV.

oraz w edytorze sekwencji GeneDoc. Jej celem będzie analiza metylacji lub jej braku w sekwencji DNA, polegająca na poszukiwaniu miejsc metylowanych cytozyn (obecność cytozyn w sekwencji DNA poddanego konwersji, w odróżnieniu od występowania tymin w tych samych pozycjach nukleotydów cząsteczki DNA przed konwersją) oraz określenie poziomu metylacji w badanych fragmentach DNA (% zmetylowanych cytozyn w odniesieniu do całkowitej liczby wysp CpG w badanym fragmencie DNA). Po analizie chromatogramów sekwencje będą porównywane z sekwencją referencyjną genomu świni oraz zwizualizowane z wykorzystaniem programu BISMA.

Analiza zbiorcza i opracowanie wyników:

Wyniki danych sekwencyjnych klonowania molekularnego zostaną przeanalizowane z wykorzystaniem programu FinchTV, co pozwoli ilościowo określić udział ekspresji z poszczególnych *alleli*, a tym samym dostarczy informacji o wzorcu ekspresji badanych sekwencji miRNA. Dzięki temu możliwe będzie ustalenie czy badane miRNA podlegają imprintingowi genetycznemu, czy może ekspresji zależnej od *allelu*. Wyniki z badania metylacji zostaną poddane analizie przy użyciu programów SEQUENCHER, FinchTV i GeneDoc, co umożliwi identyfikację sekwencji o odmiennym profilu metylacji DNA. Schematyczny profil metylacji DNA zostanie zobrazowany w programie BISMA. Pozwoli to określić, czy w przypadku zidentyfikowanych sekwencji miRNA ulegających imprintingowi, metylacja może być odpowiedzialnym za to mechanizmem. Uzyskane wyniki zostaną opracowane w formie publikacji naukowych i doniesień na konferencje.

Uzyskane wyniki:

Materiał doświadczalny stanowią próbki DNA oraz RNA wyizolowane z krwi oraz tkanki mózgu 21 świń linii 990, w ramach realizacji poprzednich tematów badawczych oraz grantu NCN prowadzonych przez pracowników Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt IZ PIB. Materiał przechowywany jest w Laboratorium Genomiki Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt IZ PIB.

W bieżącym roku sprawozdawczym, RNA tkanki mózgowej poddano reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z protokołem producenta. 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. Przeprowadzono reakcje PCR z wykorzystaniem wysoce specyficznej polimerazy HotStart Taq (Qiagen) mające na celu dobór warunków reakcji, takich jak temperatura i liczba cykli. Obecność produktów zweryfikowano stosując elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Dla miRNA-20b oraz miRNA-326 nie udało się dobrać warunków reakcji pozwalających na uzyskanie specyficznych produktów, w związku z tym dla tych mikroRNA zaprojektowano nowe startery, które przetestowano w analogiczny sposób. W rezultacie uzyskano produkty specyficzne dla każdej pary starterów. Następnie, przeprowadzono właściwy PCR w celu amplifikacji wybranych fragmentów w badanych próbkach. Ich obecność i specyficzność zweryfikowano w 2% żelu agarozowym. Uzyskane produkty oczyszczono z niezwiązanych nukleotydów z wykorzystaniem zestawu MinElute PCR Purification kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta oraz rozcieńczyło do dalszych procedur.

W następnym etapie zostanie przeprowadzone klonowanie molekularne oraz analiza wzorca metylacji badanych mikroRNA.

Zadanie 04-18-06-21

Porównawcza analiza programów do identyfikacji sekwencji mikroRNA w oparciu o wyniki sekwencjonowania następnej generacji.

kierownik zadania: dr inż. Klaudia Pawlina-Tyszko

Cel zadania:

Celem niniejszych badań jest porównawcza analiza bioinformatycznych programów do identyfikacji sekwencji mikroRNA na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania następnej generacji oraz jej empiryczna walidacja. W efekcie wybrany zostanie program najlepszy do tego typu analiz i typu materiału, który jest wykorzystywany w eksperymentach prowadzonych przez Instytut czyli materiał zwierzęcy.

Materiał i metody:

1. Porównawcza analiza bioinformatyczna

W pierwszym etapie badań wyniki sekwencjonowania następnej generacji bibliotek mikroRNA, uzyskane w ramach poprzednich projektów badawczych, przeanalizowano pod kątem jakości w celu wyboru najlepszych, najbardziej reprezentatywnych próbek z wykorzystaniem programu FastQC. Następnie, opierając się na bazie dostępnych programów do analizy mikroRNA – Tools4miRs – wytypowano trzy najpowszechniej stosowane programy o największym uznaniu w literaturze światowej wg liczby ich cytowań. Analizę miRNA przeprowadzono stosując następujące parametry: minimalna liczba odczytów – 2; mapowanie wielokrotne – 10; maksymalna liczba niedopasowań – 1; minimalna długość sekwencji – 17 nt; maksymalna długość sekwencji 25 nt. Mapowanie przeprowadzono z wykorzystaniem najnowszej wersji bazy referencyjnej sekwencji mikroRNA – miRBase 22.1. Uzyskane wyniki porównano pod względem m.in. liczby zidentyfikowanych, znanych mikroRNA, liczby zidentyfikowanych nowych mikroRNA, ich klasyfikacji, czasu wykonywania obliczeń i ich wymagań sprzętowych. Spośród zidentyfikowanych mikroRNA wybrano 21 do dalszej walidacji z wykorzystaniem metody qRT-PCR w kolejnym etapie.

2. Analiza ekspresji mikroRNA z wykorzystaniem metody qRT-PCR

Wybrane w pierwszym etapie badań próbki RNA wraz z frakcją miRNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odczynników miRCURY LNA RT kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta. PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) został przeprowadzony z wykorzystaniem zestawu miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen) oraz komercyjnie dostępnych jak i syntetyzowanych na zamówienie starterów specyficznych dla wybranych mikroRNA (miRCURY LNA miRNA PCR Assay; Qiagen) wg załączonego protokołu. Każdą reakcję przeprowadzono w dwóch powtórzeniach na urządzeniu Quant Studio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific). Dla każdej pary starterów uwzględniono kontrolę negatywną bez dodatku matrycy oraz przeprowadzono analizę krzywej topnienia (tzw. melt curve) w celu potwierdzenia specyficzności zastosowanych starterów. W celu potwierdzenia prawidłowych wydajności prowadzonych reakcji zastosowano metodę krzywej standardowej dla każdej pary starterów. Jako kontrole endogenne do normalizacji ekspresji wybrano U6 snRNA oraz 5S rRNA, rutynowo stosowane w przypadku mikroRNA. Ponadto, dla każdej próbki uwzględniono dodatkową kontrolę negatywną przeprowadzając reakcję ze starterami specyficznymi dla cel-miR-39-3p, który nie jest

identyfikowany u ssaków, w celu dodatkowego potwierdzenia prawidłowego działania wybranego zestawu do analizy ekspresji mikroRNA oraz zastosowanych starterów. Uzyskane wyniki przeanalizowano z zastosowaniem metody obliczeniowej $\Delta\Delta C_t$ w celu określenia relatywnego w stosunku do kontroli endogennej poziomu ekspresji.

Wyniki:

Wyniki sekwencjonowania następnej generacji bibliotek mikroRNA, uzyskane w ramach poprzednich projektów badawczych, przeanalizowano pod kątem jakości i wybrano łącznie 30 próbek o najwyższej jakości, pochodzących z tkanek konia (10 próbek), świni (10 próbek) oraz krowy (10 próbek). Z wykorzystaniem bazy dostępnych programów do analizy mikroRNA – Tools4miRs – wybrano trzy najczęściej stosowane programy: miRDeep2, sRNAtoolbox-sRNA bench, dawniej miRanalyzer, UEA sRNA Workbench.

Programy te różnią się interfejsem oraz wymogiem zaawansowania użytkownika. sRNAtoolbox-sRNA bench jest programem dostępnym on-line, a analiza z jego wykorzystaniem nie wymaga dużej wiedzy informatycznej i trwa kilka minut dla jednej próbki. W przypadku UEA sRNA Workbench konieczne jest pobranie i uruchomienie programu na komputerze, jednak wymagana jest niewielka wiedza z zakresu informatyki i pewna wiedza z zakresu analiz mikroRNA i ich charakterystyki; sama analiza zajmuje kilkanaście minut na próbkę. miRDeep2 obsługiwany jest z poziomu konsoli CMD, co wymaga już pewnego opanowania i wiedzy informatycznej oraz bioinformatycznej. Analiza trwa średnio kilkadziesiąt minut na próbkę.

Wytypowane programy identyfikują podobną liczbę znanych mikroRNA na próbkę (średnio ~200 UEA sRNA Workbench, ~230 miRDeep2 oraz ~270 sRNAtoolbox-sRNAbench). Znaczące różnice zaobserwowano natomiast w liczbie potencjalnie nowych sekwencji. Program sRNAtoolbox-sRNAbench średnio na próbkę identyfikował 2 nowe miRNA, UEA sRNA Workbench około 40, podczas gdy miRDeep2 ~400. Znalazło to również odzwierciedlenie w liczbie identyfikowanych niepowtarzalnych mikroRNA dla wszystkich badanych próbek. Mianowicie, program sRNAbench zidentyfikował najwięcej znanych mikroRNA (1305), podczas gdy program UEA sRNA Workbench najmniej (818). W przypadku nowych mikroRNA, najwięcej zidentyfikował program miRDeep2 (2998) a najmniej sRNAbench (54). Programy różniły się także liczbą zidentyfikowanych unikatowych sekwencji, która wahała się w przypadku znanych mikroRNA od 26 (UEA sRNA Workbench) do 134 (sRNAbench). Dla nowych mikroRNA wartości te oscylowały pomiędzy 39 dla sRNA a 2825 dla miRDeep2.

Do dalszej walidacji eksperymentalnej wybrano 21 mikroRNA, znanych jak i nowych. W związku ze znaczącymi różnicami w liczbie zidentyfikowanych mikroRNA między poszczególnymi programami wybór mikroRNA podyktowany był próbą jak najlepszego odwzorowania zaobserwowanych proporcji. Dlatego też, dla programu miRDeep2 wybrano 11 miRNA, w tym 4 znane i 7 nowych, jako że program ten zidentyfikował najwięcej nowych sekwencji spośród trzech analizowanych programów. Dla sRNAbench wybrano 7 miRNA do walidacji, w tym 5 znanych i 2 nowe, gdyż program ten zidentyfikował najwięcej znanych mikroRNA. Natomiast dla UEA sRNA Workbench wybrano 7 mikroRNA, w tym 3 znane i 4 nowe, jako że program ten zidentyfikował podobne liczby znanych i nowych mikroRNA, pośrednie w porównaniu do pozostałych programów.

Dla wszystkich badanych starterów uzyskano prawidłowe wydajności reakcji mieszczące się w przedziale 90-110%, prócz bta-miR-574, w związku z czym został on wykluczony z dalszych analiz. Przeprowadzona analiza krzywej topnienia wykazała, iż wybrane startery działają prawidłowo i są wysoce specyficzne w stosunku do badanych mikroRNA. Zastosowane kontrole, tj. negatywna bez matrycy oraz cel-miR-39-3p nie dały produktów reakcji, co świadczy o czy-

stości i specyficzności przeprowadzonych reakcji. Końcowa analiza relatywnego poziomu ekspresji wykazała ekspresję wszystkich badanych mikroRNA w próbkach (Tabela 1.) dla wszystkich analizowanych programów (Tabela 2.).

Tabela 1. Szczegółowe dane na temat walidowanych mikroRNA. Dla każdego z analizowanych programów podano informacje czy badany mikroRNA został zidentyfikowany, a jeśli tak, to czy jako znany (xxx-miR-yyy) czy nowy. bta – skrót od *Bos taurus*, ssc – skrót od *Sus scrofa*.

L.p.	Nazwa walidowanego mikroRNA wg bazy miRBase	miRDeep2	sRNAbench	UEA sRNA Workbench	Wynik walidacji metodą qRT-PCR (średni relatywny poziom ekspresji)
1.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (5,95)
2.	nowy	nowy	brak	nowy	Potwierdzony (107,79)
3.	nowy	brak	nowy	nowy	Potwierdzony (8,63)
4.	nowy	brak	nowy	brak	Potwierdzony (6,69)
5.	bta-miR-100	bta-miR-100	bta-miR-100	brak	Potwierdzony (1,94)
6.	bta-miR-3432a	bta-miR-3432a	brak	bta-miR-3432a	Potwierdzony (4,29)
7.	ssc-miR-376c	ssc-miR-376c	brak	brak	Potwierdzony (9,67)
8.	bta-miR-223	brak	bta-miR-223	bta-miR-223	Potwierdzony (3,02)
9.	bta-miR-30c	brak	bta-miR-30c	brak	Potwierdzony (1,81)
10.	nowy	brak	brak	nowy	Potwierdzony (4,41)
11.	bta-miR-574	brak	brak	bta-miR-574	Odrzucony ze względu na nieprawidłowe parametry reakcji.
12.	nowy	brak	brak	nowy	Potwierdzony (9,20)
13.	bta-miR-329b	bta-miR-329b	brak	brak	Potwierdzony (2,73)
14.	bta-miR-30a-3p	brak	brak	bta-miR-30a-3p	Potwierdzony (2,89)
15.	bta-miR-433	brak	bta-miR-433	brak	Potwierdzony (2,78)
16.	bta-miR-451	brak	bta-miR-451	brak	Potwierdzony (4,75)
17.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (13,66)
18.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (4,04)
19.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (7,04)
20.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (2,09)
21.	nowy	nowy	brak	brak	Potwierdzony (10,17)
22.	cel-miR-39-3p	brak	brak	brak	Kontrola negatywna (0)

Tabela 2. Podsumowanie wyników walidacji metodą qRT-PCR.

	miRDeep2	sRNAbench	UEA sRNA Workbench
Liczba walidowanych miRNA	11	7	7
Liczba potwierdzonych miRNA	11	7	7
Liczba walidowanych znanych miRNA	4	5	3
Liczba potwierdzonych znanych miRNA	4	5	3
Liczba walidowanych nowych miRNA	7	2	4
Liczba potwierdzonych nowych miRNA	7	2	4

Wnioski:

Walidacja metodą RT-qPCR potwierdziła ekspresję wszystkich wybranych mikroRNA w badanych próbkach, co świadczy o dużej wiarygodności każdego z zastosowanych programów. Wybór każdego z nich będzie zasadny, gdyż każdy zidentyfikował unikatowe mikroRNA, których ekspresja została potwierdzona. W celu maksymalizacji szans na wykrycie jak największej liczby sekwencji znanych, korzystnym będzie wybór programu miRDeep2; natomiast nowych, które mogą nieść ze sobą duży potencjał funkcjonalny dotychczas niescharakteryzowany,

programu sRNAbench. W przypadku zainteresowania dwoma rodzajami mikroRNA korzystne będzie zastosowanie obu programów.

Zadanie 04-18-08-21

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

kierownik zadania: dr inż. Ewelina Semik-Gurgul

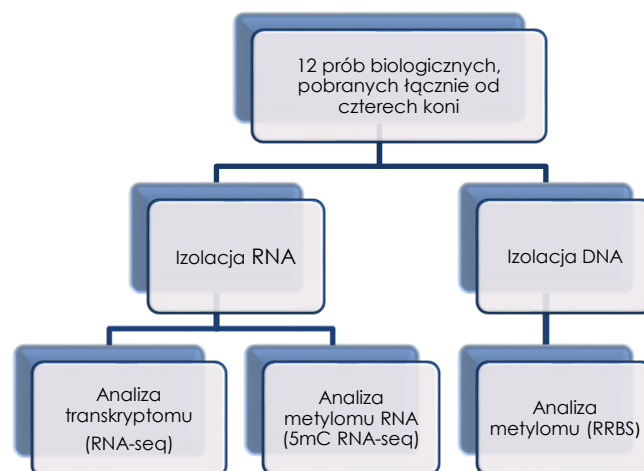
Cel zadania:

Celem zadania jest identyfikacja tkankowo-specyficznych wzorów ekspresji genów wybranych tkanek, wywodzących się z dwóch listków zarodkowych pochodzenia endodermalnego (wątroba i płuc) oraz próby biologiczne dwóch tkanek mezenchymalnych wywodzących się z mezodermy (mięsień poprzecznie prążkowany serca oraz komórki chrząstki szklistej z powierzchni stawowych kończyn). Analiza transkryptomu zostanie uzupełniona o analizę poziomu 5-metylocytozyny (m5C) w obrębie RNA. Jako modyfikacja potranslacyjna, metylacja RNA odgrywa znaczącą rolę w regulacji poziomu ekspresji genów, jeden ze stosunkowo niedawno odkrytych i mało poznanych mechanizmów epigenetycznych. Przeprowadzone prace będą stanowić uzupełnienie badań metylacji DNA wybranych tkanek i linii komórkowych konia domowego, wykonanych w ramach tematu pt. „Charakterystyka metylomów tkanek i linii komórkowych gatunku *Equus caballus*”.

Założenia metodyczne:

W ramach proponowanego zagadnienia zostaną wykorzystane najnowsze metody analiz epigenetycznych, uwzględniające technikę sekwencjonowania następnej generacji NGS (RNA-seq, RRBS oraz 5-mC RNA Bisulfite-Seq). Materiał badawczy stanowiło całkowite RNA i DNA wyizolowane z tkanki (wycinki serca, wątroby i płuc) pozyskanej pośmiertnie od dziesięciu koni w wieku od roku do dwóch lat. Do przygotowania bibliotek wytypowano 4 osobniki, dla których uzyskano izolaty RNA charakteryzujące się wskaźnikiem RIN powyżej 7.

Wykres 1. Schemat układu doświadczenia.



W wyniku zdarzenia losowego, przechowywany materiał biologiczny uległ rozmrożeniu, co doprowadziło do degradacji RNA w pobranych tkankach. Dlatego pozyskano nowe próby tkanki mięśnia sercowego, płuc, wątroby od 10 koni w typie zimnokrwistym. Nie udało się uzyskać

tkanki chrzęstnej. Zastosowanie nowych prób biologicznych w badaniach, wykluczyło możliwość wykorzystania wcześniej uzyskanych wyników w zakresie analizy metylacji DNA. W związku z tym, podjęto decyzję o przygotowaniu nowych bibliotek typu RRBS, w celu określenia tkankowo-specyficznych wzorów metylacji DNA.

Syntetyczny opis wyników zadania:

W pierwszym etapie badań przystąpiono do przygotowania bibliotek typu 5mC RNA, służących do analizy poziomu metylacji RNA. Mimo zastosowania izolatów RNA uzyskanych różnymi metodami izolacji, dodatkowego doczyszczania RNA na kulkach magnetycznych RNAClean XP (Beckman Coulter) oraz zastosowania modyfikacji metodycznych, z 12 planowanych bibliotek udało się uzyskać pięć. Analiza jakości uzyskanych odczytów NGS dla bibliotek 5mC RNA wykluczyła z dalszej analizy kolejne 2 biblioteki. Ostatecznie analizę poziomu metylacji RNA przeprowadzono na pojedynczych próbach tkanek serca, płuca i wątroby (34s, 34p, 34w) pobranych od tego samego osobnika.

Analiza danych dotyczących metylacji RNA pochodzących z NGS, umożliwiła identyfikację kilku tysięcy miejsc m5C. Około 80% miejsc miało niski poziom metylacji (<20% metylacji), podczas gdy 10–12% miejsc było umiarkowanie lub wysoce zmetylowanych (>40% metylacji). Miejsca m5C były rozmieszczone w całym ciełe genu oraz w sekwencjach niekodujących RNA (ncRNA) jak np. miRNA (Tab. 1.). Współczynnik korelacji pomiędzy poziomem metylacji poszczególnych miejsc 5mC w próbkach tkanek płuca, serca i wątroby był wysoki na poziomie 0,950 (Rysunek 1.), co wskazuje na duże podobieństwo globalnego wzoru metylacji RNA pomiędzy analizowanymi próbkami.

Tabela 1. Liczba miejsc m5C zidentyfikowanych w genie dla poszczególnych tkanek.

	Serce (34s)	Płuco (34p)	Wątroba (34w)
3'UTR	735	340	517
5' UTR	913	436	712
Egzony	5488	2283	3739
Introny	98949	44692	65664
ncRNA	2215	1158	1861

Uzyskane dane umożliwiły identyfikację pozycji, które zostały zmetylowane wyłącznie w jednym typie tkanki. W regionach sekwencji kodującej tkanki serca zidentyfikowano 912 genów zawierających miejsca m5C, niewystępujące w pozostałych tkankach, w tkance płuca 44 *loci*, a w tkance wątroby 208 genów (Rysunek 1A). Podobną analizę przeprowadzono również dla sekwencji 5'UTR i 3'UTR, identyfikując kilkanaście unikalnych pozycji m5C dla poszczególnych tkanek (Rysunek 1B i 1C).

Rysunek 1. Schemat przedstawiający liczbę genów zawierających unikalne i wspólne miejsca 5mC w regionie kodującym (A), w regionie 3'UTR genu (B) oraz regionie 5'UTR (C).



Interpretacja wyników wykazała również obecność licznych wspólnych pozycji m5C RNA dla wszystkich analizowanych rodzajów tkanek. Dalsza analiza tych pozycji umożliwiła identyfikację miejsc różnicowej metylacji RNA (DMS) pomiędzy tkanką serca, płuca i wątroby. Porównując poziom metylacji poszczególnych miejsc 5mC, uzyskanych dla tkanki płuca i serca, w regionie kodującym genu zidentyfikowano 12 różnicowych miejsc 5mC. Analizując parę tkanek płuca i wątroby zidentyfikowano sześć DMS-ów w regionie CDS oraz jeden w regionie 3'UTR. Po jednym DMS-ie zidentyfikowano również w regionie kodującym i 3'UTR genu porównując tkankę serca i wątroby. Wśród genów zawierających zidentyfikowane miejsca o zróżnicowanej metylacji znalazły się geny kodujące cząsteczki związane z rozwojem embrionalnym czy regulacją wzrostu i dojrzewania.

Sekwencjonowanie biblioteki metylomu techniką RRBS pozwoliło wygenerować średnio 18,8 mln odczytów sekwencyjnych w przeliczeniu na jedną próbkę. Na podstawie analizy danych metylacyjnych uzyskanych z NGS, odnotowano wysoki współczynnik korelacji pomiędzy poziomem metylacji poszczególnych miejsc CpG w grupie tkanek serca i płuca, wątroby i płuca oraz wątroby i serca, który wyniósł 0.86-0.94. W celu identyfikacji pozycji różnicowej metylacji DNA typu DMS oraz regionów różnicowej metylacji DNA typu DMR procent metylacji dla poszczególnych miejsc CpG porównano pomiędzy próbkami tkanki płuca i serca, tkanki wątroby i płuca oraz tkanki wątroby i serca, uznając za istotne miejsca różniące się o więcej niż 25%. Łącznie zidentyfikowano 4934 DMS-ów i 2256 DMR-ów pomiędzy próbkami płuca i serca, 4067 DMS-ów i 1939 DMR-ów pomiędzy tkankami wątroby i płuca oraz 6143 DMS-ów i 2637 DMR-ów pomiędzy wątrobką i sercem (Tabela. 2.).

Tabela 2. Statystyka DMR-ów zidentyfikowanych na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek RRBS.

Analizowane porównanie	Liczba DMR-ów	Regiony pozagenowe	Regiony intronowe	Regiony egzonowe	Regiony powyżej genu i 5'UTR	Regiony poniżej genu i 3' UTR
płuco vs serce	2256	476	1420	202	67	90
wątroba vs płuco	1939	387	1240	7	96	77
wątroba vs serce	2637	527	1714	184	79	79

Analizę sekwencji RNA przeprowadzono na 12 próbkach reprezentujących tkankę serca, płuc i wątroby. Średnia liczba odczytów na próbkę uzyskana dla tkanek płuca i serca była zbliżona (odpowiednio 5,1 miliona i 5,2 miliona dla płuca i serca). Średnia liczba odczytów na próbkę uzyskana dla tkanek wątroby była niższa od pozostałych i wynosiła 3,7 mln. Odsetek odczytów

dopasowanych do genomu referencyjnego wahał się od 77,2% do 84,4% na próbkę. Analiza ekspresji genów umożliwiła identyfikację 22193 genów o różnicowej ekspresji (DEG) w tkance płuca w odniesieniu do wątroby, z których 11554 genów było regulowane w dół, a 10639 było regulowane w górę oraz 22659 DEGs w grupie tkanek płuca w porównaniu do serca, z których 11765 ulegało nadekspresji, a 10894 charakteryzowało się obniżoną ekspresją. W tkance serca wytypowano łącznie 20971 DEGs, z których 11442 genów było regulowane w dół, w grupie tkanki serca, w porównaniu z wątrobą, a 9529 ulegało nadekspresji.

W pracy oceniono zależność pomiędzy poziomem metylacji miejsc CpG a profilem ekspresji genów w oparciu o różnice w poziomie metylacji 1330 miejsc metylacyjnych i zmian w poziomie ekspresji 809 genów pomiędzy tymi samymi próbkami tkanki płuca, wątroby i serca. Aby uwzględnić różnice w sposobie regulacji ekspresji genów przez metylację, w zależności od poziomu ekspresji genu, stawkę genów podzielono na geny o wysokiej, średniej i niskiej ekspresji na podstawie analizy rozkładu i odchylenia standardowego ekspresji wszystkich genów (>1 znormalizowany odczyt sekwencyjny). Geny o wysokiej ekspresji reprezentowały III kwartył (Q3), obserwacji natomiast geny o niskiej ekspresji I kwartył (Q1). Dodatkowo, uwzględniono także podział miejsc CpG, w zależności od ich lokalizacji w sekwencji genu, tj. w sekwencjach kodujących białko (tzw. „ciele genu”) i w promotorze genu (TSS1500), jako, że metylacja w tych częściach genu może powodować przeciwną regulację ekspresji genu. Listę genów wykazujących wysokie zmiany w poziomie ekspresji, z uwzględnieniem lokalizacji zidentyfikowanych DMR-ów przeanalizowano pod kątem ich potencjalnej funkcji biologicznej, z użyciem programu Panther Classification System Version 9.0. Klasyfikacji poddano kodowane przez te geny białka, grupując je według przynależności do określonych rodzin funkcjonalnych, funkcji molekularnej, procesu i ścieżki biologicznej. W grupie wytypowanych DEGs, niezależnie od analizowanej tkanki, największą liczbę stanowiły geny odpowiedzialne za procesy komórkowe, regulacje biologiczne i procesy metaboliczne. Były to zarówno enzymy modyfikujące białko (np. TAB1, MARK2), modulatory aktywności wiązania białek (np. TIMP3, CAST), jak i czynniki transkrypcyjne wiążące DNA (np. ZEB2, NFIA).

Podsumowanie:

Komórkowe RNA może podlegać licznym modyfikacjom chemicznym ważnym pod względem potranskrypcyjnych regulacji. Pomimo faktu, że udokumentowano tak wiele modyfikacji RNA, nasze rozumienie ich regulacji i funkcji jest nadal ograniczone. Jak dotąd, przeprowadzono kilka badań mających na celu identyfikację różnic w poziomie metylacji RNA. Badania te umożliwiły rozwój nowych narzędzi i podejść analitycznych służących do identyfikacji m5C mRNA na poziomie transkryptomu. Jednak liczba domniemanych miejsc m5C mRNA różni się nawet 1000-krotnie między badaniami. Tak więc głównym wyzwaniem w badaniach metylacji mRNA jest opracowanie eksperymentalnego i obliczeniowego schematu, który pozwoli odróżnić prawidłowo zidentyfikowaną m5C od szumu i ujawni obraz i cechy m5C mRNA. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania dotyczące analizy poziomu metylacji RNA tkanek końskich serca, płuca i wątroby, umożliwiły identyfikację zarówno wspólnych jak i unikalnych dla danej tkanki pozycji 5mC RNA. Co więcej, uzyskane wyniki pozwoliły również na określenie konkretnych pozycji 5mC różnicujących dane tkanki w zależności od poziomu metylacji RNA. Podsumowując, mapy metylacji 5mC RNA, które wygenerowaliśmy na próbkach końskich tkanek serca, płuca i wątroby, zapewniają cenne źródło informacji w wyjaśnieniu regulacji i funkcji m5C mRNA.

Ponadto, przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji dotyczących zmian profilu metylacji DNA oraz obrazu transkryptomu pod wpływem fizjologicznych procesów za-

chodzących w tkance serca, płuca i wątroby. W obrębie potencjalnej sekwencji promotorowej, w tkance płuca dla loci *PLXNA2*, *A1BG*, *ERRF1* oraz w tkance serca w obrębie *CTSC* wykazano obecność hipermetylowanych regionów oraz stwierdzono obniżoną ekspresję tych genów. W badanej grupie tkanek płuca stwierdzono również obniżony poziom metylacji fragmentu DNA wchodzącego w skład potencjalnej sekwencji promotorowej genów *TSPAN8*, *TCIRG1* i *MRPL15* oraz odnotowano podwyższony poziom ich transkryptów. Przeprowadzone analizy wykazały znikomy związek zmian w poziomie metylacji ciała genu i zmian poziomu ekspresji tego genu. Taki brak zależności był obserwowany niezależnie od bazowego poziomu ekspresji genu. Natomiast wyraźną negatywną zależność zaobserwowano pomiędzy poziomem metylacji sekwencji promotorowych genu a poziomem jego ekspresji w większości par tkanek i na różnych poziomach ekspresji. Wynik ten sugeruje złożone zależności pomiędzy metylacją i ekspresją genów, które są wypadkową ich poziomu ekspresji, lokalizacji miejsca metylowanego w sekwencji genu oraz potencjalnie innych czynników regulacyjnych i epigenetycznych. Niemniej jednak, otrzymane wyniki potwierdzają istnienie negatywnej zależności pomiędzy metylacją sekwencji promotorowych i ekspresją genów w genomie.

Zadanie 04-18-13-21

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

kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Cel zadania :

Jednym z etapów przeprowadzanych badań jest identyfikacja różnic w profilu białkowym pomiędzy próbkami mięsa pochodzącymi od bydła ras limousine, mieszańców PHF, ZB oraz analiza ich związków z parametrami jakości mięsa. Proces konwersji mięśni do mięsa oraz sam proces dojrzewania mięsa jest szeroko badany w aspekcie analizy przemian biochemicznych, mających bezpośrednie przełożenie na jakość uzyskiwanego produktu. Jakość mięsa jest cechą trudną do zdefiniowania – do tej pory nie została sformułowana jedna standardowa definicja, która wyjaśniałaby to pojęcie. Na jakość mięsa składa się wiele parametrów w tym pH, barwa, wodochłonność, kruchość czy zawartość tłuszczu śródmięśniowego.

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

Założenia metodyczne :

Materiałem do analizy profilu białkowego były fragmenty mięśnia – *Longissimus dorsi*, pobrane od bydła mięsnego rasy limousine oraz mieszańców rasy PHF i ZB, o udokumentowanym pochodzeniu i będące pod stałą kontrolą użytkowości. Zwierzęta podzielono na trzy grupy doświadczalne, po pięć sztuk w każdej: K (kontrola), D1 oraz D2. Próbkę do analizy zostaną pobrane od każdej ze sztuk, w trzech okresach: 24 h, 7 dni oraz 14 dni po uboju. W poszczególnych okresach zostaną przeprowadzone analizy dotyczące jakości mięsa. W grupie kontrolnej K, zwierzęta będą żywione standardową dawką żywieniową dla krów mlecznych.

Zwierzęta z grupy doświadczalnej D1, oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o dodatek chronionych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasy omega-3 i -6). Okres żywienia doświadczalnego wynosić będzie 60 dni.

Zwierzęta z grupy doświadczalnej D2, oprócz pastwiska będą żywione dawką wzbogaconą o zestaw ziół zwiększających żerność oraz parametry mięsa wołowego. Okres żywienia doświadczalnego wynosić będzie 60 dni.

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

Analizy przewidziane podczas realizacji zadania:

1. Analiza parametrów jakości mięsa wołowego uwzględniająca
 - a- pomiar pH,
 - b- analizę tekstury metodą WBS oraz TPA,
 - c- pomiar barwy mięsa (L^* , b^* , a^*),
 - d- ubytki masy w czasie obróbki cieplnej,
 - e- ocena organoleptyczna mięsa po obróbce cieplnej.
2. Przygotowanie próbek do izolacji białek.
3. Izolacja białek.
4. Oczyszczanie wyizolowanych białek oraz oznaczanie ich stężenia.
5. Analizy białkowe żeli 2D
 - a- ogniskowanie izoelektryczne (IEF),
 - b- SDS-PAGE,
 - c- wybarwienie białka oraz analiza komputerowa skanów otrzymanych żeli,
 - d- analiza LC-MS,
 - e- analiza typu Western blot – walidacja wyników.

Syntetyczny opis wyników zadania:

W przewidzianym do realizacji etapie analizy mięsa wołowego, materiałem do analizy profili białkowych były fragmenty mięśnia pobrane od czterech sztuk bydła mięsnego rasy limousine (łącznie analizy proteomiczne przeprowadzono dla 12 próbek w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki). Analiza jakości próbek mięsa została przeprowadzona w Zakładzie Hodowli Bydła w 48 h, 5 dni oraz 10 dni po uboju.

Analizy zostały przeprowadzone w ramach zakończonego już zadania, prowadzonego przez ZHB. Dane otrzymane w wyniku analiz jakości zostały zebrane w formie tabelarycznej (Tabela 1., Tabela 2.). Oznaczono również profile wyższych kwasów tłuszczowych (g/100 g), w zależności od czasu dojrzewania mięsa – grupa żywiona mieszanką ziółową (D2-Z1) oraz wyniki analiz profilu wyższych kwasów tłuszczowych (g/100 g) oraz zawartości witaminy E (ug/g) i cholesterolu (mg/g) w zależności od czasu dojrzewania mięsa – grupa żywiona mieszanką ziółową (D2-Z1).

Tabela 1. Wyniki analiz próbek mięsa wołowego z uwzględnieniem wartości pH.

Nr próbki	Próbka pobrana po:	Waga przed obróbką cieplną	Waga po obróbce	Ubytek	%	Waga po 45 min. schłodzenia	Ubytek w kg	%	pH
6201/1	48 h	226,4	134,5	91,9	40,59%	122,5	103,9	45,89%	5,44
6201/2	5 dniach	254	157,3	96,7	38,07%	141,6	112,4	44,25%	5,97
6201/3	10 dniach	336,4	234,6	101,8	30,26%	222,1	114,3	33,98%	5,98
7169/1	48 h	371,4	191,6	179,8	48,41%	183,2	188,2	50,67%	5,74
7169/2	5 dniach	374,4	210,4	164	43,80%	199,1	175,3	46,82%	6,02
7169/3	10 dniach	371,6	156,1	215,5	57,99%	143,7	227,9	61,33%	5,96
0192/1	48 h	220,3	140,3	80	36,31%	129,2	91,1	41,35%	5,7

0192/2	5 dniach	253,3	162,3	91	35,93%	151,4	101,9	40,23%	6,11
0192/3	10 dniach	204,5	120,5	84	41,08%	110,9	93,6	45,77%	6,08
9429/1	48 h	354,7	222,6	132,1	37,24%	201,4	153,3	43,22%	5,62
9429/2	5 dniach	310,8	210,5	100,3	32,27%	188,7	122,1	39,29%	6,23
9429/3	10 dniach	228,7	135,4	93,3	40,80%	117,6	111,1	48,58%	6,09

Tabela. 2. Pomiar barwy mięsa (L^* , b^* , a^*).

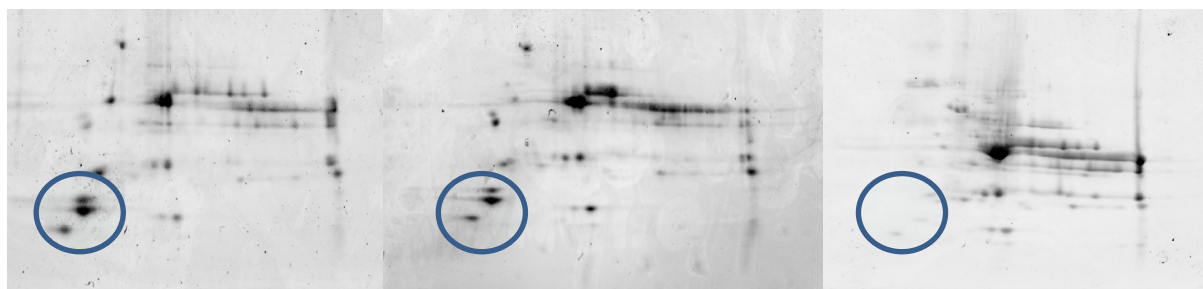
Nr próbki	Próbka pobrana po:	L		a		b	
		średnia	sd	średnia	sd	średnia	sd
6201/1	48 g	36,35	1,35	22,27	1,88	2,05	1,07
6201/2	5 dniach	35,95	0,61	22,18	0,22	0,59	0,1
6201/3	10 dniach	40,61	1,21	23,6	1,24	3,44	0,23
7169/1	48 h	34,25	1,55	23,01	1,21	3	1,08
7169/2	5 dniach	32,85	0,22	22,67	0,6	1,04	0,82
7169/3	10 dniach	34,3	2,59	21,92	0,93	0,69	0,83
0192/1	48 h	36,26	0,77	22,07	1,2	2,12	0,95
0192/2	5 dniach	34,86	0,83	22,09	0,6	-0,21	0,12
0192/3	10 dniach	39,89	0,88	22,89	0,86	1,35	0,46
9429/1	48 h	36,68	1,47	22,69	2,84	2,29	0,44
9429/2	5 dniach	34,95	1,18	21,7	0,87	0,83	0,64
9429/3	10 dniach	36,94	1,29	22	1,22	1,96	0,82

Zabezpieczone próbki mięsa poddano analizie proteomicznej wg metodyki opracowanej w poprzednim roku sprawozdawczym. Próbkę mięsa zostały zhomogenizowane w 1000 μ l buforu do lizy (opracowanie własne) przez 60 minut, przy użyciu mechanicznego homogenizatora. Nierozpuszczalne resztki tkankowe zostały usunięte przez odwirowanie, a supernatant został użyty do elektroforezy 2D. Próbkę oczyszczono z soli oraz detergentów i oszacowano stężenie białka przy użyciu metody BCA.

Analizy 2D zostały wykonywane w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki. Próbkę rozdzielono na IPG Strips™ o długości 7 cm i zakresie pH 3-10. Ogniskowanie izoelektryczne przeprowadzono przy użyciu Protean® IEF Cell wg zmodyfikowanego programu napięcia prądu. Paski zostały zredukowane w buforze wyrównującym DTT, a następnie alkiłowane jodoacetamidem. Drugi wymiar został przeprowadzony w żelu poliakrylamidowym (12%). Po rozdziale elektroforetycznym, żełe były barwione Coomassie Brilliant Blue G-250. (Fot. 1.) Analiza żeli została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania SameSpot v5.

W kolejnym etapie analiz, spoty białkowe różniące się ekspresją (zmiana intensywności świecenia spotu białkowego) lub brakiem obecności spotu białkowego w analizowanej próbce w innych próbkach, zostały wycięte z żeli i przygotowane do analizy spektrometrycznej. Analizy te wykonywało zewnętrzne laboratorium, a analiza obejmowała rozdział mieszaniny peptydów przez chromatografię cieczową (LC) i pomiar mas peptydów i ich fragmentów w spektrometrze mas – eksperyment LC-MS-MS/MS, porównanie uzyskanych mas peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych (NCBI, UniProt), (analiza statystyczna wiarygodności uzyskanych przypisań i ustalenie listy białek obecnych w próbce).

Fot. 1. Zdjęcia żeli 2D próbki pobranej w różnym czasie (od lewej 48 h, 5 dni, 10 dni) od uboju. Zaznaczone miejsca różnią się ilością białka.



Analiza profili białkowych próbek mięsa pozwoliła na identyfikację 20 spotów białkowych, różniących się ekspresją pomiędzy analizowanymi próbkami mięsa. Każdy spot białkowy reprezentuje jedno białko lub jego fragment. Dziesięć spotów białkowych o największej różnicy ekspresji wycięto z żelu, przygotowano i przestano do identyfikacji białka. W Tabeli 3. Zestawiono zidentyfikowane białka.

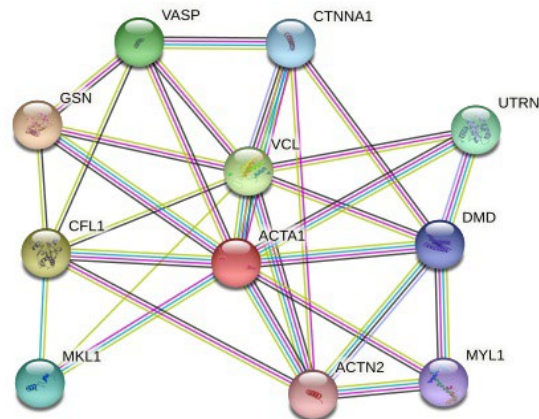
Tabela 3. Lista zidentyfikowanych białek oraz numery NCBI gi number (NCBI gi No.).

Nazwa białka	NCBI gi No.
Actin, α	gi 27819614
Myosin heavy chain 2a,	gi 13560269
Carbonate dehydratase	gi 693933
Creatine kinase M chain	gi 125305
β Enolase (enolase 3)	gi 119346
L-lactate dehydrogenase A chain	gi 1170740
Phosphoglycerate mutase 2	gi 33416469
Creatine kinase, M chain,	gi 125305
Pyruvate kinase, M2 isozyme	gi 1346398
Carbonic anhydrase III	gi 115461

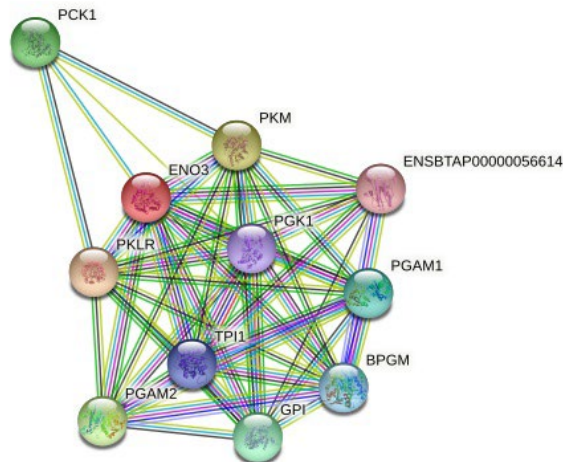
W przypadku niektórych białek nie można było określić czy spoty były fragmentacją rozpadu ich macierzystych cząsteczek różnymi izoformami, czy też modyfikacjami potranslacyjnymi. Na przykład aktynę i/lub jej odpowiednie peptydy zidentyfikowano jako aktynę α . Wynik był prawdopodobnie związany z metodą eksploracji danych, która opierała się na wynikach prawdopodobieństwa (np. wybór najbardziej możliwego kandydata). Z drugiej strony może to wskazywać na stan metabolizmu aktyny w tkance. W dalszych etapach przewiduje się walidację otrzymanych wyników oraz analizę pozostałych próbek mięsa.

Fot. 2. Przykładowa analiza STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) interakcji białko-białko dla aktyny α (ACTA1) – Fot. 2. A oraz β -enolazy (ENO3) – Fot. 2. B.

A



B



Zadanie 04-18-14-21

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

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

Cel zadania:

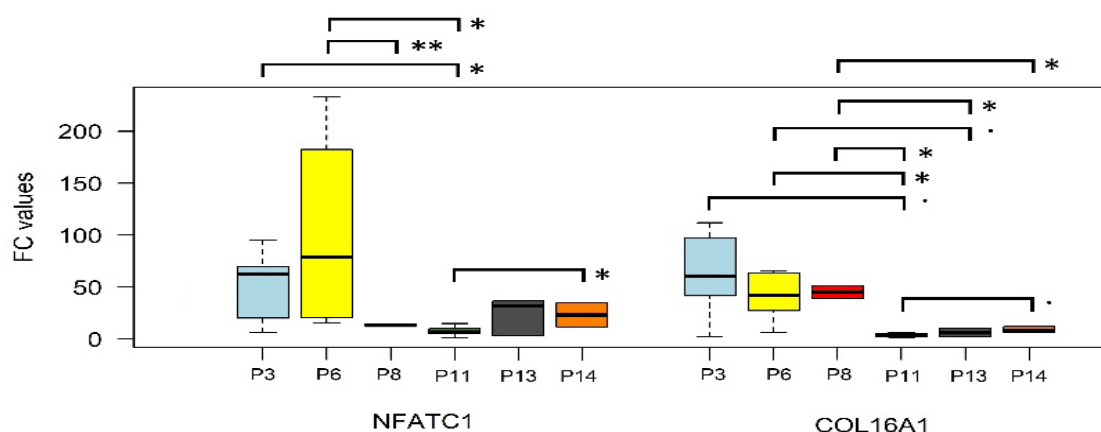
Celem badań było ustalenie zmienności na poziomie metylacji DNA w genomie chondrocytów końskich, pasażowanych w warunkach hodowli jednowarstwowej oraz powiązanie zidentyfikowanych zmian w metylacji DNA z poziomem ekspresji genów, które mają znaczenie dla utrzymania fenotypu chondrocytów w warunkach *in vitro*.

Stosując metodę RRBS, wykonano porównawczą analizę metylacji genomu komórek chrzęstnych koni, pochodzących z wczesnych oraz późnych pasażów komórkowych. W celu ustalenia funkcjonalnego znaczenia różnic w poziomie metylacji DNA między wczesnymi i późnymi pasażami komórek chrzęstnych, wykonano różnicową analizę ekspresji genów, które różniły się profilem metylacji w zależności od numeru pasażu komórkowego.

Pasażowanie linii komórkowych chondrocytów pokazało radykalne zmiany morfologii w warunkach hodowli w monowarstwie. W obrazie mikroskopowym komórki chrzęstne, pochodzące z drugiego i trzeciego pasażu, w zdecydowanej większości stanowiły komórki o zaokrąglonej „wielokątnej morfologii”, zbliżonej do pierwotnego typu chondrocytów, w przeciwieństwie do chondrocytów o wyglądzie fibroblastów charakterystycznych dla pasaży późniejszych.

Analiza metylacji metodą RRBS pozwoliła na wytypowanie grupy odmiennie metylowanych genów o znaczeniu biologicznym dla zachowania prawidłowego fenotypu komórek chrzęstnych w warunkach *in vitro*. Udowodniono, że 13 genów o różnicowej metylacji DNA wykazuje istotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi pasażami komórek chrzęstnych (przykłady na Rysunku 1.). Geny te kodują białka związane z syntezą bądź degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej oraz sygnalizacją międzykomórkową. Między innymi, istotnie wyższy poziom ekspresji w komórkach chrzęstnych z niższym numerem pasażu (3, 6 i 8) odnotowano w przypadku genów COL16A1, NADSYN1 oraz NFATC1. Odwrotną zależność zaobserwowano jeżeli chodzi o geny COL11A1, COL15A1 i JAK3, które charakteryzowała istotnie niższa ekspresja w pasażach 3, 6 i 8.

Rysunek 1. Względne różnice w ekspresji genów NFATC1 i COL16A1, w zależności od numeru pasażu komórkowego.



W badanym układzie biologicznym, obrazującym utratę fenotypu w warunkach *in vitro*, na szczególną uwagę zasługują wyniki odwrotnej korelacji pomiędzy metylacją i ekspresją genu w *locus* NFATC1, NADSYN1 oraz JAK3. NFATC1 koduje białko czynnika transkrypcyjnego o znaczącej roli w metabolizmie tkanki kostnej oraz rozwoju chrząstki stawowej. NFATC1 ulega silnej ekspresji w komórkach chrzęstnych i odpowiada za prawidłowe różnicowanie chondrocytów. NADSYN1 koduje białko, mające znaczący wpływ na przemiany metaboliczne komórek, regulując ponad 400 szlaków molekularnych związanych z eliminacją reaktywnych form tlenu (ROS). Natomiast, JAK3 uczestniczy w procesach stanu zapalnego, towarzyszącego między innymi schorzeniom autoimmunologicznym – w tym reumatoidalnemu zapaleniu stawów. Tak jak wzrost aktywności genów NFATC1 oraz NADSYN1 w początkowych pasażach komórkowych może wynikać z ich dodatniego znaczenia w różnicowaniu komórek chrzęstnych konia, tak wzrost ekspresji JAK3 w komórkach chrzęstnych z późnych pasaży może mieć związek z procesami odróżnicowania w długoterminowej hodowli chondrocytów w monowarstwie.

Analiza metylacji w skali genomu w połączeniu z analizą ekspresji kolekcji odmiennie metylowanych genów pozwoliła na wytypowanie *loci*, które mają potencjalnie funkcjonalne znaczenie dla procesu odróżnicowania chondrocytów końskich w warunkach pozaustrojowych. Geny NFATC1 oraz NADSYN1 mogą mieć dodatnie znaczenie w anabolicznych przemianach

sprzyjających utrzymaniu zdolności komórek chrzęstnych do regeneracji uszkodzeń chrząstki stawowej koni. Z kolei gen JAK3 stanowi marker niekorzystnych przemian sprzyjających tworzeniu odróżnicowanych komórek w typie fibroblastycznym w warunkach *in vitro*. Ponadto uzyskane wyniki podkreślają rolę mechanizmów epigenetycznych w procesach odróżnicowania chondrocytów w warunkach pozaustrojowych.

Zadanie 04-18-16-21

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

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

Cel zadania:

Celem zadania badawczego jest zbadanie różnicy w ekspresji wybranych genów związanych z przemianami tłuszczowymi u gęsi. Ponadto, w ramach zadania założono analizę sekwencji tych genów i poszukiwanie mutacji, które potencjalnie mogą wpływać na przemiany tłuszczowe. Materiałem badań jest RNA i DNA uzyskane z tkanek pobranych od trzech ras: kielecka, kołudzka i landes, różniących się utrzymaniem i wydajnością mięsną.

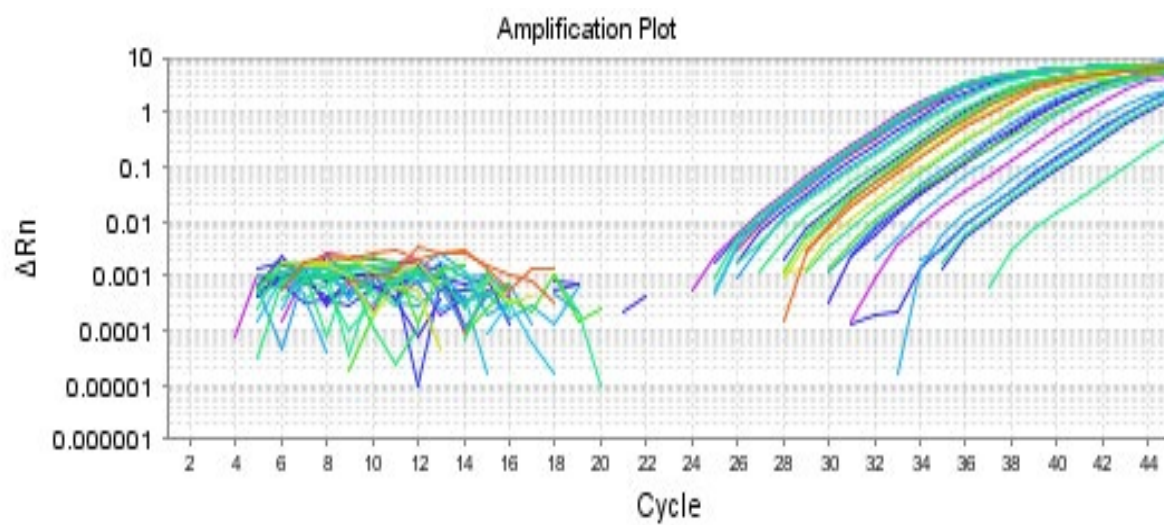
W roku sprawozdawczym wyizolowano 60 próbek RNA z tkanek: wątroba, mięsień klatki piersiowej, mięsień podudzia, tłuszcz kuperkowy i trzewny gęsi ras kołudzka®, landes i kielecka. RNA zostało sprawdzone pod względem ilości i jakości. Następnie znormalizowano RNA i przepisano na cDNA.

Z powodu braku gotowych zestawów sond do genów u gęsi przeprowadzono wstępną analizę Real-time z użyciem barwnika SybrGreen (Rysunek 1.). Metoda ta nie wymaga użycia sond, co pozwala na obniżenie kosztów analiz, charakteryzuje się jednak mniejszą specyficznością. Dla genomu gęsi europejskiej, który jest słabo poznany, w roku sprawozdawczym zaprojektowano sondy w oparciu o genom azjatyckiej gęsi dostępny w bazie Ensemble. Przeprowadzono test sond (Rysunek 2.) i stwierdzono, że przyłączają się one do cDNA z wątroby, mięśnia klatki piersiowej oraz tłuszczu trzewnego.

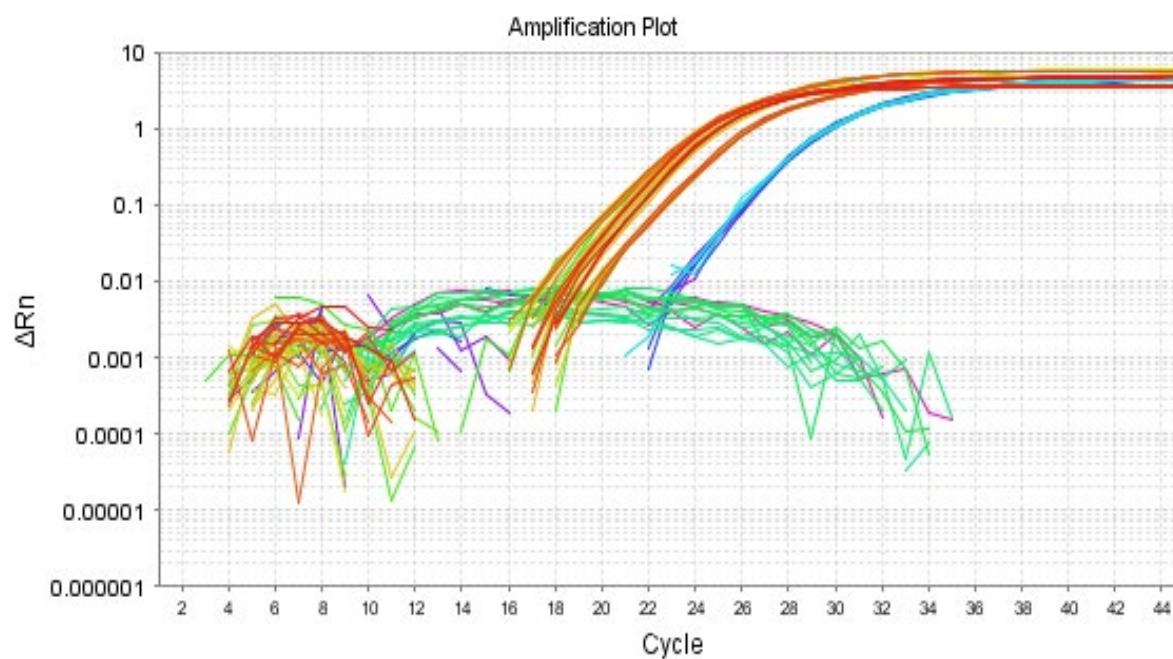
Ponadto, przeprowadzono izolację DNA z dutek piór 150 gęsi tych ras oraz próbną reakcję sekwencjonowania z zaprojektowanymi siedmioma starterami do genów związanych z przemianami tłuszczowymi. U wszystkich badanych ras uzyskano sekwencje w egzonie 4. genu ELOVL6 (Rysunek 3.), która posłużyła do zaprojektowania sondy do analizy ekspresji.

Następnym etapem badań będzie dopracowanie metodyki sekwencjonowania pozostałych genów (SCD, ACSL1, ME, H-FABP) oraz analiza ekspresji genów.

Rysunek 1. Walidacja warunków real time PCR z wykorzystaniem zestawu zawierającego SybrGreen.



Rysunek 2. Test sond na przykładzie cDNA z wątroby gęsi białej kołudzkiej®.



Rysunek 3. Fragment sekwencji genu ELOVL6 u gęsi kieleckiej.

**Zadanie 04-18-17-21**

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

kierownik zadania: dr inż. Wojciech Witarski

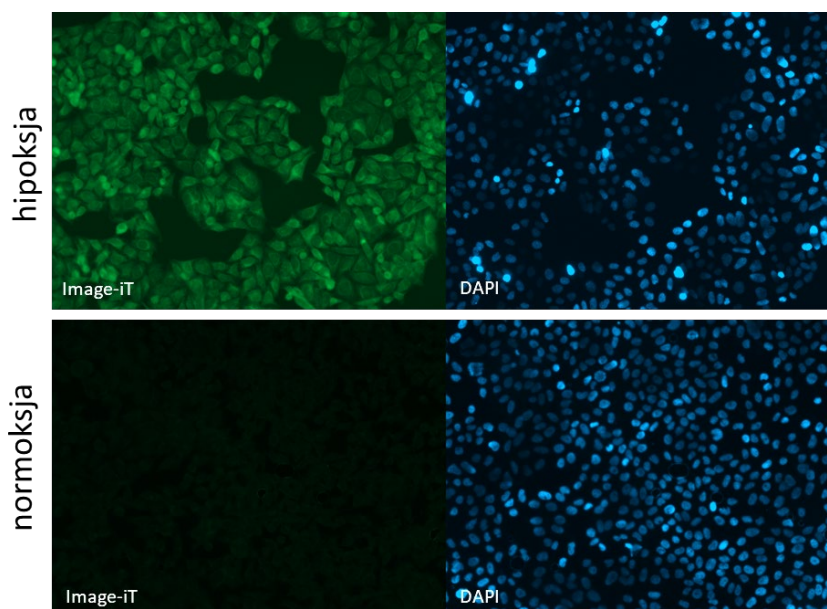
Proponowane doświadczenia składają się z trzech etapów. Planuje się rozszerzenie kolekcji pierwotnych linii komórek sarkoidu końskiego w celu wychwycenia różnic fenotypowych oraz wydzielniczych pomiędzy różnymi klinicznie manifestacjami choroby. Zostaną przeprowadzone hodowle trójwymiarowe komórek nowotworowych, także w warunkach hipoksji. Tempo wzrostu i charakter kolonii zostaną poddane analizie, a w późniejszych etapach wykaże się wpływ hipoksji na zmiany profilu ekspresji raz zmianę wybranych białek. W ostatnim kwartale I. etapu rozpocznie się proces ko-transfekcji komórek HEK293 plazmidami produkującymi białka płaszcza kapsydowego, BPV L-1 oraz L-2, których produkcja przebiegać będzie w drugim etapie. Białka kapsydu w ostatnim etapie posłużą, wraz z syntetycznymi immunogennymi białkami, analizie IVCAA, gdzie na modelu układu immunologicznego (Limfocyty T CD4⁺ CD8⁺) prześledzona zostanie ich zdolność aktywacji, mierzona jako działanie mitogenowe oraz indukujące wydzielanie interleukin.

W 2021 roku pozyskano, w korespondencji z tematem, w którym uzyskano trzy pierwotne linie sarkoidów końskich, otrzymanych jako materiał odpadowy po zabiegu chirurgicznego usunięcia guza, dodatkową linię sarkoidów końskich oraz dwie linie fibroblastów skóry konia. Dwa typy komórek izolowano w identyczny sposób – skrawki tkanki transportowane w temperaturze lodówkowej w medium transportowym – własnej kompozycji – zapewniającym optymalne właściwości buforujące oraz ochronę przed drobnoustrojami – w czasie do 48 godzin ulegały dalszemu procedowaniu. Tkankę pocięto w warunkach sterylnych na fragmenty o wielkości 0,5 mm i hodowano w mieszaninie antybiotyków na szalkach Petriego pokrytych cienką warstwą mieszaniny białek macierzy międzykomórkowej. Wszystkie pozyskane linie poddano procesom bio-bankowania komórkowego.

Hodowle, w sytuacji obniżonego tlenu, przeprowadzano w urządzeniu Hypoxia Incubator Chamber (Stemcell), w którym powietrze atmosferyczne w kontrolowanych przepływach gazu

wymieniono na mieszaninę gazu specjalnego (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) i inkubowano linie komórkowe sarkoidu końskiego wraz z odpowiadającym im liniom fibroblastów skóry konia w warunkach hipoksji oraz normoksji. Izolowany kwas RNA posłużył do dalszych analiz. Każdorazowo, warunki hodowlane testowano przy użyciu komórek HBT-35 oraz reagenta Image-iT™ Green Hypoxia Reagent (ThermoFisher), gdzie silny zielony fluorescencyjny sygnał był potwierdzeniem obecności warunków o obniżonej zawartości tlenu (pO₂<2%).

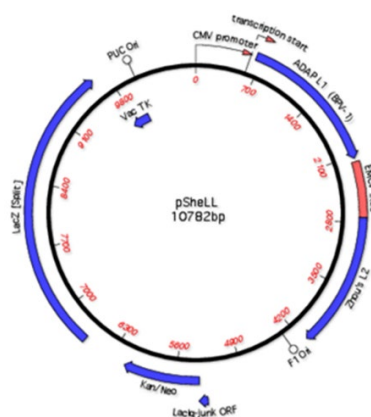
Fot. 1. Analiza poprawności eksperymentów z użyciem komory do hipoksji firmy Stemcell.



Komórki HBT35 poddano barwieniu przez 30 minut przy użyciu Image-iT (ThermoFisher) o finalnej koncentracji 5µM. Inkubacje w warunkach hipoksji (1% O₂ 5% CO₂, 94% NO₂) oraz normoksji (5% CO₂, atmosferyczna zawartość tlenu) prowadzono przez 24 godziny. Po tym okresie komórki były utrwalane poprzez inkubację w 4% paraformaldehynie, aby następnie sporządzić preparaty mikroskopowe.

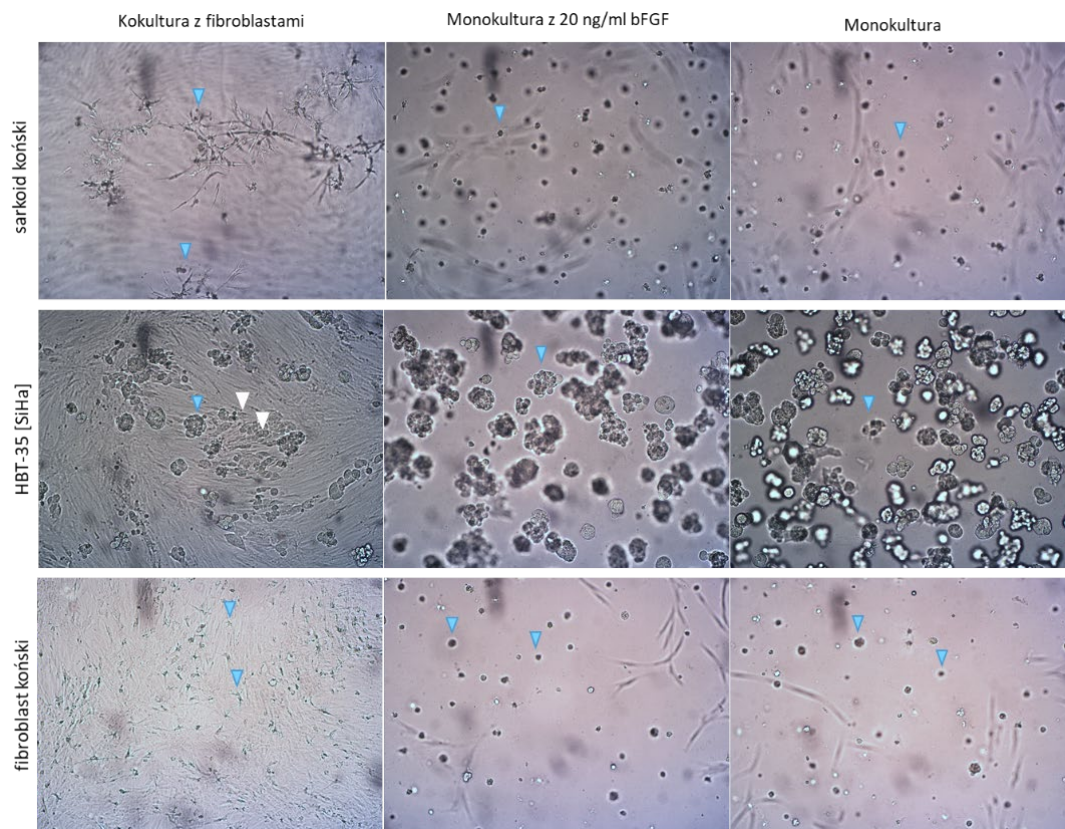
Komórki fibroblastów skóry konia oraz HEK-293 poddano analizie na odporność na antybiotyk G418, analog neomycyny. Uzyskane dawki posłużą do selekcji antybiotykowej linii po danej transfekcji plazmidem pShell.

Rycina 1. Plazmid pShell L1^L1 (addgene 37319) dedykowany do produkcji białek płaszcza wirusa. Pozyskany dzięki uprzejmości Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. „Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors”. J. Virol. 2004 Jan;78(2):751-7. 10.1128/JVI.78.2.751-757.2004 PubMed 14694107.



Komórki linii sarkoidu końskiego (3 linie), komórki fibroblastów końskich (traktowane jako negatywna kontrola inwazyjności oraz komórkowy odpowiednik niepatologicznego stanu tkanki), dwie linie wysoce inwazyjnego nowotworu szyjki macicy (HeLa oraz SiHa) zostały hodowane w białkowym żelu (Geltrex Thermofisher) odpowiadającym formie trójwymiarowej tkanki. W obrębie tych trzech grup badawczych analizowano proces wzrostu komórek w trzech reżimach stymulacji: 1) bez stymulacji, 2) przy użyciu 20 ng/ml bFGF (Thermofisher) oraz jako kultura na monolayerze komórek fibroblastów. Pomimo faktu, że każda z grup odpowiedziała na stymulację (najsilniej w przypadku parakrynowej stymulacji ko-kultury fibroblastowej), to komórki sarkoidu końskiego wykazywały niewielkie cechy inwazyjności będąc fenotypowo zbliżone do fibroblastów skóry konia.

Rycina 2. Proces hodowli trójwymiarowej komórek sarkoidu końskiego (łagodny nowotwór konia indukowany aktywnością papilloamirusa bydłęcego), komórek SiHa (silnie inwazyjny nowotwór szyjki macicy indukowany papillomawirusami ludzkimi) oraz końskich komórek fibroblastów skóry, służących jako kontrola negatywna. Komórki inkubowano w 10% serum DMEM z dodatkiem antybiotyku Primocin (invivogen) przez okres 7 dni, na żelowym trójwymiarowym rusztowaniu zbudowanym z mieszaniny komórek w medium hodowlanym oraz zewnątrzkomórkowej macierzy Geltrex (Thermofisher). Grupa kontrolna była nietraktowana, grupy stymulowane zostały podzielone na stymulowane 20ng/ml bFGF (Thermofisher) oraz rosnące na monolayerze komórek fibroblastów. Strzałka niebieska wskazuje typowe, komórki rosnące w postaci 3D, strzałka biała wskazuje miejsca inwazyjne w kierunku powierzchni komolayera fibroblastow.



Zadanie 04-18-18-21

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

Cel zadania:

Celem zadania jest przearanżowanie obecnie stosowanych barwników fluorescencyjnych stosowanych 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. Obecnie, w Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB (LGM) do badań rodowodowych owiec i świń zastosowano sekwenator kapilarny typu 3500xl umożliwiający wykorzystanie do reakcji PCR 5 barwników fluorescencyjnych: FAM, VIC, NED, TAZ i SID. Pozwoliło to na przeprojektowanie dotyczących stosowanych analiz markerów DNA na potrzeby identyfikacji zwierząt i uaktualnienie metod stosowanych w badaniach rodowodowych.

Do weryfikacji rodowodów psów ISAG, jako zestaw podstawowy zaleca aż 22 markery STR. Zastosowanie 5 barwników do znakowania sekwencji starterowych pozwoliło na zaprojektowanie jednej mieszaniny produktów PCR, która będzie możliwa do analizy podczas jednego rozdziłu elektroforetycznego (Rysunek 1.). Analiza wyników w trakcie jednego rozdziłu elektroforetycznego znacznie zmniejsza koszty badań, skraca czas realizacji zlecenia oraz zmniejsza ryzyko popełnienia błędów wynikających z konieczności dwukrotnej analizy próbki od jednego psa.

Do 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 do potwierdzania pochodzenia (Tabela 1.). Ponadto, zastosowanie dodatkowego barwnika umożliwiło efektywne wykorzystanie możliwości technicznych i dołączenie do panelu podstawowego – 15plex, dwóch dodatkowych markerów: S0026 i IGF1, które znajdują się w uzupełniającym panelu ISAG. Dzięki przeprojektowaniu dotychczasowego panelu utworzono zestaw złożony z 17 markerów, który w następnym etapie zostanie przetestowany pod względem możliwości zastosowania w rutynowych badaniach kontroli pochodzenia świń.

W przypadku kontroli rodowodów owiec wykonano modyfikację metody analizy 14 STR, stosowaną dotychczas do weryfikacji pochodzenia owiec. Modyfikacja polegała na dopasowaniu znakowania sekwencji starterowych do reakcji PCR barwnikami fluorescencyjnych, tak aby markery o zbliżonej długości sekwencji mikrosatelitarnej w ilości par zasad (pz) nie pokrywały się w trakcie rozdziłu elektroforetycznego. Znakowanie starterów do analizy markerów STR dodatkowym barwnikiem SID (Tabela 2.) znacząco ułatwi i przyspieszy analizę elektroforetyczną oraz pozwoli unikać błędów w ustalaniu pochodzenia owiec.

Rysunek 1. Projekt oznakowania barwnikami fluorescencyjnymi sekwencji starterowych do reakcji PCR w badaniach identyfikacji osobniczej psów.

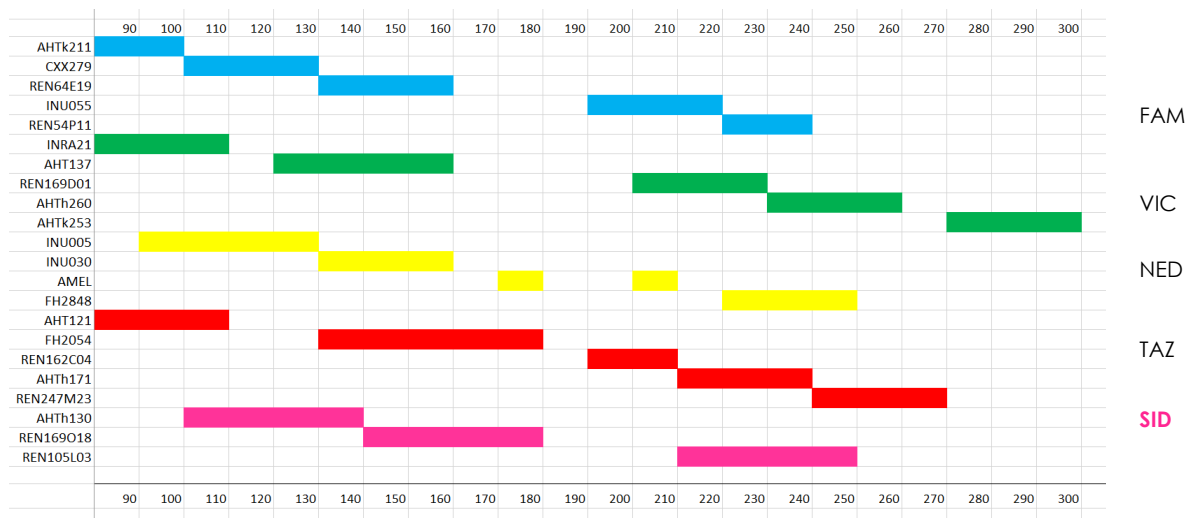


Tabela 1. Wykaz sekwencji markerów rekomendowanych przez ISAG do kontroli rodowodów świń.

Marker	SEKWENCJA forward	SEKWENCJA reverse	Barwnik
SW240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	AAACCATTAAAGTCCCTAGCAAA	FAM
SW911	CTCAGTTCCTTTGGGACTGAACC	CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	FAM
SW951	TTTCACTCTGCGACACAG	GATCGTGCCCAAATGGAC	FAM
S0090	CCAAGACTGCCTGTAGGTGAATA	GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	FAM
S0101	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG	GTCTCCCTCACACTACCGCAG	FAM
S0386	GAACCTCTGGTCTTATTTCTA	GTCAAAAATCTTTTATCTCCAACAGTAT	NED
S0227	GATCCATTATAATTTAGCACAAAGT	GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC	NED
SW936	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC	GTGCAAGTACACATGCAGGG	NED
S0228	GGCATAGGCTGGCAGCAACA	AGCCACCTCATCTTATCTACACT	VIC
SW72	ATCAGAACAGTGCGCCGT	TTTGAAAATGGGGTGTTC	VIC
SW857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	GATCCTCCTCCAAATCCCAT	VIC
S0355	TCTGGCTCTACACTCCTTCTTGATG	TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	TAZ
S0155	TGTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG	AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT	TAZ
SW24	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC	ATCCAAATGCTGCAAGCG	SID
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	GCATTCTCTGATTCTGGGTA	SID

Tabela 2. Markery STR zalecane przez ISAG do kontroli pochodzenia owiec oraz sekwencje starterowe i barwniki fluorescencyjne do ich znakowania.

Marker	SEKWENCJA forward	SEKWENCJA reverse	Barwnik
AMEL	CAGCCAAACCTCCCTCTGC	CCCGCTTGGTCTTGTCTGTGC	FAM
INRA006	AGGAATATCTGTATCAACCGCAGTC	CTGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA	FAM
INRA063	GACCACAAAGGGATTGCACAAGC	AAACCACAGAAATGCTTGAAG	FAM
INRA005	TTCAGGCATACCCTACACCACATG	AAATATTAGCCAAGTAAAACTGGG	NED
MAF214	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	GGGTGATCTAGGGAGGTTTGGAGG	NED
INRA023	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	TAATAACAGGGTGTAGATGAATC	VIC
MAF065	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG	CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	VIC
McM042	CATCTTTCAAAGAAGTCCGAAAGTG	CTTGAATCCTTCTAATCTTCGG	VIC
McM527	GTCCATTGCCTCAAATCAATTC	AAACCACTTGACTACTCCCAA	VIC
CSRD247	GGACTTGCCAGAAGTCTGCAAT	CACTGTGGTTGTATTAGTCAGG	TAZ
ETH152	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG	GAGACCTCAGGGTGGTGATCAG	TAZ
OarFCB20	GGAAAAACCCCATATATACCTATAC	AAATGTGTTAAGATTCCATACATGTG	TAZ
HSC	CTGCCAATGCAGAGACACAAGA	GTCTGTCTCCTGTCTGTATC	SID
INRA172	CCAGGGCAGTAAAAATGCATAACTG	GGCCTTGCTAGCCTCTGCAAAAC	SID

Zadanie 01-19-06-11

Wpływ parametrów jakościowych nasienia seksowanego na płodność inseminowanych jałówek i krów mlecznych.

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

Cel zadania:

Celem pracy było lepsze poznanie strukturalnych i metabolicznych zmian, odpowiedzialnych za spadek jakości nasienia seksowanego oraz określenie zależności pomiędzy badanymi parametrami jakości nasienia seksowanego i nieseksowanego a płodnością inseminowanych samic.

Założenia metodyczne:

Badania przeprowadzono na pochodzącym z zakupu, seksowanym i nieseksowanym nasieniu buhajów rasy holendersko-fryzyjskiej. Analizie poddano 37 ejakulatów nasienia seksowanego pochodzącego od 31 buhajów oraz 29 ejakulatów nasienia konwencjonalnego od 26 buhajów. Nasienie po rozmrożeniu oceniano w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB. Ocena obejmowała standardowe parametry jakości nasienia oceniane przy użyciu systemu CASA jak i wybrane markery apoptotyczne, aktywność metaboliczną (poziom ATP), integralność błon komórkowych i stan chromatyny plemników.

W celu określenia zdolności zapłodniającej nasienia seksowanego przeprowadzono inseminację 880 jałówek i 914 krów rasy holendersko-fryzyjskiej w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB Kołbacz Sp. z o.o. oraz Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB Chorzów Sp. z o.o. Seksowane nasienie stosowane było do unasienniania najlepszych zwierząt, wykazujących silne objawy rui. W przypadku nasienia konwencjonalnego przeprowadzono inseminację 2042 jałówek i krów w zakładzie doświadczalnym w Kołbacz. Po 35 dniach od zabiegu inseminacji, przy użyciu aparatu USG, przeprowadzano badanie na ciążę. Ocenę skuteczności unasienniania samic określano na podstawie wskaźnika zacięć.

Syntetyczny opis wyników:

Wybrane wyniki przeprowadzonych analiz nasienia seksowanego zamieszczono w Tabeli 1. i 2. Po inseminacji nasieniem seksowanym uzyskano średnią wartość wskaźnika zacięć na poziomie 58,4% dla jałówek, 35,4% dla krów oraz 44,9% dla jałówek i krów razem. W przypadku nasienia konwencjonalnego średnia wartość wskaźnika zacięć wynosiła 24,7% dla krów i 25,2% dla jałówek i krów razem. Analiza zależności pomiędzy parametrami jakości nasienia seksowanego i płodnością wykazała istotne korelacje pomiędzy parametrami ALH, BCF i odsetkiem plemników martwych a wskaźnikiem zacięć uzyskany dla jałówek oraz pomiędzy parametrem STR a wskaźnikiem zacięć uzyskany dla jałówek i krów razem (Tabela 3.). W przypadku nasienia konwencjonalnego stwierdzono istotne korelacje pomiędzy parametrami LIN, WOB i ALH a wskaźnikiem zacięć dla krów, oraz pomiędzy parametrami LIN i WOB a wskaźnikiem zacięć dla jałówek i krów razem (Tabela 4.).

Tabela 1. Ilość ATP i parametry ruchu plemników w nasieniu seksowanym.

Lp.	nr buhaja /nr ejakulatu	ATP pMol/20ul	mln plemn. w słomce		VCL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
			ruch post.	ruchome						
1.	1	22,4	1,4	1,7	90,2	92,4	67,5	72,4	2,9	13,8
2.	2	16,9	0,8	1,0	99,0	91,2	62,7	68,0	3,3	13,1
3.	3	31,2	0,4	0,7	114,2	88,8	53,2	59,6	4,6	9,2
4.	4	21,4	0,8	0,9	100,3	90,4	63,6	69,8	3,5	12,7
5.	5	21,0	1,1	1,3	92,1	88,4	60,1	67,5	3,0	13,8
6.	6	16,7	1,2	1,5	105,4	89,6	54,9	60,7	4,1	11,2
7.	7	47,9	2,7	3,3	94,6	89,3	58,2	64,5	3,5	11,5
8.	8	41,2	4,4	6,8	100,0	87,5	55,0	62,3	4,2	8,7
9.	9	23,9	3,4	5,3	82,2	84,5	50,0	58,7	3,5	9,2
10.	10	27,5	1,3	1,8	86,5	89,5	55,3	61,4	3,4	11,5
11.	11	36,4	2,2	2,7	91,5	88,2	57,3	64,4	3,4	11,9
12.	12	16,3	0,9	1,2	100,1	92,9	69,4	74,2	3,4	11,5
13.	13	19,4	3,4	5,2	86,9	86,1	57,2	65,6	3,5	9,9
14.	14	39,3	1,9	2,5	97,5	90,8	61,8	67,4	3,5	11,5
15.	15	16,0	1,0	1,3	99,1	90,9	61,3	66,6	3,5	11,4
16.	16	17,6	1,4	1,9	91,9	88,0	60,5	68,5	3,8	8,4
17.	17	28,3	1,5	1,9	98,1	91,4	67,3	73,1	3,4	11,4
18.	18	23,2	1,3	1,7	109,3	86,8	51,5	58,9	4,5	10,2
19.	19	14,2	1,1	1,4	93,2	89,1	56,3	62,8	3,4	12,3
20.	20/1	20,9	1,0	1,3	98,4	90,2	60,0	65,9	3,5	12,6
21.	20/2	23,3	1,3	1,5	94,8	91,3	61,9	67,2	3,3	13,6
22.	21/1	15,2	1,4	1,7	109,3	89,7	58,0	64,0	4,2	10,5
23.	21/2	16,9	0,4	0,6	109,0	92,3	63,2	67,8	3,8	10,7
24.	22/1	20,3	1,1	1,4	96,2	91,0	62,8	68,6	3,3	12,8
25.	22/2	20,9	1,1	1,4	94,9	91,1	64,8	70,3	3,3	12,0
26.	23	-	1,4	1,9	112,1	89,5	56,0	62,2	4,0	12,6
27.	24/1	15,5	1,2	1,4	104,7	91,4	62,1	67,4	3,6	12,3
28.	24/2	17,7	1,0	1,2	104,9	91,3	65,4	70,9	3,6	11,8
29.	25	16,3	1,3	1,5	105,3	92,0	61,1	65,8	3,4	14,5
30.	26	16,7	1,0	1,2	97,5	89,3	62,6	69,3	3,6	10,8
31.	27	19,6	1,0	1,4	87,1	87,8	58,5	66,1	3,7	8,8
32.	28	10,8	0,9	1,3	88,6	90,3	60,3	66,0	3,1	13,6
33.	29/1	11,4	2,6	3,3	117,8	89,8	61,6	68,0	4,1	11,8
34.	29/2	15,4	2,9	3,7	108,0	90,0	60,4	66,6	3,7	12,6
35.	30	43,3	1,5	1,9	107,9	89,7	57,8	63,7	4,1	10,5
36.	31/1	24,7	1,4	1,7	104,6	87,7	54,3	61,4	3,9	12,2
37.	31/2	26,1	1,4	1,7	101,0	91,3	60,1	65,3	3,6	12,6

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

Lp.	Nr buhaja /nr ejakulatu	Błona komórkowa			Plemniki apoptotyczne	Uszkodzona chromatyna
		żywe	martwe	zamierające		
1.	1	36,7	42,2	21,1	2,2	2,4
2.	2	31,5	51,7	16,8	8,5	1,8
3.	3	25,5	45,3	29,3	0,0	1,1
4.	4	30,6	58,0	11,3	18,1	1,8
5.	5	44,5	43,4	12,1	21,8	9,7
6.	6	42,1	41,0	17,0	2,7	0,5
7.	7	52,2	34,1	13,6	4,6	0,4
8.	8	13,0	84,3	2,7	0,0	56,2
9.	9	9,3	82,5	8,3	6,7	6,6
10.	10	12,4	83,1	4,4	0,0	-
11.	11	43,0	44,4	12,6	4,3	0,5
12.	12	19,1	25,4	55,6	0,0	1,3
13.	13	9,7	80,4	10,0	8,4	2,4
14.	14	41,5	46,1	12,4	1,1	0,3
15.	15	40,1	52,0	7,8	3,6	3,6
16.	16	47,9	50,8	1,3	18,1	0,7
17.	17	55,6	37,9	6,6	39,4	0,9
18.	18	39,8	41,4	18,8	12,5	1,0
19.	19	30,1	56,4	13,5	1,9	1,1
20.	20/1	33,8	59,9	6,4	3,6	0,9
21.	20/2	43,3	49,2	7,5	2,5	1,6
22.	21/1	38,4	51,5	10,1	5,2	1,6
23.	21/2	18,5	65,0	16,5	0,1	1,3
24.	22/1	30,3	56,1	13,6	27,2	1,3
25.	22/2	35,3	50,8	14,0	2,1	2,0
26.	23	44,2	44,8	11,0	2,5	1,1
27.	24/1	34,3	53,2	12,0	23,1	0,6
28.	24/2	25,5	55,4	19,2	1,5	2,5
29.	25	43,1	38,6	18,3	2,9	1,0
30.	26	19,7	36,9	43,4	0,0	1,7
31.	27	31,6	65,4	3,0	8,5	1,5
32.	28	25,2	64,4	10,4	8,4	1,1
33.	29/1	45,7	39,1	15,2	40,6	0,3
34.	29/2	48,6	34,3	17,0	1,1	0,6
35.	30	7,5	84,9	7,7	0,1	58,3
36.	31/1	39,3	46,3	14,3	4,9	2,3
37.	31/2	26,6	48,0	25,4	0,0	2,1

Tabela 3. Korelacje pomiędzy parametrami jakości nasienia seksowanego i wskaźnikiem zacieleń.

parametr	współczynnik korelacji		
	jąłówki	krowy	jąłówki i krowy
STR (indeks prostoliniowości)	NS	NS	0,328 ($p<0,05$)
ALH (amplituda bocznych wychyleń główki)	- 0,388 ($p<0,05$)	NS	NS
BCF (częstotliwość uderzeń wówki)	0,380 ($p<0,05$)	NS	NS
plemniki martwe (%)	- 0,375 ($p<0,05$)	NS	NS

NS – statystycznie nieistotne

Tabela 4. Korelacje pomiędzy parametrami jakości nasienia konwencjonalnego i wskaźnikiem zacieleń.

parametr	współczynnik korelacji	
	krowy	jąłówki i krowy
LIN (indeks liniowości)	0,469 ($p < 0,05$)	0,420 ($p < 0,05$)
WOB (indeks oscylacji)	0,494 ($p < 0,01$)	0,440 ($p < 0,05$)
ALH (amplituda bocznych wychyleń główki)	- 0,410 ($p < 0,05$)	NS

NS – statystycznie nieistotne

Podsumowanie:

Przeprowadzone badania wskazują, że ocena przy użyciu systemu CASA parametrów ruchu plemników STR, ALH i BCF oraz cytometryczna ocena integralności błon komórkowych plemników mogą być przydatne przy określaniu zdolności zapładniającej nasienia seksowanego. W przypadku nasienia konwencjonalnego z płodnością inseminowanych samic skorelowane były parametry ruchu plemników LIN, WOB i ALH.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość określania zdolności zapładniającej nasienia seksowanego i nieseksowanego na podstawie oceny wybranych parametrów jakościowych.

Zadanie 01-19-08-21

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

kierownik zadania: dr inż. Katarzyna Poniedziałek-Kempny

Cel zadania:

W 2021 roku kontynuowano doświadczenia z pierwszego etapu mające na celu wyselekcjonowanie optymalnego suplementu do pożywki do hodowli oocytów, który obniży zawartość lipidów w dojrzałych oocytach świni. Spośród trzech suplementów forskoliny, L-karnityny, siarczanu fenazyny wybrano najlepszy wariant doświadczalny, tj. forskolinę o koncentracji 15 μM .

W drugim etapie prowadzono badania dotyczące selekcji knurów, hodowli *in vitro* oocytów świni z dodatkiem 15 μM forskoliny, oceny oocytów pod względem dojrzałości meiotycznej oraz oceny ilościowej i jakościowej zawartości lipidów, a także poziomu reaktywnych form tlenu (ROS). Przeprowadzono również próby zapłodnienia pozaustrojowego i hodowlę uzyskanych zygot do osiągnięcia stadium blastocysty. Uzyskane blastocysty utrwalono i przeznaczono do oceny jakościowej na podstawie liczby jąder komórkowych i apoptotycznych metodą TUNEL.

Wyniki badań dotyczące dojrzewania oocytów świni w obecności forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny przedstawiono w Tabelach 1.-3.

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

Forskolina	Liczba oocytów ocenionych/liczba powtórzeń	Oocyty dojrzałe (M II) (%)
0 μM	140/12	87,1
10 μM	90/7	84,4
15 μM	64/5	73,4

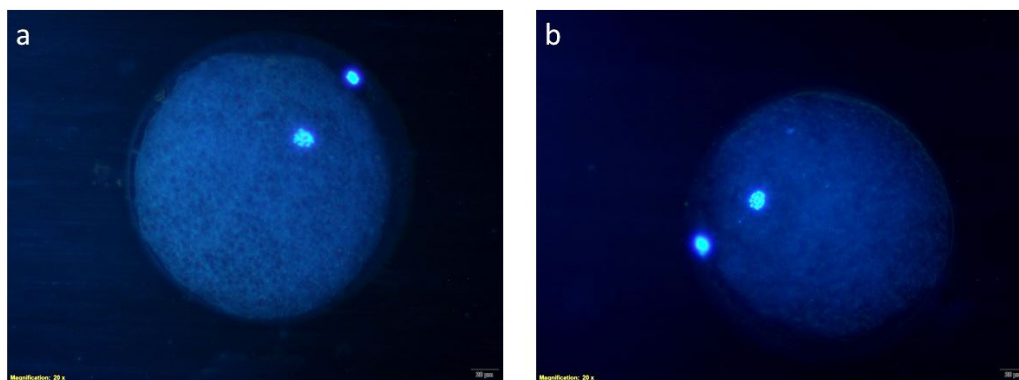
Tabela 2. Ocena dojrzałości oocytów świni hodowanych w medium o dwóch koncentracjach L-karnityny.

L-karnityna	Liczba oocytów ocenionych/liczba powtórzeń	Oocyty dojrzałe (M II) (%)
0 mg	140/12	87,1
0,5 mg	95/8	88,4
1 mg	50/4	94,0

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

Siarczan fenazyny	Liczba oocytów ocenionych/liczba powtórzeń	Oocyty dojrzałe (M II) (%)
0 uM	140/12	87,1
0,025 uM	88/7	87,5
0,05 uM	55/5	81,8

Fot. 1. Oocyt dojrzały w stadium metafazy II w pożywce z dodatkiem 15 uM forskoliny (a) oraz oocyt dojrzały z grupy kontrolnej (b) po wybarwieniu DAPI.



Wyniki dotyczące zawartości reaktywnych form tlenu (ROS) w oocytach dojrzewających w obecności forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny przedstawiono w Tabelach 4.-6.

Tabela 4. Ocena zawartości reaktywnych form tlenu w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach L-karnityny.

L-karnityna	Liczba ocenionych oocytów	Średnia zawartość ROS w oocytach (a.u.)
0 mg	60	8,38a
0,5 mg	58	10,39
1 mg	67	11,51b

a,b: $P < 0,05$

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

Tabela 5. Ocena zawartości reaktywnych form tlenu w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach siarczanu fenazyny.

Siarczan fenazyny	Liczba ocenionych oocytów	Średnia zawartość ROS w oocytach (a.u.)
0 uM	60	8,38 a
0,025 uM	58	20,20 b
0,05 uM	52	17,99 c

a,b;a,c: $P < 0,01$

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

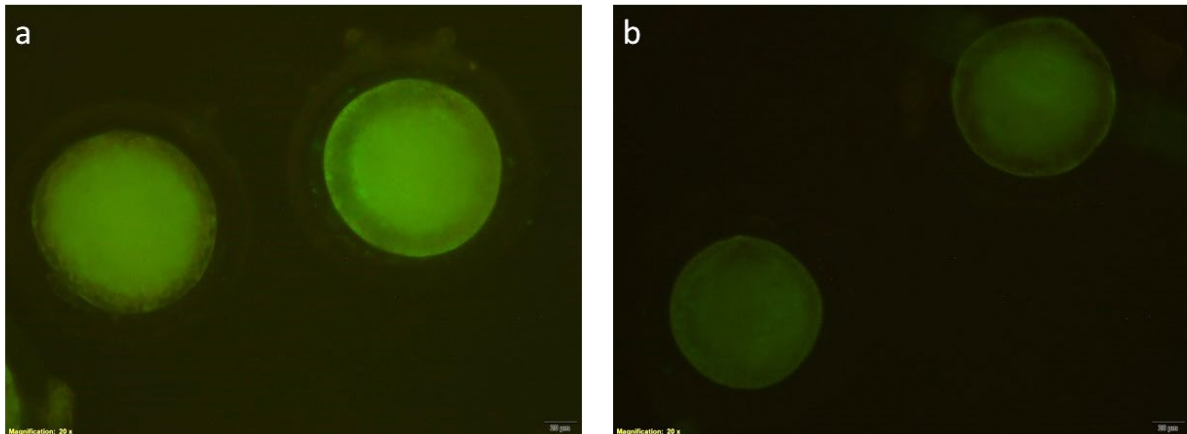
Tabela 6. Ocena zawartości reaktywnych form tlenu w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach forskoliny.

Forskolina	Liczba ocenionych oocytów	Średnia zawartość ROS w oocytach (a.u.)
0 μ M	60	8,4a
10 μ M	61	15,84b
15 μ M	50	16,49c

a,b; a,c: $P < 0.01$

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

Fot. 2. Reaktywne formy tlenu (ROS) w dojrzewających oocytach w pożywce z dodatkiem 15 μ M forskoliny (a) oraz z grupy kontrolnej (b) wybarwionych w roztworze CM-H2DCFDA.



Wyniki dotyczące zawartości lipidów w oocytach dojrzewających w obecności forskoliny, L-karnityny i siarczanu fenazyny przedstawiono w Tabelach 7.-9.

Tabela 7. Zawartość lipidów w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach L-karnityny.

L-karnityna	Średnia zawartość wszystkich lipidów w oocytach (a.u.)
0 mg	46442,69a
0,5 mg	30445,38b
1 mg	41543,51c

a,c; b,c: $P < 0.01$

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

Tabela 8. Zawartość lipidów w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach siarczanu fenazyny.

Siarczan fenazyny	Średnia zawartość wszystkich lipidów w oocytach (a.u.)
0 μ M	46442,69a
0,025 μ M	34813,78b
0,05 μ M	46232,10c

a,c; b,c: $P < 0.01$

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

Tabela 9. Zawartość lipidów w oocytach hodowanych w dwóch różnych koncentracjach forskoliny.

Forskolina	Średnia zawartość wszystkich lipidów w oocytach (a.u.)
0 μ M	46442,69a
10 μ M	36996,71b
15 μ M	41163,72c

a,b; a,c: $P < 0.01$

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

Podsumowanie wyników badań:

1. Ocena dojrzałości *in vitro* oocytów świni.
 - Nie wykazano statystycznych różnic w odsetku dojrzałych oocytów świni (stadium MII) między grupami doświadczalnymi, w których zastosowano forskolinę o 10 μM , jak i 15 μM w stosunku do grupy kontrolnej.
 - Nie stwierdzono różnic w odsetku dojrzałych oocytów osiągających stadium MII między grupą doświadczalną, w której zastosowano dodatek L-karnityny (w obu koncentracjach 0.5 mg i 1 mg) w stosunku do grupy kontrolnej.
 - Odsetek dojrzałych oocytów świni (MII) w grupach doświadczalnych, w których zastosowano koncentrację 0.025 μM oraz 0.05 μM siarczanu fenazyny nie różnił się od grupy kontrolnej.
2. Pomiar reaktywnych form tlenu (ROS) w dojrzałych *in vitro* oocytach świni.
 - Suplementacja pożywki do dojrzewania oocytów świni L-karnityną, siarczanem fenazyny lub forskoliną wpłynęła na zwiększenie reaktywnych form tlenu w dojrzewających oocytach.
3. Ocena jakościowa i ilościowa lipidów w oocytach świni dojrzałych *in vitro*.
 - Wykazano niższą zawartość lipidów w oocytach dojrzałych z grupy doświadczalnej o wyższej koncentracji L-karnityny w stosunku do oocytów z grupy kontrolnej.
 - Najniższą zawartość lipidów posiadały oocyty dojrzewające z dodatkiem najniższej koncentracji L-karnityny (0.5 mg).
 - Stwierdzono niższą zawartość lipidów w grupie doświadczalnej, w której zastosowano dodatek 0.025 μM siarczanu fenazyny w stosunku do grupy doświadczalnej, w której zastosowano wyższą koncentrację siarczanu fenazyny oraz do oocytów z grupy kontrolnej.
 - Wykazano niższą zawartość lipidów w grupach doświadczalnych zarówno o niższej jak i wyższej koncentracji forskoliny w stosunku do oocytów z grupy kontrolnej.
 - Zastosowane dodatki pod postacią L-karnityny, siarczanu fenazyny lub forskoliny do pożywki do dojrzewania oocytów świni wpłynęły na obniżenie zawartości lipidów.

Zadanie 01-19-09-11

*Kompleksowa analiza epigenetyczna zmian zachodzących w komórkach MSC konia poddanych różnicowaniu *in vitro* w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty.*

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

Cel zadania:

Kompleksowa analiza profilu ekspresji genów oraz procesów regulujących aktywność transkrypcyjną komórek MSC zróżnicowanych i niezróżnicowanych.

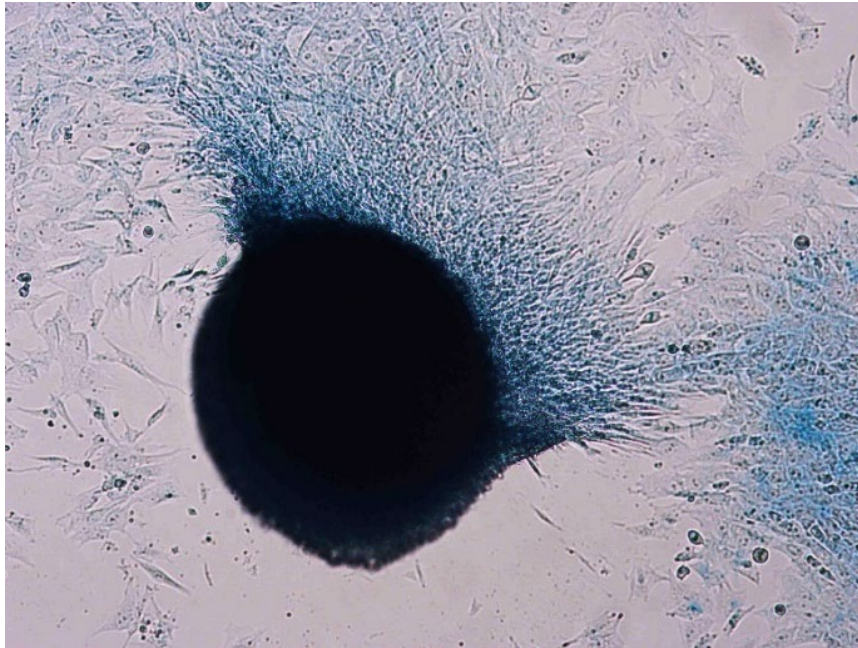
Założenia metodyczne:

Do doświadczenia użyto komórki MSC zamrożone, wcześniej pozyskane od koni po uboju. Komórki po rozchodowaniu, poddano ocenie stopnia multipotencji metodą cytometrii przepływej oraz różnicowaniu w kierunku osteoblastów, chondrocytów i adipocytów. Zróżnicowane komórki po ok. 21 dniach hodowli *in vitro* zostały poddane barwieniu. Hodowle komórek MSC oraz zróżnicowane zostały odpowiednio zakończone, a komórki po przeliczeniu i zawieszeniu w odpowiednich buforach przygotowane do dalszych analiz molekularnych (RNA-Seq, ATAC-Seq i RRBS).

Syntetyczny opis wyników:

Dla wszystkich próbek (3-5 powtórzeń dla każdej linii A+O+Ch oraz Kontroli czyli MSC) wykonano wysokoprzepustową analizę NGS dla trzech aplikacji – RNA-seq; ATAC-seq; RRBS. Część próbek wykorzystano na optymalizację metod.

Fot. 1. Fotografia przedstawia zróżnicowane komórki MSC konia w chondrocyty po barwieniu Alcian Blue.

**Zadanie 04-19-10-21**

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

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

W rezultacie prac przeprowadzonych w ubiegłym roku, z 15 loch biorczyń wyprosiło się 8. Od biorczyń uzyskano 47 potencjalnie transgeniczných prosiąt.

Po odsadzeniu, od prosiąt pobrano biopaty tkanki usznej, które 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 47 przekazanych biopatów wykazał, że u loszki 393 stwierdzono knock-out genu miostatyny.

Przeprowadzone wstępne analizy wykonane na DNA uzyskanym z biopatu usznego potwierdziły, że jeden *allel* genu MSTN pozostał prawidłowy, ale drugi ma delecję 3 nt i insercję 8 nt. Suma +5 nt sprawiła, że zmieniła się ramka odczytu i tym samym jeden *allel* został znokautowany.

W 2021 roku kontynuowano prace mające na celu uzyskanie kolejnych, potencjalnie transgeniczných prosiąt.

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

Od 30 stymulowanych hormonalnie dawczyń zygot uzyskano 264 zapłodnione komórki jajowe o prawidłowej budowie morfologicznej, które poddano transfekcji.

Konstrukcję genową KO MSTN I (na bazie DNA) wprowadzono na drodze mikroiniekcji do jednego z przedjądrzy 264 uzyskanych zygot. 261 zygot po transfekcji i ocenie morfologicznej przeniesiono do jajowodów 10 zsynchronizowanych loch biorczyń. Badania na prośność przeprowadzone w 35. dniu od transferu wykazały, że 6 biorczyń (M1-21-M6-21) jest prośnych. Oproszczenia nastąpią pod koniec stycznia i na początku lutego 2022 roku. Pozostałe 4 biorczyń będą badane w połowie stycznia 2022 roku.

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

Cel zadania:

Zastosowanie modulatorów epigenetycznych nowej generacji z grupy selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 na potrzeby opracowania innowacyjnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni domowej.

Założenia metodyczne i syntetyczny opis wyników:

W pierwszym etapie realizacji niniejszego zadania badawczego rozwinięto sieć efektywnej współpracy 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 współpracy wymienionych naukowych ośrodków biotechnologicznych, biologicznych i biomedycznych stworzono biorezerwar stabilnych mitotycznie, proteomicznie scharakteryzowanych i zabezpieczonych kriogenicznie linii transgenicznych i nietransgenicznych komórek pochodzenia skórno-powłokowego (fibroblasty, keratynocyty) oraz pochodzenia jajnikowego (komórki macierzyste), które stanowią potencjalne źródło modulowanych lub niemodulowanych epigenetycznie komórek-dawców jąder do zabiegów generowania klonalnych zarodków świni domowej techniką transplantacji jąder komórkowych do enukleowanych oocytów (SCNT, ang. *somatic cell nuclear transfer*).

W następnej kolejności, z dostępnego biorezerwaru linii komórkowych o wysokim potencjale proliferacyjnym w warunkach hodowli pozaustrojowych wyselekcjonowano linie komórek fibroblastycznych pochodzenia skórno-powłokowego do drugiej rundy prac badawczych, których celem było opracowanie oryginalnej technologii pozaustrojowego uzyskiwania klonalnych zarodków świni w wyniku rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder ekspandujących ex vivo fibroblastów dermalnych, które zostały uprzednio poddane 24-godzinnej transformacji epigenomowej, indukowanej za pośrednictwem nowego, nie stosowanego dotąd w klonowaniu somatycznym świń, modulatora epigenetycznego. Transformacja epigenomowa fibroblastycznych komórek-dawców jąder została przeprowadzona przy zastosowaniu przedstawiciela rodziny selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny K4 histonów H3 chromatyny jądrowej – trans-2-fenylocyklopropyloaminy (translcyprominy; 2-PCPA/TCP) w dawce stężeniowej 4 µM/L. Komórki fibroblastyczne, które poddano 2-PCPA/TCP-zależnej modulacji epigenetycznej, stanowiły źródło dawców jąder w wieloetapowych zabiegach klonowania somatycznego, obejmujących wyrafinowane procedury mikrochirurgiczne na uzyskanych, w wyniku pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego, oocytach-biorcach jąder fibroblastów dermal-

nych, takie jak: 1) enukleacja dojrzałych *in vitro* oocytów, 2) rekonstrukcja enukleowanych oocytów (ooplastów) z jąder komórek somatycznych złożona z mikroiniekcji komórek-dawców jąder do przestrzeni okołozótkowej ooplastów oraz elektrofuzji utworzonych kompleksów ooplast-komórka fibroblastyczna, a także 3) jednoczesna aktywacja elektryczna zrekonstruowanych oocytów (hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych, czyli cybryd klonalnych).

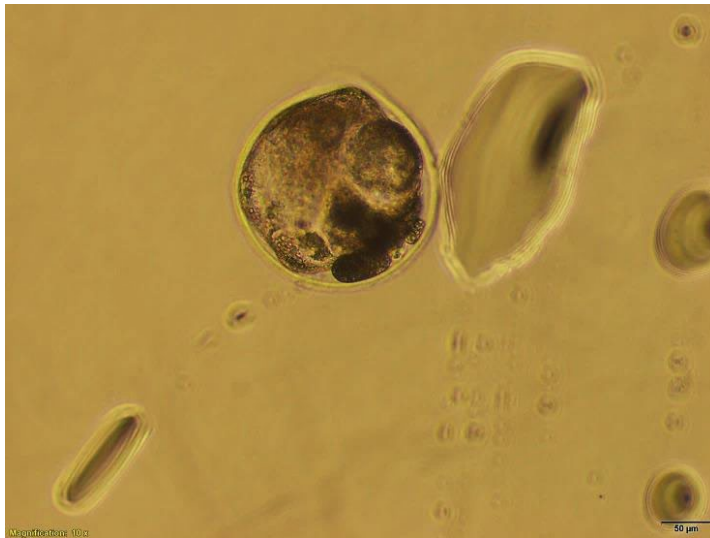
W wyniku enukleacji, rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder transformowanych epigenetycznie fibroblastów dermalnych oraz sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów wygenerowano ogółem 47 zarodków klonalnych, które następnie hodowano *in vitro* przez 144 do 168 godzin. Spośród 47 hodowanych zarodków klonalnych, aktywność podziałową wykazywało łącznie 43 (91,5%) zarodków, a do stadiów moruli i blastocysty (Rycina 1.) rozwinęło się, odpowiednio: 34 (72,3%) oraz 16 (34,0%) zarodków. W grupie kontrolnej, w następstwie enukleacji, rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder nietransformowanych epigenetycznie fibroblastów dermalnych oraz sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów uzyskano łącznie 58 zarodków klonalnych, których potencjał rozwojowy charakteryzował się następującymi parametrami: zdolność bruzdkowania: 41/58 (70,7%), zdolność do osiągnięcia stadium moruli: 27/58 (46,6%) oraz zdolność do osiągnięcia stadium blastocysty (Rycina 2.): 9/58 (15,5%).

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

Rycina 1. Klonalna blastocysta świni w finalnym stadium procesu wylęgania z osłonki przejrzystej – uzyskana z hodowanego *in vitro* zarodka zrekonstruowanego z jądra dermalnej komórki fibroblastycznej, poddanej 2-PCPA/TCP-zależnej transformacji epigenetycznej.



Rycina 2. Ekspandująca blastocysta klonalna świni – uzyskana z hodowanego *in vitro* zarodka zrekonstruowanego z jądra niemodulowanej epigenetycznie komórki fibroblastycznej pochodzenia dermalnego.



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 embrionalnej u zwierząt gospodarskich, a także w zakresie badań interdyscyplinarnych na styku biologii i biotechnologii molekularnej oraz biomedycyny. W ramach realizacji prac badawczych w 2021 roku opublikowano do chwili obecnej 5 artykułów naukowych w renomowanym czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (140 pkt. MEiN; IF = 5,924; IF (5-letni) = 6,132).

Zadanie 04-19-12-11

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

kierownik zadania: dr hab. Monika Trzcńska

Istotną funkcją banków materiału biologicznego jest nie tylko systematyczne powiększanie puli rezerwy genetycznej, ale również przeprowadzanie oceny jakości zgromadzonego w nim materiału. Okresowe badania zgromadzonego w banku materiału genetycznego powinny więc stanowić obowiązkową praktykę, pozwalającą zweryfikować zasadność jego dalszego przechowywania i możliwości wykorzystania w praktyce.

Bank Materiałów Biologicznych (centrum przechowywania nr 12062301) powstał na terenie Instytutu w 1968 roku w celu gromadzenia materiału biologicznego w postaci nasienia buhajów. Zasoby Banku Materiałów Biologicznych IZ PIB nie były dotąd oceniane przy wykorzystaniu nowoczesnych metod diagnostyki andrologicznej. W związku z powyższym, głównym celem zadania jest ocena jakości kriokonserwowanego nasienia buhajów, przeprowadzona

na podstawie analizy standardowych parametrów plemników, jak również oceny zmian apoptotycznych i aktywności metabolicznej plemników oraz oceny chromatyny plemnikowej.

W 2021 roku badania przeprowadzono na 84 ejakulatach pochodzących od 28 buhajów rasy polskiej czarno-białej oraz polskiej czerwonej. Przeprowadzono ocenę parametrów standardowych, tj. koncentracja, ruchliwość (po rozmrożeniu oraz dwóch godzinach inkubacji w temp. 37°C) oraz ocenę zmian apoptotycznych, aktywności metabolicznej plemników i stopnia uszkodzeń DNA plemników.

Wyniki:

Ocena parametrów jakościowych plemników buhajów rasy polskiej czarno-białej oraz polskiej czerwonej została przeprowadzona na nasieniu kolekcjonowanym w latach 1966–1987. Wyniki badań przedstawiono w Tabelach 1., 2., 3. oraz Tabeli 4. Średnia całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu wahała się w przedziale od $30,9 \pm 12,3\%$ do $77,7 \pm 8,7\%$ i od $13,7 \pm 5,7$ do $74,1 \pm 7,7\%$ odpowiednio dla buhajów rasy polskiej czarno-białej i polskiej czerwonej (Tabela 1., Tabela 3.). Odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA w obu rasach nie przekraczał 3%, podczas gdy odsetek plemników apoptotycznych wynosił od $2,0 \pm 0,5$ do $5,7 \pm 2,6\%$ (Tabela 2., Tabela 4.). Najwyższy poziom ATP w plemnikach spośród wszystkich analizowanych ejakulatów, stwierdzono u buhaja rasy polskiej czarno-białej, który wynosił $58,0 \pm 13,5$ pMol (Tabela 2., Tabela 4.).

Tabela 1. Wyniki oceny standardowych parametrów jakości nasienia buhajów rasy polskiej czarno-białej.

Nazwa buhaja	Numer buhaja	Data produkcji	Koncentracja w kulce/słonce	Ruchliwość		Ruchliwość po 2 h od rozmrożenia plemników		% spadek ruchliwości po 2 h od rozmrożenia plemników	
				TM%	PM%	TM%	PM%	TM	PM
Figo	PL000604307919	1985	372,0±75,0	51,9±8,6	41,3±6,8	40,3±1,8	30,8±3,1	21,1±12,9	23,9±15,2
Wierfel	PL000603953919	1983-1985	301,1±24,8	42,8±10,1	33,8±8,5	32,8±6,6	27,7±6,3	22,7±3,8	17,8±2,3
Pedant	PL000601300314	1973	416,4±68,4	38,0±5,1	27,8±4,2	32,6±8,4	27,0±4,6	15,4±12,6	3,2±2,4
Irak	PL000604138618	1984	269,2±61,4	46,5±11,9	37,7±11,6	37,1±10,3	29,0±11,7	20,4±2,0	24,1±13,1
Kerbes	PL000604498912	1984	312,6±80,6	43,8±2,4	33,3±1,0	42,6±4,1	33,3±1,0	8,9±1,0	17,2±9,1
Dofun	PL000603957915	1982-1983	420,4±113,2	54,2±9,6	42,2±10,4	32,5±10,1	24,1±6,2	37,1±29,2	40,0±25,5
Serek	PL000609219513	1975-1976	289,6±15,3	58,5±7,3	47,0±4,5	37,6±11,8	40,1±4,2	36,7±11,6	14,7±1,2
Funt	PL000604307919	1984	305,6±32,4	30,9±12,3	23,6±11,4	21,0±10,6	15,9±9,4	33,8±22,6	35,3±23,2
Kurant	PL000604258916	1984	384,6±21,3	56,7±2,0	26,7±4,3	42,1±6,0	20,1±8,1	25,9±8,0	22,2±10,5
Domal	PL000603961314	1984	327,1±22,8	77,7±8,7	49,8±8,3	67,0±24,0	35,0±15,0	15,5±5,8	32,1±10,9
Uskok	PL000609077719	1977-1978	372,4±75,3	70,2±19,2	43,6±18,8	46,8±18,8	23,8±13,3	35,2±11,2	47,8±8,9
Dokemil	PL000604663317	1982-1985	428,3±197,7	68,7±4,7	40,0±7,1	51,1±7,3	26,4±6,2	25,7±8,8	33,9±11,9
Arpet	PL000604678875	1985	663,6±246,5	77,4±8,0	41,0±5,0	42,7±6,5	17,3±3,7	44,0±14,4	56,7±15,1
Kulek	PL000604427117	1983	407,3±66,2	65,2±7,3	32,4±9,1	50,6±12,5	25,0±8,8	23,0±13,1	24,0±5,9

TM% – odsetek plemników wykazujących ruch całkowity; PM% – odsetek plemników wykazujących ruch postępowy.

Tabela 2. Wyniki oceny zmian apoptotycznych, aktywności metabolicznej plemników oraz oceny chromatyny plemnikowej buhajów rasy polskiej czarno-białej.

Nazwa buhaja	Numer buhaja	Chromatyna plemnikowa	YO-PRO-1/PI (%)			JC-1 (%)		ATP pMol/ 10 ul nasienia	
			DF%	żywe	apoptoza	martwe	high		low
Figo	PL000604307919	0,4±0,1		54,7±7,6	2,3±0,3	43,0±7,6	60,0±4,0	40,0±4,0	48,3±7,2
Wiertel	PL000603953919	0,4±0,2		47,0±8,3	4,5±1,3	48,5±9,3	48,8±7,9	51,2±7,9	32,0±7,5
Pedant	PL000601300314	0,4±0,3		42,6±4,2	3,0±1,5	54,4±2,9	45,0±2,2	55,0±2,2	26,2±1,7
Irak	PL000604138618	0,4±0,1		50,3±11,1	3,0±1,0	46,7±11,2	50,3±11,6	49,7±11,6	31,7±8,5
Kerbes	PL000604498912	2,7±1,1		52,7±17,4	3,3±1,3	44,0±16,8	52,5±3,6	47,5±3,6	22,9±11,3
Dofun	PL000603957915	0,3±0,2		56,2±5,5	3,7±1,5	40,2±6,3	57,0±9,7	43,0±9,7	49,1±12,8
Serek	PL000609219513	0,4±0,2		58,8±4,5	3,8±1,0	37,3±5,6	61,3±6,7	38,7±6,7	31,3±4,9
Funt	PL000604307919	0,4±0,1		34,3±11,2	4,3±1,5	61,3±10,4	35,0±11,0	65,0±11,0	29,7±6,5
Kurant	PL000604258916	0,4±0,1		59,3±1,9	4,2±0,8	36,5±1,5	58,3±0,8	41,7±0,8	34,4±5,2
Domal	PL000603961314	0,4±0,1		79,7±8,8	3,0±0,5	17,3±9,2	79,5±9,1	20,5±9,1	42,6±11,3
Uskok	PL000609077719	0,2±0,1		73,3±18,7	3,5±0,5	23,2±18,2	74,3±19,2	25,7±19,2	51,1±30,9
Dokemil	PL000604663317	0,2±0,1		71,5±3,8	3,0±0,5	25,5±4,3	70,8±4,7	29,2±4,7	55,4±19,7
Arpet	PL000604678875	0,6±0,1		79,5±7,5	3,5±0,5	17,0±7,0	80,0±7,7	20,0±7,7	58,0±13,5
Kulek	PL000604427117	0,3±0,2		68,0±6,1	3,0±0,5	29,0±5,7	68,2±6,9	31,8±6,9	33,9±9,2

DFI% – odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA; YO-PRO-1 – barwienie w celu weryfikacji stanu błon plazmatycznych plemników; JC-1% – odsetek plemników wykazujących niską lub wysoką aktywność metaboliczną; ATP – poziom ATP w plemnikach.

Tabela 3. Wyniki oceny standardowych parametrów jakości nasienia buhajów rasy polskiej czerwonej.

Nazwa buhaja	Numer buhaja	Data produkcji	Koncentracja w kulce/słonce	Ruchliwość		Ruchliwość po 2 h od rozmrożenia plemników		% spadek rychliwości po 2 h od rozmrożenia plemników	
				TM%	PM%	TM%	PM%	TM	PM
Kabul	PL000600005638	1968	187,5±92,2	41,5±13,2	32,6±13,1	29,4±10,4	20,9±9,3	29,9±6,8	36,6±4,0
Napoleon II	PL000609004966	1966	103,8±22,7	13,7±5,7	8,4±4,7	12,5±7,1	6,4±2,2	32,2±15,5	58,7±22,3
Urwis	PL000600008830	1967	343,3±128,1	46,0±17,7	35,7±15,9	37,3±16,6	29,5±17,4	2,6±10,5	21,2±18,6
Unik	PL0006603315630	1981	242,0±70,6	43,4±0,6	33,8±1,0	33,6±1,7	20,3±1,3	22,6±3,2	39,9±2,9
Inspektor	PL000600900531	1966	296,8±63,5	53,5±8,1	46,5±8,0	40,9±6,2	23,5±2,6	34,0±10,5	28,0±11,6
Iks	PL000603316939	1966	314,7±96,5	62,7±9,2	54,7±12,5	51,3±2,9	43,3±4,5	17,0±13,2	19,3±10,6
Ursus	PL000603304938	1981	385,8±46,6	52,0±12,9	40,8±17,9	38,2±8,1	36,6±18,4	26,0±5,1	12,0±6,5
Pastor	PL000600906030	1980	420,7±138,8	67,4±8,67	47,5±6,1	51,4±12,2	44,1±7,1	24,2±10,8	7,4±3,0
Pająk	PL000600904632	1975	404,0±235,1	53,9±13,9	38,0±12,8	37,8±11,8	25,2±10,2	30,5±7,1	34,9±6,8
Biegły	PL0006000906135	1978	334,7±137,2	66,3±7,1	45,0±7,7	57,6±8,4	34,1±4,7	13,3±6,2	23,7±4,3
Mir	PL000603204336	1987	272,2±51,0	65,3±18,9	47,9±15,3	47,9±14,4	34,3±11,2	26,7±1,7	28,6±1,3
Blok	PL000603308639	1980	273,7±51,7	74,1±7,7	54,1±9,7	63,0±9,7	47,7±4,2	15,3±11,0	12,4±7,1
Baton	PL000603308534	1981	464,2±114,8	66,2±4,8	49,6±6,5	59,1±6,4	43,9±5,3	10,6±8,1	11,1±10,2
Latarnik	PL000600072932	1970	935,9±59,45	47,1±3,3	31,3±3,7	20,7±4,4	10,4±2,8	56,3±6,4	67,1±4,9

TM% – odsetek plemników wykazujących ruch całkowity; PM% – odsetek plemników wykazujących ruch postępowy.

Tabela 4. Wyniki oceny zmian apoptotycznych, aktywności metabolicznej plemników oraz oceny chromatyny plemnikowej buhajów rasy polskiej czerwonej.

Nazwa buhaja	Numer buhaja	Chromatyna plemnikowa	YO-PRO-1/PI (5%)				JC-1 (%)		ATP pMol/ 10 ul nasienia
			żywe	apoptoza	martwe		high	low	
Kabul	PL000600005638	DFI%	42,2±13,0	5,7±2,6	52,2±10,6		43,5±13,3	56,5±13,3	53,3±9,2
Naoleon II	PL000609004966		27,2±5,9	5,7±1,6	67,2±5,0		29,0±6,6	71,0±6,6	36,8±7,9
Urwis	PL000600008830		47,5±18,4	4,0±0,5	48,5±17,9		49,2±17,8	50,8±17,8	46,1±5,2
Unik	PL000603315630		44,8±1,8	4,3±1,0	50,8±2,3		46,8±1,6	53,2±1,6	30,7±3,1
Inspektor	PL000600900531		55,2±7,6	3,2±0,8	41,7±6,9		57,7±5,6	42,3±5,6	35,4±6,4
IkS	PL000603316939		64,8±8,9	4,0±0,5	31,2±9,4		64,8±10,1	35,2±10,1	36,4±6,6
Ursus	PL000603304938		53,8±13,0	4,2±1,3	42,0±11,8		54,8±12,8	45,2±12,8	25,9±8,1
Pastor	PL000600906030		69,3±8,7	2,5±0,5	28,2±8,4		71,3±8,1	28,7±8,1	26,7±3,6
Pająk	PL000600904632		55,5±12,6	4,2±0,8	40,3±12,1		56,5±12,6	43,5±12,6	21,5±2,9
Biegły	PL0006000906135		67,7±6,5	4,8±1,0	27,5±6,6		68,2±6,5	31,8±6,5	42,8±9,6
Mir	PL000603204336		67,0±17,8	4,2±0,8	28,8±17,9		68,7±18,9	31,3±18,9	27,0±16,9
Błok	PL000603308639		77,0±8,7	2,0±0,5	21,0±8,3		77,8±6,3	22,2±6,3	27,6±7,1
Baton	PL000603308534		67,3±5,2	2,3±0,8	30,3±5,0		68,2±4,7	31,8±4,7	23,1±8,0
Łatarnik	PL000600072932		48,7±4,2	3,0±0,5	48,3±3,8		49,8±4,5	50,2±4,5	14,5±1,9

DFI% – odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA; YO-PRO-1 – barwienie w celu weryfikacji stanu błon plazmatycznych plemników; JC-1% – odsetek plemników wykazujących niską lub wysoką aktywność metaboliczną; ATP – poziom ATP w plemnikach.

Zadanie 04-19-13-11

Optymalizacja metod izolacji i kriokonserwacji komórek zarodkowych kaczek.

kierownik zadania: dr hab. Mirosław Lisowski

Opracowanie metod izolacji komórek zarodkowych kaczek umożliwi skuteczną kriokonserwację nie tylko nasienia, ale także materiału genetycznego w postaci komórek zarodkowych pozyskanych od przedstawicieli poszczególnych stad zachowawczych.

Badania nad wykorzystaniem możliwości komórek blastodermalnych ptaków prowadzone są od wielu lat. Mogą być pobierane we wczesnych fazach rozwoju embrionalnego, przenoszone z zarodków dawców do zarodków biorców, mogą brać udział w tworzeniu somatycznych tkanek i kolonizować gonady biorców, utrzymywane *in vitro* przez wiele dni, przechowywane po zamrożeniu, transfekowane i wykazywać ekspresję obcych genów. Dotychczasowe prace dotyczyły jednak wykorzystania komórek blastodermalnych, pozyskanych z tarczki zarodkowych jaj kurzych. Ze względu na to, że w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach utrzymywanych jest sześć rodów kaczek objętych programem ochrony zasobów genetycznych, za celowe wydaje się opracowanie i optymalizacja izolacji i kriokonserwacji komórek blastodermalnych pozyskanych z jaj kaczek w celu zachowania bioróżnorodności ptaków – dawców BCs.

Materiałem badawczym były komórki BCs pozyskane z tarczki zarodkowych jaj kaczek, utrzymywanych w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach należącej do Instytutu Zootechniki PIB. Są to ptaki utrzymywane w ramach stad objętych ochroną zasobów genetycznych kaczek (pekin krajowy P-33; pekin angielski linia-syntetyczna Ls-A; pekin duński P-8; pekin francuski P-9; mieszaniec Kh0-1; kaczka pomniejszona K-2). Z rozbitego jaja usuwano białko, a następnie na błonę witelinową (bezpośrednio nad tarczką zarodkową) nakładano krążek bibuły. Pozwoliło to na wycięcie przytwierdzonego do krążka fragmentu błony wraz z tarczką zarodkową. Po mechanicznym oczyszczeniu tarczki zarodkowej z żółtka, komórki wchodzące w skład tarczki zarodkowej zostały splukane do probówki przy użyciu strzykawki z PBS. Oczyszczenie komórek z resztek żółtka i fragmentów błony witelinowej odbywało się poprzez zwirowanie i zebranie warstwy komórek blastodermalnych, układających się płaszczem na powierzchni zwirowanego osadu. Po usunięciu supernatantu, do komórek z pozyskanych z dwudziestu tarczki zarodkowych z każdej grupy genetycznej, dodano 1ml pożywki hodowlanej DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz antybiotyków – penicyliny i streptomycyny (Penistrep). Jako środka osłaniającego, do pożywki dodano również DMSO (Dimetylosulfotlenek) lub DMF (Dimetyloformamid), należące do grupy niskocząsteczkowych krioprotektorów. W celu określenia koncentracji komórek, 20µl zawiesiny umieszczono w komorze Bürkera i zliczono. Tak przygotowane komórki umieszczono w 0,25 ml słómkach (IMV ref. A 201, AAA 414), wolny koniec pajetki zamykano polivinylem pyrrolidonu (PVP) (IMV ref. A 508) i umieszczano je nad lustrem ciekłego azotu i schłodzono do temperatury 140°C. Następnie słomki przenoszono do ciekłego azotu. Próbkę rozmrażano przez umieszczenie słomki w temperaturze +20°C. Po całkowitym rozmrożeniu, DMSO wypłukiwano przez stopniowe dodawanie (w 30 sekundowych odstępach) do 0,5 ml zawiesiny, odpowiednio: 0,1; 0,2; 1,0 i 8,0 ml pożywki hodowlanej. Medium usuwano poprzez wirowanie mieszaniny komórek z prędkością 3000 rpm przez 3 minuty. Komórki ponownie zawieszano w 0,2 ml świeżej pożywki hodowlanej. Przeżywalność komórek określono na podstawie barwienia błękitem trypanu.

W Tabeli 1. przedstawiono wyniki zamrażania/rozmrażania kaczek komórek blastodermalnych. Nie wykazano istotnego wpływu krioprotektora (DMF, DMSO), ani też pochodzenia komórek blastodermalnych (grupa genetyczna-ród) na procent żywych BCs po rozmrożeniu.

Tabela 1. Wpływ krioprotektora (DMF, DMSO) i pochodzenia (grupa genetyczna) kaczyc komórek blastodermalnych na ich przeżywalność po zamrożeniu/ rozmrożeniu.

Pochodzenie (Ród)	Krioprotektant	Procent komórek		
		żywych	martwych	
			z nieuszkodzoną błoną komórkową	z uszkodzoną błoną komórkową
P33	DMF	58,0	31,0	11,0
	DMSO	48,0	36,0	16,0
średnio		53,0	33,5	13,5
P8	DMF	47,0	32,0	21,0
	DMSO	41,0	39,0	20,0
średnio		44,0	35,5	20,5
LsA	DMF	49,0	26,0	25,0
	DMSO	48,0	32,0	20,0
średnio		48,5	29,0	22,5
Kh0-1	DMF	52,0	35,0	13,0
	DMSO	45,0	40,0	15,0
średnio		48,5	37,5	14,0