

Zakłady Naukowe

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

01-10-02-11

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

kierownik zadania: dr inż. Piotr Topolski

W ramach realizacji zadania, kontynuowano charakterystykę opisową dotyczącą danych fenotypowych, genetycznych i rodowodowych, gromadzonych w bazach Instytutu Zootechniki PIB oraz prowadzono analizę genomu. Wyniki tych analiz posłużyły do modyfikacji algorytmu pozwalającego na optymalizację wyboru zwierząt do pobierania materiału biologicznego. W bazie PLOWET gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych IZ PIB. Spośród ok. 11500 rekordów – najczęściej jako pojedyncza choroba – występowało *mastitis* (7021 przypadków), *metritis* (2812 przypadków) oraz cysty jajnika (1660 przypadków). W instytutowej bazie znajdują się genotypy ok. 3800 krów z zakładów doświadczalnych. Z tej liczby blisko 3000 krów znajduje się na liście zwierząt odnotowanych w bazie PLOWET.

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

Kontynuowano również badania z zakresu analizy genomu, m.in. analizę asocjacyjną (GWAS), pomiędzy markerami genetycznymi SNP a w/w cechami (schorzeniami). Do analizy użyto wartości fenotypowych cech *mastitis*, *metritis* i torbiele jajnika, które były dostępne dla około 1500 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 7 931 SNP. Genotypy osobników zgenotypowanych przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineLD Genotyping BeadChip zostały zimputowane do gęstości mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip. W dalszej analizie wykorzystano polimorfizmy o minimalnej wartości $MAF > 1\%$ oraz minimalnej jakości genotypowania $> 99\%$. Kryteria te spełniło 46 216 SNP. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 72 SNPs statystycznie istotnych, związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 21 genów kandydujących, związanych z występowaniem tych schorzeń.

W poprzednich latach sprawozdawczych wystąpiły okresowe utrudnienia w pobieraniu tkanek do badań molekularnych od części wytypowanych zwierząt, związane z brakiem możliwości współpracy z ubojniami i/lub lekarzami weterynarii wynikającymi z nałożonych kwarantann. W związku z tym zwiększono liczbę zwierząt, od których pobierano tkanki. Pobrany materiał badawczy posłużył m.in. analizie jakościowej i optymalizacji metody izolacji RNA. Z części zebranych próbek nie udało się wyizolować RNA, co wymaga uzupełnienia materiału biologicznego. W okresie sprawozdawczym zrealizowano prace nad optymalizacją modelu szacowania parametrów genetycznych i wartości hodowlanej pod względem cech zdrowotnych, zgodnie z najnowszymi zaleceniami grupy Eurogenomics, wg tzw. *Golden Standard*. Predykcja genomowych wartości hodowlanych (GEBV) została przeprowadzona przy pomocy modelu jednostopniowego (ang. *single-step GBLUP* – *ss-GBLUP*). Model *ss-GBLUP* ma następującą postać:

$$y = Xb + Wa + e, \quad (1),$$

gdzie y jest wektorem wartości fenotypowych dla każdej z trzech rozważanych cech, b jest wektorem efektów stałych, natomiast a jest wektorem złożonym z wartości hodowlanych, e jest wektorem błędów. Struktura kowariancji efektów losowych ma następującą postać: $a \sim N(0, H \otimes P)$ i $e \sim N(0, R \otimes D)$. Macierz P jest macierzą (ko)wariancji dla efektów a , natomiast macierz D jest macierzą (ko)wariancji dla efektów e . Dodatkowo, dla każdej z cech została wykonana korekta na heterogeniczność wariancji przy pomocy metody nr 2, uwzględnionej w zło- tym standardzie opracowanym przez konsorcjum Eurogenetics. Macierz H ma postać:

$$\begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G - A_{22} \end{bmatrix}, \quad A_{11}, \quad A_{12}/A_{21} \quad \text{ i } \quad A_{22}$$

są odpowiednio komponentami macierzy spokrewnień korespondującymi do niezgenotypowanych kowariancji pomiędzy zgenotypowanymi i niezgenotypowanymi oraz zgenotypowa- nych osobników. G reprezentuje macierz podobieństwa genetycznego pomiędzy zgenotypo- wanymi osobnikami. R jest macierzą diagonalną. Wszystkie obliczenia były przeprowadzone przy użyciu programu BLUP90IOD3 z rozwiązaniami równań dla PCG (Tsuruta *et al.*, 2001). Otrzy- mano następujące wyniki:

Kowariancja genetyczna (P) i błędów (D):

$$P = \begin{bmatrix} 0.033 & 0.002 & 0.019 \\ 0.002 & 0.026 & 0.023 \\ 0.019 & 0.023 & 0.043 \end{bmatrix}, \quad D = \begin{bmatrix} 0.502 & 0.084 & 0.063 \\ 0.084 & 0.329 & 0.051 \\ 0.063 & 0.051 & 0.268 \end{bmatrix}$$

Tabela 1. Odziedziczalność (przekątna) i korelacja genetyczna.

	mastitis	metritis	torbiel jajników
mastitis	0.06	0.08	0.51
metritis	-	0.07	0.69
torbiel jajników	-	-	0.14

Wyznaczono genomowe wartości hodowlane dla wszystkich trzech cech, które zostały unor- mowane do średniej 100 i odchylenia standardowego 10. Bazę genetyczną stanowiły krowy posiadające fenotyp, urodzone przed 2016 rokiem. Statystyki opisowe dla DGV i GEBV pod względem *mastitis*, *metritis* oraz torbieli jajnika zawarto odpowiednio w tabeli 2., 3. i 4.

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

	min.	max	mean	sd
GEBV	60.16	140.03	100.19	5.42
relGEBV	0.14	0.86	0.27	0.09

Tabela 3. Statystyki opisowe dla DGV, GEBV pod względem *metritis* i ich dokładności.

	min.	max	mean	sd
GEBV	42.19	161.17	100.32	5.13
relGEBV	0.11	0.54	0.28	0.05

Tabela 4. Statystyki opisowe dla DGV, GEBV pod względem torbieli jajnika i ich dokładności.

	min.	max	mean	sd
GEBV	12.04	210.15	103.05	7.96
relGEBV	0.03	0.87	0.31	1.12

Otrzymane wyniki świadczą o istnieniu w populacji bydła HF znacznej zmienności genetycznej w zakresie badanych cech zdrowotnych, a także o możliwości prawidłowego szacowania wartości hodowlanej dla wyżej wymienionych cech zdrowotnych na podstawie utworzonej w IZ PIB bazy danych, według najnowszych rekomendacji grupy Eurogenomics, której Polska jest członkiem. Tym samym istnieje zasadność kontynuacji prac nad konstrukcją precyzyjnych, zindywidualizowanych indeksów selekcyjnych w krajowej populacji bydła rasy HF.

Zadanie 01-10-04-11

Ocena dobrostanu cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców.

kierownik zadania: dr inż. Dorota Godyń

Celem zadania było określenie wpływu utrzymywania cieląt parami na wskaźniki związane z dobrostanem i produktywnością.

Na dużych fermach bydła mlecznego powszechne jest oddzielanie cieląt od matek w ciągu 24 godzin od porodu. Przez następne tygodnie cielęta utrzymywane są najczęściej indywidualnie. Do głównych uzasadnień tej praktyki należy ograniczenie przenoszenia chorób, zapobieganie tzw. objadaniu, lepsza kontrola zwierzęcia, mniejsza konkurencja pomiędzy cielętami o pokarm. Pomimo tych przesłanek, coraz więcej badań potwierdza, że łączenie cieląt w pary sprzyja wcześniejszemu i zwiększonemu spożyciu paszy stałej, poprawie dziennych przyrostów. Nie bez znaczenia jest także pozytywny wpływ takiego utrzymania na zdolności poznawcze u cieląt, stan afektywny i tworzenie mocniejszych więzi społecznych. Warto zaznaczyć, iż współczesne badania nad dobrostanem zwierząt coraz częściej koncentrują się na identyfikacji sytuacji preferowanych przez zwierzęta oraz na ocenie ich afektywnego stanu pozytywnego. Dobrostan rozumiany w tym kontekście nie ogranicza się jedynie do minimalizowania stresu czy unikania dyskomfortu, ale obejmuje także promowanie doświadczeń, które zwierzęta postrzegają jako przyjemne.

Opracowanie praktyk i metod chowu, które wspierają pozytywne formy zachowań u zwierząt gospodarskich, bez wątpienia stanowi istotny temat, który w najbliższych latach będzie szeroko podejmowany.

Na końcu sierpnia i we wrześniu, badaniami objęto grupę 10 cieląt rasy holsztyńsko-fryzjskiej. Po odizolowaniu od matek (w przeciągu 24–48 godzin), cielęta umiejscowione zostały w kojcach pojedynczych (4 sztuki) oraz w kojcach podwójnych (6 sztuk). Wszystkie zwierzęta utrzymywano przez okres 14 dni, po tym czasie cielęta trafiły do kojców grupowych.

Układ kojców w nowym cielętniku. ZD IZ PIB Kołbacz Sp. z o.o.
(Fot. I. A. Kaczor)



Zwierzęta były ważone przy wejściu do kojca oraz po 14 dniach. Monitorowano zachowanie poprzez zapisy kamer. Urządzenia rejestrowały behavior cieląt przez cały okres badań, natomiast podczas analiz skupiono się na trzech pierwszych dniach każdego tygodnia utrzymania zwierząt w kojcach (w godz. 6.00–16.00). Od wszystkich cieląt w doświadczeniu pobierano materiał biologiczny do oceny hormonów. Prowadzona była dokumentacja dotycząca stanu zdrowotnego. Skupiono się na chorobach układu pokarmowego i oddechowego. Ponadto, monitorowany był mikroklimat w cielętniku, stąd w pomieszczeniu zamontowano mierniki klimatyczne, umożliwiające pomiar wskaźników w sposób ciągły, jak również prowadzono pomiary momentalne w 6 miejscach. Monitorowano: temperaturę, wilgotność względną, prędkość ruchu powietrza, poziom gazów, takich jak: CH_4 , NH_3 , H_2S , CO_2 .

Dane mikroklimatyczne z okresu badań wskazały średnią wartość temperatury powietrza w cielętniku kształtującą się na poziomie średnio $23,2^\circ\text{C}$; wilgotność względna wynosiła 43,6%; prędkość ruchu powietrza – 0,16 m/s. Poziom dwutlenku węgla kształtował się średnio na poziomie 600 ppm. Wartość amoniaku średnio wynosiła 1 ppm, nie wykazano stężenia metanu oraz siarkowodoru.

Analiza dziennych przyrostów masy ciała, w pierwszych dwóch tygodniach kształtowała się na poziomie 432 g u cieląt utrzymywanych pojedynczo oraz 456 g dla osobników utrzymywanych w parach. Wśród badanych zwierząt nie stwierdzono biegunek ani chorób układu oddechowego. Analizy zachowania cieląt wykazały, że pierwszego dnia po odizolowaniu młodych od matek, aktywność była na bardzo niskim poziomie w obu systemach utrzymania. W 2. tygodniu stwierdzono, że zwierzęta utrzymywane w parach charakteryzowały się większą aktywnością. Objawiało się to przede wszystkim w zachowaniach socjalnych (interakcjach z drugim osobnikiem w kojcu), ale także eksplorowaniu elementów wyposażenia (ścian kojca, podłoża).

Materiał biologiczny został zgromadzony, jednak zgodnie z praktyką laboratoryjną konieczne jest zebranie pełnego kompletu próbek. Dzięki temu analiza ich wszystkich może zostać przeprowadzona jednorazowo, co jest bardziej ekonomiczne i efektywne, zwłaszcza w kontekście wykorzystania całego zestawu diagnostycznego.

Ważnym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest fakt, iż nowy cielętnik na fermie w Kołbaczu stanowi doskonałe miejsce do wychowu młodych krów. Obiekt oferuje dużą przestrzeń oraz możliwość zamontowania różnych typów kojców. Jest szczególnie korzystne dla badań naukowych. Dzięki temu, że warunki w całym pomieszczeniu są jednolite, istnieje możliwość prowadzenia eksperymentów w kontrolowanym środowisku.

Dodatkowym atutem jest odpowiednie przewietrzenie, które zapobiega gromadzeniu się gazów, a także chorobotwórczych drobnoustrojów, co znacząco może wpływać na zdrowie zwierząt.

Zadanie 01-10-06-11

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Andrzej Żarnecki

W okresie sprawozdawczym przeprowadzono kolejne oszacowanie parametrów genetycznych dla cech produkcyjnych bydła rasy simentalskiej. Parametry genetyczne stanowią ważny element w szacowaniu dokładności oceny wartości hodowlanych. Stosunkowo ograniczona liczebność i struktura populacji bydła simentalskiego utrudnia precyzyjne szacowanie parametrów. W związku z tym podjęto rozszerzone badania nad ich szacowaniem.

Z systemu FedInfo pobrano zbiory próbných udojów krów rasy simentalskiej, wykonywanych w przedziale czasu między 5. a 305. dniem laktacji. Uwzględniono dzienną wydajność mleka, tłuszczu i białka. Wybrano 49513, 49408 oraz 45321 próbných udojów z trzech pierwszych laktacji 6447 krów, wycielonych w 1046 stadach w latach 2003–2022. Utworzono 5 klas ocielenia w pierwszej, 4 w drugiej oraz w trzeciej laktacji. Przyjęto dwa sezony ocielenia: letni (IV–IX) i zimowy (X–III). Krowy były córkami 1010 ojców i 21190 matek. Utworzono 105321 klasy stado x data próbnego udoju oraz 24 klasy laktacja x sezon x wiek ocielenia. Krowy były córkami 987 ojców i 4590 matek.

Do oszacowania komponentów (ko)wariancji zastosowano model zwierzęcia z losowymi regresjami oraz Bayesowską metodę próbkowania Gibbsa i program dr. Ignacego Misztala (gibbs2f90 z pakietu BLUPF90). Wygenerowano 100 000 próbek, z których pierwsze 20 000 odrzucono jako tzw. okres rozruchowy, a następnie zapisano co 20-tą próbkę.

Odziedziczalność dziennej wydajności mleka wynosiła średnio 0,24 i wahała się od 0,18 w 34. dniu doju do 0,35 w 295. dniu doju. Odziedziczalność dziennej wydajności tłuszczu wynosiła średnio 0,22 i wahała się od 0,15 w 34. dniu doju do 0,37 w 302. dniu doju. Odziedziczalność dziennej wydajności białka wahała się od 0,12 w 24. dniu doju do 0,36 w 305. dniu doju, ze średnią wartością wynoszącą 0,24. Korelacje genetyczne między parami cech: dzienną wydajnością mleka, tłuszczu i białka wynosiły ponad 0,79.

Odziedziczalność laktacyjnej wydajności mleka wyniosła 0,37 – tłuszczu: 0,44 oraz białka: 0,37. Korelacja genetyczna między laktacyjną wydajnością mleka i tłuszczu była najniższa i wynosiła 0,74. Oszacowano wysokie korelacje genetyczne między laktacyjną wydajnością białka i laktacyjną wydajnością mleka (0,88) oraz tłuszczu (0,86).

Ocena wartości hodowlanej dla cech produkcyjnych jest szacowana na podstawie analizy dzienných wydajności mleka, tłuszczu, białka. Próbne udoje przeprowadzone w tym samym stadzie i dniu są zaliczane do jednej podklasy.

Wartości hodowlane szacowano za pomocą jednocechowej, wielolaktacyjnej (obejmującej trzy pierwsze laktacje) metody BLUP – model zwierzęcia z losowymi regresjami. Model liniowy oceny uwzględnia następujące efekty: efekt losowy dnia doju w stadzie, współczynniki stałych regresji w podklasach wieku ocielenia-sezonu ocielenia-okresu czasu, losowe regresje efektu addytywnego genetycznego, losowe regresje efektu trwałego środowiskowego, efekt błędu losowego. Krzywe laktacji w podklasach wieku ocielenia-sezonu, ocielenia-okresu czasu modelowane są za pomocą funkcji Wilminka, a pozostałe krzywe laktacji za pomocą wielomianów Legendre'a drugiego stopnia.

Wartości hodowlane dla procentowej zawartości tłuszczu i białka oblicza się na podstawie oszacowanych wartości hodowlanych dla wydajności mleka, tłuszczu i białka oraz średniej wydajności mleka i procentowej zawartości tłuszczu i białka w drugiej laktacji krów urodzonych w roku przyjętym jako baza genetyczna.

Tabela 1. Średnie wartości hodowlane oszacowane metodą TDM i metodą laktacyjną.

Metoda oceny	N	mleko (kg)		tłuszcz (kg)		białko (kg)	
		średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
TDM							
Buhaje	2735	28,4	330,1	-0,60	12,98	0,51	9,82
Buhaje* (Rel $\geq 0,50$)	727	35,1	419,7	-0,08	16,32	0,77	12,25
Krowy	30115	3,7	372,1	-1,46	13,97	-0,07	10,56
Laktacyjna							
Buhaje	2735	-96,1	269,9	-3,85	11,74	-3,28	8,13
Buhaje* (Rel $\geq 0,50$)	727	-62,6	360,6	-2,15	15,27	-2,03	10,84
Krowy	30115	-95,3	288,8	-3,55	11,85	-3,07	8,46

Buhaje* ocenione z wiarygodnością $\geq 0,50$

Tabela 2. Współczynniki korelacji między wartościami hodowlanymi oszacowanymi metodą TDM i oceną laktacyjną dla buhajów i krów.

		Buhaje	Buhaje* (Rel $\geq 0,50$)	Krowy
Liczba zwierząt		2735	727	30115
Współczynnik korelacji	mleko (kg)	0,83	0,88	0,86
	tłuszcz (kg)	0,85	0,90	0,86
	białko (kg)	0,82	0,87	0,85

Buhaje* ocenione z wiarygodnością $\geq 0,50$

Różnice w średnich wartościach hodowlanych oszacowanymi za pomocą TDM i opartymi na wydajnościach 305-dniowych wynikają z przyjętych założeń (Tabela 1.). Korelacje między wartościami hodowlanymi, otrzymanymi badanymi metodami dla wszystkich trzech cech produkcyjnych mieszczą się między 0,82 i 0,90 (Tabela 2.). Wielkość tych współczynników jest podobna do wartości podawanych w literaturze i świadczy o możliwości utrzymania podobnego rankingu buhajów i krów ocenianych za pomocą obu metod.

Zadanie 01-10-07-11

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

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

Produkty mleczne, takie jak mleko czy jogurt, są jednymi z najczęściej spożywanych produktów na świecie. Mleko jest zdrowym i pożywnym składnikiem diety, jednak rośnie liczba osób, które nie mogą spożywać nabiału ze względu na problemy zdrowotne oraz nietolerancje pokarmowe. Przyczyną części tych problemów może być typ β -kazeiny występujący w mleku. Ciągłe jednak jest niewiele informacji na temat wpływu wariantu β -kazeiny na produktywność oraz skład chemiczny mleka. Dlatego potrzebne są dalsze badania dotyczące mleka pochodzącego od krów o różnym typie β -kazeiny oraz produktów powstałych na bazie tego mleka. Stąd też celem etapu badawczego była ocena wydajności, składu fizyko-chemicznego oraz zawartości związków prozdrowotnych w mleku w zależności od zidentyfikowanego genotypu.

W pierwszym etapie pobrano materiał genetyczny do badań i wykonano oznaczenia genu β -kazeiny u 273 krów mlecznych rasy polskiej czerwonej. Krowy te utrzymywane były w 12 gospodarstwach zlokalizowanych na terenie powiatu limanowskiego. Liczebność krów w poszczególnych stadach wahała się od 10 do 109 krów.

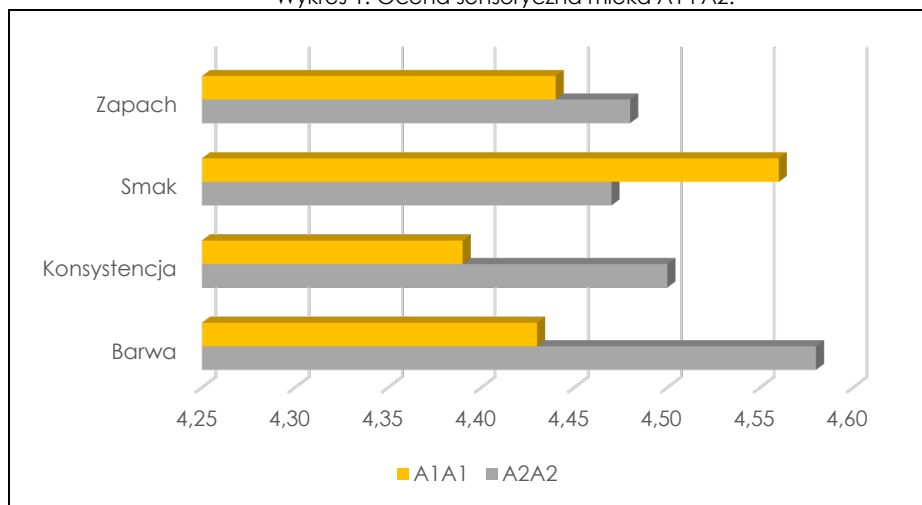
Przeprowadzona identyfikacja genów kodujących β -kazeinę wykazała, iż ok 20% przebadanych krów jest homozygotami A2A2; 49% to heterozygoty A1A2, a ok. 30% to homozygoty A1A1.

Od krów o zidentyfikowanych genotypach A1A1 i A2A2 pobrano mleko do analiz chemicznych – oznaczenia składu fizyko-chemicznego, analizy sensorycznej oraz oznaczenia zawartości związków prozdrowotnych w mleku. Mleko pobierano od krów od 50. do 200. dnia laktacji. Próbkę mleka pobierano trzykrotnie w ciągu roku; łącznie pobrano i oceniono 60 prób mleka. Oznaczono zawartość aminokwasów, witamin, kwasów tłuszczowych i makroelementów. Wykonano ocenę fizykochemiczną i sensoryczną mleka.

Skład białek mleka jest ważnym czynnikiem wpływającym na właściwości odżywcze i technologiczne mleka. Stwierdzono, że ilości i proporcje kazein mleka i białek serwatkowych odgrywają główną rolę w produkcji produktów mlecznych.

Ocena produktywności krów ze względu na zidentyfikowany genotyp nie wykazała różnic wydajności mlecznej pomiędzy krowami A1 i A2. Podobnie nie stwierdzono istotnych różnic w podstawowym składzie mleka – zawartość białka, tłuszczu, laktozy kształtowała się na zbliżonym poziomie. Nieco większą koncentrację witaminy A stwierdzono w mleku krów z genotypem A2A2, jednak były to różnice nieistotne statystycznie. W mleku A1 stwierdzono natomiast wyższą zawartość witaminy E, statystycznie istotne różnice stwierdzono w zawartości jodu i wapnia. Mleko A2 zawierało więcej takich aminokwasów, jak: kwas asparaginowy, glutaminowy, prolina i lizyna, natomiast w mleku A1 stwierdzono wyższe zawartości histydyny, metioniny, leucyny i fenyloalaniny. Ponadto, w mleku A2 stwierdzono wyższą zawartość CLA oraz mniejszy udział kwasów nasyconych. Mleko A2 w porównaniu z A1, w analizie sensorycznej zostało wyżej ocenione pod względem barwy, konsystencji i zapachu, natomiast lepszy smak miało mleko A1.

Wykres 1. Ocena sensoryczna mleka A1 i A2.



Zadanie 01-10-08-11

Możliwości wykorzystania serwatki suszonej w warunkach gospodarstwa rodzinnego jako immunomodulatorów w zwalczaniu chorób u cieląt ras mlecznych.

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

Celem zadania było wskazanie nowych możliwości wykorzystania serwatki w połączeniu z wybranymi ziołami w żywieniu oraz profilaktyce zdrowotnej cieląt oraz ograniczenie antybiotykoterapii prewencyjnej we wczesnym okresie rozwoju cieląt na rzecz naturalnych metod wspierania odporności nabytej.

Zrealizowano jeden etap badawczy obejmujący dwa podzadania:

1. Pozyskanie i przygotowanie serwatki: określenie warunków produkowanej serwatki, opracowanie metody suszenia i pozyskania proszku serwatkowego.
2. Badania mikrobiologiczne i laboratoryjne: określenie składu chemicznego i aktywności przeciwdrobnoustrojowej opracowanego proszku serwatkowego.

W pierwszym zadaniu założono pozyskanie świeżej serwatki od grupy producentów „Moniser”. Serwatka pochodziła głównie z produkcji sera twarogowego i była przewożona w pięciolitrowych, polietylenowych kanistrach do laboratorium Zakładu Hodowli Bydła IZ PIB. Po pobraniu próbek o pojemności 50 ml, wirowaniu przez 5 minut, przy prędkości obrotów 5 000 obrotów na minutę pozyskiwano śladowe ilości osadu (supernatantu) serwatkowego. Wytrącone, niewielkie ilości osadu oraz płyn nad osadu, umieszczano w kwasoodpornych kuwetach ze stali nierdzewnej. Kuwety z serwatką umieszczano na półkach suszarki próżniowej i suszono w temperaturze 40°C przez okres niezbędny do uzyskania suchego powietrznie proszku. Pozyskano także serwatkę komercyjną, przeznaczoną do dalszych badań laboratoryjnych.

W drugim zadaniu próbki świeżej serwatki pobierano do jałowych probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i przewożono w warunkach chłodniczych (4°C) do laboratorium mikrobiologicznego „Zdrowe wymię – Laboratorium Badania Mleka” w Bydgoszczy. W próbkach świeżej, płynnej serwatki wykonano analizy składu mikrobiologicznego, zarówno w celu określenia jej bezpieczeństwa dla cieląt (na obecność patogenów wywołujących schorzenia układu pokarmowego i oddechowego oraz *mastitis*), jak i w celu określenia jej działania przeciwdrobnoustrojowego w kierunku najczęstszych patogenów chorobotwórczych dla cieląt. W próbkach serwatki oznaczono ogólną liczbę bakterii. Wszystkie próbki niezależnie od ich rodzaju wstępnie posiewane były na agar Columbia, na agar CNA oraz na podłoża Mac Conkeya (dla *E. coli* i innych pałeczek G-), *Enterococcosel* (dla enterokoków), Sabouraud (dla grzybów), Strepto (dla paciorkowców) oraz na podłoża chromogenne ChromAgar do oznaczania *Salmonella*, *Yersinia* i *Campylobacter*. Po 24-48 godzinnej inkubacji odczytywany był wzrost na poszczególnych podłożach. W zależności od uzyskanych wyników przeprowadzane były testy dodatkowe. W razie wątpliwości przeprowadzany był test na katalazę, w celu stwierdzenia czy badany drobnoustroj jest katalazą dodatni (gronkowce, pałeczki, mikrokokki, grzyby), czy ujemny (paciorkowce). W przypadku gronkowców wykazujących hemolizę wykonywany był test na koagulazę z użyciem osocza króliczego liofilizowanego i/lub testu lateksowego do wykrywania *clumping factor* i białka A obecnych u *S. aureus*. Gronkowce z ujemnym wynikiem testu na koagulazę i *clumping factor* opisywane są jako CNS – koagulazo ujemne (z ang. *coagulase negative staphylococci*). Pałeczki *E. coli*, ze względu na ich powszechne występowanie w środowisku i w związku z tym stanowiące często zanieczyszczenie próbki, podzielono na hemolizujące i niewywołujące hemolizy na agarze z krwią. Za chorobotwórcze uznawano te z hemolizą. W niektórych wątpliwych przypadkach wykonywano preparaty mikroskopowe, aby odróżnić pałeczki, grzyby i ziarniaki. Dodatkowo, posiewano także poszczególne próbki na podłoża do hodowli w warunkach beztlenowych i inkubowano przez minimum 48 godzin. Niektóre szczepy bakterii, których nie można było zidentyfikować metodami rutynowymi wysyłano do identyfikacji za pomocą techniki MALDI-TOF MS na Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Każda próbka mleka ćwiartkowego zbadana była również pod kątem obecności glonów *Prototheca* i grzybów drożdżopodobnych.

Tabela 1. Wyniki badań mikrobiologicznych różnych rodzajów serwatki pozyskanych z gospodarstwa „Moniser”.

Rodzaj serwatki/nr próbki	Wyzolowane drobnoustroje	Liczebność	Ogólna liczba bakterii x 1000
Serwatka podpuszczkowa S1	Bacillus cereus	++	11
	Enterococcus faecalis	++	
	Grzyby drożdżopodobne	++	
	E. coli	+	
Serwatka podpuszczkowa S2	Bacillus cereus	++	20
	Lysinibacillus fusiformis	+	
	Enterococcus faecalis	++	
	S. aureus	++	
	E. coli	+++	
Serwatka twarogowa BN	Streptococcus dysgalactiae	+++	brak oznaczeń
	E. coli	+	
	CNS	+	
Serwatka twarogowa BN	E. coli	+++	brak oznaczeń
	Streptococcus dysgalactiae	+++	
Serwatka twarogowa S1	Streptococcus dysgalactiae	+	brak oznaczeń
	Enterococcus faecalis	+	
	CNS	+	
	Str. viridans	+	
	E.coli	+	
	Candida sp.	+	
Serwatka twarogowa S2	CNS	+++	brak oznaczeń
	E. coli	++	
	Enterococcus sp.	++	
	Candida sp.	+	
	Str. sp.	+	

Tabela 2. Wyniki badania komórkowego i bakteriologicznego z antybiogramem mleka krów pochodzących z gospodarstwa „Moniser”.

Nr krowy	Wzrost	Wynik badania
1P	+++	S. aureus, Klebsiella sp., Str. dysgalactiae
1D	+++	Klebsiella sp., Str. dysgalactiae
2P	+++	Klebsiella sp., Str. dysgalactiae
3P	++	E. coli, Str. dysgalactiae, Str. sp.
4P	+	E. coli, Str. dysgalactiae, Str. sp.
5P	++	E. coli, Str. sp.
6P	++	E. coli, Str. dysgalactiae
7P	++	Klebsiella sp., Str. sp.
8P	+++	E. coli, Str. sp.
9P	+++	Klebsiella sp., Str. dysgalactiae
10P	+++	E. coli, Str. sp.
11P	+++	E. coli, Str. sp.
Mleko zbiorcze	++	Str. uberis, CNS

W celu utworzenia skutecznej mieszaniny ekstraktów ziołowych, na podstawie dokonanego przeglądu literatury oraz wcześniejszych badań prowadzonych w Instytucie Zootechniki PIB, zakupiono preparaty proszkowe o stężeniu DER 4:1 z następujących ziół: tymianku (*Thymus vulgaris* L.), babki lancetowatej (*Plantago Lanceolata* L.), kminku (*Carum carvi* L.), jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea* L.) oraz lnu (*Linum usitatissimum* L.).

Powyżej wymienione zioła, w tym przede wszystkim tymianek, ale również kminek oraz jeżówka purpurowa, zgodnie z szeroką literaturą naukową oraz danymi farmakopearnymi, już w postaci suszu, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe lub co najmniej bakteriostatyczne w kierunku licznych patogenów bakteryjnych (Gram+ oraz Gram-), a także grzybiczych.

Zioła te zostały wybrane na podstawie wcześniejszych doświadczeń Instytutu oraz obszernych danych literaturowych, w celu utworzenia mieszanin ziółowych o działaniu minimum bakterio- oraz grzybobójczym. W pierwszym etapie badań opracowano 24 mieszaniny ziółowe o różnym udziale poszczególnych ziół i serwatki w proszku, poddając je badaniom laboratoryjnym na skuteczność działania antydrobnoustrojowego. W celu powtórzenia badań i weryfikacji wyników, dwukrotnie zwiększono stężenie poszczególnych ekstraktów ziółowych w preparatach oraz dodano ekstrakt z oregano jako jednego z ziół o najsilniejszym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Łącznie opracowano 42 preparaty o różnym układzie poszczególnych ziół i różnego rodzaju serwatki. Badania wykonano w dwóch powtórzeniach w celu weryfikacji wyników.

Prezentacja fotograficzna badania skuteczności hamowania wzrostu poszczególnych bakterii przez wybrane preparaty ziółowo-serwatkowe.

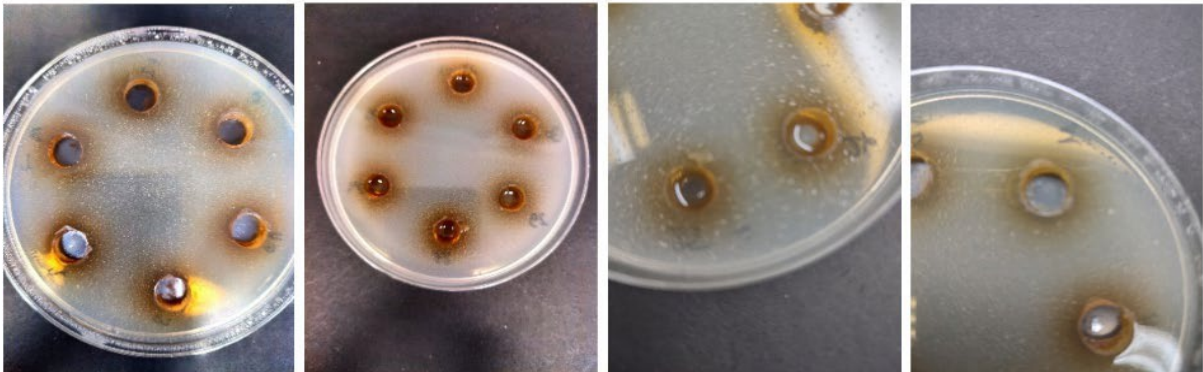
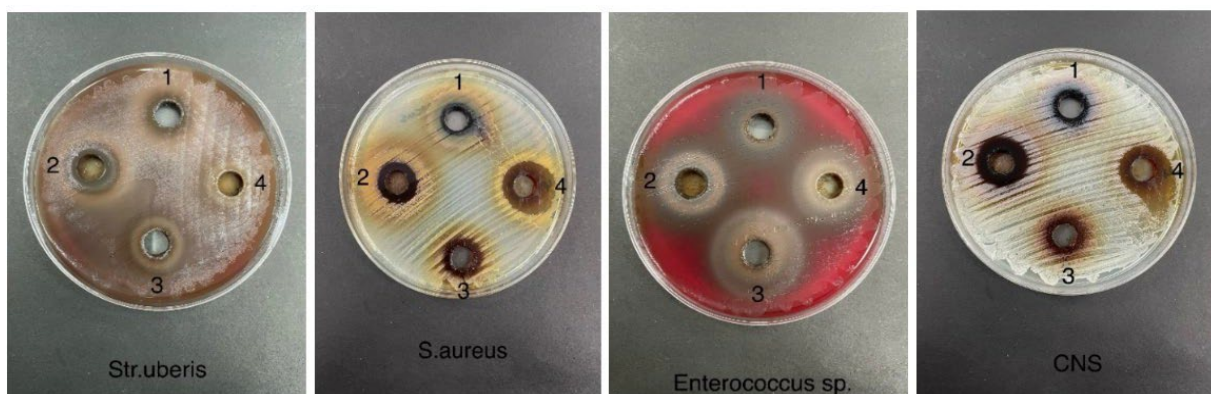


Tabela 3. Skuteczność hamowania wzrostu poszczególnych ziół ze zmienionego źródła (firma Bellako) oraz ze źródła pierwotnego (firma Bartfarm) w układzie pojedynczych ziół.

Lp	Nazwa, firma	S.aureus	CNS	Enteroc. sp.	Str.uberis	E.coli	C. krusei	K. pneumoniae
1	Babka-Bartfarm	0	15	0	0	0		
2	Jeżówka- Bartarm	14	22	0	0	śląd		
3	Kminek- Bartfarm	0	0	0	0	0		
4	Len-Bartfarm	śląd	12	0	0	0		
5	Tymianek- Bartfarm	13	20	0	0	śląd		
6	Kminek-Bellako	0	0	0	0	0		
7	Oregano-Bellako	0	0	0	0	0		
8	Tymianek-Bellako	śląd	15	0	0	0		

Strefa w mm

Prezentacja fotograficzna badania skuteczności hamowania wzrostu przez 4 różne ekstrakty ziółowe.



Badaniom poddano także serwatkę, gdzie oznaczono zawartość:

- suchej masy – zgodnie z normą P.001, wyd. 1 z dnia 24.05.2001 roku,
- popiołu surowego – zgodnie z normą P.002, wyd. 1 z dnia 24.05.2001 roku,
- tłuszczu wolnego – SOP M.013, wyd. 4 z dnia 24.02.2020 roku.

Tabela 4. Wyniki analiz chemicznych próbek serwatki.

Opis próbki zleciodawcy	sucha masa [%]	popiół surowy [%]	tłuszcz wolny [%]	białko ogólne [%]
serwatka mrożona S1	7,45	0,48	1,05	0,89
serwatka mrożona S2	6,60	0,73	0,33	0,74

S1 – serwatka podpuszczkowa

S2 – serwatka twarogowa

Na podstawie wykonanych analiz składu chemicznego stwierdzono różnice w zawartości poszczególnych składników w różnych rodzajach serwatki. Wyższym poziomem suchej masy, tłuszczu wolnego oraz białka ogólnego charakteryzowała się serwatka podpuszczkowa i ten rodzaj serwatki rekomenduje się do dalszych etapów badań.

Ze względu na problemy natury technicznej, wynikające z braku możliwości pozyskania odpowiedniej ilości suszonej serwatki oraz niezadawalającej jakości ekstraktów wytypowanych ziół, zdecydowano się na dokonanie zmian w założeniach metodycznych i dopuszczenie innych dostawców ekstraktów ziołowych, jak również wprowadzenie testowania serwatki komercyjnej bydlęcej.

Zadanie 04-10-11-11

Badania nad wprowadzeniem metody BLUP do systemu oceny wartości hodowlanej bydła mięsnego w Polsce.

kierownik zadania: dr inż. Bartosz Szymik

Celem zadania było wdrożenie metody BLUP do systemu oceny wartości hodowlanej bydła mięsnego w Polsce, dla najbardziej popularnych ras limousine (LM), charolaise (CH) oraz hereford (HH). W celu jego realizacji przeprowadzono szacowanie parametrów genetycznych cech pokroju, łatwości wycieleń, masy ciała na 210. i 420. dzień życia dla buhajów ras mięsnych ocenianych w Polsce. Następnie dokonano wyboru optymalnego modelu szacowania parametrów genetycznych.

W ramach realizacji zadania, zgromadzono materiał doświadczalny obejmujący wyniki rutynowej oceny fenotypowej cech pokroju buhajów trzech najbardziej licznych ras bydła mięsnego w Polsce: limousine (LM), charolaise (CH) oraz hereford (HH). Dla każdej z wybranych ras przygotowano zbiór danych, oparty na informacji o buhajach ocenianych pod względem cech pokroju oraz cech użytkowych. Liczba buhajów uwzględnionych w zbiorach wynosiła odpowiednio: 3200 – dla rasy LM, 510 – dla CH oraz 428 – dla rasy HH. Informacje o buhajach, takie jak dane rodowodowe, oceny cech pokroju, dane z analiz masy ciała i innych parametrów użytkowych, zgromadzono na podstawie dwóch systemów: eBovis2 oraz bazy danych „Buhaje mięsne”.

System eBovis2 jest bazą danych zarządzaną przez Instytut Zootechniki PIB, która zawiera informacje pochodzące z rutynowych ocen bydła mięsnego przeprowadzanych przez zootechników PZHBP. System ten umożliwia generowanie szczegółowych raportów dotyczących indywidualnych osobników zarówno buhajów, krów lub całych grup technologicznych, w tym raportów związanych z cechami pokroju, płodności oraz cechami użytkowości mięsnej.

Baza danych „Buhaje mięsne” zawiera dane rejestracyjne, dane rodowodowe oraz wyniki oceny wartości użytkowej i hodowlanej buhajów mięsnych. Dane z tych systemów zostały wstępnie sprawdzone pod kątem kompletności i poprawności, a następnie zestandaryzowane w ramach jednego zbioru danych.

Na podstawie utworzonego zbioru przeprowadzono charakterystykę fenotypową obejmującą wybrane cechy pokroju (z podziałem na grupy cech: kośćciec, umięśnienie, cechy funkcjonalne i dodatkowe) oraz cechy płodności. Do przetwarzania i analizy danych zastosowano własne oprogramowanie opracowane w języku R, z dodatkowym wykorzystaniem programu MS Excel. Operacje, takie jak czytanie i zapis danych, zmiana ich struktury, sortowanie, wyszukiwanie rekordów oraz agregacja informacji z różnych źródeł były prowadzone z wykorzystaniem tego oprogramowania, które zostało skompilowane i uruchomione na serwerach. Oprogramowanie to będzie także używane w kolejnych etapach badań, umożliwiając bieżącą aktualizację bazy danych.

Liczba obserwacji dotycząca poszczególnych ras

Tabela 1. Dane obejmujące ponad 400 tys. obserwacji bydła z lat 2000–2023, co umożliwiło przeprowadzenie szczegółowych analiz cech pokroju, użytkowych i płodności.

Rasa	Liczba obserwacji	Liczba ważeń	Liczba wycieleń	Masa urodzeniowa
limousine (LM)	323 858	498 858	265 696	247 786
charolaise (CH)	54 331	67 888	38 704	35 480
hereford (HH)	28 218	37 950	23 587	19 468

Średnie oceny cech pokroju

Tabela 2. Badania potwierdzające wysoką jakość użytkową ras analizowanych w Polsce, zwłaszcza rasy limousine, która dominowała liczebnością danych.

Rasa	Cecha	Liczba ocenionych zwierząt (N)	Średnia (pkt)
limousine	Umięśnienie	187 352	7,41
	Kośćciec	191 131	7,53
	Cechy funkcjonalne	184 542	7,29
	Cechy dodatkowe	186 517	7,46
charolaise	Umięśnienie	19 215	7,46
	Kośćciec	19 481	7,57
	Cechy funkcjonalne	18 651	7,23
	Cechy dodatkowe	17 070	7,40
hereford	Umięśnienie	17 098	7,63
	Kośćciec	16 862	7,52
	Cechy funkcjonalne	16 437	7,32
	Cechy dodatkowe	16 486	7,34

Zadanie 04-10-12-11

Szacowanie produktywności pastwisk z uwzględnieniem różnych metod wyceny.

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

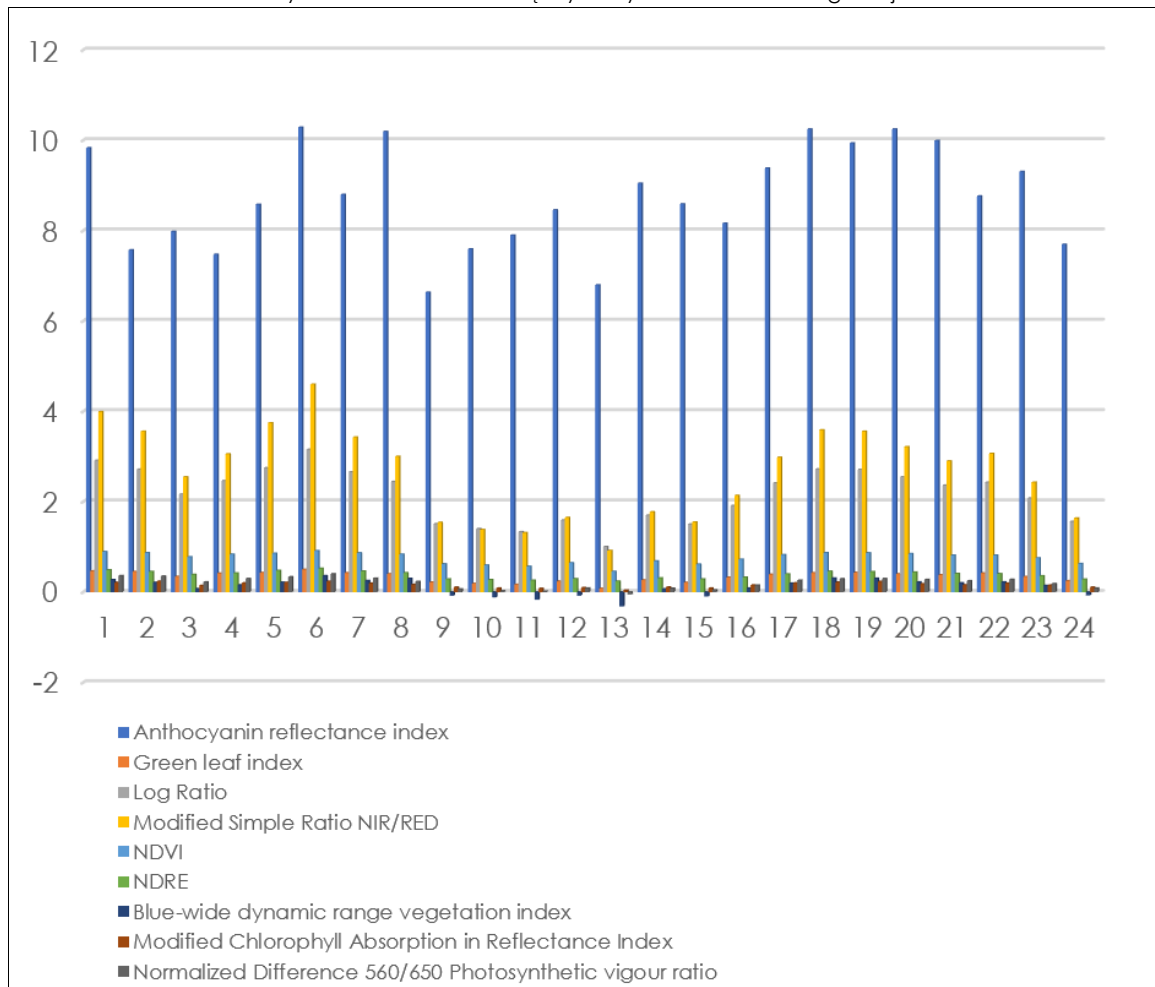
Wypas zwierząt stanowi specyficzną formę rolniczego użytkowania ziemi. Specyfika ta wynika ze ścisłego związku jaki zachodzi między warunkami siedliskowymi a wypasnymi zwierzętami. Prawidłowa organizacja wypasu umożliwia racjonalne wykorzystanie potencjału produkcyjnego pastwisk, a dobre pastwisko może nie tylko w pełni pokryć potrzeby pokarmowe zwierząt w okresie żywienia letniego, ale powinno dostarczyć przynajmniej część paszy objętościowych (siana i kiszonki) na okres jesienno-zimowy. W wielu regionach Polski pojawiają się już problemy

z wystarczającą ilością paszy z użytków zielonych, wynikającą głównie z niedoborów wody, co prowadzi do strat ekonomicznych. Dlatego też, w celu optymalizacji gospodarowania na użytkach zielonych, konieczne jest dostosowanie ich wykorzystania do bieżącej produktywności i jakości runi. Wskazane byłoby zatem monitorowanie wzrostu runi i szacowanie produktywności trawy za pomocą wskaźników, a informacje uzyskane na ich podstawie mogłyby pomóc w ustaleniu harmonogramu wypasu poszczególnych pastwisk.

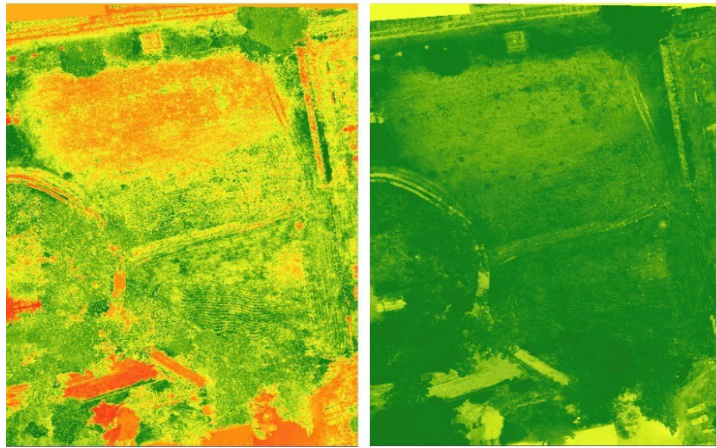
Celem przeprowadzonych badań było określenie produktywności pastwisk i porównanie metod szacowania ich produktywności. Wykorzystano metody bezpośrednie – pomiar runi na pastwisku oraz metody pośrednie w oparciu o wskaźniki wegetacji. W doświadczeniu oceniano plony suchej masy, zawartość białka ogólnego, włókna surowego i makroelementów. Z otrzymanych pasm spektralnych przeanalizowano następujące wskaźniki: wskaźnik odbicia antocyjanów, wskaźnik wegetacji w szerokim zakresie dynamiki niebieskiej, indeks zielonych liści, współczynnik logów, zmodyfikowaną absorpcję chlorofilu we współczynniku odbicia, zmodyfikowany prosty stosunek NIR/RED, NDRE, znormalizowaną różnicę 560/650, współczynnik wigoru fotosyntezy, indeks chlorofilowy liści, znormalizowaną różnicę NIR/Rededge- NDRE.

Uzyskane dane, zarówno poprzez bezpośrednie pomiary runi oraz z wykorzystaniem czujników, w tym także pomiarów teledetekcyjnych opartych na teledetekcyjnych indeksach roślinności, będą podstawą do analizy produktywności pastwisk w kolejnym etapie badań.

Wykres 1. Kształtowanie się wybranych wskaźników wegetacji.



Przykładowe obrazy wskaźników uzyskanych przy użyciu teledetekcji.



Zadanie 04-10-13-21

Hybrydowe sekwencjonowanie bydlęcego chromosomu Y przy użyciu danych z długich odczytów ONT oraz krótkich odczytów Illumina.

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Celem zadania jest opracowanie wysokiej jakości referencyjnej sekwencji chromosomu Y bydła domowego przy wykorzystaniu technologii hybrydowego sekwencjonowania, łączącego:

- długie odczyty ONT (Oxford Nanopore Technology), pozwalające na analizę dużych fragmentów genomu,
- krótkie odczyty Illumina, zapewniające wysoką dokładność w sekwencjonowaniu regionów kodujących.

Zadanie koncentruje się na poprawie specyficzności metod sekwencjonowania oraz budowie sekwencji konsensusowej dla chromosomu Y, co ma kluczowe znaczenie dla badań różnorodności genetycznej i funkcji genów specyficznych dla tego chromosomu.

Zakres działań

1. Analiza molekularna – pozyskanie sekwencji chromosomu Y:

- opracowano i zoptymalizowano metody przygotowania sond FISH przy użyciu technik iDOP-PCR oraz DOP-PCR,
- sekwencjonowanie metodą ONT ujawniło znaczące „zanieczyszczenie” sekwencjami z innych chromosomów, wskazując na konieczność dalszej optymalizacji metody.

2. Analiza bioinformatyczna

- przygotowano dane z bazy NCBI oraz przeprowadzono wstępną analizę dostępnych sekwencji referencyjnych chromosomu Y bydła.

Przeprowadzono prace nad pozyskaniem i analizą sekwencji chromosomu Y bydła, wykorzystując techniki biologii molekularnej i analizy bioinformatycznej.

Optymalizowano metody przygotowania sond FISH przy użyciu iDOP-PCR i DOP-PCR, jednak napotkano trudności ze specyficznością sygnałów. Sekwencjonowanie ONT ujawniło „zanieczyszczenie” sekwencjami z innych chromosomów, co wskazuje na potrzebę dalszej optymalizacji.

Przygotowano sekwencje chromosomu Y z bazy NCBI oraz rozpoczęto ich składanie w celu stworzenia konsensusowej referencji. Analizy wykazały różnice w jakości i zawartości GC danych, wymagające dalszych badań. Zainstalowano oprogramowanie do składania hybrydowych sekwencji ONT i Illumina oraz zrewidowano metodykę zgodnie z najnowszymi badaniami.

Wnioski

1. Wstępne prace wykazały konieczność dalszej optymalizacji metod sekwencjonowania, szczególnie w zakresie specyficzności sond dla chromosomu Y.
2. Analizy bioinformatyczne wskazują na istotne różnice w dostępnych sekwencjach referencyjnych, co wymaga budowy nowej konsensusowej sekwencji hybrydowej.
3. Wyniki stanowią solidną podstawę do kontynuacji projektu i osiągnięcia założonych celów.

Bioinformatyczne cele zadania zostały zrealizowane, lecz ze względów technicznych pozyskanie sekwencji chromosomu Y wymaga kontynuacji prac laboratoryjnych.

Zadanie 04-10-14-11

Wdrożenie modelu jednostopniowego dla cech produkcyjnych w ocenie wartości hodowlanej bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej.

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Celem zadania badawczego jest implementacja modelu jednostopniowego do oceny wartości hodowlanej bydła holsztyńsko-fryzyjskiego, koncentrując się na cechach produkcyjnych: wydajności mleka, zawartości tłuszczu, białka oraz liczbie komórek somatycznych. Model uwzględnia brakujące informacje rodowodowe za pomocą grup genetycznych i *metafounders*.

Zakres działań

1. Ocena struktury populacji referencyjnej: zbadano strukturę genetyczną i fenotypową populacji holsztyńsko-fryzyjskiej, analizując dane środowiskowe, genotypowe i rodowodowe; przeprowadzono kontrolę jakości danych.
2. Obliczenie komponentów wariancji: wykorzystano wcześniejsze wyniki z uwagi na niewielkie różnice między populacjami historyczną i obecną; utworzono grupy genetyczne, definiowane na podstawie płci, roku urodzenia i kraju pochodzenia, które wspierają scenariusze z *metafounders*.
3. Przygotowanie danych: przygotowano dane fenotypowe, genotypowe i rodowodowe dla cech takich jak wydajność mleka; ustalono strategię walidacji modelu (GEBVtest), eliminując dane z ostatnich 4 lat (2019–2022) jako próbę testową.

Ocena struktury populacji referencyjnej

Przeprowadzono szczegółową analizę struktury genetycznej i fenotypowej populacji bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Dane obejmowały cechy produkcyjne, takie jak wydajność mleczna, tłuszczu, białka oraz liczba komórek somatycznych. Proces ten objął również kontrolę jakości i kompletności danych, co pozwoliło na eliminację braków lub błędów.

Komponenty wariancji

Analiza komponentów wariancji wykazała stabilność parametrów genetycznych w populacji. Wobec niewielkich różnic w stosunku do poprzednich badań, zdecydowano się wykorzystać wcześniejsze wyliczenia jako bazę do dalszych analiz. Opracowano nowe grupy genetyczne, definiowane na podstawie płci, roku urodzenia i kraju pochodzenia, które wspierają radzenie sobie z brakami w danych rodowodowych.

Przygotowanie danych do walidacji

Przygotowano dane fenotypowe, genotypowe i rodowodowe, uwzględniając zestawy do walidacji na młodszych zwierzętach i ich ojcach. Dane fenotypowe dla wydajności tłuszczu obejmują 63,6 mln rekordów (pełny zestaw) oraz 58,4 mln rekordów po usunięciu danych z lat 2019–2022. Genotypy zawierają informacje o 113 tys. krów i 68,9 tys. buhajów. Rodowody obejmują 4,7 mln rekordów.

Strategia walidacji

Dane walidacyjne obejmowały młodsze zwierzęta, których informacje celowo usunięto z zestawu treningowego. W szczególności dotyczyło to krów urodzonych po 2019 roku oraz ich ojców z minimum 10 córkami.

Wnioski

Przeprowadzone prace pozwoliły na dokładne przygotowanie modelu jednostopniowego do dalszych analiz. Wyniki wskazują na dużą jakość danych i solidne podstawy do wyliczania wartości hodowlanych dla cech produkcyjnych. Model ten będzie walidowany i optymalizowany w kolejnych etapach projektu. Cele zadania zostały w pełni zrealizowane.

Zakład Hodowli Świń

(do dnia 30 kwietnia Zakład Hodowli Trzody Chlewnej)

kierownik: dr hab. Mirosław Tyra, prof. IZ PIB**Zadanie 01-11-03-11***Analiza wpływu immunokastracji na parametry użytkowości tucznej, rzeźnej i jakość mięsa jako alternatywa dla metody chirurgicznej.***kierownik zadania: dr inż. Martyna Małopolska**

W celu poprawy dobrostanu zwierząt, a także wyjścia naprzeciw oczekiwaniom konsumentów, coraz częściej wprowadzane są alternatywne metody kastracji w tym immunokastrację.

Metoda ta polega na dwóch iniekcjach analogu czynnika uwalniającego gonadotropiny (GnRH) skoniugowanego z proteiną (Improvac), które upośledzają funkcję jąder, co zapobiega występowaniu „knurzego” zapachu w wieprzowinie. Niemniej jednak, pytanie budzi ekonomiczna, środowiskowa oraz produkcyjna strona tej metody, jak również kwestie bezpieczeństwa żywności oraz jakości uzyskiwanego produktu. Celem niniejszych badań była ocena metody immunokastracji prowadzonej w warunkach krajowych w wymiarze wielopłaszczyznowym.

1. Ustalenie wpływu immunokastracji na użytkowość tuczną, rzeźną i jakość mięsa samców.
2. Określenie zależności pomiędzy poziomem kortyzolu a zastosowaną metodą kastracji (kastrowanie chirurgiczne i immunokastracja).
3. Określenie wpływu immunokastracji na cechy morfometryczne jąder.
4. Zdefiniowanie zależności pomiędzy analizowanymi grupami (knurki, wieprzki, immunokastraty) a poziomem skatolu, androstenonu i lotnych związków organicznych (LTO) w mięsie i tłuszczu.
5. Przeprowadzenie analiz ekonomicznych oraz określenie ryzyka wprowadzenia przedstawionej metody w warunkach krajowych.
6. Wykonanie analiz z zakresu biologii molekularnej, które przybliżą procesy komórkowe w tkance tłuszczowej, mięśniowej, przysadce, wybranym fragmencie jelita cienkiego oraz jądrach. Podjęto próbę identyfikacji markera genetycznego, który może zostać wykorzystany w programach hodowlanych do eliminacji knurzego zapachu z populacji aktywnej świń.

Założenia metodyczne

Ocena tucza została przeprowadzona na 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).

Materiał do badań stanowiło 80 knurków i 40 wieprzków rasy polskiej białej zwistouchiej (pbz). Doświadczenie zostało przeprowadzone w 4 powtórzeniach, po 10 zwierząt w każdej grupie (wieprzki, knurki, immunokastraty).

Pobieranie szczeciny w celu określenia poziomu kortyzolu w szczecinie świń 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).

Zwierzęta zostały poddane ubojowi w rzeźni przynależącej do SKURTCh, w momencie uzyskania 120 kg masy ciała (± 5 kg). Od każdego zwierzęcia pobrano jądra (jeśli występowały) oraz z jednej ćwiartki półtuszy materiał biologiczny niezbędny do analiz molekularnych (tkanki jelita, tłuszcz, fragmenty jądra, przysadka), jak również oznaczenia parametrów tekstury mięsa (mięśnia najdłuższego grzbietu – *longissimus dorsi* i szynki – *semitransversus*). Ocena jakości mięsa obejmowała ocenę tekstury i sensoryki. Parametry tekstury analizowano przy użyciu analizatora tekstury TA.TX PLUS firmy Stable Micro System z wykorzystaniem procedur: analizy siły cięcia (Warner Bratzler Blade Set HDP), testu podwójnego ściskania. Dodatkowo, zewnętrzny panel ekspertów przeprowadził analizę sensoryczną mięsa.

Dwuetapowa ocena sensoryczna mięsa wieprzowego:

- ocena barwy, marmurkowatości i zapachu mięsa surowego,
- ocena barwy, smakowitości, kruchości, soczystości i zapachu mięsa pieczonego.

W Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki oznaczono zawartość skatolu i androstenu oraz lotnych związków organicznych występujących w mięsie (*longissimus dorsi*) i tłuszczu – pochodzących od analizowanych osobników. Do oznaczeń tych substancji wykorzystano dwie metody: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Kolejny etap obejmował analizę na poziomie molekularnym. Ocenie poddano transkryptom tkanki jelitowej, mięśniowej, tłuszczowej, przysadki mózgowej oraz jąder dla trzech wyżej wymienionych grup doświadczalnych. Wytypowano geny kandydujące, związane z nieprzyjemnym zapachem wieprzowiny oraz poznano podłoże molekularne procesów związanych z występowaniem tzw. „knurzego zapachu” w wieprzowinie.

Syntetyczny opis wyników badań

Badania wykonano na knurkach i wieprzках rasy polska biała zwistoucha, pochodzących od hodowcy z województwie małopolskiego. Pierwsze pobranie szczeciny u prosiąt wykonywano u hodowcy. Po uzyskaniu odpowiedniej masy ciała, świnie zostały przewiezione do Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) w Chorzowie, gdzie nastąpiły kolejne etapy doświadczenia. Zwierzęta utrzymywane były w kojcach indywidualnych. Żywnienie 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 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
Masa ciała w dniu przyjazdu (kg)	22,93 $\pm$ 6,33	23,36 $\pm$ 5,97	22,31 $\pm$ 4,81
Dni tuczu od dnia przyjazdu (dni)	98,63 $\pm$ 16,91	99,47 $\pm$ 14,33	100,75 $\pm$ 10,88
Dni tuczu w teście (dni)	86,60 $\pm$ 13,29	88,63 $\pm$ 8,42	89,78 $\pm$ 7,57
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 ^a	239,97 $\pm$ 31,81 ^a	261,03 $\pm$ 32,51 ^b
Dzienne pobranie paszy (kg)	2,67 $\pm$ 0,24 ^a	2,71 $\pm$ 0,24 ^a	2,91 $\pm$ 0,30 ^b
Zużycie paszy na 1 kg przyrostu (kg)	2,75 $\pm$ 0,43 ^a	2,70 $\pm$ 0,39 ^a	2,97 $\pm$ 0,48 ^b

^{abc} – różne wartości superskryptów w wierszach oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami w obrębie kategorii ($P < 0,05$).

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

Cecha	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
Masa szynki właściwej (kg)	9,78 $\pm$ 0,88	9,98 $\pm$ 0,69	9,92 $\pm$ 0,97
Masa polędwicy (kg)	6,97 $\pm$ 0,84 ^a	7,37 $\pm$ 0,66 ^{ab}	7,92 $\pm$ 0,85 ^b
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 ^{ABa}	1,51 $\pm$ 0,34 ^{ABv}	1,74 $\pm$ 0,36 ^{Bc}

abc – różne wartości superskryptów w wierszach oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami w obrębie kategorii (P<0,05).

ABC – różne wartości superskryptów w wierszach oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami w obrębie kategorii (P<0,01).

Tabela 3. Parametry tekstury mięsa w poszczególnych grupach badawczych (średnia $\pm$ odchylenie standardowe).

Wskaźniki	Knury	Immunokastraty	Wieprzki
N	40	38	40
Jędrność	54,34 $\pm$ 10,68 ^a	55,02 $\pm$ 10,94 ^{ab}	52,94 $\pm$ 8,28 ^b
Wytrzymałość	141,37 $\pm$ 25,40 ^{ABa}	137,47 $\pm$ 29,38 ^{ABa}	130,64 $\pm$ 19,49 ^{Bb}
Twardość	8,71 $\pm$ 3,30 ^{ABa}	9,64 $\pm$ 2,77 ^{ABa}	10,79 $\pm$ 2,82 ^{Bb}
Spoistość	0,73 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,04
Sprężystość	0,67 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03
Żujność	4,33 $\pm$ 1,71 ^{ABa}	4,61 $\pm$ 1,43 ^{ABa}	5,24 $\pm$ 1,51 ^{Bb}
Elastyczność	0,30 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02

abc – różne wartości superskryptów w wierszach oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami w obrębie kategorii (P<0,05).

ABC – różne wartości superskryptów w wierszach oznaczają istotne różnice pomiędzy grupami w obrębie kategorii (P<0,01).

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Immunokastracja powoduje u knurków zatrzymanie rozwoju jąder i dodatkowych gruczołów płciowych, dzięki czemu jest skuteczną metodą eliminacji knurzego zapachu z tusz, co poprawia jakość mięsa i jego akceptowalność przez konsumentów.
2. Immunokastraty charakteryzują się lepszą efektywnością tuczu niż wieprzki – osiągają wyższe przyrosty dzienne oraz wykazują lepsze zużycie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała.
3. Analizowana alternatywna metoda kastracji chirurgicznej wpływa na poziom kortyzolu mierzonego w szczecinie świńskiej, tym samym wpływając na dobrostan zwierząt.
4. Korzystając z sekwencjonowania mRNA 3'taq (3'taq RNA-seq), zidentyfikowano kilka genów związanych z biosyntezą hormonów steroidowych, syntezą i wydzielaniem kortyzolu, zespołem Cushinga, szlakami metabolicznymi, wydzielaniem żółci, syntezą i wydzielaniem aldosteronu, procesem metabolicznym, procesem metabolicznym hormonów, metabolizmem lipidów, lokalizacją lipidów, różnicowaniem płci, procesem endokrynologicznym. Odkrycia te potwierdzają znaczny spadek hormonów płciowych i dostarczają istotnych spostrzeżeń na temat mechanizmu obrony przed stresem, który jest związany z metodą kastracji.
5. Immunokastracja może stanowić bezpieczną i humanitarną alternatywę dla kastracji chirurgicznej. Jednakże, jak każda interwencja, niesie ze sobą pewne ryzyka, które muszą być ocenione i zarządzane. Wprowadzenie immunokastracji wymaga odpowiedniego szkolenia personelu, monitorowania odpowiedzi zwierząt na szczepionkę, a także edukacji konsumentów i zgodności z przepisami prawnymi, aby zapewnić jej bezpieczne i skuteczne stosowanie.

6. Wprowadzenie tej alternatywnej metody kastracji na dużą skalę w warunkach krajowych będzie trudne – co związane jest z dużą liczbą małych gospodarstw, których nie stać na „dołożenie” kolejnych kosztów do produkcji tucznika.

Zadanie 01-11-05-11

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

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

Celem poznawczym jest ocena wpływu cech tucznych i rzeźnych młodych loszek oraz rodziny matki i linii ojca na wyniki użytkowości rozplodowej loch i knurów rasy puławskiej (Fot. 1.). Celem użytkowym jest określenie możliwości wykorzystania parametrów oceny przyżyciowej do przewidywania potencjału loch w zakresie ich rozrodczości oraz wskazanie najkorzystniejszych kójek rodzin matek z liniami ojców pod względem liczby prosiąt urodzonych i odchowanych rasie puławskiej.

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



Założenia metodyczne

W roku sprawozdawczym uzupełniono bazę kójek o wartości współczynnika inbrodu zwierząt (knurów, loch oraz miotów). Oszacowano wartości średnie i sd współczynnika inbrodu w poszczególnych grupach rodzin loch i linii knurów, a także wartości średnie tej cechy w poszczególnych grupach kójek. Podwyższona wartość współczynnika inbrodu u świń jest związana przede wszystkim z obniżeniem poziomu płodności loch i żywotności prosiąt. Jego ujemne skutki obserwuje się już u osobników, u których inbred przekracza 10%.

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

Syntetyczny opis wyników

Baza kójek zawierała dane z 12322 czystorasowych miotów rasy puławskiej. Mioty te pochodziły po 3914 lochach z 8 rodzin i 399 knurach z 7 linii. W tabeli 1. przedstawiono wyniki oceny użytkowości tucznej i rzeźnej, rozplodowej oraz średnie wartości inbrodu dla poszczególnych rodzin loch. Ponieważ rodzina Salwy była w tej bazie reprezentowana tylko przez 2 lochy, nie brano jej pod uwagę w analizach porównawczych.

Spośród analizowanych 7 rodzin, statystycznie istotnie największą liczbą prosiąt urodzonych i odchowanych cechowały się lochy z rodzin: Dazerka, Fuka, Fura, Sama. W dniu oceny przyżyciowej samice z tych 4 rodzin cechowały się średnią grubością słoniny z dwóch pomiarów (P2 i P4) powyżej 12,7 mm i procentową zawartością mięsa w tuszy od 51,5% (Fuka) do 56,2% (Dazerka). Zmienność fenotypową pomiędzy rodzinami loch rasy puławskiej w zakresie liczby prosiąt urodzonych i odchowanych do 21. dnia życia wykazali również Babicz i in (2007). Autorzy ci stwierdzili, podobnie jak w naszych badaniach, że spośród 6 rodzin utrzymywanych na terenie Lubelszczyzny, statystycznie istotnie największą liczbą prosiąt urodzonych cechowała się rodzina Dazerki (11,73 szt. w miotach czystorasowych i 11,95 szt. w miotach krzyżówkowych z rasą pbz), a najniższą liczbą prosiąt urodzonych w czystej rasie cechowały się rodziny: Akry (10,96 szt.), Fajki (10,69 szt.) i Multy (10,63 szt.). Analizując wartości współczynnika inbredu loch stwierdzono, że najwyższą jego wartością cechowały się samice z rodziny Arki (8%) i Akry (6,2%), u pozostałych rodzin loch wartość tego wskaźnika wahała się od 4,8% (Fuka) do 5,1% (Sama). Inbred miotów pochodzących po lochach z analizowanych rodzin wahał się od 5,8% (z rodziny Fura) do 19,5 % (z rodziny Fuki).

W tabeli 2. przedstawiono charakterystykę użytkowości tucznej i rzeźnej oraz wartości współczynnika inbredu knurów pochodzących z 7 linii rasy puławskiej oraz efekt linii knura na liczbę urodzonych i odchowanych prosiąt w miotach. Najwyższą średnią wartość współczynnika inbredu oszacowano dla osobników w linii Rodak (9,4%), najniższą w linii Sam (4%). Najwięcej miotów po jednym knurze rodziło się w linii Karat, najmniej po knurach linii Sam. Średnia wartość inbredu oszacowanego dla miotów po knurach tych linii wynosiła od 5,6% (po linii Sam) do 9,1% (po linii Rodak). Analizując wpływ linii knura na liczbę prosiąt urodzonych i odchowanych w miotach stwierdzono, że statystycznie istotnie najliczniejsze mioty urodziły się po knurach z linii Sam, a następnie po knurach linii Karat, Winiak i Wicher. Najmniejszą liczbę prosiąt urodzonych w miotach uzyskano po knurach z linii Frykas i Rodak, co stwierdzono także w badaniach wykonanych w 2005 roku (Walkiewicz i in. 2005). W przypadku liczby prosiąt odsadzonych statystycznie, istotnie największą ich liczbę uzyskano w miotach po knurach linii Sam, a następnie po knurach linii Karat.

W tabeli 3. przedstawiono średnią wartość inbredu miotów pochodzących z kojarzeń rodzin loch z liniami knurów. Kojarzenia o średniej wartości inbredu 10% i więcej (zaznaczone w tabeli na szaro) występowały w 4 rodzinach loch. Były to kojarzenia rodziny Akra z linią Rodak i Winiak, rodziny Arka z linią Pol, Sam i Winiak, rodziny Fuka z linią Frykas i Karat oraz rodziny Sama z linią Wicher.

Tabela 1. Zestawienie dla rodzin loch. Charakterystyka użytkowości tucznej i rzeźnej młodych loszek oraz ich użytkowości rozplodowej (średnie $\pm$ sd) na bazie kojarzeń (3 914 loch).

	AKRA	ARKA	DAZERKA	FAJKA	FUKA	FURA	SAMA
N loch	1486	68	706	576	6	142	928
Wiek w dniu oceny [dni]	181 $\pm$ 15,08	174 $\pm$ 12,95	185 $\pm$ 15,06	183 $\pm$ 15,19	181 $\pm$ 13,87	182 $\pm$ 14,70	183 $\pm$ 14,01
Masa ciała [kg]	104,8 $\pm$ 10,62	100,2 $\pm$ 11,24	106,4 $\pm$ 11,75	105,0 $\pm$ 9,89	110,1 $\pm$ 1,13	107,0 $\pm$ 8,58	107,9 $\pm$ 8,91
Średnia grubość słoniny [mm]	12,23 $\pm$ 2,16	11,63 $\pm$ 2,05	12,78 $\pm$ 2,33	12,67 $\pm$ 2,52	14,80 $\pm$ 2,10	13,81 $\pm$ 2,41	13,01 $\pm$ 2,59
Przyrost dzienny [g/dzień]	582 $\pm$ 65,59	590 $\pm$ 71,25	572 $\pm$ 69,15	573 $\pm$ 61,31	611 $\pm$ 63,67	589 $\pm$ 62,70	591 $\pm$ 72,24
Mięsność [%]	56,89 $\pm$ 2,87	56,91 $\pm$ 1,99	56,16 $\pm$ 3,15	55,85 $\pm$ 3,26	51,49 $\pm$ 3,32	54,23 $\pm$ 3,36	54,87 $\pm$ 3,52
Inbred lochy	0,062 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04	0,049 $\pm$ 0,04	0,049 $\pm$ 0,04	0,048 $\pm$ 0,01	0,050 $\pm$ 0,05	0,051 $\pm$ 0,04
Liczba miotów [szt.]	3,84 $\pm$ 2,35	2,55 $\pm$ 1,69	3,99 $\pm$ 2,46	3,56 $\pm$ 2,22	2,00 $\pm$ 1,07	4,63 $\pm$ 3,02	4,01 $\pm$ 2,63
Inbred miotu	0,086 $\pm$ 0,06	0,085 $\pm$ 0,03	0,062 $\pm$ 0,05	0,071 $\pm$ 0,06	0,195 $\pm$ 0,12	0,058 $\pm$ 0,05	0,068 $\pm$ 0,06
Liczba prosiąt ur. [szt.]	10,22 $\pm$ 2,53 a	9,52 $\pm$ 1,99 d	10,54 $\pm$ 2,11bc	10,17 $\pm$ 2,25ae	10,88 $\pm$ 1,25	10,47 $\pm$ 2,07cf	10,70 $\pm$ 1,93 b
Liczba prosiąt w 21. dniu [szt.]	9,11 $\pm$ 2,31a	8,77 $\pm$ 2,15c	9,50 $\pm$ 1,83 b	9,12 $\pm$ 2,05a	9,50 $\pm$ 0,53	9,35 $\pm$ 1,86b	9,42 $\pm$ 1,71b

Tabela 2. Charakterystyka użytkowości tucznej i rzeźnej młodych knurów z poszczególnych linii (średnia $\pm$ sd) oraz efekt linii knura na wyniki użytkowości rozplodowej loch.

	Frykas	Karat	Pol	Rodak	Sam	Wicher	Winiak
N knurów	47	59	85	73	38	27	70
Wiek w dniu oceny [dni]	187 $\pm$ 14,97	184 $\pm$ 13,96	179 $\pm$ 11,95	179 $\pm$ 14,02	176 $\pm$ 12,76	183 $\pm$ 17,51	186 $\pm$ 17,50
Masa ciała [kg]	115 $\pm$ 12,10	113 $\pm$ 7,33	108 $\pm$ 10,53	109 $\pm$ 9,39	112 $\pm$ 9,03	115 $\pm$ 10,16	116 $\pm$ 8,89
Średnia grubość słoniny [mm]	11,35 $\pm$ 1,51	10,22 $\pm$ 1,60	11,37 $\pm$ 1,96	11,26 $\pm$ 1,95	9,55 $\pm$ 1,56	11,00 $\pm$ 1,49	10,77 $\pm$ 1,64
Przyrost dzienny [g/dzień]	610,3 $\pm$ 71,68	614,7 $\pm$ 58,87	612,7 $\pm$ 77,67	618,6 $\pm$ 67,60	650,6 $\pm$ 74,74	634,9 $\pm$ 82,87	629,2 $\pm$ 96,85
Mięsność [%]	57,47 $\pm$ 2,99	58,28 $\pm$ 2,05	57,23 $\pm$ 2,53	56,61 $\pm$ 2,28	57,36 $\pm$ 2,16	58,05 $\pm$ 2,55	58,16 $\pm$ 3,72
Inbred knura	0,046 $\pm$ 0,02	0,045 $\pm$ 0,02	0,050 $\pm$ 0,03	0,094 $\pm$ 0,04	0,040 $\pm$ 0,03	0,055 $\pm$ 0,05	0,066 $\pm$ 0,05
Średnia liczba miotów po knurze [szt.]	31,62 $\pm$ 27,48	36,32 $\pm$ 33,54	33,91 $\pm$ 37,06	31,56 $\pm$ 26,79	19,11 $\pm$ 17,58	26,26 $\pm$ 23,02	29,60 $\pm$ 27,96
Inbred miotów	0,074 $\pm$ 0,05	0,059 $\pm$ 0,05	0,074 $\pm$ 0,06	0,091 $\pm$ 0,06	0,056 $\pm$ 0,04	0,079 $\pm$ 0,05	0,078 $\pm$ 0,06
Liczba prosiąt ur. [szt.]	10,15 $\pm$ 2,41e	10,54 $\pm$ 1,83ab	10,31 $\pm$ 2,44cd	10,24 $\pm$ 2,31 ce	10,70 $\pm$ 2,26a	10,43 $\pm$ 2,20bd	10,51 $\pm$ 2,29b
Liczba prosiąt w 21. dniu [szt.]	8,91 $\pm$ 2,21e	9,53 $\pm$ 1,55b	9,15 $\pm$ 2,25d	9,21 $\pm$ 2,12cd	9,70 $\pm$ 1,92a	9,25 $\pm$ 1,98cd	9,28 $\pm$ 2,02c

Tabela 3. Charakterystyka inbredu miotów pochodzących z kojarzeń rodzin loch z liniami knurów.

	AKRA	ARKA	DAZERKA	FAJKA	FUKA	FURA	SAMA
Frykas	0,084	0,050	0,057	0,067	0,286	0,070	0,079
Karat	0,055	0,037	0,061	0,063	0,165	0,054	0,059
Pol	0,079	0,097	0,069	0,081	-	0,060	0,056
Rodak	0,103	0,090	0,069	0,078	-	0,044	0,087
Sam	0,088	0,120	0,042	0,053	-	0,031	0,050
Wicher	0,064	0,026	0,068	0,079	-	0,058	0,112
Winiak	0,108	0,097	0,064	0,061	-	0,070	0,049

Analizując dane miotów czystorasowych pochodzących po aktualnie utrzymywanych w stadach 7 rodzinach loch i 7 liniach knurów rasy puławskiej stwierdzono, że największą liczbą prosiąt urodzonych i odchowanych w miotach cechowały się rodziny lochy: Dazerka, Fuka, Fura, Sama. W przypadku linii knurów, najliczniejsze mioty pochodziły po knurach z linii Sam, a następnie z linii Karat, Winiak i Wicher. Po lochach z rodzin: Akra, Arka i Fajka oraz po knurach z linii Frykas i Rodak urodziło i odchowało się statystycznie istotnie najmniej prosiąt.

Rozpatrując poszczególne kojarzenia stwierdzono, że mioty urodzone po kojarzeniu rodziny Fuka z linią Frykas cechowały się bardzo wysoką wartością inbredu (28,6%). Najniższą wartość współczynnika inbredu oszacowano dla miotów pochodzących z kojarzenia rodziny Arka z linią Wicher (2,6%) oraz rodziny Fura z linią Sam (3,1%).

Zadanie 01-11-06-11

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

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

Wirus afrykańskiego pomoru świń (ASF) jest obecnie największym zagrożeniem dla populacji dzików oraz trzody chlewnej w kraju. Choroby nie leczy się, ponieważ jest zwalczana z urzędu, ze względu na duże ryzyko jej rozprzestrzeniania się oraz bardzo wysoką śmiertelność zarażonych zwierząt. Powoduje to duże straty ekonomiczne dla producentów i gospodarki kraju, wynikające z tytułu ewentualnych depopulacji zarażonych stad, ograniczenia w możliwości przemieszczania świń, mięsa wieprzowego i innych produktów pozyskanych od świń oraz dzików

oraz ograniczeń związanych z zakazem eksportu wieprzowiny. Brak jest szczepionek przeciwko wirusowi ASF, pomimo prac nad nią wielu laboratoriów na świecie cel jest nadal odległy, a stosowanie kosztownej bioasekuracji nie gwarantuje stuprocentowego bezpieczeństwa.

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

Wynikiem badań do zastosowania w praktyce hodowlanej może być marker oporności na ASF genetyczny lub grupa takich markerów, jak również analiza możliwości wdrożenia go (ich) do szeroko rozumianej praktyki hodowlanej (na podstawie analiz dotyczących ich wpływu na cechy użytkowe). W odróżnieniu od konieczności stałego i kosztownego stosowania potencjalnych szczepionek na ASF, wdrożenie do programu hodowlanego ewentualnych markerów genetycznych oporności na ASF jest skutecznym sposobem eliminacji problemu na poziomie hodowli zarodowej, a także produkcji towarowej.

Zastosowanie w hodowli wspomnianych markerów genetycznej oporności na ASF w przestrzeni kilku pokoleń może skutecznie wyeliminować problem ASF, dając materiał hodowlany i produkcyjny oporny na wirusa. Pozytywne wyniki poszukiwań takiego markera i ich wpływu na cechy użytkowe mogą finalnie przyczynić się do opatentowania takiego rozwiązania.

Etapem badawczym realizowanym w bieżącym roku była ocena możliwości wykorzystania potencjalnych markerów w aktualnej populacji zarodowej świń (populacji aktywnej) – oznaczenie i analiza frekwencji. W 2024 roku otrzymano dodatkowy materiał z Mozambiku w postaci wyizolowanego DNA pochodzącego od świń lokalnej rasy produkcyjnej, które padły pod wpływem infekcji wirusem ASF – 21 próbek. Wszystkie próbki zostały zgenotypowane na poziomie genomu przy użyciu macierzy SNP (PorcineSNP80 HTS Genotyping BeadChip). Dane przeanalizowano bioinformatycznie i porównano z danymi otrzymanymi w ubiegłych latach od świń, które przeżyły zakażenia wirusem ASF oraz osobnikami tła (o nieznanym statusie zdrowotnym).

Na podstawie kompletu analiz – genotypowania mikromacierzami SNP, sekwencjonowanie całych genów metodą NGS oraz analizy funkcjonalnej wybranych genów (Figura 1.-3.), wytypowano 6 genów jako potencjalnych kandydatów związanych z przebiegiem infekcji wirusem ASF – *TTC12*; *WWC1*; *ENSSSCG00000044777* (novel gene); *CYLD*; *DAB2iP* i *OCRL*.

Figura 1. Szlak molekularny – odpowiedź immunologiczna – wytypowany gen *DAB2iP* – oprogramowanie IPA (Interpretative Phenomenological Analysis).

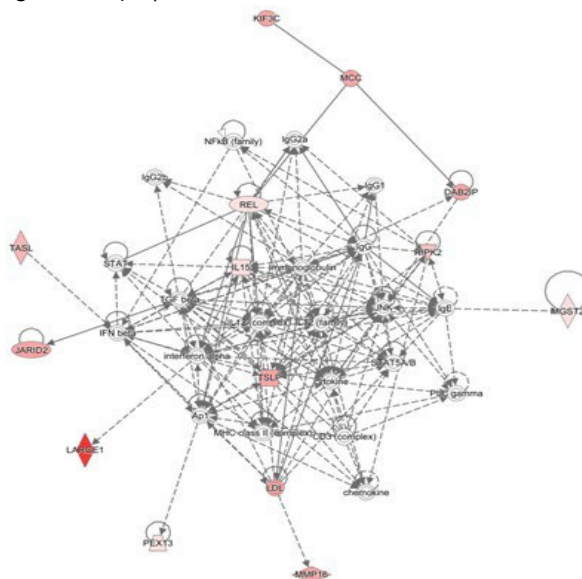


Figura 2. Szlak molekularny – śmierć komórkowa i przetrwanie komórek – wytypowany gen *TTC12* (ang. *Cell death and survival*), oprogramowanie IPA (*Interpretative Phenomenological Analysis*).

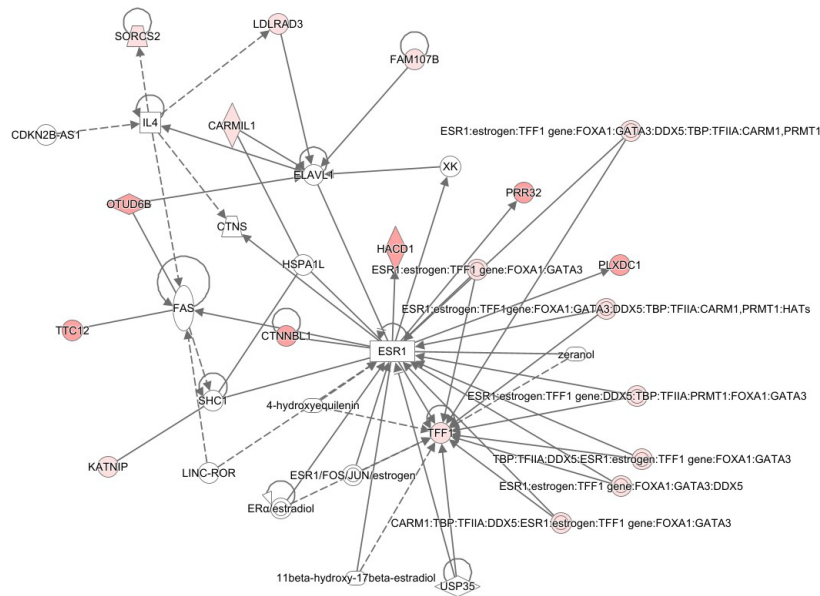
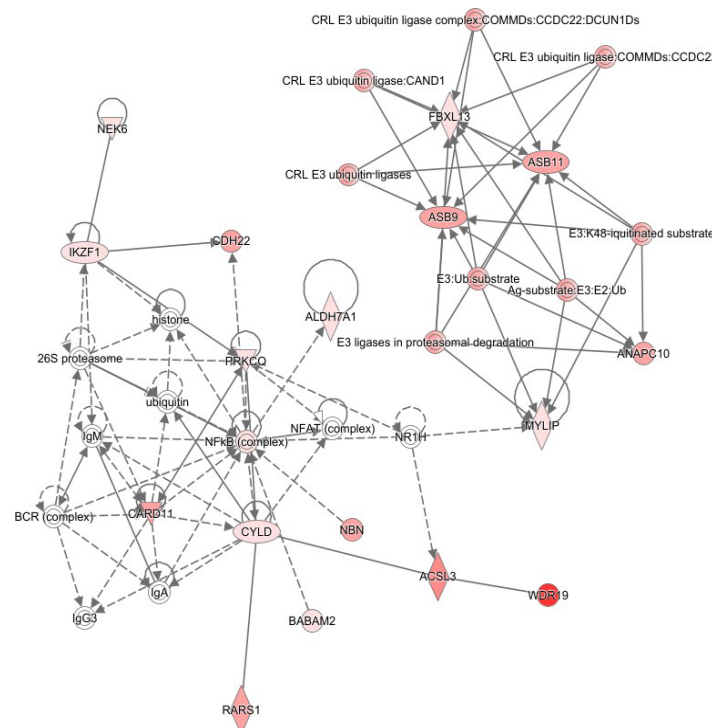


Figura 3. Szlak molekularny – rozwój nowotworów i chorób hematologicznych – wytypowany gen *CYLD*, oprogramowanie IPA (*Interpretative Phenomenological Analysis*).



Dla wszystkich powyższych genów dobrano i zoptymalizowano metodę genotypowania przy użyciu sekwencjonowania Sangera (Tabela 1.) oraz wykonano genotypowanie – łącznie dla 336 sztuk reprezentujących następujące rasy: wbp, pbz, duroc, pietrain i puławską. Rasy krajowe różniły się genetycznie od świń z Mozambiku, obecność mutacji stwierdzono jedynie w trzech genach (*TTC12*, *WWC1* i *DAB2IP*). Na tej podstawie oszacowano frekwencje genotypów dla tych genów co przedstawiono w tabeli 2. i 3.

Tabela 1. Sekwencje starterów wykorzystane do genotypowania metodą Sanger.

Gen	Nr akcesyjny	Startery	Długość amplikonu
CYLD	ENSSSCG00000040286	F- TCGCTGGCTGAGGTAAAGA R- GGAACAAGTGGATGAGATGCC	538 pz
DAB2IP	ENSSSCG00000005524	F- TGAGAAAGGGCAGTAGGTGG R- TGCTTCTCTGACCTCGTGT	549 pz
OCRL	ENSSSCG00000012650	F-CTGGTGACGCTAGTGATTGC R-TCCCATCTGACACAGCACTT	574 pz
Novel gene	ENSSSCG00000044777	F- TTCCCACTCCCATCCTTCC R- AGAAGTGGGGCAGTGTGTTA	572 pz
WWC1	ENSSSCG00000035456	F- TAAAGAGGGTCCTGCAGTGG R- GCCAGTCCTCCACAGTACT	575 pz
TTC12	ENSSSCG00000015047	F -TTTCCTGTCTAGCCCTGGG R -GTGGAAGTGAAGCCTAGTCA	525 pz

Tabela 2. Frekwencja w poszczególnych rasach analizowana dla mutacji w genie *TTC12*.

Gen		rasa					
		wbp	pbz	puławska	duroc	pietrain	razem
TTC12_1	CC		34,3	2,1	15,0		19,3
	CG	33,9	42,9	14,6	50,0		34,0
	GG	66,1	22,9	83,3	35,0	100	46,7
TTC12_4	CC	1,6	33,9	2,1	14,3		19,5
	CG	32,8	43,7	14,6	52,4		34,7
	GG	65,6	22,4	83,3	33,3	100	45,8
TTC12_5	AA						
	AC	30,2	64,2	14,9	44,4		40,6
	CC	69,8	35,8	85,1	55,6	100	59,4
TTC12_21	AA	70,9	36,1	85,1	55,6	100	59,3
	AG	29,1	63,9	14,9	44,4		40,7
	GG						

Tabela 3. Frekwencja w poszczególnych rasach analizowana dla mutacji w genach *WWC1* i *DAB2IP*.

Gen		rasa					
		wbp	pbz	puławska	duroc	pietrain	razem
WWC1_1	CC						
	CT	18,8	41,6		58,3	44,4	30,4
	TT	81,2	58,4	100	41,7	55,6	69,6
WWC1_9	CC	89,2	82,3	100	90,0	83,3	86,4
	CT	10,8	17,7		10,0	16,7	13,6
	TT						
DAB2IP	AA		30,2	42,9	16,7	85,7	44,5
	AG		69,8	57,1	83,3	14,3	55,5
	GG						

Wyniki pokazują istotne zróżnicowanie frekwencji poszczególnych wariantów genetycznych pomiędzy rasami świń, co może wynikać ze specyfiki rasowej lub różnie ukierunkowanej presji selekcyjnej. Przykładami takich specyficznych profili genetycznych o charakterze rasowym są przypadku genów *TTC12* i *DAB2IP* niektóre warianty, takie jak GG w *TTC12_1* i AA w *DAB2IP*. Są one szczególnie częste w rasach puławska i pietrain.

Wariant CC w mutacji *WWC1_9* jest niemal powszechny we wszystkich analizowanych rasach, co wskazuje na potencjalnie konserwatywny charakter tego genu. Sugeruje to, że ten wariant mógł zostać utrzymany w procesie ewolucji i selekcji hodowlanej, ponieważ być może pełni istotną funkcję biologiczną lub jest związany z korzystnymi cechami, które były preferowane w hodowli.

Zróznicowanie wariantów między rasami sugeruje, że dalsze badania funkcjonalne mogłyby pomóc w lepszym zrozumieniu ich potencjalnej roli w oporności na ASF, co będzie realizowane w kolejnym etapie badań. W chwili obecnej trudno wskazać jednoznaczną zależność między wariantami a opornością na chorobę. Prowadzone są też analizy asocjacyjne, aby poznać zależności tych wariantów z ważnymi dla hodowli cechami użytkowymi. Pozwoli to stwierdzić czy potencjałe korzystne warianty pod względem oporności na ASF nie niosą negatywnych efektów hodowlanych. Analizy te obejmą grupy cech: tuczne, rzeźne i jakości mięsa.

Zadanie 01-11-07-11

Opracowanie równań regresji do poubojowego szacowania zawartości mięsa w tuszy świń ocenianych wg nowej metodyki.

kierownik zadania: dr hab. Grzegorz Żak, prof. IZ PIB

Celem podjętych badań było opracowanie nowych równań regresji do szacowania zawartości mięsa w tuszy świń, ocenianych poubojowo w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) do wyższych mas ciała (120 kg). Zgodnie z zasadami obowiązującymi przy opracowaniu takich równań, docelowo szczegółowej dysekcji poddanych zostanie 120 półtuszy każdej z grup rasowych, tj. komponentu matecznego, który reprezentuje rasa pbz oraz komponentu ojcowskiego reprezentowanego przez mieszańce F1 duroc x pietrain. Zwierzęta pochodziły z ferm zarodowych znajdujących się na terenie kraju. W oparciu o stworzoną bazę danych z dysekcji szczegółowych po dokonaniu analiz statystycznych wyprowadzone będą równania regresji o wartości błędu szacowania, dopuszczającej formułę do stosowania w praktyce. Wybór właściwego równania poprzedzony będzie konsultacjami z Polskim Związkiem Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej POLSUS. Równanie uznane za najwłaściwsze zostanie wdrożone do stosowania w nowej metodyce oceny świń w SKURTCh.

Zgodnie z harmonogramem prac przeprowadzono pierwszy etap, tj. część doświadczalną wykonywaną przez SKURTCh, zlokalizowaną w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB Chorzeli Sp. z o.o.

W 2024 roku do SKURTCh w Chorzeli trafiło 190 sztuk prosiąt reprezentujących obydwa komponenty rasowe. Przeprowadzono tucz kontrolny i ubój zwierząt doświadczalnych wg obowiązującej metodyki. Wykonano 138 dysekcji szczegółowych lewych półtuszy – ubitych świń zgodnie z metodyką SKURTCh, w tym 90 sztuk świń rasy pbz oraz 48 sztuk mieszańców ras pietrain i duroc. Wyniki dysekcji zapisywano na dedykowanych kartach dysekcyjnych. Następnie utworzono struktury baz danych, w których w formie elektronicznej kolekcjonowane były wyniki dysekcji szczegółowych tusz zwierząt doświadczalnych. Wyniki dysekcji świń przekazane zostały do Zakładu Hodowli Świń Instytutu Zootechniki PIB.

Na koniec 2024 roku, na stanie w SKURTCh pozostawało 52 sztuki świń, w tym 22 mieszańce ras pietrain i duroc oraz 30 rasy pbz. Ukończenie części doświadczalnej przewidywane jest na koniec 2025 roku. Realizacja zadania w pierwszym roku realizacji przebiegała zgodnie z harmonogramem.

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

Zadanie 01-12-08-11

Wpływ czynników środowiskowych na poprawę efektywności chowu kur ras zachowawczych.

kierownik zadania: prof. dr hab. Józefa Krawczyk

Celem badań było określenie wpływu pory znoszenia jaj na ich jakość. Dokonano oceny kształtowania się jakości jaj znoszonych o różnych porach dnia przez kury różniące się istotnie poziomem nieśności, tj. zielononóżka kuropatwiana (Z-11) i rhode island white (A-33).

Materiałem badawczym były jaja pobrane od tych dwóch ras/rodów kur nieśnych objętych w Polsce programem ochrony. W okresie od 24. do 56. tygodniu życia, co 4 tygodnie od każdego rodu kur z tego samego przedziału zbierano wszystkie jaja o godz. 7.00, 10.00 i 13.00. Następnie poddawano je analizie oceny jakości treści i skorup. Ponadto, w 40. tygodniu życia przez 3 dni zebrano po 10 jaj w ww. porach dnia i przekazano do Centralnego Laboratorium Instytutu do wykonania analizy chemicznej ich żółtek.

Średnia nieśność kur w okresie 21-56 tygodni wynosi 152 sztuki/nioskę dla zielononózek kuropatwianych (Z-11) oraz 177 sztuk/nioskę dla rhode island white (A-33). Analizując wyniki składu chemicznego żółtek jaj w rodzie A-33, zanotowano w nich statystycznie istotnie niższy poziom wszystkich badanych składników w porównaniu z żółtkami jaj od kur Z-11 (Tabela 1.). Nie odnotowano w tym zakresie istotnych różnic między żółtkami jaj znoszonymi o różnych porach dnia z wyjątkiem popiołu surowego w jajach kur Z-11, którego niższy poziom stwierdzono w żółtkach jaj znoszonych po południu. Kury A-33 znosiły jaja o większej masie, ale o mniejszym wskaźniku JH i niższym zabarwieniu żółtka w porównaniu do jaj kur Z-11 (Tabela 2.). W rodzie A-33 żółtka jaj zebranych o godz. 10.00 wyróżniały się lepszym wybarwieniem niż te zniesione rano i po południu. Większy wpływ pory znoszenia jaj na ich jakość odnotowano wśród jaj od niosek Z-11. Jaja od tych kur znoszone rano wyróżniały się większą masą całkowitą i masą żółtek, ale gorszymi parametrami świeżości (wysokość białka i JH) w porównaniu do znoszonych później (Tabela 2.).

Skorupy jaj Z-11, w porównaniu do A-33, były lżejsze, cieńsze, o mniejszej gęstości i jaśniejszej barwie w porównaniu z jajami A-33. Nie potwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie wytrzymałości na zgniecenie między jajami obydwu badanych ras. Jaja kur Z-11 ze zbioru ранego wyróżniały się istotnie większą masą skorupy i ich grubością w porównaniu do zbieranych później. Wśród jaj od kur A-33 istotny wpływ pory znoszenia jaj na jakość ich skorup odnotowano w zakresie grubości, wytrzymałości na zgniecenie oraz barwy. Jaja od tych kur znoszone rano wyróżniały się największą grubością skorup i większą ich wytrzymałością na zgniecenie oraz jaśniejszą barwą w porównaniu z tymi, które zbierano później (Tabela 3.).

W podsumowaniu przeprowadzonych w tym okresie badań stwierdzono:

- statystycznie istotne różnice w zakresie większości cech fizycznych i chemicznych jakości jaj między jajami pochodzącymi od starej rodzimej rasy kur zielononóżka kuropatwiana (ród Z-11) o niskiej nieśności a jajami uzyskanymi od kur o znacznie większej nieśności rhode island white (ród A-33),

- jaja znoszone przez kury rano wyróżniały się mniejszą o 1,7 g masą całkowitą i masą białka, większą o 2,4 porów/cm² liczbą porów skorupy oraz wyższymi o 0,15 wartościami pH białka i niższym o 0,17 pH żółtka w porównaniu do znoszonych rano.

Tabela 1. Wpływ genotypu kur i pory znoszenia jaj na podstawowy skład chemiczny żółtka jaj.

Genotyp	Czas zbioru jaj (godz.)	Sucha masa (%)	Popiół surowy (%)	Białko ogólne (%)	Tłuszcz surowy (%)	Zawartość cholesterolu całkowitego (mg/g)
Z-11	07:00	49,1±1,05	1,66±0,09 a	16,0±0,35	34,3±1,03	11,0±0,80
	10:00	49,5±0,54	1,59±0,09	16,0±0,33	34,6±0,35	11,5±0,42
	13:00	49,2±0,67	1,53±0,05 b	16,0±0,11	34,0±1,58	11,6±1,01
	średnia	49,3±0,74**	1,59±0,09**	16,0±0,26**	34,3±1,04*	11,4±0,76**
A-33	07:00	48,2±0,45	1,49±0,03	15,4±0,43 b	33,2±1,34	9,9±0,31
	10:00	48,9±0,71	1,57±0,06	15,8±0,25 a	33,1±0,69	10,7±0,42
	13:00	48,0±0,43	1,48±0,08	15,6±0,27	33,4±0,59	10,4±0,53
	średnia	48,6±0,67**	1,51±0,07**	15,6±0,36**	33,3±0,86*	10,4±0,53**
Istotność różnic (P)						
Genotyp		0,004	0,009	0,002	0,021	0,000
Czas zbioru		0,108	0,070	0,304	0,949	0,105
Genotyp x czas zbioru		0,677	0,122	0,309	0,668	0,747

Objaśnienia: Strains of hens: greenleg partridge (Z-11), rhode island white (A-33); * różnice istotne przy P<0,05; ** – różnice wysoko istotne przy P<0,01; Różnice istotne (a, b...) lub wysoko istotne (A,B,...) między porą zbioru jaj, oddzielnie dla każdego rodzaju kur.

Tabela 2. Wpływ genotypu kur i pory znoszenia jaj na jakość treści jaj.

Genotyp	n	Czas zbioru jaj (godz.)	Masa jaja (g)	Wysokość białka (mm)	JH	Masa żółtka (g)	Barwa żółtka (pkt)
Z-11	56	07:00	56,3±6,27 b	8,10±1,35 a	90,4±7,50 a	16,8±1,94 a	9,23±1,35
	39	10:00	53,1±5,77 a	8,84±1,68 b	94,7±8,95 b	15,2±2,36 b	9,61±1,23
	79	13:00	55,6±6,54 c	8,53±1,38	92,7±7,68	16,3±2,31 a	9,04±1,46
Suma lub średnia	174		55,3±6,37**	8,46±1,46	92,4±8,04*	16,2±2,28	9,23±1,39**
A-33	53	07:00	57,4±7,13	8,03±1,68	89,3±9,80	15,6±2,04	8,43±1,82 a
	77	10:00	59,4±6,66	8,32±1,50	90,6±8,30	16,3±2,34	9,06±1,70 b
	86	13:00	58,0±6,63	8,52±1,44	92,0±8,14	15,6±2,25	8,66±1,68
Suma lub średnia	216		58,3±6,78**	8,33±1,52	90,8±7,50*	15,9±2,25	8,75±1,59**
Istotność różnic (P)							
Genotyp			0,000	0,205	0,025	0,314	0,000
Czas zbioru			0,725	0,018	0,021	0,283	0,025
Genotyp x czas zbioru			0,010	0,371	0,240	0,000	0,556

Objaśnienia: Tabela 1.

Tabela 3. Wpływ genotypu kur i pory znoszenia jaj na jakość skorup jaj.

Genotyp	n	Czas zbioru jaj (godz.)	Masa skorupy (g)	Grubość skorupy (mm)	Gęstość skorupy (mg/cm ²)	Wytrzymałość na zgniecenie (N)	Barwa skorupy (pkt.)
Z-11	56	07:00	5,77±0,61 b	0,314±0,03 a	78,1±8,32	45,6±11,8	67,1±7,98
	39	10:00	5,49±0,65 a	0,303±0,03 b	77,4±8,96	42,8±9,62	65,6±8,79
	79	13:00	5,79±0,63 b	0,305±0,02	78,6±6,73	42,7±11,4	67,0±9,94
Suma lub średnia	174		5,72±0,63**	0,307±0,03**	78,2±7,77**	43,6±11,0	66,7±9,04**
A-33	53	07:00	6,01±0,77	0,324±0,03 A	80,5±8,60	45,8±12,3 b	47,1±18,6 a
	77	10:00	6,20±0,67	0,313±0,02 B	81,3±5,90	39,6±10,4 a	40,5±12,1 b
	86	13:00	6,12±0,70	0,313±0,02 B	82,4±7,63	42,1±11,9 b	42,8±15,5
Suma lub średnia	216		6,12±0,71**	0,316±0,03**	81,5±7,33**	42,1±11,7	43,0±15,4**
Istotność różnic (P)							
Genotyp			0,000	0,000	0,000	0,325	0,000
Czas zbioru			0,425	0,001	0,308	0,009	0,068
Genotyp x czas zbioru			0,029	0,904	0,721	0,493	0,280

Objaśnienia: Tabela 1.

Zadanie 01-12-09-11

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

kierownik zadania: dr inż. Ewa Sosnowka-Czajka

W 2024 roku zakończono badania, których celem było opracowanie metody produkcji certyfikowanego żywca drobiowego w sezonie zimowym, w warunkach stresu zimna, w oparciu o kurczęta rzeźne rasy lokalnie zaadaptowanej i kurczęta mieszańców wolno rosnących w aspekcie produktywności, dobrostanu, statusu immunologicznego, poziomu stresu oraz wybranych parametrów jakości mięsa. Na badania składały się trzy doświadczenia mające na celu porównanie efektywności odchowu kurcząt rzeźnych rasy przysposobionej lokalnie oraz wolno rosnących mieszańców w chowie ekologicznym (etap 1.), ocenę efektywności odchowu kurcząt rzeźnych rasy lokalnie zaadaptowanej (etap 2.) oraz wolno rosnących mieszańców (etap 3.) w warunkach długotrwałego stresu zimna w chowie ekologicznym.

Materiał doświadczalny stanowiły jednodniowe pisklęta rhode island red (RIR) oraz hubbard JA 957. Kurczęta odchowowano metodami ekologicznymi, zgodnie z wymogami, określonymi w aktach prawnych dotyczących rolnictwa ekologicznego. Czynnikiem doświadczalnym (etap 2. i 3.) był stres termiczny (temperatura obniżona o 15°C w stosunku do temperatur zalecanych), zastosowany w środkowym lub ostatnim okresie odchowu symulującym przebywanie ptaków na wybiegach w sezonie zimowym.

Podczas badań zbierano dane dotyczące warunków klimatycznych. Kontrolowano wyniki produkcyjne, jakość tuszki i mięsa, wybrane wskaźniki fizjologiczne (parametry biochemiczne krwi, narządy limfatyczne, temperaturę ciała) i dobrostan (stan kończyn i upierzenia, toniczny bezruch, obserwacje behawioralne) kurcząt rzeźnych.

Ocena efektywności odchowu kurcząt w warunkach długotrwałego stresu zimna w chowie ekologicznym wykazała, że:

- zastosowany stres zimna nie wpłynął na końcową masę ciała i wykorzystanie paszy na przyrost 1 kg masy ciała – zarówno u kurcząt RIR, jak i Hubbard JA 957,
- obniżenie temperatury powietrza w ostatnim okresie odchowu u kurcząt RIR wpłynęło korzystnie na narządy limfatyczne (głównie śledzionę), liczbę upadków oraz na wybrane parametry analizy rzeźnej – wzrost udziału mięśni piersiowych oraz mniejsze otłuszczenie tuszki,
- obniżone temperatury odchowu wpłynęły korzystnie na niektóre parametry jakości mięsa (wyciek, pH i profil kwasów tłuszczowych), przy czym wyraźniejszy wpływ stresu zimna obserwowano u kurcząt RIR, którym zastosowano obniżenie temperatury powietrza w ostatnim okresie odchowu,
- niskie temperatury otoczenia wpłynęły na obniżenie temperatury rektalnej i radiacyjnej kurcząt rzeźnych RIR oraz hubbard JA 957,
- kurczęta RIR charakteryzowały się większą wrażliwością na stres zimna zastosowany w środkowym okresie odchowu,
- zastosowane stesy zimna w nieznacznym stopniu wpłynęły na kształtowanie się badanych parametrów krwi u kurcząt rzeźnych RIR oraz hubbard JA 957,

- niskie temperatury odchowu wpłynęły na behavior kurcząt rzeźnych RIR oraz hubbard JA 957; obniżone temperatury powietrza wiązały się z mniejszym udziałem ptaków odpoczywających pojedynczo oraz zmniejszeniem zachowań świadczących o dobrym poziomie dobrostanu; obserwowano natomiast wzrost zachowań w ramach behawioralnej termoregulacji, tj. większy udział kurcząt pobierających paszę oraz odpoczywających grupowo.

Porównanie efektywności odchowu kurcząt rzeźnych rasy przysposobionej lokalnie oraz wolno rosnących mieszańców w chowie ekologicznym wykazało, że pochodzenie kurcząt rzeźnych miało wpływ na większość badanych parametrów.

1. Kurczęta hubbard JA 957 utrzymywane zgodnie z założeniami rolnictwa ekologicznego charakteryzowały się lepszymi parametrami produkcyjnymi (przyrostyienne, końcowa masa ciała, wykorzystanie paszy, upadki) oraz wyraźnie lepszymi parametrami analizy rzeźnej.
2. Pochodzenie kurcząt rzeźnych miało wpływ na parametry jakościowe mięsa; mięso kurcząt hubbard JA 957 charakteryzowało się lepszym wyciekim, pH24, wyższym poziomem witaminy E oraz korzystniejszym profilem kwasów tłuszczowych; mięso kurcząt RIR cechowało się lepszą wodochłonnością i niższym poziomem cholesterolu.
3. Kurczęta RIR charakteryzowały się wyższym udziałem narządów limfatycznych (śledziony i torby Fabrycjusza) w porównaniu do kurcząt hubbard JA 957.
4. Kurczęta hubbard JA 957 cechowały się niższym poziomem hormonów tarczycy, kortykosteronu i większą podatnością na stres oksydacyjny w porównaniu do kurcząt RIR.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, produkcja certyfikowanych kurcząt rzeźnych powinna opierać się o kurczęta hubbard JA 957. Wykorzystanie w chowie ekologicznym wolno rosnących kurcząt rzeźnych pozwala na uzyskanie wysokich parametrów produkcyjnych oraz dobrej jakości mięsa drobiowego. Taka produkcja żywca drobiowego pozwoli na uzyskanie lepszej efektywności produkcji w porównaniu do kurcząt RIR, a tym samym poprawi dochodowość ekologicznej fermy żywca drobiowego. Ponadto, ptaki te dobrze wykorzystują zielone wybiegi i charakteryzują się stosunkowo dobrą zdrowotnością.

Produkcja certyfikowanego żywca drobiowego, również w sezonie zimowym, powinna być prowadzona w oparciu o kurczęta mieszańców wolno rosnących, np. hubbard JA 957.

Pomimo tego, że zastosowane stresy zimna nie wpłynęły negatywnie na produktywność kurcząt, uzyskane wyniki badań wskazują, że optymalny wiek dostępu do wybiegów w okresie zimowym to ostatni okres odchowu. Kurczęta rzeźne rasy lokalnie zaadaptowanej lub wolno rosnących mieszańców charakteryzują się w tym wieku największą tolerancją na stres zimna oraz lepszym poziomem dobrostanu.

Zadanie 01-12-10-11

Ocena przydatności kogutków pochodzących ze stad objętych programem ochrony do produkcji mini kurczaków.

kierownik zadania: dr hab. Jolanta Calik

Celem badań była ocena przydatności kogutków pochodzących ze stad objętych programem ochrony do produkcji mini kurcząt. Materiał doświadczalny stanowiły kogutki ze stad zachowawczych, tj. zielononóżka kuropatwiana (Z-11), żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), rhode island red (R-11), sussex (S-66) i rhode island white (A-33), leghorn (H-22) – w ilości po 50 sztuk w każdej rasie (Fot. 1.- 6.).

Kogutki Z-11. (Fot. 1. J. Calik)



Kogutki Ż-33. (Fot. 2. J. Calik)



Kogutki R-11. (Fot. 3. J. Calik)



Kogutki S-66. (Fot. 4. J. Calik)



Kogutki A-33. (Fot. 5. J. Calik)



Kogutki H-22. (Fot. 6. J. Calik)



Doświadczenie przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB w Chorzelowie Sp. z o.o. Ptaki utrzymywano w systemie ściółkowym z zachowaniem dobrostanu, w optymalnych warunkach środowiskowych. W żywieniu *ad libitum* zastosowano mieszankę zbożową opartą na krajowych źródłach białka, opracowaną w Instytucie Zootechniki PIB.

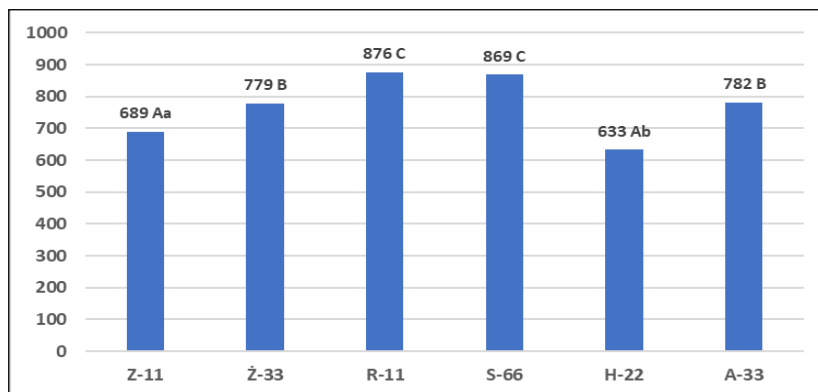
Po zakończeniu tuczu, tj. w 9. tygodniu życia kogutków, z każdej rasy wybrano do uboju po 10 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Kogutki przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Czynność uśmiercania została przeprowadzona przez osobę przeszkoloną metodą dekapitacji. Następnie została przeprowadzona standardowa obróbka poubojowa (oparzanie, skubanie, patroszenie). Schłodzone tuszki poddano analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989) po uprzednim określeniu ich barwy, przy użyciu spektrofotometru odbiciowego Minolta CR 310. Za pomocą pH-metru CyberScan 10 określono kwasowość mięśni w 15. minucie oraz w 24. godzinie po uboju. Kruchość mięśni określono przy użyciu analizatora tekstury Stable Micro Systems wyposażonego w nóż tnący Warner-Bratzler. Uzyskane wyniki zweryfikowano statystycznie, przy użyciu analizy wariancji (ANOVA). Obliczenia wykonano pakietem statystycznym Statistica 13.1.

Na rycinach 1.-3. przedstawiono wyniki masy ciała i analizy rzeźnej ocenianych ras kogutków. W 9. tygodniu życia ptaków średnia masa ciała była największa w grupie kogutków rasy rhode island red (R-11) i sussex (S-66) i wynosiła odpowiednio 876 g i 869 g, przy $P \leq 0.01$. Największą wydajność rzeźną z podrobami odnotowano u kogutków R-11 – w odróżnieniu od kogutków zielononóżka kuropatwiana (Z-11) i żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33) – co również zostało potwierdzone statystycznie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$). Kogutki R-11 i S-66 na tle ocenianych ras wyróżniały się także istotnie większą zawartością mięśni piersiowych (15,34%-15,64%) oraz nóg (20,15%-20,45%). Kogutki Z-11 różniły się istotnie ($P \leq 0.05$ i $P \leq 0.01$) od R-11 i S-66 pod względem zawartości tłuszczu sadelkowego, stanowiącego odpowiednio 0,64% i 1,01%-1,06% masy tuszki (Rycina 4.).

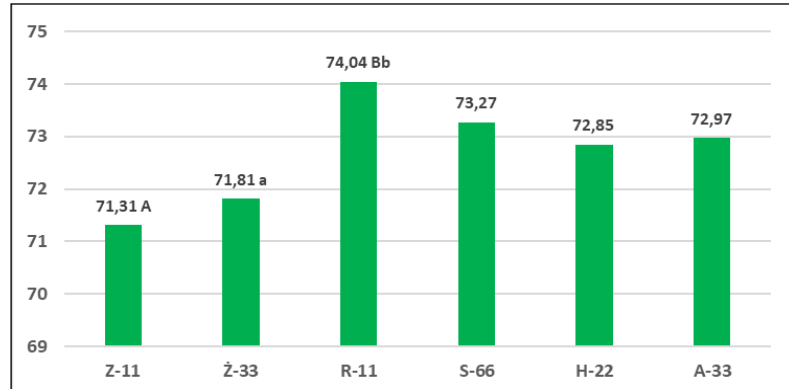
Oceniane grupy ptaków różniły się także istotnie ($P \leq 0,05$ lub $P \leq 0,01$) w zakresie barwy tuszek. Tuszki kogutów R-11, S-66, H-22 i A-33 wyróżniały się jaśniejszą (L^*) i bardziej żółtą (b^*) barwą przy mniejszym jej wysyceniu w kierunku czerwonej (a^*). Nie odnotowano wpływu rasy na pomiary kwasowości mięśni piersiowych, jak i nóg. Najlepsze parametry kruchości mięśni odnotowano u kogutków R-11, przy czym tylko w przypadku mięśni piersiowych zostało to potwierdzone statystycznie.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, najlepsze parametry mięsności u kogutków rasy rhode island red (R-11) i sussex (S-66). Z kolei, kogutki Z-11 wyróżniały się najmniej odtuszczeniem tuszki. Pomiedzy ocenianymi grupami ptaków odnotowano zróżnicowanie w zakresie wybarwienia tuszek. Nie odnotowano różnic pomiędzy ocenianymi grupami ptaków pod względem kwasowości mięśni.

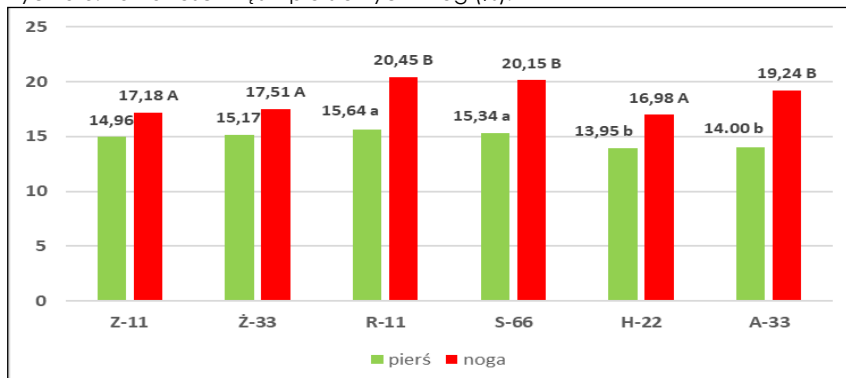
Rycina 1. Kształtowanie masy ciała (g).



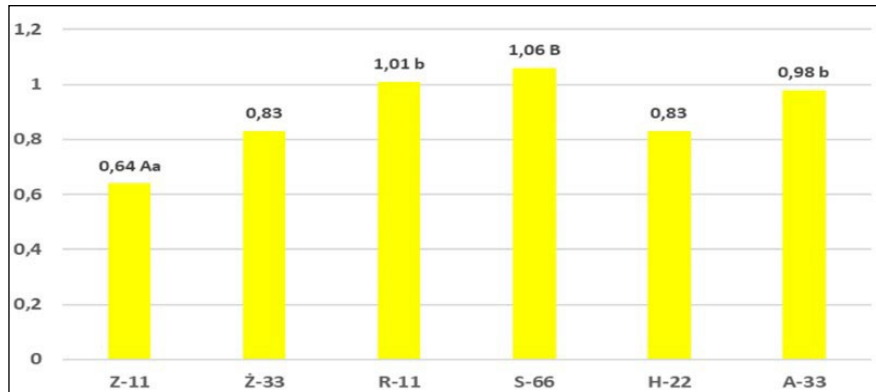
Rycina 2. Wydajność rzeźna z podrobami (%).



Rycina 3. Zawartość mięśni piersiowych i nóg (%).



Rycina 4. Zawartość tłuszczu sadelkowego (%).



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

Zadanie 01-12-11-11

Zastosowanie wybranych preparatów fitobiotycznych i ich wpływ na wskaźniki wylęgowości i fizykochemiczne parametry jaj kaczek typu pekin.

kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

Celem badań przeprowadzonych w 2024 roku było określenie wpływu wybranych preparatów fitobiotycznych podanych *in ovo*, w określonych terminach okresu embriogenezy kaczek, na kształtowanie wskaźników wylęgowości, przeżywalności i zdrowotności piskląt.

Materiałem badawczym w realizowanym zadaniu w były jaja wylęgowe kaczek typu pekin pochodzące z czterech ras objętych programem ochrony zasobów genetycznych zwierząt, tj. P-8, P-9, P-33 i LsA. Ptaki te utrzymywane są w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego IZ PIB ZD Kołuda Wielka.

Kaczki P-8. (Fot. 1. L. Lewko)



Kaczki P-9. (Fot. 2. L. Lewko)



Kaczki P-33. (Fot. 3. L. Lewko)



Kaczki LsA. (Fot. 4. L. Lewko)



Kaczki, od których pobierano jaja do iniekcji, utrzymywano w jednakowych warunkach środowiskowo-żywniowych. Z każdej grupy doświadczalnej kaczek (P-8, P-9, P-33 i LsA), będących w jednakowym wieku pobrano po 30 sztuk jaj do doświadczalnej inkubacji, po uprzednim zważeniu. Utworzono łącznie 24 grupy doświadczalne – po 6 grup doświadczalnych dla każdego rodzaju kaczek. Ogółem doświadczalnej inkubacji poddano 720 jaj kaczek (dwa powtórzenia). W okresie od maja do czerwca 2024 roku przeprowadzono iniekcję:

Kaczki P-8

Grupa 1 – kontrolna niepoddana iniekcji (0/P8)* (30 jaj/13. doba),

Grupa 2 – kontrolna pozorowana – iniekcja solą fizjologiczną (S/P8) (30 jaj/13. doba).

Kaczki P-9

Grupa 1 – kontrolna niepoddana iniekcji (0/P9)* (30 jaj/13. doba),

Grupa 2 – kontrolna pozorowana – iniekcja solą fizjologiczną (S/P9) (30 jaj/13. doba).

Kaczki P-33

Grupa 1 – kontrolna niepoddana iniekcji (0/P33)* (30 jaj/13. doba),

Grupa 2 – kontrolna pozorowana – iniekcja solą fizjologiczną (S/P33) (30 jaj/13. doba).

Kaczki LsA

Grupa 1 – kontrolna niepoddana iniekcji (0/LsA)* (30 jaj/13. doba),

Grupa 2 – kontrolna pozorowana – iniekcja solą fizjologiczną (S/LsA) (30 jaj/13. doba).

Ekstraktem czosnku w następujących grupach:

Kaczki P-8

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 13. dniu inkubacji (13Cz/P8) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 20. dniu inkubacji (20Cz/P8) (30 jaj/13. doba).

Kaczki P-9

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 13. dniu inkubacji (13Cz/P9) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 20. dniu inkubacji (20Cz/P9) (30 jaj/13. doba).

Kaczki P-33

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 13. dniu inkubacji (13Cz/P33) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 20. dniu inkubacji (20Cz/P33) (30 jaj/13. doba).

Kaczki LsA

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 13. dniu inkubacji (13Cz/LsA) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 150 µl /jajo w 20. dniu inkubacji (20Cz/LsA) (30 jaj/13. doba).

Ekstraktem propolisu w następujących grupach:

Kaczki P-8

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 13. dniu inkubacji (13P/P8) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 20 dniu inkubacji (20P/P8) (30 jaj/13. doba).

Kaczki P-9

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 13. dniu inkubacji (13P/P9) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 20. dniu inkubacji (20P/P9) (30 jaj/13 doba).

Kaczki P-33

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 13. dniu inkubacji (13P/P33) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 20. dniu inkubacji (20P/P33) (30 jaj/13. doba).

Kaczki LsA

Grupa 3 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 13. dniu inkubacji (13P/LsA) (30 jaj/13. doba),

Grupa 4 – iniekcja ekstraktem czosnku w dawce 200 μ l /jajo w 20. dniu inkubacji (20P/LsA) (30 jaj/13 doba).

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

Wszystkie doświadczenia i badania zrealizowano w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, Instytut Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Kołuda Wielka, ze względu na to, iż na fermie utrzymywane są stada kaczek pochodzące z czterech ras objętych programem ochrony zasobów genetycznych zwierząt (P-8, P-9, P-33 i LsA), od których pobrano jaja przewidziane do eksperymentów. W zakładzie wylęgowym, przeprowadzono, zgodnie z przyjętymi w nim standardowymi procedurami, inkubacje doświadczalnych jaj oraz iniekcje.

Obliczono wskaźniki wylęgowości:

- masa jaj nałożonych (g)
- udział piskląt wylężonych (%)
- udział piskląt zdrowych (%)
- udział piskląt kalekich (%)
- udział piskląt niewyklutych (%)
- masa piskląt wykłutych (g)

W grupie eksperymentalnej kaczek P-8 istotnie ($p \leq 0,05$) najcięższymi jajami wyróżniła się grupa kontrolna pozorowana, w której przeprowadzono iniekcję solą fizjologiczną dawką 150 μ l/jajo w 13. dniu inkubacji (S/P8 – 90,29 g) oraz grupa kontrolna niepoddana iniekcji (0/P8 – 90,05 g).

W przypadku grupy doświadczalnej kaczek P-9, najmniejsze masy jaj odnotowano w grupach badawczych kaczek iniekowanych w 20. dobie rozwoju embrionalnego ekstraktem czosnku (20Cz/P9 – 78,27 g) i ekstraktem propolisu (20P/P9 – 79,58 g). Masy nałożonych jaj w grupie doświadczalnej kaczek P-33 nie przekraczały 90 gramów i kształtowały się w przedziale od 83,64 g (20P/33 – iniekcja ekstraktem propolisu w dawce 200 µl w 20. dniu inkubacji) do 88,54 g (S/P33 – iniekcja solą fizjologiczną w dawce 150 µl/jajo w 13. dniu inkubacji). W przypadku masy jaj pozyskanych z grupy doświadczalnej kaczek LsA odnotowano, iż najcięższe jaja pochodziły z grupy kontrolnej nie poddanej iniekcji – 90,32 g (0/LsA). W grupie doświadczalnej kaczek P-8 najkorzystniejszymi wskaźnikami wylęgowości wyróżniła się grupa kontrolna pozorowana iniekowana solą fizjologiczną w dawce 150 µl/jajo w 13. dniu inkubacji. Udział piskląt wylęzonych i zdrowych ukształtował się na poziomie 100,0%. Ponadto, nie odnotowano udziału piskląt kalekich oraz niewyklutych. W przypadku grupy doświadczalnej kaczek P-9 w grupie kontrolnej (0/P9), kontrolnej pozorowanej (S/P9) i grupie doświadczalnej iniekowanej ekstraktem propolisu w dawce 200 µl/jajo w 13. dniu inkubacji (13P/P9), udział piskląt wylęzonych oraz zdrowych ukształtował się na poziomie 100%.

W grupach tych nie odnotowano piskląt kalekich i niewyklutych. Udział piskląt wylęzonych w grupach doświadczalnych kaczek P-33 zawierał się w przedziale od 86,67 (0/P33, 20Cz/P33, 13P/P33, 20P/P33) do 100% (S/P33). Istotnie ($p \leq 0,05$) największym udziałem piskląt zdrowych wyróżniła się grupa doświadczalna kontrolna pozorowana (S/P33 – 100%). W żadnej z doświadczalnych grup nie odnotowano udziału piskląt kalekich, a udział piskląt niewyklutych mieścił się w granicach od 0,0% (S/P33) do 13,33% (0/P33, 20Cz/P33, 13P/P33, 20P/P33). W grupie doświadczalnej kaczek LsA iniekowanej ekstraktem propolisu w 20. dniu inkubacji dawką 200 µl/jajo odnotowano 100% udziału piskląt wylęzonych i zdrowych.

W grupie doświadczalnej kaczek P-8 masa wykłutych piskląt mieściła się w przedziale od 55,13 g (13P/P8) do 57,57 g (20P/P8). Z kolei w grupie kaczek P-9 najcięższe pisklęta pochodziły z grupy iniekowanej ekstraktem czosnku w 13. dniu inkubacji – 55,57 g (13Cz/P9). W pozostałych dwóch grupach doświadczalnych ptaków pisklęta o największej masie pochodziły z grup doświadczalnych iniekowanych ekstraktem propolisu w 20. dniu inkubacji – 56,86 g (20P/P33) i 56,17 g (20P/LsA). Wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Zadanie 04-12-05-11

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

kierownik zadania: dr inż. Lidia Lewko

Celem podjętych badań było określenie wpływu iniekcji *in ovo* wybranych substancji synbiotycznych, antybakteryjnych (lizozym) a także witaminy K, w określonych terminach okresu embriogenezy dwóch doświadczalnych gatunków drobiu wodnego, na kształtowanie wskaźników wylęgowości i przeżywalności piskląt.

Materiał badawczy stanowiły jaja pochodzące ze stada hodowlanego kaczek, tj. kaczki dworki D-11, popularnej rasy rodzimej cieszącej się dużą popularnością w przyzagrodowym odchowie oraz z komercyjnego zestawu hodowlanego gęsi białej kołudzkiej® W-33 x W-11 (W-31). Ptaki te utrzymywane są w Dworzyskach w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego IZ PIB ZD Kołuda Wielka.

Ptaki, od których pobierano jaja do iniekcji utrzymywane były w warunkach technologicznych zgodnych z ogólnymi założeniami dla tego typu produkcji. Z każdej grupy genetycznej ptaków, utrzymywanych w jednakowych warunkach środowiskowo-żywnościowych i będących w jednakowym wieku pobrano jaja do doświadczalnej inkubacji oraz iniekcji.

Utworzono ogółem 18 grup doświadczalnych (9 grup doświadczalnych – obejmujących jaja wylęgowe kaczek D-11 i 9 grup doświadczalnych – obejmujących jaja wylęgowe gęsi W-31). Łącznie doświadczalnej inkubacji poddano 540 jaj kaczek i 540 jaj gęsich (1080 jaj).

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



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



Czynniki doświadczalne w okresie od maja do czerwca w latach 2021–2023

Witamina K (Vitacon/Phytomenadionum, 10 mg/ml, Polfa, Warszawa)

1. grupa kontrolna niepoddana iniekcji (K1)* (30 jaj/13. doba),
2. grupa doświadczalna 1 (D1-K1) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
3. grupa doświadczalna 2 (D2-K2) – iniekcja witaminy K w dawce 10 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

Preparat lizozymu o aktywności ≥ 40.000 U/ml (1 g, Sigma-Aldrich)

1. grupa kontrolna niepoddana iniekcji (K2)* (30 jaj/20. doba),
2. grupa doświadczalna 1 (D1-L1) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml/jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
3. grupa doświadczalna 2 (D2-L2) – iniekcja preparatem lizozymu w dawce 0,1 ml/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

Preparat synbiotyczny PoultryStar®sol (BIOMIN, Austria)

1. grupa kontrolna niepoddana iniekcji (D11-K1)* (30 jaj/13. doba),
2. grupa doświadczalna 1 (D11-S1) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 13. dniu inkubacji (30 jaj),
3. grupa doświadczalna 2 (D11-S2) – iniekcja preparatem synbiotycznym w dawce 5 mg/jajo w 20. dniu inkubacji (30 jaj).

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

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

Tabela A. Układ grup doświadczalnych – rodzaj i dawka wprowadzanego preparatu oraz dzień inkubacji w momencie iniekcji *in ovo* do jaj kaczek.

Grupa	Liczba jaj	Dzień inkubacji w momencie iniekcji	Rodzaj i dawka iniekowanego preparatu
Witamina K (<i>Phytomenadionum</i>)			
K1*	60	13 dzień	bez iniekcji
D1-K1	60	13 dzień	witamina K 10 mg/jajo
D2-K2	60	20 dzień	witamina K 10 mg/jajo
Lizozym (aktywność ≥ 40.000 U/ml)			
K2*	60	13 dzień	bez iniekcji
D1-L1	60	13 dzień	lizozym 0,1 ml/jajo
D2-L2	60	20 dzień	lizozym 0,1 ml/jajo
Synbiotyk (PoultryStar®sol)			
D11-K1*	60	13 dzień	bez iniekcji
D11-S1	60	13 dzień	5 mg/jajo
D11-S2	60	20 dzień	5 mg/jajo

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

Tabela B. Układ grup doświadczalnych – rodzaj i dawka wprowadzanego preparatu oraz dzień inkubacji w momencie iniekcji *in ovo* do jaj gęsi.

Grupa	Liczba jaj	Dzień inkubacji w momencie iniekcji	Rodzaj i dawka iniekowanego preparatu
Witamina K (<i>Phytomenadionum</i>)			
W31-K1*	60	13 dzień	bez iniekcji
W31-K1	60	13 dzień	witamina K 10 mg/jajo
W31-K2	60	20 dzień	witamina K 10 mg/jajo
Lizozym (aktywność ≥ 40.000 U/ml)			
W31-K2*	60	13 dzień	bez iniekcji
W31-L1	60	13 dzień	lizozym 0,1 ml/jajo
W31-L2	60	20 dzień	lizozym 0,1 ml/jajo
Synbiotyk (PoultryStar®sol)			
W31-K3*	60	13 dzień	bez iniekcji
W31-S1	60	13 dzień	5 mg/jajo
W31-S2	60	20 dzień	5 mg/jajo

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

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

Wszystkie uzyskane wyniki składające się na ocenę wskaźników wylęgowości z uwzględnieniem rodzaju zastosowanego preparatu bioaktywnego oraz jego dawki i okresu inkubacji w czasie iniekcji opracowano statystycznie za pomocą programu *Statistica 10* (StatSoft, 2006).

Obliczono średnie arytmetyczne ($\bar{x}$), odchylenie standardowe (SD) i współczynnik zmienności (v). W celu określenia istotności różnic między średnimi dla grup zastosowano test Duncana. Różnice uznano za statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$. Zastosowano ponadto dwuczynnikową analizę wariancji z uwzględnieniem w modelu liniowym efektu inkubacji. Istotność wpływu każdego źródła zmienności oceniono testem F-Snedecora.

Świetlenie, nawiercanie i iniekowanie doświadczalnych jaj. (Fot. L. Lewko)



Spodziewanym efektem iniekcji *in ovo* było polepszenie wyników wylęgu (zmniejszenie ilości zamartych zarodków i piskląt kalekich) oraz wskaźników użytkowości. Iniekcje wybranymi preparatami bioaktywnymi podanymi *in ovo* wpłynęły korzystnie na kształtowanie się poszczególnych wskaźników wylęgowości danych grup doświadczalnych kaczek i gęsi. Podanie *in ovo* preparatu synbiotycznego (5 mg/jajo) w 13. dobie rozwoju embrionalnego oraz witaminy K (10 mg/jajo) i preparatu lizozymu (0,1 mg/jajo) w 20. dobie wpłynęło korzystnie na oceniane wskaźniki wylęgu ptaków. Uzyskane wyniki pozwoliły wstępnie oszacować wpływ poszczególnych iniekowanych preparatów bioaktywnych, ocenić dawkę jak i dzień inkubacji dla przeprowadzenia efektywnego podania poszczególnych substancji bioaktywnych *in ovo* u kaczek i gęsi. Wyniki te są wstępne i wymagają dalszej weryfikacji.

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

Współczesny rynek drobiowy charakteryzuje się nadprodukcją pochodzącą z intensywnej hodowli, co zmusza konsumentów do zwracania uwagi na jakość mięsa, która zależy od bezpieczeństwa, wartości odżywczej i cech sensorycznych, takich jak: barwa, smakowitość, tekstura i soczystość. Pulardy, mimo że są przysmakiem we Francji czy Włoszech nie są powszechnie dostępne w Polsce. Produkcja pulard polega na tuczeniu młodych kurek, które poddawane są sterylizacji w celu uzyskania kruchego i soczystego mięsa.

Celem przeprowadzonych badań była ocena kształtowanie się wybranych cech fizykochemicznych mięsa kur i pulard, w zależności od pochodzenia i żywienia. Badania przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB Chorzeliów Sp. z o.o. Przedmiotem badań były cztery rasy/rody kury objęte programem ochrony zasobów genetycznych.

Przeprowadzono dwa doświadczenia.

Tabela 1. Układ doświadczenia 1.

Grupa		Ilość sztuk	Żywienie
I	K-22 kury bez sterylizacji	40	mieszanka kontrolna
II	K-22 kury bez sterylizacji	40	mieszanka doświadczalna
III	K-22 pulardy	40	mieszanka kontrolna
IV	K-22 pulardy	40	mieszanka doświadczalna

Tabela 2. Układ doświadczenia 2.

	Grupa	Ilość sztuk	Żywnienie
I	Ż-33 pulardy	40	mieszanka doświadczalna
II	S-66 pulardy	40	mieszanka doświadczalna
III	R-11 pulardy	40	mieszanka doświadczalna
IV	A-33 pulardy	40	mieszanka doświadczalna

Procedury doświadczeń były zgodne z wymaganiami I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, w Krakowie. Ptaki utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, przy wielkości obsady wynoszącej 7 sztuk/m². Program obejmował szczepienia przeciwko chorobie: Mareka, rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro oraz kokcydiozie.

Na potrzeby doświadczeń opracowano w Instytucie Zootechniki PIB receptury mieszanek paszowych: kontrolną (z poekstrakcyjną śrutą sojową) oraz doświadczalną (opartą na krajowych źródłach białka, bez soi). We wszystkich doświadczeniach ptaki żywiono *ad libitum*, stosując trójfazowy system żywienia. 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 10 ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Po uboju sprawdzono skuteczność przeprowadzonego zabiegu sterylizacji (brak jajnika), zbadano cechy fizykochemiczne mięsa, m.in. barwę, wodochłonność, skład chemiczny oraz przeprowadzono ocenę sensoryczną. Ponadto, dokonano uproszczonej analizy ekonomicznej efektywności produkcji pulard. Uzyskane wyniki badań poddane zostały obliczeniom statystycznym (Statistica 13.3), przy użyciu analizy wariancji (ANOVA).

Doświadczenie 1.

Pulardy osiągnęły wyższą masę ciała w 24. tygodniu życia w porównaniu z kurkami. Zużycie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała było korzystniejsze u pulard niż u kurek. Ponadto pulardy charakteryzowały się wyższym udziałem mięśni piersiowych oraz nóg w tuszce w porównaniu z kurkami. Miały również większą zawartość tłuszczu sadelkowego oraz podrobów, zwłaszcza wątroby. Mięso sterylizowanych ptaków karmionych mieszanką doświadczalną wyróżniało się lepszymi parametrami sensorycznymi, w tym lepszą kruchością, soczystością i smakiem, a także korzystniejszym profilem kwasów tłuszczowych (PUFA_{n-6} do n-3). Barwa tuszek pulard była jaśniejsza i bardziej żółta w porównaniu z tuskami kurek. Wyniki wskazują, że sterylizacja oraz zastosowanie mieszanki doświadczalnej znacząco poprawiły jakość mięsa.

Doświadczenie 2.

Najniższe zużycie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała zaobserwowano u pulard rasy sussex, a najwyższe u żółtonóżki kuropatwianej. Masa ciała w 24. tygodniu życia była najwyższa u pulard rasy S-66, a najniższa u rasy Ż-33. Pulardy rasy S-66 uzyskały najwyższą wydajność rzeźną z podrobami i bez podrobów, natomiast ptaki rasy R-11 wyróżniały się większym udziałem mięśni piersiowych i nóg w tuszce. Pulardy A-33 charakteryzowały się najwyższą zawartością tłuszczu sadelkowego oraz najkorzystniejszym stosunkiem kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 w mięśniach. Ocena sensoryczna wykazała, że mięso pulard S-66 i A-33 zostało najwyżej ocenione pod względem smaku, soczystości i kruchości.

Pularda rasy sussex (S-66).
(Fot. 1. J. Obrzut)



Pularda rasy rhode island white (A-33)
(Fot. 2. J. Obrzut)



Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pulardy, szczególnie żywione mieszanką doświadczalną, charakteryzują się lepszymi parametrami produkcyjnymi, rzeźnymi i sensorycznymi niż kury. Rasy sussex (S-66) i rhode island white (A-33) wyróżniły się szczególnie dobrą jakością mięsa, które spełniało wysokie wymagania konsumentów, pod względem wartości odżywczych i walorów sensorycznych.

Wyniki wskazują, że produkcja pulard, przy odpowiednim żywieniu i doborze rasy, może dostarczyć mięso o wysokiej jakości i uzupełniać produkcję mięsa drobiowego o produkt niszowy.

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

Zadanie 01-13-04-11

Wykorzystanie dodatków ziołowych w poprawie zdrowotności i wyników produkcyjnych małych przeżuwaczy.

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

Celem zadania jest ocena efektywności odchowu jagniąt – w warunkach produkcyjnych określony zostanie wpływ długości odchowu i dodatku ziołowego do paszy na cechy tuczne, rzeźne i jakość mięsa jagnięcego.

Materiał doświadczalny stanowiły jagnięta rasy merynos barwny ze stada IZ PIB ZD Kołuda Wielka. Część doświadczalna przeprowadzona została na fermie IZ PIB ZD Kołuda Wielka, a ubój zwierząt, ocenę rzeźną w ZD IZ PIB Pawłowice.

Jagnięta utrzymywano grupowo przy matkach, w systemie alkierzowym, żywiono sianem tåkowym i paszã treściwą, ze stałym dostępem do lizawek.

Zwierzęta podzielono na grupy (12 sztuk w grupie) zgodnie ze schematem:

- grupa I: grupa kontrolna/pasza bez dodatku/odchów tradycyjny
- grupa II: pasza bez dodatku/odchów skrócony
- grupa III: pasza z dodatkiem/odchów tradycyjny
- grupa IV: pasza z dodatkiem/odchów skrócony

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

Składniki mieszanki ziołowej dla jagniąt:

- koper włoski
- jeżówka purpurowa (*Echinacea*)
- czosnek
- tymianek

Pomiary przyżyciowe

Masa ciała i przyrosty

W trakcie doświadczenia wszystkie jagnięta poddane zostaną okresowym ważeniom, przy urodzeniu, w 28., 56. dniu życia, około 100. dnia życia i na zakończenie doświadczenia.

Kontrola pobrania paszy

Codziennie zbierane były dane dotyczące ilości podawanych pasz oraz niedojadów.

Jagnięta rasy merynos barwny ze stada IZ PIB ZD Kołuda Wielka.
(Fot. I. A. Kawęcka)



Pomiary poubojowe

Po ukończeniu doświadczenia jagnięta zostaną poddane ubojowi doświadczalnemu w celu oceny rzeźnej tuszy oraz oceny uzyskanego produktu.

Analiza rzeźna

Wykonana została według procedur stosowanych w IZ PIB – oszacowanie wydajności rzeźnej, określenie udziału wyrębów, masa wyrębów wartościowych, dysekcja szczegółowa udźca.

Ocena jakości mięsa

Pobrane próbki mięśnia udźca poddano analizom składu mięsa (skład podstawowy, profil WKT); ocena organoleptyczna mięsa pieczonego.

Tabela 1. Wyniki tuczu jagniąt.

Parametry	Średnie w grupach			
	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
wiek zakończenia tuczu (dni)	95,0	101,0	104,0	112,0
czas trwania tuczu (dni)	49,0	34,0	43,0	31,0
masa przy rozpoczęciu tuczu (kg)	25,0	31,4	26,2	33,8
masa na zakończenie tuczu (kg)	45,9	47,4	45,0	45,3
przyrost w okresie tuczu (kg)	20,9	15,9	18,7	11,5
przyrost dobowy w okresie tuczu (g)	428,4	465,7	436,8	370,9
zużycie paszy/1 kg przyrostu (kg)	3,42	4,41	3,95	4,43

Najlepsze wyniki wykazała grupa I (karmiona paszą bez dodatku w odchowie tradycyjnym), uzyskując przyrost w okresie tuczu na poziomie 20,9kg, oraz najniższe zużycie paszy na poziomie 3,42 kg. Najmniej efektywna pod względem przyrostów masy ciała i wykorzystania paszy była dieta grupy IV (pasza z dodatkiem w odchowie skróconym).

Tabela 2. Parametry rzeźne.

Parametry	Średnie w grupach			
	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
szyja (kg)	1,08	1,07	0,96	1,06
karkówka (kg)	0,38	0,39	0,38	0,35
łopatka (kg)	1,84	1,88	1,83	1,85
łata z żebrami i mostkiem (kg)	1,8	1,76	1,71	1,59
antrykot (kg)	0,8	0,83	0,76	0,81
comber (kg)	0,74	0,77	0,72	0,74
udziec (kg)	3,53	3,66	3,45	3,51
udziec - mięso (kg)	2,36	2,51	2,33	2,37
kulka - tłuszcz (kg)	0,46	0,41	0,38	0,4
kulka - kości (kg)	0,71	0,74	0,73	0,73
masa wyrębów wartościowych (kg)	5,08	5,28	4,95	5,06
udział wyrębów wartościowych (%)	49,47	50,1	49,59	49,57

Parametry rzeźne były zbliżone we wszystkich grupach, z udziałem wyrębów wartościowych w granicach 49,4% – 50,1%. Masa kluczowych wyrębów, takich jak karkówka, łopatka, comber, czy kulka, wykazuje niewielkie różnice między grupami co wskazuje na podobną jakość i strukturę półtuszy w badanych grupach.

Maciorki merynos barwny ze stada IZ PIB ZD Kołuda Wielka.
(Fot. 2. A. Kawęcka)



Zadanie 01-13-05-11

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

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

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

Ocena jakości mleka kóz, owiec i krów ras rodzimych w porównaniu do ras kosmopolitycznych

W ramach zadania dokonano porównania właściwości mleka pochodzącego do polskich ras rodzimych do ras użytkowanych mlecznie w wielu rejonach świata (krowy rasy simentalskiej, owce wschodniofryzjskie) oraz kóz mieszańców, stanowiących większość pogłowia kóz w Polsce. Skład podstawowy i wartość energetyczną mleka krowiego, koziego i owczego pozyskanego od różnych ras przedstawiono w tabeli 1. Mleko owiec górskich miało wyższą zawartość suchej masy, popiołu, tłuszczu i białka niż mleko kozie oraz pochodzące od krów czerwono-białych. Było również najbardziej kaloryczne. Mleko krów simental miało zbliżony skład do mleka owczego. Badane próbki mleka cechowały się kwasowością mieszczącą się w powyższym zakresie, co dobrze świadczy o świeżości i normalności składu surowca. Podstawowym kryterium przydatności technologicznej mleka do produkcji koncentratów i produktów sterylizowanych jest ocena stabilności układu koloidalnego mleka, którą można oznaczyć jako tzw. stabilność alkoholową. Mleko o wysokiej stabilności powinno charakteryzować się liczbą alkoholową powyżej 6. Uzyskane wyniki świadczą zatem o niskiej stabilności układu koloidalnego badanego mleka. Metoda koagulacji podpuszczkowej mleka jest powszechnie stosowana podczas produkcji serów. W związku z tym jednym z głównych kryteriów przydatności technologicznej mleka do produkcji serów jest ocena krzepliwości mleka pod wpływem podpuszczki. Wszystkie oceniane próbki mleka charakteryzowały się typowym dla mleka czasem koagulacji podpuszczkowej, który w założonych warunkach analizy w próbie Scherna powinien wynosić od 240 do 600 sekund. Wszystkie próby mleka charakteryzowały odpowiednim czasem krzepnięcia, natomiast stwierdzono różnice między gatunkami: najszybciej krzepło mleko kozie, następnie owcze; koagulacja najdłużej przebiegała w mleku krowim.

Tabela 1. Skład, wartość energetyczna oraz właściwości technologiczne mleka różnych ras.

Parametr	Krowa simental	Krowa czerwono-biała	Owca fryzyjska	Owca górska	Koza mieszaniec	Koza karpacka
Sucha masa	17,30	12,03	17,67	19,57	11,96	12,16
Białko	3,14	3,16	5,37	5,98	3,01	3,23
Tłuszcz	8,73	3,58	6,79	7,80	4,09	4,04
Popiół	0,62	0,58	1,14	1,37	0,63	0,56
Laktoza	4,81	4,71	4,37	4,42	4,23	4,33
Kcal/100g	110,41	63,70	100,04	111,78	65,76	66,60
kJ/100g	458,34	266,23	416,66	465,31	274,35	278,00
Gest (g/cm ³)	1026,33	1031,00	1033,00	1034,31	1028,00	1028,00
pH	6,65	6,73	6,57	6,62	6,58	6,72
Kwasowość (SH)	8,22	7,64	10,84	11,24	7,20	6,63
Czas krzepnięcia (min.)	3,40	3,30	2,61	2,82	1,45	1,57
l. Alkohol (ml)	1,15	1,68	2,88	2,10	3,07	3,13

Owca wchodnifryzyjska (<https://serowarnia-gertruda.pl/>) i rodzima rasa polska owca górska.
(Fot. 1. M. Pasternak)



Krowa rasy simentalskiej i rodzima rasa polska czerwono-biała.
(Fot. 2. A. Kawęcka)



Kozy mieszańce i rodzima rasa koza karpacka.
(Fot. 3. M. Pasternak)



Ocena jakości produktów od rodzimych ras trzech gatunków

W roku sprawozdawczym wykonano ocenę jakości produktów pochodzących od rodzimych ras: kóz rasy karpackiej, owiec górskich oraz krów rasy czerwono-białej, utrzymywanych w tradycyjnych systemach, w gospodarstwie zlokalizowanym w rejonie górskim, ze stałym dostępem do pastwiska od maja do września.

Tabela 2. Skład podstawowy i wartość energetyczna jogurtów.

Parametr	Krowa	Owca	Koza
Sucha masa (g/100g)	13,08	19,01	12,12
Tłuszcz (g/100g)	4,30	7,30	4,25
Popiół (g/100g)	1,03	2,82	1,25
Białko (g/100g)	3,17	5,80	3,03
Laktoza (g/100g)	4,57	3,09	3,59
kcal/100g	69,68	101,28	64,74
kJ/100g	290,75	421,29	269,81

Analiza frakcji białkowych jogurtów

Przydatność technologiczna mleka uzależniona jest od ogólnej zawartości białka oraz od zawartości poszczególnych jego frakcji. Z punktu widzenia produkcji serów znaczenie ma przede wszystkim wysoka zawartość frakcji kazeinowych, gdyż decyduje w głównym stopniu o wydajności produkcji. Wzajemnie proporcje między kazeiną i białkami serwatkowymi wpływają także na stabilność termiczną białek mleka. W przypadku nadmiaru, podatnych na koagulację pod wpływem wysokiej temperatury białek serwatkowych zmniejsza się stabilność termiczna mleka. W procesie produkcji jogurtów procesowi fermentacji podlega laktoza jak również dochodzi do różnego rodzaju proteolizy. Między innymi z części b-kazeiny powstaje gamma kazeina. Zmiany proteolityczne mają wpływ na właściwości przeciwutleniające. Zawartość poszczególnych frakcji białkowych różniła się w mleku jogurtach krowich i owczych.

Tabela 3. Frakcje białkowe białka jogurtu z mleka rodzimych ras.

Parametr	Krowa	Owca	Koza
Laktoferyna	0,16	0,17	0,48
Albumina serum	1,64	1,17	0,99
Immunoglobuliny	0,33	0,46	0,95
α -kazeina	35,59	14,58	14,53

β -kazeina	34,07	53,89	43,89
κ -kazeina	7,74	11,34	9,76
β -laktoglobulina	13,59	12,45	12,13
α -laktoalbumina	6,09	3,72	7,30
Frakcja peptydowa	0,80	0,72	2,72

Analiza sensoryczna

Jakość sensoryczna jest parametrem w głównej mierze decydującym o akceptacji konsumpcyjnej żywności. Wszystkie badane próbki mleka, serów i jogurtów cechowały się wysoką jakością sensoryczną, uzyskując oceny bliskie maksymalnej. Jogurty owcze, których smak, zapach i konsystencja były w normie, ale oceniający nie akceptowali zbyt dużej ilości tłuszczu. Sery kozie cechował lekko gorzki smak. Zmiany smaku mogły być związane z nieprawidłowym przebiegiem proteolizy, w wyniku której powstają gorzkie peptydy.

Produktami przemian białek mającymi największe znaczenie w kształtowaniu smakowości serów są: peptydy i aminokwasy wraz z produktami ich dekarboksylacji, deaminacji i desulfuracji. W wyniku fermentacji laktozy powstają takie związki smakowe jak: kwasy mlekowy, propionowy i octowy, a także aldehyd octowy i dwuacetyl. Bukiet smakowo-zapachowy serów i jogurtów uzależniony jest także od wolnych kwasów tłuszczowych i związków karbonylowych powstałych w wyniku przemian lipolityczno-oksydacyjnych tłuszczu.

Właściwości przeciwutleniające

Mleko i mleczne produkty fermentowane mają ogromny wpływ na zdrowie. Zawdzięczamy to obecności bakterii fermentacji mlekowej. Wykazują one silne działanie przeciwutleniające w stosunku do wolnych rodników. Jest to jeden z czynników zapobiegający nowotworom. Potencjał antyoksydacyjny wykazuje kazeina oraz laktoferyna, białka występujące w mleku i w mlecznych produktach fermentowanych; jogurt oraz kefir cechują się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu z innymi produktami fermentowanymi dostępnymi na rynku. Frakcja β -kazeiny cechuje się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, ze względu na obecność reszt prolinowych. Połączenie białek mleka, głównie kazeiny i β -laktoglobuliny oraz polifenoli może wpływać na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego mlecznych produktów fermentowanych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zarówno mleko jak i jego przetwory posiadają właściwości przeciwutleniające, przy czym potencjał utleniający jest wyższy w produktach, w których zaszły kontrolowane zmiany proteolityczne. Możliwe jest również powstanie bioaktywnych peptydów, które również podwyższają potencjał antyoksydacyjny produktów mleczarskich.

Tabela 4. Właściwości przeciwutleniające jogurtów.

Parametr	Krowa	Owca	Koza
Zawartość polifenoli ogółem – mg kw. Galusowego/100g	59,95	169,64	87,07
Właściwości przeciwutleniające met. FRAPA – mMol Fe ²⁺ /100 g	0,23	0,45	0,29

Porównanie właściwości mleka samic różnych gatunków zwierząt gospodarskich: alpaki i kłaczy oraz krowiego, koziego i owczego

W ramach zaplanowanych kosztów, wykonano dodatkowo ocenę mleka alpaki i kłaczy w celu kompleksowej charakterystyki właściwości mleka pochodzącego od samic różnych gatunków zwierząt gospodarskich.

Skład podstawowy mleka alpaki odbiega od składu chemicznego mleka krowiego. Charakteryzuje się dużą zawartością białka ogółem i bardzo dużą stabilnością. Białka mleka alpaki nie zawierają beta-laktoglobuliny. Charakteryzują się natomiast dużą ilością kazeiny. Stosunkowo wysoka zawartość polifenoli świadczy o dobrych właściwościach antyoksydacyjnych. Skład chemiczny i profil białkowy mleka kłaczy w dużym stopniu jest uzależniony od okresu laktacji. Mleko to charakteryzuje się mniejszą ilością białka ogółem w tym małą zawartością kazeiny, za to wysoką laktozą, dlatego też jest wykorzystywane do produkcji napojów fermentowanych, a nie produkcji serów. Zarówno mleko alpaki jak i kłaczy zyskało akceptację w ocenie organoleptycznej.

Alpaki.
(Fot. 4. A. Kawęcka)



Klacz rasy Shire.
(Fot. 5. M. Pasternak)



Tabela 5. Skład podstawowy mleka różnych gatunków.

Parametr	Krowa	Owca	Koza	Alpaka	Klacz
Sucha masa (g/100g)	12,03	19,57	12,16	16,33	9,48
Tłuszcz (g/100g)	3,16	5,98	3,23	5,29	1,98
Popiół (g/100g)	3,58	7,80	4,04	3,98	0,18
Białko (g/100g)	0,58	1,37	0,56	1,09	0,47
Laktoza (g/100g)	4,71	4,42	4,33	5,98	6,86
kcal/100g	63,70	111,78	66,60	80,83	36,95
kJ/100g	266,23	465,31	278,00	338,55	156,82

Tabela 6. Właściwości przeciwutleniające mleka różnych gatunków.

Parametr	Krowa	Owca	Koza	Alpaka	Klacz
Zawartość polifenoli – mg kw. Galusowego/100g	83,15	347,88	184,40	232,97	125,64
Właściwości przeciwutleniające met. FRAPA	0,14	0,64	0,41	0,47	0,22

Zadanie 01-13-06-11

Wykorzystanie wypasu małych przeżuwaczy w redukcji występowania roślin inwazyjnych z rodzaju *Solidago*.

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

Celem naukowym badań jest ocena skuteczności wykorzystania wypasu małych przeżuwaczy w redukcji występowania roślin inwazyjnych z rodzaju *Solidago*. Celem praktycznym jest wskazanie najbardziej skutecznej metody zwalczania nawłoci z uwzględnieniem gatunku wypasanych zwierząt. Określona została również przydatność nawłoci jako dodatku paszowego w żywieniu kóz oraz jej wpływ na jakość i właściwości pozyskiwanego mleka.

Działania zaradcze – usuwanie roślin inwazyjnych metodą wypasu i koszenia

Przygotowanie terenu

Pastwisko na którym zidentyfikowano nawłóć podzielone zostało na części, na których przeprowadzono wypas owiec i kóz oraz koszenie. Owce rasy świniarka i kozy rasy karpackiej były wypasane na pastwisku dwukrotnie. Wypasanych było 15 dorosłych maciorek i 15 kóz. Pierwsza tura wypasu rozpoczęła się 15 maja i trwała do całkowitego zgryzienia runi (początek czerwca). Zwierzęta miały stały dostęp do wody oraz do schronienia w postaci zadaszzonego koszarzu. Po zakończonej turze wypasu wykoszono niedojady, a pastwisko pozostawiono do ponownego odrośnięcia runi. Następnie przeprowadzono drugą turę wypasu.

Monitoring przyrodniczy Metodyka

Monitoring przyrodniczy został wykonany przez eksperta-botanika. Polegał m.in. na zebraniu informacji na temat występowania osobników/pędów nawłoci, sporządzeniu listy gatunków roślin niedocelowych, z podaniem szacunkowego pokrycia powierzchni (%), zajmowanej przez stwierdzone gatunki w ocenianych powierzchniach, a także wykonaniu dokumentacji fotograficznej.

Prace terenowe polegające na założeniu stałych powierzchni monitoringowych zajmowanych przez inwazyjne gatunki z rodzaju *Solidago* (tj. poligonów badawczych) wykonano wiosną (maj), w okresie wykształcenia liści nawłoci.

Poligony założono w granicach działek ewidencyjnych należących do gospodarstwa rolnego. Wszystkie poligony badawcze założone zostały w zwartych płatach nawłoci lub ich kępach, zostały ponumerowane, a ich środek został określony za pomocą odbiornika GPS.

W sezonie wegetacyjnym 2024 roku wykonano monitoring przyrodniczy na powierzchni doświadczalnej w Rozkochowie (woj. małopolskie, pow. chrzanowski, gm. Babice, południowa Polska) celem kontroli oraz oceny efektów wdrożonego wypasu kóz i owiec na występowanie inwazyjnych nawłoci *Solidago* sp. Zarejestrowano stan zróżnicowania składu gatunkowego i udziału nawłoci przed zabiegami ochronnymi i po zabiegach. Ponadto, zebrano informacje na temat występowania osobników/pędów nawłoci, sporządzono listy gatunków roślin niedocelowych z podaniem szacunkowego pokrycia powierzchni zajmowanej przez stwierdzone gatunki w ocenianych powierzchniach, a także wykonano dokumentację fotograficzną.

Nawłóć późna *Solidago gigantea* jest gatunkiem obcym, inwazyjnym i rozpowszechnionym w Polsce. Zajmuje rozległe tereny również wzdłuż Wisły, także w pobliżu Krakowa (Marjańska i in. 2023). Występowała na całej powierzchni badawczej, tworząc mniej lub bardziej zwarte płaty (tzw. nawłociowiska), a tylko miejscami pojedynczo. Nawłocie silnie konkurują z rodzimymi roślinami dzięki szybkiemu i wysokiemu wzrostowi, dużej wytrzymałości, mocnemu zagęszczeniu pędów podziemnych i nadziemnych nawłoci, co powoduje, że wewnątrz jej płatów zwykle nie występują inne gatunki roślin, a zwłaszcza dzięki znacznej liczebności powstających nasion i ich skutecznego rozsiewania (wiatr, zwierzęta). Wraz ze wzrostem zagęszczenia nawłoci maleje bioróżnorodność flory w środowisku, w którym występują (Lenda i in. 2019), dlatego tak ważne jest ograniczanie ich ekspansji i zwalczanie.

Rycina. 1. Mapa powierzchni doświadczalnej w Rozkochowie – z podziałem na cztery pola badawcze.



Wykonanie prac terenowych obejmowało założenie czterech stałych pól monitoringowych, zajmowanych przez inwazyjne gatunki z rodzaju *Solidago* w granicach działek ewidencyjnych należących do gospodarstwa rolnego i polegało na losowym wyborze, w każdym terminie kontroli, 40 poletek badawczych (po 10 dla każdego pola) w kształcie koła o powierzchni 1 m² (koło o średnicy 1,1 m). Podział na cztery stałe pola monitoringowe podyktowany był różnymi formami planowanego użytkowania w każdym z pól.

Na losowo rozmieszczonych poletkach badawczych określano skład gatunkowy zbiorowisk roślinnych (spisy gatunków) oraz szacowano pokrycie gatunków roślin zgodnie z 7-stopniową skalą ilościowości Braun-Blanquet'a.

Wyniki przeprowadzonego monitoringu efektów wypasu w redukcji występowania inwazyjnych nawłoci *Solidago* sp. wskazują, że najskuteczniejszym – najszybciej dającym satysfakcjonujące efekty zabiegiem, jest wypas owiec (ok. 95% skuteczność). W przypadku kóz skuteczność wynosiła ok. 64,3%, a w przypadku samego koszenia ok. 70%. Jednak istotną kwestią jest trwałość przeprowadzonych zabiegów, która w przypadku pola koszonego (bez zbioru siana) nie będzie zadowalająca, podczas gdy wypas kóz daje dość trwałe efekty w zwalczaniu gatunków niepożądanych. Kontynuacja badań niewątpliwie umożliwiłaby potwierdzenie zasadności tak postawionego założenia. Bezspornie wypas skutecznie redukuje warstwę zalegającego wojłoku oraz znacznie podnosi wskaźniki różnorodności biologicznej (bogactwa gatunkowego roślin). Największy wzrost liczby gatunków zanotowano w polach, gdzie przebywały owce.

Zaleca się kontynuację doświadczenia i dalsze obserwacje monitoringowe w kolejnym sezonie wegetacyjnym. Szczególnie wskazana jest kontrola odrastania i pokrycia powierzchni badawczych przez *Solidago gigantea* po okresie spoczynku zimowego, a przed wznowieniem jakiegokolwiek formy użytkowania. Istotne jest także utrzymanie zabiegów ochronnych celem dalszej eliminacji inwazyjnych nawłoci, aż do całkowitej redukcji populacji *Solidago* na powierzchniach badawczych oraz podtrzymania efektów przyrodniczych uzyskanych dzięki wdrożeniu zabiegów ochronnych.

Podczas prac monitoringowych wykonano pełną dokumentację fotograficzną (obszaru badawczego oraz każdego poletka z osobna w kolejnych cyklach).

Poniżej zamieszczono kilka wybranych fotografii obrazujących teren badań w różnych cyklach oraz płaty roślinności w wybranych poletkach.

Obszar badawczy – I cykl, 25.04.2024. Na pierwszym planie pole nr 1. (Fot. 1. D. Suder)	Poletko z dużym udziałem traw i nawłoci – 25.04.2024 roku. (Fot. 2. D. Suder)
	
Poletko zdominowane przez <i>Solidago gigantea</i> – 25.04.2024 roku. (Fot. 3. D. Suder)	Poletko z niewielkim udziałem <i>Solidago gigantea</i> . – 25.04.2024 roku. (Fot. 4. D. Suder)
	
Obszar badawczy – II cykl, 02.07.2024 roku. (Fot. 5. D. Suder)	Poletko z dużym udziałem traw i nawłoci – 02.07.2024 roku. (Fot. 6. D. Suder)
	
Poletko o wysokim bogactwie gatunkowym, nawiązujące do łąk trzęślicowych. Duży udział krwiściągu <i>Sanguisorba officinalis</i> – 02.07.2024 roku. (Fot. 7. D. Suder)	Poletko z dużym udziałem <i>Solidago gigantea</i> . – 02.07.2024 roku. (Fot. 8. D. Suder)
	

Powierzchnie wypasane. Ruń niska. Widoczny odrost nawłoci – 02.07.2024 roku. (Fot. 9. D. Suder)	Powierzchnie koszone. Widoczna ścięta, sucha biomasa nawłoci – 02.07.2024 roku. (Fot. 10. D. Suder)
	
Powierzchnie nieużytkowane z dużymi płatami nawłoci – 02.07.2024 roku. (Fot. 11. D. Suder)	Obszar badawczy – III cykl, 21.09.2024 roku. (Fot. 12. D. Suder)
	
Poletko o właściwej strukturze gatunkowej, nawłoci niemal całkowicie wyeliminowana – 21.09.2024 roku. (Fot. 13. D. Suder)	Powierzchnie koszone mocno zbuchowane przez dziki, z panującą pokrzywą – 21.09.2024 roku. (Fot. 14. D. Suder)
	
Poletko o wysokim bogactwie gatunkowym. Duży udział ostrożeńia tåkowego <i>Cirsium rivulare</i> – 21.09.2024 roku. (Fot. 15. D. Suder)	Poletko zdominowane przez pokrzywę – 21.09.2024 roku. (Fot. 16. D. Suder)
	

Ocena jakości mleka pozyskanego od kóz żywionych nawłocią

Materiał doświadczalny

Stado kóz karpackich podzielone zostało na dwie grupy – grupę kontrolną, wypasaną na tradycyjnym pastwisku (15 kóz) oraz doświadczalną na pastwisku z nawłocią (15 kóz).

Wszystkie kozy po odsadzeniu koźląt – w wieku około 100 dni – są wypasane od maja do września. Podczas przeprowadzanej rutynowo (co miesiąc) kontroli mleczności, od każdej kozy pobrano indywidualne próby mleka i przekazano do laboratorium. Próby zielonki pastwiskowej z pastwiska kontrolnego oraz nawłoci z pastwiska doświadczalnego w celu oceny wartości po-karmowej zostaną pobrane w na początku i końcu każdego cyklu wypasowego.

Ocena jakości mleka koziego karmionego pastwiskowo i z dodatkiem nawłoci

Ocenę wykonano w Katedrze Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. W badanych próbach określono podstawowy skład chemiczny: suchą masę, białko w tym zawartość frakcji białkowych oraz profil aminokwasowy, tłuszcz, laktozę, popiół. Zbadano również zawartość polifenoli ogółem i właściwości przeciwutleniające.

Wyniki

Mleko kozie znajduje bardzo szerokie zastosowanie w żywieniu ze względu na właściwości bioaktywne, niską alergenicność i właściwości immunostymulujące. Ważnymi substancjami bioaktywnymi mleka koziego są białka, oligosacharydy i witaminy. Substancje te są doskonale wchłaniane przez organizm ludzki i mogą być stosowane w profilaktyce wielu chorób. Skład chemiczny mleka jest ściśle związany z okresem laktacji. Ważnym elementem wpływającym na skład chemiczny mleka jest również żywienie zwierząt. W wielu badaniach dowodzi się, że skład mieszanki paszowej bogatej w polifenole (np. wyłoki z winogron, jabłek i innych owoców oraz ziół) wpływa bardzo pozytywnie na właściwości antyoksydacyjne mleka jak również produkowanych z niego serów. Może również wpływać korzystnie na organizm zwierząt.

W badanych próbach występowało duże zróżnicowanie w obrębie składu podstawowego suchej masy, gęstości oraz kwasowości, jak również profilu białek mleka. Świeże mleko kozie charakteryzuje się pH w granicach 6,6-6,8 i kwasowością miareczkową 6,5 -7,50SH. Kwasowość powyżej 80SH określa lekkie nadkwaszenie mleka. Poniżej 6,4 może być wynikiem stanu zapalnego wymienia. Badania wykazały, że znaczna część badanych mlek nie mieściła się w tych granicach, co może mieć wpływ na stabilność białek. Widoczny był wzrost zawartości immunoglobulin, a co za tym idzie wzrost gęstości mleka, z każdym kolejnym pobraniem. Wzrost ten był intensywniejszy w przypadku mleka zwierząt karmionych nawłocią. Występowały także różnice w barwie mleka. Próby mleka od kóz karmionych nawłocią posiadały barwę intensywnie żółtą.

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

Zadanie 01-14-05-11

Wpływ rolnictwa precyzyjnego na produkcję suma afrykańskiego w obiegu zamkniętym.

kierownik zadania: dr inż. Przemysław Pol

Na podstawie uzyskanych w pierwszych latach realizowanego zadania wyników, opracowano dwa eksperymentalne systemy podchowu typu RAS.

Jeden obieg wyposażony był jedynie w filtrację mechaniczną w postaci automatycznych rollerów oraz filtrację biologiczną, opartą o pływające złoża typu MBBR umieszczone w sześciu szesnastolitrowych workach.

Drugi obieg posiadał dodatkowy, 80 litrowy filtr z ruchomym złożem oraz wysoki, składający się sześciu poziomów zraszany filtr. Cztery z sześciu poziomów zajmowały złoża MBBR, natomiast dwa poziomu zostały dostosowane do produkcji glonów nitkowatych. Do obu basenów podłączono specjalistyczną aparaturę mierzącą – w odstępach 5 minutowych – parametry, takie jak temperatura, ORP i pH, TDS.

W każdym basenie umieszczono po 200 sztuk narybku suma afrykańskiego *clarias gariepinus* i rozpoczęto doświadczenie. Jeden raz w tygodniu woda z każdego obiegu była transportowana do analiz ICP, z dodatkowym pomiarem nasycenia tlenem wody.

Wykazano ogromne różnice w zachowaniu i dobrostanie zwierząt przetrzymywanych w obiegu z typowym systemem filtracji, w stosunku do ryb przetrzymywanych w obiegu z zaawansowanym systemem filtracji. W warunkach słabej filtracji dochodziło do podgryzania oraz aktów kanibalizmu u ryb. Większy stres objawiał się obijaniem ryb o boki basenów, jak również wyskakiwaniem z wody. Zaobserwowano także zdecydowanie dłuższe wyżeranie paszy przez ryby w warunkach słabej filtracji. Jednoznacznie stwierdzono, że słaba filtracja wody ma bardzo duży wpływ na poziom stresu u ryb, skutkujący pogorszeniem dobrostanu zwierząt, który przekłada się na tempo wzrostu, kondycję oraz gotowość do rozrodu.

Do grudnia 2024 roku, ryby osiągnęły średnią masę 300 g.

Zadanie 01-14-06-11

Wpływ dodatku makuchu i oleju z nasion dyni na użytkowość królików.

kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

W celu sprostania wymogom pokarmowym zwierząt o wysokim potencjale produkcyjnym, jakimi są bezsprzecznie króliki, należy zapewnić im dostateczną ilość pasz jak najlepszej jakości. Dla hodowcy ważny jest również aspekt ekonomiczny żywienia, które stanowi najwyższy koszt utrzymania królików oceniany na około 80-85%.

Polska importuje corocznie ponad 75% białka roślinnego – głównie w postaci śruty sojowej, której import wzrósł w ostatnim czasie do około 2,5 mln ton. Śruta ta, wykorzystywana w pełnoporcjowych mieszankach paszowych dla królików, jest najdroższym komponentem. W momencie wejścia w życie przepisów zabraniających stosowania w żywieniu zwierząt pasz GMO, będzie musiała być zastąpiona innymi komponentami. Stąd obecnie prowadzone są liczne badania dotyczące możliwości wykorzystania w hodowli królików innych pasz białkowych, jak i takich, którymi nie są skarmiane pozostałe gatunki zwierząt gospodarskich (ziota, chwasty, odpady sadownicze).

Uwagę zwraca się również na poprawę na drodze żywieniowej parametrów jakościowych produkowanego mięsa, aby sprostać coraz wyższym oczekiwaniom konsumentów co do jakości produktu końcowego.

Pestki dyni mogą stanowić jedną z alternatyw dla komercyjnie wykorzystywanych źródeł białka stosowanych w żywieniu zwierząt gospodarskich, w tym również królików. Poziom białka w nasionach dyni niektórych odmian może sięgać nawet 35%. Posiada ono pożądaną żywieniowo skład aminokwasowy z dużym udziałem aminokwasów egzogennych (Jafari i wsp., 2012).

W badaniach naukowych wykazano, że białko wyizolowane z nasion dyni ma bardzo wysoką biodostępność i przyswajalność, porównywalną z białkiem pochodzącym z nasion soi (Rezigi i wsp., 2013). Pestki dyni zawierają w swoim składzie wszystkie 9 aminokwasów egzogennych: histydynę, izoleucynę, leucynę, lizynę, metioninę, fenyloalaninę, treoninę, tryptofan i walinę (Singh i Kumar, 2023). Ponadto pestki są bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe – kwas linolowy (LA, C18:2 n-6) i oleinowy (C18:1), które pokrywają około 75% całkowitej zawartości wszystkich kwasów tłuszczowych. Cechuje je także bogactwo substancji biologicznie czynnych, takich jak: tokoferole, karotenoidy, terpenoidy, terpeny (kaburbitacyna), alkaloidy (moschatyna), skwalany, fitosterole, fenole, kumaryny, prowitaminy, barwniki i flawonoidy. Oprócz tego są źródłem magnezu, żelaza, wapnia, potasu, fosforu oraz wielu mikroelementów (Dotto i Chacha, 2020).

Cel badań

Celem podjętych badań było określenie wpływu 5 i 10% dodatku makuchu z pestek dyni do pełnoporcjowej mieszanki paszowej podawanej królikom na wyniki odchowu, użytkowość rzeźną, jakość mięsa i zdrowotność zwierząt.

Przeprowadzone doświadczenie może przyczynić się do szerszego wykorzystywania makuchu z nasion dyni w żywieniu królików zarówno w chowie intensywnym, jak i w gospodarstwach ekstensywnych czy ekologicznych, w których konieczna jest selekcja podawanych zwierzętom komponentów paszowych.

Materiał i metody

W pierwszym kwartale 2023 roku pokryto 30 samic królików rasy popielniańskiej białej utrzymywanych w fermie należącej do Instytutu Zootechniki w Aleksandrowicach. Urodzone króliczęta odchowywano przy matkach, w kojcach na głębokiej ściółce do wieku 35 dni, a następnie przeniesiono do metalowych klatek przeznaczonych do odchowu towarowego zwierząt. Utworzono trzy grupy kontrolną (K) i dwie doświadczalne (D1 i D2) – po 20 sztuk królicząt w każdej, które żywiono do wieku 90 dni pełnoporcjowymi mieszankami granulowanymi z 0, 5 i 10% dodatkiem makuchu z pestek dyni. W skład podstawowej mieszanki paszowej wchodziła: poekstrakcyjna śruta sojowa, susz z lucerny, otręby pszenne, śruty: jęczmienna i kukurydziana, olej rzepakowy, fosforan paszowy, NaCl, premixmineralno-witaminowy i arbocel. W grupie D2 makuch z dyni zastąpił w całości poekstrakcyjną śrutę sojową. W 90. dniu życia ubito po 10 sztuk królików z każdej grupy. Podczas uboju pobrano tkanki niezbędne do dalszych analiz, takie jak: mięso, krew, wątrobę, nerki, jelita i śledzionę. Opisane analizy prowadzone były w latach 2023-2024.

Na pobranych próbkach mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*) wykonano analizę tekstury mięsa oraz immunohistochemiczną analizę składu włókien mięśniowych. W mięśniu najdłuższym lędźwi (*m. longissimus lumborum*) i dwugłowym uda (*m. biceps femoris*) określono skład chemiczny i profil aminokwasowy mięsa króliczego.

Przeprowadzono również analizę morfologiczną pobranej poubojowo krwi króliczej.

Wyniki

Tabela 1. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na wyciek termiczny, siłę cięcia i profilową analizę tekstury mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*) – średnia $\pm$ SEM.

Wyszczególnienie	Grupa			p-value
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	
Siła cięcia (kg)	0,967 $\pm$ 0,08 ^a	1,661 $\pm$ 0,16 ^b	1,524 $\pm$ 0,11 ^b	0,001
Twardość (kg)	8,753 $\pm$ 0,85 ^a	13,268 $\pm$ 0,1,39 ^b	10,897 $\pm$ 1,26 ^{ab}	0,040
Spójność	0,414 $\pm$ 0,01 ^a	0,487 $\pm$ 0,01 ^b	0,458 $\pm$ 0,01 ^b	0,000
Sprężystość	0,488 $\pm$ 0,02	0,537 $\pm$ 0,01	0,504 $\pm$ 0,01	0,086
Żujność (kg)	1,871 $\pm$ 0,27 ^a	3,731 $\pm$ 0,57 ^b	2,704 $\pm$ 0,42 ^{ab}	0,021
Wyciek termiczny (%)	16,906 $\pm$ 2,46	22,287 $\pm$ 0,66	18,452 $\pm$ 1,536	0,092

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że dodatek makuchu z pestek dyni wpływał istotnie na siłę cięcia, a najwyższa wartość tej cechy dotyczyła mięsa zwierząt z grupy D1. Z kolei jej statystycznie najniższa wartość charakteryzowała mięso królików z grupy kontrolnej. Najwyższą miarę twardości odnotowano w mięsie królików żywionych 5% dodatkiem makuchu z pestek dyni. Wartość ta była istotnie wyższa w porównaniu z mięsem królików z grupy kontrolnej. Najniższa wielkość spójności i żujności została zmierzona w mięsie combra królików z grupy kontrolnej, a najwyższa z grupy D1. Nie wykazano wpływu dodatku makuchu z pestek dyni na sprężystość mięsa oraz na wyciek termiczny (Tabela 1.).

Tabela 2. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na profil aminokwasów w mięśni dwugłowym uda (*m. biceps femoris*) (g/kg próby) – średnia $\pm$ SEM.

Aminokwas	Grupa			p-value
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	
Seryna	7,927 $\pm$ 0,0,40 ^a	9,100 $\pm$ 0,38 ^b	8,229 $\pm$ 0,20 ^a	0,056
Kwas asparaginowy	21,8720 $\pm$ 0,62	20,898 $\pm$ 0,35	20,601 $\pm$ 0,49	0,190
Treonina	9,600 $\pm$ 0,23	8,931 $\pm$ 0,16	9,693 $\pm$ 0,32	0,074
Kwas glutaminowy	34,299 $\pm$ 1,37	31,931 $\pm$ 0,72	31,641 $\pm$ 0,85	0,150
Prolina	8,303 $\pm$ 0,24	8,042 $\pm$ 0,13	8,113 $\pm$ 0,20	0,632
Glicyna	11,635 $\pm$ 0,37	10,652 $\pm$ 0,23	11,251 $\pm$ 0,20	0,116
Alanina	11,798 $\pm$ 0,30	11,357 $\pm$ 0,19	12,141 $\pm$ 0,24	0,097
Walina	10,954 $\pm$ 0,22	10,233 $\pm$ 0,20	10,872 $\pm$ 0,23	0,049
Izoleucyna	9,826 $\pm$ 0,20	9,368 $\pm$ 0,22	9,754 $\pm$ 0,21	0,274
Leucyna	16,992 $\pm$ 0,35	16,001 $\pm$ 0,28	16,291 $\pm$ 0,30	0,086
Tyrozyna	10,770 $\pm$ 0,23 ^a	8,709 $\pm$ 0,39 ^b	11,080 $\pm$ 0,27 ^a	0,000
Fenylalanina	8,660 $\pm$ 0,19 ^a	7,289 $\pm$ 0,20 ^b	8,420 $\pm$ 0,20 ^s	0,000
Histydyna	7,334 $\pm$ 0,34 ^a	5,766 $\pm$ 0,41 ^b	6,958 $\pm$ 0,30 ^{ab}	0,011
Lizyna	20,479 $\pm$ 0,64 ^a	16,519 $\pm$ 0,47 ^b	21,168 $\pm$ 0,38 ^a	0,000
Arginina	16,713 $\pm$ 0,48 ^a	12,440 $\pm$ 0,96 ^b	15,521 $\pm$ 0,65 ^a	0,000
Cysteina	2,583 $\pm$ 0,06	2,529 $\pm$ 0,10	2,364 $\pm$ 0,03	0,087
Metionina	6,502 $\pm$ 0,10 ^a	6,023 $\pm$ 0,20 ^{ab}	5,899 $\pm$ 0,11 ^b	0,014
Tryptofan	2,866 $\pm$ 0,18	3,116 $\pm$ 0,20	2,660 $\pm$ 0,13	0,189
Suma aminokwasów egzogen- nych	109,926 $\pm$ 2,28 ^a	95,686 $\pm$ 2,36 ^b	107,236 $\pm$ 2,26 ^a	0,000
Suma wszystkich aminokwasów	219,113 $\pm$ 4,10 ^a	198,904 $\pm$ 2,96 ^b	212,656 $\pm$ 4,45 ^a	0,003

W mięśni dwugłowym uda (*m. biceps femoris*) (Tabela 2.), w grupie D1, stwierdzono istotny wzrost zawartości seryny, jak również obniżenie poziomu tyrozyny, fenylalaniny, lizyny i argininy w porównaniu z grupą kontrolną i grupą D2.

Najwyższy udział histydyny w profil aminokwasowym odnotowano w grupie kontrolnej, a najniższy w grupie żywionej paszą z 5% dodatkiem makuchu. Również w grupie kontrolnej wykazano najwyższy udział metioniny, natomiast najniższy w grupie D2. W przypadku pozostałych aminokwasów nie odnotowano istotnych statystycznie różnic. Podobnie jak w przypadku mięśnia combra, stwierdzono także istotne obniżenie poziomu aminokwasów egzogennych w grupie D1 w stosunku do pozostałych grup żywieniowych. Zależność ta została także wykazana w przypadku sumy wszystkich badanych aminokwasów.

Tabela 3. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na skład chemiczny mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*) i dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) (%) – średnia $\pm$ SEM.

Wyszczególnienie	Grupa			p-value
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	
m. longissimus lumborum				
Sucha masa	32,397±0,97	30,238±0,75	29,397±0,87	0,070
Białko całkowite	21,009±1,58	19,277±1,87	20,316±2,73	0,203
Tłuszcz całkowity	0,895±0,06	0,995±0,03	1,015 ±0,00	0,000
m. biceps femoris				
Sucha masa	38,041±2,23	31,879±0,85	33,364±02,14	0,080
Białko całkowite	23,120±1,93	21,217±0,27	19,168±0,72	0,100
Tłuszcz całkowity	1,015±0,01	0,990±0,01	0,996 ±0,02	0,335

Przeprowadzone doświadczenie nie wykazało, aby dodatek żywieniowy wpływał istotnie na zawartość suchej masy, białka całkowitego i tłuszczu całkowitego w badanym mięsie. Najwyższą, choć nie potwierdzoną statystycznie wartość suchej masy i białka całkowitego, stwierdzono w grupie K, natomiast tłuszczu całkowitego w mięśniu najdłuższym lędźwi w grupie D2 i mięśniu dwugłowym uda grupy K (Tabela 3.).

Tabela 4. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na proporcję włókien mięśniowych typu I, IIA i IIB mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*) – średnia $\pm$ SEM.

Parametr	Grupa			p-value
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	
ØI	48,09 $\pm$ 1,06	48,79 $\pm$ 1,35	47,78 $\pm$ 1,38	0,865
ØIIA	50,67 $\pm$ 1,76	49,744 $\pm$ 0,81	50,28 $\pm$ 1,28	0,887
ØIIB	66,19 $\pm$ 1,35	66,44 $\pm$ 1,38	66,68 $\pm$ 1,20	0,966
%I	5,87 $\pm$ 0,58	6,49 $\pm$ 0,48	6,44 $\pm$ 0,47	0,637
%IIA	23,32 $\pm$ 1,05	23,37 $\pm$ 1,16	23,10 $\pm$ 0,91	0,981
%IIB	70,81 $\pm$ 1,30	70,14 $\pm$ 1,32	70,46 $\pm$ 1,20	0,930

Objaśnienie:

I – włókna typu I (oksydacyjne, wolne, czerwone) – wybarwione na brązowo;

IIA – włókna typu IIA (oksydacyjno-glikolityczne, pośrednie) – wybarwione na niebiesko;

IIB – włókna typu IIB (glikolityczne, szybkie, białe) – brak reakcji, barwa biała.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała wpływu stosowanego dodatku żywieniowego na proporcję włókien mięśniowych w mięśniu najdłuższym lędźwi (*m. longissimus lumborum*) (Tabela 4.).

Rycina 1. Przekrój porządkowy *m. longissimus lumborum* królików rasy popielniańskiej białej. Grupa kontrolna (A), grupa żywiona 5% dodatkiem makuchu (B) oraz grupa żywiona 10% dodatkiem makuchu (C). Reakcja histochemiczna na aktywność dehydrogenazy NADH-TR oraz reakcja immunohistochemiczna na obecność izoformy miozyny wolnej. Włókna mięśniowe czerwone (typu I), pośrednie (typu IIA) i białe (typu IIB). Skala 100 μ m.

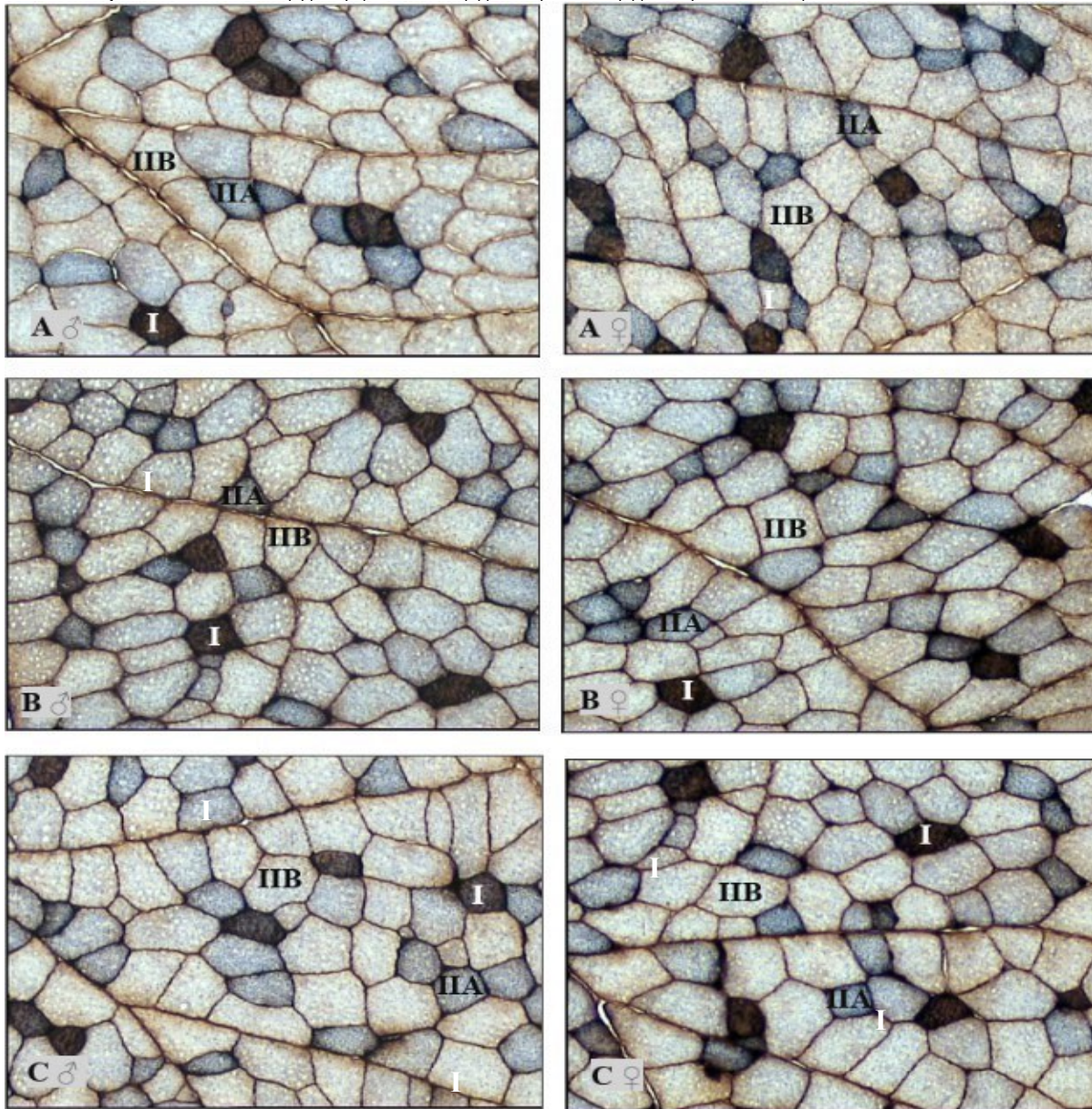


Tabela 5. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na wyniki morfologii krwi króliczej – średnia $\pm$ SEM.

Wyszczególnienie	Grupa			p-value	Normy
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10		
WBC ($10^3/\mu$ l)	8,460 $\pm$ 1,24 ^b	11,74 $\pm$ 0,93 ^a	10,31 $\pm$ 0,79 ^{ab}	0,089	2,0-15,0
LYM (%)	78,63 $\pm$ 1,39 ^a	68,43 $\pm$ 3,81 ^b	69,75 $\pm$ 2,91 ^b	0,037	25,0-95,0
MON (%)	0,870 $\pm$ 0,04	0,890 $\pm$ 0,07	1,030 $\pm$ 0,08	0,217	1,0-16,0
GRA (%)	20,66 $\pm$ 1,37 ^b	30,66 $\pm$ 3,80 ^a	29,18 $\pm$ 2,83 ^a	0,041	10,0-80,0
LYM ($10^3/\mu$ l)	6,600 $\pm$ 0,93	7,980 $\pm$ 0,65	7,090 $\pm$ 0,49	0,398	3,4-7,9
MON ($10^3/\mu$ l)	0,080 $\pm$ 0,02	0,120 $\pm$ 0,01	0,110 $\pm$ 0,02	0,253	0,0-0,5
GRA ($10^3/\mu$ l)	1,820 $\pm$ 0,31 ^b	5,310 $\pm$ 0,38 ^a	5,690 $\pm$ 0,13 ^a	0,000	1,5-5,7
RBC ($10^6/\mu$ l)	5,330 $\pm$ 0,08	5,460 $\pm$ 0,16	5,690 $\pm$ 0,13	0,158	4,0-9,0
HGB (g/dl)	11,25 $\pm$ 0,19	11,52 $\pm$ 0,32	11,86 $\pm$ 0,28	0,284	9,0-19,0

HCT (%)	33,06±0,53	33,86±0,97	34,95±0,72	0,229	30,0-53,0
MCV (μm^3)	62,58±0,77	62,14±0,33	61,54±0,38	0,394	60,0-80,0
MCH (pg)	21,29±0,26	21,09±0,16	21,40±0,59	0,846	16,0-30,0
MCHC (g/dl)	34,04±0,24	33,92±0,15	33,85±0,18	0,783	22,0-41,0
RDWC (%)	14,43±0,53 ^b	14,90±0,36 ^{ab}	15,70±0,24 ^a	0,087	
RDWS (μm^3)	35,19±0,99	36,71±0,95	37,11±0,85	0,321	
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	182,9±17,7 ^b	308,3±25,2 ^a	239,9±21,9 ^b	0,001	120-800
MPV (μm^3)	5,590±0,09	5,700±0,13	5,580±0,18	0,797	
PCT (%)	0,101±0,01 ^b	0,174±0,01 ^a	0,131±0,01 ^b	0,001	
PDW (%)	21,86±2,40	18,30±1,11	23,14±2,12	0,212	
P-LCR	4,880±0,46	4,740±0,53	4,640±0,91	0,968	12,0-42,0

Objaśnienie:

WBC – liczba białych krwinek; LYM – limfocyty; MON – monocyty; RBC – liczba czerwonych krwinek; GRA – granulocyty; HGB – hemoglobina; HCT – hematokryt; MCV – wskaźnik średniej objętości krwinki czerwonej; MCH – wskaźnik średniej zawartości hemoglobiny w krwince; MCHC – wskaźnik średniego stężenia hemoglobiny w krwince czerwonej; RDWC – współczynnik zmienności rozkładu objętości erytrocytów; RDWS – wskaźnik rozkładu objętości erytrocytów; PLT – trombocyty; MPV – średnia objętość płytek krwi; PCT – trombokryt; PDW – wskaźnik anizocytozy (zróznicowania wielkości) płytek krwi; P-LCR – odsetek płytek krwi w próbce.

Wykazano, że dodatek ten wpływa istotnie na ogólną liczbę białych krwinek (WBC). Ich statystycznie najwyższą zawartością cechowała się krew królików z grupy D1, a najniższą z grupy kontrolnej. Zauważono również wpływ badanego makuchu na procentowy udział limfocytów i granulocytów oraz na liczbę granulocytów. Statystycznie wyższy ($P \leq 0,05$) procentowy udział limfocytów i statystycznie niższy procentowy i liczbowy udział granulocytów cechował krew królików z grupy kontrolnej w stosunku do obydwu grup doświadczalnych, pomiędzy którymi nie wykazano istotnych różnic.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała także wpływ stosowanego dodatku żywieniowego na współczynnik zmienności rozkładu objętości erytrocytów (RDWC). Statystycznie potwierdzona najwyższa wartość tego parametru została odnotowana w grupie żywionej 10% dodatkiem makuchu z pestek dyni, a najniższa w grupie kontrolnej.

Ilość płytek krwi oraz hematokryt płytkowy (trombokryt) również różniły się istotnie między poszczególnymi grupami żywieniowymi. Najwyższa wartość omawianych wskaźników została odnotowana w grupie D1, a najniższa w grupie nieotrzymującej dodatku makuchu w paszy w stosunku do podawanych norm (Tabela 5.).

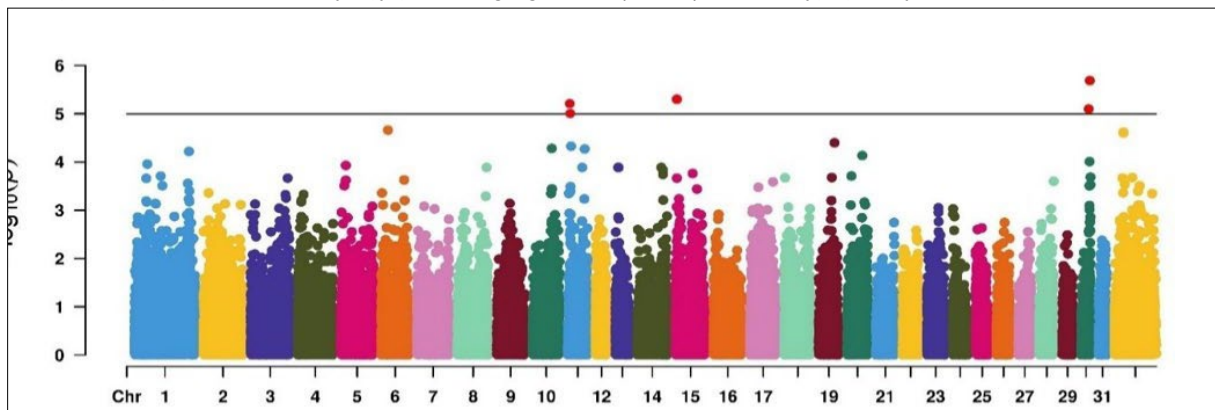
Zakład Ochrony Bioróżnorodności Zwierząt Gospodarskich i Hodowli Koni

(do dnia 29 lutego 2024 roku Zakład Hodowli Koni)

kierownik: dr inż. Agnieszka Chelmińska**Zadanie 01-15-03-11***Ocena dyskomfortu u koni pracujących oraz dotkniętych egzemą letnią i analiza genetyczna występowania tej choroby.***dr inż. Iwona Tomczyk-Wrona**

W omawianym okresie sprawozdawczym uzupełniono materiał DNA do badań nad lipcówką u koni rasy huculskiej. Część materiału pochodziła z bazy Zakładu Biologii Molekularnej. Wstępna analiza potwierdziła, że egzema letnia, potocznie zwana lipcówką, to choroba poligenetyczna wymagająca dalszych badań i analiz, w celu wyodrębnienia genów odpowiedzialnych za jej występowanie. U koni obarczonych egzemą skórną wyodrębniono między innymi ADAMTS2 odpowiedzialny za stany zapalne skóry, KCnT2 związany z działaniem pompy sodowo-potasowej, mogący powodować nadwrażliwość na ból. KCnT2 oraz LhX9 u ludzi są powiązane z nowotworami. Mutacja w genie SH3PXD2B może wywoływać rzadki zespół autosomalny recesywny i odgrywa rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej i migracji komórek. Dodatkowo, analiza rodowodów koni potwierdziła, że wśród przodków koni obarczonych lipcówką powtarza się ogier Cukor-Gurgul-5 w liniach zarówno po matce, jak i po ojcu. Zagadnienie to będzie poddane dalszej szczegółowej analizie.

Wykres 1. Wyniki badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS) ocenianej populacji koni huculskich.

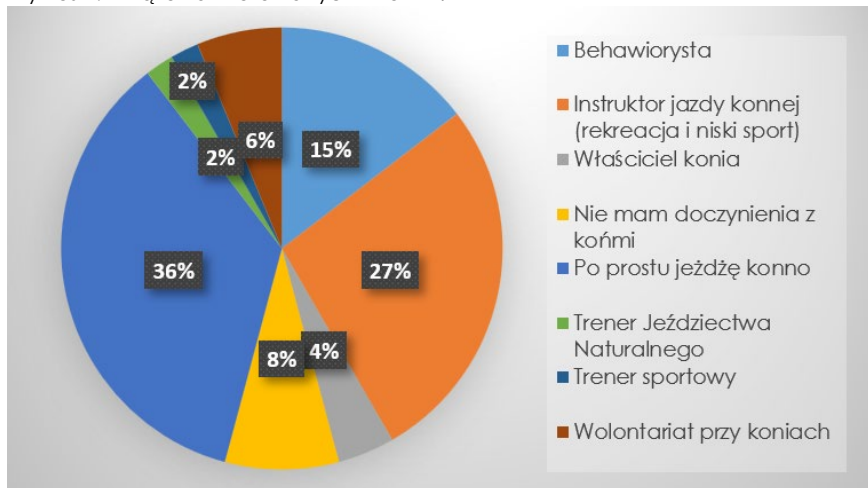


Badanie GWAS (Genome-Wide Association Study) przeprowadzone na koniach huculskich wskazało istotne statystyczne polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) na chromosomach 11, 15 oraz 30 – związane z wystąpieniem egzemy letniej. Wyniki te wymagają dalszych analiz, aby dokładnie zidentyfikować odpowiedzialne warianty genetyczne i ich rolę w rozwoju tej choroby.

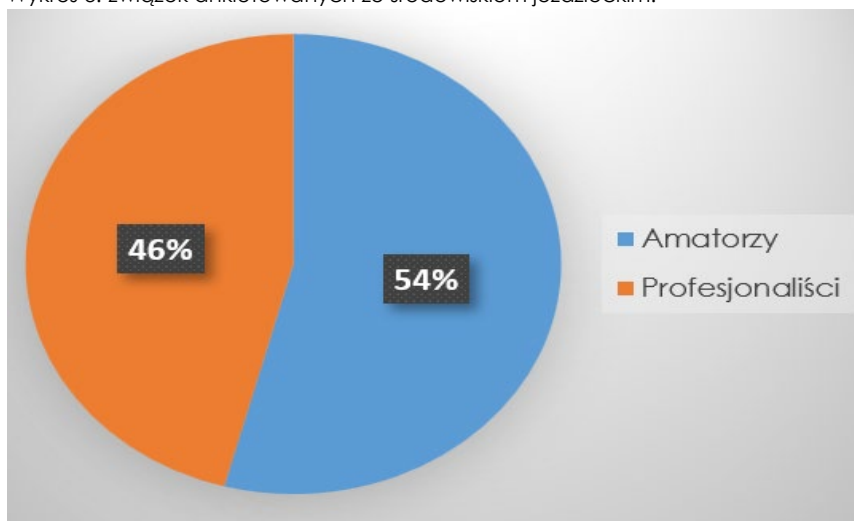
Równolegle prowadzone były prace dotyczące poszukiwania koni innych ras dotkniętych egzemą letnią. Wyszukiwano hodowle i stajnie, w których znajdowały się konie z egzemą skórną. W okresie sprawozdawczym pozyskano materiał z ośrodków hodowli koni rasy śląskiej do dalszych badań genetycznych. Zebrany materiał dotyczący koni rasy śląskiej z objawami egzemy letniej i koni zdrowych będzie poddany dalszym badaniom genetycznym, podobnie jak w populacji koni huculskich.

Dokonano przeglądu literatury o badaniach ankietowych, ukierunkowanych na analizę dobrostanu koni, weryfikację wiedzy właścicieli koni oraz osób pracujących z końmi. Przeprowadzono analizę danych uzyskanych w wyniku przeprowadzenia ankiety dobrostanowej opracowanej w języku polskim. Ankieta ta dostosowana była do specyfiki naszego kraju i obecnych systemów utrzymania. Opracowane pytania dotyczyły danych socjo-demograficznych, sprawdzających poziom wiedzy i chęci rozwoju osób pracujących z końmi, a także pytania dotyczące oceny koni, z którymi pracują w danym ośrodku. Badanie ankietowe przeprowadzono wśród 48 osób, które były lub nie były związane z końmi.

Wykres 2. Związek ankietowanych z końmi.

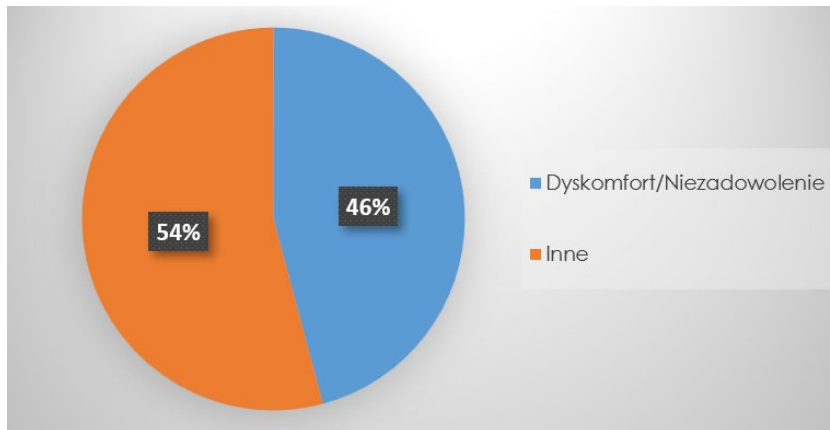


Wykres 3. Związek ankietowanych ze środowiskiem jeździeckim.



Ankietowane osoby podzielono na dwie grupy: amatorzy i profesjonaliści. Do grupy amatorów zaliczono osoby, które w ankiecie udzieliły odpowiedzi: nie mam do czynienia z końmi, po prostu jeżdżę konno, właściciel konia, wolontariusze. Do grupy profesjonalistów zaliczono: behawiorystów, instruktorów jazdy konnej, instruktorów sportu i trenerów jeździectwa naturalnego. Stosunek obu grup wyniósł 46 % amatorzy do 54 % profesjonalistów.

Wykres 4. Ocena mimiki (wyrazu) pyska konia bólowego.



Ankietowanym przedstawiono zdjęcie konia bólowego z kolką, z zadaniem określenia jego stanu na podstawie mimiki (wyrazu) pyska. W dalszej analizie szczegółowe oceny – ból, osowiały lub niezadowolony zostały połączone w jedną kategorię – dyskomfort, natomiast spokojny i skupiony w kategorię – inne. Wyniki przedstawiono na Wykresie 4.

Ponad połowa ankietowanych mylnie oceniła konia bólowego wskazując na spokój czy skupienie. Rezultaty ankiety wykazały brak rozpoznawania bólu u koni, zarówno w środowisku profesjonalistów, jak i amatorów. Prawdopodobnie większość osób nie ma nawyku myślenia o możliwości wystąpienia bólu u koni. Szukają oni raczej innych wytłumaczeń niepożądanego zachowania i postawy konia. Wynik ankiety potwierdził, że konie bólowe mogą zostać mylnie zinterpretowane jako zrelaksowane. Wskazuje to na potrzebę, aby wszystkie osoby pracujące i obcujące na co dzień z końmi ciągle poszerzały swoją wiedzę oraz dążyły do stopniowego podnoszenia poziomu dobrostanu koni.

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

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. Anna Arczewska, prof. IZ PIB

Realizowane zadania składają się z dwóch niezależnych, ale spójnych przedmiotowo celów szczegółowych. Zakres badań prowadzonych w obu celach dotyczy zagadnień nowoczesnej produkcji drobiarskiej – intensywnie odchowywanych kurcząt rzeźnych (brojlerów) oraz intensywnie użytkowanych kur nieśnych. Uwagę skoncentrowano na wpływie dodatków fitobiotyków (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 (cel 1.), a także na wpływie uwarunkowań fizjologicznych związanych z rozwojem przewodu pokarmowego oraz wydajnością sekrecyjną układu enzymatycznego u kurcząt brojlerów w wieku 10, 20 i 30 dni na strawność jelitową aminokwasów nasion krajowych niskotaninowych i wysokotaninowych odmian bobiku, w kontekście uzyskania danych umożliwiających optymalne wykorzystanie tych nasion w mieszankach paszowych stosowanych w systemie wielofazowego żywienia brojlerów (cel 2.).

W roku sprawozdawczym kontynuowano badania związane z realizacją doświadczenia na kurczętach rzeźnych, którego celem było określenie skuteczności preparatów: z czosnku (*Allium sativum*), oregano (*Origanum vulgare*), ostropestu (*Sylibum marianum*), karczocha (*Cynara scolymus*), ostryżu długiego (*Curcuma longa*) w warunkach ciągłego stosowania jonoforowego kokcydiostatyku paszowego monenzyny. Schemat doświadczenia obejmował również grupy kontrolne – negatywną bez dodatku i pozytywną z dodatkiem kokcydiostatyku.

Kurnik doświadczalny ZZZiP. (Fot. I. P. Zawisza)



Tabela 1. Schemat doświadczenia 2. na kurczętach brojlerach.

Grupa doświadczalna	Kokcydiostatyk jonoforowy w mieszance paszowej	Preparat ziołowy w mieszance paszowej
1	-	-
2	Monenzyna	-
3		Czosnek (<i>Allium sativum</i>)
4		Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)
5		Ostropest (<i>Sylibum marianum</i>)
6		Karczoch (<i>Cynara scolymus</i>)

W ramach badań przeprowadzono analizę aktywności przeciwutleniającej oraz składu testowanych ekstraktów roślinnych z: czosnku, kurkumy, ostropestu, oregano i karczocha pod kątem oznaczenia wiodących substancji bioaktywnych. Analizy aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono z wykorzystaniem następujących metod: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) oraz DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl).

Analiza metodami FRAP i DPPH wykazała, że największą aktywność przeciwutleniającą miał ekstrakt z kurkumy (160 $\mu\text{mol TE/g}$ w teście FRAP, 73,1% inhibicji w teście DPPH), natomiast najniższą czosnek (0,38 $\mu\text{mol TE/g}$ w teście FRAP, 1,05% inhibicji w teście DPPH). Wysoką aktywność wykazał również ostropest (2,63 $\mu\text{mol TE/g}$ w teście FRAP, 55,3% inhibicji w teście DPPH).

Tabela 2. Wyniki analizy aktywności przeciwutleniającej ekstraktów ziółowych.

Ekstrakt ziółowy	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	DPPH (% inhibicji)
Czosnek	0,38 ($\pm 0,01$)	1,05 ($\pm 0,28$)
Kurkuma	160 ($\pm 5,01$)	73,1 ($\pm 0,56$)
Ostropest	2,63 ($\pm 0,06$)	55,3 ($\pm 9,28$)
Oregano	1,63 ($\pm 1,72$)	6,84 ($\pm 2,19$)
Karczoch	0,38 ($\pm 0,04$)	33,5 ($\pm 7,33$)

Analiza składu zawartości wiodących substancji bioaktywnych w testowanych ekstraktach ziółowych:

- ostropest, zawartość składowych sylibinary: najwyższe stężenia miały sylibina A (55,8 mg/g) i sylibina B (86,3 mg/g). Pozostałe składniki: izosylibina A (19,2 mg/g), izosylibina B (7,1 mg/g), sylikrystyna A (55,8 mg/g), izosylikrystyna (7,1 mg/g) oraz syldianina (15,2 mg/g),
- czosnek, główne produkty degradacji allicyny w ekstrakcie z czosnku: dwusiarczek dialliu (1421 $\mu\text{g/g}$) i trisiarczek di-2-propenylowy (8029 $\mu\text{g/g}$); allicyny nie stwierdzono (substancja o dużym stopniu labilności),
- kurkuma, główne kurkuminy: kurkumina (136,3 mg/g), desmetoksykurkumina (74,4 mg/g) oraz bisdesmetoksykurkumina (35,9 mg/g),
- oregano, główne związki lotne: karwakrol (110,5 mg/g), tymol (73,0 mg/g) oraz p- cymen (0,225 mg/g),
- karczoch: kwas chlorogenowy (25,1 mg/g) oraz cynaryna (5,1 mg/g).

Analiza materiału biologicznego zgromadzonego w doświadczeniu

Przeprowadzono analizę struktury śluzówki jelita cienkiego na odcinku pobranym w 35. dniu życia kurcząt na wysokości jelita biodrowego, przy zastosowaniu standardowego barwienia z użyciem eozyny i hematoksyliny. Wyniki analizy histologicznej przedstawiono w tabeli 3. Zastosowane dodatki paszowe wpłynęły w różny sposób na strukturę śluzówki jelita biodrowego. Ostropest spowodował istotne pogrubienie warstwy mięśniowej względem wszystkich testowanych dodatków paszowych i grup kontrolnych. Zastosowanie dodatku karczocha lub ostryżu w mieszankach paszowych z monenzyną wpłynęło na skrócenie kosmków jelitowych, wyniki uzyskane w tych grupach były istotnie niższe w porównaniu do grupy otrzymującej oregano i grupy kontrolnej pozytywnej. Szerokość kosmków zwiększyła się pod wpływem monenzyny stosowanej samodzielnie lub łącznie z ostryżem długim, a wyniki uzyskane w tych grupach różniły się istotnie w porównaniu do grupy kontrolnej negatywnej. Ponadto, stwierdzono istotny wpływ

ostropestu na zwężenie kosmków jelitowych. Pomimo braku różnic istotnych statystycznie, stosunek VH/CD wzrósł najbardziej w przypadku oregano, co sugeruje jego korzystny wpływ na strukturę jelita, natomiast karczoch wpłynął na jego obniżenie, co może wskazywać na mniej efektywną organizację struktury śluzówki. Co istotne, poza szerokością kosmków, nie stwierdzono różnic pomiędzy kontrolą negatywną a pozytywną, jedynie zastosowanie dodatków ziółowych modulowało parametry struktury jelita.

Tabela 3. Wpływ dodatków paszowych na strukturę śluzówki jelita biodrowego.

Grupa	Dodatek	Grubość błony śluzowej	Grubość warstwy mięśniowej	Długość kosmków (VH)	Szerokość kosmków	Głębokość krypt (CD)	Szerokość krypt	VH/CD
1	M-	790	234 b	679 ab	82,3 bc	135,3	39,1	5,41
2	M+	799	227 b	699 a	101,8 a	156,6	39,7	4,74
3	M+Czosnek	767	271 b	661 ab	84,1 bc	139,0	34,1	4,95
4	M+Oregano	799	234 b	684 a	93,7 ab	122,6	35,8	6,02
5	M+Ostropest	705	379 a	607 abc	78,5 c	133,7	30,6	
6	M+Karczoch	626	219 b	533 c	86,3 bc	141,5	34,2	4,06
7	M+Ostryż długi	693	274 b	554 bc	101,9 a	145,8	39,8	4,71
	SEM	19,3	14,6	16,9	2,05	3,58	1,06	0,208

M – brak monenzyny w mieszankach paszowych- kontrola negatywna; M+ - monenzyna stosowana przez cały okres odchowu – kontrola pozytywna; a, b, c – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$

Przeprowadzono analizę parametrów biochemicznych krwi, której wyniki przedstawiona w tabeli 4. Spośród analizowanych wskaźników istotne różnice stwierdzono jedynie w aktywności enzymu aminotransferazy asparaginianowej (ASAT). Najwyższy poziom tego wskaźnika odnotowano w grupie otrzymującej ostropest (570 U/L), co odróżniało ją od grup kontrolnych i pozostałych grup eksperymentalnych. Wynik ten zaskakuje, bowiem ostropest ze względu na zawartość sylimaryny w swoim składzie jest postrzegany od dawna za zioło o działaniu hepatoprotekcyjnym. W pozostałych parametrach, takich jak aminotransferaza alaninowa, lipaza, amylaza, glukoza, białko całkowite, cholesterol oraz triglicerydy, nie stwierdzono istotnych różnic między grupami.

Tabela 4. Wpływ dodatków paszowych na parametry biochemiczne krwi.

Grupa	Dodatek	ALAT [U/L]	ASAT [U/L]	LIPAZA [U/L]	AMYLaza [U/L]	GLUC [mmol/L]	TP [g/dL]	CHOL [mmol/L]	TG [mmol/L]
1	M-	3,86	307 b	17,2	400	10,1	2,29	2,85	0,325
2	M+	4,35	476 ab	17,9	321	10,7	2,75	3,46	0,349
3	M+Czosnek	5,64	413 ab	18,4	368	11,2	2,86	3,68	0,409
4	M+Oregano	4,80	444 ab	18,3	370	11,7	3,07	3,76	0,341
5	M+Ostropest	5,42	570 a	18,3	294	11,4	3,03	3,64	0,423
6	M+Karczoch	4,49	394 b	17,9	326	11,9	2,75	3,52	0,355
7	M+Ostryż długi	3,70	384 b	17,5	355	12,1	2,36	3,05	0,343
	SEM	0,210	21,9	0,191	27,8	0,335	0,083	0,116	0,013

M – brak monenzyny w mieszankach paszowych-kontrola negatywna; M+ – monenzyna stosowana przez cały okres odchowu-kontrola pozytywna; a, b – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$.

Dane zgromadzone w trakcie doświadczenia są w trakcie zestawiania i obróbki statystycznej, a zabezpieczone podczas doświadczenia próbki materiału biologicznego są sukcesywnie poddawane dalszym analizom. Analizowane są takie parametry, jak hormony układu pokarmowego, wskaźniki redoks, a także pozostałości kokcydiostatyku w tkance wątrobowej.

Po uzyskaniu pełnych wyników możliwe będzie sformułowanie ostatecznych wniosków dotyczących wpływu jednoczesnego stosowania ekstraktów ziołowych i jonoforowego kokcydiostatyku paszowego, co odzwierciedla praktykę powszechnie stosowaną na fermach.

W ramach celu dotyczącego wpływu wieku kurcząt brojlerów na standaryzowaną strawność jelitową aminokwasów nasion krajowych odmian bobiku o zróżnicowanej zawartości tanin na podstawie wcześniej zaraportowanych wyników w roku sprawozdawczym przygotowano publikację naukową pt. *The Impact of Broiler Chicken Age on the Standardised Ileal Amino Acid Digestibility of Two Faba Bean (Vicia faba L. var. minor) Cultivars Differing in Their Seed Condensed Tannin Content*. Skupiono się tu na współczynnikach strawności jelitowej (SID) dziewięciu aminokwasów z grupy niezbędnych dla drobiu, obejmującej lizynę (Lys), metioninę (Met), treoninę (Thr), argininę (Arg), izoleucynę (Ile), leucynę (Leu), histydynę (His), walinę (Val) i fenyloalaninę (Phe) oraz na wartości SID uśrednionej dla ogółu tych aminokwasów.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na sformułowanie kilku istotnych dla praktyki wniosków:

1. W oparciu o porównanie różnic w wartości współczynników SID, można oczekiwać znacznie lepszego wykorzystania aminokwasów z białka surowych nasion bobiku (zarówno odmiany niskotaninowej, jak i wysokotaninowej), przez kurczęta brojlery w wieku 20 i 30 dni, niż przez młodsze ptaki.
2. W porównaniu z odmianą wysokotaninową, nasiona bobiku niskotaninowego są bogatszym źródłem strawnych aminokwasów, zwłaszcza metioniny, lizyny, treoniny, waliny i leucyny, dla 10- i 20-dniowych kurcząt brojlerów.
3. Z wyjątkiem argininy i metioniny, u kurcząt w wieku 30 dni standaryzowana strawność jelitowa niezbędnych aminokwasów nasion bobiku niskotaninowego i wysokotaninowego nie różni się znacząco.
4. U kurcząt brojlerów w wieku 10 i 20 dni, dobrej jakości poekstrakcyjna śruta sojowa cechuje się zdecydowanie wyższą jelitową strawnością niezbędnych aminokwasów niż surowe (nieprzetworzone) nasiona bobiku obu testowanych odmian.

Bobik odmiany Bobas. (Fot. 2. W. Szczurek)



Śruta sojowa. (Fot. 3. W. Szczurek)



Zadanie 01-16-09-21

Opracowanie panelu badań kompleksowej oceny właściwości i efektywności czynników żywieniowych z wykorzystaniem testów *in vitro*, w tym hodowli komórkowych i organoidów oraz weryfikacji na poziomie testów na zwierzętach monogastrycznych.

kierownik zadania: prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz

W Polsce, jak i w całej Unii Europejskiej, istnieje potrzeba zwiększenia świadomości i wdrażania zasad 3R (zastępowanie, ograniczenie, udoskonalenie) w badaniach zootechnicznych. Obecnie, wiele badań nad czynnikami żywieniowymi, w tym nad dodatkami paszowymi i ich wpływem na zwierzęta gospodarskie, nadal polega głównie na testach na żywych zwierzętach docelowych, co budzi etyczne i praktyczne obawy.

Często badania te mogą powodować stres lub naruszać dobrostan zwierząt. Od wielu lat toczy się burzliwa dyskusja odnośnie ograniczenia, a nawet zakazania badań na zwierzętach. Jedną z możliwości ograniczenia cierpienia zwierząt oraz zminimalizowania ich udziału w doświadczeniach jest poszukiwanie metod alternatywnych, do których należą różnego rodzaju testy *in vitro*, w tym prowadzone na kulturach komórkowych. Tego rodzaju badania wiążą się jednak z wieloma ograniczeniami, gdyż dwuwymiarowe (2D) systemy oparte na liniach komórkowych nie pozwalają na precyzyjne odzwierciedlenie procesów zachodzących w złożonych układach biologicznych. Z tego powodu poszukuje się bardziej dokładnych i niezawodnych modeli.

Celem zadania jest opracowanie kaskadowej ścieżki badawczej do oceny wpływu dodatków paszowych na zdrowie i produktywność monogastrycznych zwierząt gospodarskich, z założeniem wdrożenia w badaniach żywieniowych większego zakresu wstępnych badań mikrobiologicznych i hodowli komórkowych 2D i 3D – jako pewien standard metodologiczny dający naukowe podstawy do ograniczenia udziału zwierząt w doświadczeniach żywieniowych, przy zachowaniu wiarygodnych wyników. Docelowo, opracowana metodologia przyczyni się do redukcji wykorzystania zwierząt doświadczalnych w badaniach żywieniowych zgodnie z zasadami 3R (zastępowanie, ograniczenie i udoskonalenie).

Zaplanowane badania obejmują szereg działań, od weryfikacji rodzaju i efektywności metod/czynników żywieniowych, które w warunkach krajowych mogą być uznane za korzystne i skuteczne (pod względem prozdrowotnym i przeciwdrobnoustrojowym), poprzez dobór analiz chemicznych, testów skuteczności antybakteryjnej (minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC)), poprzez testy *in vitro* na hodowlach komórek 2D i 3D organoidów jelitowych, a na doświadczeniach z udziałem zwierząt docelowych skończywszy. Jak dotąd, większość badań nad organoidami dotyczyła hodowli uzyskiwanych z komórek mysich bądź ludzkich, jednak brak jest modeli *in vitro* dla zwierząt gospodarskich, co ogranicza nasze obecne możliwości prowadzenia badań żywieniowych u tych gatunków. Istotnym etapem zadania będzie próba rozwiązania problemów modeli hodowli jelitowych organoidów 3D kury, który wciąż wymaga dopracowania, w tym określenia optymalnego środowiska hodowli, istotnie różnego od specyfiki hodowli organoidów ssaczych, a następnie wykorzystanie tego modelu do badania potencjalnych dodatków paszowych. Tego rodzaju badania cechuje oryginalność i innowacyjność, gdyż organoidy zwierząt gospodarskich nie były do tej pory powszechnie stosowane w zootechnicznych badaniach naukowych.

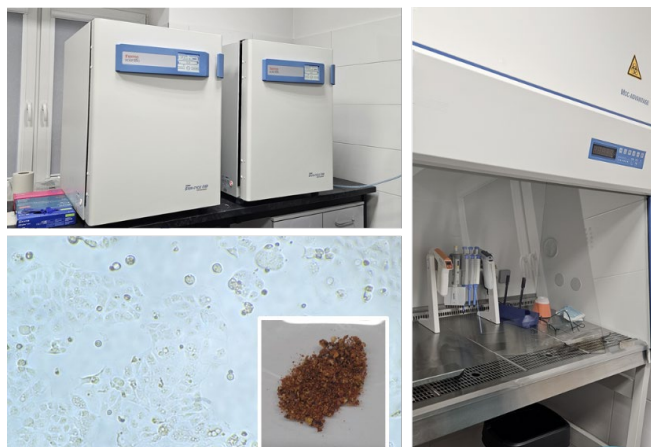
W 2024 roku, który był pierwszym rokiem realizacji zadania, wytypowano kilka gatunków roślin zielarskich o potencjalnie wysokich właściwościach prozdrowotnych, możliwych do wykorzystania jako czynniki doświadczalne do badań żywieniowych.

Wraz z partnerem z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, przeprowadzono rozpoznanie rodzaju i poziomu wiodących substancji bioaktywnych odpowiedzialnych za efektywność ekstraktów ziołowych, jako ewentualnych dodatków paszowych o działaniu prozdrowotnym, antyutleniającym czy przeciwmikrobiologicznym. W tym celu przeprowadzono analizy chemiczne i oznaczono dominujące komponenty biologicznie czynne metodami chromatograficznymi. Dla każdego ekstraktu ziołowego wykonano analizę związków lotnych oraz związków polifenolowych.

W kolejnej części badań skoncentrowano się na ocenie aktywności przeciwutleniającej wytypowanych ekstraktów ziołowych. Badanie właściwości przeciwutleniającej jest istotne, ponieważ pozwala ocenić zdolność ekstraktów do neutralizowania wolnych rodników i ochrony organizmu przed stresem oksydacyjnym. Opracowano zatem zestaw analiz chemicznych, właściwych dla danego rodzaju ekstraktu ziołowego, jego składu chemicznego i zawartości wiodących substancji aktywnych. Ze względu na duże zróżnicowanie gatunkowe i czynnościowe ekstraktów, zdecydowano się określić ich aktywność przeciwutleniającą trzema różnymi metodami: FRAP, DPPH oraz ABTS.

W trzecim etapie realizacji zadania, przeprowadzono ocenę aktywności mikrobiologicznej ekstraktów ziołowych w kierunku redukcji rozwoju bakterii patogennych, m.in. będących przyczyną schorzeń (w tym biegunek) i w konsekwencji stosowania terapii antybiotykowej w produkcji świń i drobiu. Ponadto, oceniono wpływ ekstraktów na bakterie kwasu mlekowego, będące pożądanym elementem mikrobiomu jelit świń i drobiu. W tym etapie prac badawczych opracowano metody określenia aktywności przeciwmikrobiologicznej ekstraktów roślinnych względem wybranych kultur patogennych i probiotycznych mikrobioty jelitowej świń i drobiu. Aktualnie wszystkie otrzymane wyniki badań są opracowywane.

Laboratorium hodowli komórkowych ZZZIP. (Fot. Kinga Szczepanik)



Zadanie 01-16-10-21

Wykorzystanie świni jako modelu w badaniach nad zaburzeniami funkcjonowania bariery jelitowej.

kierownik zadania: prof. dr hab. Marek Pieszka

Celem etapu badawczego była ocena przydatności modelu świni służącego do analizy „przepuszczalności” jelit.

Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach na 18 knurkach i składało się z okresu przygotowawczego polegającego na socjalizacji zwierząt z personelem i oswojenia się z kojcami metabolicznymi (Rycina. 1.).

Prosięta otrzymywały paszę prestarter odsadzeniowy bez dodatku antybiotyków w okresie od 28. do 42. dnia. Natomiast od 43. do 56. dnia zwierzęta otrzymywały mieszankę starter (Tabela 1). Od początku badań, tj. od 28. dnia były podawane z paszą dodatki: grupa I – kontrola bez dodatku, grupa II – suszona siara (*colostrum*) oraz grupa III – maślan sodu. Okres właściwy badań rozpoczął się w 43. dniu. Test absorpcji cukrów i kolekcja moczu wykonano w 48. i 55. dniu życia prosiąt. W 56. dniu zwierzęta zostały uśmiercane metodą standardową. Krew, próbki kału i tkanek zostały pobrane celem dalszych analiz (żołądek część oddźwiernikowa, dwunastnica, jelito czcze część początkowa, środkowa i końcowa, jelito biodrowe, jelito kręte).

Rycina 1. Schemat badań.



Tabela 1. Dawkowanie dodatków paszowych.

Rodzaj dodatku	Dawkowanie preparatów gram/prosię		
	Grupa I (kontrola)	Grupa II (colostrum)	Grupa III (maślan sodu)
Colostrum bydlęce (g)	0	20	0
Maślan sodu (g)	0	0	1,0

W trakcie doświadczenia określano parametry wzrostowe prosiąt m.in. masę ciała, średnie przyrosty dzienne, wykorzystanie paszy (FCR).

Analizy instrumentalne

Test absorpcji cukrów i analizę chromatograficzną zawartości: mannitolu, laktulozy, rafinozy i sacharozy w moczu prosiąt wykonano według metodyki Kubica i wsp. (2012). Morfologię krwi wykonano na analizatorze Mythic 18 (Chiny). Analizę wybranych parametrów biochemicznych surowicy krwi przeprowadzono metodą spektrofotometryczną wykorzystując dedykowane zestawy diagnostyczne firmy PZ Cormay SA, (Warszawa, Polska) postępując zgodnie z instrukcją producenta. Natomiast analizy CRP, IgG, i IgA wykonano za pomocą metody ELISA wykorzystując zestawy diagnostyczne ELISA Kit (BT-Lab, Shanghai, Chiny), pomiarów dokonano na czytniku ELISA-Magellan™ firmy Tecan Trading AG, (Szwajcaria). Aktywność sacharazy, laktazy i maltazy w homogenatach błony śluzowej oznaczono według zmodyfikowanej metody Dahlquist'a (1964), z kolei aktywność aminopeptydaz A i N oraz dipeptydopetydazy IV według zmodyfikowanej metody Maroux i in. (1973). Analizę histologiczną tkanek przewodu pokarmowego wykonano klasycznymi metodami barwienia tkanek wykorzystując eozynę i hematoksylinę. Ocenie zostały poddane parametry, takie jak: wysokość kosmków jelitowych, głębokość krypt, grubość błony śluzowej i mięśniowej, stosunek długości kosmków do głębokości krypt (Bancroft i Gamble, 2002). W badanych próbkach treści jelita grubego oznaczono skład mikrobiomu wykorzystując technikę (NGS – ang. *next-generation sequencing*).

Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną dla parametrów zootechnicznych i fizyko-chemicznych wykonano stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA zastosowano testy *post-hoc* Tukeya z poprawką Bonferroni lub test Kruskal-Wallisa z korektą Dunna, gdy zmienne nie spełniały rozkładu normalnego. Uzyskane dane były analizowane przy użyciu ogólnej procedury modelowania liniowego programu SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Dane wyrażone były jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). We wszystkich analizach wartość $P \leq 0.05$ uznano za statystycznie istotną.

Analizę statystyczną dla mikrobioty jelitowej przeprowadzono przy użyciu oprogramowania statystycznego R (wersja 4.2.2). Metryki różnorodności alfa obliczono po rozrzedzeniu na głębokości 88175 przy użyciu pakietu rtk 0.2.6.1. Obliczone metryki obejmowały wskaźniki Richness, Evenness, Simpsona i Shannona. Aby rozróżnić istotne różnice między grupami, zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Do oceny różnorodności beta metrykę odmienności Braya-Curtisa obliczono z rozrzedzonych danych przy użyciu pakietu vegan (wersja 2.6-4). Różnice między analizowanymi grupami oceniono przy użyciu testu PERMANOVA.

Analiza różnicowej liczebności — rozrzedzone dane dotyczące liczebności poddano transformacji na względne liczebności. Wartości średnie w grupach badawczych porównano przy użyciu testu Kruskala-Wallisa. Wizualizacja wyników została wykonana poprzez wygenerowanie wykresu Manhattan, przedstawiającego skorygowany $-\log_{10}(p.value)$ względem cech. Na wykresie wyróżniono odrębny próg $-\log_{10}(p.value)$ w celu określenia istotności (kolor zielony).

Wyniki badań

Obserwacje dotyczące masy ciała prosiąt oraz pobrania i wykorzystania paszy zostały przedstawione w tabeli 2. Suplementacja diety prosiąt *colostrum* bydlęcym (gr. II.) wykazała istotny wpływ na końcową masę ciała prosiąt w porównaniu do grupy kontrolnej (I.) i grupy III., otrzymującej maślan sodu ($P \leq 0.001$). Stwierdzono także istotne różnice w przyrostach masy ciała prosiąt w okresie od odsadzenia do 56. dnia życia pomiędzy grupą II. a grupą kontrolną i grupą doświadczalną III. ($P \leq 0.001$). Obserwowano istotne różnice pomiędzy wszystkimi grupami zwierząt we wskaźniku wykorzystania paszy FCR, gdzie stwierdzono następujące wartości, odpowiednio: gr. I -2,12; 1,32; 1,83 kg/kg.

Tabela 2. Parametry produkcyjne prosiąt, średnie $\pm$ SD.

Parametry	Wyszczególnienie	Żywieniowa			P-value	SD	SEM
Masa końcowa, kg		12.57 ^{ab}	14.07 ^a	11.97 ^b	0.079	1.702	0.401
Średni przyrost masy ciała, kg	łączy	3.89 ^a	6.14 ^b	4.13 ^a	0.000	1.145	0.270
	dzienny	0.160 ^a	0.256 ^b	0.172 ^a	0.000	0.048	0.011
	do 42. dnia	1.872 ^a	3.032 ^b	1.943 ^a	0.000	0.668	0.157
	dzienny	0.117 ^a	0.189 ^b	0.121 ^a	0.000	0.042	0.010
	43.-56. dzień	2.027 ^a	3.110 ^b	2.183 ^a	0.002	0.657	0.155
Pobranie paszy, kg	dzienny	0.253 ^a	0.389 ^b	0.273 ^a	0.002	0.082	0.019
	prestarter	4.92	4.63	4.43	0.291	0.530	0.125
	grower	3.33	3.50	3.07	0.163	0.397	0.094
FCR, kg/kg masy ciała	razem	8.25	8.13	7.49	0.275	7.956	0.854
	FCR razem	2.128 ^a	1.321 ^b	1.829 ^c	0.000	0.369	0.087
	FCR prestarter	2.690 ^a	1.531 ^b	2.357 ^a	0.000	0.597	0.141
	FCR starter	1.721 ^a	1.129 ^b	1.426 ^{ab}	0.002	0.333	0.078

ADG – przyrosty masy ciała; ADFI – dzienne zużycie paszy; FCR – współczynnik konwersji paszy.

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0.05$.

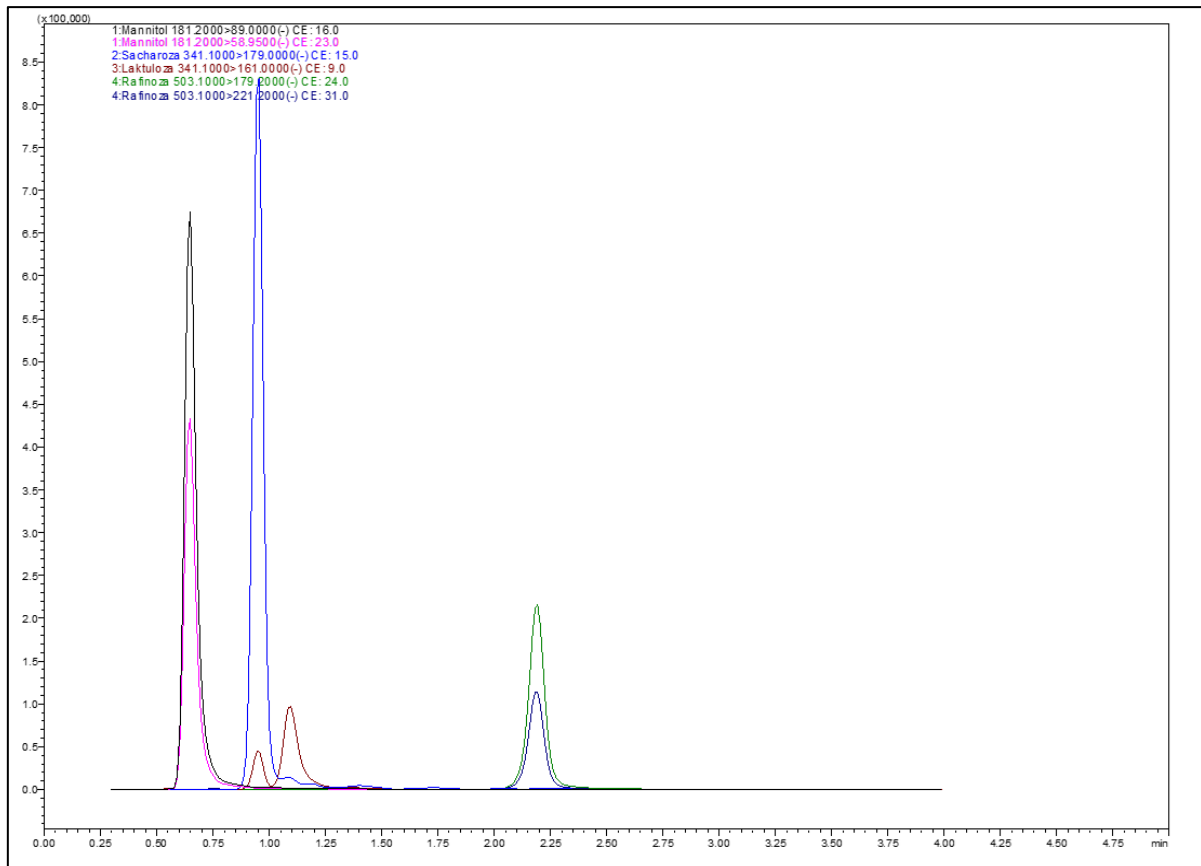
^{A,B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0.01$.

Tabela 3. Wyniki analizy chromatograficznej zawartości mannitolu, laktulozy i sacharozy w moczu świń metodą LC-MS.

Grupa	Mannitol $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	Sacharoza $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	Laktuloza $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	Rafinoza $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$
I	156,37 $\pm$ 9,05A	102,67 $\pm$ 2,77 A	149,13 $\pm$ 3,58 A	112,85 $\pm$ 2,22 A
II	213,50 $\pm$ 8,30B	183,38 $\pm$ 5,68 B	251,43 $\pm$ 6,85 B	199,10 $\pm$ 1,67 B
III	148,51 $\pm$ 6,77A	103,85 $\pm$ 3,93 A	153,23 $\pm$ 5,82 A	110,42 $\pm$ 1,46 A
P	0,001	0,001	0,001	0,001
SEM	17,25	11,26	18,28	12,48

A,B – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0.01$.

Rycina 2. Przykładowy chromatogram analizy zawartości mannitolu, laktulozy, rafinozy i sacharozy w moczu prosiąt metodą LC-MS.



W wyniku przeprowadzonego test absorpcji cukrów, przeanalizowano mocz prosiąt pod kątem zawartości mannitolu, sacharozy, laktulozy i rafinozy metodą LC-MS. Stwierdzono wysokoistotną zawartość wszystkich w/w cukrów w grupie II. otrzymującej dodatek colostrum bydlęcego, w porównaniu do grupy I. (kontrolnej) i grupy III. suplementowanej maślanem sodu ($P \leq 0.01$). W tabeli 4. przedstawiono wyniki pomiarów histometrycznych błony śluzowej dwunastnicy, jelita cienkiego oraz jelita krętego. Suplementacja diety prosiąt colostrum bydlęcym i maślanem sodu nie wpłynęła na długość kosmków jelitowych dwunastnicy, nie spowodowała wzrostu głębokości krypt jelitowych, grubości błony śluzowej, a także grubości błony mięśniowej dwunastnicy – w żadnej z wyodrębnionych grup. Wyniki analiz morfometrycznych środkowego odcinka jelita czczego wszystkich badanych parametrów wykazały istotne zróżnicowanie pomiędzy grupami, m.in. w szerokości kosmków, głębokości krypt jelitowych i grubości błony śluzowej i mięśniowej między grupą kontrolną (I.) a grupami doświadczalnymi ($P \leq 0.05$).

Analiza mikroskopowa pomiarów histometrycznych budowy ściany jelita biodrowego nie wykazała różnic w długości kosmków, głębokości krypt jelitowych i grubości błony śluzowej, natomiast stwierdzono istotnie większą grubość błony mięśniowej między grupami doświadczalnymi II. i III. a grupą kontrolną ($P \leq 0.05$). Grupa III. charakteryzowała się istotnie niższą zawartością włókien kolagenowych w porównaniu do grup I. i II. ($P \leq 0.05$) – Tabela 5.

Tabela 4. Analiza histometryczna błon śluzowych i mięśniowych różnych odcinków przewodu pokarmowego prosiąt w 56. dniu życia (μm).

Wyszczególnienie	Grupa			p-value	SEM
	I	II	III		
dwunastnica					
Długość kosmka	348.63	462.53	564.80	0.168	43.09
Szerokość_kosmka	541.17	617.03	553.78	0.416	24.25
Grubość błony_sluzowej	308.07	319.37	306.02	0.913	13.00
Głębokość_krypty	132.34	126.24	131.43	0.831	4.17
Szerokość_krypty	266.27	341.74	286.36	0.147	16.29
Grubość mięśniówki	39.51	41.07	40.03	0.733	0.78
Stosunek kosmka/krypty	1.271	1.041	1.167	0.624	0.09
jelito czcze					
Długość kosmka	397.64	319.65	419.32	0.194	23.44
Szerokość kosmka	411.43 ^a	570.88 ^b	497.41 ^{ab}	0.004	19.29
Grubość błony śluzowej	286.09 ^a	397.35 ^b	309.56 ^a	0.005	16.26
Głębokość krypty	111.83 ^a	124.23 ^{ab}	125.16 ^b	0.062	2.65
Szerokość krypty	192.27 ^a	225.11 ^{ab}	243.22 ^b	0.074	9.45
Grubość mięśniówki	36.30 ^a	39.55 ^{ab}	41.65 ^b	0.067	0.97
Stosunek kosmka/krypty	1.573 ^{ab}	1.886 ^a	1.34 ^b	0.088	0.10
jelito kręte					
Długość kosmka	454.13	571.24	395.99	0.153	37.54
Szerokość_kosmka	418.88	457.75	471.34	0.448	16.93
Grubość błony_sluzowej	285.90	287.19	286.85	0.999	10.29
Głębokość_krypty	118.21	120.73	125.66	0.692	3.43
Szerokość_krypty	185.27	203.37	233.64	0.181	10.71
Grubość mięśniówki	36.37 ^a	40.93 ^b	41.59 ^b	0.003	0.78
Stosunek kosmka/krypty	1.65	1.475	1.36	0.259	0.07

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0.05$.

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0.05$.

Rycina 3. Przykładowe obrazy mikroskopowe pokazujące przekrój jelita czczego. Sekcje zostały wybrane losowo. (I kontrola, II-colostrum, III-maślan sodu). Barwienie H&E, powiększenie 5-krotne.

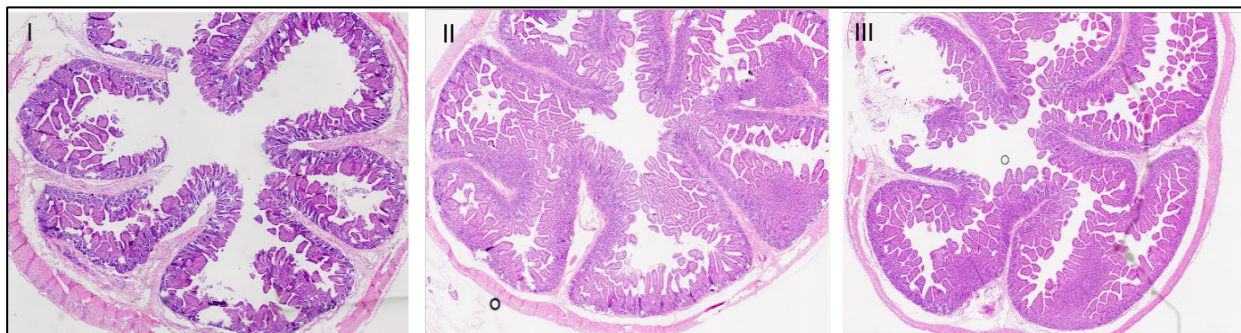


Tabela 5. Zawartość procentowa włókien kolagenowych w jelicie czczym (średnia, $\pm$ SD).

Grupa żywieniowa	% zawartość włókien kolagenowych
I	2,026 $\pm$ 1,05 ^B
II	2,117 $\pm$ 0,94 ^B
III	1,301 $\pm$ 1,03 ^A

A,B- wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0,01$

Tabela 6. Aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt (nM/min/mg białka).

Enzymy	Część jelita	Grupy żywieniowe						SEM	p-wartość
		I	$\pm$ SD	II	$\pm$ SD	III	$\pm$ SD		
Prosięta, szt.		6		6		6			
Sacharaza	Prox	0,45	0,09	0,48	0,10	0,46	0,12	0,11	0,125
	Mid	0,70 ^a	0,11	1,65 ^b	0,09	0,89 ^a	0,11	0,068	0,012
	Dist	0,30	0,01	0,28	0,02	0,26	0,02	0,013	0,298
Laktaza	Prox	10,54 ^a	3,11	20,44 ^b	3,31	11,96 ^a	4,02	2,05	0,042
	Mid	16,54 ^a	1,64	29,282 ^b	1,99	17,11 ^a	1,89	0,98	0,016
	Dist	11,12	2,04	14,90	1,41	10,86	1,16	1,01	0,084
Maltaza	Prox	7,22	1,34	6,84	1,52	7,48	1,68	0,92	0,774
	Mid	4,94	1,18	8,86	1,10	6,91	1,05	0,48	0,016
	Dist	3,02	0,41	4,68	0,48	4,98	0,66	0,32	0,218
Dipeptydaza IV	Prox	1,68	0,55	1,86	0,58	1,81	0,60	0,33	0,116
	Mid	1,64	0,62	2,44	0,70	2,98	0,70	0,22	0,051
	Dist	2,02	0,66	2,56	0,71	2,88	0,71	0,24	0,254
Aminopeptydaza N	Prox	5,52	1,48	6,42	1,58	6,18	1,59	0,66	0,064
	Mid	5,44	1,70	6,00	1,70	6,96	1,69	0,81	0,056
	Dist	6,64	1,66	7,44	1,84	7,36	1,91	0,89	0,099
Aminopeptydaza A	Prox	6,50	1,09	7,35	1,22	7,12	1,08	0,70	0,116
	Mid	4,80	1,07	5,28	1,04	5,68	1,14	0,57	0,296
	Dist	3,84	0,89	4,36	0,92	5,02	1,16	0,41	0,362

Tabela 6. Aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt (nM/min/mg białka).

* jak w tabeli 1.

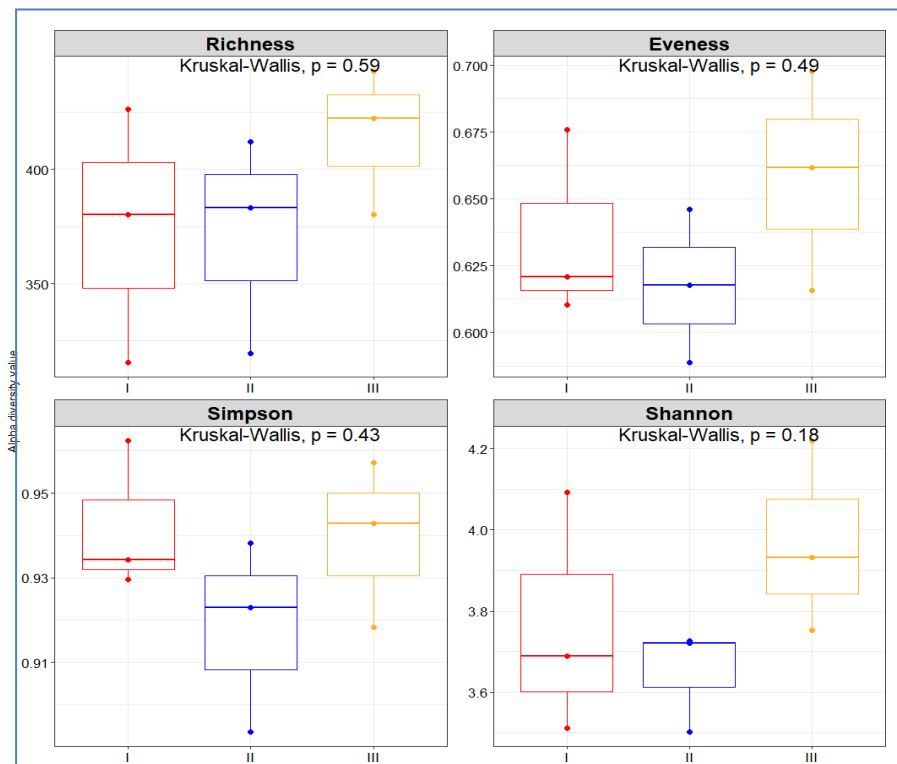
^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0,05$.^{A,B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0,01$.

W tabeli 6. zamieszczono wyniki analizy aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt. Stwierdzono istotny wzrost aktywności laktazy w części początkowej i środkowej jelita czczego w grupie II. w porównaniu do grupy kontrolnej I. i grupy III. – odpowiednio ($P \leq 0,042$ i $P \leq 0,016$). Obserwowano także w grupie II. istotnie wyższą aktywność sacharazy w porównaniu do grupy I. i III. ($P \leq 0,012$).

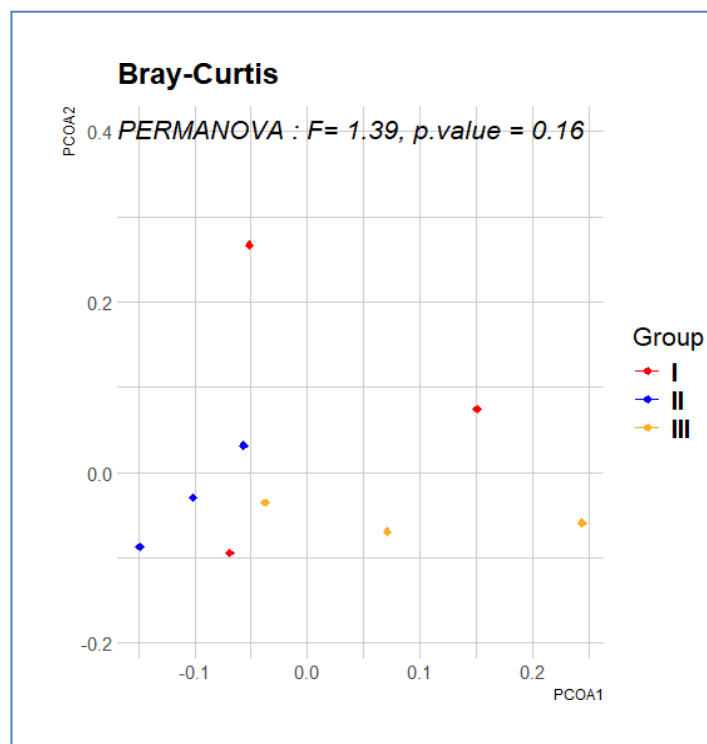
Tabela 7. Zawartość immunoglobulin IgG i IgA oraz białka CRP w surowicy krwi prosiąt w 56. dniu życia (μ g/ml).

Grupa	CRP ng/ml	IgG μ g/ml
I	3,073	76,16
II	3,813	68,13
III	3,629	81,09
P	0,638	0,66
SD	1,343	23,76
SEM	0,317	5,60

Rycina 4. Porównanie zróżnicowania alfa w grupach I., II. i III.



Rycina 5. Analiza współrzędnych głównych (PCoA) odmienności Bray-Curtisa z wynikami PERMANOVA.



Wyniki analizy mikrobiologicznej wykonanej metodą NSG przedstawiono na wykresie 2. i 3. W odniesieniu do różnorodności alfa badanej mikrobioty jelitowej, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w metrykach różnorodności alfa – bogactwie, równości, wskaźnikach Simpsona i Shannona (Rycina 1.) – pomiędzy badanymi grupami (wszystkie $P > 0,05$). Podobnie w odniesieniu do wyników różnorodności beta, pomiędzy grupami nie wykryto znaczących różnic w różnorodności beta, mierzonej za pomocą odmienności Braya-Curtisa (Rycina 2., $P > 0,05$). Analiza liczebności różnicowej średnich wartości cech w grupach nie wykazały znaczących różnic w zróżnicowanej liczebności żadnej cechy, jak pokazano na wykresie Manhattanu, wszystkie $p > 0,05$, $-\log_{10}(0,05) = 1,3$.

Tabela 8. Zawartość wybranych wskaźników biochemicznych w surowicy krwi prosiąt 56 dnia życia.

Grupa	CHOL mg/dL	TG mg/dL	ALB g/dL	TP g/dL	ALT U/L	AST U/L	ALP U/L	GLU mg/dL	CaARS mg/dL	UREA mg/dL
I	77.750	37.255	2.786	4.702	82.292	84.971	290.667	110.750	10.190	3.225
II	77.083	45.548	2.619	3.877	78.108	79.516	349.000	109.833	10.322	3.108
III	62.333	40.268	2.407	3.885	70.183	106.661	269.583	92.750	9.974	2.225
P-value	0.349	0.656	0.732	0.378	0.646	0.686	0.202	0.308	0.925	0.533
SD	20.22	15.09	0.79	1.14	21.70	52.31	78.92	22.33	1.45	1.62
SEM	4.77	3.56	0.19	0.27	5.12	13.08	18.60	5.26	0.34	0.38

* – jak w tabeli 1.

Analiza wybranych wskaźników biochemicznych w surowicy krwi, m.in. przemian węglowodanów, tłuszczów oraz białek, nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami żywieniowymi.

Tabela 9. Analiza hematologiczna krwi prosiąt w 56. dniu życia prosiąt.

Grupy	WBC*	LYM%	MON %	GRA %	LYM	MON	GRA	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDWC	RDWS	PLT	MPV	PCT	PDW	PLCR
I	8.189 ^a	58.619	4.200	37.181	4.736 ^a	0.289 ^a	3.172	5.850	9.739	32.492	59.769	17.964	27.939	17.983	37.264	242.633	7.850	0.163	35.486	13.169
II	10.414 ^{ab}	57.403	4.411	38.208	5.917 ^{ab}	0.403 ^a	4.108	5.690	9.286	33.775	59.647	16.447	27.550	17.864	37.781	166.472	7.794	0.131	39.339	13.558
III	15.222 ^b	57.778	7.086	35.114	8.9889 ^b	1.097 ^b	5.136	6.219	9.900	34.747	58.847	15.978	27.125	18.353	38.453	202.167	7.844	0.159	40.306	12.653
P	0.035	0.922	0.123	0.730	0.039	0.001	0.180	0.669	0.789	0.869	0.853	0.585	0.423	0.707	0.547	0.521	0.963	0.802	0.619	0.899
SD	5.023	5.042	2.737	6.528	3.115	0.461	1.826	0.997	1.518	6.979	2.904	3.321	1.039	1.007	1.801	105.469	0.362	0.086	8.602	3.218
SEM	1.184	1.188	0.645	1.539	0.734	0.109	0.430	0.235	0.358	1.645	0.684	0.783	0.245	0.237	0.424	25.580	0.085	0.020	2.027	0.758

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

** WBC – liczba białych krwinek, RBC – liczba czerwonych krwinek, HGB – ilość hemoglobiny, HCT – hematokryt, MCV – średnia objętość erytrocytów, MCH – zawartość hemoglobiny w erytrocytach, MCHC – stężenie hemoglobiny w erytrocytach, PLT – liczba płytek krwi; RDW to test zawartości czerwonych krwinek we krwi badanego z uwzględnieniem objętości MPV – objętość płytek krwi. Podawanie prosiętom maślanu sodu (grupa II) spowodowało istotny wzrost poziomu białych krwinek (WBC), limfocytów (LYM) i monocytów (MON) w porównaniu do grup I. i III. $P \leq 0$.

Wnioski

1. Opracowana procedura potwierdziła przydatność wykonanego testu do analizy „przepuszczalności” jelit na przykładzie rosnących prosiąt.
2. Zastosowania dodatku do diety prosiąt suszonej siary bydlęcej zwiększa przepuszczalność jelitową i poprawia wchłanianie składników pokarmowych.
3. Zastosowanie dodatku do diety szczególnie maślanu sodu, powoduje pozytywne zmiany w strukturze nabłonka jelitowego jelita czczego.
4. Zastosowanie w diecie prosiąt dodatku siary bydlęcej powoduje istotną poprawę przyrostu masy ciała oraz wykorzystania paszy (FCR) w okresie okołoodsadzeniowym.

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

Zadanie 01-17-05-11

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

kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Transformacja rolnictwa w kierunku zrównoważonego rozwoju stała się jednym z kluczowych priorytetów Unii Europejskiej w ramach strategii Zielonego Ładu (Green Deal).

Nadrzędnym celem tej inicjatywy jest osiągnięcie neutralności klimatycznej do 2050 roku, co wymaga fundamentalnych zmian w sektorze rolnym, obejmujących redukcję emisji gazów cieplarnianych, ochronę bioróżnorodności, zrównoważone gospodarowanie zasobami naturalnymi oraz zwiększenie udziału rolnictwa ekologicznego. Realizacja tych założeń jest szczególnie istotna w gospodarstwach rolnych o zróżnicowanej produkcji zwierzęcej, które znacząco oddziałują na środowisko, zarówno w zakresie emisji metanu i amoniaku, jak i intensywności wykorzystania zasobów takich jak gleba, woda czy energia.

Głównym celem badań była ocena działań i nakładów finansowych skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji zwierzęcej na środowisko w obrębie rodzinnych gospodarstw rolnych. Badania prowadzono w latach 2021-2024. Dane gromadzono w 450 gospodarstwach utrzymujących bydło mleczne (208 gospodarstw), owce (120 gospodarstw) oraz świnie (122 gospodarstw).

Analizowane obiekty położone były w obrębie Polski południowej, północno-wschodniej i północno-zachodniej, ponieważ są to regiony predestynowane do utrzymywania wskazanych gatunków zwierząt gospodarskich. Dane gromadzono bezpośrednio u rolników. W trakcie realizacji omawianego zadania współpracowano z Podkarpackim Ośrodkiem Doradztwa Rolniczego w Boguchwale, Dolnośląskim Ośrodkiem Doradztwa Rolniczego we Wrocławiu oraz Podlaskim Ośrodkiem Doradztwa Rolniczego w Szepietowie.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że większość rolników dostrzega negatywny wpływ rolnictwa na środowisko, szczególnie w kontekście intensywnych metod produkcji. Rozbieżności regionalne wskazują na różne poziomy świadomości ekologicznej i intensyfikacji działalności rolniczej. Przykładem jest województwo podlaskie, gdzie odnotowano wyższą świadomość skutków rolnictwa, podczas gdy w dolnośląskim więcej osób kwestionuje ten wpływ. Producenci rolni, identyfikując główne zagrożenia środowiskowe, wskazują przede wszystkim na erozję gleb, monokultury oraz wypalanie ściernisk. Zagrożenia te są szczególnie odczuwalne w regionach o intensywnym charakterze produkcji, co podkreśla potrzebę wdrażania praktyk rolnictwa regeneracyjnego i ochrony gleby.

Rolnicy w większości oceniają swoją wiedzę na temat zasad Dobrej Praktyki Rolniczej jako dobrą lub bardzo dobrą, co świadczy o pozytywnych efektach edukacji w tym zakresie. Niemniej jednak istnieje potrzeba dalszego wsparcia w regionach, gdzie odsetek osób z wysoką świadomością jest niższy.

Zachęty finansowe stanowią kluczowy czynnik motywujący rolników do wprowadzania ekologicznych praktyk (64,42%), podczas gdy chęć poprawy środowiska jest istotna, ale mniej dominująca (30,77%). Wyniki te wskazują na konieczność dalszego rozwijania programów wsparcia finansowego, szczególnie w kontekście realizacji założeń Zielonego Ładu.

Większość rolników ocenia zagrożenie erozją wodną jako średnie lub małe, co sugeruje umiarkowaną świadomość problemu.

Z kolei erozja wietrzna jest postrzegana jako mniej istotna, choć w regionach o lżejszych glebach, takich jak dolnośląskie, jej znaczenie może być niedoszacowane.

Rolnicy wykazują otwartość na modernizację swoich gospodarstw, szczególnie w zakresie produkcji roślinnej i zwierzęcej. Największe potrzeby dotyczą inwestycji w maszyny i urządzenia (57,69%), zwiększenia powierzchni gospodarstw (42,79%) oraz modernizacji pomieszczeń gospodarskich (38,94%).

W zakresie efektywności energetycznej i redukcji emisji gazów cieplarnianych rolnicy wykazują duże zainteresowanie odnawialnymi źródłami energii, zwłaszcza fotowoltaiką (70,67%). Działania związane z redukcją emisji gazów cieplarnianych i amoniaku koncentrują się głównie na zmniejszeniu nawożenia (43,27%) oraz przestrzeganiu zasad płodozmianu (40,87%), co wskazuje na potencjał dalszego rozwoju w tym zakresie.

Główne bariery rozwoju gospodarstw to wysokie koszty produkcji (62,02%) oraz niskie ceny produktów rolnych (51,44%). Sprzyjającymi czynnikami są natomiast wsparcie unijne (51,44%) oraz dostęp do wiedzy i szkoleń. Brak środków finansowych wciąż ogranicza wielu rolników, co podkreśla konieczność efektywnego wdrażania mechanizmów wsparcia.

Analizując ekoschematy i praktyki prośrodowiskowe, stwierdzono, że największe zainteresowanie budzą działania takie jak wapnowanie gleb (58,17%), przyorywanie obornika (51,92%) oraz międzyplony ozime (46,63%). Wyniki te wskazują na gotowość rolników do implementacji zrównoważonych praktyk, jeśli będą one wspierane finansowo i edukacyjnie.

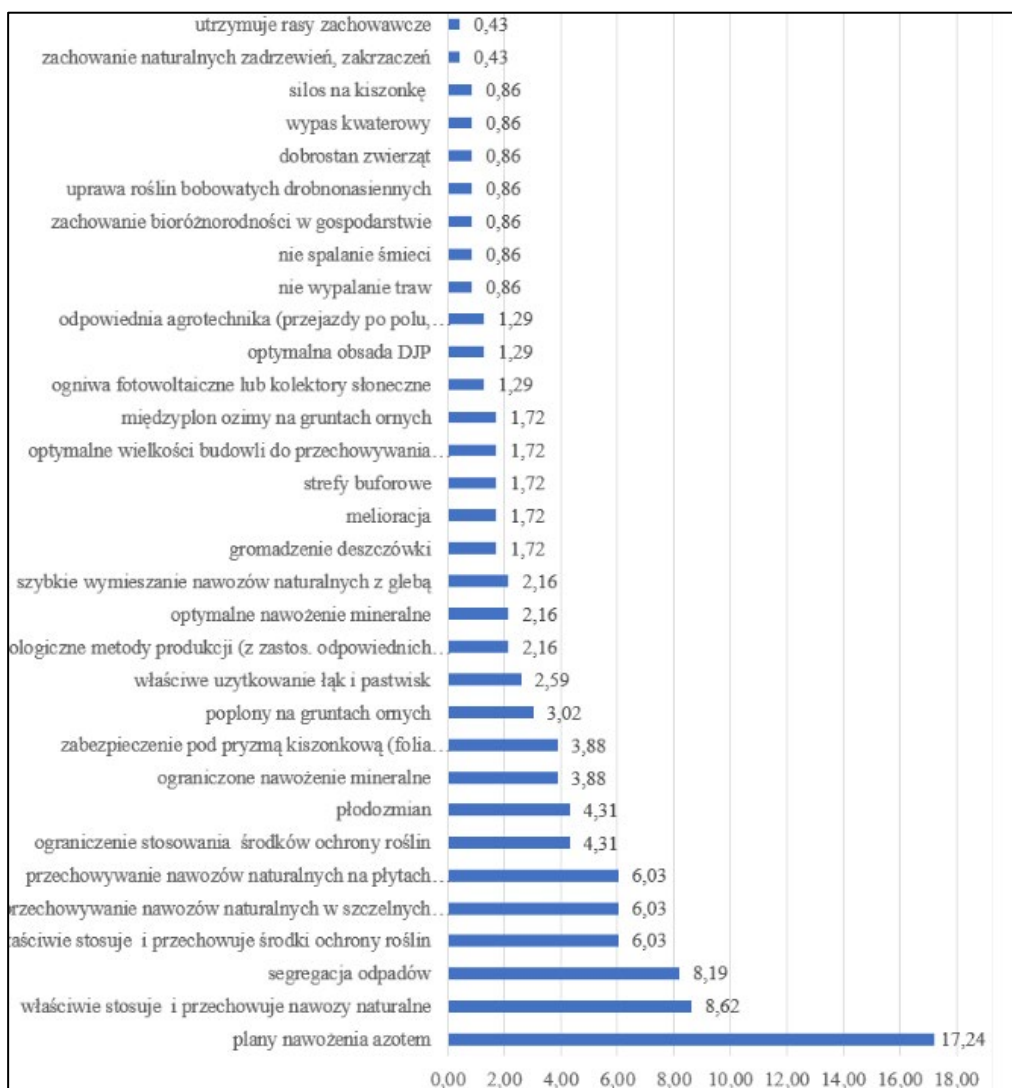
W opinii respondentów zachęty finansowe powinny być kluczowym elementem wdrażania Zielonego Ładu w rolnictwie, szczególnie dla małych i średnich gospodarstw, aby ułatwić adaptację zrównoważonych praktyk w regionach mniej rozwiniętych. Z przeprowadzonej analizy wynika, że strategię Zielonego Ładu muszą być dostosowywane do regionalnych potrzeb, uwzględniając specyfikę gospodarstw w różnych częściach kraju.

Problem podsumowuje wykres 1., który pokazuje zróżnicowane działania rolników na rzecz ochrony środowiska w ich gospodarstwach. Dane procentowe wskazują na różnice w poziomie zaangażowania w poszczególne praktyki. Kluczowe obszary, które dominują, dotyczą racjonalnego nawożenia i zarządzania odpadami. Jednocześnie niektóre działania związane z ochroną bioróżnorodności i utrzymywaniem ekologicznego charakteru gospodarstw są marginalizowane.

Planowanie nawożenia azotowego (17,24%), to najczęściej podejmowana praktyka przez rolników. Świadczy o wysokiej świadomości ekologicznej w zakresie optymalizacji użycia nawozów, co ma kluczowe znaczenie w kontekście ochrony gleby i minimalizacji strat azotu do atmosfery oraz wód gruntowych. Drugie najpopularniejsze działanie, wskazujące na troskę o właściwe przechowywanie nawozów naturalnych (8,62%) w celu uniknięcia ich negatywnego wpływu na glebę i wody gruntowe. Mniej popularną praktyką było np. właściwe stosowanie i przechowywanie środków ochrony roślin (6,03%) czy płodozmian (4,31%).

Sporadycznie odnotowano działania związane z utrzymaniem ras zachowawczych czy uprawą roślin bobowatych drobnonasiennych.

Wykres 1. Działania rolników na rzecz ochrony środowiska naturalnego w gospodarstwach rolnych.



Źródło: badanie własne; E. Sowula-Skrzyńska, Anna Borecka.

Pozyskane dane wskazują również na konieczność zwiększenia inwestycji w Ośrodki Doradztwa Rolniczego oraz szkolenia, szczególnie w zakresie redukcji emisji, ochrony gleby i zrównoważonej produkcji.

Reasumując, implementacja założeń *Zielonego Ładu* w Polsce, wymaga kompleksowego podejścia, które obejmuje finansowanie, edukację i promocję zrównoważonych technologii, aby skutecznie przyczynić się do realizacji celów klimatycznych i środowiskowych Unii Europejskiej.

Zadanie 01-17-07-11

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

kierownik zadania: dr Kamila Musiał

W 2024 roku został wykonany drugi etap badań dotyczących następstw procesów recesywnych w rolnictwie. Kontynuowane zadania obejmowały dalszą analizę danych zebranych w gminach rejonu badań, których celem była m.in. ocena zaawansowania i tendencji w przebiegu dezagraryzacji w odniesieniu do rolniczej przestrzeni produkcyjnej, gospodarowania ziemią rolniczą w aspekcie trwania gospodarstw i zrównoważenia gospodarowania ziemią rolą oraz analogicznie do udziału ziemi znajdującej się w dzierżawie. Przeprowadzone zestawienia, analizy i syntezy oparto o dane źródłowe pochodzące z 84 ankiet, obejmujących 44 gminy znajdujące się w obrębie Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej.

Jest to region specyficzny pod względem zagospodarowania rolniczego, ze względu na położenie pomiędzy dwiema dużymi aglomeracjami miejskimi. W rezultacie przeprowadzonych badań ok. 30% respondentów wskazało, że porzucanie rolniczego użytkowania ziemi na terenie poszczególnych gmin Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej jest zjawiskiem częstym, a kolejne 15,5%, że bardzo częstym. Jednakże różnice pomiędzy badanymi gminami w układzie województw są znaczące. Respondenci ocenili udział porzuconych gruntów ornych (GO) w badanych gminach średnio na 11,5% na obszarze woj. małopolskiego oraz 17,5% w woj. śląskim. Szczegółowa analiza w układzie gmin wskazała na wysoki udział porzuconych GO oraz jednocześnie na występowanie wzrastającego problemu ich zakrzaczenia, na drodze zaawansowanej sukcesji wtórnej roślinności w następujących gminach woj. śląskiego: Żarki (36%), Włodowice (34%) oraz Poczesna (32%). W analizowanej części obszaru obejmującej woj. małopolskie, nie stwierdzono w żadnej gminie wskaźnika porzucania użytkowania gruntów ornych, który oceniono jako bardzo wysoki (>30%). W licznych gminach z tego obszaru oszacowano natomiast wysoki udział porzuconych GO, dla którego najwyższe wskaźniki zanotowano w gminach: Alwernia (30%), Chrzanów i Bukowno (po 28%).

Pod wieloma względami podobnie przedstawia się problem nieużytkowanych w poszczególnych gminach trwałych użytków zielonych (TUZ), w tym także częściowo porośniętych roślinnością krzewiastą. Analogiczne uśrednione wskaźniki procentowe, wynoszą tutaj 11,0% dla gmin małopolskich oraz 23,3% dla gmin położonych na obszarze woj. śląskiego. Różnice polegają jednak na tym, że na terenie województwa śląskiego wyszacowano większą liczbę gmin z bardzo wysokim wskaźnikiem porzucania użytkowania TUZ niż GO. Z kolei innym problemem często spotykanym w realiach gmin południowej Polski, w których liczba i obsada zwierząt towarowych jest zbyt niska w stosunku do dostępnej tam bazy paszowej, jaką stanowią zbiorowiska łąkowe i pastwiskowe jest skrajna ekstensyfikacja ich użytkowania. Przy braku inwentarza duża część rolników wykasza znajdujące się w ich posiadaniu trwałe użytki zielone jedynie w celu pozyskania należnej wówczas płatności bezpośredniej obszarowej. Respondenci wykazali, że w badanych gminach średnio 34,9% TUZ jest wykaszanych jedynie w celu uzyskania wsparcia finansowego, w ramach płatności pochodzących z WPR. Różnice w tym zakresie pomiędzy gminami małopolskimi i śląskimi nie są zbyt duże, gdyż wskaźniki te wynoszą odpowiednio 36,1% oraz 33,7%. Jednakże w części gmin regionu śląskiego, które są określane jako zdecydowanie bezinwentarzowe, udział ten jest dominujący, a nawet zadziwiająco wysoki. Przykładowo w gminach Kamienica Polska i Olsztyn wartości te stanowią 70% wszystkich użytkowanych TUZ.

Kolejnym aspektem prowadzonych badań było określenie jaki jest udział gospodarstw, które pomimo że formalnie istnieją, a zatem np. opłacają podatek rolny i składają do ARiMR wnioski o płatności obszarowe, w rzeczywistości nie prowadzi samodzielnie produkcji rolnej.

Jednocześnie ziemia rolnicza, która jest w ich posiadaniu jest faktycznie użytkowana przez kogoś innego, np. przez sąsiadów którzy nadal prowadzą czynne gospodarstwa rolne. Z wykonanych analiz wynika, że taki status można wskazać w ponad 25% wszystkich gospodarstw znajdujących się w regionie badań. W tym lokalni eksperci wyszacowali, że udział formalnie istniejących gospodarstw, które porzuciły produkcję w obrębie gmin śląskich wynosi ok. 30,5%, natomiast w obrębie woj. małopolskiego wskaźniki te określone były na 22,5%. Dla poszczególnych gmin w województwie śląskim bardzo wysoki udział podmiotów rolnych istniejących tylko formalnie oszacowano dla gmin: Żarki (75%), Włodowice (70%) oraz Kamienica Polska, Sławków i Myszków (po 55% w każdej). Dla woj. małopolskiego najwięcej takich gospodarstw lokalni eksperci wyszacowali w gminach Libiąż (65%) oraz Bukowno (60%). Ofert dzierżawy ziemi na rynkach lokalnych tego regionu jest niewiele, a 70,9% wskazań respondentów potwierdza, że możliwość wydzierżawienia ziemi rolniczej jest po prostu mała. Jako śladowe możliwości czy też szanse na wydzierżawienie nowej ziemi w woj. małopolskim wskazało 14,3% respondentów, natomiast dla subregionu śląskiego było to 13,0% badanych pod tym kątem lokalnych ekspertów.

Badania wskazują, że średnio 38,5% transakcji obrotu ziemią stanowią w istocie jej sąsiedzkie użyczenia, przy czym w gminach śląskich jest to aż 43,5%. Jednakże ziemia, która jest oddana w dzierżawę lub w użyczenie, stanowi pewną zamkniętą pulę ilościową gruntów, które już znajdują się w użytkowaniu zależnym.

Zadanie 01-17-08-11

Analiza ekoefektywności produkcji w gospodarstwach utrzymujących zwierzęta gospodarskie.

kierownik zadania: dr inż. Anna Borecka

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

Cel realizowany jest poprzez oszacowanie:

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

Zakres realizowanych badań:

- przeprowadzenie badań w 75 gospodarstwach utrzymujących bydło, świnie oraz drób,
- gromadzenie danych ww. obiektach o produkcyjności, kosztach i przychodach,
- gromadzenie informacji o obciążeniu środowiska naturalnego przez poszczególne obiekty w oparciu o przygotowany wcześniej dedykowany kwestionariusz ankiety celem oszacowania wpływu produkcji zwierzęcej na środowisko w ujęciu kosztowym.

Kwestionariusz ankiety dla poszczególnych działalności miał za zadanie dostarczyć informacji z zakresu: obsady i stanu średniorocznego zwierząt gospodarskich w każdym z gospodarstw, powierzchni gruntów ornych, udziału trwałych użytków zielonych w powierzchni użytków rolnych, udziału zbóż w zasiewach, średnich plonów poszczególnych roślin uprawnych, pokrycia gleby roślinnością w ciągu roku, skali produkcji oraz towarowości produkcji poszczególnych gospodarstw, przychodów uzyskiwanych przez gospodarstwa, zużycia energii elektrycznej i innych nośników energii w gospodarstwie rolnym, zużycia paliw, zużycia nawozów naturalnych, zużycia nawozów mineralnych oraz środków ochrony roślin, wartości pieniężnej wydatków na nawozy azotowe, fosforowe i wieloskładnikowe, zużycia wody w gospodarstwie, wysokości nakładów poniesionych na ochronę środowiska w poszczególnych obiektach oraz informacji szczegółowych o organizacji produkcji zwierzęcej.

Syntetyczny opis wyników zadania

Najliczniejszą grupę w strukturze badanej zbiorowości gospodarstw stanowiły obiekty utrzymujące bydło mleczne (45) oraz świnie (20). Najmniej liczną częścią próby badawczej były gospodarstwa z drobiem kurzym (10). Wybrane do badań gospodarstwa zlokalizowane były w województwie podlaskim oraz podkarpackim. Podstawowe informacje o objętej badaniami próbie gospodarstw w podziale według specjalizacji zostały zamieszczone w tabeli 1.

Tabela 1. Podstawowe informacje o gospodarstwach objętych badaniami.

Wyszczególnienie	Średnio razem	Gospodarstwa z bydłem	Gospodarstwa ze świniami	Gospodarstwa z drobiem
Liczba gospodarstw(szt.)	75	45	20	10
Okres prowadzenia gospodarstwa rolnego (lata)	22,4	26,5	19,5	23,1
FWU*	1,96	2,03	1,89	1,93
AWU**	2,02	2,05	1,93	1,98
Użytki rolne (ha)	31,7	32,3	29,1	20,5
Wskaźnik bioróżnorodności (pkt.)	4,1	4,9	4,4	3,1
Procentowy udział zbóż w zasiewach (%)	62,4	61,5	64,8	52,9
Zużycie nawozów azotowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1ha UR	87,0	89,2	95,4	63,8
Zużycie nawozów fosforowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1ha UR	27,0	28,7	20,6	36,3
Zużycie naw. potasowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1ha UR	34,6	51,0	31,1	29,6
Zużycie nawozów wapniowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1ha UR	81,8	80,3	85,8	77,5
Ziemia własna w użytkowaniu (%)	92,5	98,5	100,0	85,1
DJP w gospodarstwie	-	39,9	19,6	65,6

Źródło: badania własne

*FWU – Family Work Unit, **AWU – Annual Work Unit

Jednym z czynników determinujących specjalizację gospodarstwa rolnego jest powierzchnia użytków rolnych jaką dysponują gospodarstwa. W każdej z wydzielonych grup gospodarstw zaobserwowano duże zróżnicowanie obszarowe. Średnia powierzchnia użytków rolnych była

większa niż średnia krajowa. Średnia wielkość powierzchni UR w gospodarstwie wyniosła 31,7 ha i była wynikiem blisko trzykrotnie wyższym w porównaniu ze średnią krajową (11,3 ha).

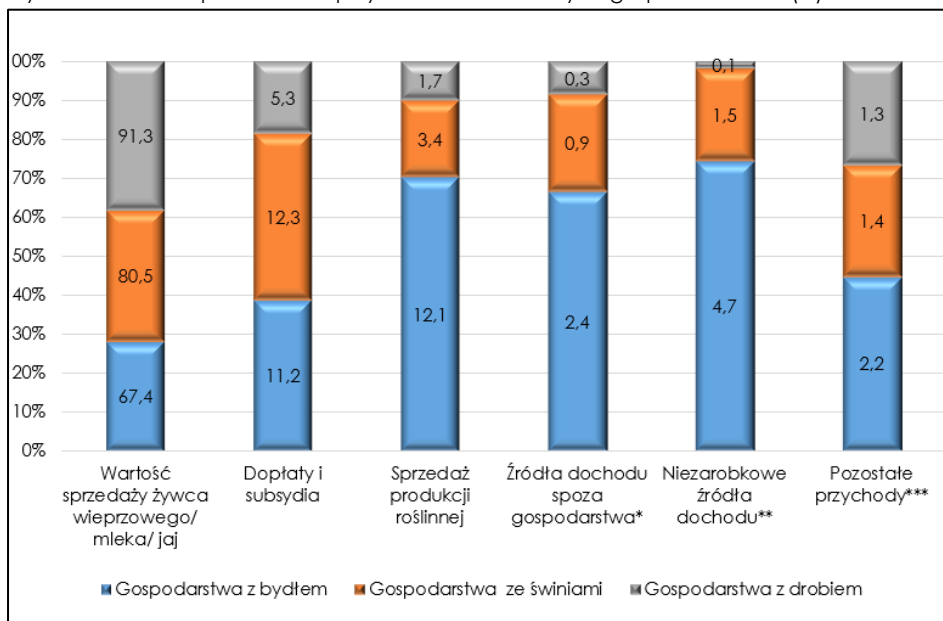
Powierzchnia użytków rolnych (UR) w analizowanej grupie 75 gospodarstw wynosiła od 3,7 do 68,0 ha. Największe gospodarstwa występowały w grupie gospodarstw utrzymujących bydło (średnio – ponad 32 ha) natomiast mniejsze w utrzymujące drób (średnio – 20,5 ha).

Poprawność zmianowania roślin oraz stopień bioróżnorodności biocenozy uprawnej determinowana jest przez udział zbóż w strukturze zasiewów. Należy unikać większego ich udziału w strukturze zasiewów niż 66%. Najkorzystniejszy udział zbóż w zasiewach występował w gospodarstwach jednokierunkowych z drobiem (ok.53%) (Tabela.1). Niewielki odsetek trwałych użytków zielonych (3,4%) w strukturze użytkowania gruntów i uproszczone zmianowanie złożone z roślin towarowych wykazywały gospodarstwa z drobiem. Schemat ten ma zdecydowanie negatywny wpływ na różnorodność biologiczną. Ważnym czynnikiem mającym wpływ na środowisko naturalne jest ilość aplikowanych nawozów w gospodarstwie. W gospodarstwach z bydłem w 82,2% obiektach stosowano nawozy mineralne, w przypadku gospodarstw utrzymujących świnie było to 85%, a w gospodarstwach z drobiem 80%. Średnio wszystkie gospodarstwa w poszczególnych specjalizacjach zużywały więcej nawozów mineralnych i wapniowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1ha UR w porównaniu ze średnią krajową jaką podaje GUS.

Stosowane dawki nawozów azotowych przekładają się na wielkość emisji gazów cieplarnianych. Średnie ich zużycie w badanej grupie gospodarstw było wyższe o ponad 23% od średniej krajowej wynoszącej w roku gospodarczym 2022/2023 – 70,7kg/1ha UR. Jedynie w gospodarstwach utrzymujących drób było ono średnio niższe (Tabela 1.).

Przychody ogółem w przypadku gospodarstw z drobiem kształtowała wartość produkcji drobiarskiej, która stanowiła ponad 91%. Wysokość płatności w przychodach odnotowano na najwyższym poziomie w gospodarstwach utrzymujących świnie (12,3%), a na najniższym w gospodarstwach z drobiem nieśnym. W przypadku gospodarstw z bydłem w strukturze przychodów dominowała również sprzedaż produkcji roślinnej (Wykres 1.).

Wykres 1. Struktura procentowa przychodów w badanych gospodarstwach (%).



Źródło: badania własne

* praca zarobkowa, wynagrodzenie nieletnich, wynajem maszyn i urządzeń, usługi rolnicze.

**renta, emerytura, zasiłki celowe, 500+, świadczenia społeczno-socjalne.

***zwrot podatku VAT, zwrot podatku akcyzowego, przychody z tytułu posiadanych udziałów w spółdzielni.

We wszystkich gospodarstwach najwyższy udział w strukturze kosztów bezpośrednich stanowiły koszty pasz. W gospodarstwach produkujących na większą skalę koszty pasz pochodzących z zakupu stanowiły ok. 46% w strukturze całkowitych kosztów bezpośrednich. Wyliczona została również wysokość kosztów produkcji, którą odnotowano na poziomie 6 080 zł w przeliczeniu na krowę, 8 297 zł/lochę oraz 42,30 zł na 100 jaj (Tabela 2.).

Tabela 2. Koszty produkcji w badanych gospodarstwach (zł).

Wyszczególnienie	Gospodarstwa z bydłem (zł/krowę)	Gospodarstwa ze świniami (zł/lochę)	Gospodarstwa z drobiem (zł/100 jaj)
Koszty bezpośrednie	4 920,3	5 547,2	32,8
Koszty pośrednie	1 159,3	2 749,3	9,5
Koszty całkowite	6 079,6	8 296,5	42,3

Źródło: obliczenia własne

Najwyższy udział w strukturze kosztów „środowiskowych” ponoszonych w gospodarstwach specjalizujących się w produkcji zwierzęcej miały koszty paliw. W obiektach wyspecjalizowanych w produkcji mleka stanowiły one ponad 35% „kosztów środowiskowych”, ogółem wynosząc średnio na obiekt 30 008,80 zł. W gospodarstwach ze świniami stanowiły odpowiednio 30,3% i 26 355,70 zł (Rysunek 1.).

Wpływ badanych gospodarstw na środowisko oceniono na podstawie analizy kosztów nawozów i środków ochrony roślin oraz ilości zastosowanych nawozów azotowych, fosforowych oraz potasowych w odniesieniu do 1 ha UR. Najwyższe koszty nawozów oraz środków ochrony roślin w przeliczeniu na 1 ha UR poniosły średnio gospodarstwa utrzymujące świnie (11 68,40 zł/ha) a najniższe z drobiem (577,83 zł/ha). W przypadku produkcji drobiarskiej najwyższe koszty ponoszono na energię elektryczną i inne nośniki energii oraz na wodę do produkcji rolnej.

Zadanie 01-17-09-11

Ocena efektywności metod mitygacji GHG w pastwiskowym utrzymaniu małych przeżuwaczy.

kierownik zadania: dr Wojciech Krawczyk

Doświadczenie w realizowanym zadaniu zostało przeprowadzone na 40 sztukach owiec maciorek rasy suffolk i owca pomorska, przy równym udziale zwierząt każdej rasy. Zostały one wybrane na zasadzie analogów – zbliżony wiek (druga lub ew. trzecia laktacja), masa ciała i kondycja. Zwierzęta pierwszej z grup – alkierzowej (A; 10 sztuk – suffolk, 10 sztuk – owca pomorska) przebywały całodobowo w owczarni, z dostępem do okólnika. Żywienie ich odbywało się z udziałem pasz objętościowych konserwowanych oraz mieszanki treściwej, bez suplementacji zielonką pastwiskową, zgodnie ze standardami wynikającymi z aktualnych norm Żywienia IZ INRA. Zwierzęta drugiej grupy – pastwiskowej (P; 10 sztuk – suffolk, 10 sztuk – owca pomorska) w miesiącach maj – październik (180 dni) przebywały 10-12 godzin na pastwiskach o dominującym udziale runi życicowej, w systemie wypasu kwaterowego (6 kwater, rotacja 24-dniowa), a zielonka pastwiskowa stanowiła podstawę ich żywienia (z suplementacją paszą treściwą, zgodnie z normami Żywienia IZ INRA). Poza sezonem pastwiskowym oraz w okresie nocnym zwierzęta były zlokalizowane w budynku owczarni. W początkowej fazie realizacji zadania sporządzono stacjonarną instalację doświadczalną.

W budynku owczarni stanowią ją trzy komplety przewodów ciśnieniowych mocowanych podkalenicowo (pobór zbiorczych prób), z punktem pomiarowym dostępnym z poziomu podłogi owczarni. Na potrzeby obiektów pastwiskowych opracowano sondy do szacowania emisji CH₄ w wydychanym przez zwierzęta powietrzu. W obydwu lokalizacjach instalacja została uzupełniona o rejestratory mikroklimatyczne.

Podczas realizacji doświadczenia zgromadzono dane pomiarowe dotyczące mikroklimatu pastwisk oraz budynku owczarni (parametry tła: temperatura, wilgotność względna oraz ruch powietrza), realizowane przy użyciu elektronicznych mierników mikroklimatycznych: DeltaOHM HD37, Logger S3121 (zapis ciągły) oraz Testoterm, mod. Testo 9610.

Pomiar emisji gazowych GHG i amoniaku, w tym najważniejszego z nich u przeżuwaczy, metanu, zrealizowano z wykorzystaniem aparatury Gasmel GT5000 Terra i Tiger Optics i-2000, stężenie gazów towarzyszących określono z wykorzystaniem elektronicznego miernika gazów Multiwarn II firmy Dräger, Gasmel GT5000 Terra oraz Horiba APNA-370.

Wyniki przeprowadzonych w 2024 roku badań wskazują, iż parametry mikroklimatyczne objętego doświadczeniem pomieszczenia owczarskiego oraz stwierdzone stężenie domieszek gazowych we wszystkich przeprowadzonych pomiarach, choć zróżnicowane, kształtowały się na korzystnym poziomie.

Stężenie amoniaku było zmienne w zależności od terminu pomiaru i w owczarni wyniosło 1-4 ppm (najwyższe wartości występujące sporadycznie), nie wykazując równocześnie jakiegokolwiek zaznaczonej tendencji. W obiekcie pastwiskowym, w większości pomiarów nie stwierdzono jego obecności, a najwyższa zmierzona wartość wyniosła 1 ppm (Tabela 2.).

Wartości NO_x zmierzone na pastwisku – około 1 ppb – były kilkakrotnie niższe od ustalonych w owczarni, gdzie uzyskiwały najwyższy poziom 9,6 ppb, przy czym udział NO był zazwyczaj co najmniej 2-krotnie wyższy od stężenia NO₂. Pomiary udziału związków azotu w alkierzu i na pastwisku odznaczyły się największą zmiennością, nie wykazując przy tym żadnej zaznaczonej tendencji.

Pomiarów emisji żwaczowej u owiec przebywających zarówno na pastwisku, jak i w alkierzu, dokonywano w przepędach, gdzie zwierzęta były unieruchomione podczas rejestracji. Każda seria pomiarów realizowana była w interwałach dwugodzinnych tak, aby zarejestrować całodobowy, zmienny przebieg emisji gazu, poczynając od najwyższego jego udziału w wydychanym powietrzu – szczytowa aktywność żwaczowa, aż do najniższych jego stężeń – kolejne oraz końcowe etapy trawienia, okres przed podaniem paszy/ przed wypasem. Każdy z pomiarów dla grupy pastwiskowej i alkierzowej był przeprowadzony w jak najbardziej zbliżonych warunkach mikroklimatycznych i przy najmniejszym ruchu powietrza.

Uzyskane podczas sezonu pastwiskowego wyniki wskazują na duże zróżnicowanie emisji metanu pomiędzy grupą przebywającą na pastwisku a zwierzętami utrzymywanymi alkierzowo (Tabela 1.).

Tabela 1. Emisja metanu od owiec podczas okresu pastwiskowego (kg/szt./60 dni).

Okres (mies.)	Wariant	
	Pastwisko	Alkierz
V-VI	3,9	3,2
VII-VIII	4,3	2,9
IX-X	4,6	3,0

Podczas sezonu pastwiskowego dystans ten uległ stopniowemu powiększeniu. Podczas, gdy emisja żwaczowa grupy A wykazywała względną stabilność w tej cesze, odnotowano wyraźną tendencję wzrostową u zwierząt żywionych zielonką w ujęciu emisyjności w następujących po sobie dwumiesięcznych okresach trwania sezonu pastwiskowego.

Początkowo wartości emisji były najniższe, a następnie wykazywały konsekwentną tendencję wzrostową. Jej przyczyną był postępujący wzrost udziału włókna w zielonce w miarę upływu sezonu wegetacyjnego runi, przy równoczesnym obniżaniu się jej strawności, co powodowało dłuższe zaleganie paszy w przedżołądku i intensyfikację procesów metanogenezy. Z tego powodu cały proces trawienia uległ również znaczącemu wydłużeniu.

Tabela 2. Całkowita emisja metanu podczas okresu pastwiskowania owiec (kg/ szt./80 dni).

Cecha	Wariant	
	Pastwisko	Alkierz
Całkowita emisja	12,8	9,1
Względna zmiana emisji metanu (%)	+40,7	0

Niemniej jednak, we wszystkich okresach sezonu pastwiskowego uzyskane wartości emisji metanu były znacząco wyższe od ustalonych dla owiec przebywających w alkierzu (Tabela 1.), co miało swe bezpośrednie przełożenie na wolumen produkcji tego gazu, podczas całego omawianego półrocznego okresu. Wartości te były o ponad 40% wyższe w grupie spásającej zielonkę pastwiskową (Tabela 2.).

Roczna emisja metanu jest powszechnie uznawana za podstawowy wskaźnik wykorzystywany w kontekście szacunków uciążliwości dla środowiska oraz przy realizacji celów redukcyjnych, natomiast sposób żywienia zwierząt, a pośrednio i system utrzymania mają istotny wpływ na wolumen emisji żwaczowej.

Tabela 3. Porównanie rocznej emisji metanu od owiec utrzymywanych pastwiskowo i alkierzowo (kg/szt.).

Cecha	Wariant	
	Pastwisko	Alkierz
Całkowita emisja	21,9	18,2
Względna zmiana emisji metanu (%)	+20,3	0

Wyniki uzyskane dla tej cechy w ujęciu rocznym są zbieżne z prezentowanymi w – decydującym w kontekście całorocznej emisji – okresie wypasu. Dla grupy alkierzowej wyniosły 18,2 kg NH₄/szt., natomiast zwierzęta pastwiskowe podczas roku emitowały do atmosfery o 3,7 kg/szt. wyższą ilość tego gazu (Tabela 3.).

Wartość omawianego wskaźnika pastwiskowej emisji metanu była dwukrotnie wyższa od ustalonej za cały okres trwania omawianego etapu badań (emisja roczna), co wynikało z profilu żywienia zwierząt poza sezonem pastwiskowym, tożsamego z żywieniem grupy utrzymywanej wyłącznie w owczarni.

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

Zadanie 01-18-14-21

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

kierownik zadania: dr inż. Wojciech Witarowski

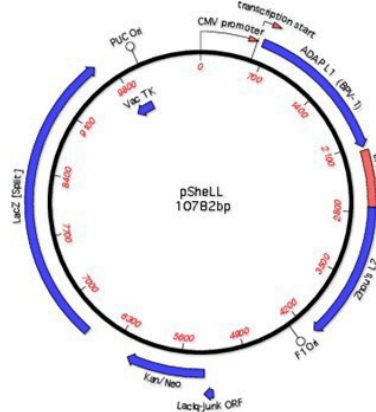
Cel zadania zakładał opracowanie modelu *in vitro* sarkoidu końskiego (neoplazji skóry pochodzenia wirusowego), jako zbliżonego do rzeczywistości, uwzględniającego trójwymiarową strukturę tkanki oraz niedobór ciśnienia parcjalnego tlenu w przestrzeni międzykomórkowej. Celem było pozyskiwanie pierwotnych linii komórkowych, które uzupełniają obecnie posiadaną kolekcję. Zwiększona kolekcja tkanek jest odpowiedzią na różne manifestacje kliniczne choroby i posłuży do określenia zmienności fenotypowej komórek. W ramach prowadzonych analiz opracowano metody trójwymiarowych hodowli symulujących charakter łitego guza wraz z otaczającą go stromą, a także hodowle komórkowe prowadzone w warunkach obniżonej zawartości tlenu.

Założenia metodyczne

Rozszerzono kolekcję pierwotnych linii komórek sarkoidu końskiego, analizując różnice fenotypowe i wydzielnicze między klinicznymi postaciami choroby. Przeprowadzono hodowle trójwymiarowe w warunkach hipoksji, badając tempo wzrostu i charakter kolonii. W późniejszych etapach oceniono wpływ hipoksji na ekspresję genów i wybrane białka. Przeprowadzono także ko-transfekcję komórek HEK293 plazmidami kodującymi białka kapsydu BPV L-1 i L-2, których produkcja miała miejsce na kolejnych etapach projektu. Następnie, białka kapsydu i syntetyczne immunogenne poddano analizie IVCAA, oceniając ich zdolność aktywacji limfocytów T CD4+ i CD8+, mierzoną jako działanie mitogenne i indukcję wydzielania interleukin.

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

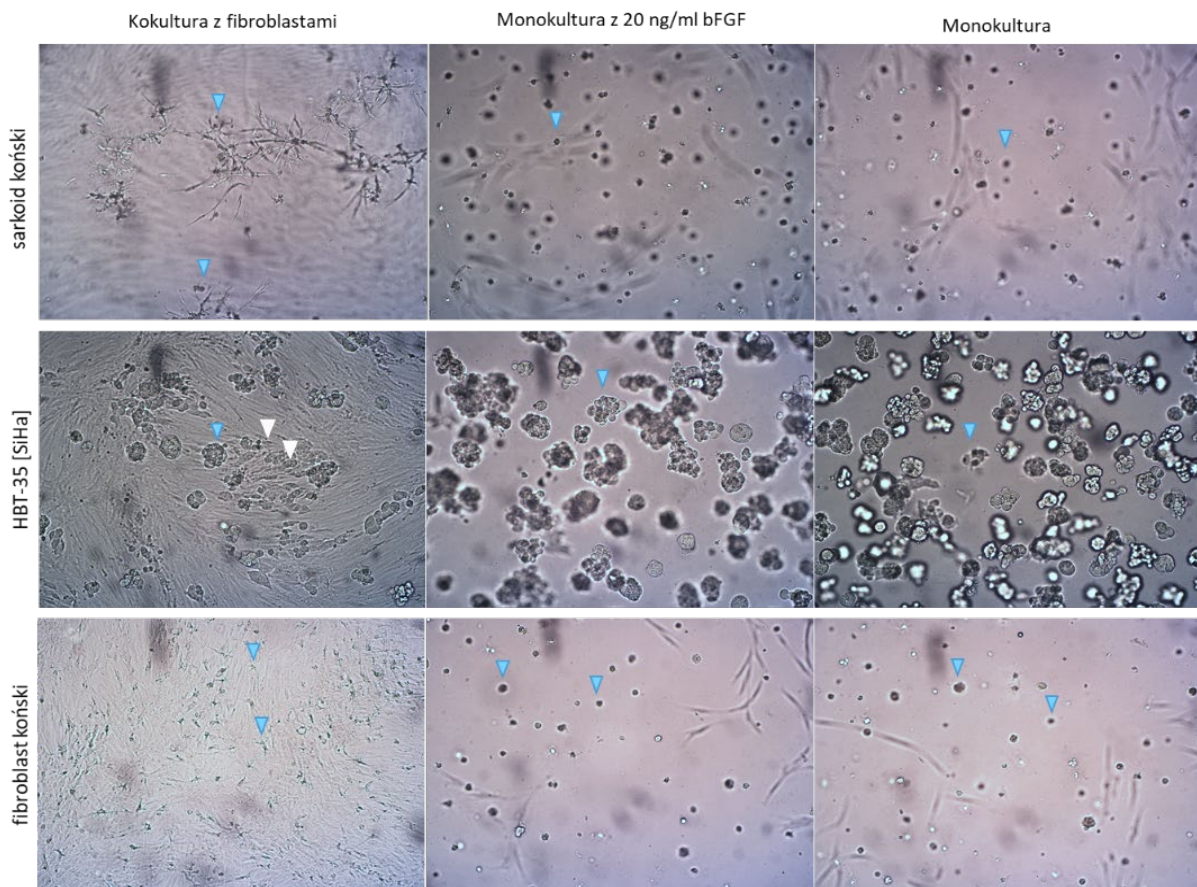
Rycina 1. Sekwencja plazmidu pSHELL wraz z opisem miejsc kodujących.



Syntetyczne omówienie wyników zadania

Badania pozwoliły na uzyskanie pierwotnych linii sarkoidów końskich, dodatkowej linii sarkoidów końskich oraz dwie linie fibroblastów skóry konia. Wszystkie pozyskane linie poddano procesom bio-bankowania komórkowego. 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 ko-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.).

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 fibroblastów.



Na pozyskanym materiale przeprowadzono wysokoprzepustową analizę sekwencjonowania NGS na czterech tkankach zdrowych oraz na ośmiu tkankach sarkoidu końskiego, ułożonego w profilach ekspresji – spodziewanym profilu ekspresji łagodnej neoplazji skóry oraz zbliżonym do tkanek kontrolnych. W skrajnych grupach uzyskano po kilka tysięcy genów podlegających różnicowej ekspresji. Przy porównaniu grupy tkanek sarkoidowych oraz kontrolnych, zbliżonych do siebie profilem ekspresji, uzyskano jedynie 162 DEG. Otrzymane w eksperymencie geny zawiadywały szeregiem szlaków sygnalizacyjnych w organizmie, w tym tych, które odpowiadają za procesy transformacji nowotworowej.

W kolejnym etapie badań, przeprowadzono proces ko-transfekcji komórek HEK293 plazmidami produkującymi białka płaszcza kapsydowego, BPV L-1 oraz L-2, których produkcja, wraz z syntetycznymi immunogennymi białkami, posłużyła analizie IVCAA. Prześledzona została ich zdolność aktywacji, mierzona jako działanie mitogenne. Przy pomocy działania anty-biotyku i uwzględnieniu pozytywnego sygnału działaniem białka fluorescencyjnego przeprowadzono selekcję najodpowiedniejszego klonu. Miano białek wirusa wykonano na lizatach komórkowych przy pomocy testu ELISA, gdzie poziom wirusa mierzono sygnałem aktywności przeciwciała (#PA5-35416, Thermofisher). Analiza IVCAA polegała na poddaniu ekspozycji na białka immunogenne komórek układu odpornościowego wyizolowanych z krwi obwodowej. Mitogenność mierzono jako funkcję aktywności komórek odpornościowych oraz jako zdolności do agregacji komórek. Tempo podziałów mierzono przy pomocy zestawu Celltiterblue firmy Promega, która wykazała pozytywną korelację pomiędzy mianem białek wirusa (lizaty komórkowe), a tempem podziałów komórek odpornościowych. Testy agregacji nie wykazały istotnych różnic między badanymi próbkami.

Zadanie 01-18-16-21

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

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

Celem zadania było określenie polimorfizmu wybranych genów warunkujących mięsność gęsi oraz określenie związku zidentyfikowanych wariantów polimorficznych z cechami użytkowości mięsnej określanej przyżyciowo (wyrażonej: masą ciała, głębokością mięśnia klatki piersiowej, długością grzebienia mostka, długością przedramienia oraz tempem przyrostu masy ciała) i poubojowo (uwzględniającej masę mięśnia piersiowego, masę mięśni udowych, ocenę jakości i profil białkowy mięsa), a także analiza ekspresji tych genów w różnych tkankach i na tej podstawie ustalenie najkorzystniejszych formuł genotypowych przydatnych w selekcji prowadzącej do modelowania poszczególnych partii mięśni i jakości mięsa u badanych ras gęsi.

Założono cele dwa cele szczegółowe:

1. Określenie markerów genetycznych i tkankowo specyficznej ekspresji genów warunkujących mięsność gęsi.
2. Ocena użytkowości mięsnej gęsi oraz charakterystyka proteomiczna i jakościowa mięsa.

Chcąc zrealizować powyższe cele badawcze przeprowadzono analizy jakościowe tkanek pobranych od gęsi landes i gęsi białej kołudzkiej® w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Kołudzie Wielkiej. Ponadto, przeprowadzono analizy molekularne tkanek u badanych ras. Próbkę do analiz jakościowych i molekularnych zostały pobrane od gęsi landes i gęsi białej kołudzkiej® w listopadzie 2023 roku. Wyniki analiz uzyskano w 2024 roku.

Analizy jakościowe

Badania jakościowe obejmowały szczegółową analizę parametrów rzeźnych gęsi. Wyliczenia statystyczne wykazały istotny wpływ rasy gęsi na masę ciała i masę tuszki oraz na wydajność rzeźną i wyniki analizy rzeźnej.

Analizy molekularne

Przeprowadzono analizę globalnej ekspresji genów w tkankach pobranych od gęsi rasy pomorska i gęsi biała kołudzka® (pobranie z 2022 roku) oraz gęsi landes i gęsi biała kołudzka® (pobranie z 2023 roku). W ramach analiz wykonano biblioteki, które następnie zostały przeanalizowane w aparacie NovaSeq X Plus Series (Illumina, USA). Wyniki ekspresji uzyskano grudniu 2024 roku. Wstępna analiza bioinformatyczna pozwoliła na określenie różnicujących genów (DEGs) w próbkach wątroby gęsi pomorskiej i gęsi białej kołudzkiej® (pobranie z 2022 roku). Dla genów o najwyższym stopniu zróżnicowania (top 20 genów) można wytypować dwa geny, tj.: HOGA1 i SCD. Gen SCD pojawia się też w wynikach analiz proteomicznych. Wyniki analiz białek pozwoliły na zidentyfikowanie szeregu białek mających wpływ na przemiany tłuszczowe, m.in.: indukujących biosyntezę tłuszczu (SCD i FASN).

Wnioski

Uzyskane wyniki jakościowe pobranego materiału od gęsi landes i biała kołudzka® wskazują, że poddane kilkudziesięcioletniej selekcji gęsi białej kołudzkiej® osiągają istotnie wyższą masę ciała i większą wydajność rzeźną w porównaniu z nioselekcjonowanymi gęsiami landes. Analiza globalnej ekspresji tkanek gęsi z dwóch pobrań pozwala na identyfikację genów o różnicującej ekspresji, które dają podstawę do poszukiwania markerów cech jakościowych i wydajności rzeźnej. Wyniki ekspresji genów, w dużej mierze znajdują swoje odzwierciedlenie w rezultatach uzyskanych z badań proteomicznych.

Zadanie 01-18-17-21

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

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

Celem badania była analiza transkryptomu chondrocytów koni w hodowli *in vitro* z wykorzystaniem osocza bogatopłytkowego (PRP), aby molekularnie ocenić wpływ biogennych czynników wzrostu na stopień zróżnicowania komórek chrząstki stawowej koni. Badaniu poddano chondrocyty pobrane *post-mortem* z chrząstki szklistej stawów pęcinowych czterech niespokrewnionych koni zimnokrwistych w wieku półtora roku. Komórki namnażano przez trzy kolejne pasaży w warunkach monowarstwy, a główny eksperyment rozpoczęto na etapie 500 000 komórek z czwartego pasażu. Osocze bogatopłytkowe (PRP) przygotowano z pełnej krwi siedmiu koni w ramach rutynowych procedur weterynaryjnych. Stymulację chondrocytów za pomocą PRP przeprowadzono przy wykorzystaniu dwóch podejść. Pierwszy eksperyment miał na celu wykorzystanie efektu powolnego uwalniania PRP w podłożu hodowlanym, poprzez wprowadzenie kulek alginianowych przygotowanych z różną zawartością PRP.

W drugim podejściu osocze bogatopłytkowe (PRP) wprowadzono bezpośrednio do podłoża hodowlanego chondrocytów.

Dwanaście bibliotek RNA-seq dla chondrocytów stymulowanych kulkami alginianowymi z PRP i dziewięć bibliotek dla chondrocytów bezpośrednio indukowanych PRP został utworzonych przy użyciu zestawu VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit dla Illumina (VA- ZYME). Tryb *pair-end* NGS został zastosowany w systemie Novaseq X Plus (Illumina). Analiza RNAseq pozwoliła zidentyfikować 5797 genów podlegających różnicowej ekspresji (DEGs). Charakterystyka funkcjonalna zidentyfikowanych DEGs wykazała, że zastosowanie tradycyjnych surowic lub PRP w hodowli komórek chrząstki stawowej skutkowało między innymi nadreprezentacją DEGs w szlakach molekularnych związanych z interakcją ECM-receptor (ecb04512), starzeniem się komórek (ecb04218), adhezją komórek do ECM (ecb04510) i sygnalizacją PI3K-Akt (ecb04151).

Uzyskane informacje podkreślają znaczenie osocza PRP w utrzymaniu potencjału chondrocytów do syntezy macierzy ECM poprzez stymulację proliferacji i różnicowania komórek chrząstki. Zmniejszona ekspresja genów kodujących czynniki prozapalne dodatkowo potwierdza zdolność osocza PRP do hamowania procesu zapalnego, który jest powszechnie związany z degeneracją chrząstki stawowej. Uzyskane wyniki badań molekularnych mogą być przydatne dla modyfikacji procedur z zakresu stosowania osocza bogatopłytkowego w leczeniu zwyrodnień stawów u koni.

Zadanie 01-18-18-11

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

kierownik zadania: dr hab. Małgorzata Natonek-Wiśniewska

Cel zadania

- opracowanie i walidacja metody wykrywania miodu na podstawie markerów molekularnych,
- opracowanie i walidacja metod molekularnych rozróżniania podgatunków pszczół zamieszkujących Polskę (pszczoła środkowoeuropejska/*Apis mellifera mellifera*/, pszczoła kraińska /*Apis mellifera carnica*/, pszczoła kaukaska /*Apis mellifera caucasic*/) od pozostałych podgatunków pszczoły miodnej,
- zastosowanie metody do identyfikacji i rozróżniania produktów pszczelich.

Założony cel obejmował dostosowanie metody identyfikacji miodu do badania zróżnicowanego materiału badawczego oraz przeprowadzenie monitoringu skali fałszowania produktów dla węgla.

Założenia metodyczne

Problem fałszowania dotyczy zarówno samych miodów poprzez dodatek do nich obcych substancji, jak również fortifikowanie miodami produktów, które zgodnie z informacją od producenta nie powinny go zawierać. Dotychczas nie ma oficjalnych metod zatwierdzonych urzędowo do kontroli tego typu produktów. Rozporządzenia UE dotyczące badań żywności i pasz (UE 51/2013, EURL-AP) wskazują na wyraźne trendy do wykorzystywania analiz opartych na DNA. Za metodami molekularnymi przemawia również fakt, że zgodnie z rozporządzeniem UE (WE 882/2004), dotyczącym analiz produktów żywnościowych i pasz, stosowane do analizy metody powinny się cechować co najmniej 13 parametrami. Większość z nich, między innymi zakres stosowania, limit wykrywania/oznaczania czy powtarzalność osiągają bardzo dobre wartości dla analiz DNA.

Syntetyczny opis wyników zadania i podsumowanie

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

Sprawdzenie i dostosowanie metody dla zróżnicowanego materiału badawczego

W celu sprawdzenia metody dla zróżnicowanego materiału badawczego przeprowadzono jej walidację dla: rozcieńczeń miodów w zakresie od 0,1-100%, próbek produktów roślinnych fortyfikowanych miodami w ilości 1% i 10% oraz komercyjnych produktów spożywczych dla wegan. We wszystkich przypadkach reakcje przeprowadzono analogicznie jak dla czystych miodów.

Wykonane analizy pozwoliły zauważyć, że:

- metoda jest powtarzalna,
- czułość metody jest na poziomie 0,1%,
- przetestowane komercyjne produkty spożywcze dla wegan (50 różnych produktów) nie zawierają dodatków miodu.

Do badań wykorzystano fragment podjednostki I (COI) mitochondrialnej oksydazy cytochromu c. Przebadano łącznie 20 rodzajów miodu, próbek roślinnych i mieszaniny obu rodzajów próbek (1% i 10%) z różnych regionów kraju oraz 50 produktów dla wegan. Dla badanych próbek wykonano ilościowo-porównawczą reakcję cT z krzywą topnienia (SybrGreen). Uzyskane wyniki wskazują na różne wartości cT dla miodu i bez miodu. Wartości cT uzyskane dla miodu były poniżej 23 cykli, podczas gdy dla próbek bez miodu cT wynosiło ponad 30 cykli. Krzywa topnienia również odróżniała obie grupy próbek. Dla próbek pszczoł miodnych wynosiła ona około 74°C, natomiast dla kontroli negatywnej ponad 83°C. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że opracowana metoda może być stosowana do identyfikacji próbek zawierających miód.

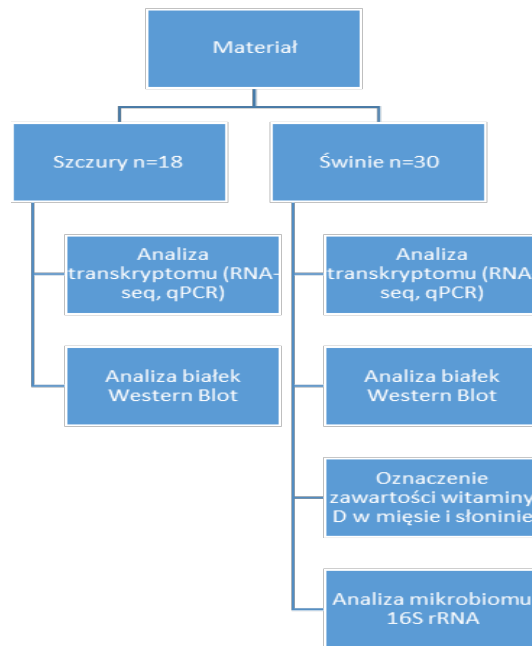
Zadanie 01-18-19-21

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

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

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

Figura 1. Założenia metodyczne i schemat planowanych analiz.

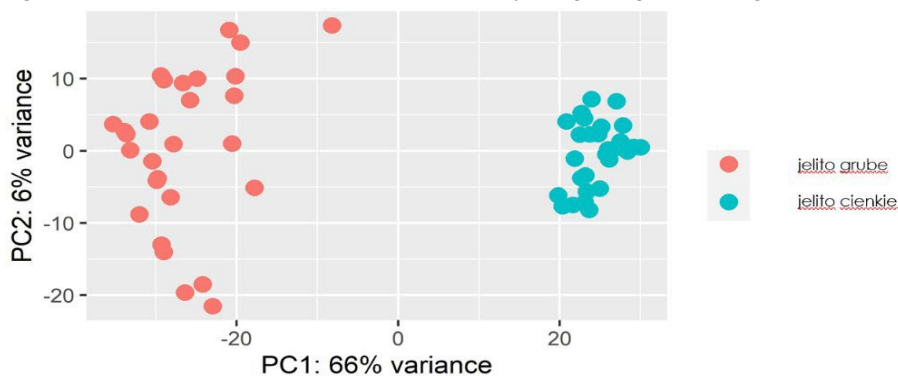


Syntetyczny opis wyników zadania

Wyzolowano RNA z próbek jelita grubego (30 próbek) oraz jelita cienkiego (28 próbek) świń otrzymujących w diecie różną dawkę witaminy D3 (grupa I – 0, grupa II – 5000 U witaminy D/kg, grupa III – 10000 U witaminy D/kg). Wyzolowane próbki oceniono pod kątem integralności oraz koncentracji RNA. Następnie utworzono biblioteki cDNA typu 3'Taq mRNA z zastosowaniem zestawu Colibri 3' mRNA Library Prep Kits for Illumina Systems (ThermoFisher scientific). Biblioteki zsekwencjonowano na aparacie Nextseq 550 firmy Illumina. W wyniku sekwencjonowania uzyskano około 541,80 mln odczytów, co daje średnio około 9,3 mln odczytów na próbkę.

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

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



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

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

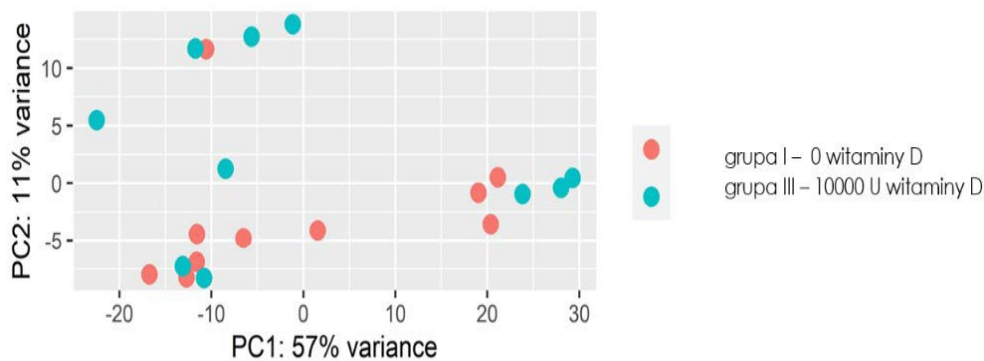
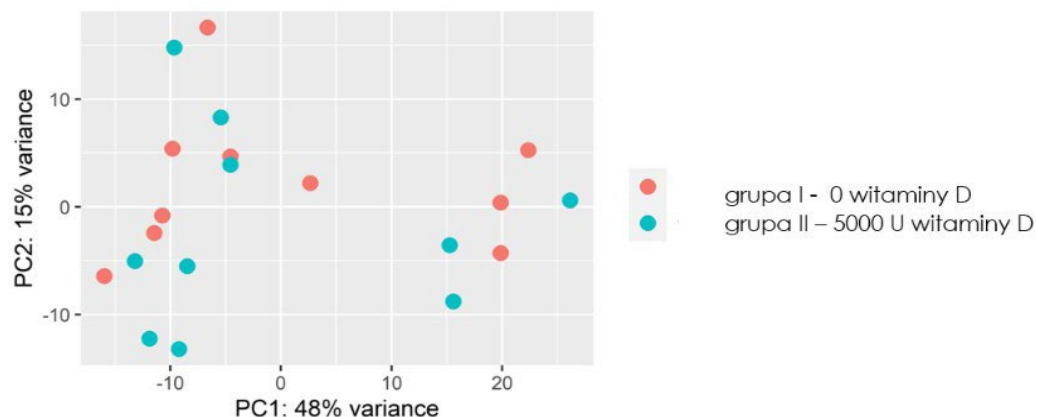


Figura 4. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita grubego świni otrzymującej w diecie 5000 U/kg witaminy D i bez suplementacji.



W obrębie jelita cienkiego, przy porównaniu grupy I z II zidentyfikowano 89 genów o obniżonej ekspresji oraz 330 genów o podwyższonej ekspresji – w grupie otrzymującej dawkę (5000 U/kg) witaminy D w porównaniu z grupą niesuplementowaną (Figura 5.). Natomiast w porównaniu grupy I z grupą III zidentyfikowano 139 genów o obniżonej ekspresji oraz 284 geny o podwyższonej ekspresji w grupie otrzymującej wysoką dawkę 10000 U/kg witaminy D (Figura 6.). Geny zidentyfikowane w obu porównaniach w przeważającej liczbie regulują biosyntezę steroli oraz procesy związane z odpornością.

Z kolei porównanie grupy otrzymującej dawkę 5000 U/kg z grupą otrzymującą dawkę podwyższoną witaminy D pozwoliło na zidentyfikowanie 116 genów o podwyższonej ekspresji i 112 o obniżonej ekspresji u zwierząt otrzymujących 10000 U/kg witaminy D.

Figura 5. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita cienkiego świni otrzymującej w diecie 5000 U/kg witaminy D i bez suplementacji.

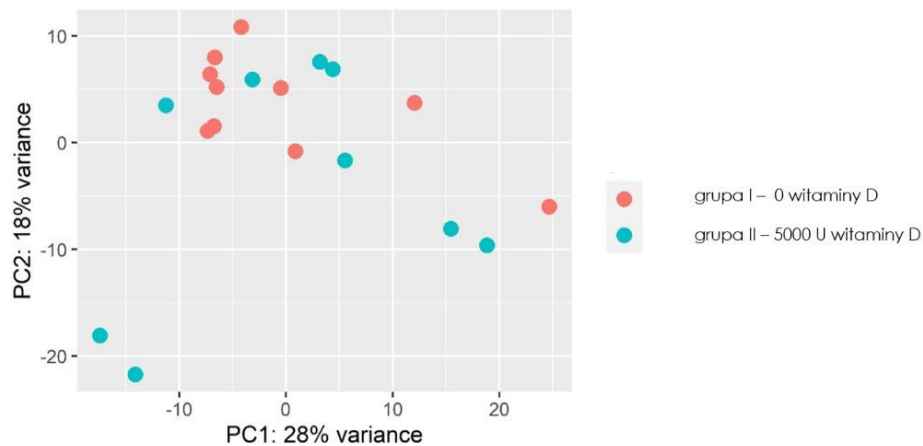
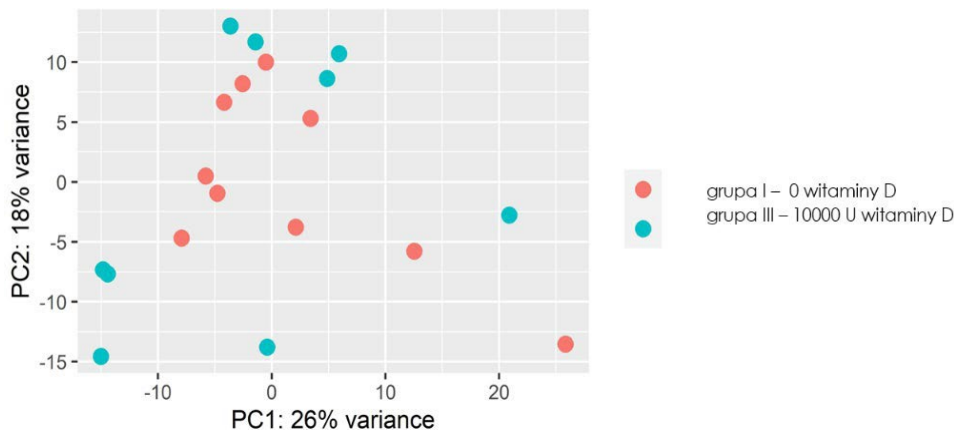


Figura 6. Analiza PCA porównania transkryptomu jelita cienkiego świni otrzymującej w diecie 10000 u/kg witaminy D i bez suplementacji.



Podsumowanie

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

Zadanie 01-18-20-21

Epigenetyczne modyfikacje genomu indukowane wysiłkiem fizycznym z wykorzystaniem modelu zwierzęcego.

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

Celem badań jest ustalenie i optymalizacja modelu hipoksji *in vitro* maksymalnie zbliżonego do warunków tlenowych w mięśniach szkieletowych oraz określenie, jaki wpływ mają warunki hipoksji na ekspresję genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, utylizacją glukozy, apoptozą indukowaną hipoksją u gołębia pocztowego oraz konia rasy czystej krwi arabskiej lub pełnej krwi angielskiej.

Nadrzędnym celem jest poszerzenie aktualnej wiedzy w tym zakresie oraz dalszej eksploracji zagadnienia przy wykorzystaniu technologii sekwencjonowania następnej generacji w kolejnych etapach badań.

Założenia metodologiczne

1. Pozyskanie i zabezpieczenie mioblastów z mięśni szkieletowych: *m. pectorallis (columba livia)* i *m. gluteus medius (equus caballus)* oraz hodowlę w celu uzyskania odpowiedniej liczebności komórek (około 3 pasaże).
2. Hodowla komórek *in vitro* w różnych warunkach tlenowych.
3. Analiza ekspresji genów – PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).
4. Sekwencjonowanie następnej generacji mioblastów poddanych różnym warunkom tlenowym.

Syntetyczny opis wyników zadania

W roku sprawozdawczym przeprowadzono i opracowano warunki dla testów hipoksji *in vitro*. Całość procedur wykonano dwukrotnie, testując powtarzalność otrzymanych wyników hodowli komórkowych. Przeprowadzono dysekcję *m. pectoralis* według opracowanych procedur i pobrano 6 fragmentów tkanki o wadze po około 1 g. Tkanki przepłukano w PBS z antybiotykiem, rozdrobniono przy użyciu nożyczek oraz strawiono poprzez godziną inkubację w 37°C w roztworze kolagenazy II. Następnie, komórki przepłukano w medium hodowlanym, zwirowano i przefiltrowano przez 40 mm membranę oraz 70 mm siłko. Komórki zawieszono w medium hodowlanym, przeniesiono na nieopłaszczoną płytkę hodowlą i inkubowano przez 1 h w 37°C. Po tym czasie, supernatant przeniesiono na płytkę hodowlaną opłaszczoną 2% roztworem żelatyny. Komórki hodowano w 37°C, w medium DMEM z wysoką zawartością cukru, z dodatkiem surowicy bydlęcej, antybiotyków oraz czynnika wzrostu EGF. Komórki inkubowano przez 72 h w odpowiednim medium oraz temperaturze. Po tym czasie, w zależności od konfluencji, zmieniło medium komórkowe lub przeprowadzono pasaż komórek z użyciem trypsyny na nowe płytki hodowlane, również stosując metodę *pre-platingu* (najpierw inkubacja na nieopłaszczonej płytce w celu oczyszczania populacji komórek z fibroblastów, następnie na płytce opłaszczonej żelatyną). Komórki przeprowadzano przez kolejne pasaże w celu ustabilizowania hodowli. Prowadzono również hodowlę komórek C2C12 (jako komórki kontrolne) w medium hodowlanym DMEM z dodatkiem surowicy bydlęcej. Część komórek poddano procesowi mrożenia (w roztworze DMEM oraz surowicy bydlęcej) w celu zbankowania.

Po uzyskaniu odpowiedniej liczby komórek doświadczalnych oraz kontrolnych, hodowle przeniesiono do komory hipoksyjnej i inkubowano w 3% O₂ przez 3, 6, 12, oraz 24 h. W odpowiednich punktach czasowych komórki zbierano w celu wyizolowania RNA. Przetestowano trzy kity do izolacji – A&A Biotechnology, Invitrek oraz Qiagen. Najlepsze rezultaty uzyskano przy użyciu zestawu Qiagen RNeasy.

W celu oszacowania proliferacji komórek miogennych przeprowadzono analizę qPCR otrzymanych hodowli komórkowych dla genów: MyoD, MYOG, Myf5, MRF4, Pax-7, Pax-10 oraz kontroli endogennych GAPDH i ACTB., z wykorzystaniem odczynników Eva Green.

Zadanie 01-18-21-21

Analiza profilu proteomicznego plemników knura poddanych procedurom biotechnologicznym.

kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Głównym celem zadania jest identyfikacja różnic w profilach białkowych (2D żel), plemników knura, traktowanych i nietraktowanych maślanem sodu (NaBu; ang. *sodium butyrate*), należącym do rodziny deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej, a następnie poddawanych procedurze kriokonserwacji.

Plemniki, niezależnie od zastosowanych procedur biotechnologicznych, poddawane są ocenie:

1. standardowych parametrów za pomocą systemu CASA (ang. *Computer Assisted Semen Analysis*) w celu określenia odsetka plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy,
2. parametrów strukturalno-funkcjonalnych, takich jak integralności błon komórkowych, uszkodzeń chromatyny plemnikowej, stanu przepuszczalności błon akrosomalnych plemników oraz zmian w mitochondrialnym potencjale transbłonowym ($\Delta\Psi_m$).

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

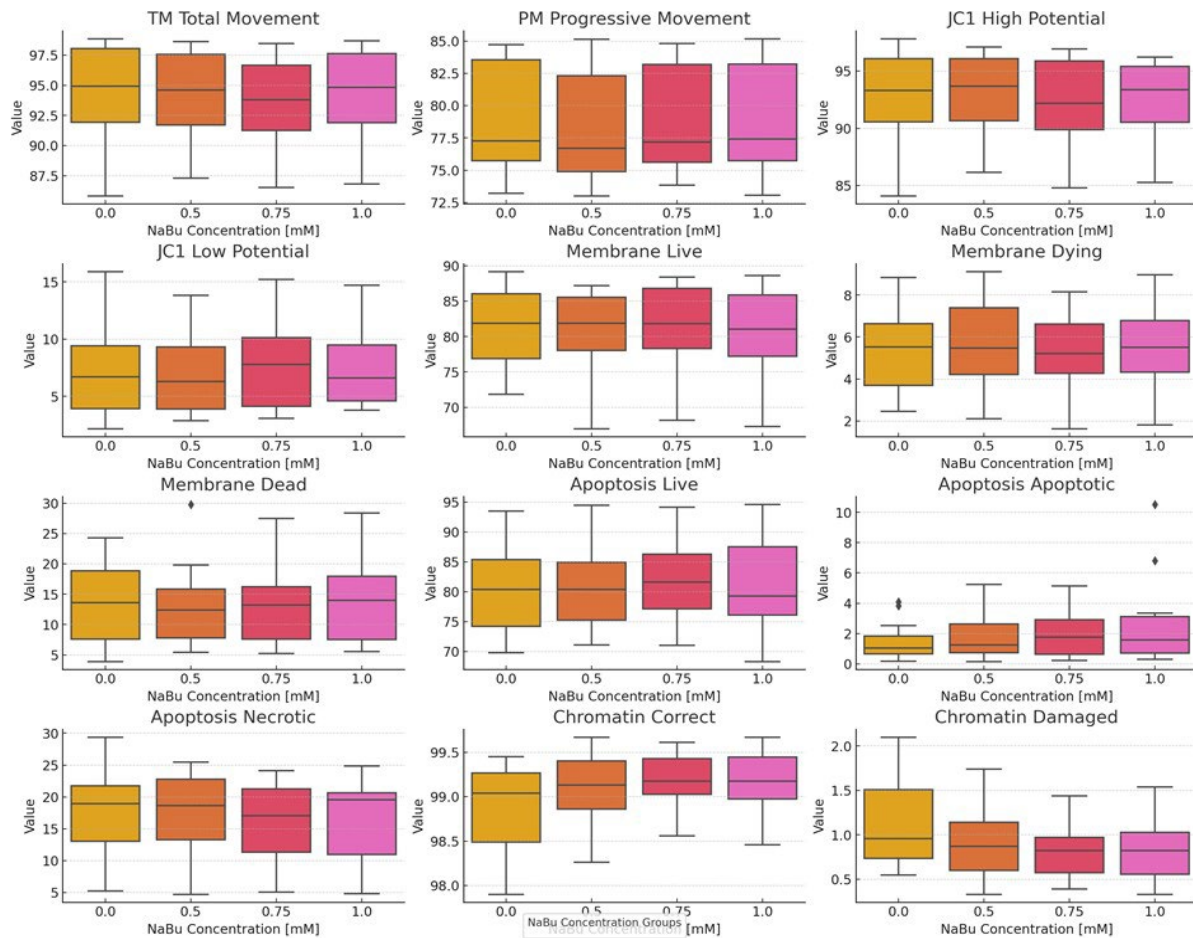
Szczegółowy opis przeprowadzonych prac

Analiza statystyczna parametrów nasienia traktowanego różnymi stężeniami maślanu sodu (NaBu). Analizie poddano takie parametry, jak: ruchliwość po 24 h lub po rozmrożeniu [%] (TM - ruch całkowity PM- ruch postępowy), JC-1 [%] (Wysoki potencjał, Niski potencjał), integralność błon [%] (żywe, zamierające, martwe), apoptoza [%] (żywe, apoptotyczne, nekrotyczne), chromatyna [%] (prawidłowa, uszkodzona).

Wyniki ANOVA wskazują, że nie ma statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) między stężeniami NaBu dla żadnego z mierzonych parametrów w świeżych próbkach.

Wartości p dla wszystkich parametrów są dość wysokie, co sugeruje, że stężenie NaBu nie wpływa znacząco na te parametry nasienia.

Rysunek 1. Wykresy pudełkowe dla wszystkich mierzonych parametrów w świeżych próbkach, pogrupowane według stężenia NaBu.



Następnie sprawdzono różnice między knurami a stężeniem NaBu i parametrami w świeżych próbkach.

Wyniki dwukierunkowej ANOVA wskazują:

Znaczące różnice między knurami w świeżych próbkach:

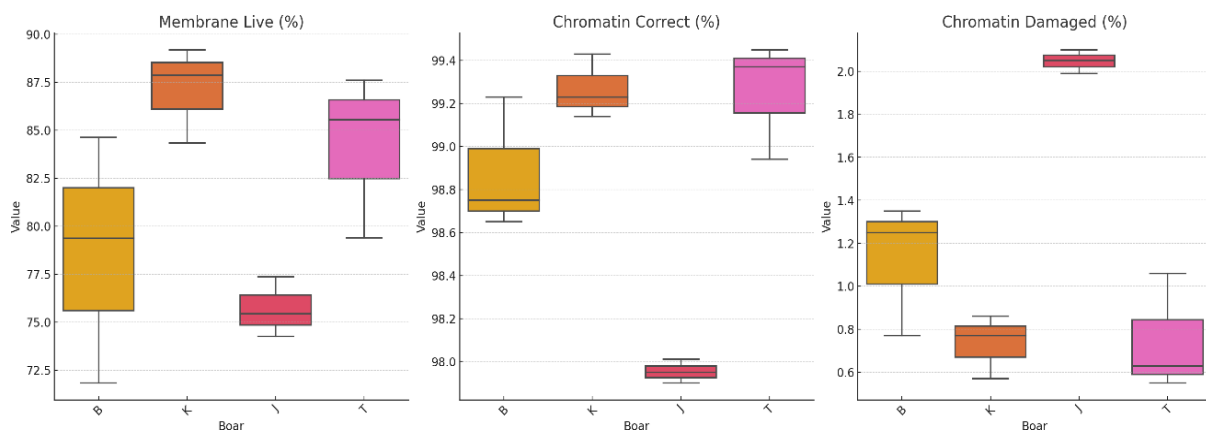
- Przy 0 mM NaBu (grupa kontrolna)
 - żywa błona ($p=0.0351$ $p=0.0351$ $p=0.0351$) → istotne różnice między knurami,
 - chromatyna prawidłowa ($p=0.000265$ $p=0.000265$ $p=0.000265$) → wysoce istotne różnice między knurami,
 - uszkodzona chromatyna ($p=0.000265$ $p=0.000265$ $p=0.000265$) → wysoce istotne różnice między knurami,
 - martwa błona ($p=0.0614$ $p=0.0614$ $p=0.0614$) → bliskie istotności.
- Przy 0,5 mM, 0,75 mM i 1,0 mM NaBu
 - brak istotnych różnic ($p>0,05$ $p>0,05$ $p>0,05$) dla wszystkich parametrów jakości nasienia.

Sugeruje to, że różnice w jakości nasienia związane z knurem są widoczne tylko w grupie kontrolnej (0 mM NaBu), ale zmniejszają się wraz z koncentracją NaBu. Wyniki testu *post-hoc* Tukeya HSD dla grupy 0 mM NaBu (kontrolnej) dla istotnych parametrów (żywa błona, prawidłowa chromatyna i uszkodzona chromatyna).

Wyniki testu *post-hoc* HSD Tukeya dla 0 mM NaBu (grupa kontrolna)

1. Żywotność błony (%)
 - znacząca różnica między Jukon (J) i Kopan (K) ($p=0,0387$),
 - brak innych znaczących różnic między knurami.
2. Prawidłowa chromatyna (%)
 - Jukon (J) ma znacznie niższą integralność chromatyny niż:
 - Bielik (B) ($p=0,0041$),
 - Kopan (K) ($p=0,0004$),
 - Tenorek (T) ($p=0,0004$),
 - brak znaczących różnic między B, K i T.
3. Uszkodzona chromatyna (%)
 - Jukon (J) ma znacznie wyższe uszkodzenia chromatyny niż:
 - Bielik (B); ($p=0,0041$),
 - Kopan (K) ($p=0,0004$),
 - Tenorek (T) ($p=0,0004$),
 - brak znaczących różnic między B, K i T.

Rysunek 2. Wykresy pudełkowe wizualizujące znaczące wyniki HSD Tukeya dla grupy 0 mM NaBu (kontrola). 1. Żywotność błony (%): Znacząca różnica między Jukon (J) i Kopan (K). 2. Prawidłowa chromatyna (%): Jukon (J) ma znacznie niższą integralność chromatyny niż Bielik (B), Kopan (K) i Tenorek (T). 3. Uszkodzona chromatyna (%): Jukon (J) ma znacząco wyższe uszkodzenia chromatyny niż Bielik (B), Kopan (K) i Tenorek (T).



Kolejną analizą była ocena wpływu stężenia NaBu na parametry w zamrożonych próbkach. Sprawdzano, czy stężenie NaBu (0, 0,5, 0,75, 1,0 mM) ma statystycznie istotny wpływ na parametry jakości nasienia w zamrożonych próbkach.

Kluczowe wyniki

1. Istotny wpływ ($p<0,05$) stwierdzono dla:
 - TM total movement ($p=0,0204$) → NaBu znacząco wpływa na całkowitą ruchliwość plemników,
 - ruch progresywny PM ($p=0,0217$) → NaBu znacząco wpływa na progresywną ruchliwość plemników.

2. Bliski istotności ($p < 0,1$ $p < 0,1$ $p < 0,1$):

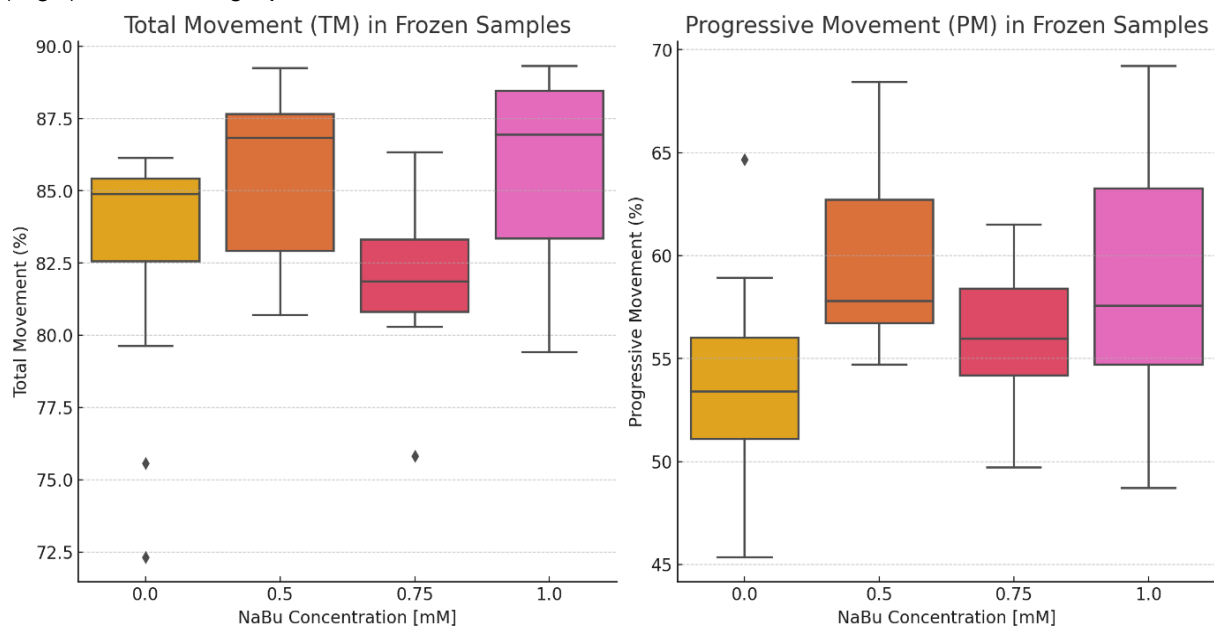
- JC1 high potential ($p = 0,0685$ $p = 0,0685$ $p = 0,0685$) → potencjalny trend, ale nieistotny statystycznie,
- JC1 niski potencjał ($p = 0,0685$ $p = 0,0685$ $p = 0,0685$) → podobny nieistotny trend.

3. Brak znaczącego wpływu ($p > 0,05$ $p > 0,05$ $p > 0,05$) na:

- integralność błon (żywe, umierające, martwe),
- apoptozę (żywe, apoptotyczne, nekrotyczne),
- integralność chromatyny (prawidłowa, uszkodzona).

Sugeruje to, że NaBu wpływa przede wszystkim na parametry ruchliwości plemników w zamrożonych próbkach, podczas gdy inne miary jakości nasienia pozostają niezmienione.

Rysunek 3. Wykresy pudełkowe dla ruchu całkowitego (TM) i ruchu postępowego (PM) w zamrożonych próbkach, pogrupowane według stężenia NaBu.



W następnej kolejności przeanalizowano różnice pomiędzy próbkami świeżymi i po mrożeniu dla wszystkich stężeń NaBu.

Kluczowe obserwacje

1. Ruchliwość plemników (TM, PM)

- zamrożone próbki wykazują większą zmienność TM i PM – w porównaniu do próbek świeżych,
- PM znacząco wzrasta przy 0,5 mM NaBu w zamrożonych próbkach, ale nie w świeżych próbkach.

2. Aktywność mitochondriów (wysoki/niski potencjał JC-1)

- wysoki potencjał JC-1 wydaje się nieznacznie spadać w zamrożonych próbkach, co sugeruje niższą aktywność mitochondriów po rozmrożeniu,
- niski potencjał JC-1 wzrasta w zamrożonych próbkach, wspierając trend dysfunkcji mitochondriów po zamrożeniu.

3. Integralność błony (żywe, umierające, martwe)

- brak wyraźnego wpływu NaBu na żywotność plemników (żywe, umierające, martwe),
- zamrożone próbki mają niższy odsetek żywych plemników.

4. Apoptoza (żywe, apoptotyczne, martwe)

- brak silnego wpływu NaBu na plemniki apoptotyczne lub martwe,
- zgodnie z oczekiwaniami, zamrożone próbki zawierają więcej plemników apoptotycznych i nekrotycznych niż próbki świeże.

5. Integralność chromatyny (prawidłowa, uszkodzona)

- uszkodzenia chromatyny są nieco większe w zamrożonych próbkach, co jest zgodne z oczekiwanym stresem zamrażania,
- brak wyraźnego wpływu NaBu na integralność chromatyny.

Tak jak w przypadku świeżego nasienia sprawdzono różnice między knurami w zamrożonych próbkach przy różnych stężeniach NaBu.

Znaczące różnice między knurami

1. Przy 0,0 mM NaBu (grupa kontrolna)

- TM ruch całkowity ($p=0,0007$ $p=0,0007$ $p=0,0007$) → knury różnią się znacząco pod względem całkowitej ruchliwości plemników,
- PM ruch progresywny ($p=0,0183$ $p=0,0183$ $p=0,0183$) → znacząca różnica w ruchu progresywnym,
- JC1 high potential ($p=0,0010$ $p=0,0010$ $p=0,0010$) → znacząca różnica,
- niski potencjał JC1 ($p=0,0010$ $p=0,0010$ $p=0,0010$) → znacząca różnica,
- apoptoza apoptotyczna ($p=0,0026$ $p=0,0026$ $p=0,0026$) → istotna różnica.

2. Przy 0,5 mM NaBu

- brak statystycznie istotnych różnic ($p>0,05$ $p>0,05$ $p>0,05$) dla jakichkolwiek parametrów CASA,
- sugeruje to, że NaBu w stężeniu 0,5 mM może zmniejszyć zmienność związaną z knurem w zamrożonych próbkach.

3. Przy 0,75 mM NaBu

- brak znaczących różnic ($p>0,05$ $p>0,05$ $p>0,05$) dla jakichkolwiek parametrów nasienia.
- efekty knura wydają się zanikać przy tym stężeniu.

4. Przy 1,0 mM NaBu

- TM total movement ($p=0,0352$ $p=0,0352$ $p=0,0352$) → znacząca różnica w całkowitej ruchliwości,
- wysoki potencjał JC1 ($p=0,0050$ $p=0,0050$ $p=0,0050$) → istotna różnica w aktywności mitochondriów,
- niski potencjał JC1 ($p=0,0050$ $p=0,0050$ $p=0,0050$) → istotna różnica.

Wnioski

1. Zmienność związana z knurem jest najwyższa w zakresie ruchliwości i funkcji mitochondriów, szczególnie przy 0 mM i 1,0 mM NaBu.
2. NaBu w stężeniu 0,5-0,75 mM wydaje się stabilizować jakość nasienia u knurów, zmniejszając zmienność.
3. NaBu nie ma silnego wpływu na integralność chromatyny lub apoptozę.

Analiza proteomiczna modyfikacji potranslacyjnych

Na tym etapie przeprowadzono analizę acetylacji na próbkach grupy kontrolnej (stężenie NaBu 0 mM) świeżych i mrożonych. Przeprowadzono izolację białek zgodnie z metodyką opracowaną w poprzednim roku sprawozdawczym.

W celu analizy modyfikacji potranslacyjnych (acetylacja) przeprowadzono próby połączenia i wykorzystania metody 2D żeli z analizą *Western blot*, do identyfikacji pojedynczych białek. Zastosowano przeciwciała wykrywające acetylację lizyny (Anti-Ki67 antibody, Abcam). Na tym etapie analiz opracowano i zoptymalizowano połączoną metodykę 2D żeli z *Western Blottem* oraz dopracowano stężenia przeciwciał wykorzystywanych w metodyce. Dalsze analizy proteomiczne są w trakcie.

Z analizy żeli pomiędzy próbkami (świeżymi i mrożonymi) o stężeniu 0mM NaBu wybrano 4 białka różniące się najbardziej stopniem acetylacji. Spoty białkowe wycięto i wysłano do identyfikacji.

Zidentyfikowano:

- NDUFA10 – część kompleksu łańcucha oddechowego I,
- ATP5A1 – podjednostka kompleksu syntazy ATP transportującego proton,
- PSMA5 – Składnik kompleksu proteasomu,
- PDIA3 (ERp57) – bierze udział w interakcji plemnik- oocyt i reakcji akrosomu.

Zadanie 01-18-22-21

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

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

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

Założenia metodyczne

W eksperymencie uwzględniono 8 wieprzków rasy złotnicka pstra i pietrain (świnie eksperymentalne) oraz 2 loszki do testów (1 szt. pbz i 1 szt. wbp). Próbkę od świń testowych zostały pobrane w celu dopracowania metodyki izolacji preadipocytów. Poubojowo, przy wadze około 100 kg, pobrano od wieprzków materiał (tkanka wątrobową, tłuszczową z części brzusznej i grzbietowej, fragment mięśnia polędwicy oraz fragment wątroby) do badania ekspresji lncRNA MALAT1, które zostały ustabilizowane w buforze RNeasy lysis oraz w ciekłym azocie (kolejne powtórzenie).

Od wszystkich świń testowych i eksperymentalnych pobrano materiał do wyprowadzenia hodowli preadipocytów w celu przeprowadzenia różnicowania i późniejszej transfekcji. Próbkę do hodowli komórkowych (próbki od 2 pietrain i 2 złotników) poddano izolacji na trzy sposoby: kitem do izolacji Preadipocyte Isolation kit (ab196988), metodą swim-up oraz metodą enzymatyczną z zastosowaniem kolagenazy I i filtracji na 70 µm nylonowej siatce. Kolejno preadipocyty poddano w kulturach proliferacji i przeniesiono w celu różnicowania. Do różnicowania wybrano kitu 3T3-L1 Differentiation Kit (abcam) oraz Preadipocyte Differentiation Medium (C-27436, Sigma Aldrich). Po różnicowaniu poddano ocenie z wykorzystaniem barwienia Lipid Staining Kit (abcam), a także z wykorzystaniem markerów dla adipogenezy (LPL, SCD).

Ocenę profilu ekspresji MALAT1 przeprowadzono dla różnych tkanek w/w pobranych od świni rasy złotnicka pstra (n=4) oraz pietrain (n=4), uwzględniając izoformy MALAT1. Dodatkowo, na próbkach RNA na których testowano postęp adipogenezy, został oceniony poziom ekspresji genu MALAT1 z podziałem na izoformy. RNA z tkanek zostało wyizolowane za pomocą Trisol, specjalnego zestawu Synegen do tkanki tłuszczowej oraz zestawu Purelink RNA. Ocenę jakości i ilości RNA wykonano na urządzeniu Nanodrop2000 oraz TapeStation2200. Następnie RNA zostało poddane odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu High-Capacity RNA-to-cDNA™ – Thermo Fisher Scientific. W programie Primer Express oraz Primer 3 zaprojektowano primery i sondy do dwóch izoform lncRNA genu MALAT1 (izoforma 1 – Forward Primer: CGGGAGCCATGCGATGTG, Reverse Primer: AAACAAAGCAGAACCCACGA, Probe Sequence: GATAGAGCGTCCTAGAGCGG, izoforma 2-Forward Primer: TCATGGTCTGCGTTTCTCAT-TATC, Reverse Primer: GCAATACTGCAGATGCAAGTTAACT, Probe Sequence: AAGAGTT-GCTTCATATCAT). Kolejno oszacowano względny poziom ekspresji genu MALAT1 (uwzględniając jego izoformy). Ilościowa ocena transkryptu została przeprowadzona na urządzeniu Quant Studio7 flex. Jako kontrolę endogenną wykorzystano geny RPL27, RPS29 i OAZ1. Metoda Sanger posłużyła jako metoda pomocnicza przy ustalaniu obecności poszczególnych izoform. Z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sanger, w celu oceny sekwencji regulatorowych świńskiego genu MALAT1, przeprowadzona została ocena jego sekwencji promotorowych. Do analizy prócz rasy pietrain i złotnicka pstra włączono także inne rasy, jak: duroc, złotnicka biała, PBZ oraz WBP. Dla 24 osobników z każdej z ras wyznaczono frekwencję zidentyfikowanych w sekwencjach promotorowych zmian polimorficznych. Zaprojektowano metodę do identyfikacji zmian polimorficznych w oparciu o metodę sekwencjonowania Sanger. Dodatkowo dla kultur preadipocytów pierwotnych uzyskanych z tkanki podskórnej grzbietowej, przeprowadzono w trzech powtórzeniach namnażanie (dzień 0.) oraz różnicowanie do dnia 12. W czterech punktach czasowych (dzień 0., 4., 7. i 12.) z komórek izolowano RNA w celu przygotowania bibliotek cDNA i globalnej oceny zmian w lncRNA w procesie postępu adipogenezy. Biblioteki wystano do sekwencjonowania.

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

Ocenie poddane zostały tkanki podskórne tłuszczowe od strony brzusznej i grzbietowej. Istotne różnice pomiędzy badanymi rasami uzyskano dla słoniny oraz podskórnej tkanki tłuszczowej pobranej z brzucha dla izoformy ENSSSCT00000080860, dla izoformy ENSSSCT00000077869, nie zaobserwowano istotnych różnic przy zastosowaniu detekcji niespecyficznej. Przy zastosowaniu detekcji specyficznej i sond Taqman (primery lub sondy na łączeniach exon-exon) zaobserwowano poziom ekspresji wyłącznie dla izoformy ENSSSCT00000080860.

Figura 1. Poziom ekspresji izoform ENSSSCT00000080860 i ENSSSCT00000077869 genu MALAT1 w zależności od rodzaju tkanki oraz rasy badanych świń z wykorzystaniem techniki qPCR i detekcji niespecyficznych (barwnik EvaGreen). W analizie uwzględniono 4 świny rasy pietrain i 4 świny rasy złotnicka pstra.

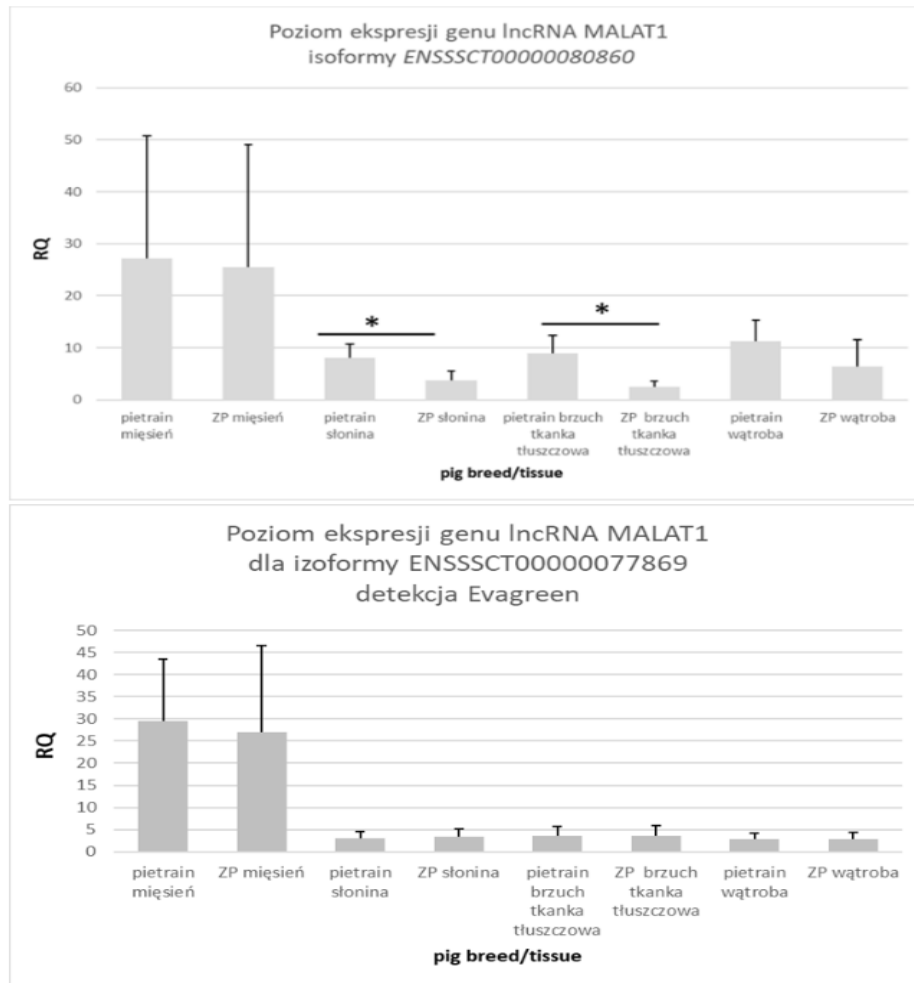
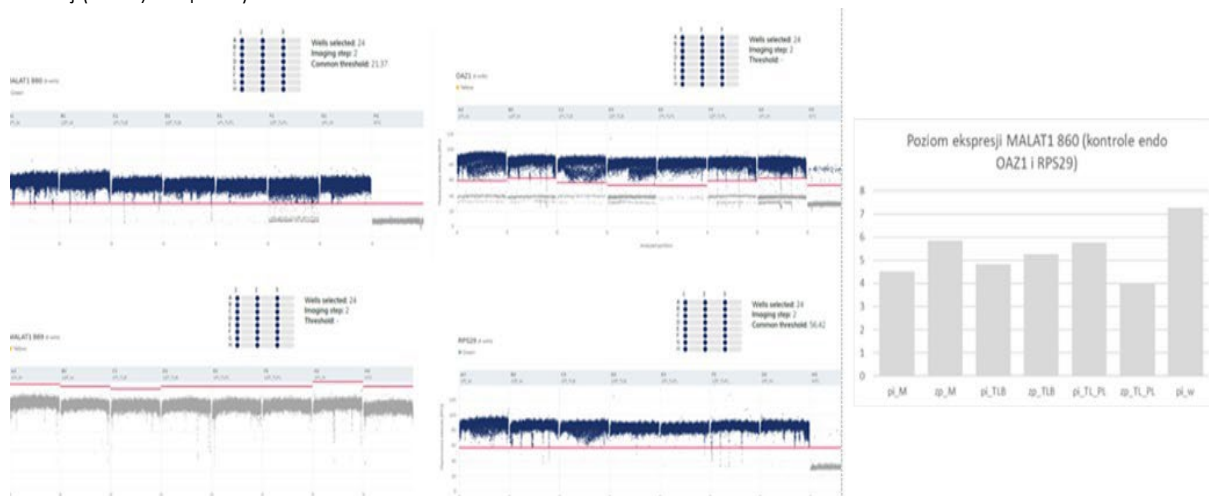


Figura 2. Ocena Ekspresji obu izoform MALAT1 z wykorzystaniem techniki digital PCR z wykorzystaniem detekcji specyficznej (sondy TaqMan).



Dodatkowo dla izoformy ENSSSCT00000080860 genu MALAT1 przeprowadzono ocenę ekspresji podczas różnicowania preadipocytów z wykorzystaniem preadipocytów wyizolowanych z tkanki podskórnej grzbietowej (słonina) pobranej od świń rasy złotnicka pstra. Ocena ekspresji ENSSSCT00000080860 genu MALAT1 wykazała istotny skok ekspresji w 3. dniu w odniesieniu do dnia przed różnicowaniem (dzień 0.) i w kolejnych dniach spadek w odniesieniu do 3. dnia, ale ekspresja była nadal wyższa w porównaniu z dniem 0.

Figura 3. Różnicujące kultury pierwotne adipocytów na różnym stadium adipogenezy. W 3., 7. i 12. dniu na pożywce różnicującej. Linie były wyprowadzane z komórek wyizolowanych z tkanki tłuszczowej podskórnej, grzbietowej pobranej zaraz poubojowo od świni rasy złotnicka pstra.

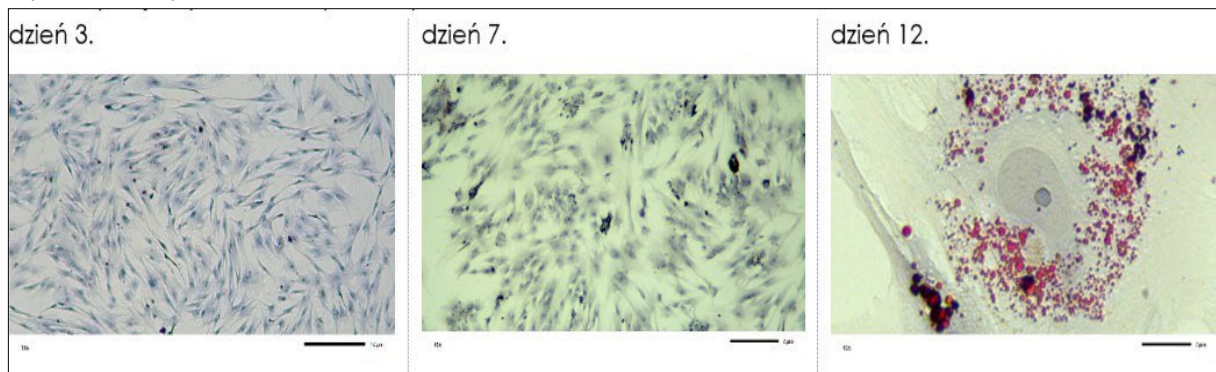
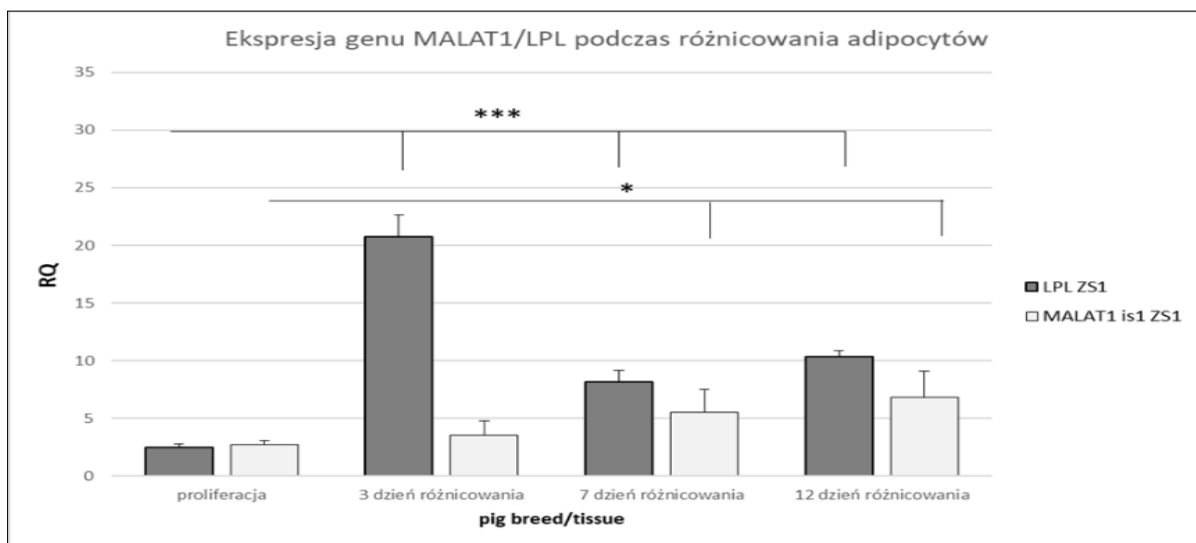


Figura 4. Poziom ekspresji genu MALAT1 izoformy ENSSSCT00000080860 (1is) w zależności od postępu adipogenezy w kulturach pierwotnych adipocytów uzyskanych z podskórnej tkanki tłuszczowej grzbietowej świni złotnicka pstra. Proliferacja, komórki namnożone na pożywce wzrostowej, przed przełożeniem na pożywkę różnicującą. LPL – marker postępu adipogenezy.



Identyfikacja mutacji w sekwencji promotorowej genu MALAT1

Ocenę mutacji w sekwencji promotorowej przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch par starterów dla promotora jednej i drugiej izoformy MALAT1. Zidentyfikowano w sumie 10 zmian polimorficznych, w tym dwie nowe. Do oceny frekwencji wszystkich zmian polimorficznych wykorzystano 7 ras świń – po 24 osobniki w każdej rasie.

Co ciekawe, rasa złotnicka biała często charakteryzowała się najwyższym udziałem procentowym dla danego polimorfizmu (rs338099140, rs695444210, rs333963848) i obserwowana frekwencja zmian polimorficznych w obrębie genu MALAT1 była widocznie różna od rasy złotnicka pstra, która to rasa najwyższą frekwencję spośród badanych prezentowała dla polimorfizmu rs321550593 (18,8%) (Tabela 1.).

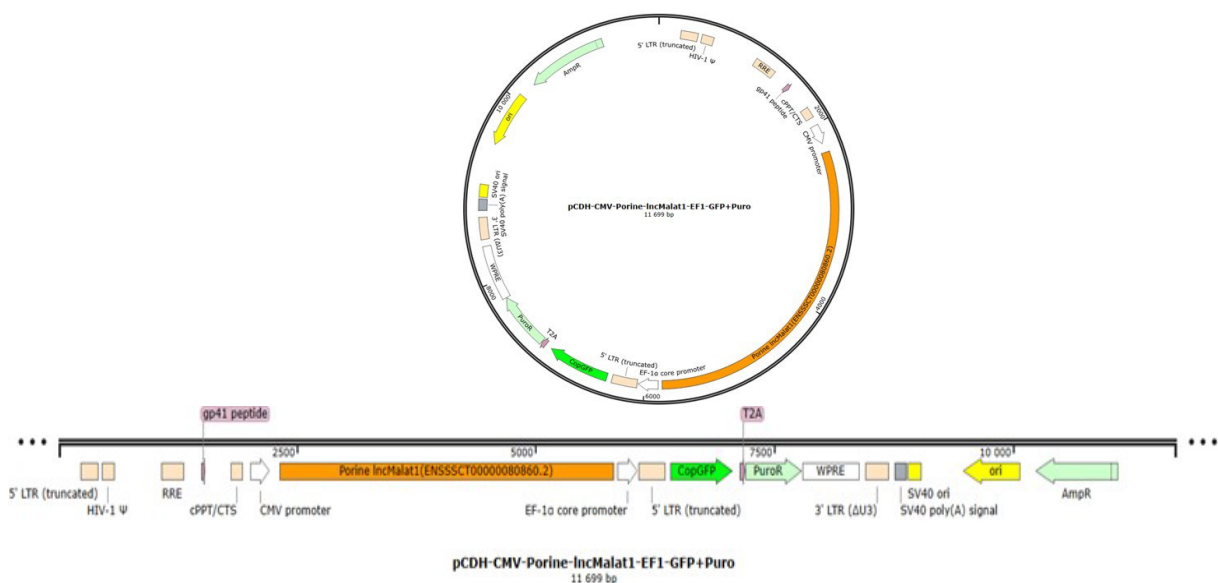
Tabela 1. Frekwencje zmian polimorficznych w obrębie sekwencji promotorowej genu MALAT1, dla izoformy ENS- SSCT00000080860 oraz ENSSSCT00000077869, z uwzględnieniem 7 ras świń należących do ras hodowlanych i zachowawczych.

rasa	rs338099140 (G)	rs329590882 (T)	rs321550593 (G)	rs695444210 (-)	NOWY CA/-	rs333963848 (G)	NOWY 1 (A)	rs318806718 (G)	rs319966827 (C)	rs338175674 (G)
puławska	0	68,8	2,1	0	0	10,4	8,3	81,3	18,8	18,8
duroc	0	6,3	0	0	8,3	29,2	2,1	4,2	46,7	46,7
Wbp	2,1	60,4	0	2,1	0	4,2	0	62,5	18,8	18,8
pietrain	0	58,3	6,3	0	0	4,2	21	58,3	37,5	35,4
Pbz	4,2	2,1	2,1	4,2	0	23	0	52,1	18,8	22,9
złotnicka pstra	0	14,6	18,8	0	4,2	8,3	0	39,6	8,3	8,3
złotnicka biała	27,1	16,7	8,3	31,3	0	31,3	0	33,3	0	31,3
Razem (%)	4,8	32,4	5,4	5,4	1,8	15,8	4,5	46,7	19	23,8

Projekt plazmidu do transfekcji na bazie wektora lentivirusowego

Plazmid został zaprojektowany tak, aby zawierał geny kodujące białka odporności na antybiotyki, które będą wykorzystywane podczas selekcji komórek transferowanych i dodatkowo gen kodujący fluorescencyjne białko GFP, co umożliwi wizualizację transferowanych komórek w świetle UV. Plazmid będzie zawierał jedną izoformę genu MALAT1 ENSSSCT00000080860 (Figura 5.). Dodatkowo, w firmie projektującej ten plazmid oraz przygotowującej wektor lentivirusowy (Creative Biogene), zamówiony został pusty plazmid zawierający wszystkie komponenty prócz genu MALAT1, który zostanie wykorzystany jako dodatkowa kontrola negatywna.

Figura 5. Zaprojektowany plazmid z wbudowanym genem MALAT1 izoforma ENSSSCT00000080860, który zostanie umieszczony w wektorze lentivirusowym.



Zadanie 01-18-23-21

Analiza wpływu CBD na mechanizmy regulacyjne związane z patogenezą sarkoidu końskiego na podstawie danych NGS.

kierownik zadania: dr hab. Ewelina Semik-Gurgul, prof. IZ PIB

Ze względu na to, że kannabidiol (CBD) staje się obecnie substancją powszechnie stosowaną do celów leczniczych, badania mają na celu określenie wpływu podawania kannabidiolu na aktywność transkrypcyjną komórek sarkoidu końskiego. Trwają prace nad ustaleniem, czy dawka i czas podawania CBD są istotnymi czynnikami modulującymi jego wpływ na komórki sarkoidu końskiego. Co więcej, przeprowadzane badania pomagają ocenić efekt antyproliferacyjny, proapoptotyczny i cytotoksyczny kannabidolu na komórki nowotworowe. Analiza obejmuje również wpływ CBD na inwazyjność komórek sarkoidu, poprzez zastosowanie testów inwazyjności komórek, jak i poprzez pomiar sekrecji białek odgrywających rolę w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-1, MMP-2 i MMP-9).

Nadrzędnym celem prowadzonych badań jest określenie siły i sposobu oddziaływania CBD na transkrypty tych komórek, czyli parametry, które pozwalają zaproponować kompleksowy mechanizm wpływu CBD na metabolizm i funkcjonowanie komórek nowotworowych w trakcie stosowanej terapii. Hipoteza badawcza zakłada, że podanie CBD spowoduje znaczące zmiany w poziomie transkrypcji wielu genów, a ich intensywność i profil będą zależą od dawki i czasu podania. Zakładamy również, że będziemy mogli zaobserwować wyraźny spadek proliferacji komórek nowotworowych i wzrost aktywności apoptotycznej prowadzącej do śmierci komórek. Uzyskane wyniki dostarczą cennych informacji niezbędnych do oceny potencjału i zakresu zastosowań CBD nie tylko w medycynie ludzkiej, ale także medycynie weterynaryjnej i leczeniu sarkoidów końskich. Będą też podstawą do dalszych badań dotyczących analizy zmian w epigenomie i proteomie pod wpływem działania kannabidolu.

Założenia metodyczne

Badania przeprowadzone zostały na trzech linii komórkowych sarkoidów końskich traktowanych kannabidolem. Ocenie poddano zarówno efekt antyproliferacyjny jak i proapoptotyczny CBD na komórki sarkoidowe. Eksperyment uwzględnił takie aspekty, jak: dawkowanie (CBD w stężeniach 20,0; 6,75; 2,25 i 0,75 μM) i czas traktowania komórek (6, 24, 48 lub 72 godziny). Analiza obejmowała wpływ CBD na: (I) podstawowe parametry komórkowe (żywołność, cytotoksyczność oraz apoptozę komórek), (II) inwazyjność komórek oraz (III) na sekrecję trzech metaloproteinaz -1, -2 i -9 związanych z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM). Co więcej, zastosowane podejście RNA-Seq, pozwoliło na obiektywną obserwację końcowego efektu CBD na ekspresję genów w analizowanych liniach komórek nowotworowych.

Wpływ CBD na żywołność komórek, cytotoksyczność i apoptozę

Do jednoczesnego pomiaru żywołności, cytotoksyczności i apoptozy komórek traktowanych CBD w określonych warunkach eksperymentalnych zastosowano test ApoTox-Glo. Wszystkie pomiary porównano do komórek kontrolnych, których żywołność ustalono na poziomie 100%. Wyniki wskazują, że żywołność komórek malała stopniowo wraz ze wzrostem stężenia CBD i wydłużaniem czasu inkubacji. Cytotoksyczność zmieniała się w zależności od dawki i czasu inkubacji, a istotne efekty zaobserwowano w różnych punktach czasowych. Apoptoza, mierzona aktywnością kaspaz-3/7, była zależna zarówno od dawki jak i czasu (Figura .1).

Ze względu na znaczny spadek żywotności po 72 godzinach inkubacji z CBD, wszystkie dalsze eksperymenty przeprowadzono bez uwzględniania punktu czasowego 72 h. Ponadto, dawkę 2,25 μM CBD wykluczono z dodatkowych analiz, ponieważ wykazywała efekty porównywalne z dawkami 0,75 μM i 6,75 μM .

Wpływ CBD na zdolność do inwazji/migracji komórek sarkoidu końskiego

Sarkoid koński charakteryzuje się miejscową inwazyjnością, polegającą na zdolności komórek sarkoidowych do naciekania okolicznych tkanek. Dlatego, w przeprowadzonych analizach zbadano również wpływ kannabidiolu na migrację i inwazyjność komórek sarkoidowych. Wyniki wykazały, że po 24 godzinach wszystkie trzy stężenia CBD znacząco zmniejszyły inwazyjność o około 34-59% ($p < 0,01$) w porównaniu z komórkami kontrolnymi, co sugeruje potencjalne zahamowanie migracji komórek. Po 48 godzinach tylko najwyższa dawka (20,0 μM) wykazała znaczącą redukcję inwazyjności (23%, $p < 0,05$) (Figura 2.).

Wpływ CBD na wydzielanie metaloproteinazy -1,-2 i -9 przez komórki sarkoidu

Wpływ CBD na wydzielanie białek MMP-1, MMP-2 i MMP-9 oceniano przy użyciu metody ELISA. Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie testowane stężenia CBD doprowadziły do istotnego zmniejszenia wydzielania MMP-1 ($p < 0,001$) we wszystkich okresach inkubacji. Ponadto, wyższe stężenie CBD również istotnie hamowało wydzielanie MMP-2 ($p < 0,05$) we wszystkich punktach czasowych, przy czym najbardziej znaczący efekt obserwowano po 6 godzinach. Uzyskane dane wskazują również, że CBD wykazało hamujący wpływ na wydzielanie białka MMP-9. Stężenie 20,0 μM CBD istotnie zmniejszało wydzielanie MMP-9 we wszystkich punktach czasowych (Figura 3.).

Wpływ kannabidiolu na profil transkrypcyjny komórek sarkoidu końskiego

Sekwencjonowanie bibliotek cDNA wygenerowało średnio 65,1 miliona odczytów sekwencyjnych na próbkę. Procent odczytów zmapowanych do genomu referencyjnego Ensembl EquCab3.0 wahał się od 89,2% do 96,5% na próbkę, z czego od 51,31 do 80,51% stanowiły sekwencje zmapowane do sekwencji genu (intron+egzon), a od 19,5% do 48,7% do regionu międzygenowego. Analiza różnicowej ekspresji genów (DEG) w zależności od stężenia CBD i czasu inkubacji wykazała zróżnicowane odpowiedzi komórek sarkoidowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano od 3 do 1591 DEG ($\text{FDR} < 0,1$; $\text{FC} > 2,0$). W przypadku stężenia 6,75 μM zaobserwowano znaczny wzrost liczby DEG po 6 godzinach (700 genów), który drastycznie spadł po 24 godzinach (3 geny) i utrzymywał się na niskim poziomie po 48 godzinach (3 geny). Może to sugerować szybkie, ale przejściowe działanie tej dawki. Najniższe stężenie (0,75 μM) wykazało niewielką liczbę DEG po 6 godzinach (19 genów), ale ich liczba znacznie wzrosła po 24 godzinach (432 geny) i osiągnęła maksimum po 48 godzinach (1591 genów).

Dane te mogą sugerować opóźnioną, lecz bardziej rozległą odpowiedź komórek na niską dawkę CBD. Stwierdzono również, iż wytypowane DEG różnią się w zależności od dawki CBD i czasu traktowania. Liczba wspólnych DEG była niewielka i wahała się od 1 do 99 genów, w zależności od porównywanych parametrów (dawki lub czasu traktowania komórek), co sugeruje specyficzną odpowiedź komórek na różne warunki eksperymentalne.

Wśród zidentyfikowanych DEG znalazły się m.in. *PIK3CA*, *VEGFA*, *LAMA5*, *MCM2*, *POLA1*, *FOS*. Wymienione geny odgrywają istotne role w kluczowych procesach nowotworowych, takich jak: proliferacja, angiogeneza, inwazyjność i unikanie apoptozy.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono również spadek ekspresji genów kodujących metaloproteinazy (MMP-2, MMP-12, MMP-14 i MMP-19) w komórkach sarkoidu inkubowanych z CBD przez 48 godzin. Nie zaobserwowano jednak zmian w poziomie ekspresji genów kodujących wcześniej badanych białek MMP-1 i MMP-9. Wyniki te sugerują, że CBD może oddziaływać na poziom tych białek w komórce bez zmiany ekspresji ich genów, poprzez przykładowo modulację translacji, stabilności białek, posttranslacyjnych modyfikacji i aktywności mikroRNA.

Analiza adnotacji funkcjonalnej i klasyfikacja ontologiczna genów DEG umożliwiła identyfikację 3 514 wzbogaconych terminów GO (FDR<0.05), w tym 1-1000 terminów procesów biologicznych (BP), 1-132 terminów składników komórkowych (CC) oraz 3-160 terminów funkcji molekularnej (MF). W przypadku dawki 20,0 μM i 24 godzinnej inkubacji oraz 6,75 μM i 48 h, nie wykryto żadnych istotnych ścieżek KEGG i terminów klasyfikacji ontologicznej GO. Dla stężenia CBD 0,75 μM i 6 h traktowania oraz 6,75 μM i 24 h wykryto tylko nieliczne terminy GO.

Walidacja wyników sekwencjonowania NGS

Do potwierdzenia danych uzyskanych z sekwencjonowania bibliotek cDNA wybrano sześć zidentyfikowanych genów o różnicowej ekspresji (*PIK3CA*, *VEGFA*, *NFKBIZ*, *HAS2*, *THBS2*, *FOS*). Walidacja z wykorzystaniem metody qPCR wykazała zgodność z wynikami NGS dla pięciu z sześciu badanych DEG, dla których odnotowano ten sam kierunek zmian ekspresji. Ponadto korelacja pomiędzy tymi wartościami była dodatnia, a współczynniki mieściły się w przedziale 0,826-1 ($p<0,05$). Tylko w przypadku *NFKBIZ* odnotowano słabą, nieistotną statystycznie korelację oraz niezgodność poziomu ekspresji określonego z wykorzystaniem metody NGS oraz qPCR.

Podsumowanie

Reasumując, uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na zależny od dawki i czasu spadek żywotności komórek sarkoidu końskiego, przy czym istotna redukcja występuje przy wyższych stężeniach i przedłużonej ekspozycji na kanabidiol (CBD). Otrzymane dane sugerują, że CBD skutecznie ogranicza zdolność komórek do migracji i inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej. Tezę tą potwierdzają również wyniki dotyczące sekrecji metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2 oraz MMP-9). W tym przypadku również najsilniejszy efekt zaobserwowano przy najwyższych stężeniach (20 μM), zwłaszcza po 6 i 48 h, podczas gdy najniższa dawka (0,75 μM) wykazywała opóźniony efekt, osiągając znaczącą redukcję po 24 i 48 godzinach.

Przeprowadzona analiza transkryptomu komórek sarkoidu końskiego traktowanego kanabidiolem wskazuje, że CBD wpływa na ekspresję genów w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji z hodowlą komórkową. Liczba genów o różnicowej ekspresji była zróżnicowana i wahała się od 3 do 1591, a niewielka liczba wspólnych DEG sugeruje specyficzną odpowiedź komórek na różne warunki eksperymentalne. Analiza funkcjonalna ujawniła istotne wzbogacenie terminów GO, związanych z regulacją procesów komórkowych, mitotycznych oraz adhezji komórek, co wskazuje na potencjalny wpływ CBD na proliferację i zdolność migracji komórek nowotworowych. Brak istotnych ścieżek w przypadku wyższych dawek i dłuższych czasów inkubacji może wskazywać na specyficzne mechanizmy adaptacyjne lub zahamowanie aktywności komórkowej. Ponadto, zaobserwowano, że CBD może wpływać na poziom białek MMP-1 i MMP-9 w komórce sarkoidu nie zmieniając bezpośrednio ekspresji genów kodujących te białka.

Podsumowując, uzyskane wyniki identyfikują możliwe mechanizmy molekularne działania CBD w ograniczaniu wzrostu i inwazyjności komórek sarkoidowych, z potencjalnym zastosowaniem w terapii tego schorzenia.

Zaobserwowano zależny od czasu i dawki efekt działania CBD na komórki sarkoidu, co podkreśla złożoność jego wpływu na zachowanie komórek. Należy zwrócić także uwagę, iż wyniki te wskazują na potrzebę optymalizacji dawki i czasu w zastosowaniach terapeutycznych CBD w leczeniu sakoidu końskich i wskazują na potencjalne cele przyszłych badań.

Figura 1. Wpływ czterech testowanych stężeń CBD i różnych czasów traktowania na żywotność komórkową, cytotoksyczność i apoptozę komórek sarkoidu końskiego. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy (SE) trzech niezależnych eksperymentów (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

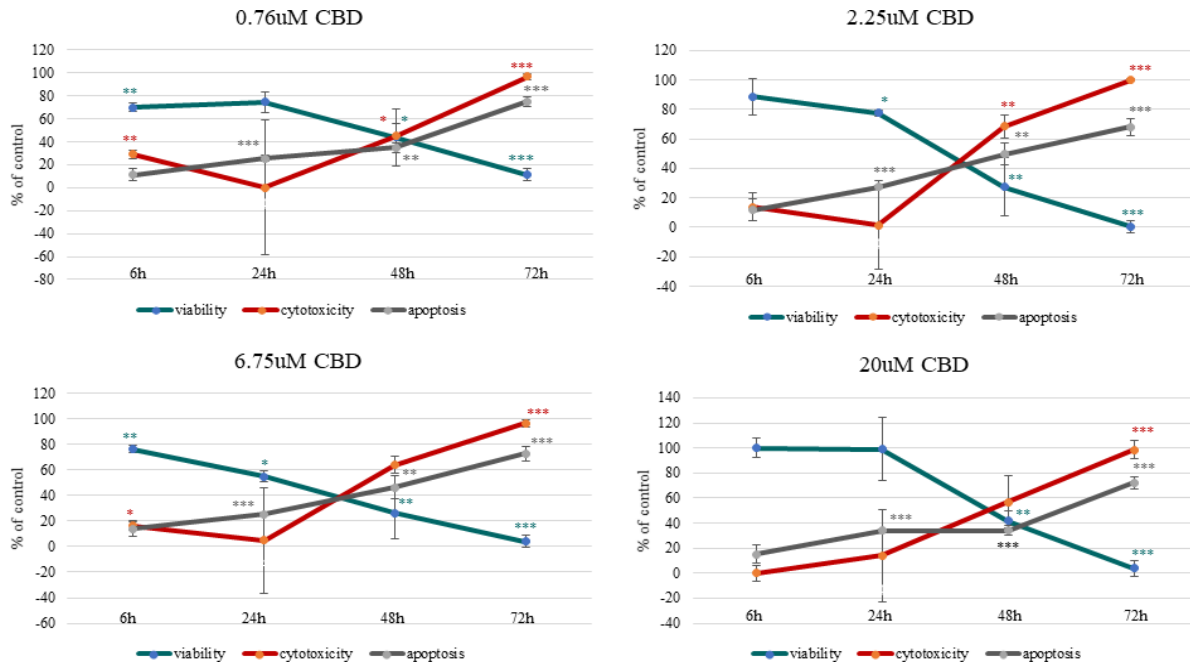


Figura 2. Wpływ testowanych stężeń CBD na inwazyjność komórek sarkoidu obserwowanych w różnych punktach czasowych. (A) Frakcja komórek, które wniknęły do dolnej powierzchni membrany/macierzy ECM po traktowaniu różnymi stężeniami CBD lub DMSO (kontrola). (B) Różnice w procencie komórek migrujących po traktowaniu CBD, określone ilościowo w porównaniu z komórkami z DMSO, średnia $\pm$ SD (odchylenie standardowe) z trzech niezależnych eksperymentów (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

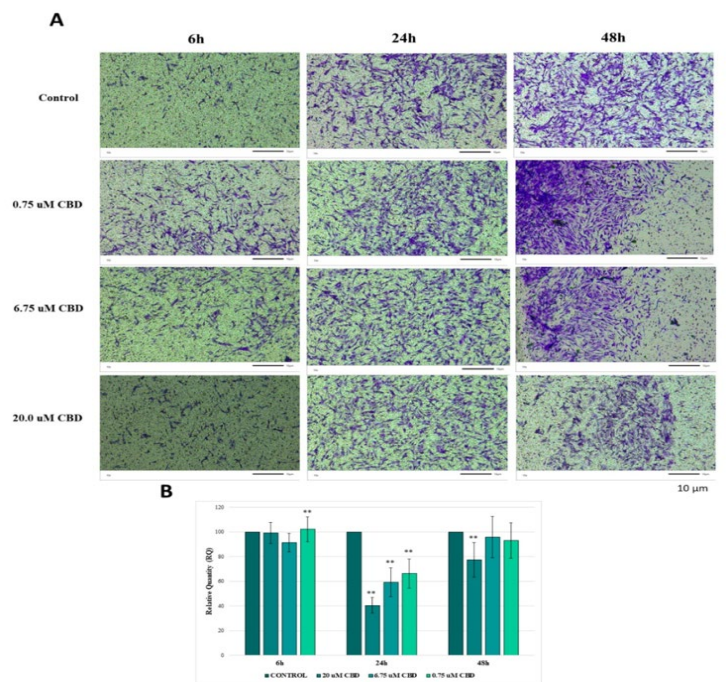
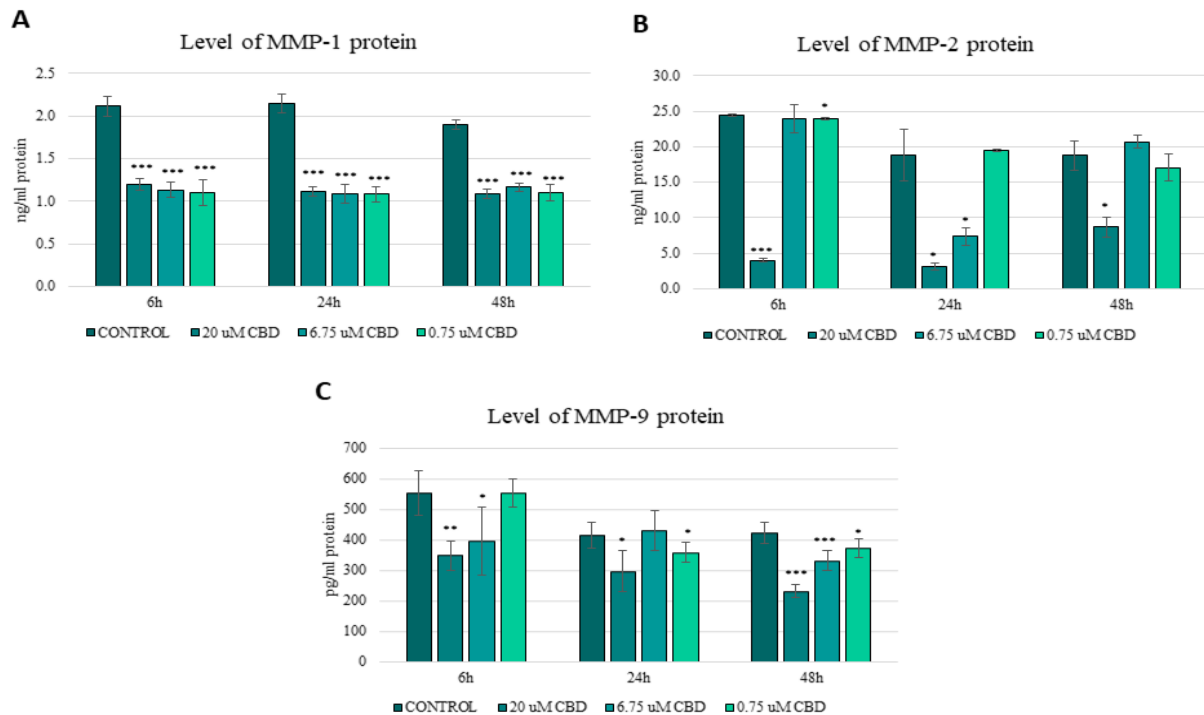


Figura 3. Poziom białka metaloproteinazy 1(A), 2(B) i 9 (C) w zebrany medium, dla trzech zastosowanych dawek CBD i w różnych czasach inkubacji w hodowli komórkowej. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD (odchylenie standardowe) z trzech niezależnych eksperymentów (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Zadanie 01-18-25-21

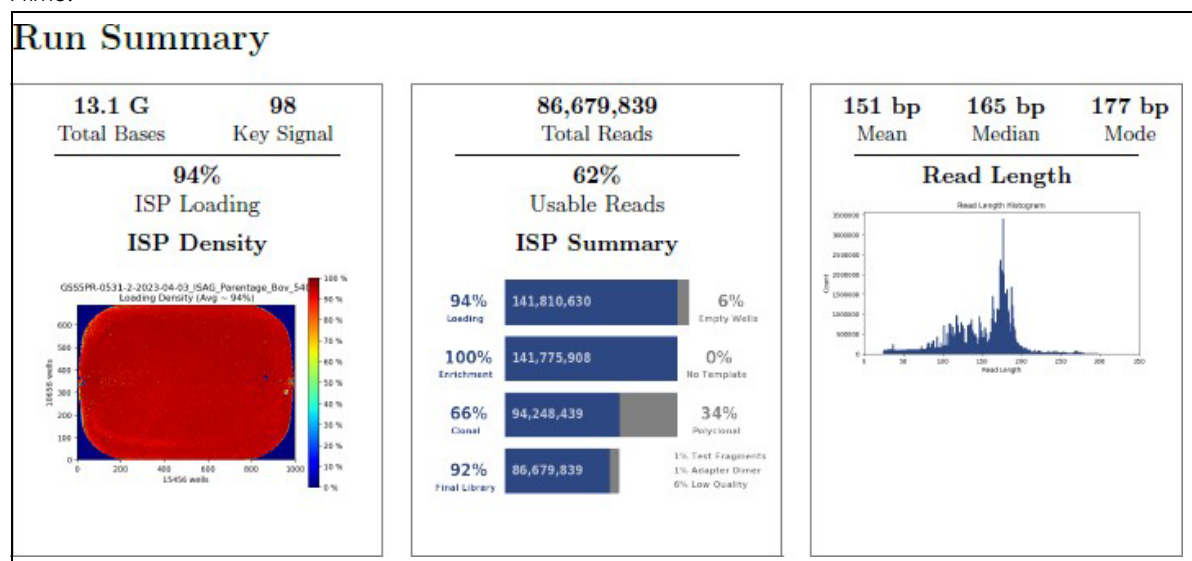
Multi-gatunkowa, symultaniczna analiza markerów SNP – opracowanie i implementacja nowej metodyki badawczej.

kierownik zadania: dr Agata Piestrzyńska-Kajtoch

Nadążając za nowymi trendami w kontroli rodowodów zwierząt i analizy profili genetycznych, w oparciu o markery SNP, jako cel zadania przyjęto opracowanie i przygotowanie do wdrożenia metod opartych na analizie SNP z wykorzystaniem systemu do sekwencjonowania nowej generacji (NGS), z rozwiązaniami AgriSeq targeted GBS.

Wybrano i pozyskano panele starterów dla markerów SNP do analiz identyfikacji osobniczej dla bydła i psów. Opracowano metodyki do przygotowania bibliotek dla tych gatunków pod kątem identyfikacji osobniczej, przygotowano gotowe protokoły. Wykonano wstępne analizy z wykorzystaniem tych paneli w celu sprawdzenia poprawności opracowanych metodyk dla próbek testowych. Wybrano próbki do dalszych testów.

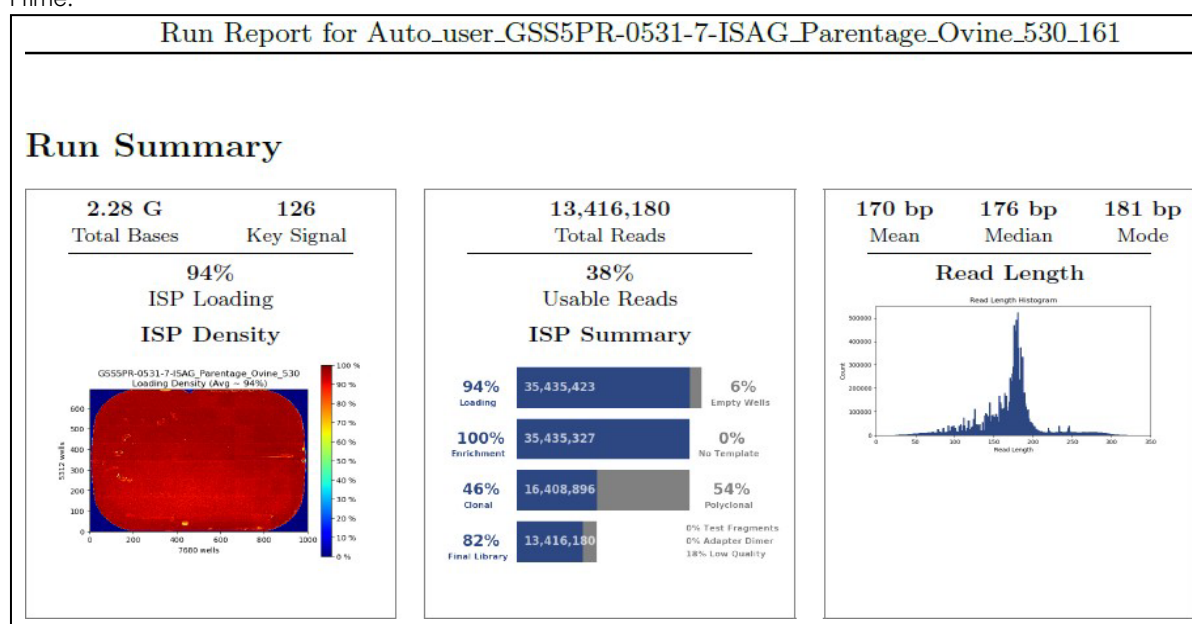
Rycina 1. Wynik analizy GBS dla panelu SNP bydła do identyfikacji osobniczej z aparatu Ion Torrent GeneStudio S5 Prime.



Laboratorium zaangażowało się w proces przygotowania panelu markerów SNP do identyfikacji osobniczej owiec. W ramach współpracy z ISAG wybrane zostały 242 markery SNP owiec.

Pod koniec roku pozyskano testowy panel starterów do GBS do analiz tych markerów. Zakupiono odczynniki niezbędne do przygotowania bibliotek GBS i odczynniki do analiz SNP w Ion Torrent GeneStudio S5 Prime i prac przygotowawczych z użyciem robota Ion Chef. Wytypowano i przygotowano próbki do analiz. Dopracowano schematy normalizacji próbek do tych analiz. Wykonano analizę testową z użyciem chipu 530 (Rycina 2.). Uzyskano bardzo dobry wynik Loading'u i nieco gorszy, jeśli chodzi o poliklonalność, co może świadczyć o konieczności obniżenia stężenia otrzymanych bibliotek. Testy metodyki są kontynuowane.

Rycina 1. Wynik analizy GBS dla panelu SNP owiec do identyfikacji osobniczej z aparatu Ion Torrent GeneStudio S5 Prime.



Wybrano zestaw do analizy mutacji genetycznych psów. Rozpoczęto testowanie metodyki. Wytypowano mutacje do panelu dla owiec typu „Custom”.

Sprawdzono możliwości i zaplanowano testowe analizy łączenia różnych paneli markerów z uwzględnieniem wielkości poszczególnych paneli, możliwości różnych chipów, ilości analizowanych próbek dla danego gatunku i rekomendacji ISAG odnośnie użycia paneli markerów SNP.

Laboratorium zgłosiło swój udział w międzynarodowych testach porównawczych kontroli rodowodów zwierząt w oparciu o markery SNP organizowanych przez ISAG dla owiec, psów i bydła.

Zadanie 01-18-26-11

Identyfikacja osobnicza i gatunkowa w rodzinie jeleniowatych.

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

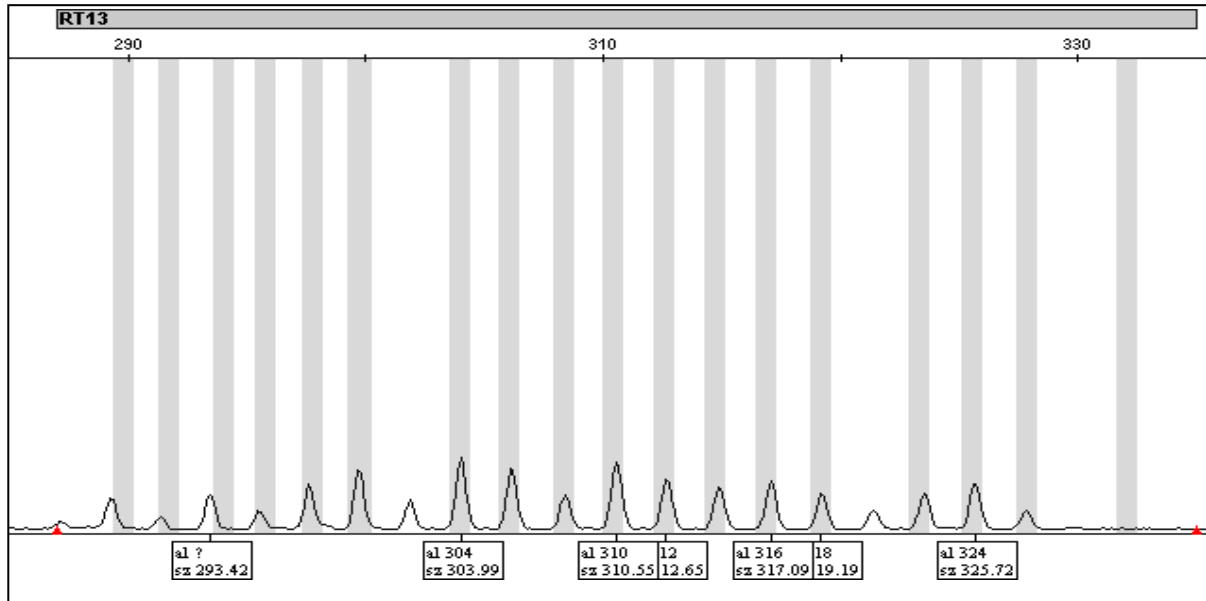
Hodowla jeleniowatych w Polsce rozwija się, rośnie również spożycie dziczyzny. Celem głównym zadania jest opracowanie i wdrożenie prostej, ekonomicznej metody umożliwiającej rozróżnianie różnych gatunków z rodziny jeleniowatych, aktualizacja metod identyfikacji osobniczej saren i jeleni szlachetnych, a także adaptacja i opracowanie metod identyfikacji osobniczej dla danieli, łosi i jeleni sika.

Opracowano metodę identyfikacji DNA pochodzącego od jeleniowatych, takich jak: jeleni szlachetny, sarna, daniel, łos. Metoda oparta jest na identyfikacji fragmentu mtDNA (Cytochrom B) o dużej homologii dla identyfikowanych gatunków. Dodatkowo, dla rozróżnienia poszczególnych gatunków można zastosować sekwencjonowanie Sangera. Identyfikowany fragment DNA jest krótki, poniżej 200 pz, co zapewnia możliwość jego zastosowania dla próbek surowych, przetworzonych i zdegradowanych.

Ponadto, dla rozróżnienia jelenia szlachetnego, jelenia sika, sarny, łosia i daniela opracowano dwa zestawy starterów pozwalających na identyfikację wszystkich wymienionych gatunków. Wybrany do testu fragment DNA wykazuje homologie w zakresie 88% -97% w zależności od konkretnego gatunku.

We wszystkich wspomnianych metodach zastosowano startery niewykazujące żadnego podobieństwa do innych gatunków zwierząt i roślin. Ma to zapewnić możliwość ich szerszego zastosowania np. analizy materiału złożonego. Wszystkie metody są w trakcie walidacji.

Rozpoczęto aktualizację metod identyfikacji osobniczej jeleni i saren. Zakupiono nowe startery i przetestowano je dla jeleni i saren na sekwenatorach Genetic Analyzer 3500xl i SeqStudio Flex. Zgodnie z przypuszczeniami, okazało się, że trzeba od nowa ustawić i zwalidować biny dla obu paneli, a także zweryfikować pojawiające się niespecyficzne przesunięcia markerów. Wykonano drabinkę *alleliczną* dla panelu jeleni, która potwierdziła przesunięcia markerów na obu tych sekwenatorach względem wycofanego już z użycia sekwenatora Genetic Analyzer 3130xl (Rycina 1.).

Rycina 1. Drabinka *alleliczna* markera RT13.

Niektóre z markerów przetestowano w monopleksach w celu weryfikacji czy niespecyficzne piki poza zakresem danego markera są *allelami*, czy tylko efektem przebieg z innych markerów. Dopracowano schemat rozcieńczeń produktów PCR, aby wykluczyć przebiecia fluorescencji spowodowane zbyt wysokimi stężeniami produktów. Zaprojektowano startery do sekwencjonowania wszystkich markerów, aby nowe binsety i nazwy *alleli* ustawić według rzeczywistej liczby powtórzeń motywów powtarzalnych.

Na podstawie istniejącej literatury wytypowano markery STR do panelu identyfikacji osobniczej łośi, danieli i jeleni sika. Rozpoczęto testowanie panelu dla łośi. Przeprowadzono wstępne analizy na sekwenatorze Genetic Analyzer 3500xl. Ze względu na brak amplifikacji stwierdzono konieczność wymiany kilku markerów z panelu dla jeleni na inne, m.in. dla markera RT1 i konieczność zmiany stężenia starterów, w tym dla markera T193. Zaplanowano kolejne etapy analiz i wytypowano markery zastępcze, które będą testowane w 2025 roku.

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

Zadanie 01-19-11-21

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

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

Celem zadania była izolacja *post mortem*, wyprowadzanie oraz ocena szpikopochodnych i adipogennych komórek MSCs oraz weryfikacja ich zdolności do różnicowania w warunkach *in vitro*. W ramach realizacji zadania kontynuowano wyprowadzanie hodowli pierwotnych linii komórek MSCs, posiadających zdolność do samoodnawiania subpopulacji komórkowych w warunkach pozaustrojowych. Następnie, komórki te poddawano weryfikacji immunofluorescencyjnej w kierunku potwierdzenia charakteru macierzystego pod kątem identyfikacji immunofenotypu, obejmującego właściwy zakres ekspresji błonowych i transbłonowych markerów powierzchniowych (z rodziny kompleksów różnicowania – CD; ang. *clusters of differentiation*). Weryfikację przeprowadzono w oparciu o analizę cytometryczną ekspresji białek CD14, CD44, CD45, CD90 i CD105.

Kolejnym etapem badań była weryfikacja zdolności komórek MSCs do różnicowania w warunkach *in vitro*. W tym celu przeprowadzono identyfikację klasycznych ścieżek różnicowania w kierunku osteoblastów/osteocytów, chondroblastów/chondrocytów i adipocytów. Ponadto, wyprowadzono pierwotne linie komórek MSCs pozyskanych ze szpiku kostnego (BM- MSCs) i tkanki tłuszczowej (AT-MSCs). W hodowli *in vitro* po uzyskaniu konfluencji na poziomie ok. 60% komórki poddano różnicowaniu w kierunku keratynocytów (KDD), kardiomiocytów (KMDD) i komórek nerwowych (NDD). Różnicowanie przeprowadzono zgodnie ze schematem zawartym w metodyce zadania. Równocześnie prowadzono hodowlę komórek BM-MSCs i AT-MSCs stanowiących kontrolę negatywną. Zróżnicowane komórki BM-MSCs i AT-MSCs w kierunku w/w typów komórek zbankowano (Tabela 1.) w celu dalszych analiz (molekularnych/fluorescencyjnych) potwierdzających ich zróżnicowany charakter.

Tabela 1. Zestawienie kriogenicznie zabezpieczonych zróżnicowanych komórek BM-MSCs i AT-MSCs.

	Lp. dawców	KDD	KMDD	NDD	MSC
AT-MSCs	6	5x	6x	5x	6x
BM-MSCs	6	4x	6x	6x	6x

Zgromadzony materiał zostanie poddany analizom w celu wykazania komórkowo-specyficznych różnic w ścieżkach różnicowania pozaustrojowego szpikopochodnych i adipogenicznych komórek MSC.

Zadanie 01-19-12-21

Opracowanie i ocena parametrów molekularnych różnych systemów wyprowadzania i różnicowania in vitro blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych wybranych gatunków ptaków hodowlanych.

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

Cel zadania

1. Opracowanie efektywnych metod izolacji komórek blastodermalnych z tarczek zarodkowych zapłodnionych jaj kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) oraz wyprowadzania hodowli pierwotnych i linii blastodermalno-pochodnych embrionalnych komórek macierzystych;
2. Stworzenie nowych modeli ex ovo pozwalających na szczegółową eksplorację biomarkerów molekularnych oraz różnych ścieżek cytodyferencjacji blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych kury domowej.

W ramach pierwszego etapu realizacji zadania badawczego opracowano zupełnie nowe procedury badawcze ukierunkowane na stworzenie innowacyjnych modeli *in vitro* wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs; ang. *blastoderm-derived embryonic stem cells*) kury domowej na potrzeby:

1. określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, proliferacji, zewnętrzkomórkowej stabilizacji fenotypowych cech pluripotencji oraz systemów różnicowania ex ovo komórek B-ESCs – przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biologii i biotechnologii reprodukcyjnej oraz molekularnej, a także embriologii eksperymentalnej i stosowanej oraz inżynierii komórkowej,
2. określenia predyktorycznych parametrów molekularnych, obejmujących detekcję biomarkerów proteomicznych oraz białkowych wskaźników immunofluorescencyjnych, determinujących:
 - a) stabilne utrzymanie pluripotencji i charakteru macierzystego przez niezróżnicowane komórki B-ESCs,
 - b) zachowanie cech odpowiedzialnych za trwałą cytodyferencjację komórek B-ESCs w kierunku wyspecjalizowanych komórek somatycznych pochodzenia ektodermalnego (ścieżka gliogenicznego różnicowania ex ovo w kierunku komórek Schwanna (neurolemocytów),
 - c) utrwalenie pozaustrojowych warunków współhodowli B-ESC-pochodnych komórek Schwanna kury domowej z komórkami neuronalnymi szczura laboratoryjnego, sprzyjających inicjacji i progresji procesów mielinizacji, czyli tworzenia osłonek mielinowych wzdłuż neurolemmy aksonów komórek nerwowych (neuronów) poprzez czynne zaangażowanie B-ESC-pochodnych neurolemocytów w przestrzenne formowanie/modelowanie ultrastrukturalnej sieci fosfosfingolipidów (w tym sfingomieliny), glikosfingolipidów/cerebrozydów (z udziałem galaktozyloceramidu), glikozylowanych lipoprotein oraz glikoprotein mieliny.

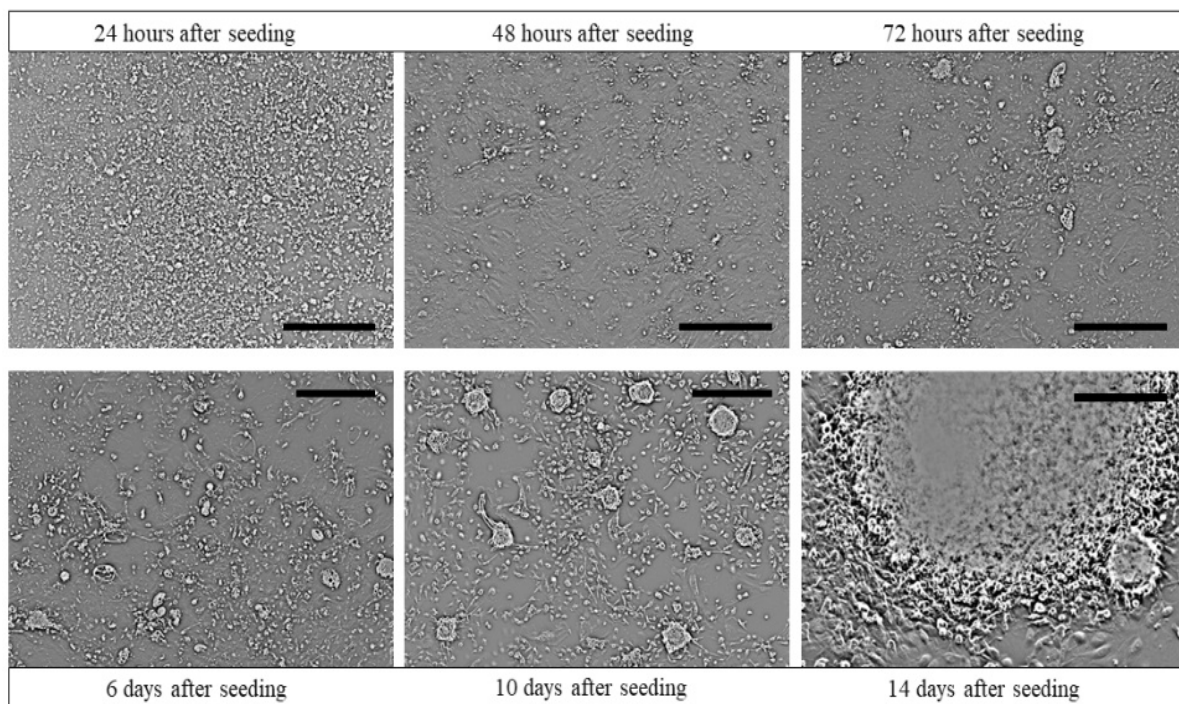
Efektem realizacji pierwszego etapu niniejszego zadania badawczego było również skonstruowanie nowatorskiego modelu *in vitro* skutkującego potwierdzeniem aktywności cytofizjologicznej oraz cech ultrastrukturalnych mielinizujących neurolemocytów, uzyskanych w wyniku gliogenicznego różnicowania namnożonych ex ovo linii pluripotentnych komórek B-ESCs kury domowej.

Podsumowując, w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań, sformułowano następujące wnioski:

1. Opracowano nowe procedury badawcze w zakresie izolacji oraz optymalizacji warunków adhezji *ex ovo* blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej (Rycina 1.) – na potrzeby stworzenia modelu różnicowania *in vitro* komórek B-ESCs w kierunku neurolemocytów (komórek Schwanna) w kontekście prowadzenia badań translacyjnych o potencjale implementacyjnym w embriologicznie wspomaganej medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej układu nerwowego ssaków i człowieka.
2. Opracowano nową procedurę badawczą ukierunkowaną na stworzenie modelu *in vitro* wyprowadzania hodowli pierwotnych oraz klonalnych linii zarodkowych komórek macierzystych wyizolowanych z blastodermi embriodysków kury domowej (Rycina 1.) – na potrzeby stworzenia modelu różnicowania *in vitro* komórek B-ESCs w kierunku neurolemocytów (komórek Schwanna) dla celów badań translacyjnych o potencjale implementacyjnym w embriologicznie wspomaganej medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej układu nerwowego ssaków i człowieka.
3. Opracowano nową procedurę badawczą ukierunkowaną na stworzenie modelu *in vitro* proliferacji i samoodnawiania populacji blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych kury domowej w celu charakterystyki ich profilu proteomicznego determinującego pluripotencję (Rycina 2.) – na potrzeby stworzenia modelu różnicowania *in vitro* komórek B-ESCs w kierunku neurolemocytów (komórek Schwanna) – pod kątem prowadzenia badań translacyjnych o potencjale implementacyjnym w embriologicznie wspomaganej medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej układu nerwowego ssaków i człowieka.
4. Opracowano nową procedurę badawczą w oparciu o model poza-jajowej identyfikacji immunofenotypowej pluripotentnych komórek B-ESCs kury domowej (Rycina 3.) – na potrzeby stworzenia modelu różnicowania *in vitro* komórek B-ESCs w kierunku neurolemocytów (komórek Schwanna) dla celów badań translacyjnych o potencjale implementacyjnym w embriologicznie wspomaganej medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej układu nerwowego ssaków i człowieka.
5. Stworzono efektywny model wyprowadzania i stabilizacji wzrostu proliferacyjnego *ex ovo* pierwotnych komórek zarodkowych wyizolowanych z blastodermi embriodysków blastul kury domowej, a także skonstruowano pionierski model indukowalnego różnicowania poza-jajowego, wyprowadzonych komórek B-ESCs, ukierunkowanego na ich molekularne prze-programowanie strukturalno-funkcjonalne w kierunku gliogenezy, czyli utworzenia komórek glejowych Schwanna (Ryciny 4.–6.), stanowiących ekwiwalent oligodendrocytów mózgowia i rdzenia kręgowego w obwodowym układzie nerwowym – w ramach inżynierii hodowli komórkowych, medycyny i bioinżynierii regeneracyjnej tkanek oraz embriologii eksperymentalnej i stosowanej.
6. Skonstruowano innowacyjny model mielinizacji *in vitro* w warunkach współhodowli B-ESC-pochodnych komórek Schwanna (komórek przypominających neurolemocyty) kury domowej z liniami komórek neuronalnych szczura laboratoryjnego, w którym wykazano po raz pierwszy pokonanie trans-gatunkowej bariery filogenetycznej między gromadą: ptaki (Aves) a gromadą: ssaki (Mammalia) w zakresie stabilnego utrzymania funkcji cytofizjologicznych kurzych komórek Schwanna w obecności szczurzych neuronów hipokampalnych poprzez ich aktywny współdział w tworzeniu osłonki mielinowej wokół neurolemmy aksonów i/lub

dendrytów formujących włókna nerwowe (Rycina 7.). Ten pionierski model badawczy *ex vivo* może stanowić solidną podstawę dla realizacji i powodzenia założeń dalszych, bardziej zaawansowanych prac badawczo-rozwojowych z zakresu badań translacyjnych o potencjale aplikacyjnym w terapiach biomedycznych chorób neurodegeneracyjnych ssaków, w tym człowieka. W tym aspekcie, szczególną uwagę należy zwrócić na zabiegi medycyny regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej ośrodkowego układu nerwowego, ukierunkowane – poprzez ksenotransplantację uzyskanych w warunkach *ex ovo* B-ESC-pochodnych komórek Schwanna ptaków – na hamowanie procesów demielinizacji oraz inicjację i progresję procesów mielinizacji *de novo* włókien nerwowych rdzennych istoty białej w obrębie struktur korowych i podkorowych mózgowia u ssaków.

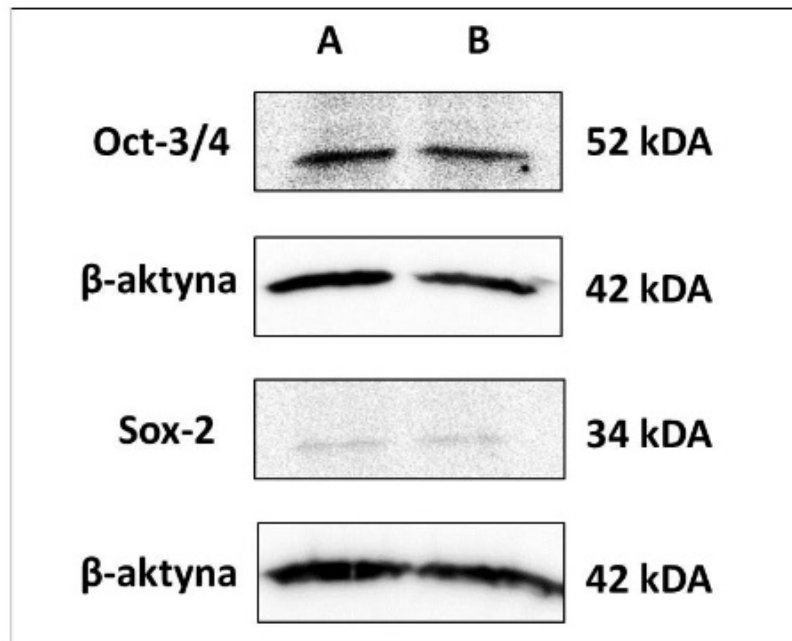
Rycina 1. Opracowanie modelu wyprowadzania *ex ovo* blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) z embriodysków wyizolowanych z zapłodnionych jaj kury domowej na potrzeby określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych ich izolacji, adhezji oraz proliferacji *in vitro*.



Analiza proliferacyjnego wzrostu oraz ocena cytologiczna prowadzona podczas 14-dniowej hodowli namnażającej blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) pochodzących z zapłodnionych jaj kury domowej. Komórki B-ESCs odznaczają się obecnością dużych jąder, zaś integralną częścią ultrastruktury ich nukleoplazmy są wyraźne jąderka zlokalizowane w przeważającej większości w pobliżu wewnętrznych warstw/blaszek otoczki jądrowej. Komórki początkowo podlegają proliferacji w monowarstwie, w obrębie której granice między poszczególnymi komórkami są zdecydowanie rozróżnialne (do 3. dnia hodowli *ex ovo*).

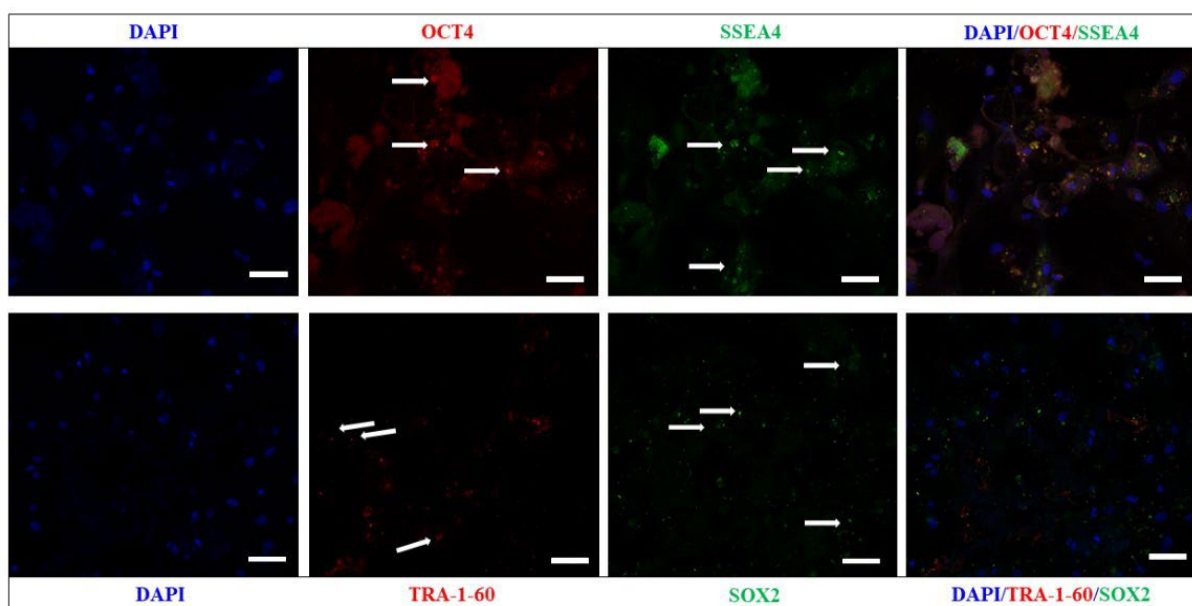
W dalszych etapach hodowli (powyżej 3. dnia), skupiska kurzych komórek B-ESCs tworzą zwarte kolonie wielowarstwowo ułożonych komórek, ułożonych w charakterystyczne cystoidalne ciała zarodkowe.

Rycina 2. Opracowanie modelu *in vitro* wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej na potrzeby określenia profilu proteomicznego zależnego od relatywnej ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji *ex ovo* przez komórki ESCs.



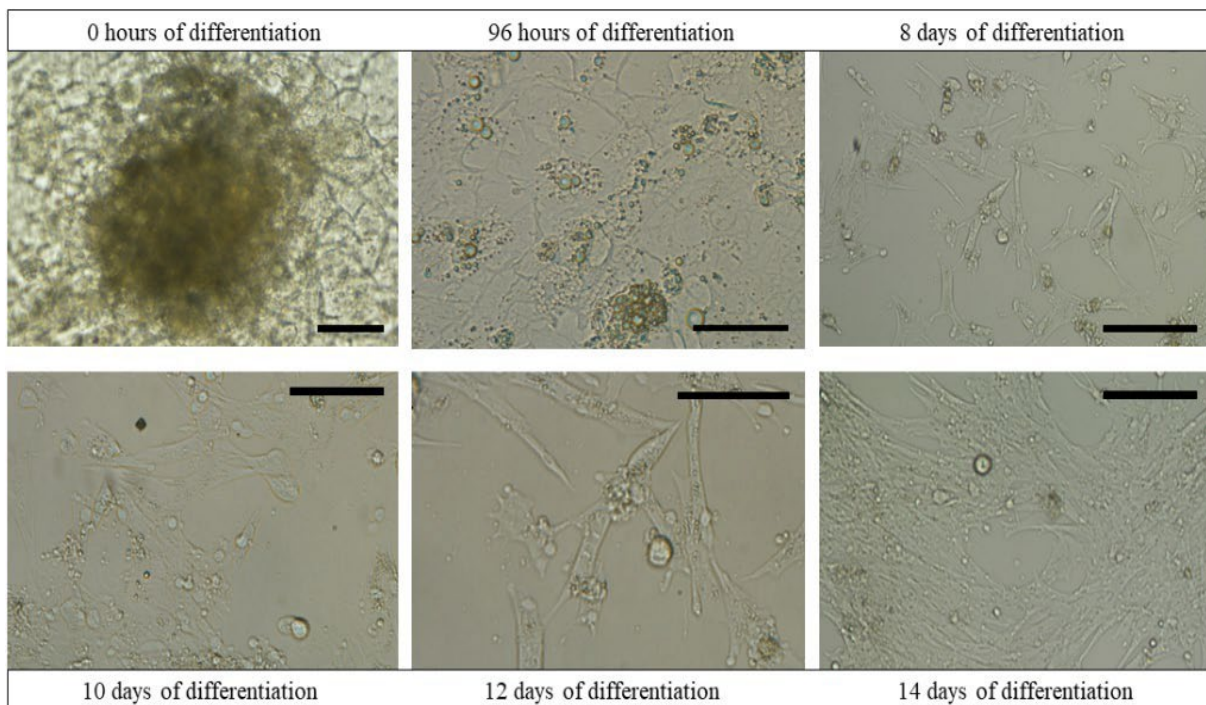
Analiza półilościowa Western-blot (W-B) biomarkerów pluripotencji Oct-3/4 i Sox-2 na poziomie białka całkowitego, wyizolowanego z blastodermalno-pochodnych komórek ESCs w ok. 15. pasażu ich hodowli *in vitro* z wykorzystaniem szklanych mikro płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) (A) oraz z wykorzystaniem polistyrenowych szalek hodowlanych z podłożem powlekany kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (B).

Rycina 3. Immunofluorescencyjna lokalizacja wybranych biomarkerów pluripotencji (Oct-4, TRA-1-60, SSEA-4 i Sox-2) w blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórkach macierzystych kury domowej po 14 dniach namnażającej hodowli *ex ovo*.



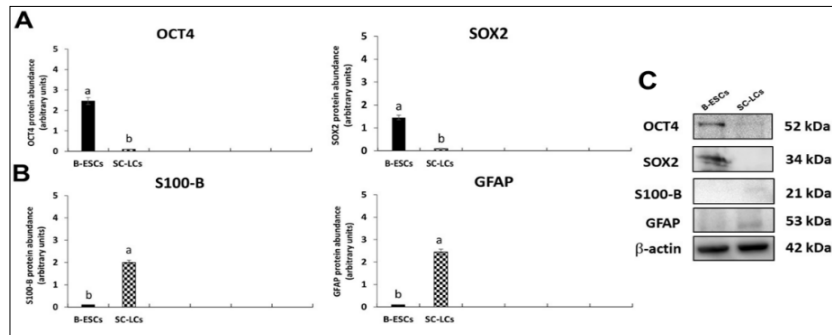
Mikrofotografie przedstawiają komórki B-ESCs, rosnące w postaci jednej warstwy – detekcja czerwonych sygnałów pochodzących od fluorochromu Alexa Fluor™ 555 oznacza, odpowiednio: wewnątrzkomórkową immunolokalizację cząsteczek białka Oct-4 (homeotyczny czynnik transkrypcyjny) – górny panel oraz zewnątrzkomórkową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

Rycina 4. Opracowanie innowacyjnego modelu gliogenicznej cytodyferencji ex ovo blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) poprzez ich molekularne przeprogramowanie w kierunku komórek przypominających neurolemocyty (komórki Schwanna; SC-LCs; ang. *Schwann cell-like cells*).



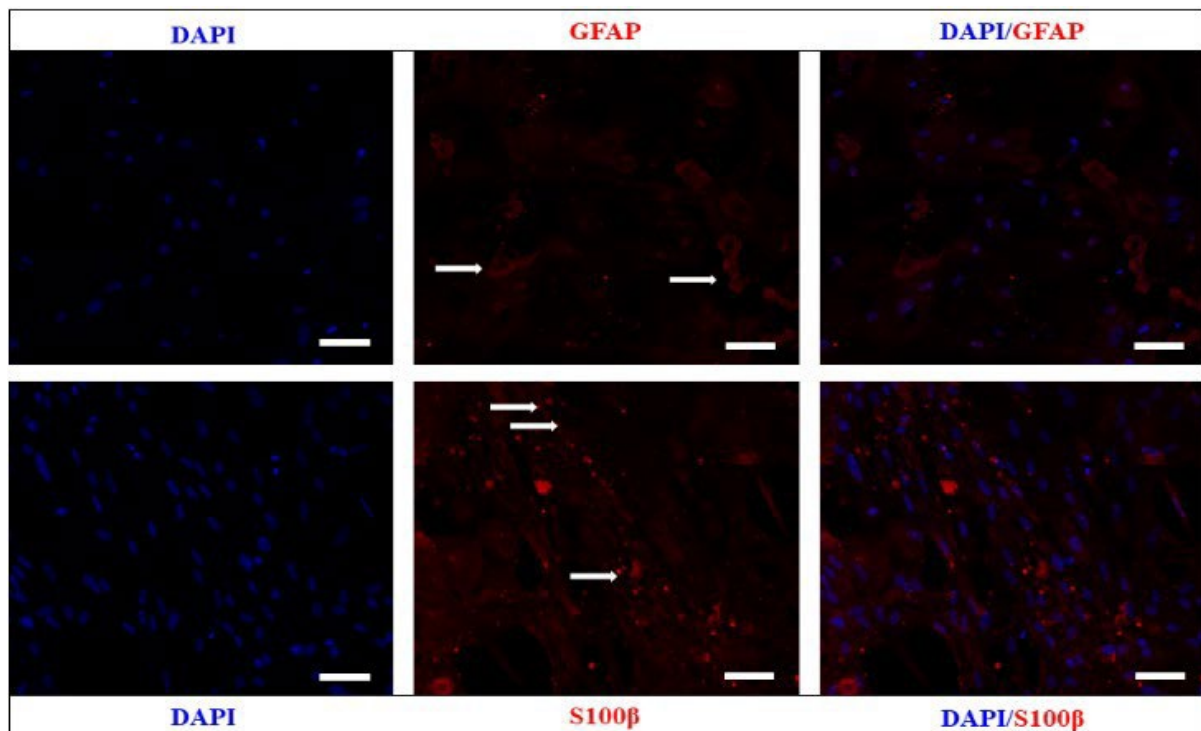
Analiza proliferacyjnego wzrostu oraz ocena cytologiczna prowadzona podczas 14-dniowej hodowli w medium różnicującym przeznaczonym do poza-jajowej neurolemogenicznej specjalizacji strukturalno-funkcjonalnej blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) w kierunku ich zróżnicowanych linii potomnych przypominających populacje komórek Schwanna. W początkowych etapach hodowli różnicującej ex ovo wyraźnie zauważalna jest postępująca elongacja komórek bez oznak przyrostu gęstości adherentnych neurolemocytów zakotwiczonej glikokaliksem zewnątrzkomórkowej powierzchni plazmolemmy do substratu poli-L-lizynowego. Progresywne wydłużanie protoplazmatyczne ulegających gliogenicznej cytodyferencji komórek B-ESCs skutkuje nabyciem przez nie wrzecionowatego lub włókniasto-tubularnego kształtu charakterystycznego dla prekursorów komórek Schwanna, co fenotypowo potwierdza wysoką efektywność procesu molekularnego i cytofizjologicznego przeprogramowania szczepów pluripotentnych komórek B-ESCs w linie klonalne SC-LCs.

Rycina 5. Opracowanie modelu neurolemogenicznej cytodyferencjacji ex ovo blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej w kierunku komórek Schwanna (SC-LCs) na potrzeby określenia profilu proteomicznego zależnego od relatywnej ekspresji markerów gliogenicznych, takich jak: GFAP oraz S-100 β oraz ich oceny porównawczej z protoplastycznymi liniami niezróżnicowanych komórek B-ESCs pod kątem ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji ex ovo przez komórki ESCs.



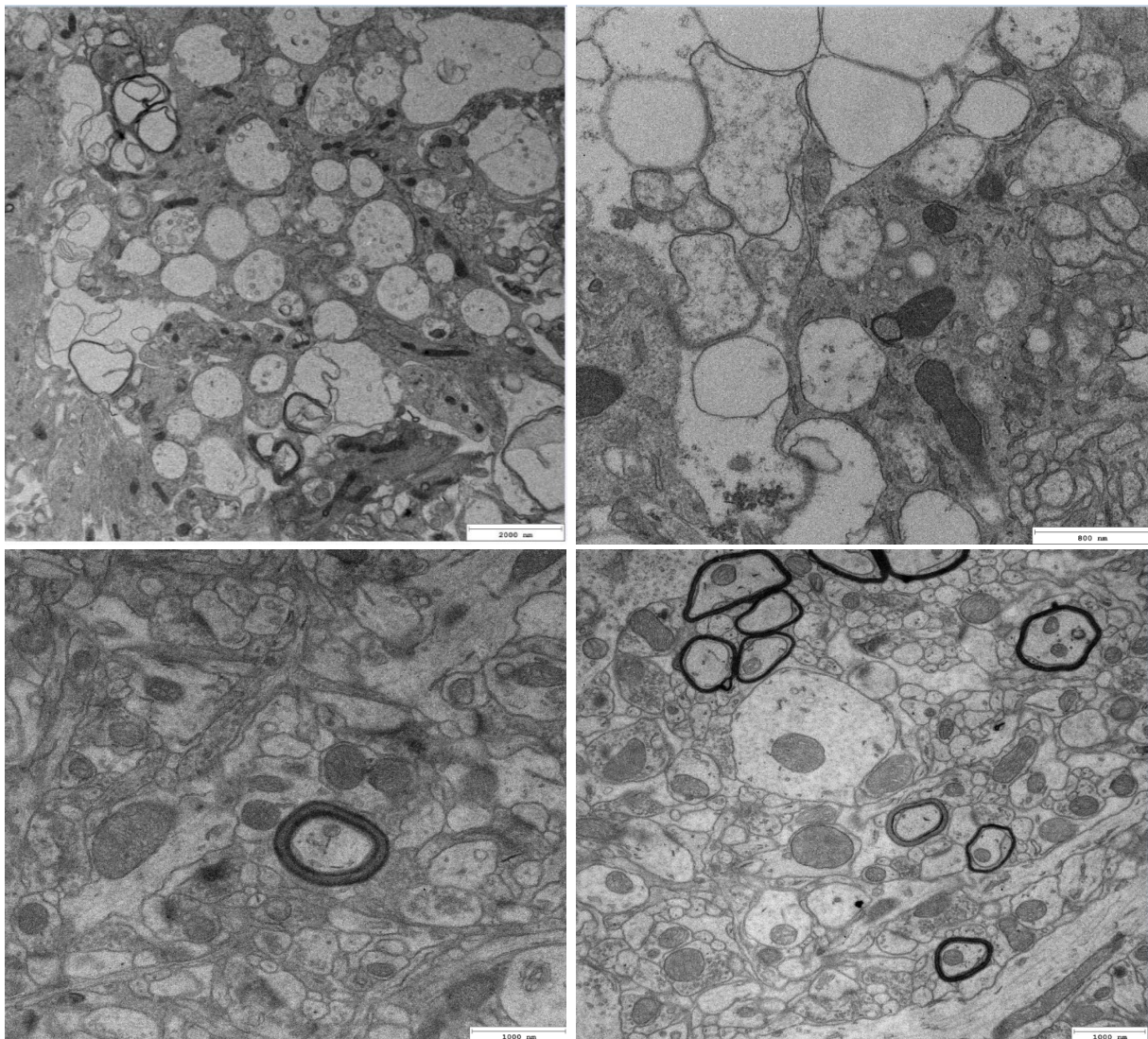
Analiza półilościowa Western-blot poziomu ekspresji biomarkerów różnicowania gliogenicznego komórek B-ESCs w kierunku komórek przypominających komórki Schwanna (SC-LCs) – określenie profilu względnej obfitości (ang. *relative abundance*) białek GFAP i S-100 β (B,C) oraz poziomu ekspresji biomarkerów związanych z charakterem pluripotentnym niezróżnicowanych komórek B-ESCs – określenie profilu względnej obfitości (ang. *relative abundance*) białek Oct-3/4 i Sox-2 (A,C) w odniesieniu do białka całkowitego, wyizolowanego z komórek SC-LCs lub ich rodzicielskich linii B-ESCs w ok. 15. pasażu hodowli *in vitro* z wykorzystaniem szklanych mikropłytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekany poli-L-lizyną.

Rycina 6. Analiza immunofluorocytochemiczna linii klonalnych neurolemogenicznie zróżnicowanych pochodnych komórek B-ESCs przeprogramowanych strukturalno-funkcjonalnie w kierunku komórek przypominających komórki Schwanna (SC-LCs; ang. Schwann cell-like cells) w kierunku detekcji epitopów powierzchniowych GFAP oraz S-100 β o ekspresji wysoko specyficznej dla neurolemocytów.



Mikrofotografie przedstawiają B-ESC-pochodne komórki przypominające neurolemocyty (komórki Schwanna; SC-LCs), proliferujące *ex ovo* w postaci hodowli monowarstwowej – detekcja czerwonych sygnałów pochodzących od fluorochromu Alexa Fluor™ 555 oznacza, odpowiednio: zewnątrzkomórkową immunolokalizację cząsteczek glikoproteinowego epitopu powierzchniowego GFAP – górny panel oraz zewnątrzkomórkową immunolokalizację glikoproteinowego epitopu powierzchniowego S-100 β – dolny panel. Na wszystkich zdjęciach niebieski sygnał pochodzi od fluorochromu DAPI, który znakuje DNA jąder komórkowych. Skala: 100 μ m.

Rycina 7. Opracowanie modelu mielinizacji *in vitro* w warunkach współhodowli B-ESC-pochodnych komórek Schwanna (komórek przypominających neurolemocyty) kury domowej z liniami komórek neuronalnych szczura laboratoryjnego, w którym udowodniono trwałe zachowanie funkcji cytofizjologicznych kurzych komórek Schwanna w obecności szczurzych neuronów hipokampalnych poprzez aktywny współudział neurolemocytów ptasich w tworzeniu osłonki mielinowej wokół neurolemmy aksonów i/lub dendrytów formujących włókna nerwowe.



Wysokorozdzielcze obrazowanie z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) potwierdziło obecność osłonek mielinowych formowanych przez kurze B-ESC-pochodne komórki SC-LCs wokół wypustek (aksonów/neurytów i/lub dendrytów) w obrębie struktur przypominających włókna nerwowe, utworzonych przez szczurze neurony hipokampalne w warunkach pozaustrojowych.

Zadanie 01-19-13-21

Badania translacyjne obejmujące charakterystykę komórek i tkanek wybranych gatunków zwierząt wolnożyjących na potrzeby opracowania modeli in vitro z zakresu biotechnologii i toksykologii reprodukcyjnej w odniesieniu do zwierząt hodowlanych.

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

Celem zadania była izolacja i zabezpieczenie tkanek od zwierząt wolnożyjących oraz wyprawianie hodowli pierwotnych oraz linii komórkowych z eksplantów tkankowych. Biopłaty tkankowe pozyskiwano *post mortem* z różnych części ciała, organów i układów narządowych osobników obojga płci. Materiał biologiczny do badań przeprowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, pochodził od różnych kół łowieckich, a dostępność tkanek i narządów była uwarunkowana okresami łowieckimi. Z założonych hodowli pierwotnych wyprowadzano stabilne mitotycznie linie komórek somatycznych lub macierzystych. Namnożone linie komórkowe zabezpieczono kriogenicznie w celu przeprowadzenia kompleksowej oceny jakości biologicznej oraz wielopłaszczyznowej charakterystyki. Zestawienie materiału przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Bank zabezpieczonych ex vivo linii komórek macierzystych i somatycznych wywodzących się z biopłatów tkankowych pozyskanych od wybranych gatunków ssaków dziko żyjących.

Gatunek	Pochodzenie komórek macierzystych lub somatycznych	Metoda zabezpieczenia ex vivo	Liczba linii komórkowych	Liczba dawczyń	Liczba dawców
Dzik euroazjatycki	AT-MSCs	Kriokonserwacja	17	-	4
	ES-FCs		11	-	6
	EC-CTs		9	-	7
Jenot azjatycki	AT-MSCs		6	5	-
	ES-FCs		5	4	-
	EC-CTs		4	4	-
Lis rudy (pospolity)	AT-MSCs		9	1	5
	ES-FCs		7	2	4
	EC-CTs		9	2	6
Sarna europejska	AT-MSCs		9	-	4
	ES-FCs		6	-	4
	EC-CTs		7	-	4

W ramach współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim, uzyskano i scharakteryzowano linie komórkowe somatyczne pochodzące od dzika europejskiego i sarny europejskiej. Próbkę tkanek, w tym jądra, mięśnie łonowo-guziczne, fragmenty skóry i chrząstki uszne, pozyskano *post mortem*. Izolację komórek Leydiga przeprowadzono enzymatycznie, uzyskując żywotność komórek na poziomie 86-89%. Hodowlę komórek prowadzono na płytkach pokrytych kolagenem w pożywce DMEM uzupełnionej FBS, z regularną wymianą medium co dwa dni. Po osiągnięciu konfluencji przeprowadzono trzy pasaże, a następnie komórki kriokonserwowano. Podobne procedury zastosowano do izolacji miocytów, keratynocytów i chondrocytów, które uzyskano z użyciem dwugodzinnej inkubacji z liberazą. Żywotność tych komórek wynosiła odpowiednio 84%, 83% i 86%. Pierwszy pasaż tych komórek odbywał się po 7 dniach hodowli, a po dwóch kolejnych pasażach również je kriokonserwowano. Wszystkie linie komórkowe wykazały charakterystyczną morfologię dla swoich typów komórkowych a dokumentacja mikroskopowa (Fot.1.) potwierdziła jakość hodowanych komórek oraz ich potencjał do dalszych zastosowań badawczych, uwzględniając zarówno ich aspekty cytofizjologiczne, jak i molekularne.

Zdjęcie mikrofotograficzne przedstawiające zabezpieczone *ex vivo* linie komórek pozyskanych z biopsatów tkankowych dzika europejskiego (A-keratynocyty, B- komórki Leydiga) oraz samicy europejskiej (C- miocyty). (Fot. 1.)



Rozwój efektywnych warunków hodowli *in vitro* otwiera nowe możliwości w zakresie ochrony *ex situ* oraz potencjalnej restytucji zagrożonych i wymarłych gatunków ssaków w Polsce. Badania te mogą mieć również zastosowanie w biotechnologicznych metodach wspomaganego rozrodu.

Zadanie 04-19-15-11

Opracowanie metod krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni.

kierownik zadania: dr Magdalena Bryła

Kriokonserwacja nasienia trutni to jedyna metoda biotechnologiczna pozwalająca na długoterminowe przechowywanie materiału genetycznego samców pszczoły miodnej przez nieograniczony okres czasu i jego transport na duże odległości. Ponadto, kriogenicznie zabezpieczone nasienie samców pełni istotną rolę w zachowaniu pożądanej puli genetycznej populacji przed nieprzewidzianymi zagrożeniami, takimi jak epidemie chorób pszczoł, zmiany klimatyczne czy inne czynniki środowiskowe, które mogą negatywnie wpływać na liczebność rodzin pszczelich. Użycie do inseminacji mrożonego nasienia trutni umożliwia elastyczne zarządzanie hodowlą pszczoł i uniezależnienie się od sezonowej dostępności dobrej jakości nasienia od dojrzałych płciowo trutni. Efektywna technologia kriokonserwacji nasienia trutni pozwala na tworzenie banków materiału genetycznego, które w przyszłości mogą stać się kluczowym elementem strategii ochrony bioróżnorodności pszczoł zwłaszcza małych populacji ras rodzimych w Polsce.

Cel zadania

Celem zadania jest opracowanie składu rozcieńczalnika do krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni oraz kompleksowej technologii kriokonserwacji, pozwalającej na efektywne kriogeniczne zabezpieczenie materiału biologicznego pszczoły miodnej. Ponadto planuje się przeprowadzić badania jakości nasienia na poszczególnych etapach technologicznych w oparciu o wybrane parametry podstawowe oraz strukturalno-funkcjonalne plemników z wykorzystaniem mikroskopu biologicznego i/lub mikroskopu fluorescencyjnego i/lub systemu SCA® CASA Sperm Class Analyzer System i/lub cytometru przepływowego.

Założenia metodyczne

Materiał doświadczalny stanowiło nasienie trutni pobrane od samców w wieku 14-21 dni, w okresie od czerwca do sierpnia. Materiał biologiczny pobierano w sposób manualny po-

przez delikatny masaż i rolowanie odwłoka owada do momentu pełnego wycisowania aparatu kopulacyjnego samca. Następnie, po lekkim uciśnięciu następowało wypchniecie nasienia na zewnątrz aparatu kopulacyjnego. Nasienie było pobrane do szklanej kapilary skalibrowanej ze strzykawką Harbo, a po pobraniu było oceniane, rozcieńczane w opracowanych rozcieńczalnikach do konserwacji w stanie płynnym oraz w rozcieńczalnikach mrożeniowych. Rozcieńczone nasienie umieszczano w słomkach 0,25 ml, bez dostępu powietrza i światła w temperaturze dodatniej w zakresie 15-17°C oraz w słomkach 0,25 ml i poddawano procedurze kriokonserwacji metodą manualną i/lub przy użyciu frezera. Ocenę jakości plemników przeprowadzano na nasieniu świeżym, po przechowywaniu w dodatnich temperaturach i po zamrożeniu-rozmrożeniu. Oceniono podstawowe parametry jakościowe plemników z wykorzystaniem systemu SCA® CASA Sperm Class Analyzer, tj.: morfologię, ruchliwość, rodzaj ruchu oraz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i/lub mikroskopii fluorescencyjnej, tj.: integralność błon plazmatycznych i struktury chromatyny plemnikowej.

Plan doświadczenia



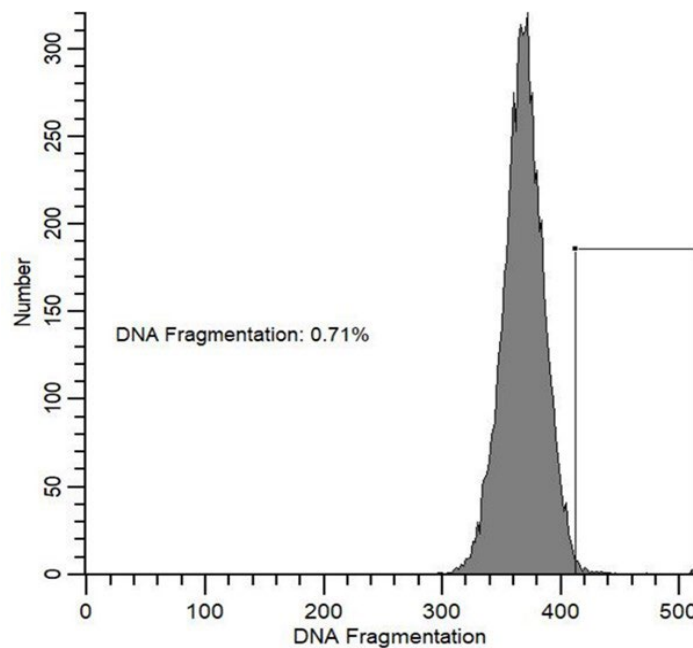
Syntetyczny opis wyników

W okresie od czerwca do sierpnia 2024 roku pozyskiwano nasienie trutni oraz oceniano standardowe parametry jakościowe nasienia. Do dalszych badań przeznaczono ejakulatory, które charakteryzowały się wysoką konsystencją, marmurkową strukturą, kremowym kolorem, o widoczny ruchu łańcuchów plemników oraz ejakulatory bez widocznych zanieczyszczeń. Nasienie rozcieńczano w różnych wariantach rozcieńczalników uzupełnianych antyoksydantami i związkami chroniącymi błony plazmatyczne plemników a następnie konserwowano w dodatnich temperaturach i kriokonserwowano w -196°C. Oceniono podstawowe parametry jakościowe nasienia z wykorzystaniem systemu SCA® CASA Sperm Class Analyzer, tj.: morfologie (Fot. 1.), ruchliwość, rodzaj ruchu; z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i/lub mikroskopii fluorescencyjnej, tj.: integralność błon plazmatycznych i chromatynę plemnikową (Fot. 2.).

Fot.1. Wady morfologiczne plemników trutni.



Fot. 2. Przykładowy histogram cytometrycznej oceny struktury chromatyny plemnikowej trutni.



W nasieniu świeżym średnia ruchliwość plemników wynosiła $95,12 \pm 2,31$, podczas gdy po 7 dniach przechowywania wahała się w przedziale od $93,05 \pm 2,50$ do $90,21 \pm 5,33$; natomiast po 21 dniach przechowywania w przedziale od $90,23 \pm 2,72$ do $89,32 \pm 6,08$ – w zależności od zastosowanego wariantu rozcieńczalnika. Natomiast średnia ruchliwość plemników po procedurze zamrażania-rozmrożenia w zależności od zastosowanego dodatku do rozcieńczalnika mroźniowego wahała się w przedziale od $77,16 \pm 5,93$ do $76,50 \pm 6,72$ w stosunku do odsetka plemników ruchliwych ($75,42 \pm 6,05$) w rozcieńczalniku kontrolnym. Odsetek plemników z wadami główki i wówki wynosił $2,54 \pm 0,71$ i $6,95 \pm 2,11$ w nasieniu świeżym; $3,75 \pm 0,84$ i $8,63 \pm 1,27$ w nasieniu przechowywanym oraz $6,62 \pm 1,52$ i $15,64 \pm 2,61$ w nasieniu kriokonserwowanym. Ocena integralności błon plazmatycznych wykazała, że średni odsetek plemników apoptotycznych jest na poziomie 2,5% w nasieniu świeżym, a w nasieniu kriokonserwowanym wynosi 5%. Analiza struktury chromatyny plemnikowej wykazała średni odsetek plemników prawidłowych na poziomie ponad 98% w nasieniu świeżym, 93% w nasieniu przechowywanym oraz ponad 89% w nasieniu kriokonserwowanym.