

Zakłady Naukowe

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

01-10-02-11

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

kierownik zadania: dr inż. Piotr Topolski

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

W bazie PLOWET gromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika) w fermach bydła mlecznego należących do zakładów doświadczalnych Instytutu. Spośród ok. 13 500 rekordów najczęściej jako pojedyncza choroba występowało *mastitis* (8 346 przypadków), *metritis* (3 237 przypadków) oraz cysty jajnika (1 917 przypadków). W Instytutowej bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 4 000 krów z zakładów doświadczalnych, z których ponad 3 100 znajduje się na liście zwierząt odnotowanych w bazie PLOWET.

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

Kontynuowano 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 1 500 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Każda z krów została zgenotypowana przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip, zawierającej genotypy 54 609 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polimorphism, SNP) lub Illumina BovineLD Genotyping BeadChip zawierającej genotypy 7 931 SNP. Genotypy osobników zgenotypowanych przy pomocy mikromacierzy Illumina BovineLD Genotyping BeadChip zostały zimputowane do gęstości mikromacierzy Illumina BovineSNP50 BeadChip. W dalszej analizie wykorzystano polimorfizmy o minimalnej wartości MAF>1% oraz minimalnej jakości genotypowania >99%. Kryteria te spełniło 46 216 SNP. W rezultacie zidentyfikowano łącznie 72 SNP statystycznie istotnie związanych z występowaniem cyst na jajniku, *metritis* i *mastitis* oraz 21 genów kandydujących związanych z występowaniem tych schorzeń.

W poprzednich latach sprawozdawczych wystąpiły okresowe utrudnienia w pobieraniu tkanek do badań molekularnych od części wytypowanych zwierząt, związane z brakiem możliwości współpracy z ubojniami i/lub lekarzami weterynarii wynikającymi z nałożonych kwarantann. W związku z tym w roku 2025 zwiększono liczbę zwierząt, od których pobierano tkanki. Pobrany materiał badawczy posłużył m.in. analizie jakościowej i optymalizacji metody izolacji RNA. Z części zebranych próbek nie zdołano wyizolować RNA, co wymaga uzupełnienia materiału biologicznego w kolejnym roku. W przypadku cechy *mastitis* i *metritis* w wynikach zaobserwowano znaczne różnice w wydajnościach mleka w grupach krów o różnym potencjale genetycznym, co przedstawiono na wykresach 1. i 2.

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 statycznych, a jest wektorem złożonym z wartości hodowlanych, natomiast 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 złotym standardzie opracowanym przez konsorcjum Eurogenetics.

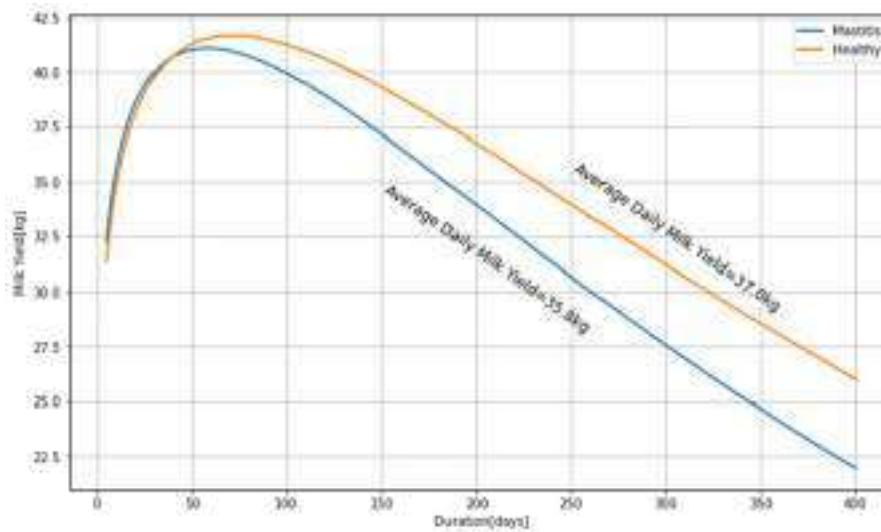
Macierz H ma postać $\begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G - A_{22} \end{bmatrix}$, A_{11} , A_{12}/A_{21} , i A_{22} odpowiednio komponentami macierzy spokrewnień korespondującymi do niezgenotypowanych, kowariancji pomiędzy zgenotypowanymi i niezgenotypowanymi oraz zgenotypowanych osobników. G reprezentuje macierz podobieństwa genetycznego pomiędzy zgenotypowanymi osobnikami. R jest macierzą diagonalną.

Wszystkie obliczenia były przeprowadzone przy użyciu programu BLUP90IOD3 z rozwiązaniami równań dla PCG (Tsuruta et al., 2001).

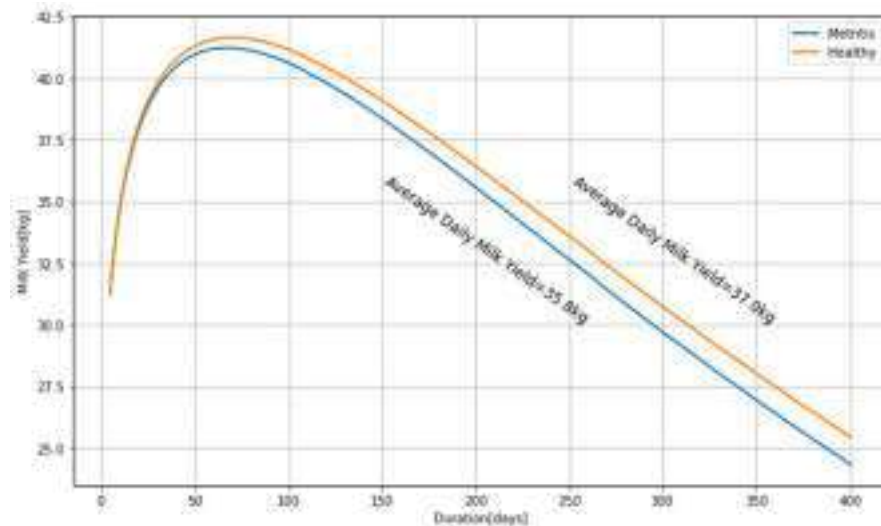
W ramach zadania kontynuowano wyznaczanie genomowych wartości hodowlanych dla wszystkich trzech cech, w kolejnych oficjalnych ocenach wprowadzonych zgodnie z harmonogramem PFHBiPM. Bazę genetyczną stanowiły krowy posiadające fenotyp urodzone przed 2016 rokiem. Dla cechy *mastitis* przeprowadzono wewnętrzne testy Interbull (ocena konwencjonalna) – wynik testu był pozytywny.

Otrzymane wyniki świadczą o możliwości prawidłowego szacowania wartości hodowlanej dla wyżej wymienionych cech zdrowotnych na podstawie utworzonej w Instytucie bazy danych według najnowszych rekomendacji grupy Eurogenomics, której Polska jest członkiem oraz o zasadności kontynuacji prac nad konstrukcją precyzyjnych, zindywidualizowanych indeksów selekcyjnych w krajowej populacji bydła rasy HF. Wyniki dotychczasowych prac prezentowano i omawiano z przedstawicielami PFHBiPM.

Wykres 1. Wydajność mleczna krów rasy PHF w zależności od potencjału genetycznego dla cechy *mastitis* (krowy zdrowe vs chore).



Wykres 2. Wydajność mleczna krów rasy PHF w zależności od potencjału genetycznego dla cechy *metritis* (krowy zdrowe vs chore).



Zadanie 01-10-04-11

Ocena dobrostanu cieląt utrzymywanych w różnych rodzajach kojców.

kierownik zadania: dr inż. Dorota Godyń

Dobrostan cieląt w okresie odchowu ma istotne znaczenie dla ich zdrowia, rozwoju oraz przyszłej wydajności produkcyjnej. Warunki utrzymania, w tym także stopień wzbogacenia środowiska, mogą wpływać na zachowanie cieląt oraz ich reakcję stresową. W praktyce cielęta często utrzymywane są w kojcach indywidualnych, co sprzyja kontroli zdrowotnej, lecz jednocześnie może ograniczać realizację naturalnych potrzeb behawioralnych.

Jednym z powszechnie stosowanych wskaźników stresu jest poziom kortyzolu, odzwierciedlający aktywność osi podwzgórze-prysadka-nadnercza. Niedobór bodźców środowiskowych może prowadzić do wzrostu poziomu tego hormonu oraz pogorszenia wskaźników dobrostanu. Zastosowanie wzbogacenia środowiska, takiego jak zabawki lub materiały absorbujące uwagę, może stanowić skuteczne narzędzie ograniczające stres u cieląt.

Celem zadania było określenie poziomu hormonu stresu u cieląt utrzymywanych w różnych kojcach oraz określenie, który materiał wzbogacający środowisko pochłania uwagę zwierząt w największym stopniu.

Zwierzęta

Badaniami objęto 28 cieląt rasy holsztyno-fryzyjskiej, które oddzielano od krów w ciągu 24–48 h po urodzeniu i przenoszono do budynku odchowu cieląt. Cielęta utrzymywano w czterech typach kojców: indywidualnych, dla dwóch cieląt, indywidualnych ze wzbogaceniem oraz kojcach ze wzbogaceniem dla cieląt utrzymywanych w parach (Fot.). Materiały użyte w kojcach stanowiły worki z sianem, wiszące piłki, szczotki oraz jutowe liny. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, z których każde obejmowało 14 cieląt (6 kojców pojedynczych, 4 kojce podwójne ze wzbogaceniem lub bez). Badania wykonano w warunkach, gdy temperatura powietrza w cielętniku była na poziomie 15–18°C.



Analiza zachowania – interakcja z przedmiotami

Analizę zachowań zabawowych cieląt przeprowadzono na podstawie nagrań wideo. Przy ocenie uwzględniono fragmenty filmów z jednego dnia w drugim tygodniu utrzymania, zarejestrowane w godzinach od 8:00 do 16:00. Z całkowitego czasu nagrań wyodrębniono epizody zabawy z przedmiotami w kojcu, rozumiane jako aktywne interakcje cieląt z elementami wzbogacenia środowiska, takimi jak: lina jutowa, worek z sianem, piłka wisząca oraz szczotka. Do zachowań zabawowych zaliczono m.in.: gryzienie, ssanie, popychanie, ciągnięcie oraz potrząsanie przedmiotem. Czas interakcji z każdym przedmiotem określano na podstawie sumy trwania zarejestrowanych epizodów zabawy w analizowanym przedziale czasowym.

Parametry fizjologiczne

Od cieląt z każdego typu kojca pobrano próbki śliny w godzinach rannych (7.30 do 8.30) oraz popołudniowych (13.30–14.30), które następnie zamrożono i przetransportowano do laboratorium. Stężenie kortyzolu ustalono poprzez zastosowanie testu immunoenzymatycznego ELISA Cortisol (Biokom).

Warunki mikroklimatyczne

Temperatura i wilgotność powietrza w cielętniku były rejestrowane w sposób ciągły za pomocą odpowiednich czujników.

Behawior

Analiza nagrań wideo wykazała, że cielęta wykazywały największe zainteresowanie liną jutową, z którą spędzały średnio około 12 minut dziennie, co stanowiło największy udział w całkowitym czasie zabawy z przedmiotami. Krótszy czas interakcji odnotowano w przypadku worka z sianem oraz piłki wiszącej. Cielęta przeznaczają na zabawę z workiem z sianem średnio około 7 minut, podobnie na kontakt z piłką. Interakcje te miały charakter krótkich, powtarzalnych epizodów. Najmniej atrakcyjnym elementem wzbogacenia środowiska była szczotka, którą cielęta bawiły się najrzadziej, spędzając na tej aktywności średnio około 4 minuty w ciągu dnia.

Tabela 1. Średnie wartości kortyzolu w ślinie.

	kojec pojedynczy	kojec podwójny	kojec pojedynczy ze wzbogaceniem	kojec podwójny ze wzbogaceniem
ng/ml	2,43	3,17	1,53	1,93

Podsumowanie

Cielęta najchętniej korzystały z liny jutowej i poświęcały jej najwięcej czasu. Może mieć to związek z silną potrzebą ssania. Wiszące sznury umożliwiały ekspresję tego zachowania. Nieco mniejsze zainteresowanie dotyczyło worka z sianem oraz piłki, natomiast szczotka była najmniej atrakcyjnym elementem wzbogacenia.

Wprowadzenie wzbogacenia środowiska wiązało się z obniżeniem poziomu kortyzolu w ślinie zarówno w kojcach pojedynczych, jak i podwójnych, co może wskazywać na redukcję stresu u cieląt.

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 aktualizację zbioru danych populacji bydła rasy simentalskiej, pochodzących z systemu FedInfo (udostępnione przez PFHBiPM), obejmującego dane z sezonów 2025/1 i 2025/2.

Po formalnej kontroli utworzono zbiory robocze, ograniczone do trzech pierwszych laktacji, zawierające:

- identyfikatory zwierząt (ID, data urodzenia, płeć),
- daty kolejnych wycieleń,
- wyniki próbnego udoju dla cech produkcyjnych: dzienna wydajność mleka (kg), zawartość tłuszczu (%), zawartość białka (%),
- daty próbnego udoju oraz numery obór, w których przeprowadzono próbny udoj,
- dane rodowodowe.

Zbiór przygotowany do testowania wariantów modelu oceny wartości hodowlanej za pomocą TDM obejmował 36 423 krowy cielące się po raz pierwszy w latach 1995–2024.

W związku z aktualizacją bazy danych fenotypowych powtórzono szacowanie parametrów genetycznych dla wydajności mleka, tłuszczu i białka. Do oszacowania komponentów (ko)wariancji zastosowano model zwierzęcia z losowymi regresjami oraz Bayesowską metodę próbkowania Gibbsa. Uzyskane oszacowania parametrów genetycznych nie różniły się istotnie od wartości otrzymanych w poprzedniej ocenie.

Do oceny wartości hodowlanej za pomocą TDM zastosowano jednocechowy, wielolaktacyjny model zwierzęcia z losowymi regresjami, ograniczony do trzech pierwszych laktacji. Modelowano dzienne wydajności mleka, tłuszczu oraz białka, uwzględniając stały efekt dnia doju w stadzie (HTD), stałe regresje w podklasach wieku ocielenia-sezonu ocielenia-okresu czasu, losowe regresje efektu addytywnego genetycznego, losowe regresje efektu trwałego środowiskowego oraz efekt błędu losowego.

W celu określenia stabilności oszacowań uzyskanych za pomocą modelu TDM obliczenia przeprowadzono niezależnie na danych z dwóch sezonów: 2025/2 oraz 2025/1. Bardzo wysokie korelacje między oszacowaniami TDM, opartymi na danych z tych dwóch kolejnych sezonów, wskazują na odpowiednią stabilność zastosowanego modelu.

Istotnym wynikiem badań jest również wykazanie stabilności powtórnego szacowania parametrów genetycznych, co jest ważnym elementem oceny wartości hodowlanych. (A. Otwińska-Mindur, E. Ptak, W. Jagusiak, A. Żarnecki. Genetic parameters for milk production traits of Simmental cows with random regression test-day. *Animal* 19 (2025), 101390).

Najważniejszym miernikiem przydatności modelu TDM, z punktu widzenia praktyki hodowlanej, jest wielkość korelacji między wartościami hodowlanymi oszacowanymi za pomocą stosowanego dotychczas rutynowo modelu laktacyjnego a wartościami hodowlanymi uzyskanymi przez zastosowanie modelu TDM. Wartość otrzymanych współczynników korelacji wskazuje, że wprowadzenie do praktyki hodowlanej metody TDM nie spowoduje dużych zmian w rankingu buhajów i krów.

Zadanie 01-10-07-11

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

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

Celem realizowanego etapu badawczego była ocena genetyczna krów mlecznych rasy polskiej czarno-białej pod względem występowania *alleli* genu β -kazeiny, ze szczególnym uwzględnieniem wariantu A2, a także kontynuacja badań nad wydajnością, składem fizykochemicznym oraz zawartością wybranych związków prozdrowotnych w mleku krów rasy polskiej czerwonej. Badania wpisują się w aktualne kierunki rozwoju hodowli bydła mlecznego oraz rosnące zainteresowanie mlekiem typu A2.

W latach 2023–2024 przeprowadzono identyfikację genetyczną genu β -kazeiny u 273 krów rasy polskiej czerwonej pochodzących z 12 gospodarstw zlokalizowanych na terenie powiatu limanowskiego. Wielkość stad wahała się od 10 do 109 osobników. Analiza rozkładu genotypów wykazała, że około 20% badanych krów stanowiły homozygoty A2A2, 49% heterozygoty A1A2, natomiast około 30% homozygoty A1A1. Uzyskane wyniki wskazują na istotny udział *allelu* A2 w tej populacji, co stwarza możliwości rozwoju produkcji mleka typu A2 w rasie polskiej czerwonej.

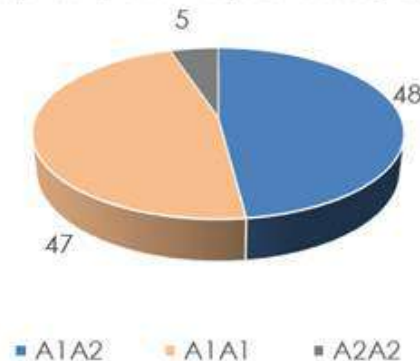
Wykonano identyfikację wariantów β -kazeiny u krów rasy polskiej czarno-białej w stadzie należącym do Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki PIB Chorzelów Sp. z o.o. Jednocześnie kontynuowano badania dotyczące składu chemicznego i jakości mleka krów rasy polskiej czerwonej. Materiał genetyczny do analiz pobierano w postaci włosów wraz

z cebulkami, z których izolowano DNA. Identyfikację genotypów β -kazeiny przeprowadzono w Laboratorium Genetyki Molekularnej metodą PCR. Od krów o zidentyfikowanych genotypach A1A1 oraz A2A2 pobrano mleko do dalszych analiz.

Próbki pozyskiwano od krów będących między 50. a 200. dniem laktacji – trzykrotnie w ciągu roku – uzyskując łącznie 60 próbek mleka. Analizy chemiczne i fizykochemiczne wykonano zgodnie z obowiązującą metodyką w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki oraz na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Zakres badań obejmował ocenę parametrów fizykochemicznych mleka, analizę profilu kwasów tłuszczowych, rozdział frakcji białkowych oraz ocenę sensoryczną. Rozdział frakcji białkowych przeprowadzono metodą elektroforezy żelowej SDS-PAGE, natomiast analizę wyższych kwasów tłuszczowych wykonano metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem aparatu SHIMADZU GC-2010 Plus. Ocenę sensoryczną mleka przeprowadzono zgodnie z normą PN-ISO 6658 (1998), stosując pięciopunktową skalę ocen. Skład panelu oceniającego wynosił pięć osób spełniających wymagania w zakresie wrażliwości sensorycznej. Oceniano barwę, konsystencję, zapach oraz smak mleka, z zastosowaniem odpowiednich współczynników ważkości, co pozwoliło na wyznaczenie wyróżnika sensorycznej jakości ogólnej.

W populacji krów rasy polskiej czarno-białej stwierdzono wyraźną dominację *allelu* A1 β -kazeiny. Udział genotypów wyniósł: A1A2 – 48%, A1A1 – 47% oraz A2A2 – 5%, co odpowiada częstości alleli na poziomie 0,71 dla A1 oraz 0,29 dla A2. Rozkład genotypów odbiegał od równowagi Hardy'ego–Weinberga, co może wskazywać na wpływ doboru hodowlanego, struktury populacji oraz stosowania określonych buhajów w rozrodzie. Niski udział genotypu A2A2 ogranicza obecnie możliwości produkcji mleka typu A2 w tej populacji, jednak obecność *allelu* A2 stwarza realne możliwości jego zwiększenia poprzez ukierunkowaną selekcję hodowlaną.

Wykres 1. Frekwencja genu β -kazeiny u krów rasy czarno-białej w ZD IZ PIB Chorzelów Sp. z o.o.



Analiza jakości mleka wykazała, że mleko pochodzące od krów o genotypie A2A2 charakteryzowało się korzystniejszym profilem lipidowym z wyższym udziałem kwasów nienasyconych, w tym MUFA i PUFA, oraz większą zawartością sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA), przy jednoczesnym obniżeniu udziału kwasów nasyconych. Ponadto mleko A2A2 uzyskało wyższe oceny sensoryczne we wszystkich analizowanych kategoriach, szczególnie w zakresie smaku i konsystencji. Analiza frakcji białkowych wskazała na wyższy udział kazein w mleku A2A2, co może mieć znaczenie technologiczne i żywieniowe.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają zasadność dalszych badań oraz działań hodowlanych ukierunkowanych na zwiększenie udziału *allelu* A2 w populacjach bydła mlecznego. Rozwój produkcji mleka typu A2 może stanowić istotny kierunek zarówno z punktu widzenia jakości surowca, jak i rosnących oczekiwań konsumentów.

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

Budowanie prawidłowej odporności cieląt bydła ras mlecznych, w tym na infekcyjne choroby układu pokarmowego, opiera się o właściwe odpojenie siałą, odpowiednią higienę kojców i otoczenia cieląt oraz podawanie preparatów o działaniu immunostymulującym. Serwatka suszona jest jednym z podstawowych składników preparatów mlekozastępczych dla cieląt. W preparatach tych stanowi źródło białek, w tym odpornościowych, oraz laktozy stanowiącej dla organizmu cielęcia źródło energii. Gospodarstwa mleczne produkujące sery dysponują znaczną ilością serwatki, której zagospodarowanie poprzez wykorzystanie w odpajaniu cieląt może stanowić ważny element ochrony środowiska oraz w budowaniu zdrowia zwierząt.

Celem naukowym było zbadanie serwatki pochodzącej od niewielkich, lokalnych producentów, określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych uzyskanego preparatu na bazie serwatki i wybranych ziół oraz określenie możliwości wykorzystania w żywieniu cieląt w celu poprawy ich statusu zdrowotnego.

Praktycznym celem projektu było wskazanie nowych możliwości wykorzystania serwatki w połączeniu z wybranymi ziołami w żywieniu oraz profilaktyce zdrowotnej cieląt, jak również ograniczenie antybiotykoterapii prewencyjnej we wczesnym okresie rozwoju cieląt.

Badania realizowano w dwóch etapach:

Etap 1.

1. Pozyskanie i przygotowanie serwatki: określenie warunków produkowanej serwatki, opracowanie metody suszenia i pozyskania proszku serwatkowego, w którym określono warunki produkcyjne serwatki oraz podjęto próbę suszenia pozyskanej z serowarni w warunkach laboratoryjnych.
2. Badania mikrobiologiczne i laboratoryjne obejmowały określenie składu chemicznego i mikrobiologicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej opracowanego proszku serwatkowego i preparatów ziołowych.

Etap 2.

1. Badania wstępne opracowanego preparatu serwatkowego, w ramach którego pozyskano trzy rodzaje serwatki: serwatkę słodką w proszku z komercyjnego zakupu, serwatkę płynną (świeżą) słodką z gospodarstwa „Moniser”, serwatkę płynną (świeżą) kwaśną z gospodarstwa „Moniser”, w których wykonano analizy chemiczne i mikrobiologiczne.
2. Badania laboratoryjne krwi i kału cieląt, w których przeprowadzono doświadczenia z udziałem cieląt rasy PHF, określając wpływ odpajania różnymi rodzajami serwatki, bez lub razem z ekstraktami ziołowymi, na parametry hematologiczne i poziom przeciwciał IgG w krwi oraz skład parazytologiczny i bakteriologiczny kału cieląt.

Każde doświadczenie trwało 14 dni, w którym losowo wybrane i przydzielone do poszczególnych grup badawczych cielęta otrzymywały dodatek preparatu serwatkowego, ziołowego lub/i obydwu preparatów jednocześnie. W każdym z nich zastosowano inny rodzaj serwatki.

Doświadczenie I obejmowało grupy badawcze:

Grupa I – grupa kontrolna, Grupa II – grupa otrzymująca serwatkę słodką suszoną (proszek serwatkowy), Grupa III – grupa otrzymująca mieszankę preparatów ziołowych, Grupa IV – grupa otrzymująca mieszankę proszku serwatkowego oraz preparatu ziołowego.

Doświadczenie II obejmowało grupy badawcze:

Grupa I – grupa kontrolna, Grupa II – otrzymująca proszek serwatkowy i preparat ziołowy raz dziennie, Grupa III – grupa proszek serwatkowy i preparat ziołowy dwa razy dziennie.

Doświadczenie III obejmowało grupy badawcze:

Grupa I – grupa kontrolna, Grupa II – grupa otrzymująca serwatkę słodką (serwatka płynna) i preparat ziołowy, Grupa III – grupa otrzymująca samą serwatkę słodką (serwatka płynna).

Doświadczenie IV obejmowało grupy badawcze:

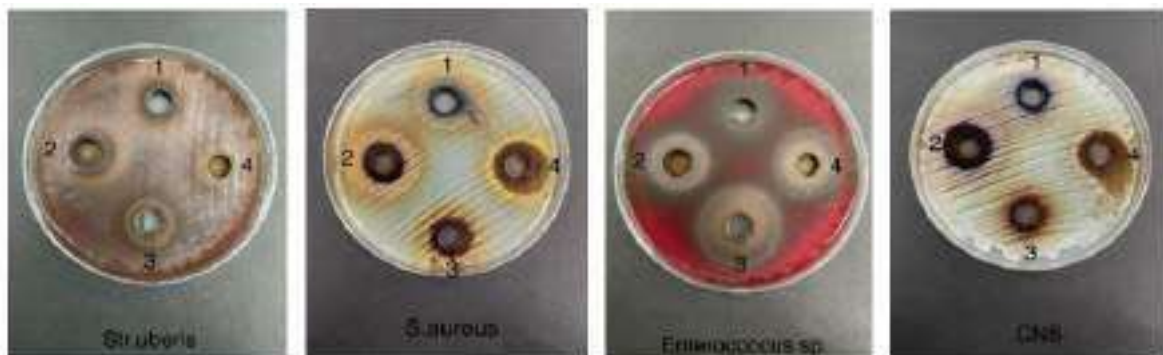
Grupa I – grupa kontrolna, Grupa II – grupa otrzymująca serwatkę kwaśną (serwatka płynna) i preparat ziołowy, Grupa III – grupa otrzymująca samą serwatkę kwaśną (serwatka płynna). Do każdej z grup badawczych w każdym doświadczeniu przydzielono losowo po pięć cieląt o wyrównanej kondycji, znajdujących się w wieku od 3 do 14 dni.

Tabela 1. Zawartość podstawowych składników pokarmowych w próbkach serwatki różnego rodzaju (S1 – serwatka podpuszczkowa, S2 – serwatka twarogowa).

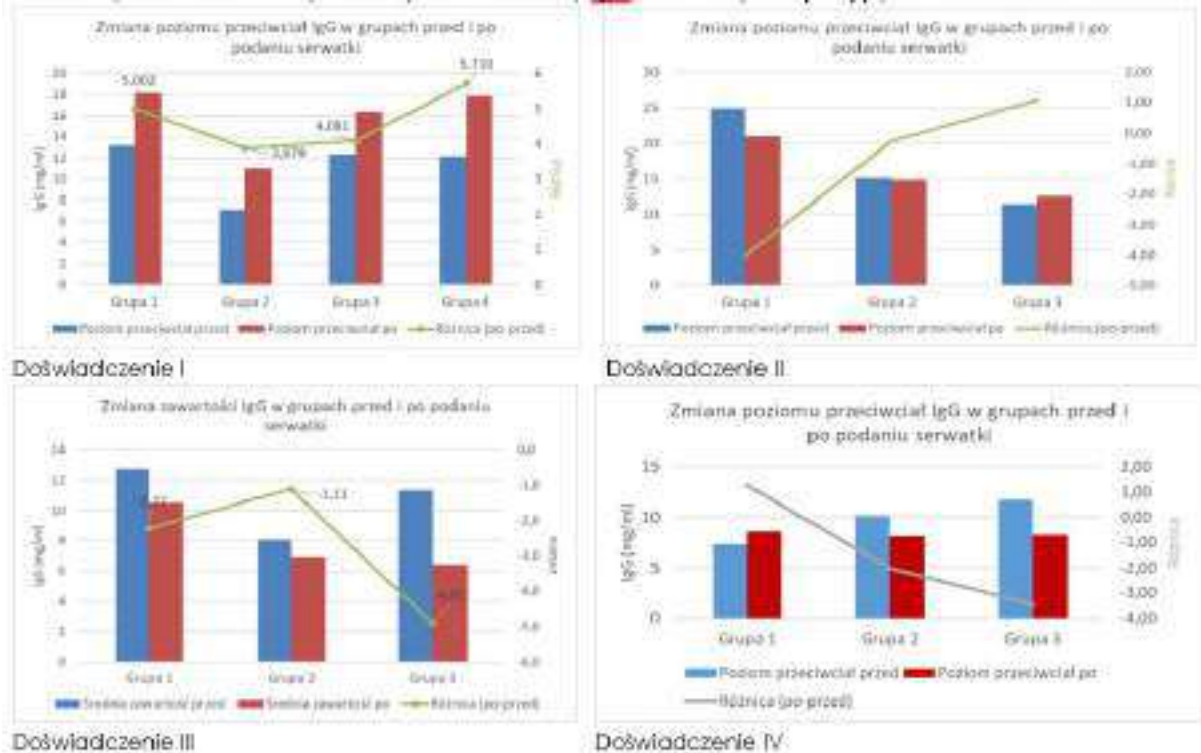
rodzaj serwatki	sucha masa [%]	popiół surowy [%]	tłuszcz wolny [%]	białko ogólne [%]
serwatka mrożona S1	7,45	0,48	1,05	0,89
serwatka mrożona S2	6,60	0,73	0,33	0,74
serwatka kwaśna	8,48	0,69	1,96	0,96
serwatka słodka	6,98	0,50	0,67	0,83

W analizach 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 rekomendowano do dalszych etapów badań. Wyższą zawartością wszystkich składników pokarmowych tj. suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu oraz popiołu ogólnego charakteryzowała się serwatka kwaśna.

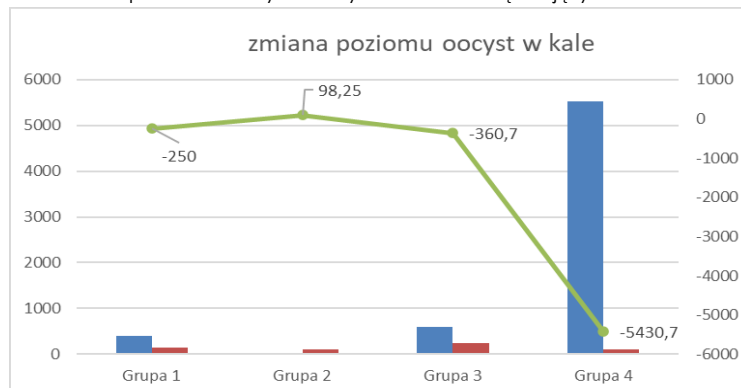
Prezentacja fotograficzna badania skuteczności hamowania wzrostu poszczególnych bakterii przez wybrane preparaty ziołowo-serwatkowe.



Wykres 1.-4. Zmiana poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicy cieląt objętych doświadczeniami I-IV.



Wykres 5. Zmiana poziomu oocyst kokcydii w kale cieląt objętych doświadczeniem I.



Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań z zastosowaniem serwatki zaleca się wykorzystanie przebadanej serwatki pochodzącej z produkcji z mleka pasteryzowanego. W serwatce z produkcji serów z mleka niepasteryzowanego stwierdzono obecność mikroorganizmów patogennych, m.in. gronkowca złocistego, gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS). Pasteryzacja mleka przeznaczonego do produkcji serów pozytywnie wpłynęła na skład mikrobiologiczny uzyskanej serwatki. Ze względu na skład chemiczny zaleca się wykorzystanie serwatki podpuszczkowej.
2. Wszystkie grupy doświadczalne, w których zastosowano zioła, charakteryzowały się wzrostem IgG po zastosowaniu dodatku serwatki słodkiej, co świadczyło o jej działaniu immunostymulującym.
3. W odniesieniu do poziomu czerwonych ciałek krwi, stwierdzono wpływ zastosowania zarówno samej serwatki suszonej słodkiej, jak i mieszanki proszku serwatkowego razem

z ziołami. We wszystkich grupach doświadczalnych zaobserwowano wzrost poziomu erytrocytów we krwi cieląt.

4. Wyraźny wzrost poziomu hemoglobiny we krwi stwierdzono u cieląt otrzymujących sam proszek serwatkowy. W pozostałych grupach wskaźnik ten znajdował się na takim samym poziomie przed, jak i po badaniach.
5. Najmniejszy spadek poziomu trombocytów stwierdzono we krwi cieląt odpajanych preparatem serwatkowym słodkim razem z dodatkiem ekstraktu ziół.
6. Zastosowanie serwatki, bez lub w kompozycji z mieszanką ekstraktów ziołowych, w większości doświadczeń wpłynęło pozytywnie na parametry hematologiczne krwi cieląt, w porównaniu z grupą kontrolną.
7. Wyniki analiz mikrobiologicznych kału cieląt objętych badaniami są niejednoznaczne. Na szczególną uwagę zasługuje fakt mniejszej różnorodności gatunkowej zarówno pasożytów, jak i mikroorganizmów u cieląt odpajanych preparatem serwatkowo-ziołowym w chłodnych miesiącach prowadzenia badań (marzec-kwiecień).
8. Zastosowane preparaty serwatkowo-ziołowe, we wszystkich doświadczeniach, najlepiej hamowały wzrost grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym cieląt.

Zadanie 04-10-11-11

Badania dotyczące wprowadzania nowych cech produkcyjnych w ocenie wartości genetycznej bydła mięsnego w Polsce.

kierownik zadania: dr inż. Bartosz Szymik

Celem realizowanego zadania badawczego było opracowanie oraz naukowa weryfikacja założeń metodycznych umożliwiających rozwój krajowego systemu oceny wartości hodowlanej bydła mięsnego, poprzez włączenie nowych cech produkcyjnych i funkcjonalnych. Szczególny nacisk położono na cechy wzrostu oraz wybrane cechy pokroju, które mają bezpośredni wpływ na efektywność ekonomiczną produkcji oraz trwałość użytkową zwierząt.

Zadanie miało charakter aplikacyjno-rozwojowy. Było ukierunkowane na stworzenie podstaw do praktycznego wykorzystania wyników w krajowym systemie selekcji bydła mięsnego, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego poziomu metodologicznego.

Założenia metodyczne

Badania przeprowadzono w oparciu o kompleksowe dane fenotypowe i rodowodowe bydła ras mięsnych użytkowanych w Polsce, pozyskane z systemu eBovis2 Polskiego Związku Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego oraz z bazy danych „Buhaje mięsne” Instytutu Zootechniki PIB. Materiał badawczy obejmował wieloletnie obserwacje buhajów ocenianych pod względem cech pokroju i mięsności, z uwzględnieniem informacji rodowodowych co najmniej dwóch pokoleń przodków. Analizowane cechy pokroju oceniane były metodą liniową przez uprawnionych zootechników-selekcjonerów – zgodnie z obowiązującymi zasadami oceny.

Podstawowym celem metodycznym było oszacowanie parametrów genetycznych cech pokroju, w szczególności odziedziczalności oraz korelacji genetycznych i fenotypowych, a następnie predykcja wartości genetycznych (EBV) zwierząt. Analizy prowadzono z wykorzystaniem liniowych modeli mieszanych w postaci modelu zwierzęcia, opartego na metodzie BLUP (Best Linear Unbiased Prediction), co umożliwiło jednoczesne uwzględnienie wpływu czynników środowiskowych, informacji rodowodowej oraz współzależności pomiędzy cechami.

W modelach statystycznych uwzględniano kluczowe efekty stałe, w tym efekt stado-rok-sezon oceny (HYS), wiek zwierzęcia w dniu oceny, w analizach wielorasowych, efekt rasy. Addytywne efekty genetyczne zwierząt traktowano jako efekty losowe, których struktura kowariancji oparta była na macierzy spokrewnień addytywnych wyznaczonej na podstawie danych rodowodowych. Estymację komponentów wariacyjnej przeprowadzono metodą ograniczonej największej wiarygodności (REML), z wykorzystaniem pakietu BLUPF90, w analizach jedno i wielocechowych.

Ze względu na konieczność zapewnienia stabilności i wiarygodności oszacowań, do szczegółowych analiz wartości hodowlanych zakwalifikowano wyłącznie rasy, dla których liczebność zwierząt w zbiorze danych przekraczała 100 osobników. Kryterium to pozwoliło ograniczyć wpływ losowych fluktuacji wynikających z małych prób oraz zapewniło porównywalność wyników pomiędzy rasami.

Predykcję wartości genetycznych przeprowadzono metodą BLUP, przy zachowaniu pełnej spójności pomiędzy modelami zastosowanymi na etapie estymacji parametrów genetycznych i wyznaczania EBV. Wykorzystano wielorasowy i wielocechowy model zwierzęcia, umożliwiający jednoczesne oszacowanie wartości genetycznych dla pojedynczych cech liniowych oraz syntetycznych grup cech opisujących umięśnienie, kośćciec i cechy funkcjonalne. Obliczenia wykonano z użyciem programu MiXBLUP, przystosowanego do analizy dużych zbiorów danych i rutynowej oceny genetycznej zwierząt hodowlanych.

Przyjęte założenia metodyczne zapewniły obiektywną i biologicznie uzasadnioną ocenę zmienności genetycznej cech pokroju bydła mięsnego oraz umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wartości genetycznych, stanowiących podstawę do analiz porównawczych, tworzenia rankingów buhajów oraz monitorowania zmian genetycznych w populacji w kolejnych latach oceny.

Syntetyczny opis wyników

Przeprowadzono kompleksową analizę genetycznych uwarunkowań cech pokroju bydła ras mięsnych, obejmującą estymację parametrów genetycznych oraz estymację wartości genetycznych buhajów różnych ras mięsnych. Badania objęły zarówno cechy szczegółowe oceniane liniowo, jak i oceny syntetyczne pokroju, co pozwoliło na wieloaspektową ocenę potencjału selekcyjnego analizowanych populacji.

Oszacowane współczynniki odziedziczalności cech pokroju mieściły się w przedziale od niskich do umiarkowanych wartości, typowych dla cech ocenianych punktowo. Najniższe odziedziczalności stwierdzono dla cech funkcjonalnych, co wskazuje na istotny wpływ czynników środowiskowych. Wyższe wartości odziedziczalności uzyskano dla cech związanych z rozwojem i umięśnieniem tułowia oraz dla ocen zbiorczych pokroju, potwierdzając możliwość ich skutecznego doskonalenia metodami selekcyjnymi.

Analiza korelacji genetycznych wykazała liczne dodatnie i często wysokie zależności pomiędzy cechami umięśnienia oraz pomiędzy cechami szczegółowymi a ocenami syntetycznymi. Szczególnie silne korelacje dotyczyły cech szerokości i grubości mięśni oraz ocen zbiorczych umięśnienia i pokroju ogólnego. Jednocześnie zależności genetyczne pomiędzy cechami funkcjonalnymi a cechami umięśnienia były na ogół niskie lub umiarkowane, co wskazuje na możliwość względnie niezależnego kształtowania tych grup cech w programach hodowlanych. Korelacje fenotypowe były z reguły niższe od genetycznych, co potwierdza istotny wpływ środowiska oraz subiektywności oceny na obserwowany fenotyp.

W dalszym etapie zadania dokonano szczegółowej charakterystyki oszacowanych wartości genetycznych (EBV) cech pokroju w obrębie ras. Średnie wartości EBV dla większości

cech koncentrowały się wokół poziomu referencyjnego, przy zróżnicowanej zmienności wewnątrzrasowej. Najliczniejsze populacje charakteryzowały się szerokim zakresem wartości EBV, co świadczy o istnieniu istotnej zmienności genetycznej możliwej do wykorzystania w selekcji. Porównania międzyrasowe wykazały, że różnice w średnich wartościach EBV pomiędzy rasami były na ogół umiarkowane, jednak dla wybranych cech widoczne były specyficzne profile rasowe. Żadna z analizowanych ras nie wykazywała jednocześnie najwyższych wartości dla wszystkich cech, co potwierdza wielocechowy charakter pokroju i konieczność prowadzenia selekcji zrównoważonej, uwzględniającej zarówno cechy rozwoju i umięśnienia, jak i cechy funkcjonalne.

Analiza zmian średnich wartości EBV w kolejnych latach oceny wskazała, że po okresie początkowych wahań, związanych z niewielką liczebnością ocenianych populacji, nastąpiła wyraźna stabilizacja średniego poziomu genetycznego cech pokroju. W latach o większej liczebności ocenianych buhajów zmiany średnich EBV miały charakter umiarkowany i dotyczyły głównie wybranych cech przy zachowaniu stabilności ocen syntetycznych. Zaobserwowane zmiany odzwierciedlają poziom genetyczny ocenianych w danym roku populacji i stanowią użyteczne narzędzie monitorowania postępu hodowlanego.

Uzyskane wyniki potwierdzają istotną zmienność genetyczną cech pokroju bydła ras mięsnych oraz zasadność ich uwzględniania w systemach oceny wartości genetycznej. Umiarkowane odziedziczalności ocen zbiorczych oraz korzystne korelacje genetyczne pomiędzy cechami umięśnienia wskazują, że selekcja oparta na ocenach pokroju może prowadzić do skorelowanego postępu genetycznego w cechach o znaczeniu produkcyjnym. Jednocześnie względna niezależność cech funkcjonalnych umożliwia ich skuteczne włączanie do indeksów selekcyjnych w celu poprawy trwałości użytkowej i dobrostanu zwierząt, bez istotnego pogorszenia cech mięsnych.

Podsumowanie i potwierdzenie osiągnięcia celu

Zrealizowane prace badawcze jednoznacznie potwierdzają osiągnięcie założonego celu zadania. Opracowano i zweryfikowano metodycznie możliwość włączenia nowych cech produkcyjnych i funkcjonalnych do systemu oceny wartości hodowlanej bydła mięsnego w Polsce.

Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie naukowe i aplikacyjne oraz mogą stanowić bezpośrednią podstawę do dalszych prac wdrożeniowych. Realizacja zadania przyczynia się do poprawy efektywności selekcji, zwiększenia opłacalności produkcji oraz wzmocnienia konkurencyjności krajowej hodowli bydła mięsnego.

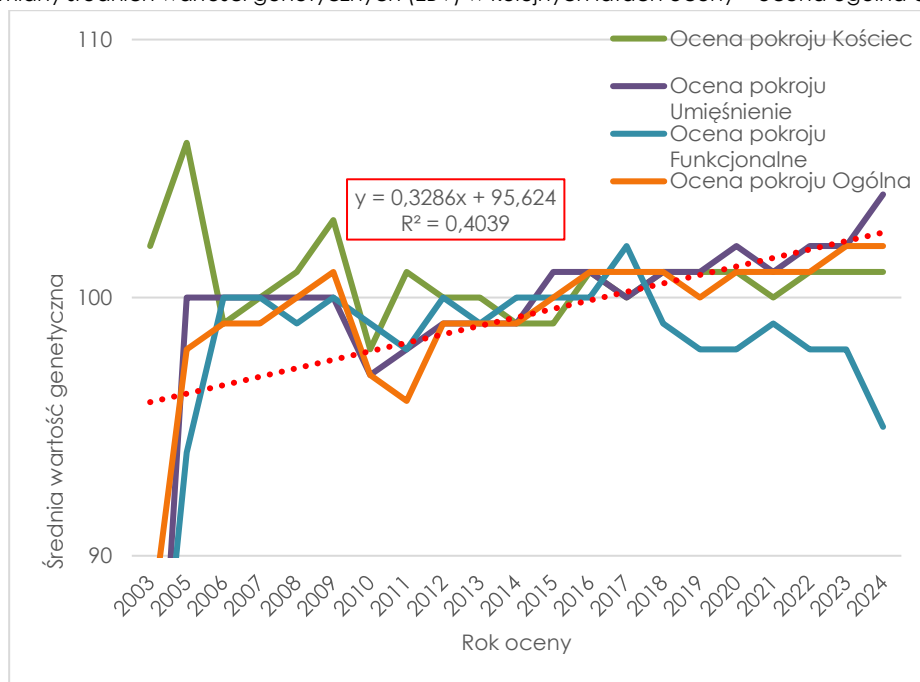
Tabela 1. Rasy dla których szacowano wartość genetyczną.

Rasa	Skrót nazwy	Liczba zwierząt
limousine	LM	5476
hereford	HH	641
charolaise	CH	638
angus czerwony	AR	354
simmentaler mięsny	SM	259
blonde d'Aquitaine	BD	234
salers	SL	228
angus czarny	AN	124
Suma: 7954		

Tabela 2. Średnie oszacowane wartości hodowlane (EBV) cech pokroju bydła mięsnego w podziale na rasy (N>100 osobników).

Lp.	Cecha	LM	CH	HH	AR	SM	BD	SL	AN
1.	Kaliber	100	100	99	100	99	100	101	98
2.	Obwód nadpęcia	101	100	100	100	99	101	102	103
3.	Szerokość klatki piersiowej	100	99	100	100	101	99	102	98
4.	Postawa nóg przednich	101	99	101	98	99	103	98	102
5.	Szerokość pyska	100	101	100	99	99	101	102	99
6.	Szerokość między łopatkami	100	100	100	102	98	100	100	100
7.	Szerokość grzbietu	100	100	101	101	101	100	99	102
8.	Grubość mięśnia grzbietu	99	100	101	104	101	99	101	100
9.	Głębokość klatki piersiowej	101	100	100	100	100	100	97	101
10.	Linia grzbietu	99	99	100	102	102	98	103	98
11.	Długość grzbietu	101	100	99	101	100	101	98	102
12.	Długość zadu	101	100	101	99	99	101	100	100
13.	Wysklepienie mięśnia uda	100	99	101	101	99	100	100	99
14.	Długość mięśnia uda	99	99	100	102	102	97	103	98
15.	Szerokość w biodrach	99	100	100	103	101	98	102	99
16.	Szerokość w kulszach	100	100	100	101	100	101	100	100
17.	Szerokość zadu	100	100	100	100	99	100	103	100
18.	Postawa nóg tylnych	101	100	100	99	99	101	99	100
19.	Kondycja	100	100	98	101	102	98	104	98
20.	Ocena pokroju – kośćciec	100	99	101	101	99	100	102	99
21.	Ocena pokroju – umięśnienie	100	99	102	102	100	100	99	99
22.	Ocena pokroju – funkcjonalna	99	100	101	100	99	99	101	98
23.	Ocena pokroju – ogólna	100	100	101	101	100	99	101	99

Wykres 1. Zmiany średnich wartości genetycznych (EBV) w kolejnych latach oceny – ocena ogólna cech pokroju.



Zadanie 04-10-12-11

Szacowanie produktywności pastwisk z uwzględnieniem różnych metod wyceny.

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

Wypas zwierząt jest jedną z podstawowych form użytkowania użytków zielonych i odgrywa istotną rolę w żywieniu przeżuwaczy oraz w zachowaniu stabilności agroekosystemów. Produkcyjność pastwisk zależy od warunków siedliskowych, składu botanicznego runi oraz intensywności użytkowania, co powoduje dużą zmienność plonowania w czasie i przestrzeni. W obliczu zmian klimatycznych oraz rosnących kosztów produkcji szczególnego znaczenia nabiera racjonalne gospodarowanie użytkami zielonymi, oparte na bieżącej ocenie ilości i jakości dostępnej paszy. Tradycyjne metody pomiaru biomasy są precyzyjne, lecz pracochłonne, dlatego coraz częściej zastępowane są metodami pośrednimi, wykorzystującymi czujniki naziemne i techniki teledetekcyjne, umożliwiające szybkie i nieinwazyjne monitorowanie stanu runi.

Celem badań było określenie produktywności pastwisk oraz porównanie skuteczności metod bezpośrednich i pośrednich w szacowaniu plonu zielonej i suchej masy. Badania prowadzono w gospodarstwie położonym w pobliżu Krakowa (50°23' N, 20°09' E) oraz w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Odrzechowej. Pomiary obejmowały wycinanie prób zielonki, ich ważenie i suszenie w celu określenia zawartości suchej masy, a następnie obliczenie plonów zielonej i suchej masy. Równolegle wykonywano pomiary herbometrem oraz zbierano dane spektralne przy użyciu bezzałogowego statku powietrznego wyposażonego w kamerę wielospektralną MicaSense RedEdge MX-Dual oraz kamerę RGB DJI Zenmuse P1. Obrazy poddano georeferencji, kalibracji geometrycznej i fotogrametrycznej, a uzyskane współczynniki odbicia posłużyły do obliczenia wskaźników wegetacji. Na podstawie analiz laboratoryjnych oceniano również zawartość białka ogólnego, włókna surowego oraz makroelementów. W analizach spektralnych uwzględniono m.in. wskaźnik NDRE, indeks zielonych liści, wskaźniki absorpcji chlorofilu oraz inne parametry związane z intensywnością fotosyntezy i kondycją fizjologiczną roślin.

Na pastwisku zlokalizowanym na Polanach Surowicznych, ze względu na położenie na stoku oraz zróżnicowane uwilgotnienie gleby, wyodrębniono dwie strefy: dolną i górną. W dolnej części stoku roślinność tworzyło zbiorowisko *Arrhenatheretum elatioris* z klasy *Molinio-Arrhenatheretea*, o zwarciu runi około 80%, z dominacją traw średniowysokich oraz bogatym udziałem roślin dwuliściennych i bobowatych. Stwierdzono obecność licznych gatunków cennych przyrodniczo, świadczących o wysokiej wartości botanicznej siedliska oraz stabilnym, ekstenywnym użytkowaniu. W górnej części stoku roślinność również miała charakter zbiorowiska *Arrhenatheretum elatioris*, z udziałem gatunków traw i roślin dwuliściennych typowych dla łąk świeżych.

Analiza wyników wykazała, że herbometr pozwala na orientacyjne szacowanie plonów, jednak jego dokładność jest umiarkowana. Najbardziej dokładne pomiary mierzone za pomocą herbometru uzyskuje się przy niższej wysokości runi, czyli w zakresie 20–25 cm. Przy wyższej wysokości pomiary są już mniej precyzyjne. Wynika to m.in. z różnic w składzie botanicznym, fazie rozwojowej poszczególnych gatunków, które istotnie wpływają na plon zielonej masy. Duży rozrzut danych potwierdza, że sam pomiar wysokości nie pozwala na dokładne określenie produktywności pastwiska, szczególnie w warunkach zróżnicowanego składu botanicznego.

Znacznie lepsze rezultaty uzyskano przy zastosowaniu wskaźników wegetacyjnych, zwłaszcza NDRE. Analiza zależności pomiędzy NDRE a plonem suchej masy wykazała bardzo silne dopasowanie modelu, co świadczy o wysokiej zdolności predykcyjnej tego wskaźnika.

Wysokie wartości NDRE korelowały z intensywnym wzrostem biomasy strukturalnej, odzwierciedlając zwiększoną zawartość chlorofilu i wysoką aktywność fotosyntetyczną roślin. Zależność pomiędzy NDRE a plonem zielonej masy była również wyraźna – choć słabsza – co można tłumaczyć większym wpływem zmienności uwilgotnienia roślin na masę świeżą.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że integracja metod stanowi najbardziej efektywne podejście do oceny produktywności pastwisk. Herbometr może być użytecznym narzędziem wspomagającym bieżące decyzje gospodarskie, natomiast wskaźniki wegetacyjne, w szczególności NDRE, umożliwiają bardziej precyzyjne i obiektywne szacowanie plonów. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność dalszych badań nad doskonaleniem modeli predykcyjnych oraz oceną przydatności różnych kombinacji wskaźników spektralnych w zróżnicowanych warunkach siedliskowych, co pozwoli w pełni wykorzystać potencjał teledetekcji w zarządzaniu użytkami zielonymi i rolnictwie precyzyjnym.

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 badań było pozyskanie wysokiej jakości sekwencji bydlęcego chromosomu Y z wykorzystaniem podejścia hybrydowego, łączącego dane z długich odczytów sekwencjonowania nanoporowego (Oxford Nanopore Technologies) oraz krótkich odczytów technologii Illumina. Zastosowanie obu typów danych miało na celu wykorzystanie zalet długich odczytów w rekonstrukcji regionów powtarzalnych i strukturalnie złożonych chromosomu Y oraz wysokiej dokładności krótkich odczytów w poprawie jakości sekwencji.

Badania ukierunkowane są na opracowanie i przetestowanie procedury hybrydowego składania sekwencji de novo chromosomu Y, obejmującej przygotowanie materiału biologicznego, ocenę jakości genomowego DNA, sekwencjonowanie oraz wstępną analizę bioinformatyczną uzyskanych danych. Szczególną uwagę poświęcono wzbogaceniu sekwencji specyficznych dla chromosomu Y poprzez wykorzystanie seksowanego nasienia.

Ostatecznym celem badań jest uzyskanie wiarygodnej sekwencji chromosomu Y będącej umożliwiającej identyfikację zmienności genetycznej oraz stworzenie podstaw do dalszych analiz genomowych, w tym badań genów związanych z męską płodnością i dziedziczeniem cech sprzężonych z chromosomem Y.

W pierwszym etapie realizacji zadania skoncentrowano się na analizie molekularnej materiału biologicznego, obejmującej pozyskanie oraz ocenę jakości genomowego DNA przeznaczonego do sekwencjonowania chromosomu Y będącego. Analizie poddano DNA wyizolowane z seksowanego nasienia (słomki) wzbogaconego w chromosom Y, pochodzącego od dwóch buhajów. Dla każdego buhaja oceniono materiał genetyczny zarówno bezpośrednio po izolacji, jak i po amplifikacji metodą WGA (Whole Genome Amplification). Celem tych działań było uzyskanie materiału o jakości i ilości umożliwiającej dalsze analizy sekwencyjne.

W ramach prac:

- przeprowadzono ocenę jakości DNA na podstawie wskaźnika DIN,
- oznaczono stężenie DNA przed i po amplifikacji WGA,
- scharakteryzowano profil wielkości fragmentów DNA w celu oceny integralności materiału genetycznego.

Tabela 1. Zestawienie parametrów ilościowych i jakościowych uzyskanych w roku sprawozdawczym.

Parametr	Jednostka	Buhaj 1	Buhaj 2
Jakość DNA (DIN)			
Izolat DNA	DIN	8,7	8,6
DNA po WGA	DIN	6,3	6,5
Stężenie DNA			
Izolat DNA	ng/μl	7,86	13,9
DNA po WGA	ng/μl	72,6	113,0
Sekwencjonowanie ONT			
Liczba odczytów	–	9 151 590	8 482 612
Łączna liczba zasad	Gb	40,8	36,4
Średnia długość odczytu	bp	4 458,8	4 294,0
Mediana długości odczytu	bp	3 452	3 352
N50 długości odczytów	bp	6 193	6 141
Średnia jakość odczytów	Q	15,1	14,8
Mediana jakości odczytów	Q	18,4	20,3
Maksymalna długość odczytu	bp	~770 507	~774 252

Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką jakość genomowego DNA po izolacji oraz skuteczność amplifikacji metodą WGA, umożliwiającą znaczące zwiększenie ilości materiału przy zachowaniu jego przydatności do dalszych analiz molekularnych. Tak przygotowane próbki zostały skierowane do sekwencjonowania z wykorzystaniem technologii długich odczytów Oxford Nanopore Technologies oraz krótkich odczytów Illumina.

Drugi etap obejmował wstępną analizę bioinformatyczną danych sekwencyjnych uzyskanych w technologii Oxford Nanopore Technologies. Prace te polegały na ocenie podstawowych parametrów jakościowych i ilościowych sekwencjonowania, w tym liczby odczytów, łącznej liczby zasad, długości odczytów oraz ich jakości. Celem było określenie przydatności danych do dalszych analiz genomowych, w szczególności do rekonstrukcji sekwencji chromosomu Y.

Otrzymane dane charakteryzowały się umiarkowanym do wysokiego pokryciem genomu, a zastosowanie seksowanego nasienia skutkowało istotnym wzbogaceniem sekwencji chromosomu Y względem jego nominalnego udziału w genomie. Szacowane pokrycie chromosomu Y, przekraczające 30×, umożliwiła prowadzenie szczegółowych analiz regionów specyficznych dla tego chromosomu, w tym analiz zmienności strukturalnej oraz genów związanych z męską płodnością.

Zrealizowano również działania związane z upowszechnieniem wyników badań. Wyniki uzyskane w ramach zadania zostały zgłoszone do prezentacji na międzynarodowej konferencji naukowej World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 2026.

Zadanie 04-10-14-11

Analiza wpływu grup genetycznych oraz metafounders na wyniki modelu jednostopniowego dla cech produkcyjnych w ocenie wartości genetycznej bydła.

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Przedmiotem badań była ocena wpływu sposobu obsługi brakujących informacji rodzicielskich w rodowodach na wyniki jednostopniowego modelu oceny wartości genetycznej bydła dla cech produkcyjnych. W szczególności analizowano zastosowanie klasycznych grup genetycznych oraz podejścia opartego na *metafounders* w kontekście dokładności, stabilności oraz porównywalności predykcji wartości hodowlanych. Badania miały na celu porównanie różnych scenariuszy niekompletności rodowodu oraz określenie, w jakim stopniu wybór metody reprezentacji brakujących rodziców wpływa na wyniki walidacji modelu jednostopniowego, zarówno dla zwierząt genotypowanych, jak i niezgenotypowanych. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem rzeczywistych danych populacyjnych, obejmujących informacje fenotypowe, rodowodowe i genomowe, przy zastosowaniu jednostopniowego modelu test-day SNP-BLUP.

Ostatecznym przedmiotem analizy było wskazanie rozwiązania metodologicznego zapewniającego największą odporność ocen wartości hodowlanej na niekompletność rodowodu, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości predykcji w warunkach rutynowej oceny genetycznej bydła.

Celem realizowanego zadania była ocena wpływu różnych metod obsługi brakujących informacji rodzicielskich w rodowodach na wyniki jednostopniowego modelu oceny wartości hodowlanej bydła mlecznego. W szczególności analizowano zastosowanie klasycznych grup genetycznych oraz *metafounders* w kontekście dokładności i stabilności predykcji wartości hodowlanych dla cech produkcyjnych.

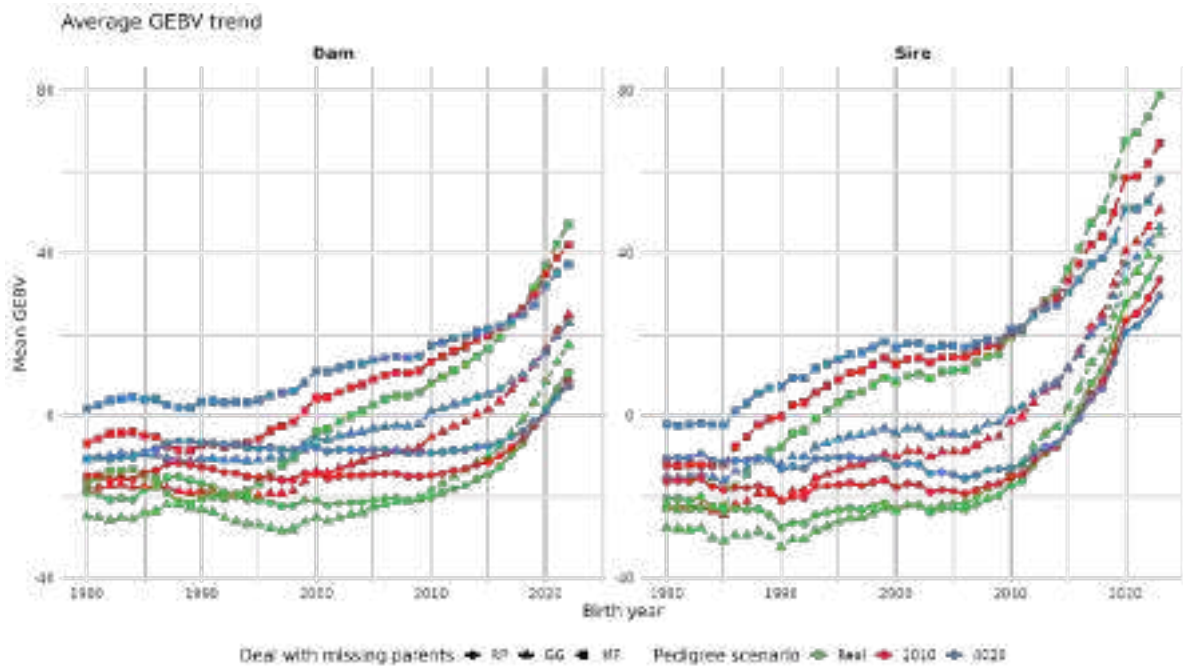
Przeprowadzono aktualną ocenę struktury populacji referencyjnej oraz ponowne obliczenie komponentów wariancji, dostosowanych do bieżącej struktury genetycznej populacji. Następnie opracowano nową definicję grup genetycznych, opartą na płci, roku urodzenia oraz kraju pochodzenia zwierząt – bez uwzględniania udziału rasy HF. Zdefiniowane grupy posłużyły jako podstawa do utworzenia *metafounders*, umożliwiających integrację informacji rodowodowych i genomowych w modelu jednostopniowym.

Dane fenotypowe, genotypowe oraz rodowodowe zostały starannie przygotowane zgodnie z przyjętymi scenariuszami niekompletności rodowodu. Przeanalizowano trzy warianty rodowodów różniące się poziomem brakujących rodziców oraz trzy metody ich obsługi: surowy rodowód, grupy genetyczne oraz *metafounders*. Analizy wykonano dla cechy wydajności tłuszczu z wykorzystaniem jednostopniowego modelu test-day SNP-BLUP.

Walidację przeprowadzono oddzielnie dla krów i buhajów, z uwzględnieniem statusu genotypowania. Wyniki wykazały, że dostępność informacji genomowych istotnie poprawia trafność predykcji wartości hodowlanych, niezależnie od zastosowanej metody obsługi brakujących rodziców. W przypadku zwierząt niezgenotypowanych stwierdzono, że zastosowanie *metafounders* traci odporność przy rosnącym udziale braków rodowodowych, prowadząc do tendencyjnych oszacowań wartości hodowlanych, szczególnie u buhajów.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że sposób obsługi brakujących danych rodowodowych ma znaczenie dla jakości predykcji w modelach jednostopniowych, a rola danych genomowych jest kluczowa dla stabilności i wiarygodności ocen. Realizacja zadania dostarczyła praktycznych wniosków istotnych dla dalszego rozwoju rutynowej oceny wartości hodowlanej bydła mlecznego w Polsce oraz przyczyniła się do powstania publikacji naukowych i prezentacji konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym.

Wykres 1. Trend genetyczny dla osobników podzielony według płci i scenariusza.



Wnioski

Zastosowanie modeli jednostopniowych umożliwia skuteczną integrację danych fenotypowych, rodowodowych i genomowych, prowadząc do stabilnych i porównywalnych oszacowań wartości hodowlanych dla cech produkcyjnych bydła mlecznego.

Dostępność informacji genomowych istotnie poprawia trafność predykcji wartości hodowlanych, niezależnie od zastosowanej metody obsługi brakujących danych rodzicielskich w rodowodach.

W przypadku zwierząt niezgenotypowanych skuteczność podejścia z wykorzystaniem *metafounders* maleje wraz ze wzrostem niekompletności rodowodu, co może prowadzić do tendencyjnych oszacowań wartości hodowlanych, szczególnie u buhajów.

Uzyskane wyniki wskazują, że dobór metody obsługi brakujących rodziców powinien być uzależniony od stopnia kompletności rodowodu oraz dostępności danych genomowych, co ma istotne znaczenie dla dalszego rozwoju rutynowej oceny wartości hodowlanej w Polsce.

Prace naukowe powstałe w wyniku realizacji zadania

W trakcie realizacji zadania przygotowano i opublikowano prace naukowe prezentujące wyniki analiz dotyczących wpływu sposobu obsługi brakujących rodziców w rodowodach na wyniki jednostopniowej oceny wartości hodowlanej bydła mlecznego. Prace te obejmują zarówno porównanie alternatywnych podejść metodologicznych, jak i szczegółową analizę stabilności predykcji wartości hodowlanych w zależności od kompletności rodowodu oraz dostępności danych genomowych. Wyniki badań zostały zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych oraz w formie manuskryptów.

Zadanie 04-10-15-11

Analiza wpływu interakcji genotyp-środowisko na zdrowotność krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej.

kierownik zadania: dr inż. Piotr Topolski

Stworzono oprogramowanie i interaktywną bazę danych służącą do gromadzenia danych środowiskowych (temperatura, wilgotność, żywienie). Oprogramowanie to zostało zaimplementowane w czterech zakładach doświadczalnych Instytutu utrzymujących bydło rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Dane są gromadzone na serwerach IZ PIB.

Informacje o zdrowotności krów są przechowywane w bazie PLOWET od 2016 roku. W roku sprawozdawczym zgromadzono dane fenotypowe dotyczące występowania trzech schorzeń (*mastitis*, *metritis*, torbiele jajnika). Spośród ok. 13 500 rekordów, najczęściej jako pojedyncza choroba występowało *mastitis* (8 346 przypadków), *metritis* (3 237 przypadków) oraz cysty jajnika (1 917 przypadków). W bazie genotypów znajdują się genotypy ok. 4 000 krów z zakładów doświadczalnych Instytutu. Z tej liczby ponad 3 100 krów znajduje się na liście zwierząt odnotowanych w bazie PLOWET.

Poza wyżej wymienionymi bazami danych, gospodarstwa są wyposażone w system automatycznego zarządzania stadem AFIFARM. Dane z tego systemu obejmują ponad 36 000 rekordów krów i są od 2016 roku również gromadzone na serwerach. Przechowywane są informacje dotyczące danych: identyfikacyjnych, chronologicznych, rodowodowych i fenotypowych, takich jak dane: produkcyjne, behawioralne, płodności, inseminacji, przebiegu wycieleń, śmiertelności cieląt, itp.

Na podstawie informacji zarejestrowanych w tym systemie podjęto prace służące do zgromadzenia danych i utworzenia bazy żywienia krów, począwszy od 2016 roku (dawka żywieniowa/grupa technologiczna). W tym celu utworzono odpowiednią aplikację do automatycznego pobierania danych. Część danych jest wprowadzana na podstawie archiwalnej dokumentacji hodowlanej (dane wprowadzane ręcznie z ksiąg).

W kolejnym okresie, po zgromadzeniu odpowiednio dużej liczby danych, planuje się przeprowadzenie ich aproksymacji.

Średnie dobowe, minimalne i maksymalne temperatury oraz wilgotność w czterech fermach krów mlecznych należących do zakładów doświadczalnych Instytutu z podziałem na sezon – oceny na podstawie zgromadzonych danych przedstawiono w Tabeli 1. i 2.

Tabela 1. Średnie dobowe, minimalne i maksymalne temperatury oraz wilgotność w czterech fermach krów mlecznych w sezonie zimowym.

Obora	Średnia dobowa temp. (°C)	Temp. min. (°C)	Temp. max (°C)	Średnia wilgotność (%)	Wilgotność min. (%)	Wilgotność max (%)
Obora 1	6,5	2	10,5	82	70	92
Obora 2	7,2	3,1	11,8	85	72	95
Obora 3	5,8	1,5	9,6	80	68	90
Obora 4	6,9	2,4	11	83	71	93

Tabela 2. Średnie dobowe, minimalne i maksymalne temperatury oraz wilgotność w czterech fermach krów mlecznych w sezonie letnim.

Obora	Średnia dobowa temp. (°C)	Temp. min. (°C)	Temp. max (°C)	Średnia wilgotność (%)	Wilgotność min. (%)	Wilgotność max (%)
Obora 1	21,5	17,2	28,8	68	55	82
Obora 2	22,8	18,5	31,9	70	58	85
Obora 3	20,9	16,8	27,7	65	52	78
Obora 4	23,4	19,1	32,6	72	60	88

Zadanie 04-10-16-11

Implementacja modelu jednostopniowego w ocenie genetycznej bydła rasy simentalskiej.

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Celem badań było przygotowanie podstaw do implementacji modeli jednostopniowych w ocenie genetycznej bydła rasy simentalskiej dla cech produkcyjnych, pokroju, płodności oraz długowieczności. Badania ukierunkowane były na integrację danych fenotypowych, rodowodowych i genomowych w celu uzyskania bardziej precyzyjnych i aktualnych oszacowań wartości genetycznych zwierząt rasy simentalskiej ocenianych w Polsce.

Dążono do opracowania nowej metodyki oceny wartości genetycznej bydła simentalskiego, obejmującej wyznaczenie komponentów wariacji, redefinicję grup genetycznych oraz przygotowanie warunków do wdrożenia modelu jednostopniowego w krajowym systemie oceny. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych prac wdrożeniowych, mają zastosowanie w praktyce hodowlanej oraz mogą być wykorzystane w publikacjach naukowych i kolejnych etapach rozwoju metod selekcji tej rasy.

Szczegółowy opis prac

W pierwszym etapie realizacji zadania skoncentrowano się na opracowaniu ogólnych kryteriów filtracji oraz porządkowania danych wejściowych dotyczących cech produkcyjnych bydła rasy simentalskiej. Analizie poddano zarówno rekordy dnia testowego, jak i dane identyfikacyjno-rodowodowe. Celem było zapewnienie wysokiej jakości, spójności oraz porównywalności danych wykorzystywanych w kolejnych etapach projektu.

W ramach prac:

- zidentyfikowano kluczowe typy danych wykorzystywane w projekcie, obejmujące rekordy dnia testowego, identyfikację zwierząt, informacje o stadach oraz dostępne elementy rodowodu,
- przyjęto założenia dotyczące spójności identyfikatorów oraz powiązań pomiędzy poszczególnymi zbiorami danych,
- określono ogólny kierunek filtracji danych surowych, ukierunkowany na przygotowanie stabilnego jakościowo zbioru danych do dalszej analizy populacji referencyjnej oraz estymacji parametrów genetycznych.

Drugi etap obejmował ocenę struktury populacji referencyjnej oraz przygotowanie wariantów populacji do dalszych obliczeń. Prace te polegały na określeniu liczebności analizowanych zbiorów, stopnia kompletności informacji rodowodowych oraz rozdzieleniu populacji na grupę zwierząt czystorasowych (100% SIM) oraz szerszą populację spełniającą przyjęte kryterium przynależności do rasy simentalskiej, z uwzględnieniem dopuszczonych dolewów rasowych.

Populacja referencyjna – zwierzęta czystorasowe rasy simentalskiej (100% SIM)

Do pierwszego etapu estymacji komponentów wariacji wybrano populację czystorasową, dla której dostępne były:

- 270 406 rekordów dnia testowego,
- 13 966 krów,
- 16 868 osobników w rodowodzie.

Zbiór ten został przyjęty jako bazowy i referencyjny do pierwszego przebiegu obliczeń parametrów genetycznych cech produkcyjnych, ze względu na jego jednorodność rasową, ograniczającą wpływ niejednorodności populacji na stabilność estymacji. Wzięto również pod uwagę całą populację rasy simentalskiej (SIM) wraz z zaakceptowanymi dolewami rasowymi. Równolegle scharakteryzowano szerszą populację obejmującą zwierzęta spełniające przyjęte kryterium przynależności do rasy simentalskiej, z uwzględnieniem dopuszczonych dolewów rasowych.

Populacja ta obejmuje:

- 848 825 rekordów dnia testowego,
- 48 943 krowy,
- rodowód w trakcie kompletowania.

Wariant ten charakteryzuje się większą liczebnością i potencjalnie wyższą użytecznością aplikacyjną, jednak wymaga dalszego „domknięcia” i weryfikacji informacji rodowodowych oraz dodatkowej kontroli spójności danych przed zastosowaniem w docelowych modelach oceny genetycznej.

Zadanie 04-10-17-11

Modernizacja systemu oceny genetycznej mała licznych ras bydła mlecznego.

kierownik zadania: dr inż. Kacper Żukowski

Celem badań była modernizacja systemu oceny genetycznej mała licznych ras bydła mlecznego poprzez przygotowanie warunków do wdrożenia nowoczesnych narzędzi obliczeniowych, umożliwiających analizę złożonych modeli statystycznych. Prace ukierunkowano na zastąpienie dotychczas stosowanych rozwiązań informatycznych, niespełniających aktualnych standardów technologicznych, systemem zapewniającym większą elastyczność obliczeniową oraz możliwość dalszego rozwoju metod oceny genetycznej.

W ramach realizacji zadania dążono do stworzenia podstaw do wdrożenia zaktualizowanego systemu oceny genetycznej, umożliwiającego poprawę dokładności selekcji hodowlanej w populacjach mała licznych ras bydła mlecznego. Uzyskane rezultaty wspierają działania na rzecz zachowania bioróżnorodności genetycznej oraz stanowią podstawę do dalszych analiz naukowych i przygotowania publikacji.

Szczegółowy opis prac

W pierwszym etapie realizacji zadania przyjęto podejście jakość → spójność → kompletność, koncentrując się na filtrowaniu i porządkowaniu danych wejściowych dotyczących mała licznych ras bydła mlecznego. Prace rozpoczęto od kontroli spójności podstawowych pól identyfikujących rasę, a następnie przeprowadzono ocenę skali braków i rozbieżności, które mogą wpływać na poprawną definicję populacji referencyjnej małych ras.

W ramach prac:

- przeprowadzono kontrolę spójności oznaczeń ras w danych produkcyjnych i rodowodowych,
- oceniono kompletność informacji rodzicielskich (matka, ojciec) w kontekście budowy populacji referencyjnej,

- zidentyfikowano główne źródła niespójności rasowej oraz braki danych ograniczające możliwość dalszych analiz genetycznych.

Drugi etap obejmował ocenę struktury populacji referencyjnej małych ras bydła mlecznego pod kątem możliwości jej wiarygodnego wykorzystania w ocenie genetycznej. Skoncentrowano się na analizie spójności rasowej w relacji osobnik–rodzice oraz na określeniu skali braków danych rodowodowych.

Populacja referencyjna – zwierzęta małych ras bydła mlecznego spełniające kryteria spójności rasowej i rodowodowej

W ramach diagnostyki przeanalizowano wybrane rasy istotne z punktu widzenia dalszych prac badawczych, w tym: RDC (rasa polska czerwona, RP), PZR (rasa polska czerwono-biała, ZR), PZB (rasa polska czarno-biała, ZR) oraz PBG (polska biało-grzbieta, BG).

Tabela 1. Spójność rasowa i rodowodowa – wybrane małe rasy bydła mlecznego.

Rasa	Łącznie osobników	Niespójne przypadki (ogółem)	Braki danych rodzicielskich	Rodzic(e) innej rasy
RDC – polska czerwona (RP)	32 350	5 448	640	4 808
PZR – polska rasa czerwono-biała (ZR)	20 877	20 864	367	20 497
PZB – polska rasa czarno-biała (ZB)	9 616	9 600	409	9 191
PBG – polska biało-grzbieta (BG)	4 032	585	471	114

Dodatkowo oznaczenia ras rodzimych, zgodne z międzynarodowym systemem kodów ISO3, zostały zaimplementowane w systemach *Interbull*, co umożliwi dalszą integrację danych na poziomie międzynarodowym.

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

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) pozostaje jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla populacji świń oraz dzików w Polsce i Europie. Choroba ta, ze względu na brak skutecznych metod leczenia i szczepień, zwalczana jest wyłącznie metodami administracyjnymi. Prowadzi to do znacznych strat ekonomicznych w produkcji trzody chlewnej oraz do destabilizacji rynku wieprzowiny. Pomimo intensywnych działań bioasekuracyjnych nie udało się dotychczas w pełni zahamować szerzenia się wirusa, co wskazuje na konieczność poszukiwania alternatywnych, długofalowych rozwiązań problemu ASF.

Celem realizowanego zadania statutowego jest identyfikacja genetycznych różnic pomiędzy zwierzętami wrażliwymi i opornymi na zakażenie wirusem ASF, jako potencjalnych markerów oporności oraz ocena możliwości ich wykorzystania w krajowej praktyce hodowlanej. Przyjęta koncepcja badań zakłada, że selekcja genetyczna ukierunkowana na zwiększenie naturalnej odporności świń może w perspektywie kilku pokoleń stanowić trwałe uzupełnienie dotychczasowych metod walki z ASF.

Zakres i etap realizacji badań

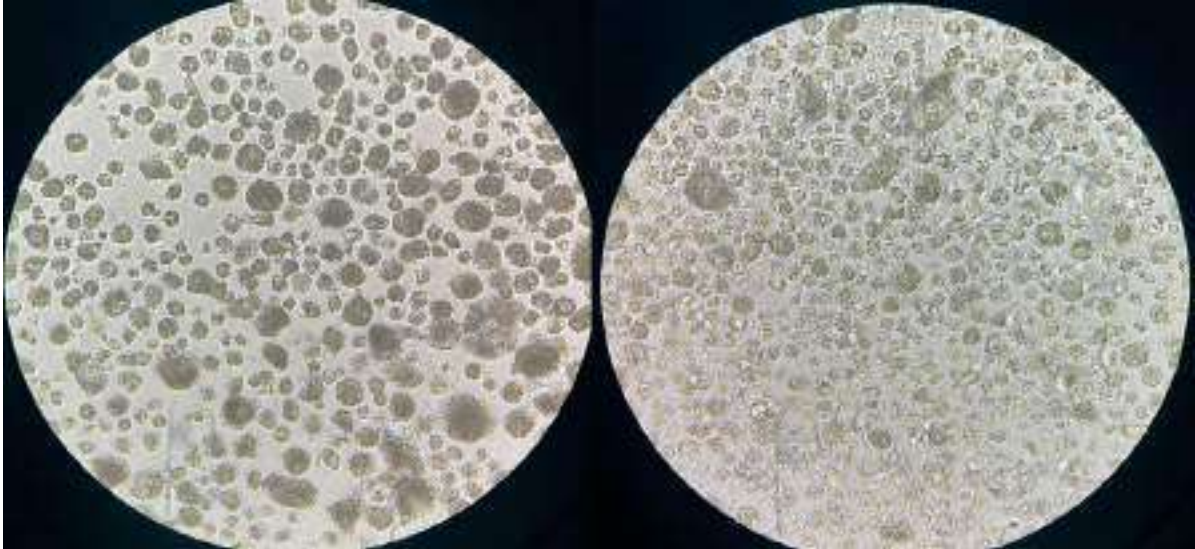
Prace badawcze koncentrowały się na realizacji etapu obejmującego weryfikację związku wytypowanych genów kandydujących z podatnością lub opornością komórek na zakażenie wirusem ASF w modelu *in vitro*. Etap ten stanowi logiczną kontynuację wcześniejszych badań genomowych, w których na podstawie analiz WGS, mikromacierzy SNP, sekwencjonowania Sangera oraz analiz asocjacyjnych wytypowano grupę genów potencjalnie związanych z przebiegiem infekcji ASF.

Weryfikacja modelu komórkowego *in vitro*

W początkowej fazie badań *in vitro* zastosowano nieśmiertelną linię świńskich makrofagów pęcherzykowych płuc iPAM303, która zachowuje wiele cech fenotypowych i funkcjonalnych makrofagów pierwotnych, w tym ekspresję genów SLA klasy II oraz zdolność do odpowiedzi immunologicznej. W celu oceny przydatności tej linii jako modelu infekcyjnego przeprowadzono próbne zakażenia wirusem ASFV szczepu Georgia w warunkach wysokiego reżimu bezpieczeństwa biologicznego w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym PIB w Puławach.

Analiza replikacji wirusa metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz obserwacje morfologiczne komórek wykazały brak produktywnej replikacji ASFV w linii iPAM303. Wartości Ct pozostawały na zbliżonym poziomie pomiędzy dniem zakażenia a kolejnymi punktami czasowymi, a komórki nie wykazywały cech efektu cytopatycznego. Odpowiedź uzyskano w kontrolnym modelu pierwotnych makrofagów pęcherzykowych płuc (PPAM), w którym obserwowano intensywną replikację wirusa oraz charakterystyczne zmiany morfologiczne. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że linia iPAM303 nie stanowi odpowiedniego modelu do badań nad replikacją ASFV.

Figura 1. a i b. Wynik zawartości kopii wirusa w makrofagach oznaczony metodą qPCR.



W linii iPAM303 nie zaobserwowano istotnych zmian morfologicznych ani cech efektu cytopatycznego po zakażeniu ASFV, co koreluje z brakiem spadku wartości Ct w analizie qPCR. W przypadku linii iPAM303 nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie wirusowego DNA pomiędzy 0. a 6. dniem po zakażeniu. Wartości Ct pozostawały na zbliżonym poziomie (średnio ok. 28), co wskazuje na brak amplifikacji sygnału wirusowego w czasie trwania doświadczenia. Również analiza morfologiczna nie wykazała charakterystycznych zmian cytopatycznych, które mogłyby sugerować aktywną replikację wirusa lub destrukcyjny wpływ zakażenia na komórki. Odmienną odpowiedź zaobserwowano w przypadku pierwotnych makrofagów płucnych (PPAM). W tej grupie doszło do wyraźnego spadku wartości Ct z poziomu około 28 w dniu zakażenia do około 19 po 6 dniach, co jednoznacznie wskazuje na intensywną replikację wirusa ASFV. Wyniki qPCR korelowały z obserwacjami mikroskopowymi, w których stwierdzono wyraźne zmiany morfologiczne komórek typowe dla zakażenia ASFV, potwierdzając prawidłowy przebieg infekcji w modelu kontrolnym (Figura 2.).

Figura 2. a i b. Porównanie podatności unieśmiertelnionej linii makrofagów świńskich iPAM303 (IMM) oraz pierwotnych makrofagów pęcherzykowych płuc (PPAM) na zakażenie wirusem afrykańskiego pomoru świń (ASFV).



Przedstawiono obrazy mikroskopowe komórek w dniu zakażenia (0 dpi) oraz 6 dni po zakażeniu (6 dpi) przy powiększeniu 400×. W linii iPAM303 (Figura 2.b) nie zaobserwowano istotnych zmian morfologicznych ani cech efektu cytopatycznego po zakażeniu ASFV, co koreluje z brakiem spadku wartości Ct w analizie qPCR. W przeciwieństwie do tego, w pierwotnych makrofagach płucnych (PPAM; Figura 2.b) widoczne są wyraźne zmiany morfologiczne charakterystyczne dla zakażenia ASFV, zgodne z istotnym obniżeniem wartości Ct pomiędzy 0 a 6 dpi, wskazującym na aktywną replikację wirusa.

Opracowanie i wdrożenie modelu pierwotnych makrofagów

W związku z brakiem podatności linii iPAM303 na zakażenie ASFV podjęto decyzję o przejściu na biologicznie adekwatny model oparty na pierwotnych makrofagach pęcherzykowych płuc. Opracowano, zoptymalizowano i wdrożono procedurę izolacji makrofagów z płuc świń domowych oraz dzików, pozyskiwanych w ramach rutynowych ubojów rzeźnych oraz kontrolowanych odstrzałów.

Uzyskano wysoką liczbę żywych komórek, umożliwiającą zarówno prowadzenie bieżących doświadczeń, jak i bankowanie materiału biologicznego do dalszych analiz. Izolowane makrofagi zachowywały cechy morfologiczne i funkcjonalne charakterystyczne dla komórek pierwotnych i wykazywały potwierdzoną podatność na zakażenie wirusem ASFV, co czyni je kluczowym narzędziem w dalszych badaniach funkcjonalnych.

Geny kandydujące i kierunki analiz funkcjonalnych

Równolegle do prac nad modelem komórkowym kontynuowano analizy dotyczące genów kandydujących. Na podstawie wcześniejszych badań genomowych jako jeden z kluczowych genów wytypowano gen TTC12, charakteryzujący się istotnym zróżnicowaniem frekwencji wariantów *allelicznych* pomiędzy populacjami świń oraz przewidywanym udziałem w procesach przeżycia komórek, odpowiedzi stresowej i regulacji szlaków śmierci komórkowej.

Przygotowano koncepcję badań funkcjonalnych genu TTC12 z wykorzystaniem dwóch komplementarnych podejść: sztucznej nadekspresji genu z użyciem wektorów lentiwirusowych oraz czasowego wyciszenia ekspresji genu metodą interferencji RNA (RNAi). Opracowano szczegółowy schemat eksperymentalny obejmujący odpowiednie kontrole transfekcji i wyciszenia, który zostanie wdrożony w kolejnych etapach realizacji zadania.

Znaczenie uzyskanych wyników i perspektywy dalszych badań

Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie metodologiczne i poznawcze. Jednoznaczne wykazanie braku przydatności linii iPAM303 jako modelu infekcyjnego ASFV pozwoliło na racjonalne ukierunkowanie dalszych prac badawczych i uniknięcie błędnych interpretacji wyników. Opracowanie i wdrożenie modelu pierwotnych makrofagów pęcherzykowych płuc stanowi kluczowy krok w kierunku wiarygodnej oceny mechanizmów interakcji wirus-gospodarz.

W kolejnych etapach projektu planowane jest przeprowadzenie badań infekcyjnych z wykorzystaniem pierwotnych makrofagów, funkcjonalna walidacja genu TTC12 oraz innych genów kandydujących (m.in. DAB2IP), a także porównanie odpowiedzi komórek pochodzących od świń domowych i dzików. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości stanowić podstawę do opracowania genetycznych markerów oporności na ASF i ich wdrożenia do krajowych programów hodowlanych, przyczyniając się do zwiększenia bezpieczeństwa biologicznego produkcji trzody chlewnej.

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 jest opracowanie nowych równań regresji do szacowania zawartości mięsa w tuszy świń ocenianych poubojowo w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh). Zgodnie z obowiązującą metodyką oceny poubojowej świń tucz kontrolny trwa do osiągnięcia masy ciała – 120 kg, wcześniej było to 100 kg. Dlatego też powstała konieczność opracowania nowych równań do określania mięsności świń. Zgodnie z zasadami obowiązującymi przy opracowaniu takich równań, docelowo szczegółowej dysekcji poddanych zostaje minimum 120 półtuszy każdej z grup rasowych, tj. komponentu matecznego, który w ramach prowadzonych badań reprezentuje rasa pbz oraz komponentu ojcowskiego reprezentowanego przez mieszańce F1 duroc x pietrain. Zwierzęta pochodzą 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 ich 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.

W drugim roku realizacji zadania, zgodnie z harmonogramem prac przeprowadzono 2. etap, tj. część doświadczalną wykonywaną przez Stację Kontroli Użytkowości Trzody Chlewnej zlokalizowaną w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB Chorzelów Sp. z o.o. Kolejny rok realizacji zadania rozpoczęto ze stanem świń znajdujących się w SKURTCh w Chorzelowie wynoszącym 52 sztuki świń, w tym 22 mieszańce ras pietrain i duroc oraz 30 rasy pbz. W kolejnych miesiącach zakupiono 50 prosiąt w wieku i masie ciała zgodnym z założeniami metodyki oceny stacyjnej świń. W związku z tym uzyskano zakładane w zadaniu liczebności obydwu genotypów świń, tj. 120 sztuk rasy pbz oraz 120 mieszańców F1 pietrain i duroc, biorąc pod uwagę dwa pierwsze lata jego realizacji. Przeprowadzono tucz kontrolny według obowiązującej metodyki. Wykonano 102 dysekcje szczegółowe lewych półtuszy zgodnie z metodyką SKURTCh, w tym 30 sztuk świń rasy pbz oraz 72 sztuki mieszańców ras pietrain i duroc.

W dniu 31 grudnia 2025 roku zakończona została, zgodnie z harmonogramem zadania, część doświadczalna przeprowadzona w SKURTCh w Chorzelowie. W trakcie roku utworzono dalsze struktury baz danych, w których w formie elektronicznej kolekcjonowane były wyniki dy-sekcji szczegółowych tusz zwierząt doświadczalnych.

Zadanie 01-11-08-11

Wykorzystanie kiszonki oraz produktów ubocznych przemysłu browarniczego i winiarskiego w celu poprawy dobrostanu, składu mikroflory jelitowej i wyników produkcyjnych świń.

kierownik zadania: dr inż. Martyna Małopolska

Głównym celem zadania jest podniesienie poziomu dobrostanu świń z wykorzystaniem produktów ubocznych przemysłu winiarskiego i browarniczego, poprzez realizację celów szczegółowych:

1. Opracowanie receptury i kompleksowa analiza gryzaków dla świń wytworzonych z młota browarniczego i wyłtoków owocowych, obejmująca badanie aktywności przeciwutleniającej, przeciwmikrobiologicznej oraz składu bioaktywnego.

2. Ocena wpływu suplementacji mieszanką z kiszonką z ziarna kukurydzy na ilościowy i jakościowy skład mikrobiomu bakteryjnego jelit świń.
3. Ocena wpływu wzbogacenia środowiska na fizjologię i zachowanie warchlaków.

Niniejsze badanie zapewnia kompleksowy obraz sukcesji mikrobiomu jelit świń od odsadzenia do uboju. Wynikiem badań do zastosowania w praktyce jest skład jakościowy i ilościowy mikrobiomu, co pozwoli na stworzenie wzorca prawidłowo funkcjonującego mikrobiomu jelitowego świń. Badania ilościowe i jakościowe mogą dostarczyć informacji na temat mikroorganizmów jelitowych, co ma znaczenie dla optymalizacji żywienia zwierząt gospodarskich, a tym samym poprawieniu efektywności produkcji.

W oparciu o uzyskane wyniki dotyczące wpływu dodatku wzbogacającego środowisko bądź żywienia opartego na kiszonce na mikrobiom jelitowy świń będzie można dostosować strategię żywieniową i dobrostanową świń. Oznacza to, że modyfikacja poprzez zmianę żywienia, zmianę materiałów wzbogacających środowisko wpłynie nie tylko na status funkcjonalny i zdrowotny jelit, ale również na ogólny stan zdrowia zwierząt, w tym na poziom ich dobrostanu i komfortu psychicznego, co ma przełożenie w poprawie efektywności produkcji, bezpieczeństwa żywności i sprzyja idei zrównoważonego rolnictwa.

Założenia metodyczne

Do produkcji gryzaków wykorzystano produkty uboczne pochodzenia roślinnego, pozyskane lokalnie: młóto browarnicze, stanowiące pozostałość po ekstrakcji brzezki z ziaren siodu jęczmiennego po zakończeniu procesu warzenia piwa, charakteryzujące się wysoką zawartością białka i błonnika oraz wyłtoki jabłkowe, będące pozostałością po tłoczeniu soku jabłkowego. Surowce poddano obróbce cieplnej (suszeniu), a następnie rozdrobieniu.

Przygotowano cztery warianty recepturowe gryzaków o zróżnicowanym składzie:

- wariant I: młóto browarnicze + mąka pszenna + 2 jaja kurze,
- wariant II: wyłtoki jabłkowe + mąka pszenna + 2 jaja kurze,
- wariant III: młóto browarnicze + wyłtoki jabłkowe + mąka pszenna + 2 jaja kurze,
- wariant IV: młóto browarnicze + mąka pszenna + woda.

Po połączeniu składników gryzaki wypiekano w piecu w kilku wariantach temperaturowo-czasowych, w powtórzeniach technologicznych, w celu uzyskania odpowiedniej konsystencji poprzez optymalizację procesu suszenia oraz formowania gryzaków.

Zastosowano następujące warianty wypieku:

- 220°C przez 40 minut,
- 220°C przez 60 minut, a następnie 100°C przez 40 minut,
- 180°C przez 120 minut.

Po wypieku gryzaki pozostawiano do wystudzenia w temperaturze pokojowej, a następnie pakowano próżniowo i przechowywano do czasu wykonania dalszych analiz.

Przygotowanie próbek do analiz obejmowało rozdrobienie i mielenie w młynku laboratoryjnym przez 12 s. Do analiz stosowano materiał suchy, a wyniki przeliczano na suchą masę (s.m.). Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach analitycznych. Wilgotność produktów ubocznych oraz gotowych gryzaków oznaczano przy użyciu wagosuszarki laboratoryjnej poprzez suszenie próbek (ok. 2 g) w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy.

Zawartość polifenoli ogółem oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina–Ciocalteu. Jako wzorzec zastosowano (+)-katechinę, a absorbcję mierzono przy długości fali 760 nm. Wyniki obliczano na podstawie krzywej wzorcowej. Aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodami ABTS i DPPH. Metoda ABTS polegała na pomiarze zdolności ekstraktów do redukcji kationorodnika ABTS•⁺ (734 nm), a wyniki wyrażano jako równoważniki Troloxu (mg Trolox/100 g s.m.). Metoda DPPH opierała się na ocenie zdolności próbek do redukcji stabilnego rodnika DPPH•, a aktywność przeciwutleniającą wyrażano jako procent inhibicji na podstawie spadku absorbcji przy 516 nm. Zawartość białka oznaczano metodą Kjeldahla poprzez oznaczenie całkowitej zawartości azotu i przeliczenie jej na białko przy użyciu współczynnika 6,25.

Ocenę organoleptyczną gryzaków przeprowadzono z udziałem zespołu oceniającego, stosując pięciostopniową skalę punktową (1–5). Oceniano barwę, jednorodność rozmieszczenia składników, zapach, konsystencję, odczucie wilgotności, lepkość oraz ogólną akceptowalność produktu.

Najwyższą zawartością białka oraz najwyższą aktywnością antyoksydacyjną (ABTS i DPPH) charakteryzowały się gryzaki oparte na młócie browarniczym. Warianty zawierające wyłoki jabłkowe cechowały się wyższą wilgotnością oraz podwyższoną zawartością polifenoli ogółem.

Materiał zwierzęcy i warunki utrzymania

Do badań wytypowano 48 loszek linii 990, pochodzących z miotów, w których znajdowały się co najmniej trzy samice. Zwierzęta utrzymywano w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Pawłowicach.

W momencie odsadzenia loszki podzielono na trzy grupy doświadczalne, po 16 osobników w każdej, przy czym samice z jednego miotu przydzielano do różnych grup:

grupa I – kontrolna,

grupa II – żywiona kiszonką z ziarna kukurydzy,

grupa III – grupa z dodatkiem gryzaków z młóta browarniczego.

Wychowanie prowadzono w systemie *ad libitum*, przy jednoczesnej kontroli pobrania paszy. Dla każdej grupy opracowano mieszanki paszowe typu prestarter i starter, zbilansowane pod względem energii metabolicznej, białka ogólnego, włókna, aminokwasów egzogennych oraz składników mineralnych.

Zrealizowano planowaną rotację materiałów wzbogacających środowisko w systemie trzydniowym (poniedziałek, środa, piątek). Dodatkowo w grupie żywionej młótem, w każdy poniedziałek stosowano gryzaki z młóta browarniczego.

Materiał biologiczny (kał, mocz, ślina, szczecina) pobierano w trzech punktach czasowych: w momencie wprowadzenia zwierząt do kojców, w połowie tuczu oraz bezpośrednio przed ubojem.

Zgromadzono dane dotyczące cech tucznych i rzeźnych, wykonano pomiary przyżyciowe metodą PIGLOG oraz pomiary poubojowe grubości stoniny i wysokości oka polędwicy. Po uboju pobrano szeroki zakres materiału biologicznego, w tym krew, fragmenty jelit, treść jelit, mięsień najdłuższy grzbietu oraz tkankę tłuszczową, które zabezpieczono do dalszych analiz.

Przez cały okres tuczu prowadzono monitoring zwierząt przy użyciu systemu ciągłego nagrywania wideo. Zwierzęta zostały indywidualnie oznaczone, a zgromadzony materiał wideo zabezpieczono do dalszych analiz.

W kolejnych etapach nagrania zostaną poddane analizie behawioralnej, koncentrującej się na zachowaniach zabawowych oraz wskaźnikach dobrostanu.

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

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.

Doświadczenie przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzeli. Badaniami objęto kogutki objęte programem ochrony zasobów genetycznych zwierząt, tj. zielononóżka kuropatwiana (Z-11), żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33), rhode island red (R-11), sussex (S-66), leghorn (H-22) i rhode island white (A-33), w ilości po 50 sztuk w każdej rasie (Fot. 1.).

Kogutki ras/rodów: Z-11, Ż-33, R-11, S-66, H-22, A-33
(Fot. J. Calik).



Pisklęta w 1. dniu życia zważono i oznakowano indywidualnymi znaczkami. Program szczepień obejmował szczepienia przeciwko chorobie: Mareka, rzekomemu pomorowi, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, chorobie Gumboro. Wszystkie rasy/rody utrzymywano z zachowaniem dobrostanu w optymalnych warunkach środowiskowych. Przez cały okres odchowu ptaki miały zapewniony stały, nieograniczony dostęp do wody i były żywione ad libitum mieszanką sypką zawierającą 204 g białka ogólnego i 2820 kcal, tj. 11.85 MJ EM w 1 kg paszy. Mieszkankę przygotowano na bazie śrut zbożowych opartych na krajowych źródłach, z wyłączeniem śruty sojowej.

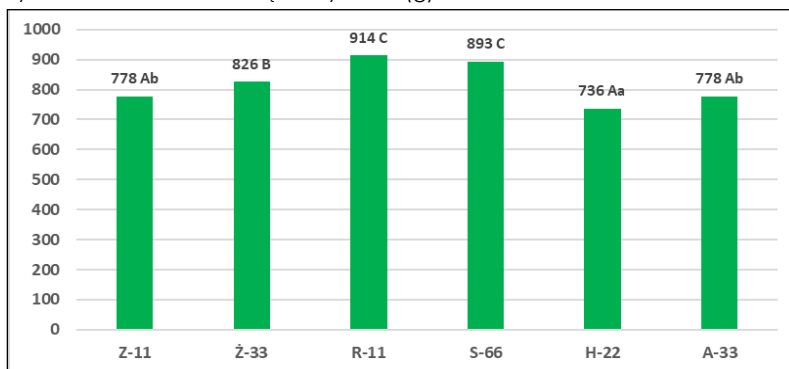
W 10. tygodniu życia kogutków z każdej rasy wybrano do uboju po dziesięć ptaków o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie. Ptaki przez około 12 godzin przed ubojem nie otrzymywały paszy, natomiast miały zapewniony stały dostęp do wody. Czynność uśmiercania została przeprowadzona przez osobę przeszkoloną, metodą dekapitacji. Następnie została przeprowadzona standardowa obróbka poubojowa (oparzenie, skubanie, patroszenie). Schłodzone tuszki poddano analizie rzeźnej według metodyki Zioteckiego i Doruchowskiego (1989), określając: wydajność rzeźną z podrobami, udział mięśni piersiowych i nóg, kości, podrobów (żołądka, wątroby, serca) oraz tłuszczu sadełkowego. Z każdej tuszki wypreparowano całe mięśnie piersiowe i nóg. 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. Wodochłonność (WHC) mięśni piersi i nóg zostały określone metodą Grau i Hamma (1953). Uzyskane wyniki

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

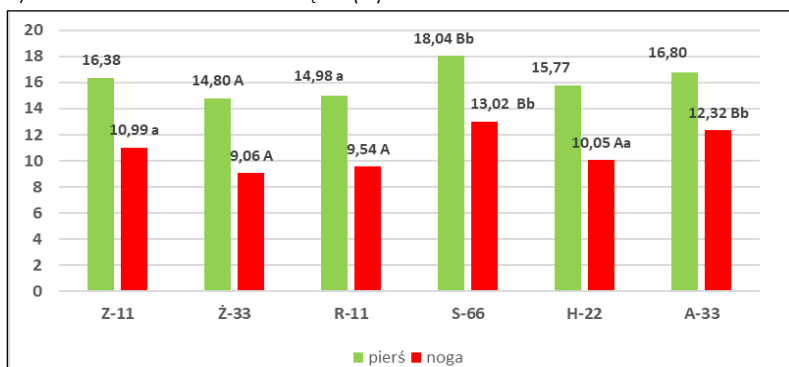
Średnia masa ciała (Rycina 1.) w 10. tygodniu życia ptaków była istotnie ($P \leq 0.01$) największa u kogutków S-66 i R-11 (893–914 g), przy jednocześnie istotnie ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$) największej wydajności rzeźnej z podrobami (72,01–73,28%). Najmniejszą masę ciała i wydajność rzeźną odnotowano u kogutków H-22, która wynosiła odpowiednio 736 g i 69,15 %. Kogutki S-66 i R-11 na tle ocenianych ras wyróżniały się także większą zawartością mięśni piersiowych (15,11–15,36%) oraz nóg (19,12–20,07%). Największą zawartość podrobów, a szczególnie żołądka, odnotowano u kogutków R-11 ($P \leq 0.05$). Zawartość tłuszczu sadełkowego stanowiła od 0,65 (Z-11) do 1,19% (S-66) masy tuszki, przy istotnych różnicach statystycznych ($P \leq 0.01$). Najmniejsze wartości pH odnotowano u kogutów S-66, które różniły się istotnie ($P \leq 0.05$) w mięśniach piersiowych od H-22 i A-33, a w mięśniach nóg od pozostałych ocenianych ras/rodów. Po 24 godzinach schładzania tuszek wartości pH były bardziej ustabilizowane i nie odnotowano wpływu rasy na pomiary kwasowości ocenianych mięśni. Mięśnie piersiowe kogutków Ż-33 i R11 w porównaniu do S-66 charakteryzowały się korzystniejszym wskaźnikiem wodochłonności (Rycina 2.). W mięśniach nóg odnotowano statystyczne różnice pomiędzy kogutkami Z-11, Ż-33, R-11 i H-22 a S-66 i A-33. Najlepsze parametry kruchości (Rycina 3.) wykazywały mięśnie piersiowe kogutków Ż-33 i R-11 w odróżnieniu od H-22, przy istotnych różnicach statystycznych ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$). Podobne różnice odnotowano w mięśniach nóg.

Uzyskane wyniki dostarczają cennych informacji o kształtowaniu się jakości parametrów jakości mięsa kogutków różnych ras żywionych w oparciu o krajowe źródło białka. Kogutki rhode island red (R-11) i sussex (S-66), w porównaniu do pozostałych ocenianych ras, wyróżniały się istotnie największą masą ciała, wydajnością rzeźną i umiśnieniem tuszki. Zarówno mięśnie piersiowe, jak i nóg kogutków rhode island Red (R-11) i żółtonóżka kuropatwiana (Ż-33) cechowały się lepszymi parametrami fizycznymi, takimi jak wodochłonność i kruchość.

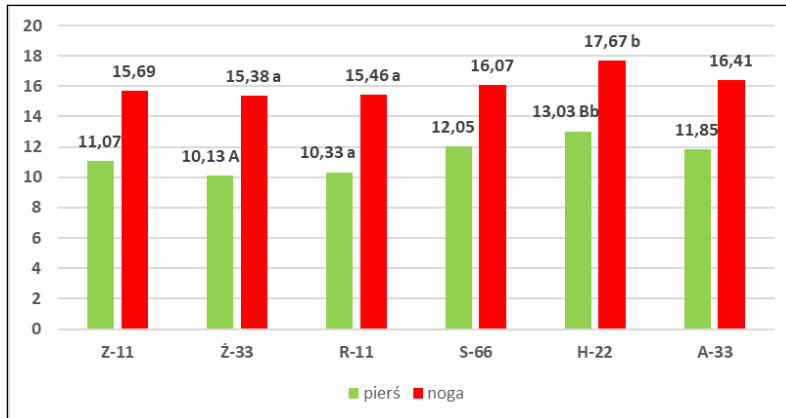
Rycina 1. Kształtowanie się masy ciała (g).



Rycina 2. Wodochłonność mięśni (%).



Rycina 3. Kruchość mięśni (N).



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 przeprowadzonych badań była ocena wpływu żywienia kaczek z dodatkiem wybranych preparatów fitobiotycznych (preparat czosnku i preparat propolisu) na fizykochemiczne parametry jaj.

Materiałem badawczym w realizowanym zadaniu 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 Instytutu Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Kołuda Wielka.

W tym celu utworzono łącznie 12 grup doświadczalnych:

- cztery grupy kontrolne (P-8 K, P-9 K, P-33 K, LsA K) – standardowa mieszanka paszowa,
- cztery grupy żywieniowe – czosnek (P-8 CZ, P-9 CZ, P-33 CZ, LsA CZ) – mieszanka paszowa wzbogacona preparatem czosnku,
- cztery grupy żywieniowe – propolis (P-8 P, P-9 P, P-33 P, LsA P) – mieszanka paszowa wzbogacona preparatem propolisu.

Tabela 1. Ramowy układ doświadczenia.

Lp.	Grupa genetyczna kaczek	Żywienie			Liczba jaj pobrana do analiz
		bez dodatku	+ czosnek	+ propolis	
1.	P-8	30 sztuk	30 sztuk	30 sztuk	90 sztuk
2.	P-9	30 sztuk	30 sztuk	30 sztuk	90 sztuk
3.	P-33	30 sztuk	30 sztuk	30 sztuk	90 sztuk
4.	LsA	30 sztuk	30 sztuk	30 sztuk	90 sztuk
Ogółem					360 sztuk

Ogółem ocenie jakościowej zostało poddanych 360 jaj pobranych od ptaków będących w szczytowym okresie produkcji nieśnej (losowo po 30 jaj), które następnego dnia poddane zostały szczegółowej ocenie jakościowej.

Doświadczenie żywieniowe zrealizowano w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, ze względu na to, że utrzymywane są tutaj 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 doświadczenia.

W laboratorium przeprowadzono zgodnie z przyjętą metodyką następujące badania:

- cechy fizyczne: masa jaja (g), indeks kształtu jaja (%); parametry białka: masa (g), wysokość (mm), wartość pH, jednostki Haugha; parametry żółtka: masa (g), barwa ($L^* a^* b^*$), wartość pH; parametry skorupy: masa (g), grubość (μm), wytrzymałość (kg), odkształcenie elastyczne (μm), barwa ($L^* a^* b^*$), porowatość (ilość por/ cm^2),
- cechy chemiczne: zawartość lizozymu (%) oraz jego aktywność hydrolityczną (U/ml).

Doświadczalne jaja kaczek P-9 (Fot. 1. Lidia Lewko)



W przypadku grup doświadczalnych kaczek żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku, masa pozyskanych jaj do badań mieściła się w przedziale od 79,85 g (P-9 CZ) do 86,30 g (P-8 CZ). Najbardziej kulistym kształtem cechowały się jaja kaczek P-33 CZ (72,17%), a wydłużonym LsA CZ (70,00%). W przypadku grup doświadczalnych ptaków żywionych paszą z wzbogaconą preparatem propolisu, jajami o największej masie (84,29 g) i najbardziej kulistym kształcie (73,25%) wyróżniło się stado kaczek LsA P. W pozostałych grupach doświadczalnych masa jaj kształtowała się w przedziale od 80,66 g (P-33 P) do 83,35 g (P-8 P), a indeks kształtu od 70,57 (P-8 P) do 72,57% (P-33 P). Wykazano statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$).

W grupie ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku największą ($p \leq 0,05$) masą białka (47,19 g) wyróżniły się jaja kaczek P-33 CZ. Z kolei największą ($p \leq 0,05$) wysokością białka (7,16 mm), przy jednocześnie najwyższych jednostkach Haugha (77,41) i najmniejszej wartości pH (8,59) cechowały się jaja kaczek LsA CZ. Największą masą białka w grupie doświadczalnej ptaków żywionych paszą z wzbogaconą preparatem propolisu charakteryzowały się jaja LsA P (46,16 g), a najkorzystniejsze parametry jakościowe białka – największa wysokość (6,47 mm) i jednostki Haugha (72,99) wyróżniły jaja kaczek P-33 P. Wartość pH białka mieściła się w zakresie od 8,73 (P-33 P) do 8,81 (LsA P).

Określając cechy fizyczne żółtka jaj wybranych stad doświadczalnych kaczek stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$). Największą masą żółtka zarówno w grupie doświadczalnej ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku jak i propolisu wyróżniły się jaja kaczek P-8, odpowiednio 31,46 g i 30,31 g. Parametr jasności barwy L^* kształtował się w przedziale od 51,77 (P-8 CZ) do 54,30 (P-33 CZ) w przypadku grup doświadczalnych ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku oraz od 49,96 (P-33 P) do 53,50 (LsA P) dla jaj kaczek żywionych paszą wzbogaconą dodatkiem propolisu.

Największym udziałem barwy czerwonej (1,82) i żółtej (30,90) cechowały się żółtka jaj kaczek P-9 żywionych paszą z wzbogaconą preparatem czosnku. Natomiast w grupie doświadczalnej kaczek żywionych paszą wzbogaconą dodatkiem propolisu największym natężeniem barwy czerwonej wyróżniły się żółtka jaj P-33 P (1,47), a żółtej żółtka jaj P-8 P (30,19). Wartości pH żółtka ukształtowały się w granicach od 6,03 (P-8 CZ i LsA CZ) do 6,08 (P-9 CZ) dla jaj pozyskanych od ptaków żywionych paszą z wzbogaconą preparatem czosnku oraz od 6,06 (LsA P) do 6,20 (P-9 P) dla jaj pochodzących z grupy doświadczalnej kaczek żywionych paszą wzbogaconą dodatkiem propolisu.

Różnice ($p \leq 0,05$) zaobserwowano ponadto w przedstawionych cechach obrazujących jakość skorup jaj. W grupie doświadczalnej kaczek żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku jaja pozyskane ze stada P-9 charakteryzowały się skorupami o największej masie (8,05 g), grubości (424,2 μm), wytrzymałości (50,25 N) przy jednocześnie najmniejszej porowatości (12,50 porów/ cm^2). W grupie ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem propolisu jaja cechowały się lżejszymi skorupami, których masa wyniosła średnio 7,80 g. Najgrubszymi skorupami o największej wytrzymałości wyróżniły się jaja kaczek P-8 P, odpowiednio 415,5 μm i 55,15 N. Porowatość analizowanych skorup kształtowała się w przedziale od 11,0 (P-33 P) do 17,00 (LsA P). Parametr jasności barwy L^* kształtował się w przedziale od 78,92 (LsA CZ) do 85,63 (P-33 CZ) w przypadku grup doświadczalnych ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku oraz od 81,45 (LsA P) do 83,80 (P-8 P) dla jaj kaczek żywionych paszą wzbogaconą dodatkiem propolisu. Największym udziałem barwy czerwonej (1,82) i żółtej (30,90) cechowały się żółtka jaj kaczek P-9 żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku. Skorupy jaj kaczek LsA w obu grupach doświadczalnych charakteryzowały się największym udziałem barwy zielonej, odpowiednio -1,59 (LsA CZ) i -1,42 (LsA P). Z kolei w przypadku jaj kaczek P-33 skorupy tych jaj pozyskane z obu grup żywieniowych odznaczały się największym udziałem barwy żółtej, odpowiednio 6,40 (P-33 CZ) i 5,98 (P-33 P).

Analizując odkształcenie elastyczne skorupy jaj kaczek wybranych grup doświadczalnych dokonanych pod wpływem nacisku 0,5, 1,0 i 1,5 kg odnotowano, iż w grupie doświadczalnej ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem czosnku najwyższą ($p \leq 0,05$) wartością analizowanego parametru pod wpływem wszystkich zastosowanych obciążeń wyróżniły się skorupy jaj LsA CZ, odpowiednio 39,91 μm (nacisk 0,5 kg), 70,71 μm (nacisk 1,0 kg) oraz 89,05 μm (nacisk 1,5 kg). W drugiej grupie doświadczalnej, w której dodatkiem żywieniowym był preparat propolisu, również od rodu LsA pozyskano jaja charakteryzujące się najbardziej odkształcającymi się skorupami pod wpływem zastosowanych obciążeń, a wartości tego wyróżnika kształtowały się w zakresie od 36,04 μm (nacisk 0,5 kg) do 90,86 μm (nacisk 1,5 kg). Odnotowano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Jaja pozyskane od kaczek P-8 żywionych paszą z wzbogaconą preparatem czosnku wyróżniły się białkami o największej ($p \leq 0,05$) zawartości lizozymu (1,38 $\mu\text{g/ml}$), a tym samym najwyższej jego ($p \leq 0,05$) aktywności enzymatycznej ukształtowanej na poziomie 29276 U/ml. Z kolei grupie doświadczalnej ptaków żywionych paszą wzbogaconą preparatem propolisu, największą zawartością i aktywnością badanego enzymu cechowały się białka jaj kaczek P-33, odpowiednio 1,35 $\mu\text{g/ml}$ i 28873 U/ml. Natomiast najmniejszym udziałem lizozymu o jego najmniejszej aktywności enzymatycznej charakteryzowały się jaja pozyskane od rodu LsA w obu doświadczalnych grupach żywieniowych – 1,03 $\mu\text{g/ml}$ i 21866 (LsA CZ) i 1,07 $\mu\text{g/ml}$ i 22808 U/ml (LsA P). Odnotowano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Zadanie 01-12-12-21

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Marcin Samiec

Optymalizacja warunków izolacji komórek blastodermalnych z tarczki zarodkowych zapłodnionych jaj wybranych gatunków hodowlanego drobiu wodnego – kaczki domowej (*Anas platyrhynchos f. domestica* oraz *Cairina moschata f. domestica*); Opracowanie efektywnych metod wyprowadzania hodowli pierwotnych i linii blastodermalno-pochodnych embrionalnych komórek macierzystych kaczek; Stworzenie nowych modeli *ex ovo* pozwalających na szczegółową eksplorację biomarkerów molekularnych oraz różnych ścieżek cytodyferencji i/lub kancerogenezy blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych kaczek.

W ramach drugiego etapu realizacji zadania badawczego opracowano nowatorskie systemy poza-jajowego wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs; ang. blastoderm-derived embryonic stem cells) kaczki domowej na potrzeby:

- określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, proliferacji, zewnątrzkomórkowej stabilizacji fenotypowych cech pluripotencji oraz wysoce specyficznego różnicowania *ex ovo* komórek B-ESCs,
- identyfikacji 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/neurolemogenicznego różnicowania *ex ovo* w kierunku komórek Schwanna (neurolemocytów),
 - c) utrwalenie pozaustrojowych warunków współhodowli B-ESC-pochodnych komórek Schwanna kaczki domowej z komórkami neuronalnymi szczura laboratoryjnego, sprzyjających inicjacji i progresji procesów mielinizacji, czyli tworzenia osłonek mielinowych wzdłuż neurolemmy aksonów sznurzych komórek nerwowych poprzez czynne zaangażowanie B-ESC-pochodnych neurolemocytów kaczki.

Efektom realizacji drugiego etapu niniejszego zadania badawczego było również skonstruowanie innowacyjnego 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 kaczki domowej.

1. Najważniejsze osiągnięcia o charakterze strategicznym i wdrożeniowym oraz wnioski

Stworzenie innowacyjnego modelu komórkowego o wysokim potencjale aplikacyjnym
Opracowano funkcjonalny model komórkowy oparty na blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórkach macierzystych kaczki domowej (Rycina 1. i 2.), umożliwiającymi ich efektywne różnicowanie gliogeniczne *ex ovo* w kierunku komórek Schwanna (neurolemocytów) (Rycina 3). Model ten stanowi nowatorską i konkurencyjną alternatywę wobec klasycznych systemów bazujących na somatycznych komórkach macierzystych, pochodzących z tkanek dorosłych organizmów (ASCs) oraz indukowanych pluripotentnych

komórkach macierzystych (iPSCs), oferując prostsze procedury pozyskiwania, mniejsze ograniczenia etyczne oraz wysoką stabilność hodowlaną.

2. Identyfikacja rasy/rodu/linii K-2 kaczek jako preferencyjnego źródła materiału biologicznego

Wykazano istnienie rasowo uwarunkowanych różnic w kompetencjach komórek B-ESCs do ich neurolemogenicznego przeprogramowania (cytodyferencjacji w kierunku komórek neurolemocyto-podobnych), wskazując rasę/ród/linię K-2, jako szczególnie predysponowaną do uzyskiwania linii komórek przypominających komórki Schwanna o stabilnym i jednorodnym fenotypie (Rycina 3.). Wynik ten ma istotne znaczenie praktyczne, umożliwiając racjonalny dobór materiału biologicznego w przyszłych badaniach rozwojowych i wdrożeniowych.

3. Potwierdzenie funkcjonalnej użyteczności uzyskanych linii neurolemogenicznie zróżnicowanych pochodnych komórek B-ESCs kaczki domowej

Zastosowanie modelu mielinizacji *in vitro* bazującego na współhodowli z komórkami nerwowymi szczura pozwoliło na ocenę zdolności kaczyc B-ESC-pochodnych komórek przypominających komórki Schwanna do podejmowania interakcji neuron-glej. Identyfikacja struktur mielinopodobnych w analizie ultrastrukturalnej stanowi ważny krok w kierunku funkcjonalnej walidacji uzyskanego modelu i potwierdza jego potencjał w badaniach nad regeneracją nerwów (Rycina 4.).

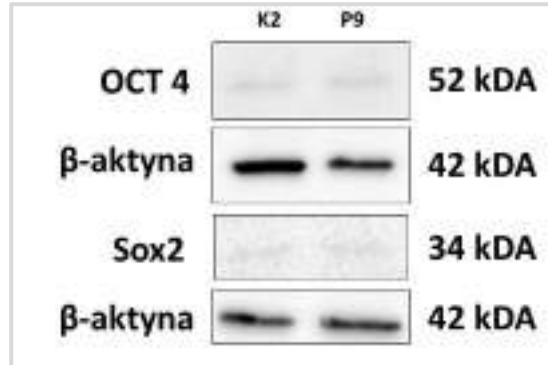
4. Ukierunkowanie dalszego rozwoju badań na poziom przedkliniczny

Uzyskane rezultaty tworzą solidne podstawy do dalszej implementacji w kierunku badań przedklinicznych, obejmujących zwiększenie skali eksperymentów, pogłębioną charakterystykę molekularną oraz ocenę stabilności i bezpieczeństwa uzyskanego fenotypu. Takie podejście otwiera perspektywę wykorzystania opracowanego modelu w przyszłych zastosowaniach z zakresu medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej układu nerwowego.

5. Potencjał długofalowy i znaczenie dla rozwoju biotechnologii

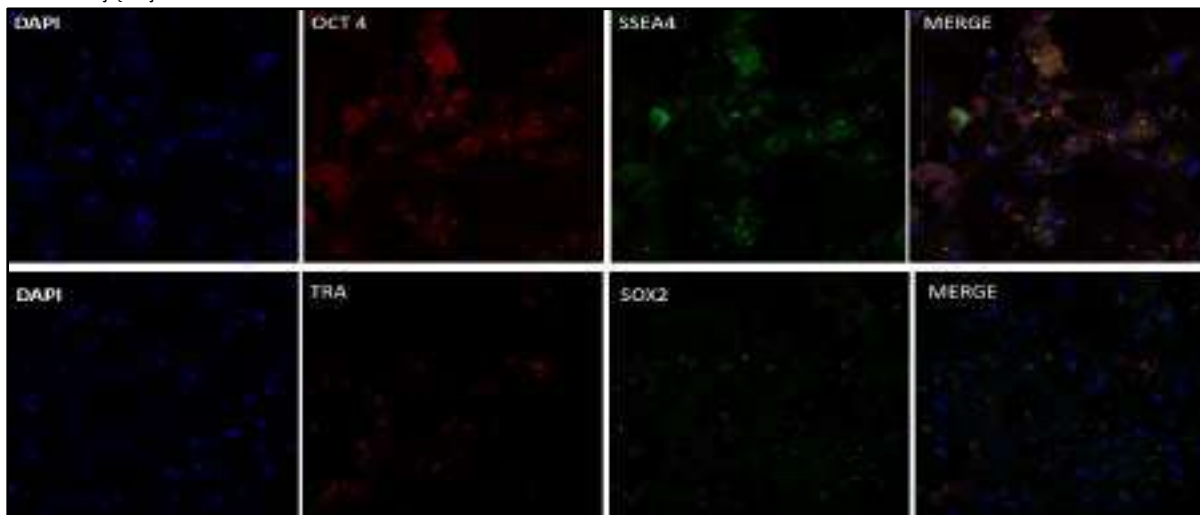
Opracowany system badawczy wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju nowoczesnej biotechnologii i medycyny regeneracyjnej, wzmacniając krajowe kompetencje w obszarze zaawansowanych modeli komórkowych. Niniejsze zadanie badawcze stwarza realne możliwości dla konstruowania interdyscyplinarnych platform badawczo-rozwojowych.

Rycina 1. Opracowanie modeli badawczych hodowli ex ovo blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kaczki domowej na potrzeby określenia profilu proteomicznego związanego z relatywną ekspresją czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) warunkujących charakter pluripotencyjny.



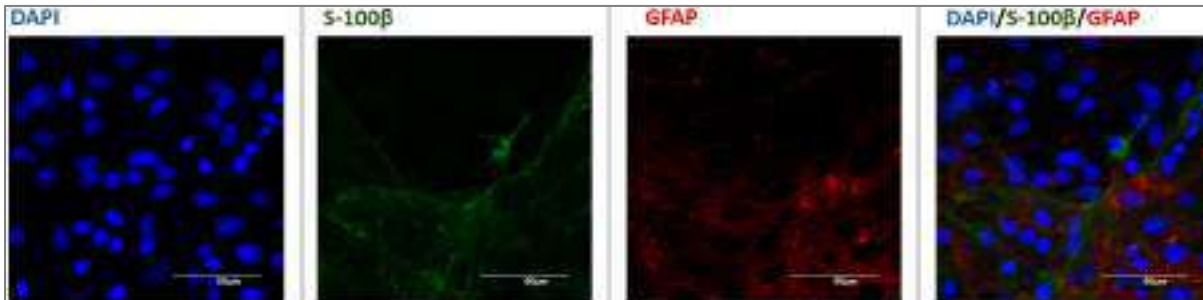
Reprezentatywne wyniki analizy ilościowej Western-blot (W-B) wskazujące na relatywną ekspresję biomarkerów pluripotencji Oct-3/4 i Sox-2 na poziomie białka całkowitego, wyizolowanego z hodowanych ex ovo przez 14 dni komórek B-ESCs wybranych ras/rodów/linii kaczek (K-2, P-9).

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



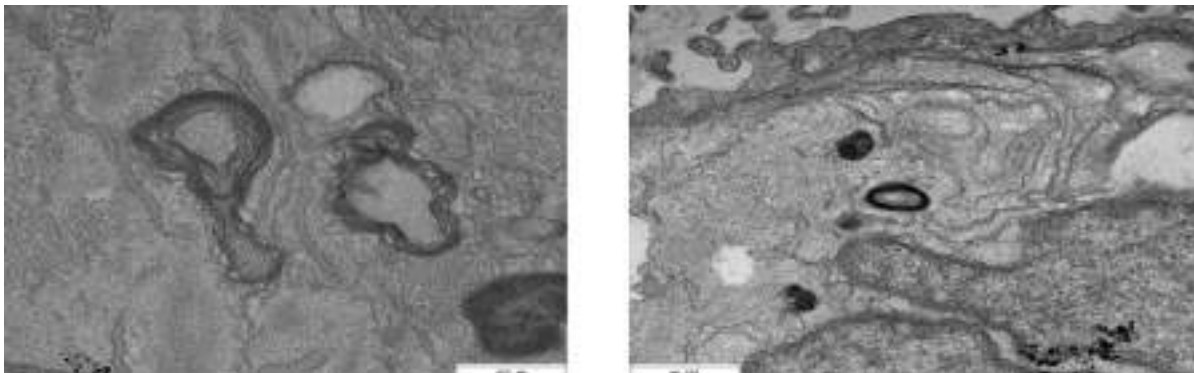
Mikrofotografie przedstawiają kacze komórki B-ESCs, rosnące w postaci jednej warstwy – detekcja czerwonych sygnałów pochodzących albo od barwnika fluorescencyjnego AlexaFluor 594 albo od fluorochromu Alexa Fluor 555 oznacza, odpowiednio: wewnątrzkomórkową immunolokalizację cząsteczek białka Oct-4 (homeotyczny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

Rycina 3. Analiza immunofluorocytochemiczna linii klonalnych neurolemogenicznie zróżnicowanych pochodnych kaczych komórek B-ESCs rasy/rodu/linii K-2, przeprogramowanych strukturalno-funkcjonalnie w kierunku komórek przypominających komórki Schwanna (SC-LCs; ang. *Schwann cell-like cells*) 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 – identyfikacja zielonego sygnału pochodzącego od barwnika fluorescencyjnego AlexaFluor 488 wskazuje na powierzchniową immunolokalizację cząsteczek glikoproteinowego epitopu błonowego S-100 β . Z kolei, detekcja czerwonego sygnału emitowanego przez wzbudzony fluorochrom Alexa Fluor™ 555 oznacza zewnątrzkomórkową immunolokalizację cząsteczek glikoproteinowego epitopu powierzchniowego GFAP. Na wszystkich zdjęciach niebieski sygnał pochodzi od fluorochromu DAPI, który znakuje DNA jąder komórkowych. Obraz nakładany (DAPI/S-100 β /GFAP) jednoznacznie potwierdza nabywanie przez komórki immunofenotypu charakterystycznego dla komórek Schwanna. Skala: 50 μ m.

Rycina 4. Opracowanie modelu mielinizacji *in vitro* w warunkach współhodowli B-ESC-pochodnych komórek Schwanna (komórek przypominających neurolemocyty) kaczuki domowej (rasy/rodu/linii K-2) z liniami komórek neuronalnych szczura laboratoryjnego, w którym udowodniono trwałe zachowanie funkcji cytofizjologicznych kaczych komórek Schwanna w obecności szczurzych neuronów hipokampalnych poprzez aktywny współdziałanie neurolemocytów ptasich w tworzeniu osłonki mielinowej wokół neurolemmy aksonów i/lub dendrytów formujących włókna nerwowe.



Wysokorozdzielcze obrazowanie z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) skutkowało identyfikacją wielowarstwowych struktur błonowych o koncentrycznej organizacji, odpowiadających osłonkom mielinowym formowanym wokół wypustek komórek neuronalnych szczura (aksonów/neurytów i/lub dendrytów), co sugeruje zdolność kaczych B-ESC-pochodnych komórek przypominających komórki Schwanna do inicjowania procesów mielinizacji *in vitro*.

Zadanie 04-12-07-11

Ocena dobrostanu drobiu w aspekcie stosowania suplementacji *in ovo* oraz różnych zabiegów technologicznych w okresie okołolęgowym.

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

Przeprowadzono pierwszy etap, tj. badanie pilotażowe, które stanowi podstawę do wypracowania założeń metodycznych i procedur ich wprowadzania w kolejnych etapach zadania. Celem badań było określenie wpływu 12- i 24-godzinnego oświetlenia zielonym światłem LED podczas inkubacji na cechy wylęgowe oraz jakość piskląt brojlerów Ross 308.

Badania przeprowadzono w wylęgarni w Zakładzie Hodowli Drobiu Instytutu Zootechniki PIB w Aleksandrowicach. Doświadczenie przeprowadzono na 324 jajach wylęgowych pochodzących ze stada rodzicielskiego Ross 308. Przed rozpoczęciem procesu inkubacji, jaja wylęgowe zostały poddane ocenie jakości. Następnie jaja losowo przydzielono do trzech grup doświadczalnych (inkubatorów), z sześcioma powtórzeniami w każdej grupie i 18 jajami na powtórzenie.

Zastosowano różne warunki stymulacji świetlnej w całym okresie inkubacji (21 dni):

- grupa kontrolna – brak ekspozycji na światło (D24:L0),
- ciągła ekspozycja na światło – (D0:L24),
- fotoperiod – 12 godzin ciemności oraz 12 godzin oświetlenia (D12:L12).

System oświetleniowy inkubatora składał się z modułów LED RGB (Citi RGB LED Modules, 0.72 W/60 mA), zainstalowanych po obu stronach aparatu lęgowego pomiędzy tacami przeznaczonymi do umieszczania jaj. W doświadczeniu zastosowano monochromatyczne światło zielone o szczytowej długości fali 525 nm. Natężenie oświetlenia mierzono na poziomie jaj za pomocą cyfrowego luksomierza (Testo 545, Niemcy) i utrzymywano na poziomie 200 ± 20 lx. W celu eliminacji wpływu światła zewnętrznego przednie okno każdego inkubatora pokryto folią ograniczającą przenikanie światła.

A) System oświetleniowy inkubatora; (B) Obserwacje tempa klucia (Fot. J. Pawłowska).



Przed rozpoczęciem procesu inkubacji, jaja wylęgowe o średniej masie 60,4 g przechowywano przez 2 dni w temperaturze 17°C. Po okresie przechowywania każde jajo zostało zważone, oznaczone i następnie umieszczone w jednym z trzech identycznych aparatów lęgowych wyposażonych w zintegrowane kosze klujnikowe (HEKA Favorit Olymp, Rietberg, Niemcy). Inkubację prowadzono całkowicie zgodnie ze standardowymi procedurami stosowanymi w wylęgarniach. Od 1. do 18. dnia inkubacji jaja utrzymywano w temperaturze 37,8°C oraz wilgotności względnej 55%. W 18. dniu jaja przeniesiono do koszy klujnikowych, gdzie temperatura kształtowała się na poziomie 37,2°C, a wilgotność na poziomie 65%.

Wszystkie jaja prześwietlono w 7. i 18. dobie inkubacji odrzucając jaja niezapłodnione, uszkodzone lub zawierające zamarte zarodki.

W 18. dniu inkubacji wszystkie jaja z każdej grupy zostały zważone w celu obliczenia ubytku masy jaja, a następnie przeniesione do klujnika. Czas wylęgu rejestrowano pomiędzy 18,5. a 21. dobą inkubacji (450-504 h) w interwałach czasowych wynoszących 6 godzin. W tym czasie monitorowano tempo naklucia wewnętrznego i zewnętrznego oraz moment wyklucia. Wszystkie jaja niewyklute zostały objęte analizą embriopatologiczną w celu określenia doby zamarcia zarodka. Aby zminimalizować wpływ czynnika ludzkiego, wszystkie wyklute pisklęta jednodniowe zostały poddane ocenie jakości przez dwóch oceniających. Wykorzystano następujące parametry: masę wylęgową, punktację Tona i długość pisklęcia. Ewaluacja punktowa została wykonana zgodnie z metodyką opracowaną przez Tonę i in. (2003) z oceną aktywności ruchowej, wyglądu zewnętrznego i pozostałości błon. Cechy te oceniane były zgodnie z ich znaczeniem w 100-punktowej skali. Wymiary piskląt oznaczono poprzez pomiar długości od czubka dzioba do końca środkowego palca nogi z dokładnością do 0,5 cm.

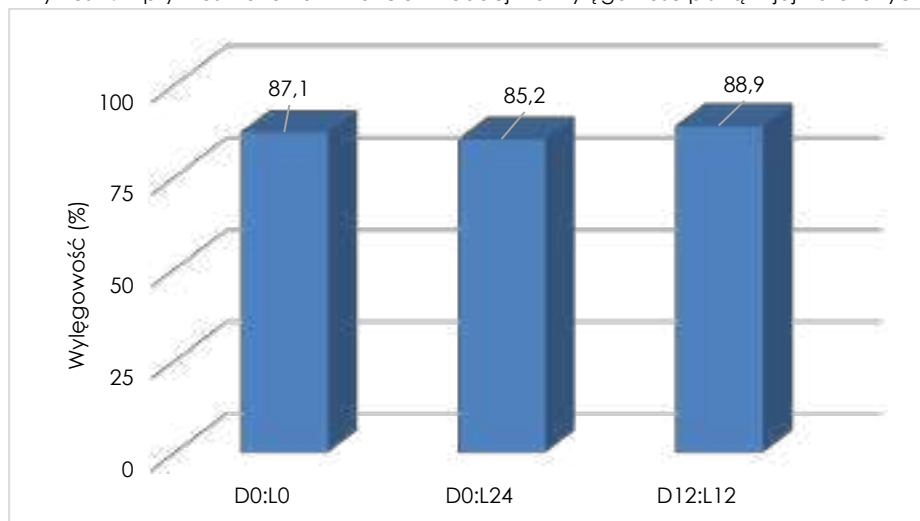
Utratę masy jaja oraz masę pisklęcia względem jaja w zależności od oświetlenia w trakcie inkubacji przedstawiono w Tabeli 1. Najwyższą utratę masy jaja (11,3%) zaobserwowano w grupie D0:L24 i ta wartość różniła się istotnie statystycznie względem pozostałych grup. Z kolei najwyższą masę względną pisklęcia odnotowano w grupie kontrolnej ($P < 0,001$).

Tabela 1. Wpływ oświetlenia w trakcie inkubacji na utratę masy ciała oraz masę względną piskląt brojlerów Ross 308 (średnia \pm odchylenie standardowe).

Grupa	D0:L0	D0:L24	D12:L12	p-value
Utrata masy jaja (%)	7,9 \pm 2,4 ^b	11,3 \pm 0,5 ^a	9,3 \pm 2,3 ^b	0,028
Masa pisklęcia względem jaja (%)	73,1 \pm 0,5 ^a	72,2 \pm 0,4 ^b	71,8 \pm 0,4 ^b	<0,001

Rezultaty inkubacji wyrażone wylęgowością jaj nałożonych po zastosowaniu różnych warunków oświetlenia nie wykazały statystycznie istotnych różnic (Wykres 1.). Pomimo braku statystycznego potwierdzenia, zaobserwowano, że najniższy odsetek piskląt wyklutych występował w grupie z ciągłą ekspozycją na światło w trakcie inkubacji. Wylęgowość w tej grupie była niższa niż w grupie kontrolnej i D12:L12, odpowiednio o 2 i 4 punkty procentowe (p. p.).

Wykres 1. Wpływ oświetlenia w trakcie inkubacji na wylęgowość piskląt z jaj nałożonych



Analiza przebiegu lęgu przedstawiona w Tabeli 2. świadczy o tym, że wprowadzenie różnych warunków oświetlenia w trakcie inkubacji nie zaburzyło tempa klucia wewnętrznego ($P>0,05$). W drugim okresie klucia, tzw. zewnętrznym zaobserwowano, potwierdzony statystycznie wpływ oświetlenia 12-godzinnego na opóźnienie klucia zewnętrznego. Proces nakłuwania skorupy jaja w grupie D12:L12 trwał dłużej niż w grupie kontrolnej, średnio o 4,5 godziny ($P<0,05$), natomiast samo klucie we wspomnianej grupie było dłuższe o 3,2 godziny ($P<0,05$).

Tabela 2. Wpływ oświetlenia w trakcie inkubacji na przebieg lęgu piskląt brojlerów Ross 308 (średnia \pm odchylenie standardowe).

Grupa	D0:L0	D0:L24	D12:L12	p-value
Nakłucie wewnętrzne	457,3 \pm 7,3	455,1 \pm 7,1	455,3 \pm 5,9	0,165
Nakłucie zewnętrzne	469,0 \pm 8,8 ^b	468,8 \pm 9,2 ^b	473,5 \pm 7,8 ^a	0,016
Klucie	485,8 \pm 6,6 ^b	486,4 \pm 7,1 ^b	489,0 \pm 5,3 ^a	0,002

Wyniki dotyczące jakości piskląt jednodniowych przedstawiono w Tabeli 3.

Dla oceny jakości ptaków posłużono się następującymi wskaźnikami: masa ciała, długość piskląt oraz liczba punktów według skali Tona i in. (2003). Zastosowanie oświetlenia w trakcie inkubacji nie miało istotnego wpływu na jakość piskląt jednodniowych ($P>0,05$).

Pisklęta ze wszystkich grup charakteryzowały się zbliżoną długością oraz masą ciała. Wydłużony proces klucia zaobserwowany w grupie 12:12 skutkował obniżoną jakością piskląt, co potwierdziła niższa ocena upierzenia i wyglądu zewnętrznego (wyższy odsetek mokrych piskląt) ($P<0,05$).

Tabela 3. Wpływ oświetlenia w trakcie inkubacji na jakość piskląt jednodniowych

Grupa	D0:L0	D0:L24	D12:L12	p-value
Masa ciała (g)	43,8 \pm 2,7	43,3 \pm 2,6	43,9 \pm 2,8	0,082
Długość piskląt (cm)	14,4 \pm 0,7	14,6 \pm 0,6	14,7 \pm 0,7	0,141
Punktacja Tona*	98,7 \pm 3,7	99,1 \pm 2,5	98,7 \pm 2,9	0,459
Puch/wygląd	10,0 \pm 0,2 ^a	9,9 \pm 0,4 ^a	9,5 \pm 0,9 ^b	0,001

*Tona score (Tona i in, 2003)

W podsumowaniu przeprowadzonych w tym okresie badań wysunięto następujące uogólnienia dotyczące stosowania stymulacji świetlnej w okresie inkubacji brojlerów:

1. Ciągła ekspozycja na światło w trakcie inkubacji spowodowała istotną utratę masy jaj wylęgowych.
2. Stymulacja świetlna w okresie inkubacji nie miała wpływu na wskaźniki wylęgowości.
3. Nie odnotowano wpływu stymulacji świetlnej na jakość piskląt jednodniowych.
4. Chociaż stymulacja światłem zielonym podczas inkubacji nie miała negatywnego wpływu na wylęgowość i śmiertelność zarodków, ekspozycja na cykl świetlno-ciemny może zakłócać czas wylęgu.

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 było określenie wpływu fitogenicznych dodatków paszowych na wskaźniki produkcyjne rodzimych ras owiec i kóz.

Etap zadania: Ocena efektywności odchowu jagniąt w warunkach produkcyjnych

Materiał doświadczalny i lokalizacja

Jagnięta rasy merynos barwny ze stada Instytutu Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Kołuda Wielka. Część doświadczalna przeprowadzona została na fermie, ubój zwierząt i ocenę rzeźną dokonano w Instytucie Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Pawłowice. Wykoty odbyły się w okresie styczeń–marzec. Jagnięta utrzymywane były grupowo przy matkach, w systemie alkierzowym, żywione sianem łąkowym i paszą treściwą, ze stałym dostępem do lizawek. W wieku 40 dni zwierzęta podzielone zostały na grupy.

Układ doświadczenia

Jagnięta utrzymywane były w kojcach grupowych (po 12 jagniąt w każdej grupie):

- grupa I: grupa kontrolna/pasza bez dodatku/odchów tradycyjny (70 dni),
- grupa II: pasza bez dodatku/odchów skrócony (56 dni),
- grupa III: pasza z dodatkiem/odchów tradycyjny,
- grupa IV: pasza z dodatkiem/odchów skrócony.

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

Tabela 1. Składniki mieszanki ziołowej dla jagniąt.

Koper włoski
Jeżówka purpurowa (Echinacea)
Czosnek
Tymianek

Pomiary i analizy

Pomiary przyżyciowe – dokonano ważeń kontrolnych w 56 dniu życia oraz w dniu rozpoczęcia doświadczenia i na zakończenie doświadczenia. Wykonano przyżyciowe pomiary USG mięśnia najdłuższego grzbietu (MLD).

Pomiary poubojowe – w ramach zadania, w Instytucie Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Pawłowice, przeprowadzono ubój jagniąt, wykonano pomiary poubojowe, dyssekcję szczegółową wyrębów wartościowych oraz pobrano i zabezpieczono próbki mięsa do analiz.

Analiza rzeźna – wykonana została według procedur stosowanych w Instytucie Zootechniki PIB: oszacowanie wydajności rzeźnej, określenie udziału wyrębów, masa wyrębów wartościowych, dyssekcja szczegółowa udźca.

Ocena jakości mięsa – pobrane próbki mięśnia udźca poddano analizom składu mięsa.

Wyniki analiz

W Tabeli 2. przedstawiono podstawowe parametry tuczu jagniąt. Masa początkowa jagniąt odchowywanych tradycyjnie wynosiła 32,65 kg, a średni czas trwania tuczu wyniósł 32,58 dni. Jagnięta utrzymywane w tym systemie, żywione paszą z dodatkiem ziół, osiągnęły masę handlową w krótszym okresie. W obu grupach uzyskano wyższe wartości wydajności rzeźnej niż przy odchowie skróconym. Jagnięta uzyskały dobre przyrosty masy ciała, choć zróżnicowane w zależności od grupy. Grubość i powierzchnia MLD była najwyższa w grupach bez suplementacji.

Tabela 2. Wpływ badanych czynników na cechy tuczne i rzeźne jagniąt.

Parametr	Tradycyjny odchów		Skrócony odchów	
	Kontrola	Ziółta	Kontrola	Ziółta
Masa początkowa (kg)	31.45A	33.83A	25.04B	26.28B
Masa końcowa (kg)	45.38	45.37	45.96	45.02
Koniec tuczu (dni)	100.83A	112.08B	94.86C	103.80A
Czas trwania tuczu (dni)	34.33A	30.83B	49.00C	43.20D
Przyrost w trakcie tuczu (kg)	15.96A	11.56B	20.95C	18.76C
Przyrost dzienny w trakcie tuczu (g)	465.66A	370.89B	428.37A	436.83A
Przyrost dzienny życiowy (g)	435.15A	373.21B	446.32A	396.67B
Pasza na kg wzrostu (kg)	4.41A	4.43A	3.42B	3.95B
Masa tuszy przed głodzeniem (kg)	46.68	45.18	46.56	45.15
Masa tuszy po głodzeniu (kg)	42.90	42.14	42.96	42.21
Masa tuszy ciepłej (kg)	22.30	21.73	21.93	21.30
Masa tuszy zimnej (kg)	21.60	21.02	21.30	20.61
Prawa półtusza (kg)	10.52	10.23	10.27	9.98
Lewa półtusza (kg)	11.06	10.78	10.92	10.63
Wydajność rzeźna (%)	50.33a	49.84a	49.51b	48.59b
Masa udźca (kg)	3.67	3.51	3.54	3.46
Masa mięsa udźca (kg)	2.52	2.37	2.36	2.34
Masa tłuszczu udźca (kg)	0.41	0.40	0.46	0.38
Masa kości (kg)	0.74	0.73	0.72	0.74
Masa części wartościowych (kg)	50.10	49.57	49.47	49.59
Grubość MLD (cm)	3.10a	2.97b	3.02a	2.91b
Grubość tłuszczu MLD (cm)	0.39	0.38	0.39	0.37
Powierzchnia MLD (cm ²)	11.20A	9.60B	10.48A	9.13B

A, B – $P \leq 0.01$; a, b – $P \leq 0.05$ – średnie w wierszach i oznaczane różnymi literami różnią się istotnie.

System odchowu nie miał wpływu na zawartość suchej masy popiołu i cholesterolu. Zawartość tłuszczu różniła się w zależności od systemu odchowu i żywienia. Najniższa była w grupie odchowywanej tradycyjnie, bez dodatku. Mięso grup bez suplementacji charakteryzowało się wyższą zawartością białka w mięsie.

Tabela 3. Wpływ badanych czynników na skład chemiczny mięsa jagnięcego.

Parametr	Tradycyjny odchów		Skrócony odchów	
	Kontrola	Ziota	Kontrola	Ziota
Sucha masa [%]	24.06	23.75	23.93	23.92
Popiół [%]	1.10	1.10	1.10	1.09
Tłuszcz [%]	2.00aA	2.29bB	2.21cC	2.52dD
Białko [%]	21.13A	20.62B	20.99A	20.44B
Cholesterol [mg/100 g]	0.77	0.73	0.74	0.75

Udział poszczególnych grup kwasów tłuszczowych (SFA, UFA, MUFA, PUFA-6) tłuszczu mięsa jagnięcego nie różnił się w zależności od sposobu żywienia ani odchowu, jednak zawartość poszczególnych kwasów była zróżnicowana. Zawartość kwasu kaprynowego była istotnie wyższa w grupach otrzymujących dodatek ziota. Zawartość kwasu oleinowego była najwyższa w grupie odsadzanej części od matek i suplementowanej ziołami. Kwas arachidonowy (C20:4) występował w największej ilości w tłuszczu mięsa jagnięcego odchowywanego tradycyjnie.

Tabela 4. Wpływ badanych czynników na profil kwasów tłuszczowych tłuszczu mięsa jagnięcego (%).

Parametr	Tradycyjny odchów		Skrócony odchów	
	Kontrola	Ziota	Kontrola	Ziota
C10	0.03A	0.09B	0.02A	0.11B
C12	0.32	0.32	0.33	0.37
C14	3.93	4.35	4.01	4.04
C16	24.86	24.97	25.12	24.58
C16-1	1.78	1.78	1.92	1.83
C18	14.25	14.14	13.78	13.88
C18-1	37.27aA	39.64B	39.46bB	40.34C
C18-2	11.69	10.04	10.50	10.36
GAMA	0.21	0.18	0.18	0.21
C20	0.04	0.03	0.03	0.04
C18-3	0.98a	0.85b	0.84b	0.81b
CLAC9-T11	0.55	0.64	0.65	0.67
CLAT10-C12	0.02	0.00	0.01	0.00
CLAC9-C11	0.02	0.00	0.02	0.00
CLAT9-T11	0.01	0.00	0.01	0.00
C22	0.09	0.05	0.06	0.04
C20-4	3.28A	2.42B	2.57B	2.35B
C22-1	0.00	0.01	0.00	0.00
EPA	0.32	0.23	0.25	0.15
DHA	0.36A	0.26B	0.25B	0.18C
SFA	43.51	43.95	43.36	43.09
UFA	56.49	56.05	56.64	56.91
MUFA	39.06	41.42	41.38	42.17
PUFA	17.43	14.62	15.26	14.74
PUFA-6	15.18	12.64	13.24	12.93
PUFA-3	1.66A	1.34B	1.34B	1.14C
DFA	70.74	70.19	70.42	70.79
UFA-SFA	1.30	1.28	1.31	1.32
MUFA-SFA	0.90	0.94	0.96	0.98
PUFA-SFA	0.40	0.33	0.35	0.34
PUFA 6-3	9.11a	9.71b	9.99b	11.53c

Jagnięta odchowywane tradycyjnie przy matkach do 70. dnia i żywione paszą z dodatkiem ziół osiągnęły masę handlową w najkrótszym czasie. Pod względem zarówno parametrów tucznych, jak i rzeźnych stwierdzono zróżnicowanie w zależności od grupy. Odchów tradycyjny jagniąt merynosa wydaje się być najkorzystniejszym dla składu mięsa.

Stado merynosa barwnego w IZ PIB ZD Kołuda Wielka (Fot. 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.

Etap: Ocena jakości innowacyjnych produktów z mleka rodzimych ras trzech gatunków

Polskie rodzime rasy – koza karpacka, krowa rasy czerwono-białej, polska owca górska (Fot. M. Pasternak).



Wytworzenie produktów mlecznych

W ramach etapu, z mleka trzech gatunków rodzimych przeżuwaczy: polska owca górska, koza karpacka i krowa rasy czerwono-białej, wytworzone zostały produkty mleczne jogurt typu SKYR i ser typu HALLOUMI, a następnie wykonano analizy chemiczne i organoleptyczne tych

produktów w celu oceny i porównania ich właściwości odżywczych, prozdrowotnych i sensorycznych.

Jogurt typu SKYR i ser typu HALLOUMI wytworzone zostały w warunkach przetwórci z mleka zbiorczego, osobno z każdego rodzaju mleka, zgodnie z recepturami stosowanymi przez serowara przy wytwarzaniu tych produktów. Ocenę produktów wykonano w Katedrze Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.



Halloumi (halloomi) – tradycyjny cypryjski ser półtwardy o wysokiej temperaturze topnienia, co pozwala na jego smażenie i grillowanie bez utraty kształtu. Wytwarzany jest z mleka owczego, koziego, często krowiego, z dodatkiem mięty i soli, posiada słony smak i sprężystą, lekko gumowatą konsystencję.



Skyr – tradycyjny islandzki produkt mleczny podobny do jogurtu, ale gęstszy i znacznie bogatszy w białko, często bez tłuszczu, wytwarzany przez dodanie podpuszczki i usunięcie serwacji, co nadaje mu unikalną, kremową konsystencję i kwaśny smak.

Wyniki analizy chemicznej produktów

Jogurt typu SKYR

Rodzaj użytego mleka miał wpływ na skład podstawowy i wartość energetyczną wytworzonego jogurtu.

Skyr owczy miał najwyższą zawartość podstawowych składników z wyjątkiem węglowodanów oraz największą wartość energetyczną (Tabela 1.). Zawierał najwięcej wapnia, fosforu i sodu; skyr kozie – potasu i żelaza. Zarówno produkty owcze, jak i kozie, miały wyższą zawartość magnezu i manganu (Tabela 2.).

Analizując profil aminokwasowy skyru stwierdzono, że we wszystkich produktach najliczniej wystąpiła glutamina, prolina oraz lizyna. Dla większości aminokwasów stwierdzono statystycznie istotne różnice, w zależności od gatunku. Mleko krowie zawierało więcej kwasu asparaginowego, glutaminy, seryny, glicyny, argininy, tyrozyny. Przewagę tryptofanu, proliny, waliny i metioniny stwierdzono w mleku kozim. W serze owczym dominującym aminokwasem była alanina i cysteina.

Tabela 1. Skład podstawowy skyru (%) i wartość kaloryczna.

Parametr	Owca	Koza	Krowa
Sm	23.99A	17.32B	12.12C
Białko	8.28A	6.43B	3.77C
Tłuszcz	11.59A	6.97B	4.03C
Popiół	0.85A	0.75B	0.76B
Węglowodany	3.27	3.17	3.56
Kcal	150.50A	101.15B	65.61C
KJ	625.14A	421.16B	273.81C

A, B, C – $P \leq 0.01$; a, b, c – $P \leq 0.05$ – średnie w wierszach i oznaczone różnymi literami różnią się istotnie.

Tabela 2. Minerality w skyrze (mg/kg).

Parametr	Owca	Koza	Krowa
Ca	1547.09A	1505.06B	1221.78C
Cd	0.01B	0.01B	0.02A
Fe	51.98A	57.43B	43.09C
Mg	236.07A	235.09A	148.19B
Mn	1.04A	1.05A	0.80B
P	707.30A	646.85B	449.94C
Pb	-	0.18A	0.16A
Zn	4.66B	4.94A	3.30C
K	1242.71C	1979.30A	1855.48B
Na	634.97A	305.24C	489.65B

Objaśnienia: Tabela 1.

Ser typu Halloumi

Podobnie jak w przypadku jogurtu, również ser owczy miał najwyższą zawartość podstawowych składników z wyjątkiem węglowodanów i popiołu, oraz największą wartość energetyczną (Tabela 3.). W przypadku aminokwasów stwierdzono mniejsze zróżnicowanie składu pomiędzy rodzajami produktu. Podobnie jak w jogurcie typu SKYR, dominującymi aminokwasami były glutamina i leucyna.

Tabela 3. Skład podstawowy halloumi (%) i wartość kaloryczna.

Parametr	Owca	Koza	Krowa
Sm	52.52A	44.44B	42.24C
Białko	24.49A	20.08B	18.44C
Tłuszcz	23.85A	19.95B	19.65B
Popiół	2.70B	2.96A	2.75B
Węglowodany	1.48	1.45	1.40
kcal	318.51A	265.67B	256.21C
KJ	1323.84A	1104.14B	1064.31C

Objaśnienia: Tabela 1.

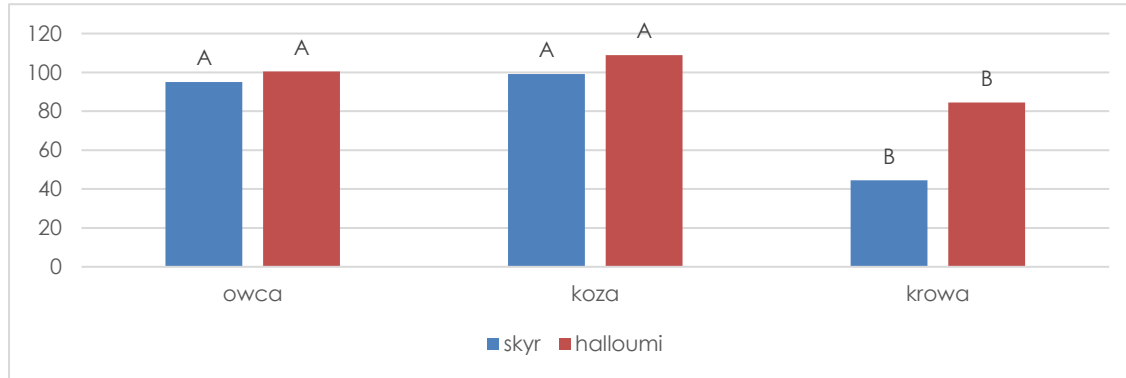
Analizując profil kwasów tłuszczowych w serze, stwierdzono wpływ rodzaju użytego mleka na większość kwasów. W tłuszczu serów kozich było więcej niż w pozostałych średnio łańcuchowych kwasów tłuszczowych (MCT), takich jak kapronowy (C6:0), kaprylowy (C8:0) i kaprynowy (C10:0), które odpowiadają za ich łatwiejszą przyswajalność produktów kozich w porównaniu do serów krowich; kwasy te stanowią 15–20% tłuszczów w serze kozim.

W serze owczym stwierdzono więcej, niż w kozim i krowim, kwasu palmitooleinowego (C16:1 n-7), oleinowego (C18:1 n-9), linolowego (C18-2n-6), alfa-linolenowego (C18:3 n-3) oraz prawie czterokrotnie więcej CLA (sprężony kwas linolowy). Kwasy tłuszczowe: laurynowy (C12:0), mirystynowy (C14:0), palmitynowy (C16:0) dominowały w serze krowim.

Produkty owcze i kozie charakteryzowały się wyższą zawartością tych składników niż krowie.

Zawartość składników fenolowych przedstawiono na Wykresie 1.

Wykres 1. Zawartość fenoli ogółem w skyrze i halloumi.



Przeprowadzone badania wykazały, że produkty wytworzone z mleka różnych gatunków charakteryzowały się zróżnicowanym podstawowym składem chemicznym, zawartością kwasów tłuszczowych oraz właściwościami antyoksydacyjnymi.

Produkty te mogą stanowić ciekawą ofertę na rynku produktów mlecznych dla różnych grup konsumentów.

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 zaplanowanych badań była ocena skuteczności wykorzystania wypasu małych przeżuwaczy w redukcji występowania roślin inwazyjnych z rodzaju *Solidago*. Określono jakość i właściwości pozyskiwanego od kóz mleka. Działania zaradcze – usuwanie roślin inwazyjnych metodą wypasu i koszenia.

Przygotowanie terenu i wypas

Kontynuowano działania na terenie podzielonym w poprzednim roku na trzy części, na których przeprowadzono wypas owiec i kóz oraz zastosowano koszenie. Pozostawiono również obszar kontrolny, na którym nie prowadzono żadnych działań.

Monitoring przyrodniczy

W sezonie wegetacyjnym 2025 roku powtórnie 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.*

Na założonych czterech stałych polach monitoringowych, zajmowanych przez inwazyjne gatunki z rodzaju *Solidago*, losowano w każdym terminie kontroli po 40 poletek badawczych (po 10 dla każdego pola):

- pole nr 1 – wdrożono tutaj wyłącznie wypas owiec,
- pole nr 2 – wprowadzono tutaj tylko wypas kóz,
- pole nr 3 – użytkowano kośnie,
- pole nr 4 – brak użytkowania (pole kontrolne).

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.

Badania wskazują, że na początku doświadczenia w poszczególnych polach pokrycie nawłoci *Solidago gigantea* było dość porównywalne (od ok. 25% w polu kontrolnym do nieco ponad 40% w polu koszonym; średnio ok. 32,6%). Po pierwszym etapie zabiegów ochronnych zwarcie nawłoci spadło średnio do 12,5%, jednak w polu nr 1 (owce) rekordowo do 1,5%. Na koniec drugiego etapu badań w bieżącym roku pokrycie nawłoci było bliskie zeru na powierzchniach wypasanych i tym razem nieco wyższe w przypadku pastwiska owczego (choć tu wielkość pokrycia przez cały rok utrzymywała się na podobnym poziomie 0,5-1%. Natomiast wypas kóz powodował stopniowe ograniczanie wielkości populacji inwazyjnej nawłoci (wahając się w przedziale ok. 8-12%), ale ostatecznie to tutaj zanotowano praktycznie całkowitą jej redukcję w końcowym etapie doświadczenia.

Powierzchnia doświadczalnia z podziałem na 4 pola badawcze (Fot. 1. D. Suder).



Stado kóz (Fot. 2. D. Suder).



Powierzchnie nieużytkowane z dużymi plamami nawłoci. (Fot. 3. D. Suder).



Obszar badawczy – II cykl (Fot. 4. D. Suder).



Poletka o właściwej strukturze gatunkowej, zgryzana przez kazy, nawłóć niemal całkowicie wyeliminowana (Fot. 5. D. Suder).



Chroniona centuria pospolita tuż obok powierzchni białawczej (Fot. 6. D. Suder).



Ocena jakości mleka pozyskanego od kóz żywionych nawłocią

Analizy próbek mleka pozyskanych od grupy kóz pasących się na pastwisku kontrolnym, które nie zawierało w swym składzie nawłoci lub zawierało jej bardzo mało, oraz od grupy kóz pasących się na pastwisku porośniętym nawłocią, różniły się statystycznie istotnie pod względem wielu parametrów. Mleko od kóz wypasanych na pastwisku z nawłocią, zawierało w swym składzie istotnie więcej suchej masy, białka i tłuszczu, miało wyższą niż w grupie kontrolnej kaloryczność.

Tabela 1. Skład podstawowy i właściwości technologiczne mleka pozyskanego od kóz z grupy kontrolnej i doświadczalnej.

Parametr	Kontrola	Nawłóć
Sucha masa	12.24A	12.82B
Białko	3.91A	4.34B
Tłuszcz	3.36a	3.59b
Popiół	0.79	0.80
Laktoza	4.17	4.09
Kcal	62.62a	65.99b
KJ	261.94a	275.96b
Gęstość	1030.41	1030.85
pH	6.70	6.62
Kwasowość	6.72A	7.63B
Czas krzepnięcia	4.59	5.01

A, B – $P \leq 0.01$; a, b – $P \leq 0.05$ – średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie.

Elektroforeza białek mleka wykazała, że mleko uzyskane od kóz z grupy wypasanej na nawłoci zawierało istotnie więcej immunoglobulin niż mleko kóz z grupy kontrolnej. Charakteryzowało się ono również istotnie niższą zawartością kazeiny alfa-s2-kazeiny i kappa-kazeiny oraz wyższą alfa-laktoalbuminy.

Tabela 2. Elektroforeza białek mleka pozyskanego od kóz z grupy kontrolnej i doświadczalnej.

Parametr	Kontrola	Nawłóć
Laktoferyna	0.91	0.97
albumina serum	2.45	1.85
Immunoglobuliny	3.97A	6.78B
Alfa-s2-kazeina	10.49a	9.05b
Alfa-s1-kazeina	4.77	4.85
Beta-kazeina	38.70	38.24
Kappa-kazeina	15.56A	14.37B
Beta-lactoglobulina	13.55	14.33
Lizozym	1.72	0.82
Alfa-lactoalbumina	6.43A	7.75B
Peptydy	2.26	1.75

Objaśnienia: Tabela 1.

Podsumowanie etapu

Wypas owiec i kóz okazał się skuteczną metodą eliminacji nawłoci; zanotowano praktycznie całkowitą jej redukcję w końcowym etapie doświadczenia.

Mleko od kóz wypasanych na pastwisku z nawłocią, zawierało w swym składzie istotnie więcej suchej masy, białka i tłuszczu, miało wyższą niż w grupie kontrolnej kaloryczność; zawierało więcej immunoglobulin, przy niższej zawartości kazeiny alfa-s2 i kappa.

Zadanie 01-13-07-11

Optymalizacja systemów żywienia jagniąt z uwzględnieniem warunków ekologicznych w celu poprawy wyników produkcyjnych oraz uzyskania produktu wysokiej jakości.

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

Celem badań jest ocena efektywności odchowu i tuczu, wartości rzeźnej oraz jakości odżywczej i prozdrowotnej mięsa jagniąt ras należących do odmiennych typów użytkowych, utrzymywanych w różnych systemach żywienia na terenie Polski.

Etap badawczy realizowany w roku sprawozdawczym – Ocena użytkowości tucznej i rzeźnej jagniąt utrzymywanych w gospodarstwie ekologicznym.

Polska owca pogórza w gospodarstwie ekologicznym Jaworze
(Fot. Marta Pasternak-Choros).



Tryczki ze stada rodzimej rasy polska owca pogórza w Jaworzu (z Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki PIB Grodziec Śląski sp. z o.o.) w wieku ok. 6 miesięcy podzielone zostały na dwie grupy:

- grupa I (alkierz): jagnięta żywione alkierzowo, sianem tåkowym do woli i paszą treściwą (0,3-0,5 kg), ze stałym dostępem do lizawek,
- grupa II (pastwisko): jagnięta przebywały na pastwisku oraz otrzymywały dodatek paszy treściwej (0,3-0,5 kg); lizawki.

Dokonano ważeń kontrolnych w 56. dniu życia oraz w dniu rozpoczęcia doświadczenia (wiek 4 miesiące) i na zakończenie doświadczenia (7 miesięcy). Wykonano przyżyciowe pomiary USG mięśnia najdłuższego grzbietu (MLD).

Jagnięta polskiej owcy pogórza (Fot. Marta Pasternak-Chorosz).



W ramach zadania, w Instytucie Zootechniki PIB Zakład Doświadczalny Pawłowice, przeprowadzono ubój jagnięt, wykonano pomiary poubojowe, dysekcję szczegółową wyrębów wartościowych oraz pobrano i zabezpieczono próbki mięsa do analiz.

Wstępna analiza pokazała różnice w parametrach tucznych i rzeźnych jagnięt w zależności od systemu utrzymania/żywienia. Jagnięta korzystające z pastwiska były cięższe, a pomiary mięśnia najdłuższego grzbietu dla tej grupy miały wyższe wartości (Tabela 1.). Masa tusz oraz jej pomiary również wskazują na przewagę grupy utrzymywanej na pastwisku (Tabela 2.).

Masa wyrębów uzyskanych podczas dysekcji półtuszy różniła się między grupami. Dla wszystkich wyrębów była ona wyższa w grupie żywionej na pastwisku (Tabela 3.). W dysekcji szczegółowej ilość tłuszczu w antrykocie i udźcu była mniejsza w grupie wypasanej.

Korzystniejsze parametry tuczne i rzeźne uzyskano dla grupy utrzymywanej na pastwisku.

Tabela 1. Pomiary przyżyciowe.

Parametr	Alkierz	Pastwisko
Masa jagnięt (kg)		
Masa początkowa	34,69	34,50
Masa końcowa	40,69	43,06
Pomiary USG MLD		
Głębokość MLD (cm)	2,39	2,59
Szerokość MLD (cm)	4,48	4,51
Powierzchnia MLD. (cm ²)	7,44	7,99
Grubość tłuszczu (cm)	0,17	0,18

Tabela 2. Pomiary poubojowe.

Parametr	Alkierz	Pastwisko
Masa tusz (kg)		
Masa tuszy przed głodź.	35,85	39,54
Masa tuszy ciepłej	14,56	17,41
Masa tuszy zimnej	13,94	16,51
Prawa półtusza	6,79	8,07
Lewa półtusza	7,15	8,44
Pomiary (cm)		
Długość grzbietu	28,38	40,36
Szerokość grzbietu	36,38	21,86
Obwód udźca	37,00	38,86

Tabela 3. Masa wyrębów i szczegółowa dysekcja części wartościowych (kg).

Parametr	Alkierz	Pastwisko
Szyja	0,73	0,82
Karkówka	0,29	0,80
Łopatką	1,25	1,63
Łata	1,06	1,20
Antrykot	0,51	0,57
mięso	0,32	0,32
tłuszcz	0,29	0,04
kości	0,17	0,20
Comber	0,44	0,51
mięso	0,28	0,34
tłuszcz	0,04	0,15
kości	0,08	0,10
Udziec	2,37	2,88
mięso	1,65	2,07
tłuszcz	0,18	0,16
kości	0,79	0,64

Ocena mikrobiomu jelitowego jagniąt utrzymywanych w różnych systemach

W celu poszerzenia analiz dotyczących wpływu wypasu na produktywność zwierząt, włączono do metodyki badanie mikrobiomu jelitowego jagniąt, które pozwala ocenić skład i różnorodność bakterii, grzybów i innych mikroorganizmów zasiedlających przewód pokarmowy. Badanie to daje możliwość identyfikacji ewentualnych zaburzeń w składzie mikrobioty, co może mieć wpływ na zdrowie i dobrostan zwierząt.

Pobrane podczas doświadczenia materiały od każdego osobnika obecnie jest analizowany w Laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego, Instytucie Nauk o Środowisku.

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

Zadanie 01-14-05-11

Wpływ rolnictwa precyzyjnego na produkcję suma afrykańskiego w obiegu zamkniętym.

kierownik zadania: dr inż. Przemysław Pol

Celem zadania badawczego było porównanie wyników tradycyjnej produkcji suma afrykańskiego do wyników uzyskanych przy wdrożeniu systemu całodobowego, zdalnego monitorowania produkcji w obiegu RAS.

W wyniku podjęcia badań naukowych objętych wnioskiem, możliwe stało się stworzenie wzorcowej produkcji rybackiej opartej o cyfryzację. Obiegi dla suma zostały podłączone do specjalnej aplikacji z przechowywaniem zebranych danych w chmurze. Aplikacja zapewniła zdalne sterowanie urządzeniami, stały wgląd w bieżące i historyczne parametry, wysyłanie powiadomień oraz alertów, w przypadku zmian poszczególnych parametrów wykraczających poza zadane zakresy normy.

Do kontroli produkcji wykorzystane zostały urządzenia:

- monitorujące i regulujące temperaturę wody w poszczególnych sekcjach obiegu,
- monitorujące temperaturę powietrza w pomieszczeniach do produkcji ryb,
- monitorujące ilości substancji rozpuszczonych w wodzie (Total Dissolved Solids), znajdujących się w formie jonowej,
- monitorujące poziom wody;
- monitorujące odczyn wody pH w obiegu;
- monitorujące potencjał redox ORP;
- zdalne zarządzanie wszystkimi urządzeniami podłączonymi do gniazda zasilania z funkcją opóźnionego włączenia.

Dodatkowym celem zadania było wykonanie analizy porównawczej gonad osobników młodocianych i dojrzałych obu płci suma afrykańskiego hodowanego w wodzie z zaawansowanym systemem filtracji lub z jego brakiem (filtracja podstawowa). Pozwoliło to na wykazanie, czy zanieczyszczenia mają wpływ na morfologię oraz ultrastrukturę wyżej wymienionych narządów, kluczowych dla produkcji rybackiej, ponieważ są one związane z rozrodem.

Założenia metodyczne

Badania prowadzono na dwóch obiegach basenów wyposażonych w oddzielny system filtracji. Każdy obieg wyposażony był w dwa baseny doświadczalne oraz otwarty system filtracji typu sump. Każdy basen miał rzeczywistą objętość wody wynoszącą 560 l, natomiast system filtracji miał rzeczywistą objętość wody wynoszącą 280 l. Całkowita objętość wody w każdym obiegu wynosiła 1400 l. W każdym systemie filtracji umieszczone były sondy temperatury, ORP, pH oraz TDS podłączone z komputerem odczytującym parametry wody w odstępach 10-minutowych. W celu utrzymania stałego poziomu wody w basenach oraz w systemie filtracji, automatycznie grawitacyjnie dolewana była objętość wody jaka odparowywała z obiegów. W celu wymuszenia cyrkulacji wody w sumpie, zastosowano dwie pompy cyrkulacyjne typu Gyre, ustawione w stały tryb pracy i przepływ wody wynoszący 4000 l/h. W sumpie umieszczono trzy tytanowe grzałki o mocy 500 W każda, natomiast temperatura wody była ustawiona na 26°C.

W każdym z obiegów, raz w tygodniu dokonywano podmiany 10% objętości wody oraz inspekcji systemów filtracji. W razie konieczności dokonywano usuwania pływających zawiesin i większych zanieczyszczeń mogących zmniejszyć prędkość przepływu wody w basenach. Również raz w tygodniu dokonywano pomiarów laboratoryjnych ICP wody (jest to test pozwalający na dokładne określenie składu chemicznego wody). Do każdego z basenów o rzeczywistej objętości wody wynoszącej 560 litrów, wpuszczono 200 sztuk wylęgu suma afrykańskiego *Clarias gariepinus* o masie 10,36 g każdy, co przekładało się na zagęszczenie ryb wynoszące 0,0036% na m³, dopuszczając tym samym maksymalne zagęszczenie ryb wynoszące 44,64% na m³ przy docelowej masie każdej ryby wynoszącej 1,25 kg. Z każdego basenu do systemu filtracji odprowadzana była dolna woda zawierająca największą ilość zawiesin oraz produktów przemiany materii ryb. Woda ta przepływała grawitacyjnie do dwóch filtrów mechanicznych typu Roller. W filtrach użyto włókniny o gęstości 40 g/m² oraz o długości 42 m i szerokości 19 cm. Całkowita powierzchnia włókniny wynosiła 7,98 m². Gdy poziom wody w komorze reakcyjnej filtra mechanicznego podnosił się do maksymalnego poziomu, pływak w nim umieszczony podnosił się i uruchamiał silnik nawijający włókninę, co skutkowało obniżeniem się poziomu wody w filtrze. Filtry zostały umieszczone w specjalnych zielonych skrzyniach z ażurowym dnem i bokami, tak aby jedynie dolna część filtra była zanurzona w wodzie. Filtrację biologiczną stanowiło złożo pływające MBBR typu K2 o długości 13 mm i średnicy 16 mm i powierzchnię czynną wynoszącą 1000 m²/m³. Złoża w objętości 10 litrów były umieszczone w workach z oczkiem 4x4 mm. Co dwa tygodnie przez 6 miesięcy wykonywano pomiar długości i masy ciała 6 samców i 6 samic wybranych losowo z każdego basenu, po czym osobniki te były zwracane do basenów. Płeć była określana na podstawie morfologii brodawki płciowej. Po każdym kolejnym miesiącu doświadczenia po 6 osobników z każdego systemu (po 3 z każdego basenu) o podobnej długości i masie ciała wybierano do pośmiertnego pobrania tkanek. Dodatkowo, na zakończenie badań wybrano po 30 osobników z każdego układu (po 15 z każdego basenu) w tym samym celu. Do eutanazji zwierząt zastosowano przedawkowanie środka znieczulającego MS-222 (etylo 3-aminobenzoesan metanosulfonian). o wypreparowaniu gonad, mierzone je oraz ważono. Analizę gonad wykonano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (SM), świetlnego (LM), oraz transmisyjnego (TEM) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) przy użyciu standardowych technik (Dymek et al. 2022). Preparaty histologiczne barwiono tri-chromem Mallory'ego zgodnie z procedurą (Bagiński, 1969). Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica, za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Syntetyczne wyniki badań

Filtry mechaniczne

W systemie zaawansowanym stwierdzono, że każdy z dwóch filtrów rolkowych zużywał średnio jedną rolkę włókniny filtracyjnej co 168 godzin. W okresie eksperymentu trwającym 182 dni, oba filtry zużywały łącznie 52 rolki, co odpowiadało łącznej powierzchni 414,96 m². W systemie podstawowym stwierdzono, że każdy z dwóch filtrów rolkowych zużywał średnio jedną rolkę włókniny filtracyjnej co 56 godzin. W rezultacie, w tym samym okresie oba filtry zużywały łącznie 156 rolek, co odpowiadało łącznej powierzchni 1244,88 m².

Filtr glonowy

Z filtra glonowego każdego tygodnia zdrapywano i ważono algi. W ciągu pierwszych trzech tygodni eksperymentu nie zaobserwowano żadnych glonów. Jednak od czwartego tygodnia, wraz ze wzrostem poziomu fosforanów w wodzie, wzrosła również biomasa glonów, osiągając całkowitą masę 580,60 g pod koniec badania.

Odczyn wody pH

W obu badanych układach obserwowano dobowe wahania odczynu pH wody – w godzinach nocnych utrzymywał się na niższym poziomie, natomiast w godzinach porannych zaczynał wzrastać aż do godziny 13:00–14:00, kiedy to osiągał najwyższą wartość po czym znów poziom ten obniżał się. W układzie z podstawowym systemem filtracji poziom pH był niższy (wahania między 6,78 a 6,98) niż w układzie z zaawansowanym systemem filtracji (wahania między 7,3 a 7,4).

Analiza chemiczna wody (ICP) oraz nasycenie tlenem

Przed wpuszczeniem ryb do basenów, w obiegu z podstawowym systemem filtracji nasycenie tlenem wynosiło 7,12 mg/l natomiast w obiegu z zaawansowanym systemem filtracji 8,36 mg/l. W pierwszym tygodniu, poziom nasycenia tlenem obniżył się do poziomu 4,74 mg/l (spadek o 50,21%) w przypadku podstawowej filtracji oraz do poziomu 7,65 mg/l w przypadku zaawansowanej filtracji (spadek o 9,28%). Z każdym tygodniem nasycenie tlenu w obu obiegach spadało, uzyskując ostatecznie 2,38 mg/l w obiegu z podstawowym systemem filtracji oraz 6,51 mg/l w obiegu z zaawansowanym systemem filtracji a różnice te były istotne statystycznie. Analiza ICP wody pozwoliła sprawdzić obecność wielu pierwiastków i związków chemicznych. Analiza statystyczna wykazała, że różnice istotnie statystyczne zachodziły pomiędzy poziomem amoniaku, siarki oraz żelaza w układach z podstawowym lub zaawansowanym systemem filtracji. W żadnym z badanych układów nie wykazano obecności następujących pierwiastków: As, B, Be, Cd, Co, Hg, La, Pb, Sb, Sc, Sr, Ti, W.

Obserwacje behawioralne

Ryby hodowane w basenach z podstawowym systemem filtracji, były bardziej wrażliwe na bodźce akustyczne, częściej uderzały w ściany basenów, wyskakiwały z wody, podgryzały się powodując uszkodzenia ciała oraz cechowały się mniejszą przeżywalnością. Ryby z basenów z zaawansowaną filtracją wykazywały się krótszym czasem wyjadania paszy oraz brakiem podgryzania się. Ponadto w basenach z zaawansowaną filtracją przeżywalność była na zdecydowanie wyższym poziomie. Nie zaobserwowano natomiast statystycznie istotnych różnic w średnim tempie przyrostu masy zwierząt.

Koszty funkcjonowania odbiegów w doświadczeniu

Badania prowadzono w pomieszczeniu o powierzchni 34,1 m² i objętości 92,07 m³. Badania prowadzono od lipca do grudnia. Pomieszczenie było ogrzewane za pomocą dwóch klimatyzatorów. W obiegu z podstawowym systemem filtracji, pracował komputer akwarystyczny z sondami, filtr mechaniczny, grzałki oraz pompa obiegowa. W obiegu z zaawansowanym systemem filtracji pracował komputer akwarystyczny z sondami, filtr mechaniczny, grzałki, pompa obiegowa, pompa tłocząca wodę do odpieniacza, dwie pompy cyrkulacyjne typu gyre.

W ciągu 6 miesięcy doświadczenia obieg z podstawowym systemem filtracji zużył 5127,44 kWh energii elektrycznej, podczas gdy obieg z zaawansowanym systemem filtracji zużył 5220,47 kWh. Różnica w zużyciu energii przez układy wynosi 93,03 kWh co stanowi 1,18% różnicy pomiędzy układami. Różnica wynikała nie tylko z faktu poboru energii przez dodatkowe pompy, ale również ze względu na błędne odczyty z sond temperatury, które bardzo często przekłamywały temperaturę w dół i zbyt długo utrzymywały włączone grzałki.

Podsumowanie potwierdzające osiągnięcie założonego celu zadania

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że zastosowanie zaawansowanego systemu filtracji pozwala uzyskać lepszą jakość wody hodowlanej, tzn. cechującą się m.in. bardziej stabilnym pH, wyższą zawartością tlenu rozpuszczonego w wodzie oraz mniejszą zawartością amoniaku, co przekłada się na spadek zachowań agresywnych oraz wyższą przeżywalność utrzymywanych zwierząt. U obu płci podstawowy system filtracji miał wpływ na wyższy indeks gonadosomatyczny, tj. gonady były większe w tym systemie niż w zaawansowanym systemie filtracji. Wydaje się, że większy rozwój gonad w trudniejszych warunkach może być strategią mającą na celu uzyskanie większej liczby potomstwa. Dzięki temu jest bardziej prawdopodobne, że część potomstwa przeżyje, a geny rodziców zostaną pomyślnie przekazane następnemu pokoleniu. Badanie wykazało, że systemy filtracji mają znaczący wpływ na dobrostan sumów afrykańskich (*Clarias gariepinus*) hodowanych w obiegu zamkniętym RAS.

Zadanie 01-14-06-11

Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na użytkowość królików.

kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Makuch z pestek dyni to cenny dodatek paszowy dla zwierząt gospodarskich, będący dobrym źródłem wysokiej jakości białka (z wszystkimi 9 aminokwasami egzogennymi), nienasyconych kwasów tłuszczowych (n-3 i n-6), witamin (A, E, C, z grupy B) i minerałów (żelazo, cynk, magnez, wapń), jak również substancji biologicznie czynnych (tokoferole, karotenoidy, terpeny, alkaloidy).

Celem zadania było określenie wpływu dodatku makuchu z pestek dyni do pełnoporcjowych mieszanek paszowych dla królików na ich zdrowotność, wskaźniki odchowu i jakość mięsa. Uzyskane wyniki mogą stać się punktem wyjściowym w dalszych rozważaniach nad poszukiwaniem nowych komponentów paszowych mogących znaleźć wykorzystanie w żywieniu zwierząt w gospodarstwach ekologicznych i u rolników produkujących tak zwaną żywność „bio”.

Króliki na wybiegu w gospodarstwie ekologicznym (Fot. D. Kowalska).



Materiał i metody

W bieżącym roku sprawozdawczym określono wskaźniki statusu redox w surowicy krwi królików, oznaczając aktywność enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i glutationu (GSH), poziom produktu peroksydacji lipidów, tj. stężenie aldehydu dimalonowego (MDA) w osoczu krwi i poziom wskaźnika układu antyoksydacyjnego tj. całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (FRAP). W kolejnym etapie przeprowadzono analizę ekspresji genów FADS2 i ACACA w mięśniu najdłuższym lędźwi (m. longissimus lumborum) i wątrobie.

Wyniki

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że makuch z pestek dyni podawany w paszy królikom istotnie obniża poziom MDA w surowicy krwi (Tabela 1.). Wskazuje to na zmniejszoną peroksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie zwierząt z obydwu grup doświadczalnych.

Rosnący udział makuchu z pestek dyni w dawce żywieniowej królików zwiększył poziom SOD w surowicy krwi króliczej. Istotnie statystycznie różnice wystąpiły pomiędzy wszystkimi grupami żywieniowymi. Nie odnotowano natomiast wpływu badanego dodatku na stężenie CAT we krwi.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu makuchu z pestek dyni na poziom GSH w surowicy krwi badanych zwierząt. Wykazano natomiast jego istotny wpływ na FRAP. Najniższy poziom omawianego parametru odnotowano w grupie kontrolnej, a najwyższy w grupie otrzymującej 10% dodatek makuchu. Świadczy to o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej makuchu z pestek dyni, wynikającej z obecności przeciwutleniaczy, takich jak witamina E i β -karoten.

Tabela 1. Wpływ makuchu z pestek dyni na wskaźniki statusu redox w surowicy krwi królików – średnia \pm SEM.

Wyszczególnienie	Grupa			p-value
	K n = 6	D1 n = 6	D2 n = 6	
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	2,183 \pm 0,07 ^a	1,577 \pm 0,14 ^b	1,482 \pm 0,09 ^b	0,000
SOD (U/ml)	23,989 \pm 0,09 ^a	26,586 \pm 0,40 ^b	27,764 \pm 0,17 ^c	0,000
CAT (U/ml)	19,563 \pm 0,63	19,398 \pm 0,65	17,575 \pm 0,70	0,093
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	4,934 \pm 0,03	4,734 \pm 0,12	4,915 \pm 0,08	0,217
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	6,246 \pm 0,08 ^a	7,603 \pm 0,40 ^{ab}	7,736 \pm 0,54 ^b	0,030

Objaśnienie: K - grupa kontrolna żywiona granulowaną mieszanką podstawową o standardowej recepturze; D1 - grupa żywiona mieszanką z 5 % udziałem makuchu z pestek dyni; D2 - grupa żywiona mieszanką z 10% udziałem makuchu z pestek dyni; a, b, c – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$); MDA – aldehyd dimalonowy; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; CAT – katalaza; GSH – glutation; FRAP – zdolność redukcji jonów żelaza (III); SEM – błąd standardowy średniej.

Przeprowadzona analiza wykazała wpływ omawianego dodatku żywieniowego na poziom ekspresji badanych genów (Tabela 2.). Gen FADS2 oznaczony w mięśniu najdłuższym lędźwi (m. longissimus lumborum) wykazywał istotnie najwyższą ekspresję u królików żywionych paszą z 10% dodatkiem makuchu dyniowego, najniższa ekspresja została odnotowana w grupie kontrolnej. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku ekspresji omawianego genu w wątrobie. Gen odpowiedzialny za syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych odznaczał się najwyższym poziomem w grupie D2.

Najwyższa ekspresja genu ACACA cechowała tkankę mięśniową pobraną od zwierząt z grupy kontrolnej, a statystycznie najniższą grupę żywioną 5% dodatkiem badanego makuchu. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic w ekspresji genu ACACA w wątrobie badanych królików. Zaobserwowano jednak, że najwyższa ekspresja tego genu w wątrobie dotyczyła zwierząt z grupy kontrolnej, a najniższa z grupy D2.

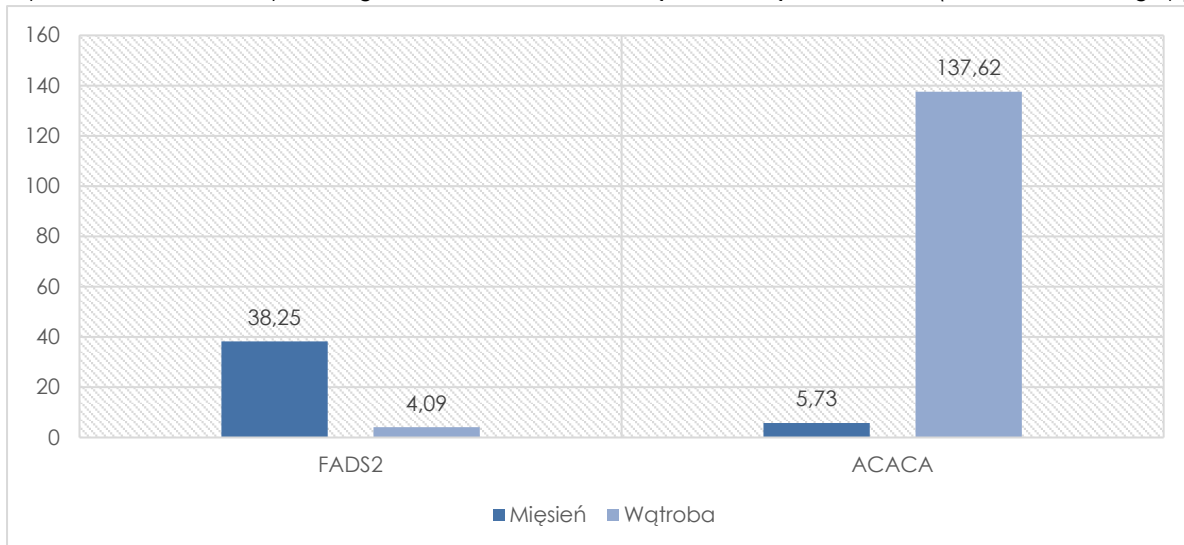
Wykres 1. przedstawia porównanie ekspresji genów FADS2 i ACACA w tkance mięśniowej oraz w wątrobie królików. Stwierdzono, że wyższa ekspresja genu FADS2 cechuje mięśnie, natomiast wątroba odznacza się wyższym poziomem genu ACACA.

Tabela 2. Wpływ dodatku makuchu z pestek dyni na ekspresję genów FADS2 i ACACA w mięśniu najdłuższym lędźwi (*m. longissimus lumborum*) i wątrobie królików – średnia \pm SEM.

Gen	Grupa			p-value
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	
Mięsień				
FADS2	26,18 \pm 3,90 ^a	29,87 \pm 3,32 ^{ab}	41,62 \pm 5,58 ^b	0,096
ACACA	6,60 \pm 1,29 ^a	3,23 \pm 0,66 ^b	5,58 \pm 0,86 ^{ab}	0,778
Wątroba				
FADS2	2,36 \pm 0,49 ^a	3,12 \pm 0,34 ^a	7,71 \pm 2,11 ^b	0,005
ACACA	203,54 \pm 53,33	129,33 \pm 25,34	81,25 \pm 33,46	0,111

Objaśnienie: K - grupa kontrolna żywiona granulowaną mieszanką podstawową o standardowej recepturze; D1- grupa żywiona mieszanką z 5% udziałem makuchu z pestek dyni; D2 - grupa żywiona mieszanką z 10% udziałem makuchu z pestek dyni; a, b – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$); SEM- błąd standardowy średniej.

Wykres 1. Porównanie aktywności genów FADS2 i ACACA w mięśniach i wątrobie królików (średnie dla trzech grup).



Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań w latach 2023–2025 wskazują, że makuch z pestek dyni może być wykorzystywany jako białkowy komponent paszowy stosowany w żywieniu królików, bez wywierania negatywnego wpływu na wyniki produkcyjne. Jego pozytywny wpływ na zdrowotność zwierząt może przyczynić się do ograniczenia występowania chorób i konieczności stosowania syntetycznych środków farmaceutycznych.

Zadanie 01-14-07-11

Wpływ wybranych dodatków paszowych na poprawę jakości mięsa i zdrowotność królików utrzymywanych w różnych warunkach termicznych.

kierownik zadania: prof. dr hab. Dorota Kowalska

Królik domowy (*Oryctolagus cuniculus*) jest gatunkiem szczególnie wrażliwym na podwyższoną temperaturę otoczenia. Wynika to m.in. z ograniczonej liczby gruczołów potowych, wysokiego stosunku powierzchni ciała do masy oraz specyficznej fizjologii termoregulacyjnej. W warunkach, w których temperatura przekracza strefę komfortu termicznego królików (ok. 15–20°C), dochodzi do wystąpienia stresu cieplnego. Zjawisko to, powszechne zwłaszcza w intensywnych systemach produkcji zwierzęcej, prowadzi do licznych zaburzeń fizjologicznych i metabolicznych. Stres cieplny skutkuje m.in. obniżeniem pobrania paszy, zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej, osłabieniem odporności oraz nasileniem stresu oksydacyjnego. Coraz częstsze w Polsce tzw. noce tropikalne, gdzie temperatura nie spada poniżej 20°C, są coraz większym problemem dla hodowców tego gatunku zwierząt.

Cel badań

Celem podjętych badań jest określenie wpływu dodatku do mieszanki paszowej dla królików oleju z Inicznika siewnego (*Camelina sativa L.*) i jego połączenia z imbirzem lub selenem na wyniki użytkowości rozplodowej, tucznej i rzeźnej, jakość mięsa oraz zdrowotność zwierząt utrzymywanych w warunkach podwyższonej temperatury otoczenia.

Materiał i metody

Rozpoczęto realizację pierwszego etapu zadania badawczego pod nazwą „Ocena użytkowości tucznej i rzeźnej królików”. Etap ten obejmował rozród królików rasy popielniańskiej białej i odchów młodych osobników. Po odsadzeniu od matek zwierzęta przeniesiono do metalowych, dwupoziomowych klatek przeznaczonych do odchowu towarowego.

W tych warunkach kontynuowano odchów, stosując pasze eksperymentalne o następujących składach:

- grupa K (kontrolna) – mieszanka pełnoporcjowa, granulowana o standardowej recepturze, zawierająca 2% oleju rzepakowego,
- grupa D1 (doświadczalna) – mieszanka pełnoporcjowa, granulowana z 2% dodatkiem oleju z Inicznika siewnego,
- grupa D2 (doświadczalna) – mieszanka pełnoporcjowa, granulowana z 2% dodatkiem oleju z Inicznika siewnego oraz 0,50% dodatkiem imbiru mielonego,
- grupa D3 (doświadczalna) – mieszanka pełnoporcjowa, granulowana z 2% dodatkiem oleju z Inicznika siewnego oraz dodatkiem selenu w ilości 0,3 mg/kg paszy.

Wyniki

W trakcie odchowu króliki były regularnie ważone w 35., 42., 56., 70. i 90. dniu życia, co pozwoliło na określenie ich użytkowości tucznej (Tabela 1.).

Tabela 1. Wpływ dodatków żywieniowych na masę ciała i przyrosty w poszczególnych tygodniach odchovu królików (g) – średnia \pm SD.

Wyszczególnienie	Grupa			
	K n = 30	D1 n = 30	D2 n = 30	D3 n=30
Masa ciała w 35. dniu	1014 \pm 35	1078 \pm 48	1092 \pm 22	1122 \pm 21
Masa ciała w 42. dniu	1288 \pm 43	1394 \pm 64	1397 \pm 30	1446 \pm 26
Masa ciała w 56. dniu	1793 \pm 48	1948 \pm 83	1965 \pm 36	1961 \pm 32
Masa ciała w 70. dniu	2298 \pm 53 ^b	2433 \pm 88 ^{ab}	2520 \pm 42 ^a	2500 \pm 46 ^{ab}
Masa ciała w 90. dniu	2817 \pm 64 ^b	2944 \pm 94 ^{ab}	3103 \pm 50 ^a	2951 \pm 62 ^{ab}
Przyrosty od 35. do 42. dnia	273,86 \pm 15,86	315,76 \pm 22,61	304,09 \pm 17,39	323,91 \pm 21,36
Przyrosty od 42. do 56. dnia	505,71 \pm 28,19	554,09 \pm 37,88	568,48 \pm 14,74	515,16 \pm 18,39
Przyrosty od 56. do 70. dnia	503,86 \pm 21,53	484,70 \pm 30,32	555,30 \pm 18,23	538,59 \pm 27,36
Przyrosty od 70. do 90. dnia	518,86 \pm 42,33 ^{ab}	512,12 \pm 24,45 ^{ab}	582,42 \pm 27,00 ^a	451,09 \pm 42,79 ^b
Przyrosty od 35. do 90. dnia	1802,29 \pm 64,17	1866,67 \pm 72,95	2010,30 \pm 42,54	1828,750 \pm 56,02

W wieku 90 dni króliki zostały poddane ubojowi. Podczas uboju oraz obróbki poubojowej przeprowadzono analizę rzeźną, obejmującą m.in. określenie wydajności rzeźnej oraz mas wybranych elementów tuszki (Tabela 2., 3. i 4.). Ponadto pobrano tkanki niezbędne do dalszych etapów badań, takie jak mięśnie, krew, wątrobę, nerki oraz fragmenty jelit.

Tabela 2. Wpływ dodatków żywieniowych na wyniki analizy rzeźnej ciepłej (g) – średnia \pm SD.

Wyszczególnienie	Grupa			
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	D3 n=10
Masa ubojowa	2951 \pm 75,37	3096 \pm 80,00	3159 \pm 134,32	3020 \pm 89
Masa tuszki ciepłej	1454 \pm 42,75 ^b	1604 \pm 57,91 ^{ab}	1663 \pm 33,47 ^a	1552 \pm 53,68 ^{ab}
Masa wątroby	90,24 \pm 7,71	82,66 \pm 4,56	98,60 \pm 7,55	131,16 \pm 93,84
Masa serca	9,94 \pm 0,24	9,98 \pm 0,90	12,06 \pm 0,85	9,66 \pm 0,52
Masa nerek	19,18 \pm 1,45	21,48 \pm 1,19	21,76 \pm 0,82	19,82 \pm 1,48
Masa płuc	19,22 \pm 1,06	17,22 \pm 0,76	16,54 \pm 1,04	16,30 \pm 0,94
Masa skóry	349,62 \pm 16,84	399,10 \pm 14,79	401,66 \pm 13,81	351,74 \pm 15,22
Masa skoków	97,24 \pm 2,83	96,98 \pm 3,29	97,60 \pm 3,27	92,23 \pm 2,68
Masa przewodu pokarmowego	543,30 \pm 16,13 ^a	461,27 \pm 12,38 ^b	527,98 \pm 25,12 ^{ab}	484,39 \pm 21,97 ^{ab}
Masa głowy	265,78 \pm 4,74	274,56 \pm 4,80	276,96 \pm 6,33	263,62 \pm 6,43

Tabela 3. Wpływ dodatków żywieniowych na wyniki analizy rzeźnej zimnej (g) – średnia \pm SD.

Wyszczególnienie	Grupa			
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	D3 n=10
Masa tuszki schłodzonej	1429 \pm 42,62 ^b	1582 \pm 58,97 ^{ab}	1635 \pm 35,75 ^a	1520 \pm 53,85 ^{ab}
Masa części przedniej	586,10 \pm 21,89	649,16 \pm 24,98	663,88 \pm 16,03	607,75 \pm 23,56
Masa combra	304,80 \pm 13,99 ^b	352,20 \pm 19,75 ^{ab}	379,30 \pm 13,65 ^a	353,90 \pm 19,10 ^{ab}
Masa części tylnej	537,70 \pm 10,86	580,60 \pm 18,07	591,50 \pm 13,99	558,10 \pm 18,38

Tabela 4. Wpływ dodatków żywieniowych na wydajność rzeźną ciepłą i zimną (%) – średnia \pm SD.

Wyszczególnienie	Grupa			
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	D3 n=10
Wydajność rzeźna ciepła	49,26 \pm 0,52	51,69 \pm 0,57	53,51 \pm 2,60	51,32 \pm 0,45
Wydajność rzeźna zimna	48,40 \pm 0,57	50,95 \pm 0,62	52,58 \pm 2,55	50,25 \pm 0,46

Zrealizowano również cel badawczy pod nazwą „Analiza kwasowości i barwy mięsa”. Parametry te oznaczono w mięśniu najdłuższym grzbietu oraz w mięśniu dwugłowym uda, po upływie 45 minut i 24 godzin od uboju (Tabela 5.).

Tabela 5. Wpływ dodatków żywieniowych na kwasowość i barwę mięsa – średnia \pm SD.

Parametr	Grupa			
	K n = 10	D1 n = 10	D2 n = 10	D3 n=10
Mięsień najdłuższy grzbietu				
pH 45 min.	6,58 \pm 0,04	6,62 \pm 0,05	6,63 \pm 0,05	6,61 \pm 0,04
pH 24 h	5,63 \pm 0,03	5,67 \pm 0,04	5,65 \pm 0,03	5,66 \pm 0,02
L*45	46,94 \pm 3,46	44,95 \pm 1,89	44,92 \pm 1,42	42,30 \pm 1,75
a*45	4,83 \pm 0,74	3,59 \pm 0,04	3,75 \pm 0,28	3,49 \pm 0,31
b*45	1,90 \pm 0,65	2,31 \pm 0,65	3,12 \pm 0,44	2,60 \pm 0,57
L*24	52,13 \pm 1,79	54,78 \pm 3,03	51,83 \pm 2,56	50,69 \pm 3,04
a*24	7,08 \pm 0,64	5,52 \pm 0,72	4,91 \pm 0,58	5,82 \pm 0,68
b*24	5,67 \pm 0,44	5,63 \pm 0,59	7,04 \pm 0,49	7,02 \pm 0,44
Mięsień dwugłowy uda				
pH 45 min.	6,65 \pm 0,03	6,75 \pm 0,04	6,72 \pm 0,04	6,61 \pm 0,04
pH 24 h	5,65 \pm 0,03	5,69 \pm 0,04	5,68 \pm 0,05	5,69 \pm 0,04
L*45	52,36 \pm 1,17	51,37 \pm 1,06	50,90 \pm 0,96	48,94 \pm 0,57
a*45	4,47 \pm 0,26	4,13 \pm 0,55	3,86 \pm 0,35	3,43 \pm 0,26
b*45	0,52 \pm 0,90	0,71 \pm 0,77	1,52 \pm 0,70	1,31 \pm 0,45
L*24	54,11 \pm 0,91 ^a	53,23 \pm 0,84 ^{ab}	51,72 \pm 0,85 ^{ab}	49,86 \pm 1,10 ^b
a*24	6,48 \pm 0,46 ^a	5,28 \pm 0,46 ^{ab}	4,49 \pm 0,59 ^b	5,04 \pm 0,38 ^{ab}
b*24	4,15 \pm 0,31	3,29 \pm 0,20	3,71 \pm 0,32	4,36 \pm 0,43

Próbki mięsa przeznaczone do realizacji celu „Określenie składu chemicznego mięsa i podawanej paszy” przekazano do analiz laboratoryjnych na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie i Centralnego Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB.

Zakład Ochrony Bioróżnorodności Zwierząt Gospodarskich i 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

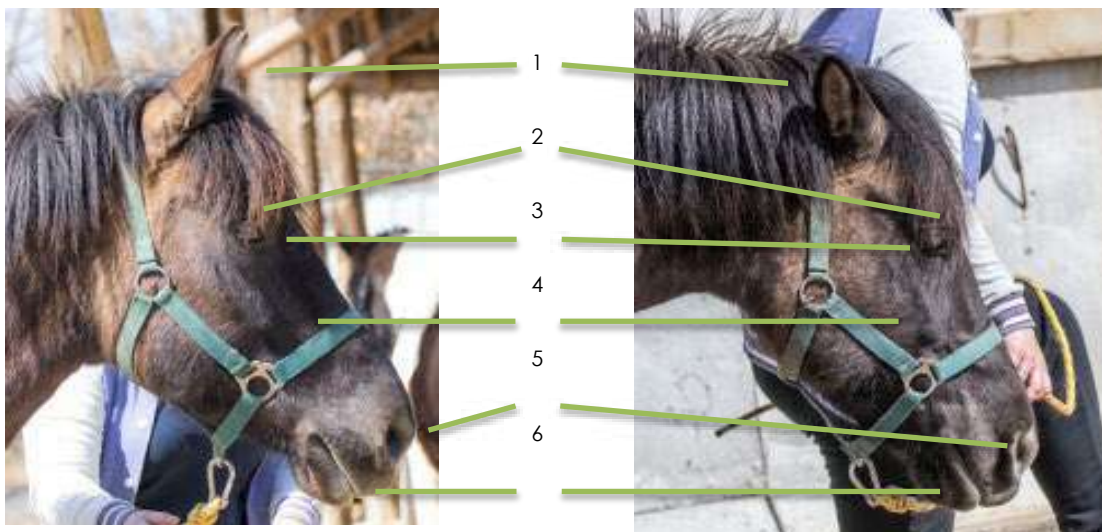
Etapy badawcze realizowane w ramach zadania

1. Opracowanie modelu oceny dyskomfortu u koni pracujących i hodowlanych na podstawie wyrazu pyska i ocena dobrostanu koni na podstawie oznak bólu i dyskomfortu wśród koni rekreacyjnych.
2. Porównanie stanu emocjonalnego koni po wprowadzeniu nowoczesnych metod szkolenia z wykorzystaniem wzmocnienia pozytywnego (R+) i targetowania.
3. Określenie zdolności oceny samopoczucia koni przez instruktorów/hodowców i właścicieli koni.
4. Ocena dobrostanu koni na podstawie oznak bólu i dyskomfortu wśród koni dotkniętych egzemą letnią.
5. Analiza genetyczna koni dotkniętych egzemą letnią.

Celem projektu była ocena dobrostanu koni poprzez rozpoznanie sygnałów dyskomfortu i/lub bólu u koni pracujących oraz dotkniętych chorobą alergiczną skóry. Projekt zakładał szerzenie świadomości w hodowli oraz w użytkowaniu koni, aby ocena dyskomfortu na podstawie wyrazu pyska była codziennością u instruktorów i hodowców.

Dokonano analizy opartej na punktacji wyrazu pyska koni Horse Grimace Scale (HGS). Oceniono takie wskaźniki jak: obniżone uszy (1), skurcz mięśni nad okiem *m. levator anguli oculi medialis* (2), powieki zakrywające połowę oka (3), napięte mięśnie twarzowe (4), napięte i rozszerzone nozdrza (5), napięty pysk (6) (Fot.). Przyznano punkty: 0 – niewidoczne, 1 – lekko widoczne, 2 – wyraźnie widoczne.

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



Przeprowadzona analiza genetyczna koni dotkniętych nadwrażliwością na ukąszenia owadów pozwoli zweryfikować podłoże genetyczne powstawiania choroby i wczesną identyfikację nosicieli w celu eliminowania takich osobników z hodowli.

Stwierdzenia i wnioski

1. Zgodnie z założeniami projektu oceniono zachowanie, poziom stresu i dyskomfortu u koni pracujących oraz u koni dotkniętych egzemą letnią.
2. Wykazano statystycznie istotne różnice między mimiką koni na pastwisku i przy schodkach do wsiadania. Różnice wykazano również między mimiką na pastwisku i w trakcie prowadzenia, oraz prowadzenia i przy schodkach. Średnia punktów oceny mimiki według Horse Grimace Scale (HGS) na pastwisku wyniosła 3,25 pkt, natomiast przy schodkach 5,28. Wyniki te sugerują, że schodki do wsiadania mogą kojarzyć się koniom nieprzyjemnie i wywołać negatywne emocje.
3. Podczas doświadczenia nie stwierdzono dużych różnic w częstotliwości skurczów serca. Prawdopodobnie podczas prowadzenia konia ruch wpływał na niewielkie pobudzenie pracy serca. Wyniki sugerują, że przy schodkach do wsiadania zmienia się nastawienie emocjonalne koni wyrażone mimiką, jednak pomiar tętna wskazuje, że nie są one w nadmiernym stresie.
4. Podobne wyniki uzyskano na podstawie badań poziomu kortyzolu w ślinie. Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, że przebieg doświadczenia miał raczej wpływ na ustabilizowanie poziomu kortyzolu bez zaznaczenia wyraźnej reakcji na stres.
5. Porównanie zachowania koni wykazujących oznaki stresu/dyskomfortu po wprowadzeniu krótkiego szkolenia z wykorzystaniem wzmocnienia pozytywnego w treningu pozwoliło ocenić pozytywny wpływ szkolenia i potwierdzić, że rozwijające się, przyjazne metody treningowe koni mogą zostać w łatwy sposób zaimplementowane do codziennej pracy z tymi zwierzętami.
6. Uzyskane wyniki pozwoliły zobrazować poziom dobrostanu koni, wyrażający się stanem emocjonalnym koni pracujących oraz koni dotkniętych egzemą letnią. Porównanie obiektywnych wyników doświadczenia z ankietami przeprowadzonymi wśród instruktorów i hodowców odzwierciedliło poziom wiedzy osób, które na co dzień pracują z końmi.
7. Przeprowadzona analiza rodowodowa i genetyczna koni dotkniętych nadwrażliwością na ukąszenia owadów w celu próby wyłonienia genów odpowiedzialnych za powstawanie egzemy letniej może przyczynić się do szybszego wykrywania nosicieli tej choroby, dzięki czemu możliwa będzie świadoma hodowla i zmniejszenie występowania osobników dotkniętych tą chorobą w populacji koni.
8. Wyniki doświadczenia kierowane są przede wszystkim do właścicieli ośrodków jazdy konnej i hodowców koni, gdyż dobrostan koni łączy się z produktywnością, wydajnością, zdrowotnością, a prawidłowa ocena stanu emocjonalnego koni przekłada się na bezpieczeństwo zarówno obsługi jak i samych koni. Ocena dobrostanu koni oraz świadomości opiekunów tych zwierząt pozwoli zobrazować w jakim stopniu konieczne jest szkolenie osób zajmujących się końmi w celu podnoszenia ich wiedzy, tym samym dążąc do podnoszenia poziomu dobrostanu koni i minimalizowania ryzyka urazów wśród ludzi i zwierząt.

Zadanie 01-15-04-11

Analiza genetycznego podłoża wad koni zimnokrwistych w oparciu o badania markerów genetycznych.

dr inż. Grażyna Polak

Celem zadania jest ustalenie podłoża genetycznego cech kościstości (obwód nadpęcia) oraz występowanie objawów *Chronic Progressive Lymphoedema* (CPL) – przewlekłego postępującego obrzęku limfatycznego.

Badanie genetycznego uwarunkowania kościstości

Informacje przekazywane z Polskiego Związku Hodowców Koni wskazują na zmniejszający się obwód nadpęcia (kościstość) zwłaszcza wśród ogierów sokólskich. W wyniku tego, coraz większa liczba reproduktorów jest eliminowana z hodowli zwiększając zagrożenie tej chronionej populacji.

Badanie CPL

Przewlekły, postępujący obrzęk limfatyczny (CPL), będący prawdopodobnie wadą dziedziczną, występuje w Polsce wśród koni zimnokrwistych, głównie u starszych ogierów, ponieważ objawy pojawiają się po trzecim roku życia. Jest on wieloczynnikowym schorzeniem obejmującym interakcję czynników genetycznych i środowiskowych. Charakteryzuje się postępującym obrzękiem dolnych partii kończyn konia, któremu towarzyszy złuszczenie się naskórka, wyraźne zwłóknienie skóry właściwej oraz rozwój fałdów i guzków. Przyczyną problemów jest nieprawidłowa budowa elastyny, co u dotkniętych chorobą koni powoduje nieprawidłowe wchłanianie i usuwanie limfy. W stadiach szczególnie ostrych osobniki muszą być poddane eutanazji, co oprócz konieczności pozbycia się z hodowli potencjalnie cennych osobników powoduje także straty ekonomiczne wśród hodowców. Jak podają źródła szczególnie podatny na nią jest belgijski koń zimnokrwisty, z którą to rasą spokrewnione są polskie rasy i typy koni zimnokrwistych, także te objęte ochroną.

Materiał (cebulki włosowe z grzywy) został pobrany w gospodarstwach indywidualnych, a także podczas imprez hodowlanych w następujących województwach: warmińsko-mazurskim, pomorskim, podlaskim, lubelskim, mazowieckim, małopolskim. Hodowcy zostali poinformowani o celu badań i wyrazili na nie zgodę. Badania nie wymagały zgody Lokalnej Komisji Etycznej.

W pierwszym roku zebrano materiał od koni sztumskich i sokólskich (objęte programami ochrony), a także koni innych ras zimnokrwistych – w sumie od 71 osobników, w tym 23 ogierów i 48 klaczy:

- pkz (polski koń zimnokrwisty) – 24
- pkz/sok typ sokólski – 32
- pkz/sztum typ sztumski – 3
- koń belgijski – 1
- arden polski – 6
- arden francuski – 4
- cob irlandzki – 1

Dokumentacja wprowadzana do bazy danych podczas pobierania materiału:

- nazwa konia, nr wpisu do księgi,
- data urodzenia, wiek w latach,
- pochodzenie (do 5-tego pokolenia wstecz),
- występowanie w rodowodzie osobników obcych ras z podaniem tych ras,
- wymiary (obwód nadpęcia, wysokość, obwód klatki piersiowej) przy wpisie do księgi stadnej,
- uwagi dotyczące fenotypu.

Wyniki

Badania genetycznego uwarunkowania kośćcistości – analizy prowadzono na zgromadzonym materiale w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt.

Analizy poszukiwania mutacji sprawczych (mała kośćcistość):

- izolowanie DNA przy użyciu zestawu komercyjnego,
- ocena spektrofotometryczna (aparat NanoDrop) ilości i jakości otrzymanego DNA,
- identyfikacji regionów genomu związanych z budową kośćca,
- analiza SNP przy użyciu mikromacierzy,
- analiza asocjacyjna całego genomu (GWAS),
- typowanie mutacji potencjalnie związanych z cechami pokroju.

Do badań wybrano grupę koni, z czego 19 (1 belg, 10 ardeńskich, 6 pkz, 1 cob, 1 sztum) oznaczono jako D – o dużej kośćcistości (>25 cm) i 19 (11 sokólskich i 8 pkz) oznaczono M – mała kośćcistość (≤25cm obwodu nadpęcia).

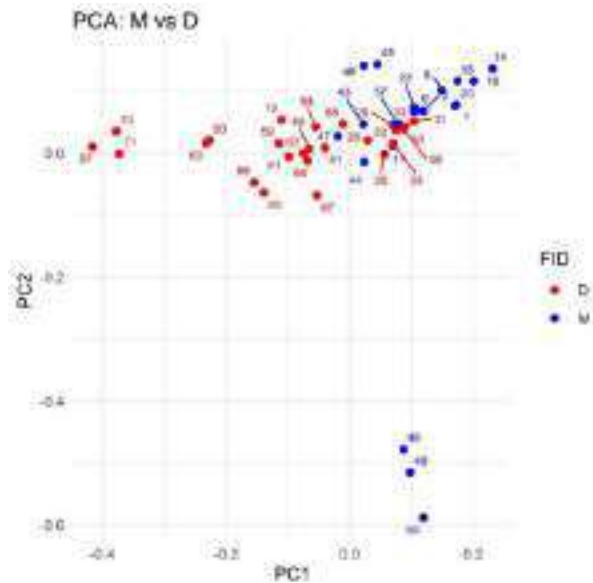
Koń o dużej kośćcistości (po lewej) i małej kośćcistości (Fot. 1. Olsztyński ZHK., G. Polak).



Próbki również podzielone zostały zgodnie z oznaczeniami – M (mała kośćcistość) i D (duża kośćcistość). Dane uzyskane z mikromacierzy SNP zostały przeanalizowane metodą asocjacji GWAS z wykorzystaniem pakietu GenABEL w oprogramowaniu R oraz oprogramowaniu GenSel.

Wstępne wyniki GWAS (Rycina 1.) pokazały zgrupowanie osobników D – o dużym obwodzie nadpęcia z lewej strony wykresu.

Rycina 1. Wyniki dotyczące kościistości – próbki podzielone zgodnie z oznaczeniami M – mały obwód nadpęcia i D – duży obwód nadpęcia.



W części centralnej występują zarówno osobniki M jak i D, a z prawej tylko M. Może to być spowodowane faktem, że konie z objawami CPL mają duży obwód nadpęcia lub wskazywać na dwa efekty na jednym wyniku.

Wyniki genetycznego uwarunkowania CPL

W tej części badań, przy uwagach dotyczących fenotypu i wprowadzanych do bazy danych, uwzględniano opis objawów CPL i zdjęcia kończyn, na których występowały objawy w różnych stadiach nasilenia choroby lub informacje, że osobnik był wolny od objawów (grupa kontrolna), co pozwoliło na podzielenie osobników na trzy grupy:

1. wyraźne objawy CPL,
2. podejrzenie występowania CPL,
3. wykluczone objawy CPL.

Wśród 71 wybranych osobników, 18 prezentowało wyraźne objawy: zgrubienia, deformacje i zakażenia naskórka kończyn przednich poniżej stawu nadgarstkowego i tylnych poniżej stawu skokowego.

Koń z objawami CPL (Fot. 2. G. Polak).



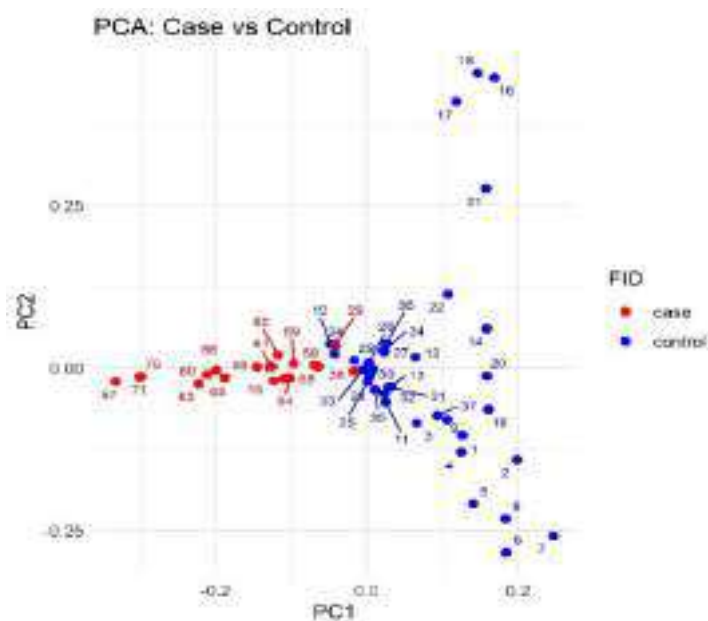
Żadnych schorzeń ww. odcinków kończyn (grupa kontrolna) nie prezentowało 35 osobników. Pozostałe prezentowały stany pośrednie (podejrzanie wystąpienia CPL). Próbki materiału (cebulki włosowe) były przekazywane do laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB.

Analizy identyfikacji polimorfizmów związanych z występowaniem CPL:

- na podstawie dostępnych informacji zgenotypowanie mutacji wskazanych przez innych autorów jako potencjalnie determinujące CPL,
- zaprojektowanie i zoptymalizowanie metody detekcji,
- zróównanie frekwencji występowania mutacji z grupą kontrolną.

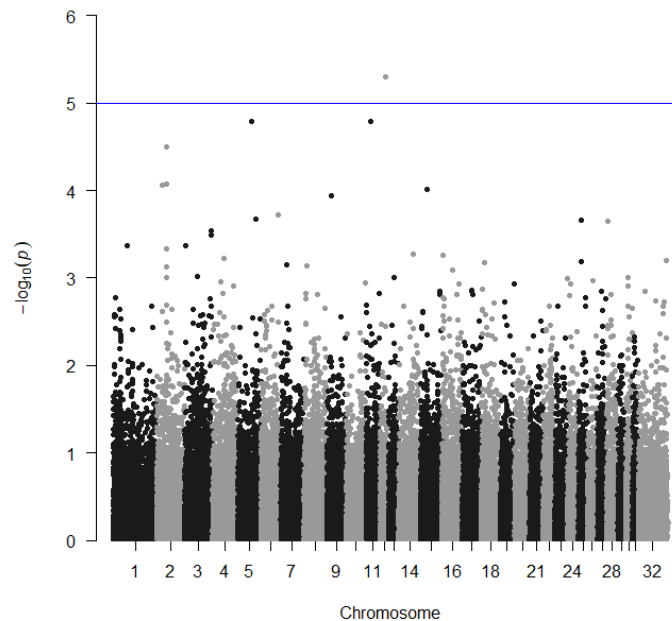
Początkowo przeprowadzone analizy dotyczyły sekwencjonowania genu FOXC2. Na możliwe znaczenie tego genu przy CPL wskazywały materiały źródłowe, ze względu na podejrzenie podobnego dziedziczenia zaburzeń u ludzi. Wyniki nie wskazywały jednak powiązania tego genu z CPL. Przeanalizowanie materiału przy użyciu oprogramowań metodą asocjacji GWAS dało daleko bardziej interesujące wyniki, które wskazały kilka genów mogących mieć związek z CPL.

Rycina 2. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) przedstawiające rozdział koni na grupę chorą (case – czerwone punkty) oraz zdrową (control – niebieskie punkty) w oparciu o pierwsze dwie składowe główne (PC1 i PC2).



Wstępne wyniki z macierzy polimorfizmów i analizy w kierunku CPL wskazują, że próbki rozdzielły się w dwóch kierunkach i np. koń 57 który jest najbardziej wysuniętym punktem na lewo ma, zgodnie z opisem i zdjęciami krytyczne CPL.

Rycina 3. Wyniki GWAS dla analizowanej cechy – linia pozioma oznacza próg istotności statystycznej.



Cztery geny mogące mieć związek z CPL:

1. gen KANSL1 jest kluczowym regulatorem działania chromatyny i ekspresji genów; białko to ma szeroki wpływ na przebieg rozwoju dzięki modulacji aktywności wielu genów,
2. gen TMEM54 koduje białko transmembranowe; najsilniej powiązано go z procesami migracji i proliferacji komórek,
3. gen RERE jest kluczowym koregulatorem transkrypcji związanym z sygnalizacją kwasu retinowego i prawidłowym rozwojem wielu narządów,
4. OLFM3 to gen kodujący białko związane z rozwojem układu nerwowego, funkcjonowaniem synaps oraz modulacją macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wyniki przeprowadzonej analizy GWAS są bardzo obiecujące i wskazują, że mimo braku potwierdzonych wyników badań w krajach zachodnich (być może ze względu na małą próbę badanych koni), należy prowadzić dalsze analizy pod kątem uwarunkowania genetycznego CPL wśród polskiej populacji. Należy również przeanalizować potencjalną zależność dużej kościowości i występowania CPL.

Zadanie 01-15-05-11

Zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe umaszczenia bydła ras rodzimych.

dr inż. Ewa Sosin

W bieżącym roku rozpoczęto zbieranie materiału badawczego, który pobrano od 183 osobników należących do czterech ras zachowawczych bydła: polska czerwono-biała (11), polska czerwona (13), biało-grzbieta (154) i w typie bydła nadbużańskiego czarnego (5).

Materiał pozyskano w siedmiu gospodarstwach, w województwach: małopolskim, mazowieckim, warmińsko-mazurskim i lubelskim. Podzielono na trzynaście grup – zgodnie z kolorem umaszczenia: czarno-boczysta, czerwono-boczysta, żuławskie z odmianami czarnymi, żuławskie z odmianami czerwonymi, czerwona jasne umaszczenie i czerwona ciemne umaszczenie, czerwona – podżara, czerwono-biała (bez wyraźnie dominującej barwy), czerwono-biała

biała (z dominacją białej barwy), czerwono-biała czerwona (z dominacją czerwonej barwy), czerwono-biała podżara (występowała ciemna maska lub podpalanie), jednolita czarna, czarno-biała BG (dla jednego przypadku biało-grzbieta, kiedy nie występował pas na grzbiecie, a łaty były duże i wyraźne).

Z uwagi na zagrożenie chorobami zakaźnymi i obostrzenia weterynaryjne dotyczące przemieszczania się między stadami materiał pobierano w drugiej połowie roku.

Przeprowadzono analizę struktury genetycznej bydła na podstawie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA w 12 loci rekomendowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG. Analizę przeprowadzono przy zastosowaniu reakcji PCR multiplex (Type-it Microsatellite PCR Kit - Qiagen) oraz fluorescencyjnie znakowanych sekwencji mikrosatelitarnych (barwniki: FAM, VIC, NED, PET). Otrzymane produkty PCR poddano elektroforezie pionowej w sekwenatorze Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer.

Wynik rozdziału elektroforetycznego oraz określanie profili DNA przeprowadzono w programie GeneMapper® Software.

Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
kierownik: dr hab. Anna Arczewska-Włosek, prof. IZ PIB

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-Włosek, prof. IZ PIB

Badania realizowane w ramach zadania składały się z dwóch niezależnych, ale spójnych przedmiotowo celów szczegółowych.

Celem głównym zadania było określenie efektów wybranych czynników żywieniowych w zakresie aktualnie istotnych zagadnień nowoczesnej produkcji drobiarskiej – zdrowotności wysokoprodukcyjnych kur nieśnych i kurcząt rzeźnych, jakości produktów (mięsa i jaj) oraz strawności jelitowej aminokwasów nasion krajowych odmian roślin strączkowych jako alternatywnego dla śruty sojowej GMO źródła białka paszowego.

W odniesieniu do celu 1. uwagę skierowano na ekstrakt z ostropestu, karczocha, ostryżu, czosnku lub oregano, tj. substancje, które mają właściwości antyoksydacyjne, a także oddziałują na funkcjonowanie wątroby, co w przypadku kurcząt brojlerów może wpływać na metabolizowanie kokcydiostatyków jonoforowych i w konsekwencji ich niższą lub wyższą retencję w wątrobie. Może to mieć bezpośrednie przełożenie na produktywność, status zdrowotny kurcząt, ale także bezpieczeństwo produktów odzwierzęcych. W przypadku wysokoprodukcyjnych kur nieśnych, zakładano z kolei, iż badane substancje, tj. L-karnityna i ekstrakt z ostropestu, karczocha lub ostryżu, wykażą działanie osłonowe i hepatoprotekcyjne oraz poprawią jakość jaj, w tym ich wartość dietetyczną, przy zachowaniu wysokiego poziomu produkcji.

W przypadku celu 2. analizowano wpływ 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.

Kontynuowano analizy materiału biologicznego zgromadzonego w trakcie doświadczeń żywieniowych na kurczętach brojlerach oraz kurach nieśnych oraz zestawiono wyniki, dokonano ich analizy oraz sporządzono raport końcowy z realizacji zadania.

Celem doświadczeń realizowanych na kurczętach brojlerach było określenie skuteczności preparatów z czosnku (*Allium sativum*), oregano (*Origanum vulgare*), ostropestu (*Silybum marianum*), karczocha (*Cynara scolymus*) lub ostryżu długiego (*Curcuma longa*) w warunkach ciągłego stosowania jonoforowego kokcydiostatyku paszowego: salinomycyny (doświadczenie 1.) lub monenzyny (doświadczenie 2.). Schemat doświadczenia obejmował również grupy kontrolne: negatywną – bez dodatków oraz pozytywną – z dodatkiem kokcydiostatyku.

W doświadczeniach oceniono wskaźniki produkcyjne (przyrost masy ciała, pobranie i wykorzystanie paszy), parametry biochemiczne krwi (m.in. białko, lipidy, glukozę, enzymy wątrobowe), hormony układu pokarmowego oraz wskaźniki stresu oksydacyjnego. Przeprowadzono także analizę morfometryczną struktury jelita cienkiego, ocenę cech poubojowych i udziału narządów wewnętrznych, a także oznaczono poziom pozostałości kokcydiostatyków w wątrobie, jako organu odpowiedzialnego za metabolizm tych substancji.

Do najważniejszych obserwacji i wyników uzyskanych w doświadczeniach należy zaliczyć:

1. Zastosowanie salinomycyny nie wpływało istotnie na przyrosty masy ciała w okresie 1–21 dnia życia, natomiast w okresie 22–42 dnia życia poprawiało wykorzystanie paszy w porównaniu z kontrolą negatywną.
2. Salinomycyna nie wykazywała korzystnego wpływu na stabilność oksydacyjną mięsa ani na większość parametrów redoks i hormonalnych, a jej zastosowanie wiązało się ze wzrostem stężenia cholesterolu.
3. Dodatki fitogeniczne stosowane łącznie z salinomycyną istotnie poprawiały wykorzystanie paszy w porównaniu z kontrolą negatywną, a wybrane z nich (ostropest, czosnek) zwiększały przyrosty masy ciała.
4. Większość ekstraktów roślinnych (z wyjątkiem karczocha) istotnie obniżała wartość TBA w mięsie świeżym, co wskazuje na poprawę jego stabilności oksydacyjnej.
5. Dodatki fitogeniczne modyfikowały odpowiedź metaboliczną ptaków na obecność kokcydiostatyku paszowego salinomycyny – karczoch i ostryż długi obniżały stężenie glukozy i lipidów, natomiast czosnek wiązał się z ich wzrostem.
6. Zastosowanie ekstraktów roślinnych, co wpływało na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (wzrost SOD lub GPX), bez istotnych zmian w poziomie MDA, wskazuje na brak nasilenia stresu oksydacyjnego i lepszą ochronę antyoksydacyjną.
7. Poziom pozostałości kokcydiostatyków w tkankach był znikomy.

Podsumowując, stosowane wciąż na dużą skalę kokcydiostatyki paszowe jako główne narzędzie profilaktyki kokcydiozy drobiu rzeźnego, samodzielnie lub łącznie z ekstraktami ziołowymi, nie wywierają negatywnego wpływu na parametry wzrostu, status zdrowotny zwierząt oraz jakość produktów odzwierzęcych. Wszystkie uzyskane parametry mieściły się w zakresach referencyjnych dla kurcząt brojlerów. Z punktu widzenia bezpieczeństwa konsumenta najważniejszym wnioskiem jest, że stosowanie kokcydiostatyków w zalecanych dawkach i przy stosowaniu zalecanych okresów karencji jest bezpieczne, bowiem poziom pozostałości kokcydiostatyków w tkankach kurcząt jest minimalny, jeśli są w ogóle wykrywalne.

Zastosowanie ekstraktów ziołowych nie wpłynęło negatywnie na metabolizowanie i odkładanie w tkankach kokcydiostatyków, pozytywnie wpływając na produktywność, status zdrowotny i jakość mięsa. Schemat doświadczenia przeprowadzonego na kurach nieśnych ilustruje Tabela 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia 3.

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

Zastosowanie ostryżu oraz wybranych dodatków ziółowych obniżało aktywność enzymów wątrobowych (ASAT, LDH) oraz poziom lipidów we krwi, w tym trójglicerydów i cholesterolu (zwłaszcza LDL). Najkorzystniejsze efekty uzyskano przy stosowaniu dodatków pojedynczo lub w wybranych kombinacjach, natomiast łączenie ich z L-karnityną zazwyczaj nie poprawiało profilu biochemicznego. Dodatki nie wpływały istotnie na poziom stresu oksydacyjnego, jednak mieszanka ostropestu i karczocha ograniczała stłuszczenie wątroby, podczas gdy ich łączne zastosowanie z L-karnityną nasilało ten proces.

Głównym celem badań w ramach celu 2. było oznaczenie w testach współczynników standaryzowanej (korygowanej) strawności jelitowej (SID) aminokwasów zawartych w nasionach bobiku, z uwzględnieniem ich aktualnej klasyfikacji ze względu na zawartość tanin skondensowanych (odmiana niskotaninowa oraz odmiana wysokotaninowa).

Zgodnie z najnowszymi poglądami wartości współczynników SID poszczególnych aminokwasów charakteryzują faktyczną wartość żywieniową białka materiałów paszowych, co powoduje, że mogą stanowić ważne kryterium w podejmowaniu decyzji o wyborze nasion bobiku z danej grupy odmianowej jako komponentu białkowego mieszanek dla kurcząt brojlerów we wczesnej i późniejszych fazach odchowu oraz ułatwić dostosowanie tych decyzji do zmieniającej się sytuacji na krajowym rynku roślinnych surowców białkowych.

Hipoteza badawcza zakładała, że uwarunkowania fizjologiczne związane z rozwojem i motoryką przewodu pokarmowego oraz wydajnością sekrecyjną układu enzymatycznego u kurcząt brojlerów w wieku 10, 20 i 30 dni mogą znacząco wpływać na efektywność trawienia polipeptydów i wchłaniania AA zawartych w tych nasionach oraz reakcję ptaków na niekorzystnie (antyżywieniowe) działanie tanin skondensowanych. Przyjęto występowanie różnic w strawności SID aminokwasów u kurcząt w danym wieku wynikające zarówno z udziału tanin w nasionach, jak i między wiekiem ptaków w obrębie odmiany nisko- i wysokotaninowej. Użycie w testach poekstrakcyjnej śruty sojowej GMO (SBM) jako materiału kontrolnego (referencyjnego) pozwoliło sprawdzić czy i w jakim zakresie strawność aminokwasów bobiku różni się od wartości oznaczonych dla SBM u ptaków danej grupy wiekowej.

Bobik wysokotaninowy, odmiana BOBAS
(Fot. 1. W. Szczurek).



Bobik niskotaninowy, odmiana AMIGO
(Fot. 2. W. Szczurek).



Z punktu widzenia istotności dla praktyki, podsumowując uzyskane wyniki skupiono się na współczynnikach 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 wszystkich tych aminokwasów.

Poniżej zebrano najważniejsze obserwacje i wnioski:

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 kurcząt brojlerów 10- i 20-dniowych.
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.
5. Uzyskane rezultaty mogą stanowić praktycznie przydatne źródło informacji przy planowaniu zastępowania śruty sojowej surowymi nasionami bobiku w żywieniu brojlerów na różnych etapach wzrostu.

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: dr hab. Anna Arczewska-Włosek, prof. IZ PIB

Etapy badawcze realizowane w roku sprawozdawczym

1. Ocena właściwości bioaktywnych i antyutleniających wybranych czynników żywieniowych:
 - a) wybór dodatków paszowych do badań,
 - b) przygotowanie ekstraktów/olejków eterycznych z materiałów roślinnych o potencjalnie wysokich właściwościach prozdrowotnych,
 - c) opracowanie zestawu analiz chemicznych właściwych dla danego rodzaju dodatków paszowych,
 - d) przeprowadzenie analiz chemicznych określających poziom substancji bioaktywnych oraz właściwości antyutleniające wybranych dodatków paszowych,
 - e) opracowanie otrzymanych wyników badań, przygotowanie rankingu najefektywniejszych dodatków paszowych i sporządzenie raportu z realizacji celu.
2. Ocena aktywności mikrobiologicznej wybranych czynników żywieniowych:
 - a) przeprowadzenie testów mikrobiologicznych MIC i MBC dodatków paszowych wybranych pod kątem wpływu na jelitową florę patogenną i probiotyczną świń i drobiu,
 - b) sporządzenie raportu z realizacji celu.
3. Ocena metodą *in vitro* wpływu wybranych czynników żywieniowych na nabłonek jelitowy świń:
 - a) opracowanie metodyk dla modeli hodowli komórkowej 2D i 3D organoidów jelitowych świńskich,
 - b) określenie wpływu wybranych w poprzednich etapach badań dodatków paszowych na przeżywalność komórek świńskiego nabłonka jelitowego, w szczególności enterocytów,

stymulację procesów proliferacyjnych, apoptotycznych, charakteryzujących status redoks, a także istotne dla środowiska jelitowego funkcje bariery jelitowej mierzonej między innymi za pomocą metody TEER w warunkach hodowli komórkowej 2D oraz hodowli 3D organoidów.

4. Ocena metodą *in vitro* wpływu wybranych czynników żywieniowych na nabłonek jelitowy kury:
 - a) opracowanie metodyk dla modeli hodowli komórkowej 2D i 3D organoidów jelitowych kurzych.

Opis wyników zadania

Ad 1. W badaniach wykorzystano kolejnych sześć ekstraktów roślinnych, z czego dwa były komercyjnie dostępne (szałwia i wrotycz), cztery wytworzono w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii z komercyjnie dostępnych suszy (wyłtoki z białych winogron, wyłtoki z czerwonych winogron, łuski z cebuli i łupiny z czosnku (Fot. 1.).

Ekstrakty pozyskane z materiału roślinnego (Fot. 1. Anna Arczewska-Włosek).



W celu oceny zawartości dominujących komponentów bioaktywnych w badanych preparatach wykorzystano spektroskopię masową (MS) oraz chromatografię cieczową o wysokiej sprawności (HPLC).

Najwięcej polifenoli stwierdzono w suchych ekstraktach z wyłtoków z czerwonych winogron – dominowały tam antocyjany, oraz z ekstraktach z łupin cebuli – przedstawiciele flavonoidów.

W ekstraktach z wyłtoków z winogron wśród związków lotnych dominowały terpeny, a w czerwonych, oprócz nich, średniołańcuchowe kwasy organiczne oraz estry. W ekstraktach z cebuli i czosnku, w grupie komponentów lotnych przeważały substancje siarkoorganiczne, przy czym zwłaszcza czosnek był ich bogatym źródłem.

W celu określenia aktywności przeciwutleniającej badanych substancji (Tabela 1.), preparaty zostały poddane czterem różnym chemicznym metodom oceny zdolności przeciwutleniającej.

Najsilniejszą aktywnością przeciwutleniającą odznaczały się ekstrakty sporządzone z wyłtoków z czerwonych winogron i łusek z cebuli. Suche ekstrakty z szaławii i wrotycza, praktycznie nie zawierały związków charakterystycznych dla odpowiedniego materiału roślinnego, wpływało to na znikomą aktywność przeciwutleniającą.

Tabela 1. Aktywność przeciwutleniająca preparatów fitobiotycznych.

	DPPH % inhibicji	ABTS mg Trolox/100 g	FRAP μmol TE/g	Polifenole mg/100 g katechiny
Szałwia	48,5 ±0,2	36,4 ±3,4	20,4 ±0,1	723,1 ±1,1
Wrotycz	18,9 ±0,2	98,4 ±1,1	32,1 ±0,1	1440,7 ±4,3
Winogrono białe (wytloki)	50,3 ±6,8	1193,9 ±1,1	109,1 ±0,1	4142,2 ±9,9
Winogrono czerwone (wytloki)	94,5 ±0,1	2857,9 ±0,5	401,9 ±0,6	10056,9 ±8,6
Cebula (lusk)	88,3 ±0,1	1864,4 ±0,9	315,5 ±0,8	8271,9 ±6,8
Czosnek (lupiny)	57,8 ±0,4	396,2 ±1,7	121,4 ±0,1	3672,2 ±18,9

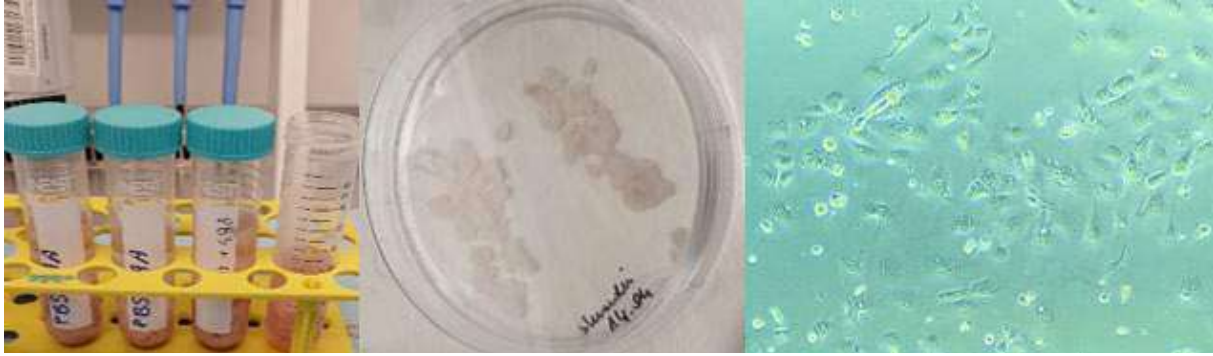
Ad 2. Wszystkie wytypowane ekstrakty przekazano do analizy aktywności mikrobiologicznej. W badaniach wykorzystano mikroorganizmy potencjalnie chorobotwórcze pochodzące z amerykańskiej kolekcji czystych kultur (American Type Culture Collection; ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Candida albicans* ATCC 24433; *Clostridium perfringens* ATCC 13124 oraz szczepy referencyjne mikroorganizmów probiotycznych pozyskanych z preparatów probiotycznych: *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (DSM 9843; Sanprobi IBS); *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103; Dicoflor 6); 25 *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (Enterol). Ekstrakty wykazywały zbliżoną aktywność przeciwmikrobiologiczną, przy czym na kultury patogenne najsilniej inhibująco działały ekstrakty z wytlóków z czerwonych winogron oraz z łupin czosnku (Tabela 2.).

Tabela 2. Wartości MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*, minimalne stężenie hamujące) i MBC (ang. *Minimal Bactericidal Concentration*, minimalne stężenie bakteriobójcze)/ MFC (ang. *Minimum Fungicidal Concentration*, minimalne stężenie grzybobójcze) ekstraktów roślinnych względem badanych mikroorganizmów. Wartości wyrażone są w (mg/ml).

Ekstrakt	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Szałwia	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 20,0 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 13,3 MFC: 20,0	MIC: 13,3 MFC: 13,3	MIC: 13,3 MBC: 13,3	MIC: 13,3 MBC: -
Wrotycz	MIC: 13,3 MBC: 20,0	MIC: 20,0 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: 20,0	MIC: 13,3 MFC: 20,0	MIC: 13,3 MFC: 13,3	MIC: 13,3 MBC: 13,3	MIC: 6,7 MBC: 20,0
Winogrono białe (wytloki)	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: 26,7	MIC: 13,3 MBC: 26,7	MIC: 13,3 MBC: 26,7	MIC: 33,3 MFC: 33,3	MIC: 33,3 MFC: -	MIC: 13,3 MBC: -	MIC: 13,3 MBC: -
Winogrono czerwone (wytloki)	MIC: 33,3 MBC: 33,3	MIC: 33,3 MBC: 33,3	MIC: 6,7 MBC: 33,3	MIC: 6,7 MBC: 33,3	MIC: 33,3 MFC: 33,3	MIC: 33,3 MFC: 33,3	MIC: 13,3 MBC: 13,3	MIC: 13,3 MBC: 20,0
Czosnek (lupiny)	MIC: 13,3 MBC: 26,7	MIC: 13,3 MBC: 26,7	MIC: 20 MBC: 26,7	MIC: 20 MBC: 26,7	MIC: 6,7 MFC: 6,7	MIC: 6,7 MFC: 6,7	MIC: 13,3 MBC: 13,3	MIC: 6,7 MBC: 13,3
Cebula (lusk)	MIC: 13,3 MBC: 13,3	MIC: 6,7 MBC: 13,3	MIC: 6,7 MBC: 13,3	MIC: 6,7 MBC: 13,3	MIC: 13,3 MFC: 13,3	MIC: 26,7 MFC: 20,0	MIC: 13,3 MBC: 20,0	MIC: 13,3 MBC: 13,3

Ad 3. i 4. Analizy prowadzone na tym etapie wykonano na dwóch typach komórek świni. Pierwszą była komórka IPEC-J2, która jest linią komercyjną świńskich enterocytów wyizolowanych z jelita czczego prosiąt nie ssących. W oparciu o liczne dane literaturowe komórki izolowano dziesięcioma różnymi sposobami (Fot. 2.). Testowano także różne składy pożywek hodowlanych oraz warunki prowadzenia hodowli.

Izolacja enterocytów świńskich (Fot. 2. Anna Arczewska-Włosek).



Ekstrakty postanowiono przygotowywać w dziewięciu różnych stężeniach rozpuszczonych w 70% metanolu. Postępowanie to było podyktowane faktem stworzenia analogicznych wyników do tych otrzymanych w badaniach mikrobiologicznych.

Na komórkach przeprowadzono testy żywotności, proliferacji oraz cytotoksyczności (Fot. 3.) oraz analizę poziomu ROS. Analizy prowadzono po 6 i 24 godzinach inkubacji z ekstraktem. Przeprowadzono także analizę przepuszczalności bariery jelitowej metodą TEER.

Przykładowa analiza cytotoksyczności ekstraktu metodą LDH.



Najbardziej efektywnym sposobem izolacji komórek okazała się metoda z wykorzystaniem trawienia fragmentów tkanki (2 h w temp 37°C), a następnie zaożyczenia hodowli eksplantatów oraz metoda opierająca się na wykorzystaniu homogenizatora do tkanek.

Najbardziej korzystna temperatura hodowli wynosiła 38,5°C. Dla linii komórkowej IPEC-J2 właściwą pożywką okazała się pożywka o składzie: DMEM/Ham's F12 (50:50) z dodatkiem 10% FBS, 1% suplementu glutamaks, 1% roztworu antybiotyku i związku przeciwgrzybicznego (AAS), 1% roztworu insulina- transferyna-selen (ITS), 1% roztworu podstawowych aminokwasów (BME), 1% roztworu endogennych aminokwasów (MEM) oraz 5 ng/ml nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF). W przypadku wyizolowanych w laboratorium Instytutu Zootechniki PIB enterocytów zastosowano pożywkę: o składzie 4:1 czyli 4 ml pożywki IPEC-J2 oraz 1 ml ODM (IntestiCult™ Organoid Differentiation Medium (Human)-StemCell Technologies).

Testy komórkowe wykonywane zostały dla oceny wpływu 24 h inkubacji komórek z ekstraktami do stężenia 3,3 mg/ml. Podyktowane było to faktem, że komórki hodowane w wyższych stężeniach charakteryzowały się już niekorzystnymi parametrami żywotności, niskim tempem proliferacji, następował wzrost stężenia reaktywnych form tlenu oraz cytotoksyczności.

Zadanie 01-16-10-21

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Marek Pieszka

Na podstawie hipotezy badawczej sformułowano cele naukowe:

1. Ocena przydatności modelu świni służącego do analizy bariery jelitowej u odsadzonych prosiąt.
2. Ocena skuteczności zastosowania dodatku do diety probiotyku lub liposomalnego ekstraktu z goździka na barierę jelitową i profil mikrobioty u odsadzonych prosiąt.
3. Ocena efektywności dodatku do diety probiotyku lub liposomalnego ekstraktu z goździków wspierającego proces dojrzewania przewodu pokarmowego prosiąt po odsadzeniu od lochy.

Materiał i metody

Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach na 18 wieprzkach rasy DanBred 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. Od 43. do 56. dnia zwierzęta będą otrzymywały mieszankę starter (Tabela 1.). Od początku badań, tj. od 28. dnia były podawane z paszą dodatki: grupa I (kontrola – bez dodatku), grupa II (probiotyk) oraz grupa III (liposomalny ekstrakt z goździków). 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 uśmiercone 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 (probiotyki)	Grupa III (liposom)
Probiotyk (g)	0	2000 g probiotyku/ prosię/dzień	0
Liposom (mg)	0	0	10 mL liposomalny ekstrakt z goździka 30 mg kwasu galusowego

W trakcie doświadczenia określano parametry zootechniczne prosiąt m.in. masę ciała, średnie przyrosty masy ciała, pobranie paszy, 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 wykonano metodą spektrofotometryczną wykorzystując dedykowane zestawy diagnostyczne firmy PZ Cormay SA, (Warszawa, Polska), postępując zgodnie z instrukcją producenta. 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 korzystając z techniki (NGS – ang. *next-generation sequencing*). Analiza TEER – badanie przepuszczalności warstwy pojedynczych komórek nabłonkowych poprzez pomiary rezystancji elektrycznej (TEER, ang. *Trans Endothelial Electrical Resistance*) za pomocą aparatu The Millicell ERS (Electrical Resistance System). Wykonano ocenę właściwości i efektywności czynników żywieniowych z wykorzystaniem testów *in vitro* w hodowlach komórkowych.

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 88 175 przy użyciu pakietu rtk 0.2.6.1. Obliczone metryki obejmowały wskaźniki Richness, Evenness, Simpsona i Shannona.

W celu wykazania istotnych różnic 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 $-\log_{10}(p\text{-value})$ względem cech.

Wyniki badań

Właściwa suplementacja diety prosiąt związkami zdolnymi do optymalnego utrzymania funkcji jelit jest jednym z najefektywniejszych sposobów na poprawę zdrowotności i produktywności prosiąt. Poniżej zestawiono i opisano uzyskane wyniki z badań żywieniowych i analiz laboratoryjnych.

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

Wyszczególnienie	Grupy żywieniowe					
		I	II	III	SEM	P
Masa końcowa, (kg)		15,8	14,8	15,4	0,385	0,072
Pobranie paszy (g)	Prestarter	3415,17	2953,58	3134,83	110,27	0,238
	Starter	7183,67	6537,83	6663,17	156,70	0,211
	łącznie	10598,83	9491,42	9798,00	252,66	0,186
Średnie dzienne pobranie paszy (ADFI, g)	Prestarter	341,51	295,35	313,48	8,67	0,356
	Starter	478,91	435,85	444,21	10,45	0,211
	łącznie	423,95	379,65	391,92	10,11	0,186
Średni przyrost dzienny (ADG, g)	Prestarter	0,176	0,175	0,161	0,01	0,855
	Starter	0,205	0,235	0,206	0,03	0,918
	łącznie	0,274	0,266	0,269	0,01	0,863
Zużycie paszy na 1 kg przyrostu (FCR, kg/kg)	Prestarter	2,13	2,03	2,00	0,16	0,947
	Starter	3,49	3,15	3,13	0,52	0,476
	łącznie	1,56	1,56	1,46	0,03	0,334
Przyrost całkowity (g)	Prestarter	1,76	1,75	1,61	0,11	0,855
	Starter	3,07	3,52	3,10	0,45	0,918
	łącznie	6,848	6,197	6,725	0,22	0,477

ADG – przyrosty masy ciała; ADFI – dzienne zużycie paszy; FCR – współczynnik konwersji paszy, ^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P \leq 0,05$.

Obserwacje dotyczące masy ciała prosiąt oraz pobrania i wykorzystania paszy zostały przedstawione w Tabeli 2. Suplementacja diety prosiąt probiotykiem (gr. II) wykazała tendencję do wyższej masy końcowej prosiąt w porównaniu do grupy kontrolnej (I) i grupy III, otrzymującej liposomalny ekstrakt z goździka ($P = 0,072$). Nie stwierdzono istotnych różnic w przyrostach masy ciała prosiąt w okresie od odsadzenia do 56 dnia życia pomiędzy grupami żywieniowymi ($P = 0,863$). Średnie pobranie paszy przez prosięta przez cały okres doświadczenia było zbliżone i wynosiło średnio 409,8 g. Nie stwierdzono także istotnych różnic w średnim wskaźniku wykorzystania paszy FCR, który mieścił się w granicy 1,46–1,56 kg/kg.

Tabela 3. Ocena histometryczna układu pokarmowego prosiąt w 56. dniu życia.

Parametry	Narządy	Grupy żywieniowe				
		I	II	III	SEM	P
Masa narządów (g)	żołądek	151,27	141,12	146,87	3,13	0,440
	jelito cienkie	762,15 ^b	592,88 ^a	708,92 ^b	22,24	0,001
	jelito grube	287,63	271,28	270,88	7,84	0,638
	wątroba	349,85	313,98	350,98	6,99	0,960
pH	żołądek	4,355	3,42	3,75	0,22	0,241
	dwunastnica	6,04	6,03	6,18	0,08	0,692
	cienkie	5,64	5,56	5,78	0,05	0,245
	grube	6,24	6,47	6,45	0,07	0,284
Długość, cm	dwunastnica	20,00 ^a	25,17 ^b	22,83 ^{ab}	0,788	0,016
	cienkie	1197,50	1130,67	1232,83	29,03	0,367
	grube	250,00	244,00	228,00	6,92	0,432

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

Ocena histometryczna wykazała istotne zróżnicowanie w masie jelita cienkiego pomiędzy grupą II a grupą I i III $P \leq 0,001$. Stwierdzono istotnie dłuższą długość dwunastnicy u prosiąt otrzymujących probiotyk w porównaniu do grupy I i III $P \leq 0,016$ (Tabela 3.).

Tabela 4. Parametry tandemowego spektrometru mas dla poszczególnych analitów.

Analityt	Jon pseudomolekularny	Jon fragmentacyjny	Q1 (V)*	q2 CE (V)**	Q3 (V)*
Mannitol	181,2	89,0	12	16	20
Sacharoza	341,1	179,0	12	15	15
Laktuloza	341,1	161,0	16	9	13
Rafinoza	503,1	179,2	24	24	15

* napięcie wstępne na kwadrupolu, ** energia kolizji w celi kolizyjnej.

Tabela 5. Wyniki analizy chromatograficznej zawartości: mannitolu, laktulozy i sacharozy w moczu prosiąt 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	78,53 \pm 1,63 ^A	41,19 \pm 1,01 ^A	39,17 \pm 1,65 ^A	34,97 \pm 0,92 ^A
II	165,61 \pm 3,16 ^{BC}	53,25 \pm 1,04 ^{AB}	77,49 \pm 2,29 ^B	67,82 \pm 0,47 ^B
III	186,54 \pm 5,26 ^C	74,77 \pm 1,78 ^B	154,75 \pm 3,14 ^C	99,54 \pm 1,47 ^C
P	0,01	0,01	0,01	0,01

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

W wyniku przeprowadzonego testu absorpcji cukrów przeanalizowano mocz prosiąt pod kątem zawartości mannitolu, sacharozy, laktulozy i rafinozy metodą LC-MS (Tabela 5.). Stwierdzono wysokoistotne zróżnicowanie w zawartości mannitolu, sacharozy, laktulozy i rafinozy pomiędzy grupami ($P \leq 0,01$). Najwyższe stężenia cukrów stwierdzono w moczu prosiąt otrzymujących w diecie liposomalny roztwór goździków odpowiednio 186,54; 74,77; 154,75; 99,64 $\mu\text{g/mL}$, następnie w grupie otrzymującej probiotyk 165,61; 53,25; 77,49; 67,82 $\mu\text{g/mL}$. Najniższe stężenia cukrów stwierdzono w grupie kontrolnej, odpowiednio: 78,3; 41,19; 39,17 i 34,97 $\mu\text{g/mL}$.

Rycina 2. Przykładowe obrazy mikroskopowe pokazujące przekrój jelita czczego. Sekcje zostały wybrane losowo, (I – kontrola, II – probiotyk, III – liposom), barwienie H&E, powiększenie 5-krotne.

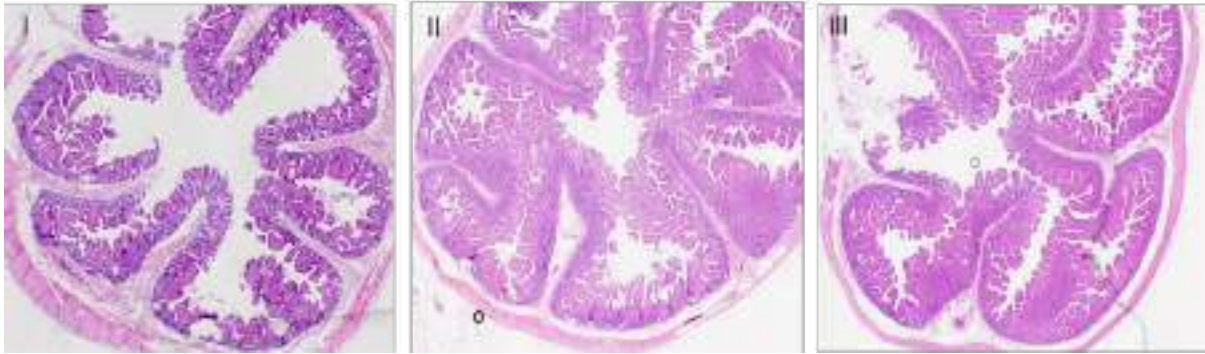


Tabela 6. Aktywność enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt (nM/min/mg białka).

Enzymy	Część jelita	Grupy żywieniowe*						SEM	p-wartość
		I	±SD	II	±SD	III	±SD		
Prosięta (sztuka)		6		6		6			
Sacharaza	Prox	0,45	0,09	0,50	0,10	0,46	0,12	0,11	0,125
	Mid	0,69 ^a	0,11	0,99 ^a	0,09	0,70 ^b	0,11	0,038	0,032
	Dist	0,30	0,01	0,31	0,02	0,40	0,02	0,010	0,078
Laktaza	Prox	10,54	3,11	9,44	3,31	10,06	2,02	1,05	0,242
	Mid	12,34	0,84	14,16	1,19	11,11	1,09	0,78	0,116
	Dist	9,12	1,14	11,80	1,41	8,96	0,76	0,81	0,184
Maltaza	Prox	7,22	1,14	8,84	1,32	7,58	1,38	0,92	0,374
	Mid	4,94 ^a	0,98	8,86 ^b	1,10	5,51 ^a	0,95	0,44	0,046
	Dist	4,02	0,41	6,68	0,48	4,88	0,56	0,32	0,098
Dipeptydaza IV	Prox	1,48	0,35	1,66	0,58	1,51	0,60	0,33	0,116
	Mid	1,64	0,42	1,84	0,66	1,48	0,50	0,20	0,098
	Dist	1,80	0,44	1,96	0,66	1,78	0,60	0,22	0,284
Aminopeptydaza N	Prox	3,12	0,52	4,42	0,58	3,18	0,59	0,36	0,094
	Mid	4,64 ^a	0,54	6,90 ^b	0,52	4,50 ^a	0,44	0,39	0,038
	Dist	3,84	0,66	5,02	0,64	3,76	0,61	0,35	0,106
Aminopeptydaza A	Prox	5,55	0,59	6,35	0,62	5,42	0,54	0,42	0,156
	Mid	4,90	0,67	5,38	0,54	5,68	0,56	0,47	0,216
	Dist	3,04	0,59	4,36	0,92	5,02	0,49	0,21	0,192

* – jak w Tabeli 2.

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

W Tabeli 6. zamieszczono wyniki analizy aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego jelita czczego prosiąt. Stwierdzono istotny wzrost aktywności sacharazy i maltazy w części środkowej jelita czczego w grupie II w porównaniu do grupy kontrolnej (I) i grupy III odpowiednio ($P \leq 0,038$ i $P \leq 0,046$). Obserwowano także w grupie II istotnie wyższą aktywność aminopeptydazy N w porównaniu do grupy I i III ($P \leq 0,012$),

Tabela 7. Analiza hematologiczna krwi prosiąt pobranej w 56. dniu życia.

Wskaźniki morfotyczne krwi	Grupy żywieniowe*			SEM	P
	I	II	III		
WBC, 10 ³ /μL	12,49	10,87	13,11	0,962	0,632
LYM, %	57,70	63,04	61,06	2,017	0,597
MON, %	7,64	6,23	3,91	0,823	0,184
GRA, %	34,66	30,72	51,11	6,170	0,366
LYM, 10 ³ /μL	7,08	6,71	8,03	0,576	0,641
MON, 10 ³ /μL	0,99	0,64	0,56	0,134	0,418
GRA, 10 ³ /μL	4,44	3,52	4,53	0,412	0,561
RBC, 10 ⁶ /μL	6,19 de	5,35 d	6,46 e	0,220	0,082
HGB, g/dL	10,05	9,06	10,59	0,412	0,301
HCT, %	36,47	32,59	38,80	1,370	0,160
MCV, μm ³	58,92	60,62	60,31	0,754	0,668
MCH, pg	16,22	16,85	16,46	0,309	0,731
MCHC, g/dL	27,58	27,76	27,26	0,357	0,853
RDWC, %	17,89	17,32	17,82	0,254	0,628
RDWS, fl	36,98	37,84	36,60	0,776	0,812
PLT, 10 ³ /μL	118,89 ^a	158,15 ^a	306,87 ^b	26,098	0,002
MPV, fl	8,56 ^a	8,04 ^{ab}	7,59 ^b	0,154	0,031
PCT, ng/mL	0,105 ^a	0,128 ^a	0,233 ^b	0,019	0,006
PDW, %	41,42 ^d	37,18 ^{de}	30,73 ^e	1,895	0,061
PLCR	18,50 ^a	14,79 ^{ab}	11,84 ^b	0,905	0,004

* – jak w Tabeli 2.

^{a,b} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy P≤0,05.

W Tabeli 7. przedstawiono wyniki analizy hematologicznej. Stwierdzono istotnie wyższą zawartość płytek krwi oraz prokalcytoniny (PCT) w grupie II, w porównaniu do grupy I i III P≤0,002. W grupie II obserwowano także istotnie niższy poziom czerwonych krwinek oraz średnią objętość krwinek (MPV) w porównaniu do pozostałych grup odpowiednio – P = 0,082 i 0,031. Stwierdzono istotnie podwyższony procentowy wskaźnik objętości płytek krwi (PLCR), w grupie kontrolnej (I) i grupie (II) P≤0,004.

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

Wskaźniki biochemiczne	Grupy żywieniowe*				
	I	II	III	P	SEM
CHOL, mg/dl	90,83	97,25	98,08	0,245	1,900
LDL-D, mg/dl	35,80	37,82	35,70	0,789	1,342
HDL-D, mg/dl	42,44	44,98	42,77	0,614	1,091
ALB, g/dl	3,58	3,46	3,40	0,316	0,047
TG, mg/dl	41,06	31,84	43,12	0,422	3,611
IRON, ug/dl	178,95	179,38	198,99	0,644	9,153
UREA, mg/dl	6,434 ^{ab}	9,058 ^b	5,475 ^a	0,010	0,543
TP, g/dl	4,553	4,516	4,516	0,989	0,114
CK, U/l	1691,56	1360,58	1745,66	0,776	278,68
Amyl eps, U/l	2628,77	2759,72	2118,70	0,326	174,05
CREA enz, mg/dl	0,791	0,722	0,709	0,563	0,032

GLU hex, mg/dl	110,72	119,95	115,36	0,416	2,824
LIPA, U/L	10,37 ^d	10,43 ^e	9,60 ^{de}	0,078	0,186
MG, mg/dl	2,73 ^e	2,38 ^{de}	2,216 ^d	0,083	0,167
Ca ARS, mg/dl	12,86	11,95	12,39	0,139	0,195
ALP, U/l	360,17	340,00	385,50	0,102	8,820
AST, U/L	88,25 ^b	48,29 ^a	68,29 ^{ab}	0,003	5,331
ALT, U/L	96,77 ^e	66,68 ^d	83,48 ^{de}	0,051	5,222
GGT, U/l	68,44	55,46	45,16	0,200	5,256

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

Analiza wybranych wskaźników biochemicznych w surowicy krwi odpowiedzialnych na przemiany węglowodanów, tłuszczów oraz białek wykazała istotne różnice we wskaźnikach wątrobowych, m.in. w AST i ALT, gdzie stwierdzono istotne ich obniżenie w grupie otrzymującej probiotyk w porównaniu do pozostałych, odpowiednio: $P \leq 0,003$ i $P \leq 0,051$. Natomiast istotne obniżenie poziomu mocznika, stwierdzono w surowicy prosiąt otrzymujących liposomalny ekstrakt z goździków $P \leq 0,010$. Obserwowano także w tej grupie tendencję do obniżonego poziomu magnezu i lipazy odpowiednio $P = 0,078$ i $P = 0,083$

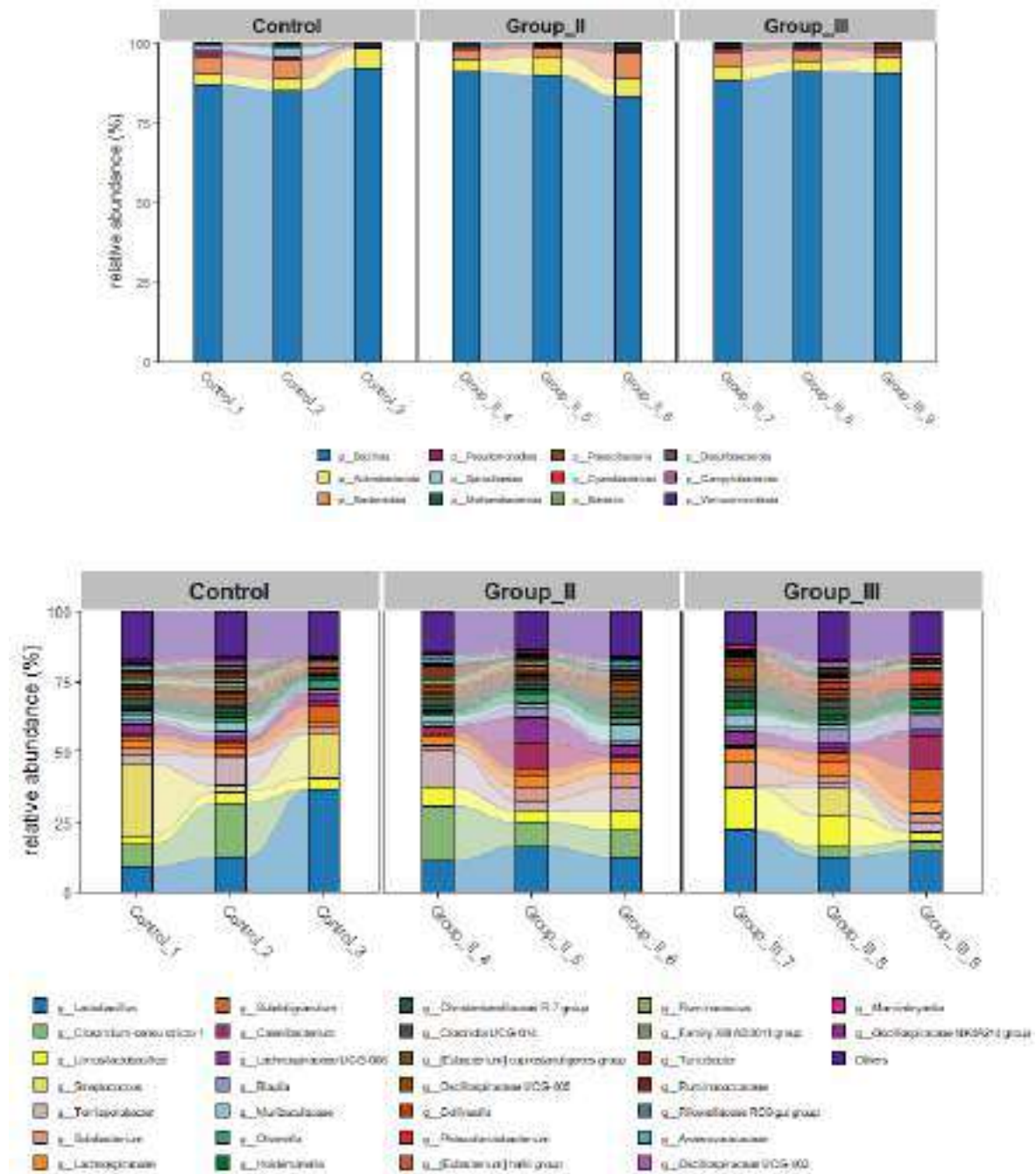
Skład mikrobiomu jelitowego i profilowanie różnorodności

W osiemnastu mikrobiomach kałowych prosiąt (po sześć na grupę) struktura społeczności na poziomie typu była zdominowana przez Bacillota we wszystkich grupach, ze średnią (\pm SD) względną liczebnością wynoszącą $88,2 \pm 3,6\%$ w grupie kontrolnej, $88,1 \pm 3,8\%$ w grupie probiotycznej i $90,1 \pm 1,3\%$ w grupie liposomalnego ekstraktu z goździków (Rycina 3.A). Bacteroidota i Actinobacteriota stanowiły kolejne najliczniejsze typy (grupa kontrolna: odpowiednio $3,9 \pm 3,1\%$ i $4,3 \pm 1,8\%$). Efekty leczenia w tej randze taksonomicznej były niskie: Bacillota wzrosła o 1,9 punktu procentowego po zastosowaniu ekstraktu z goździków, podczas gdy Bacteroidota i Actinobacteriota różniły się średnio o <1 punkt procentowy w porównaniu z grupą kontrolną. Bardziej widoczne były stałe redukcje Spirochaetota w przypadku obu interwencji (kontrola $1,50 \pm 1,41\%$; probiotyk $0,30 \pm 0,15\%$; ekstrakt z goździków $0,12 \pm 0,13\%$), którym towarzyszyło niewielkie zmniejszenie liczebności Pseudomonadota (kontrola $1,20 \pm 0,63\%$; probiotyk $0,73 \pm 0,23\%$; ekstrakt z goździków $0,88 \pm 0,17\%$).

Patescibacteria wykazywały rozbieżne zachowania – niższe w przypadku probiotyku i wyższe w przypadku ekstraktu z goździków, jednak nadal stanowiły niewielki składnik. Skład na poziomie rodzaju był wyraźniejszy między interwencjami. Kontrole charakteryzowały się wysoką względną liczebnością Lactobacillus (średnio $19,36\%$) i Streptococcus ($14,78\%$) (Rycina 3. B). Oba rodzaje leczenia znacząco zmniejszyły liczbę paciorkowców (Streptococcus), zbliżając się do wartości wyjściowych w grupie probiotycznej (średnio $0,06\%$) i redukując do $3,42\%$ w przypadku ekstraktu z goździków. Natomiast liczba bakterii Lactobacillus spadła z $19,36\%$ w grupie kontrolnej do $13,19\%$ w grupie probiotycznej i $16,48\%$ w grupie z ekstraktem z goździków, podczas gdy liczba bakterii Limosilactobacillus wzrosła w obu grupach, najbardziej widoczna w przypadku ekstraktu z goździków (grupa kontrolna $3,71\%$; grupa probiotyczna $5,73\%$; grupa z ekstraktem z goździków $9,82\%$). Kilka dodatkowych rodzajów Bacillota wykazało zmiany zależne od leczenia. Liczba bakterii Clostridium sensu stricto 1 wzrosła w grupie probiotycznej ($12,55\%$ w porównaniu z $9,25\%$ w grupie kontrolnej), ale spadła w przypadku ekstraktu z goździków ($2,45\%$), podczas gdy liczba bakterii Terrisporobacter wzrosła w grupie probiotycznej ($8,14\%$ w porównaniu z $4,43\%$ w grupie kontrolnej) i spadła w przypadku ekstraktu

z goździków (1,78%). Rodzaje związane z produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z Lachnospiraceae i Ruminococcaceae wykazały selektywne wzbogacenie, szczególnie w grupie z ekstraktem z goździków, takie jak *Blautia* (4,18% w porównaniu z 1,46% w grupie kontrolnej), *Subdoligranulum* (5,17% w porównaniu z 3,02%) i *Phascolarctobacterium* (2,69% w porównaniu z 0,52%). Grupa probiotyczna wykazała mniejsze lub mieszane zmiany w tych taksonach (*Subdoligranulum* 1,98%; *Phascolarctobacterium* 0,35%). Wśród mniej licznych rodzajów, liczba *Treponema* zmniejszyła się po zastosowaniu obu interwencji (kontrola 1,45%; probiotyk 0,20%; ekstrakt z goździków 0,12%), a liczba *Turicibacter* była wyraźnie niższa po zastosowaniu ekstraktu z goździków (0,07% w porównaniu z 1,04% w grupie kontrolnej).

Rycina 3 a i 3 b. Wykresy słupkowe względnej liczebności na poziomie typu (A) i rodzaju (B) mikrobiomów kałowych z grupy kontrolnej, grupy probiotycznej (grupa II) i grupy ekstraktów goździkowych liposomowych (grupa III).

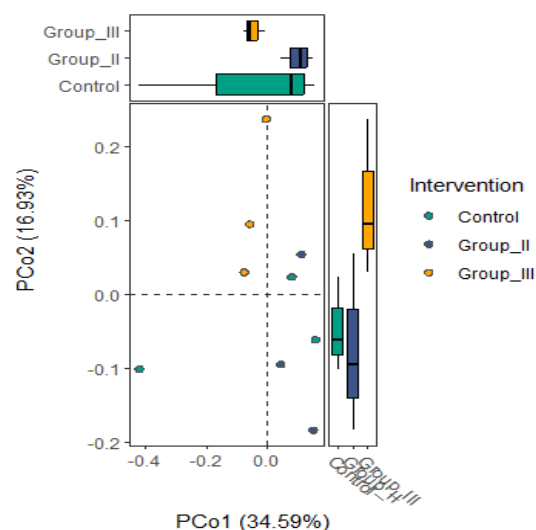


Podsumowując, skład na poziomie typu bakterii pozostał zasadniczo podobny we wszystkich grupach z jednolitą dominacją Bacillota, z niewielkimi przesunięciami, podczas gdy profile na poziomie rodzaju różniły się między obiema interwencjami i grupami kontrolnymi. Oba rodzaje interwencji doprowadziły do zmniejszenia liczby Streptococcus i redystrybucji bakterii Lactobacillus (zmniejszając liczbę bakterii Lactobacillus przy jednoczesnym wzroście liczby bakterii Limosilactobacillus), ale probiotyk preferencyjnie zwiększył liczbę Clostridium sensu stricto 1 i Terrisporobacter, podczas gdy ekstrakt z goździków selektywnie wzbogacił Blautia, Subdoligranulum i Phascolarctobacterium. Wyniki te wskazują, że pomimo stabilnej architektury na poziomie typu, interwencje te powodują odmienne rekonfiguracje na poziomie rodzaju mikrobioty jelitowej bogatej w Bacillota. Aby ocenić wpływ suplementacji na różnorodność mikrobiologiczną, dokonaliśmy ilościowej oceny różnorodności, a w próbie, wykorzystując zaobserwowane wskaźniki ASV, Chao1, Shannona i Simpsona w trzech grupach. Wskaźniki bogactwa mikrobiologicznego, w tym zaobserwowana liczba ASV i oszacowania Chao1, były zasadniczo podobne we wszystkich grupach, ze znacznym nakładaniem się rozkładów i brakiem statystycznie istotnych różnic w porównaniach parami (adnotowane wartości p wynosiły 0,7–1,0).

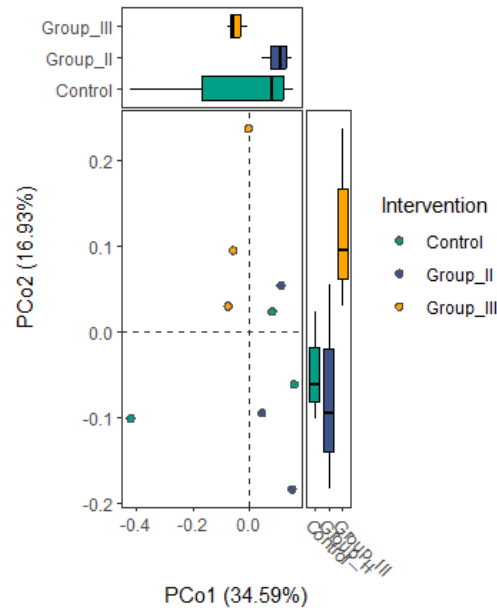
Wskaźniki różnorodności i równomierności wykazywały podobny wzorzec. Wartości różnorodności Shannona były nieznacznie podwyższone w obu grupach interwencyjnych w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy równomierność Simpsona była najwyższa w grupie z ekstraktem z goździków. Jednak żadna z tych różnic nie osiągnęła istotności statystycznej (adnotowane wartości p wynosiły 0,2–1,0). Analiza różnorodności a sugeruje, że w ramach ograniczeń tej ograniczonej liczebności próby, żadna ze strategii suplementacji nie spowodowała istotnej zmiany w bogactwie mikrobiologicznym ani równomierności. Bogactwo (Obserwowane, Chao1) pozostało stabilne, co sugeruje brak zauważalnych zmian w liczbie obecnych taksonów mikroorganizmów. Chociaż indeksy Shannona i Simpsona wykazały niewielkie trendy wzrostowe, szczególnie w przypadku równomierności Simpsona w Grupie III, prawdopodobnie odzwierciedlają one umiarkowane redystrybucje względnej liczebności, a nie wyraźną rotację taksonomiczną.

Reasumując, chociaż istnieje kierunkowa sugestia na nieznacznie zwiększoną równomierność zbiorowisk, dane nie potwierdzają istotnych zmian w różnorodności alfa w przypadku żadnej z interwencji przy obecnej mocy statystycznej.

Rycina 4. Wykresy skrzypcowe wskaźników różnorodności α (bogactwo obserwowane, Chao1, Shannon i Simpson) dla mikrobiomów kałowych grupy kontrolnej, grupy probiotycznej (grupa II) i grupy liposomalnych ekstraktów goździkowych (grupa III).



Rycina 5. Analiza głównych współrzędnych (PCoA) odległości beta-różnorodności.

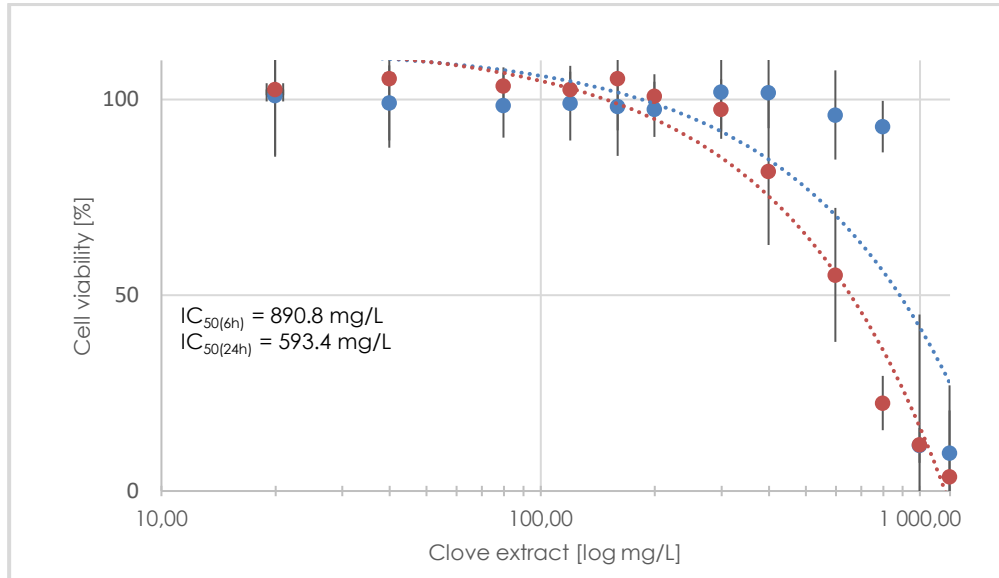


Do analizy istotności zastosowano testy Manna-Whitneya z poprawką Benjaminie Hochberga. Analiza współrzędnych głównych (PCoA) oparta na różnicach między próbkami ujawniła umiarkowany, częściowo ustrukturyzowany podział społeczności mikrobiologicznych według grup interwencyjnych. Pierwsze dwie osie PCoA wyjaśniały 34,59% (PCo1) i 16,93% (PCo2) wariacji w składzie społeczności. Próbkami kontrolnymi były głównie rozłożone w kierunku ujemnego krańca PCo1, podczas gdy obie grupy interwencyjne (grupy II i III) miały tendencję do skupiania się bliżej źródła lub dodatnich wartości PCo1. Pomimo tych kierunkowych trendów, ogólne rozkłady próbek wykazały znaczne nakładanie się w przestrzeni ordynacji. Aby formalnie ocenić różnice między grupami, przeprowadzono test PERMANOVA (9999 permutacji). Czynniki interwencji wyjaśniał około 28,2% całkowitej wariacji ($R^2 = 0,282$), ale efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej ($F = 1,18$, $p = 0,227$). Wyniki te sugerują, że chociaż suplementacja może wpływać na skład społeczności w sposób kierunkowo spójny, zaobserwowane zmiany są niewielkie i nieistotne statystycznie przy obecnej liczbie próbek. Nakładanie się wyników między grupami wskazuje, że ogólna struktura mikrobioty pozostaje zasadniczo podobna pomimo interwencji.

Ocena właściwości i efektywności czynników żywieniowych z wykorzystaniem testów *in vitro* w hodowlach komórkowych.

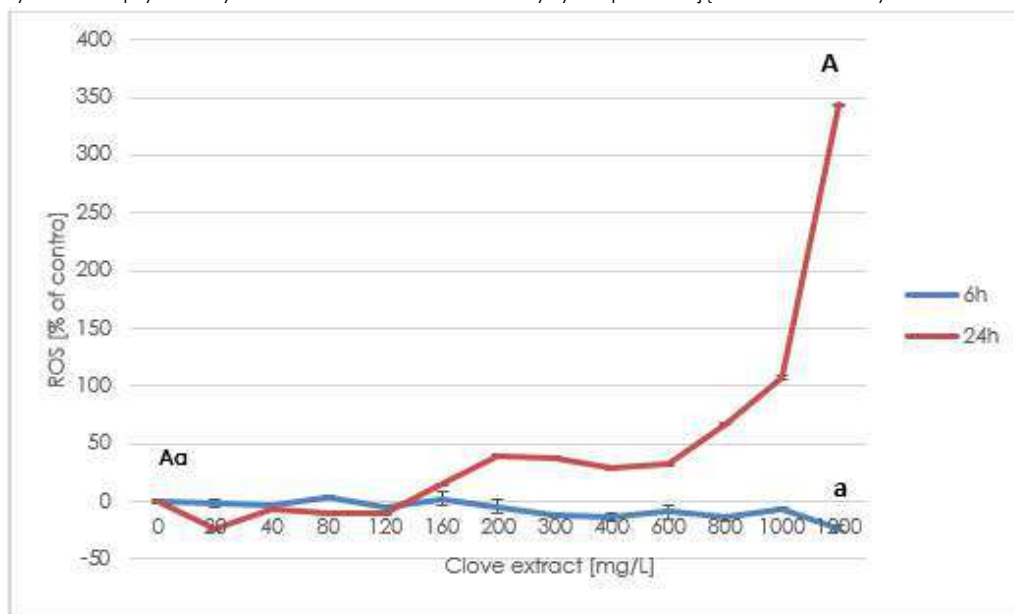
W komórkach poddanych działaniu ekstraktów przez dwadzieścia cztery godziny, żywotność komórek była zmniejszona w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku stężeń 200 mg/l ($p < 0,002$) i 1000 mg/l ($p < 0,001$). W przypadku komórek poddanych działaniu ekstraktów przez sześć godzin wyniki są niemal identyczne; zaobserwowano statystycznie istotnie niższą żywotność komórek w hodowli komórkowej w przypadku stężeń 200 mg/l i 1000 mg/l ($p < 0,001$) ekstraktu z goździków. Cytotoksyczność mierzona w komórkach po 6-godzinnej ekspozycji na ekstrakty wykazała statystycznie istotny wzrost w komórkach hodowanych przy dwóch najwyższych stężeniach ($p < 0,05$). W przypadku 24-godzinnej ekspozycji cytotoksyczność wzrosła statystycznie tylko przy najwyższym stężeniu ($p < 0,001$). Ponadto, nie zaobserwowano wpływu na żywotność i cytotoksyczność komórek hodowanych z 1% i 6% rozpuszczalnikiem ekstraktu (70% etanolem).

Rycina 6. Wykres procentowej żywotności enterocytów świńskich w funkcji logarytmu stężenia ekstraktu z goździków.

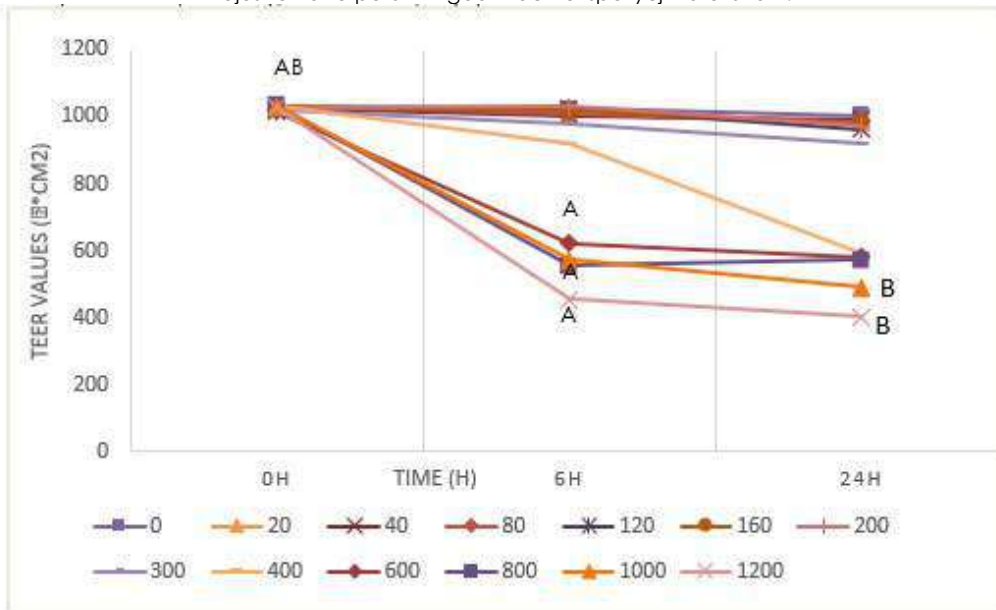


Wartości IC_{50} dla 6-godzinnej ekspozycji wynosiły 890,8 mg/l, a dla 24-godzinnej 593,4 mg/l. Interesujące jest, że najwyższe stężenie goździków podczas 6-godzinnej ekspozycji miało właściwości antyoksydacyjne i statystycznie istotnie zmniejszyło poziom ROS ($p < 0,05$), podczas gdy 24-godzinna ekspozycja miała odwrotny efekt i statystycznie istotnie zwiększała poziom ROS ($p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic w pozostałych grupach badawczych. Nie zaobserwowano również wpływu na poziom ROS w komórkach hodowanych z 1% i 6% rozpuszczalnikiem ekstraktu (70% etanolem).

Rycina 7. Wpływ różnych wartości ekstraktu z koniczyny na produkcję ROS w enterocytach świńskich.



Rycina 8. Przenabłonkowy opór elektryczny w enterocytach (TEER) po dodaniu ekstraktu z goździków. TEER rejestrowano po 6 i 24 godzinach ekspozycji na ekstrakt.



Ta sama wielka litera (A) oznacza statystycznie wysoce istotne różnice ($p \leq 0,005$) w jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) z następowym testem post hoc Tukeya.

Spadek przenabłonkowego oporu elektrycznego (TEER) wskazuje na zaburzenie integralności nabłonka. Stężenia ekstraktu z goździków do 300 mg/l nie wpływają negatywnie na TEER i nie powodują jego spadku w ciągu 24 godzin po ekspozycji. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice ($p < 0,005$) po 24-godzinnej inkubacji komórek z ekstraktem z goździków w stężeniu 400 mg/l. Nie zaobserwowano żadnych zmian po 6 godzinach inkubacji przy tym stężeniu. Stężenia powyżej 400 mg/l statystycznie istotnie obniżyły wartość TEER nawet po 6 godzinach inkubacji ($p < 0,005$).

Wnioski i stwierdzenia

1. Opracowana procedura potwierdziła przydatność zastosowanego protokołu badawczego do analizy integralności bariery jelitowej na przykładzie rosnących prosiąt.
2. Zastosowane interwencje żywieniowe wykazały pozytywny wpływ na integralność i wzmocnienie bariery jelitowej u odsadzonych prosiąt.
3. Zastosowanie interwencji żywieniowej poprzez dodatek do diety preparatu probiotycznego lub liposomalnego ekstraktu z goździka moduluje mikrobiotę jelitową, ochrania przed bakteriami chorobotwórczymi i zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi.

Zadanie 04-16-06-11

Długoterminowy wpływ składu paszy stałej podawanej w pierwszych tygodniach życia na funkcjonowanie zwacza i wartość użytkową bydła mlecznego.

kierownik zadania: dr hab. Paweł Górka, prof. IZ PIB

W ramach realizowanego zadania określony zostanie długoterminowy wpływ składu paszy stałej podawanej cielętom ras mlecznych na funkcjonowanie zwacza i najważniejsze wskaźniki produkcyjne (wydajność mleczna, podatność na choroby). Zakłada się, że powszechnie praktykowane podawanie cielętom ras mlecznych pasz treściwych do woli od pierwszych dni życia,

pomimo szeregu zalet, ma również negatywne, długoterminowe konsekwencje, które do tej pory nie były brane pod uwagę w praktycznym żywieniu tej grupy zwierząt. Uściślając, wyniki dostępnych badań wskazują, że pobranie przez cielęta pasz treściwych przyspiesza rozwój strukturalny i funkcjonalny nabłonka żwacza. Przekłada się to na większe pobranie paszy stałej i przyrosty masy ciała i jednocześnie prowadzi do bardzo niskiego pH w żwaczu zwierząt, opóźnienia w rozwoju jego pojemności oraz oddalenia w czasie rozwoju odruchu przeżuwania. Wyniki niektórych badań wskazują, że sytuacja taka może mieć długoterminowe, negatywne konsekwencje dla zwierzęcia. Niskie pH w żwaczu w początkowym okresie życia może długoterminowo modyfikować/programować skład mikroorganizmów zasiedlających ten odcinek przewodu pokarmowego, co ma decydujący wpływ na przebieg procesów trawiennych u przeżuwaczy. Ponadto może zwiększać podatność żwacza na niskie pH w życiu dorosłym lub też modyfikować jego reakcję na czynniki żywieniowe w sposób, który może prowadzić do pogorszenia wykorzystania składników pokarmowych. W efekcie przeprowadzone badania mogą zmienić obecne podejścia do żywienia cieląt ras mlecznych. W ujęciu szczegółowym, w ramach projektu określony zostanie wpływ składu podawanej paszy stałej w pierwszych tygodniach życia na: 1) wydajność mleczną krów oraz podatność na choroby w pierwszej laktacji; 2) wybrane markery funkcjonowania żwacza (pH, przeżuwanie); 3) wybrane wskaźniki biochemiczne krwi charakteryzujące wydolność metaboliczną organizmu oraz jego adaptację do rozpoczętej laktacji. Oczekuje się, że wyniki badań mogą być punktem wyjścia do zdecydowanej zmiany obecnie praktykowanego żywienia cieląt ras mlecznych i zastąpienia powszechnie podawanych im pasz treściwych paszami objętościowymi.

Założenia metodyczne

Doświadczenie jest wykonywane na 200 jałówkach ras mlecznej, które będą przebywały w doświadczeniu do ukończenia 100. dnia laktacji, w celu określenia długoterminowego wpływu podawanej paszy stałej w pierwszym okresie życia na produktywność zwierząt. Zwierzęta przydzielone do badań (cielęta w wieku początkowym nie przekraczającym 15 dni życia) zostały rozdzielone do jednej z dwóch grup doświadczalnych, różniących się podawaną paszą stałą w pierwszych tygodniach życia, tj. otrzymującej mieszankę treściwą, której głównym składnikiem są ziarna zbóż (Grupa A); otrzymującej siewkę z siana (Grupa B). Doświadczalne pasze będą podawane zwierzętom przez okres pierwszych 12 tygodni życia, po czym będą żywione typową dawką pokarmową dla rosnących jałówek.

Doświadczenie zostanie podzielone na trzy etapy:

1. okres żywienia preparatem mlekozastępczym oraz 2–4 tygodnie po zakończeniu jego podawania, w czasie których zwierzęta będą jednocześnie żywione doświadczalnymi paszami stałymi,
2. okres od 2 do 4 tygodni po zakończeniu żywienia preparatem mlekozastępczym do wycielenia,
3. pierwsze 100 dni laktacji.

W trakcie doświadczenia monitorowane będą następujące parametry: pobranie paszy, masa ciała zwierząt, ich aktywność (z wykorzystaniem czujników montowanych na ciele, w tym pomiar czasu przeżuwania), wybrane wskaźniki metaboliczne krwi, kondycja zwierząt, pH żwacza oraz wydajność mleczna.

Syntetyczny opis wyników

Zadanie jest w trakcie realizacji. Wstępne wyniki pierwszego etapu badań nie wskazują na istotne różnice w pobraniu paszy i przyrostach masy ciała jałówek.

Zwierzęta przydzielone do pierwszego etapu badań (Fot. P. Górka).



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

Zadanie 01-17-07-11

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

kierownik zadania: dr Kamila Musiał

Głównym celem zadania badawczego było zdiagnozowanie stanu zaawansowania procesów recesywnych, a zatem dezagraryzacji i dezanimalizacji na obszarach chronionych i znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie, w obrębie Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej.

Wykonanie badań służyło pogłębieniu wiedzy w zakresie istniejącego stanu rolniczej przestrzeni produkcyjnej oraz siedlisk przyrodniczych, które bezpośrednio ją otaczają w wybranym obszarze analiz.

Badania prowadzone w latach 2023–2025 obejmowały realizację badań terenowych o charakterze ankietowym, a w wybranych gminach również badań o charakterze przyrodniczym. Przygotowane zostały stosowne formularze ankiet, które następnie zostały wykonane w układzie gmin i objęty wszystkie gminy wiejskie, miejsko-wiejskie, a także nieliczne miejskie, znajdujące się na obszarze makroregionu o nazwie Wyżyna Krakowsko-Częstochowska. Badania te o charakterze ocen eksperckich prowadzone były we wszystkich czterdziestu czterech gminach zaliczonych do tego obszaru, poprzez wyjazdy terenowe bezpośrednio do gmin. Posłużyło temu także wsparcie Małopolskiego oraz Śląskiego Ośrodka Doradztwa Rolniczego, jak również Izby Rolniczych z tych dwóch województw.

W każdej gminie przeprowadzono dziesięć ankiet. Uzyskane i opracowane wyniki badań, umożliwiły ocenę rolniczej przestrzeni produkcyjnej w obszarach znajdujących się w obrębie lub bliskim sąsiedztwie parków krajobrazowych. W głównej mierze analizy dotyczyły obszaru Parku Krajobrazowego Orlich Gniazd oraz jego otuliny, ponieważ w części badań w woj. małopolskim pokrywał się on z obszarem sześciu gmin, natomiast w woj. śląskim obejmował osiemnaście gmin. Ponadto, obszar badań pokrywał się także z obszarami innych parków krajobrazowych wraz z ich otulinami, jakimi były: Dłubniański PK, PK Dolinki Krakowskie, Rudniański PK oraz Tenczyński PK. Analizy dotyczyły oceny oddziaływania obszarów chronionych na rolnictwo, na podstawie danych dotyczących gospodarki rolnej oraz dezagraryzacji produkcyjnej, w tym porzucania chowu inwentarza, a zatem dezanimalizacji, na terenie poszczególnych gmin, jak również wpływu tych procesów recesywnych na przyrodniczy kształt przestrzeni rolno-leśnej na terenach chronionych lub z nimi sąsiadujących.

Wyżyna Krakowsko-Częstochowska jest obszarem specyficznym pod względem zagospodarowania rolniczego, ze względu na położenie pomiędzy dwiema dużymi aglomeracjami miejskimi. Rezultaty badań pod kątem udziału poszczególnych kategorii gospodarstw w aspekcie ich stanu i perspektyw rozwoju wskazały, że na tym obszarze łącznie ok. 14% gospodarstw wykazywało cechy rozwoju (kategoria A). Na drugim biegunie tak prowadzonych obserwacji znajdowały się gospodarstwa schyłkowe (kategoria D), tzn. takie które wycofują się z prowadzenia produkcji rolniczej. Ich udział w obszarze badań był średnio dwukrotnie wyższy, aniżeli gospodarstw rozwojowych i wynosił dla woj. śląskiego 30%, natomiast dla woj. małopolskiego 25%. Ponadto badania w terenie wykazały, że udział, a zatem także i liczba gospodarstw wykazujących cechy rozwoju, był niemal dwukrotnie niższy aniżeli w przypadku gospodarstw nierozwojowych (kategoria C), które stanowiły średnio 37,5% podmiotów rolnych z całego rejonu badań.

W województwie śląskim najmniejszy udział gospodarstw określanych jako rozwojowe, czyli posiadające znaczący potencjał produkcyjny i relatywnie dużą skalę produkcji stwierdzono

w gminach: Poręba (3%) oraz Myszków, Włodowice i Janów (po 4% dla każdej z tych gmin). Niejako na drugim biegunie takiej oceny znajdowały się gminy Żarnowiec (25%) oraz Niegowa (27%). W województwie małopolskim najmniej gospodarstw z tzw. kategorii „A” wskazano dla gminy Trzebinia (2%), ale także bardzo niski był ich udział w gminach: Bukowno, Klucze oraz Bolesław (po 5%). Z kolei najwyższy udział gospodarstw rozwojowych stwierdzono w gminach Iwanowice (28%) oraz Zabierzów (23%), a następnie gminach: Zielonki, Skąta i Wolbrom (po 20%). Z kolei w odniesieniu do gospodarstw potencjalnie rozwojowych (kategoria B), najwięcej takich podmiotów określono dla gmin: Krzeszowice (37%), Iwanowice (36%) i Skąta (33%), natomiast najmniej dla gmin: Trzebinia (3%), Klucze (5%) oraz Babice (7%).

W rezultacie przeprowadzonych badań oszacowano, że średni udział gospodarstw utrzymujących bydło w analizowanych gminach, położonych w woj. małopolskim wynosił ok. 7%. Odnośnie chowu świń udział taki wyszacowany został na ok. 4%, jednak wahania pomiędzy poszczególnymi gminami były tam dosyć duże. O wiele trudniej było ocenić udział gospodarstw prowadzących chów owiec, jako że wskazania respondentów wahały się od całkowitego ich braku, do 1-2% (przy czym wartość 2% została wskazana tylko dla dwóch gmin). Dla części obszaru badań znajdującego się w obrębie woj. śląskiego, zaawansowanie procesu dezanimalizacji odnośnie utrzymania owiec było jeszcze większe. Udział badanych gospodarstw utrzymujących bydło wyszacowano na 3%, świnie na 4%, a chów owiec był faktycznie w fazie wygaśnięcia. Istotne jest, aby w rolnictwie – w tym zwłaszcza w otoczeniu obszarów cennych przyrodniczo – rozwijać tendencje mające na celu utrzymanie większej liczby przeżuwaczy. W badaniach przyjęte zostało, że stada liczące po 30 sztuk krów lub bydła opasowego, mogą być uznane za takie, które kreują dochody i przychody w rolnictwie uznawane za satysfakcjonujące. Gospodarstwa takie są lub też mogą być biorcami nieużytkowanych TUZ, znajdujących się w ich bliskim sąsiedztwie. Jednakże w obszarze prowadzonych badań takich podmiotów rolnych było bardzo mało, dla woj. śląskiego liczba stad > 30 sztuk krów średnio w gminie wynosiła dwa, natomiast dla woj. małopolskiego cztery. Jeszcze mniej było gospodarstw nastawionych na produkcję bydła opasowego, odpowiednio średnio dwa na gminę dla woj. małopolskiego oraz jedno dla woj. śląskiego. Pomimo, że w obszarze badań obserwowany był niedobór przeżuwaczy i znaczący udział gospodarstw degresywnych, to jednocześnie brak było w badanych gminach bardzo dużych areatów porzuconych TUZ, ale także niezagospodarowanych GO, które mogłyby być przeznaczone pod różne formy rolniczego zagospodarowania. Obszary takie zostały zidentyfikowane jedynie w siedmiu gminach w obrębie woj. małopolskiego oraz w sześciu na terenie woj. śląskiego. Gminy na terenie woj. śląskiego, w których stwierdzono największą liczbę stad, tzn. z bydłem o koncentracji stad powyżej 30 sztuk, to: Przyrów, Niegowa, Pilica, Lelów i Żarnowiec. W woj. małopolskim w tym względzie wyróżniają się gminy: Trzyciąż, Iwanowice oraz Gołcza.

Przeprowadzone badania wykazały we wszystkich gminach obszaru obserwacji zaawansowane procesy przemian strukturalnych i agrarnych, w tym o charakterze degresywnym. W dominującej liczbie gmin najwyższy udział posiadały gospodarstwa nierozwojowe i schyłkowe, przy czym najwyższy udział gospodarstw typowo schyłkowych był charakterystyczny dla północnej części regionu badań. W tych gminach powinny być kontynuowane i pogłębione badania o charakterze przyrodniczym, celem określenia wpływu zaawansowanej dezagrarnizacji na stan rolniczej przestrzeni produkcyjnej.

Analizy procesów, które składają się na całkowitą ocenę zaawansowania dezanimalizacji, wskazały na duże zróżnicowanie w poszczególnych gminach odnośnie porzucania chowu przeżuwaczy. Ogółem proces dezanimalizacji był bardziej zaawansowany w woj. śląskim aniżeli w małopolskim. Występowanie w badanych gminach różnej wielkości obszarów zajętych przez porzucone łąki oraz murawy ciepłolubne głównie ulokowane na wzgórzach, daje potencjał do wypasu i jednoczesnego zagospodarowania rolniczej przestrzeni produkcyjnej w tym zakresie. Jest to tym bardziej uzasadnione, że w obszarze analiz przeważają gleby z klas bonitacyjnych IV b oraz V, a zatem cechujące się średnią i słabą przydatnością rolniczą. Jest to jednak także wysoce

problematyczne, ze względu na małą liczbę utrzymywanego inwentarza żywego w gospodarstwach znajdujących się na obszarze badań.

Zadanie 01-17-08-11

Analiza efektywności produkcji w gospodarstwach utrzymujących zwierzęta gospodarskie.

kierownik zadania: dr inż. Anna Borecka

Celem zadania badawczego jest identyfikacja i ocena wpływu działalności gospodarstw utrzymujących zwierzęta gospodarskie na poszczególne komponenty kapitału naturalnego oraz kompleksowe określenie kierunku zmian zachodzących w relacjach pomiędzy gospodarstwem rolnym a środowiskiem naturalnym.

Cel realizowany jest poprzez oszacowanie m.in.: wydajności środowiskowej, środowiskowej intensywności produkcji, kosztów poprawy efektu środowiskowego, efektywności kosztów środowiskowych.

Założenia metodyczne

Zakres prac badawczych obejmował analizę sześćdziesięciu dziewięciu gospodarstw rolnych specjalizujących się w chowie bydła (35), świń (26) oraz drobiu (8), zlokalizowanych w dwóch województwach. W badanych obiektach przychody z produkcji zwierzęcej stanowiły ponad 60% przychodów z działalności rolniczej ogółem. Podstawowym narzędziem badawczym były dedykowane kwestionariusze ankiet opracowane oddzielnie dla każdego kierunku produkcji, które umożliwiły pozyskanie szczegółowych informacji dotyczących organizacji produkcji roślinnej i zwierzęcej, struktury użytkowania gruntów, skali produkcji, zużycia środków produkcji, kosztów i przychodów oraz poziomu obciążeń środowiskowych.

Syntetyczny opis wyników zadania

Analiza charakterystyki gospodarstw wykazała istotne zróżnicowanie zasobów pracy, powierzchni użytków rolnych oraz struktury użytkowania gruntów pomiędzy poszczególnymi specjalizacjami (Tabela 1.).

Najmniejszymi zasobami siły roboczej charakteryzowały się gospodarstwa drobiarskie, jednocześnie w tej grupie odnotowano najdłuższy okres prowadzenia gospodarstwa rolnego. Średnia powierzchnia użytków rolnych w badanej próbie wynosiła ponad 20 ha i była niemal dwukrotnie wyższa od średniej krajowej. Największe gospodarstwa występowały w grupie utrzymującej bydło, natomiast najmniejsze drób. W gospodarstwach utrzymujących bydło dominowały trwałe użytki zielone, natomiast w gospodarstwach utrzymujących świnie i drób przeważały grunty orne.

Struktura zasiewów w badanych obiektach w większości przypadków była zgodna z zasadami dobrej praktyki rolniczej. Udział zbóż w zasiewach mieścił się w zalecanych granicach, szczególnie w gospodarstwach drobiarskich, podczas gdy w gospodarstwach z bydłem i świniami zboża stanowiły dominującą grupę roślin. Średnia liczba gatunków roślin w zmianowaniu wynosiła 4,3, co wskazywało na spełnienie zaleceń dotyczących racjonalnego płodozmianu. Obecność roślin motylkowatych oraz poplonów sprzyjała poprawie struktury gleby, ograniczeniu erozji oraz zwiększeniu okrywy glebowej w okresie zimowym.

Jednocześnie w gospodarstwach objętych badaniem odnotowano niski udział upraw roślin silnie degradujących glebę, do których zalicza się rośliny okopowe.

Ograniczenie powierzchni uprawy było konsekwencją zarówno zmieniających się uwarunkowań rynkowych, jak i przeobrażeń organizacyjnych w produkcji zwierzęcej. Wyjątek

stanowiły gospodarstwa drobiarskie, które charakteryzowały się niewielkim udziałem trwałych użytków zielonych oraz uproszczonym zmianowaniem, opartym głównie na uprawie roślin towarowych, co negatywnie wpływało na poziom różnorodności biologicznej.

Tabela 1. Podstawowe informacje o gospodarstwach utrzymujących zwierzęta gospodarskie.

Wyszczególnienie	Średnio razem	Gospodarstwa z bydłem	Gospodarstwa ze świniami	Gospodarstwa z drobiem
Liczba gospodarstw rolnych (szt.)	69	35	26	8
Okres prowadzenia gospodarstwa rolnego (lata)	19,12	18,54	16,72	20,91
Roczna jednostka pracy AWU*	1,94	2,02	1,87	1,76
Użytki rolne (ha)	20,53	29,28	18,47	10,50
Grunty orne (ha)	12,06	8,77	16,99	9,63
Udział trwałych użytków zielonych (%)	39,86	69,53	6,32	4,30
Wskaźnik bioróżnorodności (pkt.)	4,3	4,5	4,6	3,4
Udział zbóż w zasiewach (%)	58,41	57,2	61,52	55,42
Zużycie nawozów azotowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1 ha UR (kg)	71,70	72,50	76,26	63,78
Zużycie nawozów fosforowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1 ha UR (kg)	27,36	32,00	18,33	36,28
Zużycie nawozów potasowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1 ha UR (kg)	34,42	48,00	32,39	29,67
Zużycie nawozów wapniowych w przeliczeniu na czysty składnik na 1 ha UR (kg)	76,96	74,83	75,40	80,13
DJP w gospodarstwie	-	20,84	11,87	25,76
Koszty całkowite produkcji (zł/szt.; zł/100 jaj)	-	6 535,57	8 918,74	45,47

Źródło: badania własne.

*AWU- Annual Work Unit; DJP – duża jednostka przeliczeniowa.

Ocena wpływu badanych gospodarstw na środowisko została przeprowadzona między innymi na podstawie analizy zużycia nawozów mineralnych oraz środków ochrony roślin w przeliczeniu na 1 ha użytków rolnych. We wszystkich analizowanych specjalizacjach zużycie nawozów mineralnych w przeliczeniu na czysty składnik było wyższe od średniej krajowej.

Najwyższe zużycie nawozów azotowych oraz najwyższe koszty nawozów i środków ochrony roślin odnotowano w gospodarstwach utrzymujących świnie, natomiast najniższe – w gospodarstwach drobiarskich.

Stosowane dawki nawozów azotowych wiązały się z potencjalnym wzrostem emisji gazów cieplarnianych, choć średnie zużycie w badanej grupie tylko nieznacznie przekraczało średnią krajową.

We wszystkich gospodarstwach najwyższy udział w strukturze kosztów bezpośrednich stanowiły koszty pasz. Koszty całkowite produkcji wyliczono na poziomie 6 535,57 zł w przeliczeniu na krowę; 8 918,74 zł w przeliczeniu na lochę oraz 45,47 zł na 100 jaj (Tabela 1.).

Relacja pomiędzy poziomem obciążeń środowiskowych a wartością produkcji była wyraźnie zróżnicowana w zależności od kierunku produkcji zwierzęcej (Tabela 2.). Najbardziej zrównoważoną relacją charakteryzowały się gospodarstwa utrzymujące bydło, co wynikało z większego udziału trwałych użytków zielonych oraz niższej koncentracji obsady zwierząt.

Gospodarstwa utrzymujące świnie i drób cechowały się wyższym poziomem obciążeń środowiskowych w relacji do wartości produkcji, przy czym w gospodarstwach drobiarskich kluczowe znaczenie miały koszty energii elektrycznej i zużycia wody.

Tabela 2. Relacja obciążeń środowiskowych do wartości produkcji w gospodarstwach utrzymujących bydło, świnie i drób.

Kierunek produkcji	Udział wartości produkcji w przychodach (%)	Dominujące obciążenia środowiskowe	Charakter relacji obciążeń środowiskowych do wartości produkcji
Bydło	69,6	paliwa, nawozy mineralne	Relatywnie zrównoważona relacja dzięki większemu udziałowi TUZ i niższej koncentracji obsady
Świnie	79,5	nawozy mineralne, paliwa	Wysoki poziom obciążeń środowiskowych w relacji do wartości produkcji
Drób	88,3	energia elektryczna, woda	Bardzo wysoki poziom obciążeń środowiskowych przy dużej koncentracji produkcji

Źródło: badania własne.

Struktura kosztów produkcji wskazała, że największy udział w kosztach bezpośrednich we wszystkich analizowanych gospodarstwach stanowiły koszty pasz, natomiast w strukturze kosztów środowiskowych dominowały koszty paliw oraz energii.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że wzrost intensywności produkcji zwierzęcej, prowadzący do zwiększenia wartości produkcji, wiąże się jednocześnie ze wzrostem presji na środowisko naturalne, przy czym skala tej zależności jest silnie uzależniona od kierunku produkcji oraz organizacji gospodarstwa rolnego.

Zadanie 01-17-09-11

Ocena efektywności metod mitygacji GHG w pastwiskowym utrzymaniu małych przeżuwaczy.

kierownik zadania: dr Wojciech Krawczyk

Cel realizowanego etapu badań stanowiła ocena mitygacji gazów cieplarnianych (GHG), zwłaszcza emisji metanu z fermentacji żwaczowej w systemie zróżnicowanego terminu pastwiskowania. Doświadczenie przeprowadzono na 80 maciorkach rasy suffolk i owcy pomorskiej ogółem, przy równym udziale zwierząt każdej z ras. Zostały one wybrane na zasadzie analogów – zbliżony wiek (2. lub ew. 3. laktacja), masa ciała i kondycja.

Przez okres trwania etapu doświadczenia zwierzęta pierwszej grupy – alkierzowej (A; 10 sztuk suffolk, 10 sztuk owcy pomorskiej) – przebywały całodobowo w owczarni, z dostępem do okólnika. Żywienie opierało się na paszach objętościowych konserwowanych oraz mieszance treściwej, bez suplementacji zielonką pastwiskową, zgodnie ze standardami wynikającymi z aktualnych norm żywienia IZ-INRA. Zwierzęta pozostałych trzech grup pastwiskowych, równych pod względem liczebności i składu rasowego (każda z grup P1, P2 i P3: 10 sztuk suffolk, 10 sztuk owcy pomorskiej), w miesiącach kwiecień–październik (180–200 dni) przebywały przez 10–12 godzin dziennie na pastwiskach o dominującym udziale runi życicowej, w systemie wypasu kwatrowego, 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 przebywały w budynku owczarni.

Introdukcja zwierząt na pastwiska przebiegała w trzech różnych terminach: Grupa P2 – w terminie klasycznym, gdy wysokość porostu osiągnęła 10-12 cm, co miało miejsce na przełomie miesiąca kwietnia i maja; Grupa P1 – w terminie wcześniejszym: 2 tygodnie przed terminem klasycznym; Grupa P3 – w terminie opóźnionym: 2 tygodnie po terminie klasycznym. Stacjonarna instalacja doświadczalna w budynku owczarni składała się z trzech kompletów 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 Testosterm, mod. Testo 9610.

Pomiar emisji gazowych GHG i amoniaku, w tym najważniejszego z nich u przeżuwaczy: metanu, zrealizowano z wykorzystaniem analizatora Lumasense Technologies A/S INNOVA 1512-5 wraz z wielokanałowym modułem poboru próbek INNOVA 1409-06, Gasmet GT5000 Terra oraz aparatury Tiger Optics i-2000. Stężenie gazów towarzyszących określono z wykorzystaniem elektronicznego miernika gazów Multiwarn II firmy Dräger, Gasmet GT5000 Terra oraz Horiba APNA-370.

Wyniki przeprowadzonych 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 owczarni, wyniosło 1-5 ppm (najwyższe wartości występujące sporadycznie), nie wykazując równocześnie jakiegokolwiek zaznaczonej tendencji. W obiektach pastwiskowych w większości pomiarów nie stwierdzono jego obecności, a najwyższa zmierzona wartość wyniosła 1 ppm. Wartości NO_x zmierzone na pastwisku (około 1 ppb) były kilkakrotnie niższe od ustalonych w owczarni, gdzie uzyskiwały najwyższy poziom 8,4 ppb, przy czym udział NO był zazwyczaj, co najmniej 2-3-krotnie wyższy od stężenia NO₂. Pomiaru 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 na pastwisku, jak i w alkierzu dokonywano w przepędach, gdzie zwierzęta były unieruchomione na czas dokonywania pomiarów. Każda seria pomiarów realizowana była w interwałach 2-godzinnych, tak aby zarejestrować całodobowy, zmienny przebieg emisji gazu.

W rejonie lokalizacji bazy doświadczalnej miała miejsce długotrwała susza. Niedobór opadów przy równoczesnej intensywnej insolacji spowodował, że pomimo poprawnego wzrostu masy zielonej pastwisk na początku sezonu kwiecień/maj, poczynając od czerwca roślinność przestała wykazywać oznaki wegetacji i dalszego rozwoju, jaki to stan miał miejsce do późnego lata. Pozostały zdrewniały materiał roślinny nawet w niewielkim udziale nie mógł pokryć zapotrzebowania żywieniowego pastwiskowych grup doświadczalnych. Okoliczności te uniemożliwiły realizację etapu doświadczenia w zakładanym zakresie. Uzyskane podczas sezonu pastwiskowego wyniki wskazują na duże zróżnicowanie emisji metanu pomiędzy grupami przebywającymi na pastwisku i otrzymującymi zielonkę a zwierzętami utrzymywanymi alkierzowo (Tabela 1.).

Tabela 1. Emisja metanu od owiec podczas okresu pastwiskowego (kg/szt./2 mies.).

Okres (mies.)	Wariant					
	Pastw. 1 2025 r.	Pastw. 2 2025 r.	Pastw. 3 2025 r.	Pastw. 2024 r.	Alkierz 2025 r.	Alkierz 2024 r.
IV/V-VI	3,8	4,0	4,0	3,9	3,1	3,2
VII-VIII	4,6	4,5	4,5	4,3	3,0	2,9
IX-X	4,8	4,6	4,7	4,6	3,2	3,0

Najniższą, a tym samym najbardziej korzystną wartość CH₄ uzyskano w grupie wcześniej introdukowanej na pastwisko (P1, okres: IV/V), co być może miało związek z walorem mitygacyjnym pobieranej przez zwierzęta młodej filogenetycznie zielonki. Niestety, powyżej opisane okoliczności uniemożliwiły weryfikację tezy w ujęciu poszczególnych okresów spasanania, jak i pełnego sezonu

wegetacyjnego. Podczas upływu sezonu pastwiskowego dystans pomiędzy wolumenem emisji na pastwisku i w alkierzu ulegał stopniowej eskalacji. Gdy emisja żwaczowa grupy A wykazywała względną stabilność w tej cesze (podobnie jak miało to miejsce w ubiegłym roku), 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, przez co cały proces trawienia uległ również znaczącemu wydłużeniu. Utrata pewnej ilości wody w skoszzonej a następnie transportowanej do skarmienia zielonce mogła ponadto przyczynić się do pewnego wzrostu emisji, zwłaszcza porównując analogiczne wyniki pastwiskowe z roku sprawozdawczego i ubiegłego. 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 grupach spásających zielonkę pastwiskową (Tabela 2.).

Tabela 2. Całkowita emisja metanu podczas okresu pastwiskowania owiec (kg/szt./6 mies.).

Cecha	Wariant					
	Pastw. 1 2025 r.	Pastw. 2 2025 r.	Pastw. 3 2025 r.	Pastw. 2024 r.	Alkierz 2025 r.	Alkierz 2024 r.
Całkowita emisja	13,2	13,1	13,2	12,8	9,3	9,1
Względna zmiana emisji metanu (%)	+41,93	+40,86	+41,93	+37,63	0	-2,15

Wartość całkowitej 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.

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

Cecha	Wariant					
	Pastw. 1 2025 r.	Pastw. 2 2025 r.	Pastw. 3 2025 r.	Pastw. 2024 r.	Alkierz 2025 r.	Alkierz 2024 r.
Całkowita emisja	22,5	22,4	22,5	21,9	18,6	18,2
Względna zmiana emisji metanu (%)	+20,97	+20,43	+20,97	+17,74	0	-2,15

Roczna emisja metanu jest powszechnie uznawana za podstawowy wskaźnik wykorzystywany w kontekście szacunków uciążliwości produkcji rolniczej dla środowiska oraz przy realizacji celów redukcyjnych. Wyniki uzyskane w tej cesze są zbieżne z pozyskanymi w – decydującym o kontekście czterocznej emisji – okresie wypasu (Tabela 2.).

W grupie alkierzowej wyniosły 18,6 kg NH₄ na sztukę, natomiast zwierzęta żywione pastwiskowo w ujęciu rocznym emitowały do atmosfery o ponad 20% większą ilość tego gazu (Tabela 3.).

Zadanie 01-17-10-11

Stan i przebieg procesów recesywnych w produkcji zwierzęcej jako miara peryferyzacji wybranych gmin różnych regionów FADN w Polsce.

kierownik zadania: dr Kamila Musiał

Głównym celem zadania badawczego było zdiagnozowanie i ocena stanu zaawansowania procesów recesywnych w obszarach wiejskich, dotyczących produkcji zwierzęcej i roślinnej w różnych regionach Polski. Tak ujmowane trendy wsteczne dla rolnictwa obrazowane są poprzez natężenie zjawisk dezanimalizacji i dezagraryzacji, które jednocześnie często stanowią także miarę stopnia peryferyzacji rolniczej wybranych gmin. Porzucanie ziemi przez rolników nie jest procesem nieznanym, ani też nowym. Może ono wynikać bezpośrednio z uwarunkowań przyrodniczych, jak również mieć podłoże ekonomiczne, rodzinne lub organizacyjne. W tym ostatnim przypadku może być to m.in. następstwem nadmiernego rozdrobnienia ziemi oraz większego oddalenia poszczególnych działek rolnych od siedziby gospodarstwa. Może także wynikać ze słabej jakości gleb, na których znajdują się użytki rolne oraz z niekorzystnego ukształtowania terenu.

Analizy prowadzone były w gminach położonych w obrębie sześciu parków krajobrazowych lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie, znajdujących się na obszarze trzech województw wybranych do analiz na podstawie regionalizacji produkcyjno-ekonomicznej FADN: województwo pomorskie (według FADN – region Pomorze i Mazury), województwo kujawsko-pomorskie (według FADN – Wielkopolska i Śląsk) oraz województwo lubelskie (wg FADN – Mazowsze i Podlasie). Parki krajobrazowe objęte badaniami, to w kolejności: Szczebrzeszyński PK oraz Kazimierski PK (województwo lubelskie), Nadgoplański Park Tysiąclecia i Krajeński PK (województwo kujawsko-pomorskie) oraz Kaszubski PK i Park Krajobrazowy Dolina Słupi (województwo pomorskie). W celu przeprowadzenia w terenie analiz utworzono odpowiednie dla potrzeb badań formularze ankiet o charakterze eksperckim.

Pierwszy etap badań obejmował wykonanie 144 ankieto-wywiadów, mających na celu zdiagnozowanie wybranych aspektów stanu organizacji rolnictwa i gospodarstw. Szczególną uwagę skupiono na tych cechach ilościowych i jakościowych, które bezpośrednio lub pośrednio wiążą się z dezagraryzacją, a stąd także z peryferyzacją rolnictwa. Jest to o tyle istotne, że rolnictwo w różnych obszarach chronionych, w tym także w obrębie parków krajobrazowych, realizuje ważne funkcje w przestrzeni danych gmin, w tym również związane ze świadczeniem usług ekosystemowych.

Dobrani do badań respondenci to rolnicy, którzy posiadali relatywnie większe aniżeli średnia dla ocenianych regionów gospodarstwa rolne (od 15,8 do 61,11 ha). Prowadzili oni produkcję roślinną i zwierzęcą w tym w zakresie utrzymania bydła lub świń – w znacznie mniejszym stopniu także owiec oraz deklarowali chęć powiększenia skali produkcji, często korzystając również z dzierżawy ziemi. Spośród sześciu ocenianych parków krajobrazowych, tego typu obszary w obrębie województwa lubelskiego cechowały się widocznymi problemami wynikającymi z częstego porzucania rolniczego użytkowania. Było to odpowiednio 9,4% wskazań dla Kazimierskiego PK oraz 25% dla Szczebrzeszyńskiego PK. W pozostałych parkach krajobrazowych zlokalizowanych w województwach kujawsko-pomorskim oraz pomorskim, problem ten miał jednak charakter nieznaczny lub wręcz incydentalny. W najmniejszym stopniu dotyczył on Nadgoplańskiego Parku Tysiąclecia. Porzucanie ziemi rolniczej i wiążące się z nim niezбиieranie masy roślinnej, powtarzające się w co najmniej kilku postępujących po sobie okresach wegetacyjnych dotyczyło w większym stopniu trwałych użytków zielonych niż gruntów ornych. Proces taki można było odnieść w głównej mierze do gmin znajdujących się w obrębie Szczebrzeszyńskiego PK, gdzie stwierdzono średnio 23,3% porzuconych TUZ oraz Kazimierskiego PK – odpowiednio 19,8%. Na obszarze wymienionych powyżej parków również najbardziej nasilone były wieloaspektowe problemy produkcyjne i ekonomiczne, obrazowane np. poprzez "koszenie łąk

jedynie w celu otrzymania dotacji" – 24,4% dla Szczepreszyńskiego PK oraz 30,8% dla Kazimierskiego PK. Dotyczyło to również GO, które są porzucane lub też uprawiane w sposób bardzo ekstensywny – odpowiednio 17,1% oraz 17,4% wskazań respondentów. Cenny ze względów przyrodniczych pastwiskowy system utrzymania letniego przeżuwaczy, został określony jako „często praktykowany” w następujących parkach: PK Dolina Słupi, Kaszubskim PK oraz Szczepreszyńskim PK. W pozostałych parkach krajobrazowych stosowany był on „rzadko” lub wcale nie występował. Najmniej korzystne wyniki w tym zakresie uzyskano dla obszaru Kazimierskiego PK. Gospodarstwa zlokalizowane w badanym obszarze mają zróżnicowany udział w zakresie ich stanu i przewidywanych perspektyw rozwoju. Najwyższy udział gospodarstw nierozwojowych i schyłkowych odnotowano dla Szczepreszyńskiego PK (54% wskazań) oraz dla Nadgoplańskiego Parku Tysiąclecia (47,8% wskazań). Z kolei najwięcej gospodarstw rozwojowych znajdowało się w Kazimierskim PK (32%) oraz Kaszubskim PK (30,8). Udział gospodarstw utrzymujących bydło był najwyższy w obszarze Krajeńskiego PK (25,7%) oraz Kaszubskiego PK (21%). Z kolei najniższy udział bydła stwierdzono średnio dla gospodarstw położonych w obrębie Kazimierskiego PK (4,5%) oraz Szczepreszyńskiego PK (8,7%). Średnio najwięcej gospodarstw zajmujących się chowem świń stwierdzono dla Nadgoplańskiego Parku Tysiąclecia oraz dla Krajeńskiego Parku Krajobrazowego, kolejno 11,7% oraz 10,1%, jednak nawet tam gdzie chów świń był stosunkowo dobrze rozwinięty, obejmował on zaledwie średnio 1 na 10 gospodarstw. W przypadku owiec wartości te były jeszcze niższe, jako że w Krajeńskim Parku Krajobrazowym zwierzęta te były utrzymywane w ok. 2,4% gospodarstw.

Zadanie 01-17-11-11

Ocena oddziaływania produkcji zwierzęcej na środowisko naturalne – metody mitygacji i efekt ekonomiczno-społeczny.

kierownik zadania: dr inż. Elżbieta Sowula-Skrzyńska

Celem badawczym zadania jest weryfikacja skuteczności działań ograniczających negatywne oddziaływanie produkcji zwierzęcej na środowisko naturalne, w szczególności w odniesieniu do gospodarstw rodzinnych oraz przedsiębiorstw rolnych utrzymujących bydło i świnię.

W ramach badań planowana jest szczegółowa analiza ilościowa i jakościowa nakładów finansowych oraz określenie ich wpływu na redukcję emisji zanieczyszczeń i poprawę stanu środowiska.

Etap za ten rok obejmował trzy kluczowe działania:

1. opracowanie założeń metodycznych i konstrukcji kwestionariuszy badawczych,
2. wykonanie badań pilotażowych w co najmniej trzydziestu gospodarstwach mlecznych, w celu oceny trafności doboru metody badawczej,
3. identyfikację praktyk mitygacyjnych podejmowanych w gospodarstwach w odpowiedzi na presję środowiskową produkcji zwierzęcej.

Opracowano kwestionariusze ankiety, których zadaniem było gromadzenie danych umożliwiających ocenę wpływu produkcji zwierzęcej na elementy kapitału naturalnego oraz analizę relacji między gospodarstwem a środowiskiem. Kwestionariusz obejmował szeroki zakres informacji, m.in. o: obsadzie zwierząt, strukturze i powierzchni gruntów, uprawach i plonach, towarowości produkcji, przychodach, bilansie substancji organicznej, zużyciu energii i paliw, zużyciu wody, nawożeniu mineralnym i naturalnym, nakładach finansowych na środki produkcji oraz kosztach działań prośrodowiskowych.

Współczesna intensyfikacja produkcji zwierzęcej (szczególnie w sektorze bydła i trzody) stanowi istotne wyzwanie środowiskowe. Zjawisku temu towarzyszy nie tylko wzrost emisji zanieczyszczeń, ale również konflikty społeczne, spadek opłacalności, likwidacja gospodarstw małych

i średnich oraz pogorszenie warunków życia w sąsiedztwie ferm przemysłowych. Do kluczowych problemów środowiskowych należą emisje metanu i amoniaku, straty azotu oraz niewłaściwa gospodarka odchodami zwierzęcymi, co prowadzi do degradacji gleb i zanieczyszczenia wód powierzchniowych i podziemnych. Wobec tych wyzwań rośnie potrzeba wdrażania rozwiązań, które pozwolą ograniczyć presję środowiskową przy zachowaniu rentowności gospodarstw.

Analiza wyników badań pilotażowych wskazuje, że próba badawcza obejmuje gospodarstwa o znacznym zróżnicowaniu skali produkcji. Średnia liczba krów mlecznych wynosiła ok. 40 sztuk, a bydła ogółem ok. 81 sztuk, przy czym wartości maksymalne sięgały odpowiednio 95 krów i 204 sztuk bydła, co świadczy o dużym zróżnicowaniu organizacyjnym. Przeciętna wydajność mleczna (ok. 8 833 l/krowę/rok) wskazuje na obecność obiektów o wyższej intensywności technologicznej. Z punktu widzenia środowiskowego intensywność może wpływać dwójako – z jednej strony zmniejszać emisję w przeliczeniu na litr mleka, z drugiej zwiększać presję środowiskową poprzez wzrost koncentracji zwierząt, zużycia energii i pasz oraz ryzyko nadwyżek nawozowych. Średni czas użytkowania krów (ok. 5 lat) jest wskaźnikiem korzystnym, ponieważ dłuższe użytkowanie ogranicza środowiskowy koszt remontu stada i może sprzyjać redukcji emisji w przeliczeniu na produkt.

Istotne informacje dotyczą także profilu społeczno-ekonomicznego gospodarstw – średni wiek właścicieli wynosił 43,8 roku, a dominowało wykształcenie średnie i zawodowe. Może to oznaczać, że wdrażanie innowacji środowiskowych będzie zależne przede wszystkim od dostępności doradztwa, dofinansowania oraz prostoty wdrożenia działań, a nie wyłącznie od świadomości ekologicznej. Struktura użytkowania ziemi była typowa dla gospodarstw mlecznych – średnio ok. 39 ha, w tym ok. 23 ha gruntów ornych oraz ok. 12 ha trwałych użytków zielonych, które odgrywają ważną rolę środowiskową, m.in. poprzez ograniczanie erozji, poprawę retencji i stabilizację węgla glebowego.

Ocena wdrażanych działań mitygacyjnych pokazuje, że gospodarstwa najczęściej stosują praktyki organizacyjne i agrotechniczne, które nie wymagają wysokich nakładów inwestycyjnych. Przykładowo, wszystkie gospodarstwa dzielą dawki nawozów azotowych na kilka aplikacji, co ogranicza straty azotu i zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia wód. Jednocześnie tylko 60% wykonuje regularne analizy gleby, co może prowadzić do niewłaściwego planowania nawożenia i wzrostu nadwyżek azotu oraz emisji N_2O . W zakresie stosowania inhibitorów odnotowano wyraźną asymetrię: częściej stosowane były inhibitory ureazy (ok. 47%), natomiast inhibitory nityfikacji występowały marginalnie (ok. 3%). Wynik ten wskazuje, że rolnicy preferują rozwiązania prostsze i bardziej dostępne, natomiast rzadziej sięgają po technologie wymagające większej wiedzy i ponoszenia kosztów.

Wysokie odsetki dotyczyły również działań związanych z nawozami naturalnymi: większość gospodarstw wykonuje szybkie przyoranie obornika (ok. 87%), co zmniejsza straty amoniaku i poprawia efektywność nawożenia. Znaczenie mają także międzyplony (ok. 77%) oraz rośliny motylkowate w płodozmianie (ok. 57%), które wspierają retencję składników i poprawę struktury gleby. Zaskakująco niski był udział pozostawiania resztek poźniwnych na polu (ok. 10%), co może w dłuższym okresie osłabiać bilans materii organicznej gleb. Ponadto w strukturze upraw dominowała orka tradycyjna, natomiast systemy bezorkowe pozostają nadal rzadkie.

W obszarze infrastruktury do przechowywania nawozów naturalnych gospodarstwa najczęściej wdrażają podstawowe rozwiązania: przykrywanie zbiorników na gnojowicę oraz posiadanie uszczelnionych płyt obornikowych. Jednocześnie zaawansowane technologie (np. zakwaszanie, separacja gnojowicy, kompostowanie kontrolowane) pojawiają się sporadycznie lub wcale, co wskazuje na ograniczenia inwestycyjne, techniczne i organizacyjne. Pozytywnym sygnałem jest rosnące znaczenie planowania nawożenia oraz dzielenia dawek nawozów naturalnych, co świadczy o przechodzeniu od podejścia „pozbywania się nawozu” do podejścia opartego na zarządzaniu składnikiem.

W zakresie działań dotyczących samych zwierząt i budynków inwentarskich dominowało regularne usuwanie i higienizacja odchodów, a wielu rolników wskazywało poprawę dobrostanu i zdrowotności jako istotny element strategii mitygacyjnej. Wydłużanie okresu użytkowania krów oraz poprawa efektywności biologicznej stada sprzyjają ograniczeniu emisji w przeliczeniu na jednostkę produktu. Stosunkowo wysoki był także udział dodatków paszowych redukujących metan, co wskazuje na otwartość gospodarstw na rozwiązania żywieniowe. Zbilansowane żywienie białkiem ma jednocześnie znaczenie środowiskowe i ekonomiczne, zmniejszając emisje i obniżając koszty pasz. Natomiast działania wymagające modernizacji budynków (np. wentylacja, filtracja powietrza) były mniej popularne, co może wynikać z kosztów i trudności wdrożenia w istniejących obiektach.

Analiza działań związanych z energią i organizacją pracy wskazuje, że gospodarstwa wciąż są zależne od paliw kopalnych, jednak wiele z nich podejmuje modernizacje energetyczne (wymiana źródeł ciepła, modernizacja instalacji, energooszczędne systemy chłodzenia i wentylacji). Jednocześnie wykorzystanie odnawialnych źródeł energii pozostaje ograniczone, a monitoring zużycia energii i paliw występuje sporadycznie, mimo że może stanowić istotny element zarządzania efektywnością i dalszej redukcji emisji.

Tabela 1. Identyfikacja działań skierowanych na redukcję niekorzystnych oddziaływań produkcji rolnej na środowisko w badanych gospodarstwach.

Metody ograniczania emisji GHG i innych zanieczyszczeń realizowane w gospodarstwach		Udział %
Praktyki ograniczania emisji GHG i NH ₃ z gleby	Optymalizacja nawożenia azotowego - podział dawek nawozów azotowych na kilka aplikacji w sezonie	100,00
	Termin i technika aplikacji nawozów – unikanie nawożenia na glebę zamarznąłą lub zalaną	93,33
	System uprawy – orka tradycyjna	90,00
	pH gleby i wapnowanie – regularne wapnowanie gleby	90,00
	Termin i technika aplikacji nawozów – stosowanie szybkiego przyorania obornika po rozrzuconiu	86,67
	Zarządzanie wodą glebową – zabiegi poprawiające drenaż i strukturę gleby (np.: melioracje, głęboszowanie)	86,67
	Płodozmian i dobór roślin – stosowanie międzyplonów/roślin okrywowych	76,67
	Optymalizacja nawożenia azotowego – regularne analizy gleby w celu ustalenia dawek nawozów	60,00
	Płodozmian i dobór roślin – uwzględnianie w płodozmianie roślin motylkowatych (wiązanie azotu)	56,67
	Stosowanie inhibitorów – inhibitory ureazy (przy nawożeniu mocznikiem)	46,67
	Termin i technika aplikacji nawozów – aplikacja gnojowicy/gnojówki doglebowo	46,67
	Poprawa żyzności gleby i próchnicy – stosowanie nawozów organicznych (kompost, obornik przetworzony)	40,00
	System uprawy – uproszczona (strip-till, mulczowa)	30,00
	Poprawa żyzności gleby i próchnicy – pozostawianie resztek poźniwnych na polu	10,00
	Stosowanie inhibitorów – inhibitory nitryfikacji	3,33
System uprawy – bezorkowa (no-fill)	3,33	
Praktyki ograniczania emisji GHG i NH ₃ z nawozów naturalnych	Przykrywanie zbiorników na gnojowicę	80,00
	Czy płyta obornikowa jest uszczelniona i posiada system odprowadzania odcieków?	80,00
	Czy dostosowujesz dawki nawozów naturalnych do potrzeb roślin na podstawie planu nawozowego?	73,33
	Czy dzielisz dawki nawozów naturalnych na kilka aplikacji zamiast stosować jednorazowo dużą ilość?	73,33
	Składowanie przyz obornika na polu z uwzględnieniem ochrony przed opadami	60,00
	Przykrywanie przyz obornika	36,67
	Napowietrzanie gnojowicy (systemy mieszania, aeracja) w zbiornikach	23,33
	Dodatek naturalnych środków do gnojowicy (np. biofiltry, preparaty mikrobiologiczne)	6,67
	Napowietrzanie i kontrolowane kompostowanie obornika (system przyz napowietrzanych)	3,33

Praktyki ograniczania emisji GHG i NH ₃ z produkcji zwierzęcej	Regularne usuwanie i higienizacja odchodów w budynkach (np. częstsze czyszczenie kanałów, maty)	86,67
	Poprawa zdrowotności i dobrostanu zwierząt (mniej brakowań, lepsze przyrosty)	70,00
	Stosowanie dodatków paszowych redukujących metan (np. 3-NOP, algi, taniny, drożdże)	50,00
	Zbilansowane żywienie białkiem (dopasowanie zawartości N w dawce, obniżenie surowego białka)	46,67
	Wydłużenie okresu użytkowania krów (więcej laktacji, dłuższa produkcja)	43,33
	Dobór ras i linii genetycznych o wyższej wydajności (mniej emisji na jednostkę produktu)	30,00
	Stosowanie systemów wentylacji i filtracji powietrza (np. biofiltry, płuczki powietrza)	30,00
	Zmniejszenie otwartej powierzchni z gnojownicą w budynku (np. szybki spływ odchodów)	23,33
Inne działania ograniczające emisję GHG i NH ₃	Zużycie paliw kopalnych w gospodarstwie (diesel, benzyna, autogaz)	100,00
	Wymiana źródeł ciepła na mniej emisyjne (zamiast węgla – pellet, gaz, OZE, pompy ciepła)	90,00
	Stosowanie energooszczędnych systemów chłodzenia i wentylacji (odzysk ciepła, inteligentne sterowanie)	80,00
	Modernizacja instalacji elektrycznych i oświetlenia (np. LED, czujniki ruchu, automatyka)	76,67
	Stosowanie odnawialnych źródeł energii w gospodarstwie	26,67
	Stosowanie energooszczędnych maszyn i urządzeń rolniczych (ciągniki, dojarki, chłodnie)	20,00
	Monitorowanie i rejestr zużycia energii/paliw w gospodarstwie	6,67
	Optymalizacja logistyki w gospodarstwie (tączenie transportów, współpraca z sąsiadami)	3,33

Podsumowując, rozpoczęte badania potwierdzają, że gospodarstwa mleczne wdrażają liczne metody ograniczania negatywnego wpływu produkcji zwierzęcej na środowisko, przy czym dominują działania niskokosztowe, łatwe do zastosowania i dające szybkie efekty organizacyjne. Jednocześnie widoczne są bariery we wdrażaniu technologii zaawansowanych, co wskazuje na potrzebę wsparcia finansowego, doradczego oraz demonstracyjnego. Szczególnie istotne jest, że wiele działań prośrodowiskowych przynosi równocześnie korzyści ekonomiczne (lepsze wykorzystanie azotu, redukcja strat składników i niższe koszty energii), co zwiększa szanse na ich trwałe wdrożenie i społeczną akceptację kierunków transformacji rolnictwa.

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

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 zidentyfikowanie genetycznych uwarunkowań mięsności gęsi, ze szczególnym uwzględnieniem polimorfizmów genów związanych z rozwojem tkanki mięśniowej oraz metabolizmem kwasów tłuszczowych, a także określenie ich tkankowo specyficznej ekspresji. Badania obejmowały porównanie trzech ras gęsi: pomorskiej (POM), białej kołudzkiej® (KOL) oraz landes (L), utrzymywanych w ujednoczonych warunkach chowu owsianego.

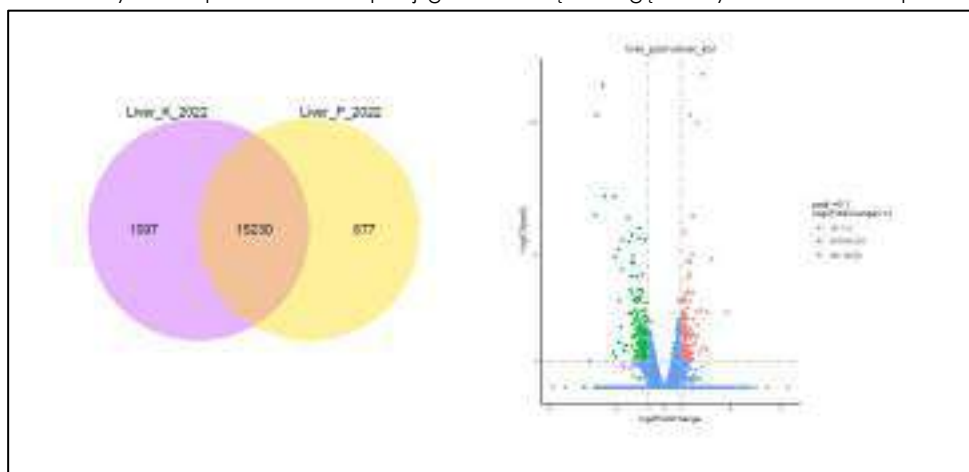
Przeprowadzono szczegółową analizę rzeźną, ocenę jakości mięsa, analizę profilu kwasów tłuszczowych oraz badania molekularne z wykorzystaniem technik RNA-seq i qPCR. Wykazano istotny wpływ rasy na masę ciała, masę tuszki oraz wydajność rzeźną. Gęsi białe kołudzkie® charakteryzowały się najwyższą masą ciała i wydajnością rzeźną, natomiast gęsi pomorskie niższymi parametrami produkcyjnymi. Rasa landes zajmowała pozycję pośrednią.

Analiza jakości mięsa wykazała ograniczoną liczbę różnic istotnych statystycznie, głównie w zakresie barwy mięśni oraz parametrów tekstury. Profil kwasów tłuszczowych wskazał na różnice między rasami, szczególnie w udziale frakcji SFA, MUFA i PUFA, co potwierdza wpływ tkanki genetycznego na metabolizm lipidów.

Analiza transkryptomyczna ujawniła wyraźne różnice w ekspresji genów w wątrobie i mięśni piersiowym pomiędzy rasami. U gęsi białej kołudzkiej® dominowały geny związane z lipogenezą i anabolizmem lipidów (m.in. FASN, SCD, ME1), natomiast u gęsi pomorskich i landes obserwowano aktywację szlaków związanych z oksydacją lipidów, odpowiedzią przeciwzapalną oraz funkcją mitochondrialną. W mięśni piersiowym gęsi pomorskich i landes utrzymywała się wysoka aktywność genów związanych z proliferacją i remodelowaniem tkanki, podczas gdy u gęsi białej kołudzkiej® wcześniej aktywowane były szlaki metaboliczne związane z odkładaniem tłuszczu. Przykładowo, w analizie między gęsią pomorską a kołudzką uzyskano 1 974 geny o zróżnicowanej ekspresji (DEGs). Następnie DEGs analizowano pomiędzy dwiema grupami, określając liczbę genów wspólnych oraz specyficznych dla każdej z grup (ras); 1 097 DEGs było unikatowych dla rasy białej kołudzkiej®, a 877 DEGs dla rasy pomorskiej.

Rycina 1.a (Venn) i 1. b. (Volcano plot).

Przykładowe wyniki dla porównania ekspresji genów w wątrobie gęsi białych kołudzkich® i pomorskich.



Uzyskane wyniki potwierdzają silne genetyczne podłoże różnic w mięsności i metabolizmie lipidów pomiędzy rasami gęsi oraz wskazują na możliwość wykorzystania zidentyfikowanych markerów genetycznych w selekcji hodowlanej i programach ochrony zasobów genetycznych.

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

Cele zadania

1. Opracowanie, walidacja i wdrożenie metod molekularnych opartych na PCR do identyfikacji pszczoły miodnej (*Apis mellifera*).
2. Różnicowanie wybranych podgatunków pszczoły miodnej występujących w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem *Apis mellifera carnica* oraz linii Dobra.
3. Opracowanie narzędzi do potwierdzania autentyczności miodów naturalnych i wykrywania ich śladowych ilości w produktach spożywczych, w tym deklarowanych jako wegańskie.
4. Wsparcie ochrony produktów regionalnych oraz działań kontrolnych związanych z przeciwdziałaniem zafałszowaniom.

Założenia metodyczne

Badania zaplanowano jako kompleksową analizę molekularną obejmującą zarówno materiał biologiczny pochodzący bezpośrednio od pszczół, jak i produkty spożywcze zawierające lub potencjalnie zawierające miód. Podstawą identyfikacji genetycznej było mitochondrialne DNA, charakteryzujące się wysoką stabilnością, dużą liczbą kopii w komórce oraz przydatnością do analiz materiału zdegradowanego i silnie przetworzonego. Analizy pszczół oparto na amplifikacji fragmentu mtDNA obejmującego region COI-COII, uznawanego za marker informacyjny w badaniach filogenetycznych i haplotypowych *Apis mellifera*.

Identyfikację podgatunków prowadzono z wykorzystaniem:

- sekwencjonowania Sangera i analizy porównawczej z sekwencjami referencyjnymi (BLAST),
- analizy restrykcyjnej (RFLP) enzymem DraI jako metody szybkiej i niskokosztowej,
- testów PCR z primerami celowanymi w wybrane podgatunki, jako podejścia przesiewowego.

W analizach miodów i produktów spożywczych zastosowano zarówno klasyczną reakcję PCR, jak i real-time PCR z barwnikiem SYBR® Green, umożliwiającą ocenę ilościową oraz analizę krzywych topnienia.

Kluczowym elementem metodyki była optymalizacja procedur izolacji DNA z trudnych matryc (miód, produkty przetworzone), w tym eliminacja inhibitorów reakcji PCR.

Walidację metod przeprowadzono z wykorzystaniem próbek referencyjnych, rozcieńczeń oraz materiałów fortyfikowanych miodem, co umożliwiło określenie specyficzności, powtarzalności i granicy wykrywalności.

Syntetyczny opis wyników zadania

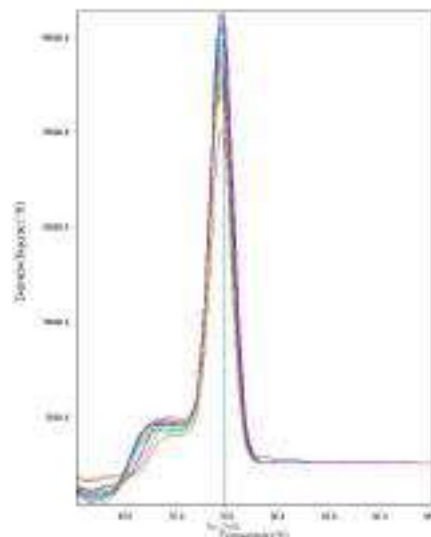
Analiza pszczół

Sekwencjonowanie fragmentów mtDNA pozwoliło na identyfikację licznych haplotypów i wykazało znaczną zmienność genetyczną pszczół występujących w Polsce. W populacjach typu buckfast dominował haplotyp C1, świadczący o wysokiej jednorodności genetycznej, natomiast w populacjach lokalnych stwierdzono obecność wielu haplotypów charakterystycznych dla różnych podgatunków (*A. m. carnica*, *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*). W niektórych przypadkach wykazano rozbieżności pomiędzy deklarowanym a rzeczywistym podgatunkiem pszczół, co potwierdza powszechne mieszanie linii hodowlanych w kraju. Analiza RFLP enzymem DraI była zgodna z wynikami sekwencjonowania i pozwalała na szybkie różnicowanie haplotypów, jednak nie zawsze umożliwiała jednoznaczne przypisanie podgatunku. Testy PCR z primerami specyficznymi dla wybranych podgatunków charakteryzowały się ograniczoną skutecznością, co wynikało z niedopasowania sekwencji referencyjnych do lokalnych populacji pszczół. Podjęto próbę pozyskania długich fragmentów mitochondrialnego DNA pszczoły kraińskiej linii Dobra z wykorzystaniem sekwencjonowania nanoporowego; skuteczna amplifikacja fragmentów referencyjnych potwierdziła poprawność projektu startów, natomiast dalsze analizy są w toku.

Analiza miodów i produktów spożywczych

Opracowana procedura izolacji DNA z miodu zapewniała wysoką jakość materiału genetycznego, umożliwiając skuteczną amplifikację nawet w próbkach o niskiej zawartości DNA. Metoda real-time PCR pozwoliła na jednoznaczną identyfikację miodu naturalnego na podstawie charakterystycznej temperatury topnienia produktu PCR, stabilnej i wyraźnie odróżnialnej od próbek negatywnych (Wykres 1.). Analiza krzywych topnienia wykazała bardzo wysoką zdolność dyskryminacyjną metody, niezależną od stopnia rozcieńczenia próbek oraz obecności inhibitorów. Klasyczna reakcja PCR potwierdziła obecność miodu w próbkach fortyfikowanych oraz naturalnych, z granicą wykrywalności na poziomie 0,1%. W żadnej z analizowanych próbek komercyjnych produktów wegańskich nie stwierdzono obecności miodu, co potwierdziło zgodność deklaracji producentów z rzeczywistym składem produktów. Metoda umożliwiała również rozróżnienie miodów naturalnych od ich sztucznych zamienników oraz ocenę próbek mieszanych.

Wykres 1. Krzywa topnienia dla miodów naturalnych.



Zrealizowane zadanie potwierdziło wysoką przydatność metod molekularnych opartych na analizie mitochondrialnego DNA w identyfikacji pszczoły miodnej oraz badaniach autentyczności produktów pszczelich.

Sekwencjonowanie fragmentów mtDNA w połączeniu z analizą RFLP stanowi wiarygodne narzędzie do oceny zróżnicowania genetycznego pszczół i ujawnia znaczną skalę mieszania linii hodowlanych w populacjach krajowych.

Opracowane testy przesiewowe PCR wymagają dalszego dopasowania do lokalnej struktury genetycznej pszczół, co wskazuje na konieczność kontynuacji badań referencyjnych nad populacjami polskimi.

Metody real-time PCR i klasycznej PCR umożliwiają jednoznaczne wykrywanie miodu naturalnego, także w śladowych ilościach, niezależnie od stopnia przetworzenia produktu.

Kluczowym parametrem diagnostycznym okazała się analiza krzywych topnienia, zapewniająca wysoką specyficzność i powtarzalność wyników.

Opracowane procedury spełniają wymagania praktycznej kontroli jakości żywności, w tym certyfikacji produktów wegańskich oraz ochrony miódów regionalnych.

Wyniki badań mają bezpośrednie zastosowanie w działalności laboratoryjnej, monitoringu rynku oraz dokumentowaniu pochodzenia biologicznego produktów, stanowiąc solidną podstawę do dalszych wdrożeń i prac badawczo-rozwojowych.

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

Mięśnie szkieletowe są tkanką wysoce plastyczną, a ich funkcjonowanie podczas intensywnego wysiłku jest wprost zależne od dostępności tlenu i wynikających z tego zmian metabolicznych. W warunkach wysiłku dochodzi do okresowych niedoborów tlenu (hipoksji), które uruchamiają m.in. szlaki zależne od HIF-1, przeprogramowanie energetyczne w kierunku glikolizy oraz przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej i struktur kurczliwych. W ramach zadania przyjęto, że kontrolowana hipoksja *in vitro* może stanowić użyteczny model do odtwarzania kluczowych komponentów adaptacji mięśni do wysiłku, a następnie do ich analizy na poziomie ekspresji genów (qPCR) oraz globalnej odpowiedzi transkryptomocnej (RNA-Seq).

Główne cele badawcze

Ustalenie i optymalizacja modelu hipoksji *in vitro* możliwie zbliżonego do warunków tlenowych w mięśniach szkieletowych.

Ocena wpływu hipoksji na ekspresję genów związanych z:

- metabolizmem kwasów tłuszczowych,
- utylizacją glukozy i szlakami energetycznymi,
- apoptozą indukowaną hipoksją.

Zastosowanie NGS (RNA-Seq) do identyfikacji globalnych zmian ekspresji oraz szlaków biologicznych zależnych od stężenia tlenu i czasu ekspozycji.

Założenia metodyczne i organizacja prac

Komórki mięśni szkieletowych izolowano z materiału pobranego *post mortem* (etyczne źródło materiału), za pisemną zgodą właściciela. Pobrania wykonano bezpośrednio po ustaniu

czynności życiowych z *m. gluteus medius*, w warunkach aseptycznych i z zachowaniem łańcucha chłodniczego. Zgodnie z obowiązującymi przepisami, procedura nie stanowiła doświadczenia na zwierzętach żywych.

Testowano trzy podejścia do pozyskania populacji miogenicznych i w każdej metodzie zastosowano etap pre-plating, aby ograniczyć udział fibroblastów i wzbogacić frakcję komórek miogennych. Hipoksję indukowano w inkubatorze HypoxyLab (Oxford Optronix) poprzez kontrolowane mieszaniny gazowe ($N_2 + 5\% CO_2 + \text{zadane } O_2$). Równolegle prowadzono normoksję ($\approx 21\% O_2, 5\% CO_2$). Zaprojektowano dwa typy doświadczeń: krótkotrwała umiarkowana hipoksja ($3\% O_2$) z punktami czasowymi 3, 6, 18, 24 h (qPCR; 3 powtórzenia techniczne); długotrwała ekspozycja (48–72 h) w pięciu grupach: $21\% O_2$ i $3\% O_2$ oraz $1\% O_2$ (48 h lub 72 h) do RNA-Seq i analiz porównawczych. Analizy molekularne obejmowały qPCR z walidacją genów referencyjnych oraz RNA-Seq z kompleksową analizą bioinformatyczną zmian ekspresji genów zależnych od warunków tlenowych.

Wyniki

W pierwszym etapie prac uzyskano populacje komórek pochodzenia mięśniowego z wykorzystaniem trzech metod izolacji: trawienia enzymatycznego pronazą, trawienia kolagenazą oraz hodowli z eksplantatu. Zastosowanie pronazy skutkowało obecnością większej ilości resztek tkankowych oraz wolniejszym tempem proliferacji komórek, co ograniczało ich przydatność w dalszych doświadczeniach. Hodowla z eksplantatu pozwalała na uzyskanie największej liczby komórek, jednak populacja ta charakteryzowała się znaczną heterogenicznością morfologiczną oraz cechami sugerującymi domieszkę innych typów komórek niemiogennych. Najkorzystniejsze rezultaty uzyskano w przypadku izolacji z użyciem kolagenazy, która zapewniała wysoką powtarzalność, dobrą żywotność oraz stabilny profil miogenny komórek, potwierdzony podwyższoną ekspresją MYOD1 oraz MYOG po kolejnych pasażach i etapie *pre-platingu*. W konsekwencji populację uzyskaną metodą kolagenazową uznano za najbardziej odpowiednią do dalszych analiz w różnych warunkach tlenowych, badań qPCR oraz analiz transkryptomicznych RNA-Seq.

Równolegle podjęto próbę opracowania modelu porównawczego z wykorzystaniem komórek mięśniowych gołębia pocztowego. Pomimo zastosowania analogicznych procedur izolacji i modyfikacji warunków hodowli, komórki ptasie wykazywały ograniczoną zdolność do długoterminowej proliferacji oraz cechy starzenia komórkowego już po kilku pasażach. Unieemożliwiło to uzyskanie stabilnej hodowli porównywalnej z modelem końskim, co stanowi istotny wniosek metodyczny dla dalszych badań nad modelami międzygatunkowymi.

Kluczowym elementem części analitycznej była walidacja genów referencyjnych do analiz ekspresji genów metodą qPCR. Ocena stabilności ośmiu kandydatów z wykorzystaniem kilku niezależnych algorytmów wykazała, że najbardziej stabilnym genem referencyjnym w badanych warunkach był ACTB, a kolejne miejsca w rankingu zajmowały RN18S, SDHA oraz GAPDH. Najniższą stabilnością charakteryzowały się geny B2M i TFRC. Wykazano jednocześnie, że wybór genu referencyjnego istotnie wpływa na interpretację wyników ekspresji genów docelowych, w szczególności MYOG, co ma bezpośrednie znaczenie praktyczne dla przyszłych analiz prowadzonych w pierwotnych hodowlach komórek mięśniowych konia.

Analiza ekspresji genów metodą qPCR wykazała dynamiczną odpowiedź komórek na warunki tlenowe. Ekspresja *HIF1A* osiągała maksimum po trzech godzinach inkubacji zarówno w normoksji jak i hipoksji, przy czym w warunkach obniżonego stężenia tlenu utrzymywała się na wyższym poziomie do sześciu godzin, potwierdzając aktywację klasycznej odpowiedzi na niedotlenienie. MYF5 wykazywał podwyższoną ekspresję we wczesnych punktach czasowych,

a następnie jej spadek, co jest zgodne z profilem aktywacji i proliferacji komórek progenitorowych.

MYOD1 charakteryzował się trendem wzrostowym po dwudziestu czterech godzinach, natomiast *MYOG*, marker późnego różnicowania, osiągał najwyższe poziomy ekspresji po osiemnastu godzinach w obu warunkach tlenowych. Przejściowy spadek ekspresji *PAX7* po sześciu godzinach, a następnie jej stopniowy wzrost, wskazuje na dynamiczną równowagę pomiędzy aktywacją progenitorów a utrzymaniem ich puli. Obserwacje morfologiczne potwierdziły, że krótkotrwała hipoksja była dobrze tolerowana i nie prowadziła do obumierania komórek, a jednocześnie sprzyjała ich większemu wydłużeniu i uporządkowaniu.

Analizy RNA-Seq dostarczyły globalnego obrazu zmian transkryptomicznych zależnych od stężenia tlenu i czasu ekspozycji. Uzyskano dane o wysokiej jakości, z bardzo wysokim odsetkiem mapowania odczytów do genomu referencyjnego, a analiza PCA wykazała wyraźne grupowanie próbek zgodnie z warunkami tlenowymi i czasem hodowli. Wydłużona normoksja prowadziła do aktywacji programów związanych z miogenezą i organizacją aparatu kurczliwego, co odzwierciedla naturalną progresję kultur miogenicznych. Ostra, ciężka hipoksja indukowała, natomiast skoordynowane przeprogramowanie metaboliczne w kierunku glikolizy oraz przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, czemu towarzyszyła aktywacja szlaku HIF-1. Porównania długotrwałych ekspozycji wykazały stopniowaną, zależną od stężenia tlenu modulację odpowiedzi komórkowej – umiarkowana hipoksja wpływała głównie na remodelowanie cytoszkieletu i adhezję komórek, natomiast ciężka hipoksja sprzyjała aktywacji programów różnicowania i tworzenia struktur kurczliwych.

Analiza wspólnych genów różnicująco ekspresjonowanych dla trzech poziomów tlenu po 72 godzinach ekspozycji pozwoliła na identyfikację zestawu genów kandydujących związanych z adaptacją mięśni do wysiłku i wydolnością fizyczną, takich jak: *ACTN3*, *ATP2A1*, *FNDC5*, *EGLN1*, *SLC16A1*, *NAMPT*, *VEGFB*, *NOS1* oraz *SMYD1*. Obecność tych markerów potwierdza, że opracowany model komórek miogenicznych konia w kontrolowanych warunkach hipoksji wiernie odtwarza kluczowe, tlenozależne mechanizmy adaptacyjne mięśni szkieletowych.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki potwierdzają osiągnięcie celu zadania poprzez opracowanie i walidację powtarzalnego modelu *in vitro* końskich progenitorów mięśni szkieletowych, umożliwiającego kontrolowaną analizę odpowiedzi komórkowej na zmienne napięcie tlenu. Model ten stanowi solidną podstawę do dalszych badań mechanizmów adaptacji mięśni do wysiłku, analiz funkcjonalnych oraz zastosowań translacyjnych, a opracowane know-how obejmuje kompletny pipeline eksperymentalny do pozyskiwania, charakterystyki i analizy komórek mięśniowych w warunkach normoksji i hipoksji.

Zadanie 01-18-21-21

Analiza profilu proteomicznego plemników knura poddanych procedurom biotechnologicznym.

kierownik zadania: dr Grzegorz Smółucha

Celem zadania badawczego była kompleksowa ocena wpływu modyfikacji potranslacyjnych białek, ze szczególnym uwzględnieniem acetylacji lizyn, na jakość i funkcjonowanie plemników knura poddanych procedurom biotechnologicznym, w tym kriokonserwacji.

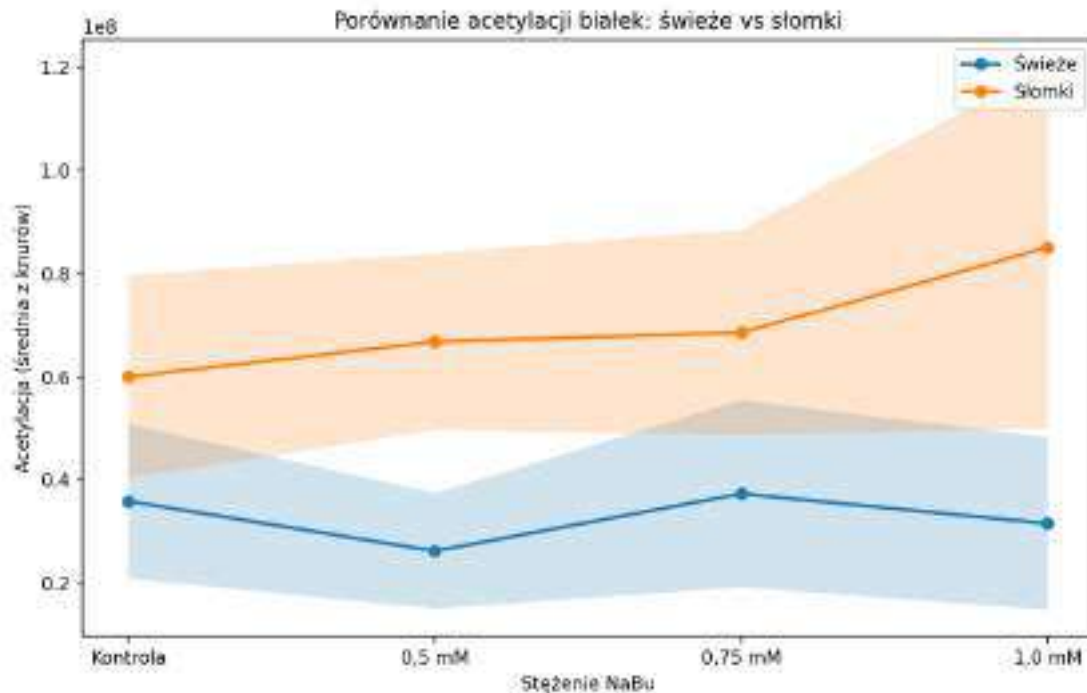
Badania koncentrowały się na analizie zmian w proteomie plemników świeżych i mrożonych, traktowanych inhibitorem deacetylaz histonowych – maślanem sodu (NaBu) oraz na powiązaniu tych zmian z parametrami strukturalno-funkcjonalnymi komórek plemnikowych.

Plemniki, jako komórki o ograniczonej zdolności syntezy białek, regulują swoje funkcje głównie poprzez modyfikacje potranslacyjne istniejących białek, wśród których szczególne znaczenie przypisuje się acetylacji lizyn. Modyfikacja ta wpływa na organizację cytoszkieletu, metabolizm energetyczny oraz ruchliwość plemników. Dotychczas brakowało danych dotyczących roli acetylacji białek w plemnikach knura – zwłaszcza w kontekście kriokonserwacji, co stanowiło podstawę do podjęcia niniejszych badań. Materiał badawczy stanowiło nasienie knurów różnych ras, analizowane w czterech grupach doświadczalnych: świeże i kriokonserwowane, traktowane lub nietraktowane maślanem sodu (NaBu). Jakość nasienia oceniano z wykorzystaniem systemu CASA, metod cytometrycznych oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Równolegle prowadzono analizy proteomiczne z zastosowaniem elektroforezy dwuwymiarowej (2D-PAGE), spektrometrii mas (LC-MS/MS) oraz analizy typu *Western blot* w celu identyfikacji zmian w poziomie acetylacji białek. Analiza parametrów jakości świeżego nasienia wykazała brak istotnego wpływu NaBu, niezależnie od zastosowanego stężenia, na ruchliwość plemników, integralność błon, stan chromatyny czy apoptozę. Jednocześnie stwierdzono wyraźne różnice osobnicze pomiędzy knurami, szczególnie w grupie kontrolnej, co podkreśla znaczenie czynnika osobniczego w ocenie jakości nasienia. Natomiast w przypadku nasienia kriokonserwowanego zaobserwowano istotny wpływ NaBu na parametry ruchliwości (ruch całkowity i postępowy), przy jednoczesnym braku wyraźnego oddziaływania na pozostałe wskaźniki jakości. Najniższe stężenia NaBu (0,5–0,75 mM) wydawały się ograniczać zmienność pomiędzy knurami, co może wskazywać na potencjalny efekt stabilizujący. Analizy proteomiczne ujawniły istotne różnice w profilach białkowych pomiędzy grupami doświadczalnymi. Traktowanie plemników NaBu prowadziło do zmian w liczbie i intensywności spotów białkowych, przy czym efekt ten był zależny od dawki inhibitora i szczególnie wyraźny w próbkach kriokonserwowanych. Wraz ze wzrostem stężenia NaBu obserwowano pojawianie się nowych spotów, zanik lub osłabienie innych oraz przesunięcia punktów izoelektrycznych, co wskazuje na występowanie modyfikacji potranslacyjnych. Identyfikacja białek różnicujących grupy wykazała, że zmiany dotyczyły głównie białek zaangażowanych w organizację cytoszkieletu (α - i β -tubulina, AKAP4, ODF2), metabolizm energetyczny (ATP5B, GAPDH-S, VDAC2) oraz odpowiedź na stres komórkowy (HSP70, HSP90, PRDX5). Szczegółowa analiza acetylacji białek wykazała, że w świeżym nasieniu poziom acetylacji nie ulegał istotnym zmianom w odpowiedzi na NaBu, a obserwowane różnice miały charakter indywidualny i niespójny. Odmienną sytuację stwierdzono w nasieniu mrożonym, gdzie najwyższa dawka NaBu (1,0 mM) powodowała istotny wzrost acetylacji białek. Ponadto poziom acetylacji w mrożonym nasieniu korelował dodatnio z odsetkiem komórek nekrotycznych oraz, po uwzględnieniu dawki NaBu, z ruchem całkowitym plemników. Wyniki te wskazują, że acetylacja białek w warunkach stresu kriogenicznego może odzwierciedlać zarówno procesy degeneracyjne, jak i adaptacyjne zmiany funkcjonalne plemników.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że kriokonserwacja istotnie zwiększa wrażliwość proteomu plemników knura na modulację acetylacji białek przez inhibitor deacetylaz histonowych. NaBu, szczególnie w najwyższym zastosowanym stężeniu, nasila zmiany proteomiczne i epigenetyczne w mrożonym nasieniu, podczas gdy plemniki świeże charakteryzują się względnie stabilnym poziomem acetylacji.

Uzyskane wyniki podkreślają kluczowe znaczenie stanu fizjologicznego plemników dla interpretacji zmian molekularnych oraz wskazują, że modyfikacje potranslacyjne białek mogą stanowić istotny element odpowiedzi plemników na stres kriogeniczny.

Wykres 1. Porównanie acetylacji białek z nasienia świeżego i mrożonego.

**Zadanie 01-18-22-21**

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

kierownik zadania: prof. dr hab. Katarzyna Piórkowska

Celem proponowanych 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 była wcześniej analizowana w kontekście otyśnięcia 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 umożliwi dostarczenie nowych informacji pomocnych przy opracowaniu skutecznych narzędzi do regulacji poziomu tkanki tłuszczowej u zwierząt czy człowieka.

Założenia metodyczne

Materiał do badań

W eksperymencie wykorzystano osiem świń ras złotnicka pstra i pietrain. Od wszystkich zwierząt pobrano materiał do uzyskania pierwotnych linii preadipocytów w celu oceny zdolności różnicowania i transfekcji.

Komórki od czterech świń izolowano trzema metodami: z użyciem komercyjnego kitu, metodą swim-up oraz enzymatycznie z kolagenazą I. Preadipocyty proliferowano w medium wzrostowym, a następnie różnicowano w dwóch systemach hodowlanych. Skuteczność adipogenezy oceniano barwieniami lipidów oraz analizą ekspresji genów LPL i SCD metodą

qPCR. Linie komórkowe kriobankowano. Przeprowadzono transfekcję w celu indukcji nad-ekspresji lncRNA MALAT1.

Transdukcja lentiwirusowa

Przeprowadzono lentiwirusową transdukcję świńskich preadipocytów przy czterech wartościach MOI (10, 40, 90, 160) w medium wzrostowym z dodatkiem Polybrene. Wydajność transdukcji oceniano po 48 h metodą cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej oraz qPCR. Po 72 h komórki poddano 7-dniowej selekcji puromycyną, a do dalszych badań wybrano wariant MOI 40. Kontrolę stanowiły komórki transdukowane pustym wektorem GFP. Wpływ nadekspresji lncRNA MALAT1 analizowano podczas proliferacji oraz po 3 i 7 dniach różnicowania, zbierając komórki do analiz molekularnych.

Ocena histologiczna preparatów tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa była oceniana pod względem budowy komórek tłuszczowych dla dwóch wykorzystanych w eksperymencie ras świń – złotnickiej pstrej oraz pietrain.

Przygotowanie preparatów histologicznych tkanki tłuszczowej

Próbki tkanki tłuszczowej szybko zamrożono w izopentanie schłodzonym ciekłym azotem i przechowywano w -80°C . Przed kriosekcją bloki wyrównano temperaturowo w kriostacie (-20°C), a następnie wykonano skrawki o grubości 7–10 μm , które nanoszono na szkiełka i suszono. Skrawki utrwalono w 10% buforowanej formalinie i barwiono hematoksyliną i eozyną (H&E). Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym Olympus ($\times 20$), a obrazy przetwarzano w programie ImageJ.

Ocena histologiczna tkanki tłuszczowej w odniesieniu do różnych ras.

Tabela 1. Charakterystyka świń rasy złotnickiej pstrej i pietrain o wysokiej i niskiej zawartości tłuszczu wykorzystanych w eksperymencie, średnia \pm SD.

Cechy	złotnicka pstra (n=4)			pietrain (n=4)			p-value	Różnica m. grupami*
	Mean		SD	Mean		SD		
Dzienne przyrosty (g)	639	A	18.7	1031	B	108	0.00353	38%
Wydajność rzeźna (kg)	75.2	A	0.49	77.5	B	0.62	0.0013	3%
Tłuszcz otrzewnowy (kg)	0.80		0.31	0.42		0.13	0.06	36%
Połędwiczki masa (kg)	0.30	A	0.06	0.46	B	0.05	0.008	48%
Szynka masa (kg)	8.82	A	0.69	11.7	B	0.78	0.00172	25%
Grubość słoniny w punkcie K1 (cm)	3.38	A	0.75	0.88	B	0.15	0.004495	74%
Masa tkanki tłuszczowej szynki ze skórą (kg)	2.46	A	0.24	1.15	B	0.23	0.00025	53%
Masa tkanki tłuszczowej połędwicy ze skórą (kg)	2.45	A	0.49	0.83	B	0.21	0.003	66%
Bekon z żeberkami (kg)	6.2	A	0.13	5.1	B	0.16	6.39E-05	18%
Grubość tkanki tłuszczowej nad łopatką (cm)	3.6	A	0.5	1.9	B	0.19	0.00301	56%
Grubość tkanki tłuszczowej na krzyżu I (cm)	3.35	A	0.65	1.00	B	0.31	0.001951	69%
Grubość tkanki tłuszczowej na krzyżu II (cm)	2.98	A	0.60	0.7	B	0.0	0.0036	77%

Grubość tkanki tłuszczowej na krzyżu III (cm)	3.39	A	0.68	0.85	B	0.11	0.00337	75%
Średnia grubość słoniny (cm)	3.08	A	0.50	1.14	B	0.15	0.00214	63%
Powierzchnia oka polędwicy (cm ²)	32.05	A	4.95	66.8	B	1.53	0.000294	52%

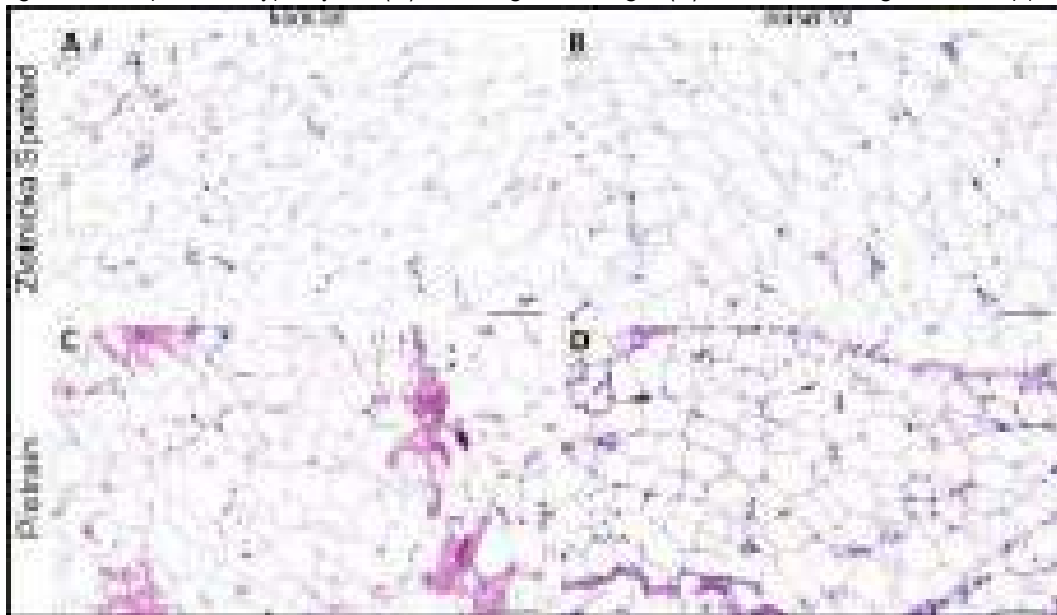
Skróty: SD – odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami należą do tej samej grupy statystycznej (A, B = $p < 0,01$; a, b = $p < 0,05$); K1 – grubość słoniny w punkcie K1 (cm) opisuje grubość słoniny na bocznej krawędzi mięśnia najdłuższego grzbietu.

Osobniki obu ras zostały poddane porównaniu w zakresie cech tucznych oraz rzeźnych (Tabela 1.). Uzyskane wyniki wskazują na istotne zmiany w zakresie niemal każdego ocenianego parametru.

Ocena struktury histologicznej podskórnej tkanki tłuszczowej

Adipocyty obserwowano jako duże, wakuolizowane komórki z obwodowo położonymi jądrami. Tkanka tłuszczowa świń rasy złotnickiej pstrej wykazywała większe adipocyty i większą akumulację lipidów, natomiast u rasy pietrain stwierdzono mniejsze, zwarte komórki oraz grubsze przegrody tkanki łącznej. Różnice te odzwierciedlają większą zdolność odkładania tłuszczu u świń rasy złotnickiej pstrej w porównaniu z rasą pietrain (Rycina 1.).

Rycina 1. Struktura histologiczna tkanki tłuszczowej podskórnej, pobranej od świń rasy złotnickiej pstrej i pietrain, barwionej hematoksyliną i eozyną (H&E). Próbki pobrano z dwóch okolic ciała: (A) tłuszczu grzbietowego i (B) tłuszczu brzuszego u świń rasy złotnickiej pstrej oraz (C) tłuszczu grzbietowego i (D) tłuszczu brzuszego u świń rasy pietrain.



Także analiza morfometrii adipocytów wykonana w programie ImageJ wykazała, że komórki świń rasy złotnickiej pstrej były istotnie większe niż u rasy pietrain w obu obszarach anatomicznych. Największe adipocyty stwierdzono w tłuszczu grzbietowym świń rasy złotnickiej pstrej, a najmniejsze w tłuszczu brzuszonym rasy pietrain.

Wyniki potwierdzają fenotyp wysoko-tłuszczowy rasy złotnickiej pstrej i chudy fenotyp rasy pietrain. Dwuczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ rasy i regionu oraz ich interakcję na wielkość adipocytów.

Tabela 2. Charakterystyka morfometryczna adipocytów w tkance tłuszczowej podskórnej świń rasy złotnickiej plamistej i pietrain (barwienie H&E).

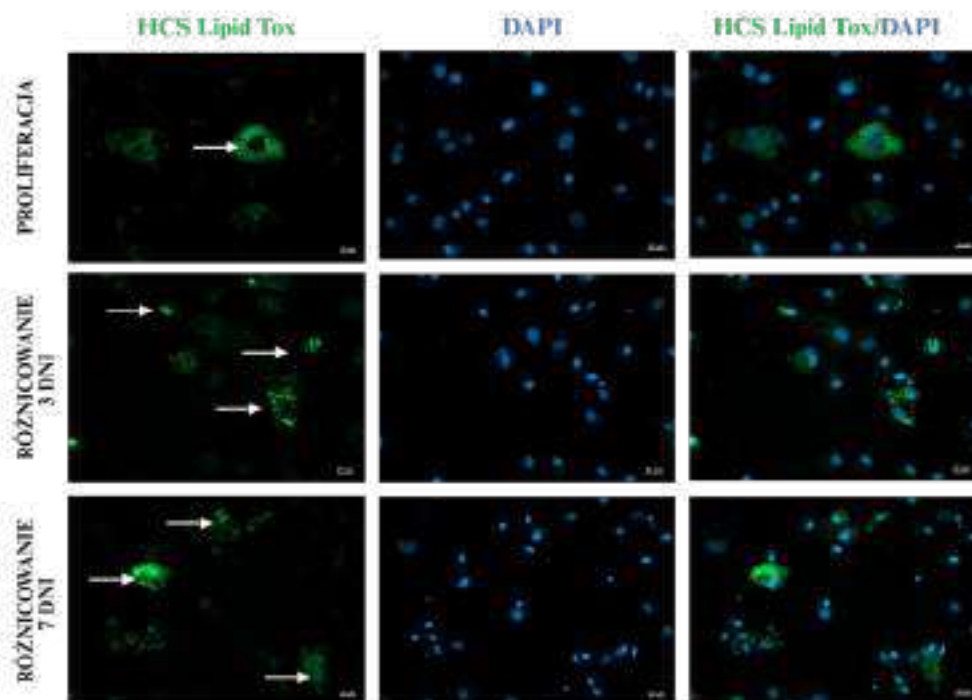
Rasa	Region	Średnia powierzchnia (μm^2)	SD powierzchnia (μm^2)	Średnia średnica (μm)	SD średnica (μm)	n
złotnicka pstra	śłonina	3995.5 Aa	680.4	71.3 Aa	6.1	50
	tkanka tł. brzuszna	5297.8 Cb	1392.7	82.1 Cb	10.8	50
pietrain	śłonina	3063.8 Bc	847.9	62.6 Bc	8.6	50
	tkanka tł. brzuszna	3428.4 Dd	1452.6	66.1 Dd	14.0	50

A,B – wielkie litery oznaczają istotne różnice w grupach o wartości $p < 0,0001$; a, b, c – małe litery oznaczają istotne różnice w grupach o wartości $p < 0,05$.

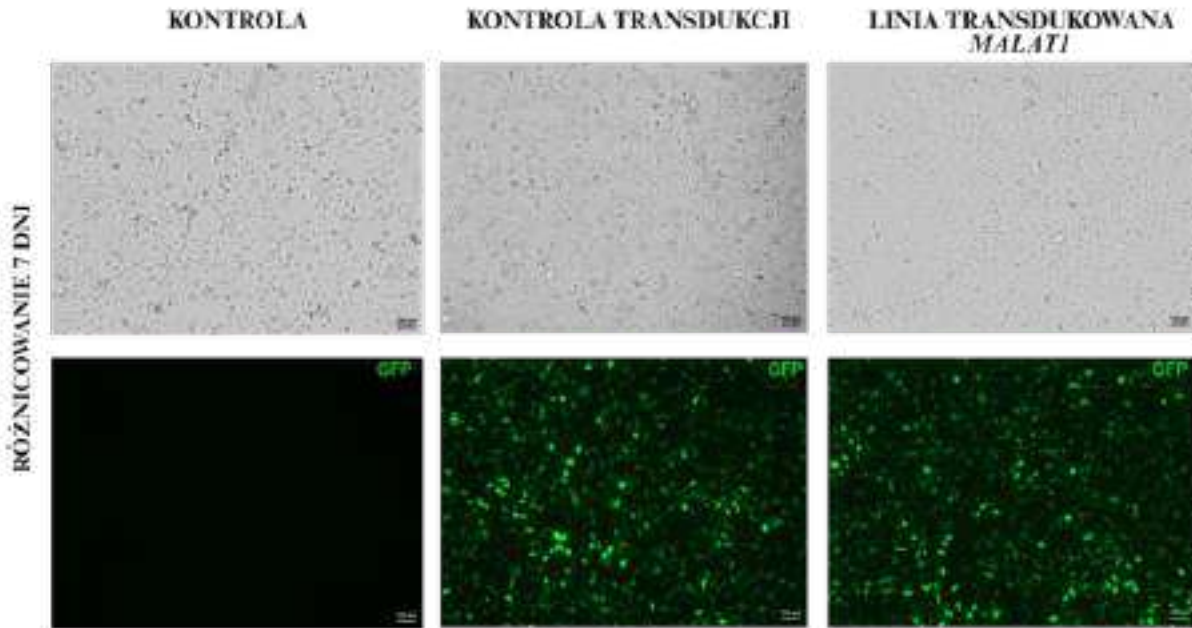
Transfekcja i ocena jej wpływu na kultury preadipocytów

Wyprowadzono pierwotną linię świńskich preadipocytów o prawidłowej morfologii i zdolności do różnicowania w adipocyty, potwierdzonej barwieniem lipidów. Transdukcja lentiwirusowa umożliwiła uzyskanie komórek z nadekspresją MALAT1, co potwierdzono ekspresją GFP i analizą qPCR. Preadipocyty transdukowane przy MOI 10 i 40 zachowały prawidłową morfologię i zdolność proliferacji, natomiast wyższe MOI powodowały efekt cytotoksyczny. Do dalszych analiz wybrano komórki transdukowane przy MOI 40.

Rycina 2. Fluorescencyjna detekcja kropli lipidowych w wyprowadzonej linii preadipocytów świńskich poddanych kolejno: proliferacji w medium wzrostowym oraz trzy- i siedmiodniowemu różnicowaniu w medium Preadipocyte Differentiation Medium. Komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie. Analizę mikroskopową przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Zeiss AX100 imager D.2 microscope (Zeiss, Germany) oraz oprogramowania Zeiss Zen 2 Blue Edition Software.



Rycina 3. Preadipocyty poddane trzydniowej proliferacji w medium wzrostowym i siedmiodniowemu różnicowaniu w medium wspierającym proces różnicowania, obrazowane z zastosowaniem BioTek Cytation1 Cell Imaging Multi-mode Reader (Agilent).



W kolejnych etapach kontrolne i transdukowane preadipocyty będą hodowane w medium wzrostowym, a następnie różnicowane i zbierane w ustalonych punktach czasowych. Z komórek zostanie wyizolowane RNA i miRNA, przygotowane biblioteki i przeprowadzone sekwencjonowanie w celu oceny wpływu nadekspresji MALAT1 na proliferację i różnicowanie preadipocytów na poziomie transkryptomu i miRonomu.

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 wykorzystaniem rozwiązania AgriSeq targeted GBS.

Laboratorium zostało zaangażowane w proces przygotowania panelu markerów SNP do identyfikacji osobniczej owiec. W ramach współpracy z ISAG wybrano 242 markery SNP owiec i pozyskano testowy panel starterów do GBS do analizy tych markerów. Wytypowano i przygotowano próbki do analiz: próbki różnych ras owiec oraz próbki z pierwszego, próbnego międzynarodowego testu porównawczego kontroli rodowodów owiec w oparciu o markery SNP, organizowanego przez ISAG (ISAG trial sheep SNP Comparison Test 2024/2025). Dopracowano schematy normalizacji próbek do tych analiz, także z zastosowaniem stacji pipetującej. Wykonano analizy z użyciem chipu 530. Laboratorium uzyskało certyfikat potwierdzający udział w teście.

Niestety, podczas opracowywania wyników testu międzynarodowego przez ISAG stwierdzono, że niektóre ze starterów zostały błędnie zaprojektowane przez ich producenta. W efekcie wszystkie laboratoria biorące udział w teście z wykorzystaniem platformy Ion Torrent nie mogły uzyskać prawidłowego wyniku analizy dla 30 spośród analizowanych markerów.

Porównanie wyników dla próbek z testu międzynarodowego pomiędzy laboratoriami wykazało różnice w wynikach genotypowania – w zależności od użytej techniki analizy (platformami NGS), które wymagają dalszej weryfikacji. Testy metodyki będą kontynuowane, jak tylko uda się pozyskać panel starterów z poprawionymi starterami.

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



Pozyskany panel starterów dla markerów SNP do identyfikacji osobniczej dla psów wykorzystano do analizy próbek z międzynarodowego testu porównawczego kontroli rodowodów SNP psów (ISAG dog SNP Comparison Test 2024/2025) oraz innych próbek tego gatunku. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem chipu 530 i protokołów opracowanych w pierwszym roku realizacji zadania. Uzyskano bardzo dobry wynik loadingu, a zsekwencjonowane produkty miały oczekiwaną długość. Laboratorium uzyskało certyfikat udziału w teście. Wybrano próbki do dalszych testów.

Wybrano zestaw do analizy mutacji genetycznych psów. Trwają prace testowania protokołu i analiza wyników.

Wykonano testowe analizy łączenia różnych paneli markerów z uwzględnieniem wielkości poszczególnych paneli, z wykorzystaniem chipu 530. Biblioteki dla owiec, bydła i psów, przygotowane w ramach zadania, połączono w zestawach: owca + pies oraz owca + bydło + koń (dla koni wykorzystano biblioteki przygotowane w ramach innego projektu). Uzyskano wyniki dla wszystkich analiz. Trwa szczegółowa analiza porównawcza.

Rycina 2. Wynik łączonej analizy GBS dla paneli SNP do identyfikacji osobniczej owiec i psów z aparatu Ion Torrent GeneStudio S5 Prime.



Rycina 3. Wynik łączonej analizy GBS dla paneli SNP do identyfikacji osobniczej owiec, bydła i koni z aparatu Ion Torrent GeneStudio S5 Prime.



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 dla danieli, łosi i jeleni sika.

W ramach zadania opracowano zestaw trzech metod molekularnych przeznaczonych do identyfikacji DNA wybranych gatunków jeleniowatych. Metody te zostały zaprojektowane jako wzajemnie uzupełniające się, tak aby umożliwiły analizę materiału biologicznego o zróżnicowanej jakości, stopniu przetworzenia oraz poziomie degradacji DNA. Wszystkie opracowane metody znajdują się obecnie na etapie walidacji.

Pierwsza z metod opiera się na amplifikacji krótkiego fragmentu mitochondrialnego DNA obejmującego gen cytochromu B, o długości poniżej 200 par zasad. Ze względu na niewielką długość identyfikowanego fragmentu metoda ta jest dedykowana do analizy próbek surowych, przetworzonych technologicznie oraz próbek zdegradowanych, w których DNA występuje w postaci silnie pofragmentowanej.

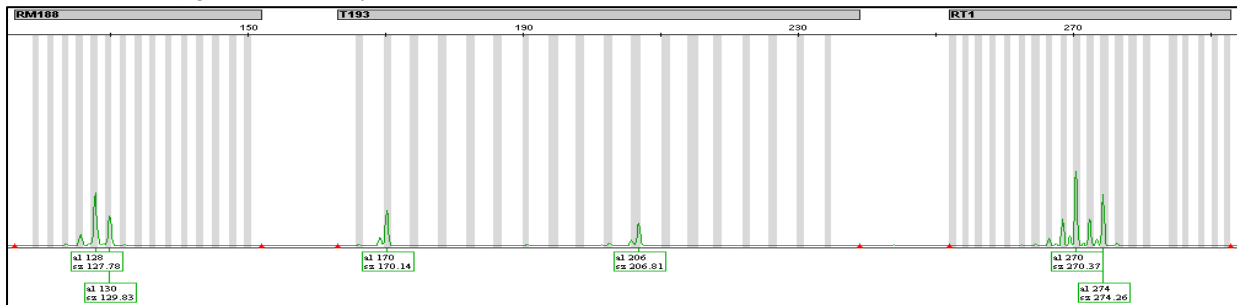
Drugą metodę opracowano w celu rozróżnienia jelenia szlachetnego, jelenia sika, sarny, danieli oraz łosia i bazuje na amplifikacji dłuższych fragmentów mitochondrialnego DNA, przekraczających 500 par zasad. Zastosowanie długich ampikonów pozwala na uzyskanie większej ilości informacji sekwencyjnej, jednak jednocześnie ogranicza zastosowanie metody do materiału świeżego lub dobrze zachowanego. Metoda ta stanowi uzupełnienie podejścia opartego na krótkich fragmentach DNA i może być wykorzystywana w analizach wymagających wyższej rozdzielczości identyfikacyjnej. Wybrane do analizy fragmenty DNA wykazują homologiczność w zakresie 88–97%, w zależności od identyfikowanego gatunku, co umożliwi ich skuteczne i jednoznaczne rozróżnienie.

Trzecia metoda została zaprojektowana jako metoda selektywna, przeznaczona wyłącznie do identyfikacji DNA łosia. Jej opracowanie wynika z potrzeby jednoznacznej detekcji tego gatunku, w szczególności w próbkach o złożonym składzie gatunkowym. Metoda ta może być stosowana zarówno jako narzędzie potwierdzające obecność DNA łosia, jak i jako uzupełnienie pozostałych metod w przypadkach wymagających szybkiej i ukierunkowanej analizy.

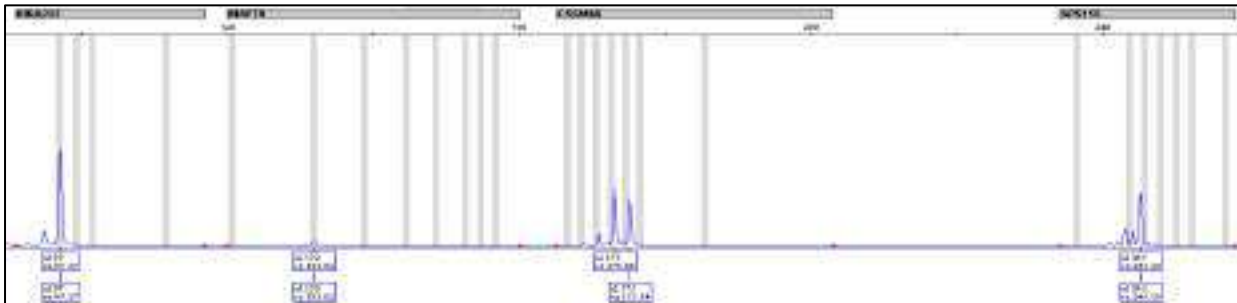
We wszystkich opracowanych metodach zastosowano startery charakteryzujące się wysoką specyficnością, niewykazujące homologii z sekwencjami DNA innych gatunków zwierząt ani roślin. Takie podejście umożliwia zastosowanie metod do analizy materiału złożonego oraz minimalizuje ryzyko reakcji nieswoistych. Zróżnicowanie długości amplifikowanych fragmentów DNA oraz zakresu identyfikowanych gatunków pozwala na elastyczne dopasowanie metody do charakteru analizowanej próbki i celu badania. Wszystkie opisane metody są obecnie w trakcie walidacji.

Ponadto, w ramach zadania zaktualizowano metody identyfikacji osobniczej jeleni (Rycina 1.) i saren (Rycina 2.). Przetestowano różne stężenia starterów i warianty programów termicznych termocyklera oraz od nowa ustawiono zakresy *alleliczne* dla obu paneli, dostosowując metodykę do sekwenatorów SeqStudio 24 Flex i 3500xl Genetic Analyzer. Wykonano drabinkę alleliczną dla panelu jeleni, która potwierdziła przesunięcia markerów na obu tych sekwenatorach względem wycofanego już z użycia sekwenatora Genetic Analyzer 3130xl. Pozyskano dodatkowe próbki materiału genetycznego saren i jeleni.

Rycina 1. Markery genetyczne dla jeleni znakowane barwnikiem VIC.

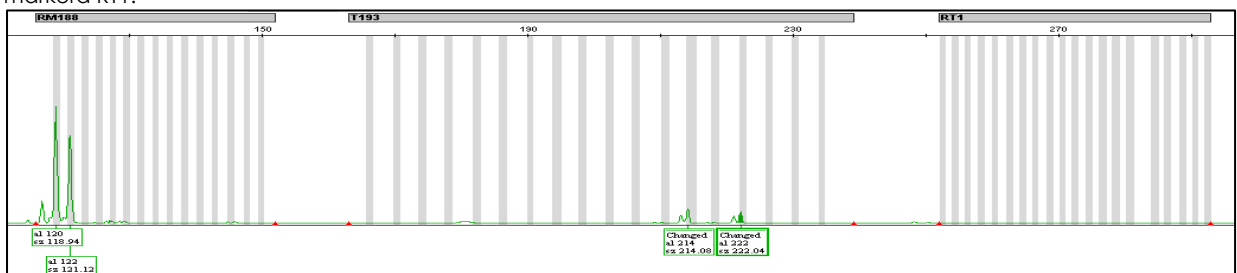


Rycina 2. Markery genetyczne dla saren znakowane barwnikiem FAM.



Dla łośi, danieli i jeleni sika przeprowadzono analizy z użyciem panelu starterów jeleni. Nie wszystkie markery się amplifikowały (Rycina 3.) – stwierdzono konieczność wymiany kilku markerów z użytego panelu na inne. Na podstawie istniejącej literatury wytypowano markery STR do panelu identyfikacji osobniczej dla łośi. Zamówiono startery do markerów zastępczych i przygotowano metodykę. Trwa analiza otrzymanych wyników.

Rycina 3. Markery genetyczne analizowane u łośi znakowane barwnikiem VIC – widać brak amplifikacji w obrębie markera RT1.



Ze względu na bardzo małą liczbę próbek DNA danieli i jeleni sika, dokładna walidacja panelu dla tych dwóch gatunków nie była możliwa. Próby pozyskania większej liczby próbek tych dwóch gatunków nie powiodły się.

Zadanie 01-18-27-21

Genotypowanie świń i dzików z wykorzystaniem różnych technik i markerów w celu dobrania precyzyjnych narzędzi do identyfikowania obydwu podgatunków.

kierownik zadania: dr inż. Anna Koseniuk

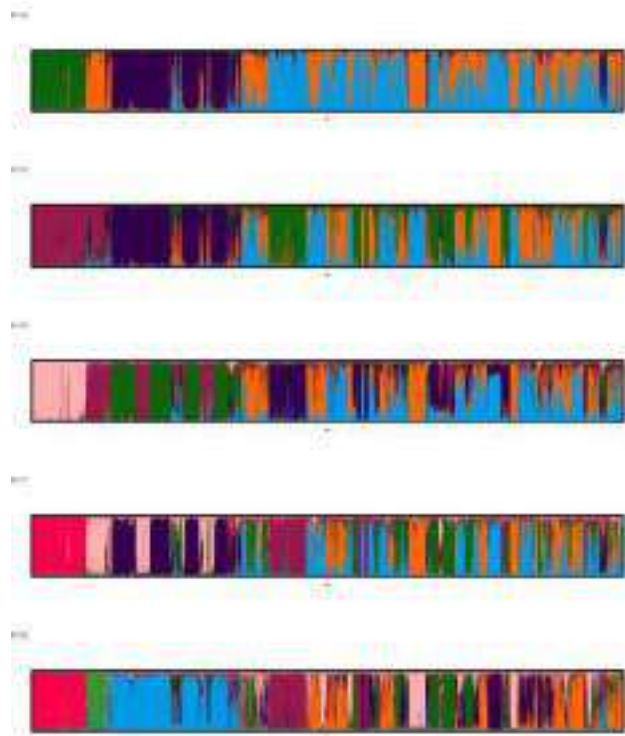
Cele zadania badawczego:

- wyznaczenie zmienności populacji dzików i świń w Polsce oraz przeprowadzenie analizy porównawczej z innymi populacjami dzikich i domowych świń z Europy i Azji (na podstawie wyników własnych oraz danych on-line dostępnych w repozytoriach DNA),
- analiza struktury demograficznej dzików i świń w oparciu o długość ciągów homozygotycznych (ROH), identyfikacja hybrydyzacji, analiza zmienności liczby kopii sekwencji w genomie (copy number variation, CNV) oraz identyfikacja znaczników selekcyjnych,
- opracowanie metody identyfikacji obu podgatunków.

W pierwszym roku realizacji zadania skoncentrowano się na zgromadzeniu materiału badawczego oraz opracowaniu i optymalizacji metodyki analiz molekularnych. Właściwa selekcja próbek badawczych stanowiła istotny etap determinujący powodzenie dalszych prac i realizację założonych celów projektu. Do analizy zmienności genetycznej zostały wybrane próbki świni domowej. Kryterium wyboru stanowiły próbki osobników o potwierdzonym rodzicielstwie na podstawie analiz mikrosatelitarnego polimorfizmu DNA. Dzięki temu zachowano przynależność rasową. Ponadto zadbano, aby osobniki do badań były jak najmniej ze sobą spokrewnione. Powiększono bazę próbek pochodzących od dzików do 428. Do analiz w oparciu o polimorfizm mikrosatelitarny przeznaczono 1930 próbek – 428 dzików i 1502 świń różnych ras.

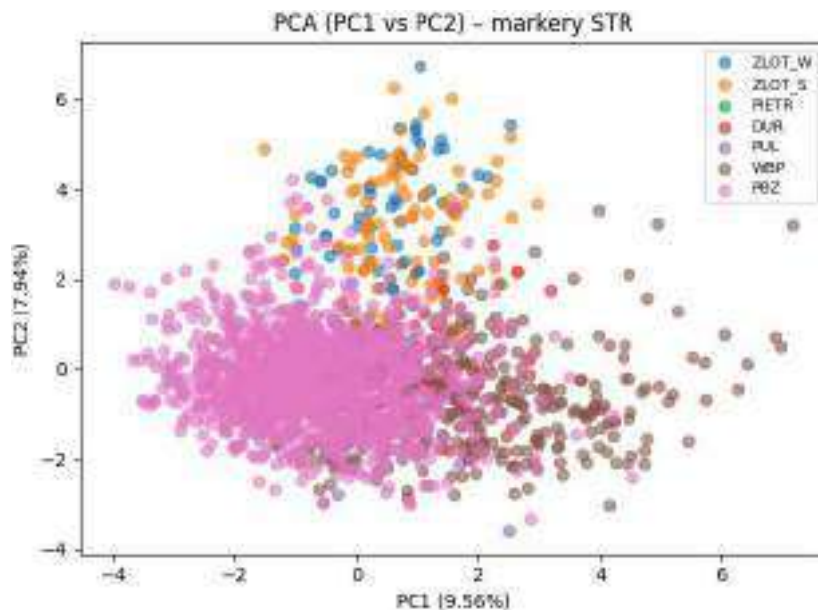
Analizę struktury populacyjnej przeprowadzono z wykorzystaniem programu STRUCTURE w oparciu o dane genotypowe z 14 markerów mikrosatelitarnych. Dla każdej wartości liczby klastrów ($K = 2-10$) wykonano niezależne uruchomienia algorytmu z zastosowaniem 150 000 iteracji oraz 500 000 iteracji fazy burn-in, przy założeniu modelu admixture model i niezależnych częstości alleli. Wyniki analizy nie wykazały istnienia jednoznacznej, statystycznie najbardziej prawdopodobnej wartości K . Zarówno wartości logarytmu prawdopodobieństwa danych [$\ln P(D)$], jak i analiza oparta na metodzie ΔK , nie wskazały wyraźnego maksimum dla żadnej z testowanych wartości K . Zamiast tego obserwowano stopniowy wzrost $\ln P(D)$ wraz ze wzrostem K oraz wysoką zmienność pomiędzy powtórzeniami, bez wyraźnego punktu załamania krzywej. Brak wyraźnie najlepszego K wskazuje na ciągły charakter zmienności genetycznej badanych populacji, a nie na istnienie dyskretnych, jednoznacznie rozdzielonych jednostek genetycznych. Taki wzorec jest typowy dla populacji o historii intensywnej selekcji, krzyżowań międzyrasowych oraz wspólnego pochodzenia, szczególnie w przypadku markerów neutralnych, takich jak mikrosatelity.

Rycina 1. Wynik analizy struktury populacji dla siedmiu badanych ras świń; bez jednoznacznego wskazania K o największym prawdopodobieństwie.



Analiza głównych składowych (PCA) przeprowadzona na podstawie 14 markerów mikrosatelitarnych ujawniła istotną strukturę genetyczną badanych ras. Pierwsze dwie składowe wyjaśniały łącznie 17,5% całkowitej zmienności. Rasy zachowawcze (puławska oraz złotnicka) wykazywały większą odrębność genetyczną, podczas gdy rasy komercyjne (WBP, PBZ, duroc, pietrain) charakteryzowały się znacznym nakładaniem klastrów, co wskazuje na ich większą homogenizację genetyczną.

Rycina 2. Wykres PCA (PC1 vs PC2) dla 1930 próbek, oparty na 14 markerach STR, z kolorowym rozróżnieniem ras



Zadanie 01-18-28-11

Profilowanie DNA jako narzędzie w nowoczesnej hodowli zwierząt.

kierownik zadania: dr inż. Angelika Mąsior

Głównym celem zadania badawczego jest dopracowanie oraz wdrożenie metod profilowania DNA u alpaki i kotów, przy wykorzystaniu wszystkich markerów molekularnych rekomendowanych przez ISAG i nie tylko. Zadanie ma na celu rozwinięcie narzędzi genetycznych, które wspomogą identyfikację osobniczą tych gatunków, co przyczyni się do rozwinięcia tych usług w laboratorium. Ponadto zaplanowane są metody identyfikacji płci ptaków, bez wyraźnego dymorfizmu płciowego.

W przypadku pierwszego celu: *Identyfikacja osobnicza alpaki i lam* – został zmodyfikowany dotychczasowy panel mikrosatelitarny obowiązujący w LGM. Wykorzystano pulę dostępnych markerów mikrosatelitarnych wyizolowanych dla rodziny Camelidae. Wybrano odpowiednie markery, dopasowano regiony, wyznakowano startery barwnikami fluorescencyjnymi. Metodę opracowano pod kątem amplifikacji typu multiplex, tak, aby w jednej reakcji móc amplifikować jak największą liczbę markerów. Dobrano odpowiedni program termiczny z wykorzystaniem polimerazy Tipe It Microsatellite Kit (Qiagen) (Tabela 1.).

Tabela 1. Program termiczny dla trzech paneli mikrosatelitarnych.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [min]	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95	5	1
Denaturacja	95	0,5	28
Przyłączanie starterów	60	1,5	
Wydłużanie	72	0,5	
Wydłużanie końcowe	60	30	1

W ramach realizacji zadania opracowano 3 panele (3 pleksy mikrosatelitarne) (Tabela 2., 3. i 4.; Rycina 1., 2., 3.).

Tabela 2. Panel I - sekwencje starterów.

Marker	Primer (5'-3') Forward	Primer (5'-3') Reverse
LCA99	CAGGTATCAGGAGACGGGCT	AGCATTATCAAGGAACACCAGC
SRY	GGCTCTAGAGATCCCAAATGC	TAGTCTCTGTGCCCTCCTCGA
LGU49	TCTAGGTCCATCCCTGTTGC	GTGCTGGAATAGTGCCCAGT
LCA94	GTCCATTCATCCAGCACAGG	ACATTGGCAATCTCTGGAGAA
LCA19	TAAGTCCAGCCCCACACTCA	GGTGAAGGGGCTTGATCTTC
LCA56	ATGGTGTTTACAGGGCGTTG	GCATTACTGAAAAGCCCCAGG
LGU50	CTGCTGTGCTTGTCAACCCTA	AGCACCACATGCCTCTAAGT
LCA8	GCTGAACCACAATGCAAAGA	AATGCAGATGTGCCTCAGTT
LCA37	AAACCTAATTACCTCCCCCA	CCATGTAGTTGCAGGACACG
LCA65	TTTTCCCTGTGGTTGAAT	AACTCAGCTGTTGTCAGGGG
LCA66	GTGCAGCGTCCAAATAGTCA	CCAGCATCGTCCAGTATTCA
YWLL02	GTGCACTCAGATACCTTCACA	TACATCTGCAATGATCGACCC
VOLP05	ACTTAATCACCTGGATGTAT	ATATGGTTCAGTGTGTTACT
LCA5	GTGGTTTTTGCCCAAGCTC	ACCTCCAGTCTGGGGATTTC
LGU91	GTCTCCGGTTGCAGATGAG	AGAAGCAGAATGGTAGTGAAGAA
LCA24	ACTCACGGGTGACATACACTG	GAGCAGTGTGTTGTTGCAIT

Rycina 1. Panel I – elektroforogram alpaki.



Tabela 3. Panel II - sekwencje starterów.

Marker	Primer (5'-3') Forward	Primer (5'-3') Reverse
P194	AGCAGGTGAAAAGCAGAATTGTGTG	AGTTTTCCATTGCCGTTGCAGAG
PCTD17	CCCTCTCACCTGTCTACTG	GTATTCTGGCATTGGTTGT
CMS13	TAGCCTGACTCTATCCATTCTC	ATTATTGGAATCAACTGTAAGG
P132	CAGAGGAGGGACCACTAATGCTGGC	GGGCAAGTGAAGTGAGTGAATGG
YWL40	CACATGACCATGTCCCCTTAT	CCAGTGACAGTGTGACTAAGA
CMS3	GCTCTCTGTGCCTCAATATG	ACCATAGTCTGGGTAGCA
YWLL38	GGCCTAAATCCTACTAGAC	CCTCTCACTCTTGTTCCTC
YWLL44	CTCAACAATGCTAGACCTTGG	GAGAACACAGGCTGGTGAATA
YWLL59	TGTGCAGGAGTTAGGTGTA	CCATGTCTCTGAAGCTCTGGA
YWLL36	AGTCTTGGTGTGGTGGTAGA A	TGCCAGGATACTGACAGTGAT
LCA23	TCACGGCAAAGACGTGAATA	CCAGGAAACACACACCCAC
LCA77	TGTTGACTAGAGCCTTTTCTTTT	GGGCAAGAGAGACTGACTGG
LCA18	TCCACCCATTAGACACAAGC	TAGGAAGCTCCAAGAAGAAAAGAC
YWL46	AAGCAGAGTGATTTAACCGTG	GGATGACTAAGACTGCTCTGA
YWLL08	ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC	CCATGGCATTGTGTTGAAGAC
LGU68	CATCTACATGCCCTGTGTG	TGCAGGGAGGACTAACAGGT
YWLL29	GAAGGCAGGAGAAAAGGTAG	CAGAGGCTAATAACTTGCAG

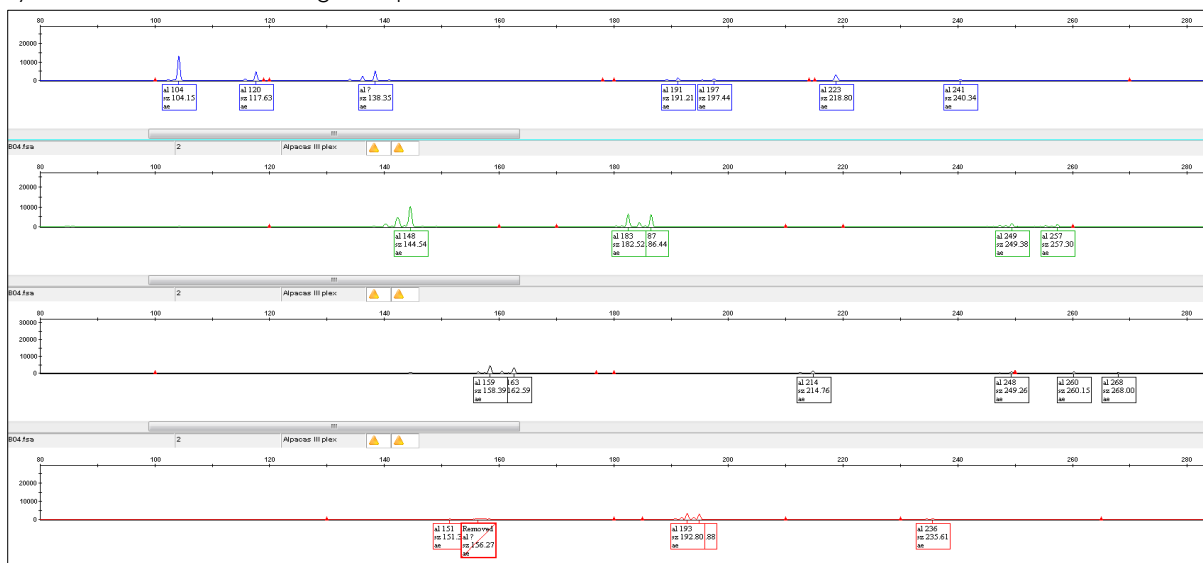
Rycina 2. Panel II – elektroforogram alpaki.



Tabela 4. Panel III - sekwencje starterów.

Locus	Primer (5'-3') Forward	Primer (5'-3') Reverse
LGU83	TCACAAACTTGGAGGAAGCA	ATAGCCCTGGGGTTCATGG
LGU93	CCTGTGGAGCTAGGCCTTC	TTTGAATCCCAGCCTGCTC
LGU76	TTCCITCCATTGAAGCAGGT	TGAGATGCACTGCTTTGGATA
LCA82	CGTGACACCAGGCTAAGTGA	TTTCAGATGGTAGCTTTAAAAATTG
YWLL43-X	ATACCTCTCTTGCTCTCTCTC	CCTCTACAACCATGTTAG CCA
LGU52	GTGGITGGAACCTGCAACTC	TTGGGACCTGCTCCATAAC
VOLP04	GCAITTCCTCCGTAATCATTG	TGACACCTTTTGTTCATT
VOLP03	CGACAGCAAGGCACAGGA	AGACGGITGGGAAGGTGG
VOLP32	GTGATCGGAATGGCTTGA	CAGCGAGCACCTGAAAAGAA
CVRL07	AATACCCTAGTTGAAGCTCTGTCTC	GAGTGCCTTTATAAATATGGGTCTG
LCA68	TCCTGTCTGTGAGAAGGCTG	CCGAAGGAAAAATAAATGGAA
LCA90	TATAACCCTGGTCTCGCAA	CCAAGTAGTATCCATTATGCG
VOLP68	CTGAAGAAAAATTGTTACA	TTGCATGAGTCTATTTAGATA

Rycina 3. Panel III – elektroforogram alpaki.



Metoda została wstępnie zwalidowana i z powodzeniem może zostać wdrożona w poczet usług LGM. Baza DNA IMG Alpaki jest obecnie dopracowywana zgodnie z trzema opracowanymi panelami. W trakcie przygotowania są nowe formaty certyfikatów i ekspertyz DNA dla hodowców.

Zadanie 01-18-29-21

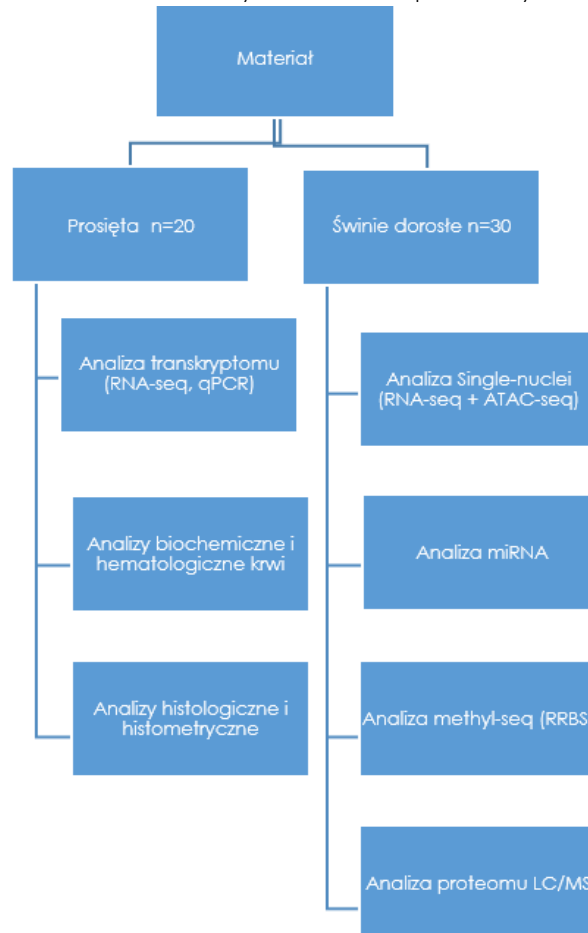
Analiza wpływu suplementacji witaminą D diety świń na procesy molekularne zachodzące w jelitach z zastosowaniem technik omicznych.

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

Celem badań jest ocena zmian transkryptomu oraz ekspresji genów wywołanych suplementacją witaminą D na poziomie różnego typu pojedynczych komórek jelita cienkiego i grubego świni. Uzyskane wyniki pozwolą na identyfikację głównych typów komórek wrażliwych na działanie witaminy D. Uzyskana wiedza pozwoli na lepsze zrozumienie potencjału terapeutycznego witaminy D u zwierząt i ludzi.

Założenia metodyczne

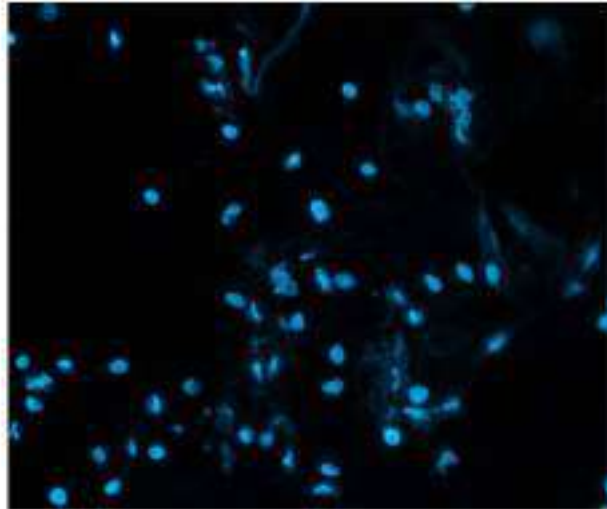
Rycina 1. Założenia metodyczne i schemat planowanych analiz.



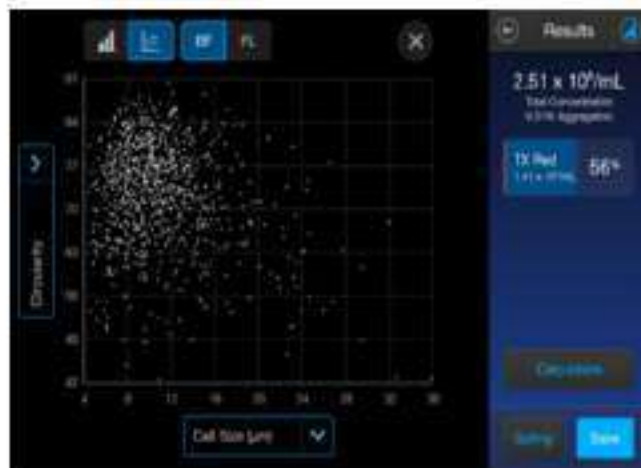
Syntetyczny opis wyników zadania

W roku sprawozdawczym realizowano prace przygotowawcze i eksperymentalne związane z wdrożeniem zaawansowanych technik omicznych zaplanowanych w projekcie. Przeprowadzono serię prób izolacji jąder komórkowych z tkanek jelit świni przeznaczonych do analizy single-nuclei RNA-seq. Do izolacji jąder wykorzystano zestaw Nuclei Isolation Kit firmy 10 x Genomics. Początkowo izolacje wykonywane z fragmentów jelit przechowywanych w temperaturze -80°C charakteryzowały się niską jakością uzyskanych preparatów, zawierających dużą liczbę uszkodzonych jąder oraz zanieczyszczenia komórkowe. Pomimo prób optymalizacji procedury nie udało się poprawić jakości izolatów z tego materiału. Dopiero zastosowanie fragmentów jelit przechowywanych w ciekłym azocie oraz użycie innego zestawu (Minute™ Single Nucleus Isolation Kit for Tissues/Cells) firmy (Invent Biotechnologies inc.) umożliwiło uzyskanie preparatów o wysokiej jakości. Uzyskano około 5 milionów jąder dobrej jakości na mikrolitr, co stanowi ilość wystarczającą do przejścia do kolejnych etapów procedury, obejmujących przygotowanie bibliotek single-nuclei RNA-seq oraz sekwencjonowanie. W trakcie wszystkich procedur izolacji jąder prowadzono obserwacje mikroskopowe i pomiary na urządzeniu Countess (Thermo-fisher Scientific).

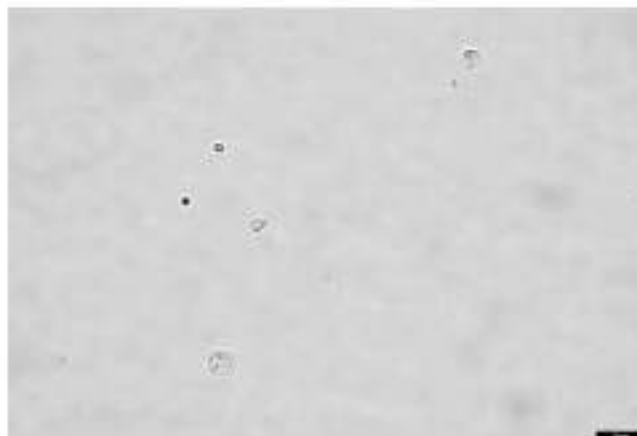
Rycina 2. Zdjęcie mikroskopowe jąder komórkowych, barwionych DAPI, izolowanych z fragmentów jelita, przechowywanych w temp. -80°C .



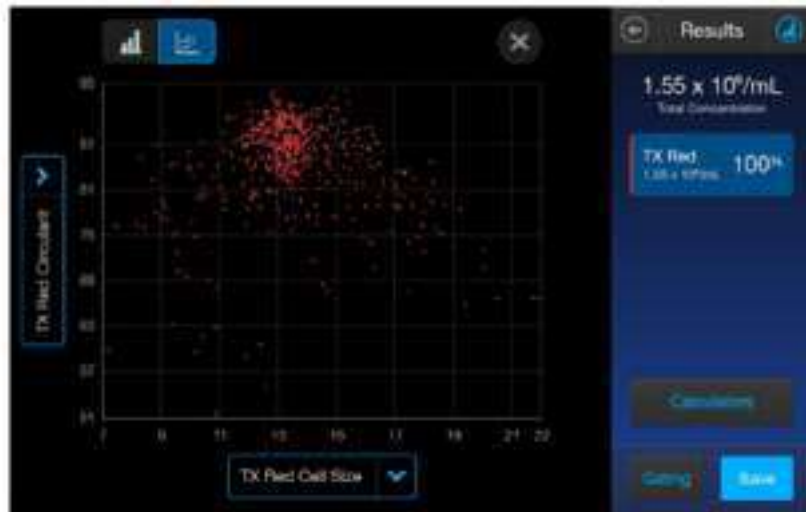
Rycina 3. Izolacja z komórek jelita przechowywanego w temp. -80°C . Wykres parametru „circularity” w stosunku do średnicy komórek wygenerowany na liczniku komórek Countess. Większość obiektów charakteryzuje się niskim parametrem „circularity” $< 80\%$, co wskazuje na degradację jąder.



Rycina 4. Zdjęcie mikroskopowe jąder komórkowych, w jasnym polu, izolowanych z fragmentów jelita przechowywanych w ciekłym azocie. Widoczna ciągłość błony jądrowej.

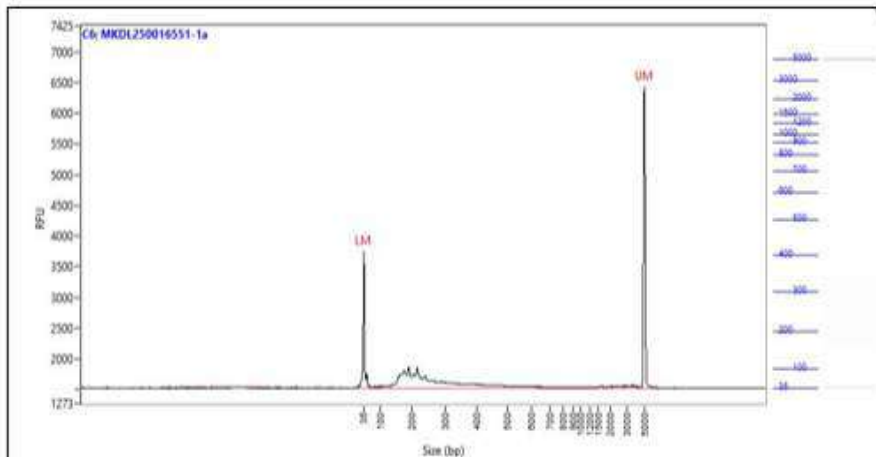


Rycina 5. Izolacja z komórek jelita przechowywanego w ciekłym azocie. Wykres parametru „circularity” w stosunku do średnicy komórek wygenerowany na liczniku komórek Countess. Większość obiektów charakteryzuje się wysokim parametrem „circularity” > 80%, co wskazuje na dobrą jakość jąder.



Równolegle przeprowadzono izolację DNA z trzydziestu próbek jelita cienkiego świń otrzymujących różne dawki witaminy D oraz przygotowano biblioteki RRBS przeznaczone do analizy metylacji DNA. Biblioteki te są obecnie sekwencjonowane w firmie zewnętrznej.

Rycina 6. Obraz biblioteki RRBS wygenerowany na urządzeniu LabChip GX Touch Fragment Analyzer.



Zadanie 01-18-30-11

Baza danych SNP zwierząt gospodarskich – nowoczesne narzędzie do analiz genetycznych i wspomaganie selekcji.

kierownik zadania: dr Agata Pięstrzyńska-Kajtoch

Podążając za nowymi trendami w selekcji zwierząt gospodarskich i towarzyszących w oparciu o kontrolę rodowodów, oznaczanie mutacji powiązanych z chorobami genetycznymi i oznaczanie wariantów genów powiązanych z pożądanymi i niekorzystnymi cechami z zastosowaniem wielkoskalowych metod z zakresu biologii molekularnej, niezwykle istotnym wyzwaniem staje się analiza uzyskiwanych danych.

Celem zadania jest opracowanie i utworzenie bazy danych oraz aplikacji do obsługi tej bazy, co pozwoli analizować dane w zakresie markerów SNP do kontroli rodowodów zwierząt, badań populacyjnych, bioróżnorodności oraz posłuży jako narzędzie do wspomagania selekcji zwierząt w zakresie markerów genetycznych związanych z chorobami genetycznymi i cechami użytkowymi. Umożliwi to zmniejszenie nakładu czasu pracy potrzebnego dotychczas na tego typu analizy, posłuży różnym gatunkom zwierząt i ułatwi opracowanie danych do publikacji naukowych.

Przeprowadzono prace przygotowawcze i opisowe niezbędne do utworzenia bazy danych i aplikacji. Podzielono pracę na etapy realizacji, wyznaczono główne cele prac, opisano oczekiwane funkcje aplikacji, wybrano oprogramowanie do postawienia bazy danych (Microsoft SQL Server) i aplikacji (Microsoft Visual Studio C#).

W ramach realizacji zadania przygotowano szczegółowe opisy poszczególnych modułów aplikacji, z uwzględnieniem funkcjonalności specyficznych dla gatunku. Rozpoczęto prace nad podstawową wersją bazy i aplikacji, a także zakupiono serwer na dane.

Zadanie 01-18-31-11

Genetyka sądowa zwierząt – rozwój nowych metod badawczych dla zwierząt hodowlanych, towarzyszących i wolno żyjących.

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

Genetyka kryminalistyczna (sądowa) zwierząt, w której nacisk kładzie się na gatunki inne niż ludzkie, jest podzielona na dwa główne nurty – nurt dotyczący gatunków zwierząt towarzyszących człowiekowi oraz nurt dotyczący zwierząt wolno żyjących. Obecnie analiza kryminalistyczna to długi, wysoce precyzyjny proces, przeprowadzany w akredytowanych laboratoriach, przez wysoce wyspecjalizowany personel, z zachowaniem najwyższych standardów pracy, zgodnie z wytycznymi międzynarodowymi oraz z zastosowaniem specjalistycznej aparatury. Częścią sieci laboratoriów kryminalistycznych są laboratoria zajmujące się genetyką sądową.

Celem zadania jest opracowanie nowych metod i dostosowanie istniejących metod genetycznych w Laboratorium Genetyki Molekularnej do standardów i wymogów badań genetyki sądowej. W efekcie powstania wyspecjalizowanej Pracowni Genetyki Sądowej Zwierząt, opracowane zostaną nowe metody badań, a już istniejące metody zostaną zaktualizowane i wystandaryzowane.

Laboratorium Genetyki Molekularnej od wielu lat wykonuje ekspertyzy zlecone przez sądy, policję i prokuraturę, wykorzystując genetyczne metody identyfikacji osobniczej i gatunkowej. Najczęściej sprawy dotyczą kradzieży zwierząt, kłusownictwa, znęcania się nad zwierzętami, wypadków drogowych z udziałem zwierząt i pogryzień przez psy lub wilki. Rozpoczęto prace nad dostosowaniem metod identyfikacji osobniczej i gatunkowej do wymogów badań genetyki sądowej. Rozbudowano i zaktualizowano rejestr ekspertyz sądowych. Przygotowano i ujednolicono kartę pracy do badań ekspertyz sądowych. Wydzielono, opisano i częściowo przygotowano stanowiska do badań w ramach ekspertyz sądowych. Zakupiono wyposażenie, które umożliwi rozpoznawanie elementów/fragmentów materiałów dowodowych zawierających ślady materiału biologicznego i właściwe pobranie materiału do badań oraz pobieranie materiału biologicznego z wnętrza zębów i kości.

Rycina 1. Pobieranie materiału biologicznego do analiz z fragmentu kości zwierzęcej i śladów biologicznych.



Przetestowano kilka metod izolacji DNA z kości, ściółki i fragmentów tkanek dopracowując protokoły do takiej analizy i wybierając warianty metod, które pozwalają otrzymać DNA o możliwie najwyższym stężeniu i najlepszych parametrach jakościowych. Rozpoczęto szkolenie nowych techników do izolacji materiału genetycznego ze śladów biologicznych. W kolejnych etapach powstaną gotowe, opisane instrukcje do tych zastosowań.

Rycina 2. Porównanie markerów genetycznych (mikrosatelitarnych – STR) dwóch różnych próbek DNA jeleni pochodzących z dwóch różnych śladów biologicznych (tkanka i ślady krwi).



Zadanie 01-18-32-21

Kompleksowa analiza wpływu CBD na mechanizmy epigenetyczne związane z patogenezą sarkoidu końskiego.

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

Celem realizowanego zadania była ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na epigenom komórek sarkoidu końskiego, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w poziomie metylacji DNA oraz profilu ekspresji mikroRNA (miRNA), które mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju i progresji tego nowotworu.

Prowadzone badania mają na celu określenie charakteru, kierunku oraz intensywności zmian epigenetycznych indukowanych przez CBD w zależności od zastosowanej dawki oraz czasu inkubacji komórek nowotworowych. Hipoteza badawcza zakłada, że podawanie kannabidiolu wywołuje zmiany w epigenomie komórek sarkoidu końskiego, w tym w globalnym wzorcu metylacji DNA oraz profilu ekspresji miRNA, co może prowadzić do modulacji szlaków związanych z proliferacją, apoptozą i inwazyjnością komórek nowotworowych, a ich intensywność i profil będą zależę od dawki i czasu podania.

Kannabidiol to jeden z głównych związków chemicznych występujących w konopiach (*Cannabis sativa*), należący do grupy kannabinoidów. W przeciwieństwie do bardziej znanego tetrahydrokannabinolu (THC), CBD nie wykazuje działania psychoaktywnego. Istniejący stan wiedzy wskazuje, że CBD może wpływać na epigenom komórek nowotworowych poprzez modulację metylacji DNA i ekspresji miRNA. Te efekty epigenetyczne mogą przyczyniać się do zahamowania proliferacji, indukcji apoptozy i zmniejszenia zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych.

Chociaż obecne badania *in vitro* dostarczają obiecujących wyników, potrzebne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć mechanizmy działania CBD i jego potencjalne zastosowanie w terapii nowotworowej. Zrozumienie wpływu CBD na epigenom komórek nowotworowych, takich jak komórki sarkoidu końskiego, może dostarczyć nowych danych na temat mechanizmów działania tego kannabinoidu.

Sarkoidy końskie, to najczęstszy typ nowotworu skóry u koni, o charakterze lokalnie inwazyjnym. Chociaż istnieją różne terapie, ich skuteczność jest ograniczona, a nawroty częste. Wyniki proponowanych badań dotyczących analizy wpływu CBD na zmiany w metylacji DNA oraz regulację ekspresji miRNA, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie nowotworów, przyczynić się mogą w przyszłości do rozwoju nowych terapii dla sarkoidów końskich.

Badania w ramach zadania przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli komórkowych sarkoidów końskich traktowanych różnymi dawkami kannabidiolu (20.0, 6.75 oraz 0.75 μM) oraz inkubowanych przez 6 h, 24 h i 48 h. Analizę zmian epigenetycznych zaplanowano w oparciu o wysokoprzepustowe techniki sekwencjonowania nowej generacji. Do oceny globalnych zmian metylacji DNA zastosowano metodę RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing).

Równolegle zaplanowano analizę profilu ekspresji mikroRNA metodą miRNA-seq, pozwalającą na identyfikację miRNA potencjalnie zaangażowanych w regulację szlaków związanych z proliferacją, apoptozą i inwazyjnością komórek nowotworowych.

Wykonano analizę zmian poziomu metylacji DNA w 108 zabezpieczonych próbach w postaci izolatów DNA, wyizolowanych z hodowli komórkowych sarkoidów końskich traktowanych CBD. Biblioteki typu RRBS przygotowano z wykorzystaniem zestawu Zymo-Seq RRBS Library Kit (Zymo Research). Jakość przygotowanych bibliotek oceniono przy użyciu aparatu TapeStation, natomiast ilościową ocenę przeprowadzono metodą fluorymetryczną z zastosowaniem aparatu Qubit. Biblioteki doprowadzono do stężenia 4 nM, połączono w dwie pule z uwzględnieniem sekwencji indeksujących, a następnie poddano sekwencjonowaniu na płatformie NovaSeq X Plus (Illumina), stosując tryb podwójnego odczytu (paired-end) o długości 150 nukleotydów. Równolegle, w ramach przygotowań do drugiego etapu badań, przeprowadzono testy zestawów odczynników przeznaczonych do przygotowania bibliotek miRNA-seq. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano zestaw NEBNext® Low-bias Small RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) jako najbardziej odpowiedni do dalszej analizy profilu ekspresji mikroRNA w badanym modelu.

Zrealizowane prace umożliwiły skuteczne przygotowanie i sekwencjonowanie bibliotek RRBS, stanowiących podstawę do szczegółowej analizy zmian metylacji DNA indukowanych przez kannabidiol w komórkach sarkoidu końskiego.

Ponadto przeprowadzone testy metodyczne pozwoliły na wybór optymalnej strategii przygotowania bibliotek miRNA-seq.

Zadanie 04-18-19-21

Optymalizacja metody identyfikacji białek, peptydów i modyfikacji posttranslacyjnych (PTMs) z wykorzystaniem spektrometrii mas.

kierownik zadania: dr Grzegorz Smolucha

Celem realizowanego zadania jest optymalizacja metod identyfikacji białek, peptydów oraz modyfikacji potranslacyjnych (PTMs) z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Wszystkie prace w roku sprawozdawczym koncentrowały się na kluczowych etapach procedury analitycznej, obejmujących przygotowanie próbek, optymalizację warunków chromatograficznych i spektrometrycznych oraz wstępną analizę danych MS/MS.

Na etapie przygotowania próbek porównano różne buforę lizujące i metody homogenizacji pod kątem wydajności izolacji białek oraz stabilności PTMs.

Wyniki wykazały istotny wpływ zastosowanych warunków na zachowanie modyfikacji potranslacyjnych, co pozwoliło wybrać procedurę zapewniającą optymalny kompromis pomiędzy wydajnością, czystością próbki i integralnością PTMs. Optymalizacja warunków chromatograficznych wykazała, że wydłużenie gradientu elucji prowadzi do wzrostu liczby zidentyfikowanych peptydów oraz poprawy stabilności czasów retencji. Najlepsze parametry uzyskano dla gradientu 90-minutowego i przepływu 300 nL/min, które przyjęto jako standardowe warunki dalszych analiz. Równolegle zoptymalizowano parametry pracy spektrometru mas Exploris 240, co przełożyło się na poprawę jakości widm MS/MS oraz skuteczniejszą lokalizację miejsc modyfikacji potranslacyjnych. Analiza porównawcza trybów akwizycji danych DDA i DIA wskazała na przewagę trybu DIA w zakresie pokrycia proteomu i powtarzalności ilościowej. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszej walidacji metody na próbkach biologicznych w kolejnych etapach realizacji zadania.

Zadanie 04-18-20-21

Molekularne podstawy cech starzenia na przykładzie linii komórkowych wywodzących się z chrząstki stawowej.

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

Programowana śmierć komórek (apoptoza) pozwala na eliminację źle funkcjonujących komórek z organizmu, podczas gdy proces starzenia komórkowego (senescencji) utrzymuje uszkodzone komórki bez podziałów, zachowując ich metabolizm. Opisany proces senescencji komórek jest przyczyną szeregu chorób wieku podeszłego, ze względu na fakt, że takie komórki kumulują się wraz z wiekiem.

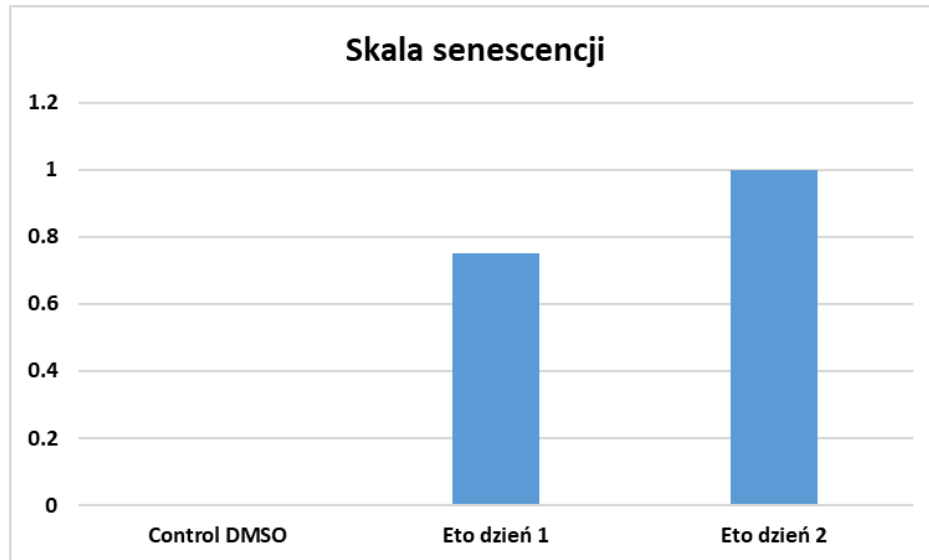
Z drugiej strony wykazano, że proces senescencji komórek zmienionych nowotworowo, może hamować rozwój nowotworu, stanowiąc kolejną alternatywę w terapii antynowotworowej. Dostępnym problemem jest fakt, że rezultaty indukowania senescencji komórkowej są specyficzne dla określonych typów komórek.

Celem wstępnego podejścia była weryfikacja efektu starzenia komórkowego, po zastosowaniu inhibitora topoizomeryzy II (etopozyd) w linii komórkowej chrząstki stawowej z wykorzystaniem danych analizy transkryptomu. Komórki chrząstki stawowej hodowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 100% dostępu tlenu przez 7 dni. Następnie komórki traktowano etopozydem pierwszego, drugiego i dziewiątego dnia inkubacji. Równolegle, jako kontrolę utrzymywano komórki traktowane DMSO. Na każdym etapie pobierano 1 mln komórek do przygotowania RNA, które wykorzystywano do produkcji bibliotek typu poli-A, z przeznaczeniem do procedury sekwencjonowania transkryptomu.

Analiza RNA-seq komórek poddanych działaniu etopozydem wykazała szerokie zmiany transkryptyczne zgodne z efektami starzenia komórkowego indukowanymi inhibitorem

topoizomerazy II (wynik analizy SENCAN) – Wykres 1. Jednakże bliższe badanie ilości transkryptu w *loci* kluczowych genów markerowych apoptozy, odpowiedzi na uszkodzenia DNA i wrażliwości na etopozyd, wskazało na profil bardziej zgodny z apoptozą niż z senescencją komórkową. Trwają dalsze badania mające na celu określenie znaczenia zastosowanej stymulacji.

Wykres 1. Zakres starzenia się komórek linii chrzęstniakomięsa po traktowaniu etopozydem, na podstawie profilowania ekspresji genów metodą sekwencjonowania RNA.



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

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 Trzcńska, prof. IZ PIB

Badania realizowano w obszarze biologii rozrodu psowatych, w których pies domowy (*Canis lupus familiaris*) stanowił model badawczy umożliwiający opracowanie metodyki badań komórek plemnikowych zwierząt dziko żyjących, w tym m.in. wilka (*Canis lupus*), lisa rudego (*Vulpes vulpes*), jenota (*Nyctereutes procyonoides*).

Opracowane rozwiązania obejmowały zarówno metody długoterminowego zabezpieczania materiału biologicznego (kriokonserwacja), jak i krótkoterminowe metody przechowywania nasienia (chłodzenie).

W przypadku badań dotyczących długoterminowego przechowywania nasienia ich celem było opracowanie składu rozcieńczalnika pozbawionego żółtka jaja kurzego, którego stosowanie wiąże się z istotnymi ograniczeniami praktycznymi, które obejmują przede wszystkim ryzyko biologiczne, mogące utrudniać międzynarodową wymianę materiału biologicznego.

W przeprowadzonych badaniach analizie poddano 10 ejakulatów psów, porównując skuteczność standardowego rozcieńczalnika Tris-Citric-Fructose z dodatkiem żółtka jaja (TCF-EY) z rozcieńczalnikami zawierającymi asolecytynę sojową w stężeniach 0,05% (Asol 0.05%) oraz 0,5% (Asol 0.5%). Analizie poddano parametry jakości nasienia świeżego oraz nasienia po kriokonserwacji, obejmujące ruchliwość plemników, aktywność mitochondrialną oraz poziom stresu oksydacyjnego. Analiza parametrów ruchliwości plemników wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami wyłącznie w zakresie ruchu całkowitego. Najwyższe wartości tego parametru odnotowano w próbkach kriokonserwowanych z użyciem rozcieńczalnika TCF-EY, natomiast istotnie niższe wartości stwierdzono w przypadku rozcieńczalnika zawierającego asolecytynę sojową w stężeniu 0,5%. Wartości uzyskane dla stężenia 0,05% charakteryzowały się pośrednim poziomem.

W odniesieniu do ruchu postępowego plemników nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Ocena żywotności plemników wykazała brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbkami kriokonserwowanymi z zastosowaniem rozcieńczalnika żółtkowego oraz rozcieńczalników opartych na asolecytynie sojowej, niezależnie od zastosowanego stężenia. Ocena aktywności mitochondrialnej wykazała, że w przypadku subpopulacji plemników MT⁻/PI⁺ oraz MT⁺/PI⁺ nie występowały istotne różnice pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami. Natomiast odsetek plemników MT⁺/PI⁻, charakteryzujących się aktywnymi mitochondriami oraz nienaruszoną błoną komórkową, był istotnie wyższy w próbkach kriokonserwowanych z użyciem rozcieńczalnika TCF-EY w porównaniu do obu rozcieńczalników zawierających asolecytynę sojową ($p < 0,05$). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy stężeniami asolecytyny 0,05% i 0,5%. Analiza stresu oksydacyjnego wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami w obrębie subpopulacji CellROX⁺/DRD⁺, gdzie próbki kriokonserwowane z użyciem rozcieńczalnika zawierającego 0,05% asolecytyny sojowej różniły się istotnie od próbek TCF-EY oraz Asol 0,5% ($p < 0,05$).

W przypadku subpopulacji CellROX⁻/DRD⁻ stwierdzono istotne różnice pomiędzy rozcieńczalnikiem TCF-EY a rozcieńczalnikami zawierającymi asolecytynę, natomiast nie wykazano różnic pomiędzy stężeniami 0,05% i 0,5%.

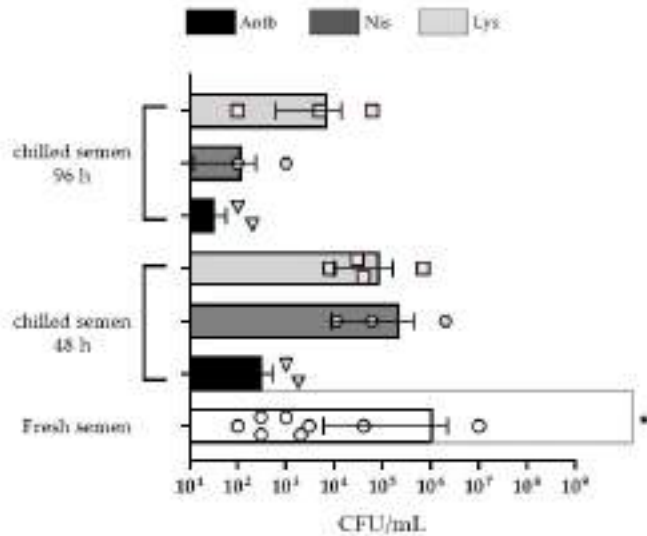
Dla subpopulacji CellROX⁺/DRD⁻ nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Doświadczenia realizowane w ramach doskonalenia procesu krótkoterminowego chłodzenia nasienia psowatych miały na celu ocenę statusu mikrobiologicznego ejakulatów oraz skuteczności działania bakteriostatycznego rozcieńczalników. Stosowanie antybiotyków w rozcieńczalnikach nasienia jest standardową praktyką mającą na celu zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego materiału przeznaczonego do inseminacji. Jednak narastająca antybiooporność bakterii stanowi istotne wyzwanie, uzasadniające poszukiwanie alternatywnych strategii ograniczania kontaminacji mikrobiologicznej. Analizie mikrobiologicznej poddano 15 ejakulatów, ocenianych zarówno w postaci nasienia świeżego (po pobraniu), jak i po krótkoterminowym przechowywaniu w temperaturze 4°C przez 48 oraz 96 godzin.

Na każdym etapie czasowym przeprowadzono równoległą ocenę jakości nasienia, obejmującą: ruchliwość plemników, morfologię, integralność błony komórkowej, aktywność mitochondrialną, poziom reaktywnych form tlenu (ROS) oraz stopień fragmentacji DNA. Porównano skuteczność bakteriostatyczną oraz wpływ na jakość nasienia rozcieńczalników zawierających antybiotyki (Antb) oraz rozcieńczalników opartych na peptydach o właściwościach bakteriostatycznych, tj. lizozymie (500 µg/ml; Lys) oraz nizynie (50 µg/ml; Nis). Badania posiewowe wykazały brak wzrostu bakterii w przypadku 40% próbek świeżego nasienia, a najczęściej wykrywano bakterie *Streptococcus* spp. Antybiogram wykazał antybiooporność w niektórych próbkach nasienia świeżego na: Penicylinę G, Streptomycynę, Tetracyklinę oraz Amoksyliny z kwasem klawulanowym.

Przedstawione informacje uzasadniają celowość badania alternatywnych dla antybiotyków substancji bakteriostatycznych. Testowane stężenia lizozymu i nizyny nie wykazały działania cytotoksycznego (wartości ocenianych parametrów jakości nasienia nie były istotnie różne między badanymi grupami). Jednak wykazano, że bakteriostatyki były mniej skuteczne w ograniczaniu liczby kolonii na mililitr (CFU/ml) bakterii *Streptococcus* i *Staphylococcus* w porównaniu z antybiotykami, a wartość CFU/ml była osobniczo zróżnicowana (Rycina 1.).

Lizozym i nizyna wykazują potencjał bakteriostatyczny w rozcieńczalnikach do krótkoterminowego przechowywania nasienia, a ze względu na fakt, iż testowane peptydy antybakteryjne (AMPs) nie wykazują efektów cytotoksycznych wobec komórek plemnikowych, ich aktywność wobec *Streptococcus* i *Staphylococcus* powinna być oceniona przy wyższych stężeniach.

Rycina 1. Wartości kontaminacji bakteryjnej w nasieniu świeżym oraz poddanym chłodzeniu w badanych rozcieńczalnikach. Różne kolory słupków oznaczają różne rozcieńczalniki. CFU/ml: jednostki tworzące kolonie na mililitr próbki; różne kształty przedstawiają wartości CFU/ml w próbkach od poszczególnych osobników i pokazują zmienność obciążenia bakteryjnego między próbkami. Różnica istotna statystycznie przy $p = 0,03$.



W ramach realizacji zadania przeprowadzono również badania porównawcze na modelach dzika (*Sus scrofa*) oraz świni domowej (*Sus scrofa domestica*), obejmujące analizę ekspresji genów i białek *ADIPOQ*/adiponektyny oraz jej receptorów *ADIPOR1*/AdipoR1 i *ADIPOR2*/AdipoR2, a także *NAMPT*/wisfatyny i jej receptorów *INSR* oraz *TLR4*, w mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSCs) oraz adipocytach (ADMs) uzyskanych w wyniku różnicowania MSCs, wyizolowanych z tkanki tłuszczowej dzika i świni ($n = 5$).

Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w ekspresji *ADIPOQ* zależne zarówno od pochodzenia biologicznego, jak i typu komórek. U świni domowej wykazano statystycznie wyższą ekspresję genu *ADIPOQ* w mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSCs) w porównaniu do adipocytów (ADMs), co sugeruje istotną rolę adiponektyny już na etapie komórek prekursorowych. W przypadku dzika nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji genu pomiędzy MSCs a ADMs. Analiza porównawcza wykazała, że najwyższy poziom ekspresji *ADIPOQ* występował w MSCs świni. Taką zależność obserwowano również na poziomie białka adiponektyny. W przypadku ekspresji genu *ADIPOR1* stwierdzono istotnie wyższe poziomy w adipocytach (ADMs) zarówno u świni, jak i dzika, w porównaniu do MSCs. Analiza poziomu białka AdipoR1 nie odzwierciedlała w pełni wyników uzyskanych na poziomie mRNA. Wykazano, że ekspresja białka AdipoR1 w MSCs i ADMs świni oraz w MSCs dzika utrzymywała się na porównywalnym poziomie, natomiast w adipocytach dzika była istotnie niższa względem pozostałych grup. Ekspresja mRNA *ADIPOR2* oraz poziom białka AdipoR2 wykazywały zbliżony wzorzec regulacji zarówno w komórkach pochodzących od dzika, jak i świni domowej, charakteryzujący się wyższą ekspresją w adipocytach w porównaniu do MSCs. Analiza ekspresji mRNA *NAMPT* w komórkach pochodzących od świni domowej i dzika wykazała jej wyższy poziom w adipocytach w porównaniu do MSCs. Identyczną zależność w ekspresji białka wisfatyny, zaobserwowano pomiędzy ADMs i MSCs dzika, przy czym nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi typami komórek świni. Ekspresja mRNA *INSR* wykazywała podobną tendencję jak w przypadku *NAMPT*. Zaobserwowano istotnie wyższy poziom transkryptu *INSR* w adipocytach w porównaniu do mezenchymalnych komórek macierzystych, niezależnie od pochodzenia biologicznego komórek. Jednocześnie nie odnotowano istotnych

różnic w ekspresji mRNA receptora pomiędzy komórkami pochodzącymi od dzika i świni domowej.

Z kolei analiza prążków wraz z pomiarem densytometrycznym wykazały spójność wyników, dotyczących ekspresji białka INSR, z tymi otrzymanymi dla ekspresji mRNA tylko w kontekście prób, pochodzących od świni. Natomiast dla dzika zaobserwowano odmienną tendencję w przypadku badanych parametrów. Na poziomie białka INSR stwierdzono różnice zależne od pochodzenia biologicznego komórek; istotnie wyższy poziom białka odnotowano w mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSCs) pochodzących od dzika oraz w adipocytach pochodzących od świni domowej. W przypadku receptora TLR4 ekspresja jego mRNA nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy MSCs i ADMs, ani pomiędzy komórkami pochodzącymi od dzika i świni domowej. Podobnie, nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie białka TLR4 pomiędzy MSCs i ADMs w obrębie każdego z analizowanych modeli biologicznych. Niemniej jednak, analiza porównawcza wykazała istotnie wyższą ekspresję białka TLR4 zarówno w MSCs, jak i ADMs pochodzących od świni domowej w porównaniu do komórek pochodzących od dzika.

Zadanie 01-19-14-11

Wykorzystanie modelu bi-transgenicznej świni in vivo w określeniu biokompatybilności nowych materiałów zastosowanych do elektro-przędzenia siatek stosowanych w chirurgicznym leczeniu wypadania narządów miednicy mniejszej (POP).

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

Celem zadania jest zbadanie biokompatybilności nowo zastosowanych materiałów do produkcji wszczepialnych siatek, których przydatność w chirurgicznym leczeniu wypadania narządów miednicy mniejszej (POP – *pelvic organ prolapse*) będzie testowana na modelu transgenicznych świń – *in vivo*. Podyktowane jest to faktem, iż dotychczas stosowane implanty siatkowe w chirurgicznym leczeniu wypadających narządów miednicy mniejszej (macicy, pochwy czy pęcherza moczowego), są wykonane z polipropylenu. Materiał ten może erodować i twardnieć, przecinając tkankę i powodując poważny ból. Jest to przyczyną poważnego dyskomfortu i może prowadzić do powikłań wymagających ponownej interwencji chirurgicznej. Proponowane badania mają na celu zbadanie biokompatybilności nowych materiałów wyprodukowanych metodą elektro-przędzenia, jako implantów siatkowych i zbadanie ich funkcjonalnej bio-przydatności, w odniesieniu do implantu siatkowego wykonanego z polipropylenu.

W celu zrealizowania pierwszego etapu zaplanowanych badań, w Katedrze Metaloznawstwa i Metalurgii Proszków AGH, po przeprowadzeniu testów biokompatybilności na komórkach somatycznych, zostały wyłonione trzy warianty polimerów: poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Sigma-Aldrich, UK), poly(L-lactic acid) (PLLA) oraz poli(l-laktyd-ko- ϵ -kaprolakton) (PLCL) (Corbion, The Netherlands). W następnym etapie, polimery poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Sigma-Aldrich, UK), poly(L-lactic acid) (PLLA) oraz poli(l-laktyd-ko- ϵ -kaprolakton) (PLCL) (Corbion, The Netherlands) suszono przez 4 godziny w temperaturze $T = 30^{\circ}\text{C}$ w laboratoryjnej suszarce (Pol-Eko, Polska). Roztwory polimerów PCL, PLLA i PLCL o stężeniach odpowiednio 8%, 9% i 10% wagowych przygotowano poprzez rozpuszczenie odmierzonej ilości polimeru z chloroformem, kwasem octowym i metanolem (wszystkie rozpuszczalniki Avantor, Polska) w stosunku 8:1:1 wagowo. Roztwory mieszano w temperaturze $T=25^{\circ}\text{C}$ i przy 400 obr./min za pomocą mieszadła magnetycznego (IKA, Niemcy).

Proces elektroprzędzenia przeprowadzono przy użyciu urządzenia wyposażonego w komorę klimatyczną (IME Technologies, Holandia). Parametry elektroprzędzenia włókien zesta-

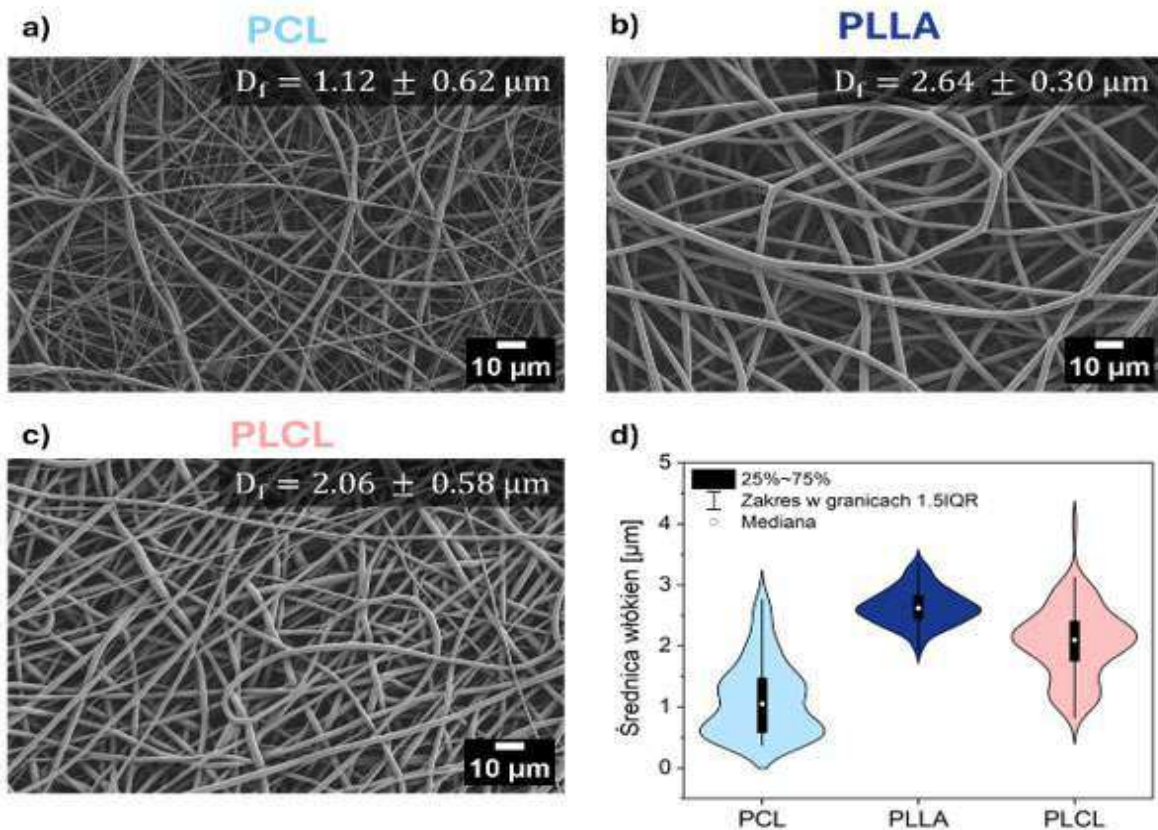
wiono w Tabeli 1. Włókna odkładano na papierze na obrotowym kolektorze (50 obr./min) aż do uzyskania maty o grubości ~ 50-70 μm .

Tabela 1. Parametry elektropzędzenia włókien PCL, PLLA i PLCL.

Próbka	Napięcie [kV]	Przepływ roztworu [mlh^{-1}]	Odległość dysy od kolektora [cm]	Wilgotność względna [%]	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
PCL	15	5	18	40	25
PLLA		3.5			
PLCL		3			

W rezultacie przeprowadzonych prac uzyskano trzy rodzaje elektropzędzonych rusztowań włóknistych PCL, PLLA i PLCL. Dodatkowo morfologia włókien została przeanalizowana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (SEM, Merlin Gemini II, ZEISS, Germany). Obrazy SEM ujawniły jednolitą, gładką powierzchnię włókien bez obecności defektów, mokrych plam polimeru oraz porów (Figura 1. a-c). Średnia średnica włókien wynosiła odpowiednio $1.12 \pm 0.62 \mu\text{m}$, $2.64 \pm 0.30 \mu\text{m}$ oraz $2.06 \pm 0.58 \mu\text{m}$ dla próbki PCL, PLLA i PLCL. Rozkład średnic włókien przedstawiono na Figurze 1. d.

Figura 1. Obrazy SEM włókien: a) PCL, b) PLLA, c) PLCL; d) rozkład średnic włókien PCL, PLLA i PLCL (D_f – średnia średnica włókien).



Na potrzeby realizacji zadania przygotowanych zostało 45 implantów – po 15 dla każdego z wybranych materiałów. Ustalono i opracowano protokół sterylizacji implantów przed wszczepieniem.

Zadanie 04-19-15-11*Opracowanie metod krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni.***kierownik zadania: dr Magdalena Bryła**

Krótko- i długoterminowo zabezpieczone nasienie trutni pszczoły miodnej stanowi rezerwową pulę genetyczną, która może być wykorzystywana zarówno w bieżącej pracy hodowlanej, jak i w sytuacjach zagrożeń, takich jak epidemie chorób pszczoł, zmiany klimatyczne czy inne czynniki środowiskowe obniżające kondycję i liczebność rodzin pszczelich.

Zastosowanie do inseminacji nasienia przechowywanego (krótkoterminowo) lub kriokonserwowanego (długoterminowo) umożliwia bardziej elastyczne zarządzanie hodowlą, zwiększa bezpieczeństwo programu selekcyjnego oraz ogranicza zależność od sezonowej dostępności dojrzałych płciowo trutni oraz zmiennej jakości pozyskiwanego materiału biologicznego.

Cel zadania

Celem zadania było opracowanie składu rozcieńczalnika do krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni oraz kompleksowej technologii kriokonserwacji pozwalającej na efektywne kriogeniczne zabezpieczenie materiału biologicznego pszczoły miodnej.

Założenia metodyczne

Materiał doświadczalny stanowiło nasienie trutni pobrane w sposób manualny od samców w wieku 14-21 dni, w okresie od czerwca do sierpnia 2025 roku. Nasienie po pobraniu od 10 trutni było łączone w jeden ejakulat, który następnie rozcieńczano i analizowano na podstawie podstawowych jak i funkcjonalno-strukturalnych parametrów jakościowych plemników. Nasienie rozcieńczano w opracowanych rozcieńczalnikach do konserwacji w stanie płynnym oraz w rozcieńczalnikach mroźniowych. Następnie rozcieńczone nasienie umieszczano w mini słómkach, bez dostępu powietrza i światła w temperaturze dodatniej w zakresie 15-17°C oraz w mini słómkach 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 następujące parametry jakościowe: morfologię, ruchliwość, rodzaj ruchu, żywotność, integralność błon plazmatycznych, strukturę chromatyny plemnikowej.

Szczegółowy opis przeprowadzonych prac

1. Przygotowano rodziny pszczele do wychowu zwiększonej liczby trutni poprzez dodanie ramek z węzłą trutową oraz poszerzenie gniazda, co umożliwiło intensyfikację czerwienia trutowego. Rodziny wzmocniono i zapewniono odpowiednie warunki pokarmowe, wspierając rozwój dojrzałych płciowo trutni. Przeprowadzono selekcję materiału ojcowskiego w celu pobierania materiału biologicznego od dojrzałych płciowo owadów w okresie od czerwca do sierpnia. W 2025 roku pobrano nasienie od około 2 000 dojrzałych płciowo trutni.
2. Przy opracowaniu rozcieńczalnika do krótkoterminowego przechowywania nasienia trutni testowano różne stężenia soli sodowej kwasu hialuronowego, resveratrolu oraz mleczka pszczelego (RJ). Po rozcieńczeniu nasienia natywnego w przygotowanych rozcieńczalnikach umieszczano w mini słómkach, bez dostępu powietrza i światła przez 7, 14, 21 dni w temperaturze dodatniej w zakresie 15-17°C.

3. Przy opracowaniu skład rozcieńczalnika mroźniowego testowano różne stężenia soli sodowej kwasu hialuronowego, resveratrolu, L-karnityny oraz mleczka pszczelego. Wybrano technologię kriokonserwacji nasienia trutni w mini słomkach, zamrażanych metodą manualną poprzez stopniowe obniżanie temperatury w kontrolowanych warunkach, z zastosowaniem krioprotektantów chroniących plemniki przed uszkodzeniami wywołanymi formowaniem się kryształów lodu. Proces obejmował etap schładzania, równoważenia z krioprotektantem, zamrażania w parach ciekłego azotu oraz końcowe przechowywanie materiału w ciekłym azocie w temperaturze -196°C .
4. Przeprowadzono ocenę podstawowych parametrów jakościowych nasienia z wykorzystaniem systemu SCA® CASA Sperm Class Analyzer, mikroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej w nasieniu świeżym, po konserwacji w dodatnich temperaturach w 7., 14., 21. dniu oraz po procedurze zamrażania-rozmrażania.

Syntetyczny opis wyników

W nasieniu świeżym średnia ruchliwość plemników wynosiła średnio $98,75 \pm 4,35$, podczas gdy po 7 dniach przechowywania wahała się w przedziale od $92,33 \pm 1,90$ do $90,53 \pm 4,50$; a po 14 dniach przechowywania w przedziale od $90,61 \pm 1,94$ do $88,52 \pm 3,02$ w zależności od zastosowanego wariantu rozcieńczalnika. Średnia ruchliwość plemników po procedurze zamrażania-rozmrożenia w zależności od zastosowanego dodatku do rozcieńczalnika mroźniowego wahała się w przedziale od $77,23 \pm 5,51$ do $66,40 \pm 4,62$ w stosunku do odsetka plemników ruchliwych ($55,67 \pm 3,12$) w rozcieńczalniku kontrolnym. Odsetek plemników z wadami główki i wtki 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 $2,21 \pm 0,46\%$ w nasieniu świeżym, a w nasieniu kriokonserwowanym wynosi $4,9 \pm 1,04\%$. Analiza struktury chromatyny plemnikowej wykazała średni odsetek plemników prawidłowych na poziomie ponad 98% w nasieniu świeżym, 93% w nasieniu przechowywanym oraz ponad 88% w nasieniu kriokonserwowanym. Wprowadzenie dodatków do rozcieńczalnika stosowanego w krótko- i długoterminowym przechowywaniu nasienia trutni istotnie poprawiło jego parametry jakościowe względem kontroli. Spośród testowanych wariantów najwyższe wartości ocenianych wskaźników uzyskano po zastosowaniu resveratrolu oraz mleczka pszczelego.

Zadanie 04-19-16-21 (d. 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

W ramach realizacji zadania badano wpływ związku terapeutycznego ST-437, należącego do grupy imidazoli, na proces chondrogenyzy *in vitro* u świni domowej (*Sus scrofa domestica*).

Związek ST-437 podano w formie sferycznych nanocząstek, stanowiących potencjalny nośnik o właściwościach sprzyjających kontrolowanemu dostarczaniu substancji aktywnej do komórek. ST-437 zsyntetyzowano w *Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia*.
Badania

wykonano przy użyciu modelu komórkowego *in vitro* opartego na komórkach pochodzenia chrzęstnego ($n = 3$).

Przeprowadzone badania miały na celu kompleksową ocenę efektów działania ST-437 na proces chondrogenyzy i obejmowały charakterystykę linii mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), barwienie błękitem alcjanowym, analizę cyklu komórkowego, ocenę morfologii oraz analizę ekspresji genów związanych z apoptozą i stresem oksydacyjnym.

Ocena morfologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych oraz przebiegu hodowli *in vitro* została przeprowadzona metodą obserwacji mikroskopowej, wykonywaną podczas rutynowej wymiany pożywki hodowlanej, a także na etapie zakończenia hodowli, tuż przed zabezpieczeniem materiału biologicznego do dalszych analiz molekularnych. Monitorowano hodowle trzech niezależnych linii komórkowych wyizolowanych od osobników świni domowej, które poddano działaniu badanego terapeutyku ST-437 – w trzech wariantach dawkowania: 0 nM – próba kontrolna (bez dodatku terapeutyku); 0,001 nM oraz 0,01 nM. W początkowej fazie hodowli (pierwsze dni ekspozycji), zaobserwowano wyraźnie zwiększoną liczbę komórek martwych w warunkach, w których zastosowano wyższe stężenie ST-437 (0,01 nM). Komórki te wykazywały cechy degeneracyjne, takie jak zaokrąglenie, oderwanie od podłoża oraz zmniejszona przejrzystość cytoplazmy. Wraz z przedłużeniem czasu ekspozycji obserwowano zmniejszenie liczby obumarłych komórek, co może wskazywać na adaptację komórek do obecności związku terapeutycznego.

W przypadku hodowli komórkowych prowadzonych równolegle w warunkach różnicowania w kierunku chondrocytów, nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu dodatku ST-437 niezależnie od zastosowanego stężenia na morfologiczne oznaki chondrogenyzy. Komórki w tych warunkach tworzyły wyraźne skupiska, a ich kształt i ułożenie wskazywały na prawidłowo przebiegający proces różnicowania, bez opóźnień lub zahamowania.

Potwierdzenie zdolności różnicowania komórek MSCs w kierunku chondrocytów przeprowadzono za pomocą swoistego barwienia błękitem alcjanowym. Na podstawie obserwacji hodowli komórkowych oraz dokumentacji fotograficznej (Rycina 1.) określono zdolności linii komórkowych do różnicowania.

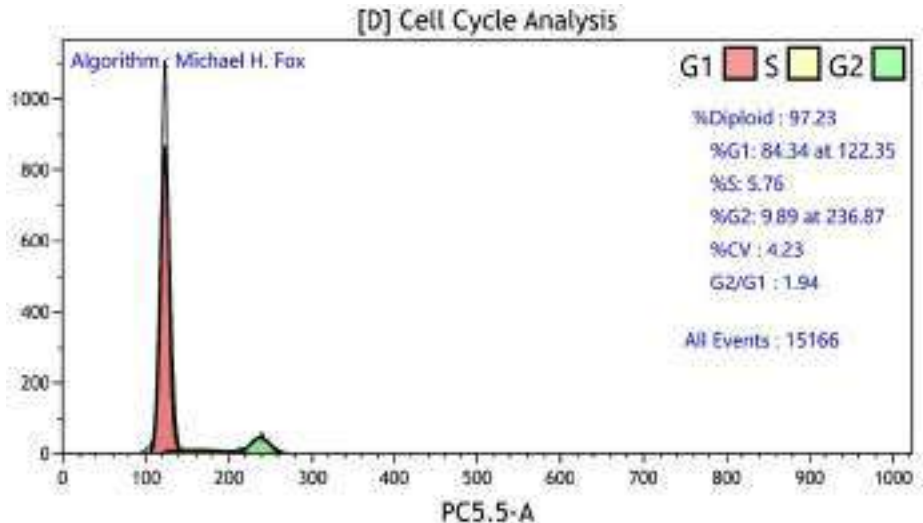
Rycina 1. Fotografie hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych poddanych różnicowaniu. (a) osobnik nr 1; (b) osobnik nr 2; (c) osobnik nr 3.



W celu oceny wpływu terapeutyku na proliferację oraz ewentualne zatrzymanie cyklu komórkowego wykonano analizę rozkładu faz cyklu metodą cytometrii przepływowej.

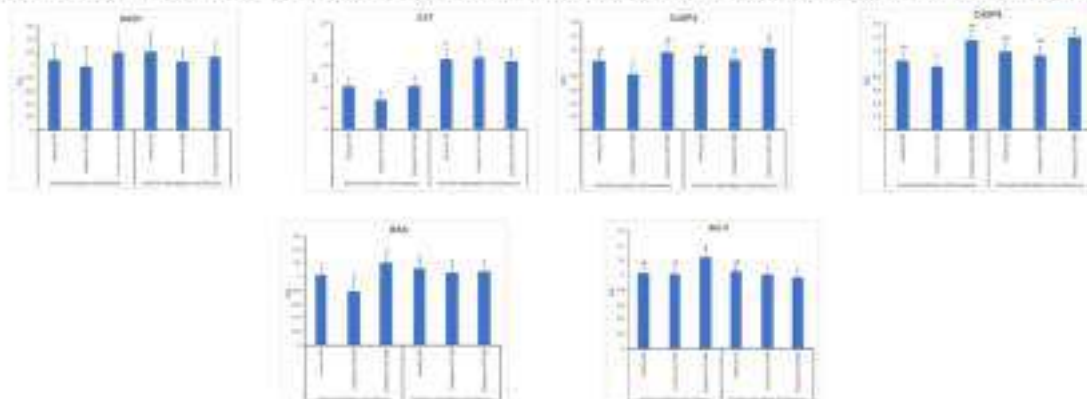
Uzyskane profile cytometryczne wykazały wysoki stopień zgodności pomiędzy analizowanymi liniami komórkowymi (Rycina 2.). Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G_0/G_1 , S, G_2/M) był zbliżony we wszystkich próbkach, co wskazuje na stabilność proliferacyjną i podobną aktywność mitotyczną pomiędzy liniami MSCs pochodzącymi od różnych osobników.

Rycina 2. Przykładowa analiza cytometryczna cyklu komórkowego.



W celu oceny potencjalnego działania cytotoksycznego oraz pro- lub antyapoptotycznego testowanego związku wykonano analizę ekspresji przy użyciu ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Analizę ekspresji przeprowadzono dla genów kodujących kluczowe białka i enzymy zaangażowane w proces apoptozy oraz odpowiedź komórkową na stres oksydacyjny, takich jak: *SOD1*, *CAT*, *CASP3*, *CASP8*, *BCL2* i *BAX* (Rycina 3.).

Porównując ekspresję analizowanych genów pomiędzy hodowlami *in vitro* poddanymi oraz niepoddanymi różnicowaniu stwierdzono istotne statystycznie różnice dla genu *BCL2* przy stężeniu terapeutycznego 0,001 nM oraz dla genu *CAT* we wszystkich grupach eksperymentalnych. W przypadku *BCL2* wyższą ekspresję zaobserwowano w komórkach poddanych różnicowaniu. Ekspresja *BAX* pozostawała na poziomie zbliżonym do *BCL2*, co może świadczyć o zachowaniu równowagi pomiędzy szlakami pro- i antyapoptotycznymi. W odniesieniu do katalazy stwierdzono niższy poziom ekspresji w komórkach różnicujących się w kierunku chondrocytów. Może to być związane z ochronnym działaniem macierzy pozakomórkowej wytwarzanej przez chondrocyty, która ogranicza dostęp czynników stresu oksydacyjnego, a także z niższą aktywnością metaboliczną wyspecjalizowanych komórek.

Rycina 3. Wpływ nanocząstek zawierających ST-437 na ekspresję genów *SOD1*, *CAT*, *CASP3*, *CASP8*, *BAX* oraz *BCL2*.

Wnioski

1. Wszystkie wyizolowane linie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) pozyskane od samic świni domowej wykazały zdolność do różnicowania w kierunku chondrocytów, co potwierdzono specyficznym barwieniem błękitem alcjanowym.
2. W trakcie prowadzenia hodowli *in vitro* nie stwierdzono cech morfologicznych świadczących o cytotoksyczności zastosowanego terapeutyku. Początkowo obserwowano zwiększoną liczbę obumarłych komórek, jednak ich liczba ulegała zmniejszeniu wraz z czasem ekspozycji.
3. W próbach poddanych chondrogenezie nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem terapeutyku a poziomem ekspresji genów związanych z apoptozą i stresem oksydacyjnym, co sugeruje brak efektu dawkozależności.
4. W warunkach *in vitro* zastosowanie nanocząstek zawierających ST-437 nie wpłynęło istotnie na poziom ekspresji genów zaangażowanych w procesy apoptozy i stresu oksydacyjnego, co sugeruje brak działania cytotoksycznego na poziomie molekularnym.
5. Analiza cyklu komórkowego wykazała prawidłowy rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu, wysoki poziom diploidalności oraz niski współczynnik zmienności, co potwierdza ich stabilność genetyczną, zdolność do proliferacji i czyni je wartościowym materiałem do dalszych badań *in vitro*.
6. W świetle uzyskanych wyników konieczna jest kontynuacja badań nad związkami ST-437, uwzględniająca szerszy zakres stężeń, różne nośniki nanostrukturalne oraz bardziej złożone modele biologiczne, takie jak organoidy czy hodowle 3D.