

ROCZNIKI NAUKOWE ZOOTECHNIKI

INSTYTUT ZOOTECHNIKI
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
KRAKÓW 2011

T. 38

z. 1

RADA REDAKCYJNA

Prof. dr hab. *Jędrzej Krupiński* — przewodniczący — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Franciszek Brzóska* — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Zbigniew Dobrzański* — Wrocław, prof. dr hab. *Eugeniusz Herbut* — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Dymitr Kaliszewicz* — Olsztyn, dr hab. *Ewa Kapkowska*, prof. UR Kraków, prof. dr hab. *Jerzy Koreleski* — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Jolanta Kurył* — Jastrzębiec, prof. dr hab. *Jan Niemiec* — Warszawa, prof. dr hab. *Marian Różycki* — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Jadwiga Seremak-Bulge* — Warszawa, prof. dr hab. *Zdzisław Smorąg* — Kraków-Balice, prof. dr hab. *Tadeusz Szulc* — Wrocław

REDAKCJA

Redaktor naczelny — prof. dr hab. *Mariusz Pietras*
Zastępcy redaktora naczelnego — prof. dr hab. *Ewa Słota*,
dr hab. *Sylwester Świątkiewicz*, prof. nadzw.
Sekretarz redakcji — mgr *Magdalena Bielska*
Opracowanie redakcyjne — mgr *Magdalena Bielska*, mgr *Danuta Dobrowolska*,
mgr *Jerzy Pilawski*, mgr *Katarzyna Skupniewicz*
Projekt okładki — *Beata Barszczewska-Wojda*

Adres redakcji — Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Sarego 2, 31-047 Kraków
<http://www.izoo.krakow.pl>

Wydanie publikacji
dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

© Copyright by Instytut Zootechniki PIB

PL ISSN 0137-1657

KRÓTKO- I ŚREDNIOŁAŃCUCHOWE KWASY TŁUSZCZOWE W ŻYWIENIU PROSIĄT

Ewa Hanczakowska, Agnieszka Szewczyk

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
32-083 Balice k. Krakowa

Kwasy tłuszczowe to związki organiczne zawierające łańcuch węglowodorowy i grupę karboksylową (COOH) na końcu łańcucha. Wchodzą one w skład tłuszczów jako estry z glicerolem. Własności kwasów tłuszczowych zależą głównie od ilości atomów węgla i z tego punktu widzenia możemy podzielić je na krótkołańcuchowe (mniej niż 6 atomów węgla), średniołańcuchowe (od 6 do 12 atomów) i długołańcuchowe, zawierające więcej niż 12 atomów węgla. Większość naturalnych tłuszczów roślinnych i zwierzęcych zawiera głównie kwasy o 18 węglach (kwas stearynowy i pochodne) i 16 węglach (kwas palmitynowy), natomiast kwasy o krótszym łańcuchu są składnikami tłuszczu mleka.

Kwasy krótkołańcuchowe

Kwasy tłuszczowe o krótkim łańcuchu węglowym SCFA (Short Chain Fatty Acids) używane są od lat jako zakwaszacze lub konserwanty pasz. Mają one silne działanie antybakteryjne i przeciwwgrzybiczne, dzięki czemu mogą poprawiać przyrosty masy ciała świń (Partanen i Mroz, 1999). Ochrona, jaką dają zakwaszacze, jest szczególnie ważna w przypadku prosiąt, zwłaszcza w najniebezpieczniejszym dla nich okresie, tj. po odsadzeniu (Roth i Kirchgessner, 1998). Przewód pokarmowy wcześniej odsadzonych prosiąt nie jest dojrzały pod względem morfologicznym i nie działa w pełni sprawnie. Żołądek nie wydziela wystarczającej ilości kwasu solnego mogącego utrzymać pH na właściwym poziomie gwarantującym pełną aktywność pepsyny i chroniący przed zakażeniem bakteryjnym. Zaburzenia równowagi mikroflory jelitowej są główną przyczyną występowania biegunek u młodych zwierząt (Simon i in., 2001).

Obniżenie pH treści przewodu pokarmowego sprzyja rozwojowi bakterii fermentacji mlekowej równocześnie hamując rozwój bakterii szkodliwych, co wpływa na ograniczenie ich metabolitów, na przykład amoniaku i amin. Zapobiega również efektowi buforowania paszy w początkowym odcinku przewodu pokarmowego i ogranicza wzrost niepożądanego mikroflory (*E. coli*, *Clostridium*), tym samym ograniczając występowanie biegunek oraz śmiertelność prosiąt.

Tsiloyiannis i in. (2001) porównywali działanie kwasów organicznych, m.in. kwasu mrówkowego i propionowego na bakterie *Escherichia coli*, z działaniem antybiotyków paszowych. Wszystkie kwasy dały pozytywny efekt, wobec czego autorzy proponują użycie ich jako zamiennika antybiotyków. Jednak w naszych badaniach (nieopublikowanych) mieszanka kwasów mrówkowego i propionowego działając mocno bakterioobójczo na *Clostridium perfringens* nie zredukowała istotnie populacji *E. coli*.

SCFA dodane nawet do paszy w niewielkiej ilości niezminiającej pH w przewodzie pokarmowym mają działanie antybakteryjne (Canibe i in., 2001). Wskazuje to na istnienie mechanizmu niezależnego wprost od kwasowości środowiska. Kwasy organiczne są rozpuszczalne w tłuszczach w formie niezdysoncjowanej, w której mogą wnikać do wnętrza komórki bakteryjnej. Tam pod wpływem enzymów następuje dysoncjacja kwasu, a powstałe jony niszczą strukturę komórki powodując jej śmierć (Ricke, 2003). Z drugiej strony bakterie probiotyczne, np. bakterie kwasu mlekowego mogą prawidłowo rozwijać się w obecności kwasów. Najprawdopodobniej można to wyjaśnić ich wysokim śródkomórkowym stężeniem potasu, który przeciwdziała aktywności powstałych anionów (Russel i Diez-Gonzales, 1998).

Poza działaniem antybakteryjnym, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą dostarczać prosiętom energii zużywanej głównie na procesy przebudowy nabłonka jelitowego (Topping i Clifton, 2001), np. kwas masłowy (C_4) jest źródłem energii dla kolonocytów, a kwas propionowy (C_3) jest substratem dla wielu procesów metabolicznych. Hamuje on syntezę cholesterolu obniżając jego poziom we krwi (Wong i in., 2006). Kwasy krótkołańcuchowe produkowane są przez florę bakteryjną w jelicie grubym i mogą mieć, zwłaszcza kwas masłowy i propionowy, korzystny wpływ na nabłonek, dzięki lepszemu odżywieniu jego komórek (Scheppach i in., 1992). Jednak ze względu na słaby rozwój mikroflory kwasy te wytwarzane są u bardzo młodych prosiąt w niewielkiej ilości (Murray i in., 1987). Nie mają więc istotnego wpływu na nabłonek, ale wchłaniane są do krwioobiegu i mogą brać udział w przemianach metabolicznych. W przeciwieństwie do kwasów podawanych w paszy nie wpływają więc na zmiany we wcześniejszych odcinkach przewodu pokarmowego.

Kwasem tłuszczowym, któremu poświęca się w ostatnich latach dużo uwagi, jest kwas masłowy. Nie jest w tym przypadku ważne jego działanie antybakteryjne, ale wpływ na budowę nabłonka jelit przewodu pokarmowego i działanie prozdrowotne, zwłaszcza na układ krążenia (Ranganna i in., 2005). Kwas masłowy produkowany jest głównie przez bakterie w okrężnicy, również u prosiąt (Kien i in., 2000), jednak prawie całkowicie wykorzystywany jest na miejscu, najprawdopodobniej do ochrony przed nadmierną proliferacją komórek, prowadzącą do nowotworu (Ranganna i in., 2005). Tak więc tylko jego niewielka część dostaje się do krwioobiegu i dostępna jest dla innych procesów fizjologicznych. Drugim miejscem produkcji tego kwasu jest gruczoł mlekowy (Smith i German, 1995), a jego zawartość w mleku wynosi około 10% tłuszczu całkowitego.

Obecnie brak jest jednolitego poglądu na wpływ kwasu masłowego na budowę nabłonka jelita cienkiego. Według Kotuni i in. (2004) oraz Wanga i in. (2005) dodatek maślanu sodu do paszy dla prosiąt powoduje wydłużenie kosmków w jelicie cienkim. Powinno to znaleźć odbicie w lepszych przyrostach prosiąt, ponieważ kosmki

jelitowe są miejscem wchłaniania składników pokarmowych. Biagi i in. (2007) nie stwierdzili jednak zmian w długości kosmków ani lepszych przyrostów prosiąt po dodaniu maślanu. Podobne wyniki otrzymali również Weber i Kerr (2008). Można mieć nadzieję, że problem ten wyjaśni się w trakcie dalszych badań.

Kwasy średniołańcuchowe

Przedstawiciele tej grupy kwasów to przede wszystkim kwasy: kapronowy (C_6), kaprylowy (C_8), kaprynowy (C_{10}) i laurynowy (C_{12}). Kwasy te określa się zazwyczaj angielskim skrótem MCF lub MCFA (Medium Chain Fatty Acids). Istnieją również kwasy o nieparzystej liczbie atomów węgla, np. kwas enantowy (C_7) i kwas pelargonowy (C_9), które nie mają jednak praktycznego znaczenia. Kwasy te mogą być pobierane przez zwierzęta jako estry z glicerolem, czyli triacylglicerole – MCT (Medium Chain Triacylglycerols). Ich cząsteczki są mniejsze niż cząsteczki triacylgliceroli długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, dzięki czemu proces ich hydrolizy jest szybki, bardziej energooszczędny i nie wymaga obecności wszystkich enzymów biorących normalnie udział w metabolizmie tłuszczów. Według Odle i in. (1994) młode prosięta, u których gruczoły wydzielające enzymy trawienne są jeszcze w toku rozwoju, sprawnie trawią i absorbują MCT. Triacylglicerole zawierające kwas kapronowy są trawione najszybciej.

Średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą być absorbowane bezpośrednio z jelita cienkiego do krwioobiegu w formie niezestryfikowanej, a następnie transportowane do wątroby, gdzie w mitochondriach zachodzi ich szybka oksydacja z wydzielaniem znacznej ilości energii. Proces ten nie wymaga obecności karnityny niezbędnej do utleniania wyższych kwasów tłuszczowych (Papamandjaris i in., 1998). Uzyskana energia może być wykorzystana przez młody organizm do syntezy białek, a co za tym idzie do szybszego rozwoju tkanek. Ten szlak metaboliczny sprawia, że MCFA nie tworzą materiału zapasowego jak wyższe kwasy tłuszczowe, ale zachowują się jak węglowodany dostarczając szybko znacznych ilości energii (Fushiki i in., 1995).

Wykorzystanie MCT w znacznym stopniu zależy od długości łańcucha węglowego kwasów. Wiele danych wskazuje, że prosięta najlepiej trawią i najszybciej wchłaniają triacylglicerole zawierające kwas kapronowy (Odle, 1997; Wieland i in., 1993). Emulgacja przyspiesza trawienie i wchłanianie MCFA, ale w tym przypadku istnieje niebezpieczeństwo wzrostu zawartości tych kwasów we krwi aż do poziomu zagrażającego zdrowiu i życiu prosiąt (Wieland i in., 1993).

Straarup i in. (2006) badali w doświadczeniu na prosiętach wpływ podawania triacylgliceroli o zmienionej strukturze, zawierających kwas kaprynowy w pozycjach sn-1 i 3 (czyli przy skrajnych grupach hydroksylowych glicerolu) i z długołańcuchowym kwasem w pozycji sn-2 na skład tłuszczu odkładanego w tkankach. Zmienione triacylglicerole porównywali z olejem rzepakowym. Stwierdzili oni, że profil odłożonych kwasów tłuszczowych odzwierciedlał profil badanych tłuszczów z wyjątkiem kwasu kaprynowego, który był utleniany dostarczając energii do syntezy białka. Według Carvajala i in. (2000) pozycja, w jakiej kwas średniołańcuchowy związany jest w cząsteczce glicerolu, ma wpływ na ogólną absorpcję tłuszczu: MCFA w pozycji 1 lub 3 (co zważywszy na budowę cząsteczki glicerolu jest równoważne), w przeciwieństwie do pozycji 2, zwiększa absorpcję tłuszczu, zwłaszcza długołańcuchowych

nasyconych kwasów tłuszczowych. Zdaniem Nagaty i in. (2003) produkcja triacylgliceroli z odpowiednimi kwasami tłuszczowymi, w specyficznych pozycjach 1 i 3 lub 2 w cząsteczce może prowadzić do otrzymania lipidów zapobiegających chorobom cywilizacyjnym, takim jak hiperlipidemia czy otyłość, dostarczając aktywnych fizjologicznie kwasów tłuszczowych.

Istnieje również zależność między średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi a produkcją greliny przez komórki sekrecyjne (endokryjne) żołądka (Nishi i in., 2005). Po pobraniu z pokarmem, część średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych wchłaniana jest przez błonę śluzową żołądka. Syntetyzowane w organizmie MCFA mają z kolei zdolność dyfundowania do komórek żołądka, gdzie następnie aktywują grelinę. Jednymi z bardziej reaktywnych rodników kwasowych są: acyl kwasu dekanowego (kaprynowego), 10 węglowego nasyconego kwasu tłuszczowego (C_{10}) oraz 10 węglowego kwasu tłuszczowego zawierającego jedno podwójne wiązanie ($C_{10:1}$) (Hosoda i in., 2000., Kaiya i in., 2001, 2002).

Doświadczenie Nishi i in. (2005) wykazało, że po podawaniu myszom diety bogatej w triacylgliceryd kwasu heptanowego (C_7), którego endogennie ssaki nie produkują, wzrosła koncentracja n-heptanylu greliny w żołądku zwierząt doświadczalnych. Nie wykazano natomiast takiej zależności między długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi a opisywanym hormonem.

Grelinę ma korzystny wpływ na młody organizm, przyspiesza wzrost i rozwój zwierząt zarówno po urodzeniu, jak i w okresie prenatalnym. Stąd pozytywny wpływ MCFA i MCT podawanych w paszy dla ciężarnych i młodych zwierząt. Azain (1993) badał wpływ kwasów średnio- i długołańcuchowych podawanych lochom w okresie laktacji na zdrowotność prosiąt. Prosięta pochodzące od matek otrzymujących w paszy kwasy średniołańcuchowe rzadziej zapadały na choroby bakteryjne i wirusowe, a śmiertelność była w tej grupie o 36% mniejsza.

MCFA jako źródło łatwo dostępnej energii, również dzięki aktywności bakterio-bójczej mogłyby być stosowane w żywieniu prosiąt zamiast wycofanych antybiotyków paszowych. Działanie bakterio-bójcze i bakterio-statyczne opiera się na dwóch mechanizmach. Pierwszym z nich jest obniżenie pH paszy poniżej poziomu optymalnego dla rozwoju bakterii, drugim jak w przypadku kwasów krótkołańcuchowych przenikanie do wnętrza komórki w formie niezdisocjowanej. Dysocjacja i obniżenie pH następuje wewnątrz komórki. Mikroorganizmy dążąc do utrzymania odczynu obojętnego zużywają znaczne ilości energii, co powoduje ograniczenie syntezy białek i w efekcie śmierć komórki (Ricke, 2003). MCFA ograniczają rozwój bakterii z rodzajów *Clostridium* (Dierick i in., 2002), *Salmonella* (Skřivanova i in., 2006) i *Escherichia* (Marounek i in., 2003).

Jedną z najmniejbezpiecznych bakterii atakujących przewód pokarmowy prosiąt jest *Clostridium perfringens*. Typ C tej bakterii jest przyczyną występowania krwawych biegunek u młodych prosiąt oraz nekrozy komórek nabłonka jelitowego, często prowadzących do śmierci (Songer i Uzal, 2005). Typ ten jest jednak stosunkowo rzadko spotykany, o wiele częstszy jest typ A będący normalnym składnikiem flory bakteryjnej przewodu pokarmowego świń. Również on może być przyczyną chorób u nowonarodzonych, a także odsadzonych prosiąt. W przeprowadzonych przez nas badaniach (Szewczyk i Hanczakowska, 2007) stwierdziliśmy wysokoistotny spadek

ilości *Clostridium perfringens* po podaniu prosiętom kwasu kaprylowego lub kapronowego. Ponieważ jednak prosięta w grupie kontrolnej również były zdrowe, można sądzić, że mieliśmy do czynienia z mniej szkodliwą formą tej bakterii.

Batovska i in. (2009) badali antybakteryjne działanie średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych i ich 1-monoacylgliceroli (w tym przypadku tylko jedna grupa hydroksylowa glicerolu w pozycji 1 była zestryfikowana kwasem) na mikroorganizmy z rodzajów *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Listeria* i *Streptococcus*. Okazało się, że istnieje tu synergizm działania: monoacylglicerole zawierające kwasy laurynowy lub kaprynowy wzmacniały działanie czystego kwasu laurynowego, który był mało aktywny. Podobne doświadczenie przeprowadzili również Bergsson i in. (2001) stwierdzając wysoką aktywność monoacylglicerolu zawierającego kwas kaprynowy w pozycji 1 przeciw *Staphylococcus aureus*. Komórki bakterii ginęły na skutek zniszczenia błony komórkowej.

Bakteriobójcze działanie kwasów uzależnione jest od pH treści przewodu pokarmowego. W badaniach Skřivanovej i Marounka (2007) aktywność kwasu kaprynowego przeciw *Escherichia coli* była niska przy pH 6.5 i rosła przy pH 5.3.

Inną ważną właściwością średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest ich zdolność pobudzania procesów rozwojowych nabłonka jelita cienkiego. Na stres odsadzenia prosięta reagują m. in. głębokimi zmianami w budowie anatomicznej tego nabłonka (Skrzypek i in., 2005). Kosmki stanowiące część nabłonka i będące miejscem wchłaniania składników pokarmowych w jelicie cienkim ulegają znacznej redukcji, zwłaszcza w rejonie dwunastnicy. Marion i in. (2002) stwierdzili, że u prosiąt w trzecim dniu po odsadzeniu wysokość kosmków uległa 59% redukcji w porównaniu do wysokości przed odsadzeniem, a masa nabłonka jelita cienkiego zmniejszyła się o 55%. W okresie tym obserwuje się wzmożoną apoptozę enterocytów. Prawdopodobną przyczyną obumierania enterocytów jest niedostateczna podaż tlenu i substancji odżywczych z krwią, co wiąże się z deficytem energii (Mohsen i in., 2006). Być może wydajne źródło łatwo przyswajalnej energii, jakim są kwasy średniołańcuchowe, ma wpływ na wzrost długości kosmków jelitowych stwierdzony przez Diericka i in. (2002) oraz związaną z tym poprawę wskaźników produkcyjnych prosiąt.

W Instytucie Zootechniki przeprowadzono badania nad wykorzystaniem średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych: kaprylowego i kapronowego w żywieniu prosiąt. Ich działanie porównywano z działaniem stosowanych powszechnie zakwaszaczy, tj. kwasu fumarowego i mieszaniny kwasów mrówkowego i propionowego. Wyniki trzech przeprowadzonych doświadczeń dowiodły pozytywnego wpływu MCFA na spadek ilości upadków prosiąt oraz na wskaźniki odchowu. Poprawie uległa także pozorna strawność białka i włókna paszy. Korzystne zmiany stwierdzono w nabłonku jelita cienkiego, którego kosmki uległy wydłużeniu, zwłaszcza pod wpływem kwasu kaprylowego. Bakteriobójcze działanie kwasów było jednak, jak już wspomniano, stosunkowo słabe.

Podsumowując omówione badania można stwierdzić, że zarówno wolne średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe, jak też ich estry z glicerolem mają działanie bakteriobójcze, a także wpływają stymulująco na wzrost zwierząt, zwłaszcza młodych. Ten stymulujący wpływ może być wynikiem ograniczenia wzrostu bakterii patogennych oraz zmian w budowie nabłonka jelita cienkiego.

Piśmiennictwo

- Azain M. (1993). Effects of adding medium chain triglycerides to sow during late gestation and early lactation on litter performance. *J. Anim. Sci.*, 71: 3011–3019.
- Batovska D.I., Todorova I.T., Tsvetkova I.V., Najdenski H.M. (2009). Antibacterial study of medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationship. *Pol. J. Microbiol.*, 58: 43–47.
- Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrimsen O., Thormar H. (2001). Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS*, 109: 670–678.
- Biagi G., Piva A., Moschini M., Vezzali E., Roth F.X. (2007). Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. *J. Anim. Sci.*, 85: 1184–1191.
- Canibe N., Steien S.H., Øverland M., Jensen B.B. (2001). Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 79: 2123–2133.
- Carvajal O., Nakayama M., Kishi T., Sato M., Ikeda I., Sugano M., Imaizumi K. (2000). Effect of medium-chain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition in rats. *Lipids*, 35: 1345–1351.
- Dierick N.A., Decuyper J.A., Molly K., Van Beek E., Vanderbeke E. (2002). The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition. II. *In vivo* release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livest. Prod. Sci.*, 75: 129–142.
- Fushiki T., Matsumoto K., Inoue K., Kawada T., Sugimoto E. (1995). Swimming endurance capacity of mice is increased by consumption of medium-chain triglycerides. *J. Nutr.*, 125: 531–539.
- Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. (2000). Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴ – ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J. Biol. Chem.*, 275: 21995 – 22000
- Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Koda A., Yamamoto K., Kitajima Y., Matsumoto M., Minamitake Y., Kikuyama S., Kangawa K. (2001). Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J. Biol. Chem.*, 276 (44): 40441–40448.
- Kaiya H., Van Der Geyten S., Kojima M., Hospoda H., Kitajima Y., Matsumoto M., Geelissen S., Darras V.M., Kangawa K. (2002). Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology*, 143: 3454–3463.
- Kien C.L., Chang J.C., Cooper J.R. (2000). Butyric acid is synthesized by piglets. *J. Nutr.*, 130, 234–237.
- Kotunia A., Wolinski J., Laubnitz D., Jurkowska M., Rome V., Guilloteau P. (2004). Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed by artificial sow. *J. Physiol. Pharmacol.*, 55: 59–68.
- Marion J., Biernat M., Thomas F., Savary G., Le Breton Y., Zabielski R., Le Huërou-Luron I., Le Divisich J. (2002). Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42: 339–354.
- Marounek M., Skřivanova E., Rada V. (2003). Susceptibility of *Escherichia coli* to mC₂ – C₁₈ fatty acid. *Folia Microb. (Praha)*, 48: 731–735.
- Mohsen T., Stewart S., Annette M., Knowles A., Attaix D., Samuels S. (2006). Effect of energy substrates on protein degradation in isolated small intestinal enterocytes from rats. *J. Parent. Enter. Nutr.*, 30: 497–502.
- Murray R.D., McClung H.J., Li B.U., Ailabouni A. (1987). Short-chain fatty acid profile in the colon of newborn piglets using fecal water analysis. *Pediatr. Res.*, 22: 720–724.
- Nagata J., Kasai M., Watanabe S., Ikeda I., Saito M. (2003). Effects of highly purified structured lipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid on lipid profiles in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67: 1937–1943.
- Nishi Y., Hiejima H., Hosoda H., Kaiya H., Mori K., Fukue Y., Yanase T., Nawata H., Kangawa K., Kojima M. (2005). Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinol.*, 146: 2709–2715.
- Odle J. (1997). New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model. *J. Nutr.*, 127: 1061–1067.

- Odle J., Lin X., Wieland T., van Kempen T. (1994). Emulsification and fatty acid chain length affect the kinetics of [^{14}C] – medium chain triacylglycerol utilization by neonatal piglets. *J. Nutr.*, 124: 84–93.
- Papamandjaris A., MacDougall D., Jones P. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.*, 62: 1203–1215.
- Partanen K., Mroz Z. (1999). Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 117–145.
- Ranganna K., Yatsu F.M., Hayes B.E. (2005). Butyrate, a small pleiotropic molecule with multiple cellular and molecular actions. *Recent Res. Devel. Mol. Cell. Biochem.*, 2: 123–151.
- Ricke S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci.*, 82: 632–639.
- Roth F., Kirchgessner M. (1998). Organic acid as feed additives for young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci.*, 7: 25–35.
- Russel J., Diez-Gonzales F. (1998). The effect of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microbial Physiol.*, 39: 205–234.
- Scheppach W., Bartram P., Richter A., Richter F., Liepold H., Dusel G., Hofstetter G., Rütthlein J., Kasper H. (1992). Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 16: 43–48.
- Simon O., Jadamus A., Wahjen W. (2001). Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. *J. Anim. Feed Sci.*, 10, Suppl. 1: 51–67.
- Skřivanova E., Marounek M. (2007). Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.*, 52 (1): 70–72.
- Skřivanova E., Marounek M., Benda V., Brezina P. (2006). Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarni Med.*, 51: 81–88.
- Skrzypek T., Valverde P.J., Skrzypek H., Woliński J., Kazimierczak W., Szymanczyk S., Pawłowska M., Zabielski R. (2005). Light and scanning microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *J. Physiol. Pharmacol.*, 56, Suppl. 3: 71–87.
- Smith J.G., German J.B. (1995). Molecular and genetic effects of dietary derived butyric acid. *Food Technol.*, 49: 87–90.
- Songer J.G., Uzal F.A. (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17: 528–536.
- Straarup E.M., Danielsen V., Høy C.E., Jakobsen K. (2006). Dietary structured lipids for post-weaning piglets: fat digestibility, nitrogen retention and fatty acids profiles of tissues. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr. (Berl.)*, 90: 124–135.
- Szewczyk A., Hanczakowska E. (2007). Wpływ zakwaszaczy oraz średnio-łańcuchowych kwasów tłuszczowych na mikroorganizmy zasiedlające jelito cienkie prosiąt. *Mat. konf.: Wkład młodych naukowców w rozwój nauk rolniczych*, Puławy, 23–24.11.2007, ss. 225–230.
- Topping D.L., Clifton P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81: 1031–1034.
- Tsiloyiannis V.K., Kyriakis S.C., Vlemmas J., Sarris K. (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.*, 70: 287–293.
- Wang J.F., Chen X., Wang Z.X., Dong S.H., Lai Z.W. (2005). Effect of sodium butyrate on the structure of small intestine mucous epithelium of weaning piglets. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.*, 35: 298–301.
- Weber T.E., Kerr B.J. (2008). Effect of sodium butyrate on growth performance and response to lipopolysaccharide in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 86: 442–450.
- Wieland T.M., Lin X., Odle J. (1993). Emulsification and fatty-acid chain length affect the utilization of medium-chain triglycerides by neonatal pigs. *J. Anim. Sci.*, 71: 1869–1874.
- Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A., Jenkins D.J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40: 235–243.

EWA HANCZAKOWSKA, AGNIESZKA SZEWCZYK

Short- and medium-chain fatty acids in piglet feeding

SUMMARY

Short-chain fatty acids, i.e. organic acids with carbon chains containing less than 6 carbon atoms and one carboxylic group have been used for many years as strong antibacterial agents. Their importance increased as feed antibiotics were banned in the European Union. Thus, these fatty acids can be used as antibiotic replacers. They also can provide piglets with energy which is utilized mainly by intestinal epithelium cells. Propionic and butyric acids have a role in animal metabolism. Medium-chain fatty acids, i.e. caproic (6 carbon atoms), caprylic (8 carbon atoms), capric and lauric acids (10 and 12 carbon atoms, respectively) have also antibacterial activity: probably they diffuse into bacterial cells in undissociated form and dissociate within the protoplasm leading to intracellular acidification. They are also a readily available energy source, especially for young animals. They are rapidly absorbed from the stomach and small intestine and transported directly to the liver where they are oxidized in mitochondria. They affect intestinal mucosa by increasing the length of microvilli and thus improving nutrient availability. All these properties make them a valuable feed supplement for piglets.

ZASTOSOWANIE TECHNIKI NOKAUTU GENOWEGO, ANALIZY SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH ORAZ SZCZEPÓW WSOBNYCH MYSZY W MAPOWANIU GENÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA SPERMATOGENEZĘ

Dorota Bederska

Instytut Zootechniki Państwowego Instytut Badawczy, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
32-083 Balice k. Krakowa

W poniższej pracy opisano techniki mapowania genów warunkujących prawidłową spermatogenezę u ssaków. Przedstawiono dwie najczęściej stosowane metody polegające na nokaucie genowym oraz analizie sekwencji mikrosatelitarnych w wybranych szczepach wsobnych myszy. Lokalizacja sekwencji wpływających na proces gametogenezy mogłaby stać się niezwykle pomocnym narzędziem w utrzymaniu niezaburzonego rozrodu zwierząt hodowlanych. Stosunkowo dobrze poznany jest już wpływ genów na płodność u myszy i ludzi. Coraz częściej badaniami obejmuje się także zwierzęta hodowlane.

Ważnym aspektem badań zajmujących się rozrodem ludzi i zwierząt jest poznanie sekwencji genowych warunkujących niezaburzoną spermatogenezę. Ich zlokalizowanie na chromosomie Y (Krzanoska, 1969), jak i na autosomach (Huhtaniemi, 2006) mogłoby pomóc zarówno w uniknięciu ekonomicznych strat w produkcji zwierząt hodowlanych związanych z problemami w rozrodzie, jak i w wyborze prawidłowego leczenia u ludzi. Szerokie zastosowanie znalazły tutaj szczepy wsobne myszy z nokautami genowymi, które umożliwiają określenie wpływu deficytu danego białka w organizmie, a zarazem ustalenie jego biologicznej funkcji. Istotne stało się również odkrycie i wykorzystanie markerów genetycznych klasy II, czyli sekwencji mikrosatelitarnych, do procesu mapowania genów czy analizy hetero- lub homozygotyczności. W pracy poruszono problem niepłodności związanej z czynnikiem samczym i przedstawiono próby wyjaśnienia jej genetycznej etiologii.

Mysz laboratoryjna

Małe wymagania hodowlane, szybki rozwój osobniczy, duża liczba młodych w miocie oraz wysoki procent podobieństwa genomu z ludzkim uczyniły mysz jednym

z najpopularniejszych zwierząt wykorzystywanych w laboratoriach na całym świecie. Mysz wykorzystywana jest w badaniach od XIX wieku, a jej wkład w odkrycia naukowe jest nieoceniony. Stworzenie zwierzęcych modeli chorób człowieka umożliwiło ich szybsze analizowanie, sprawniejsze poznawanie przyczyn oraz wdrażanie nowych metod terapeutycznych. Na przestrzeni lat wyselekcjonowano wiele różnorodnych szczepów myszy laboratoryjnych, które służą jako materiał do badań specjalistycznych. Obecnie ich największa baza znajduje się w Jackson Laboratory (www.jax.org) mającego swoje oddziały w USA i Kanadzie.

Szczepy wsobne

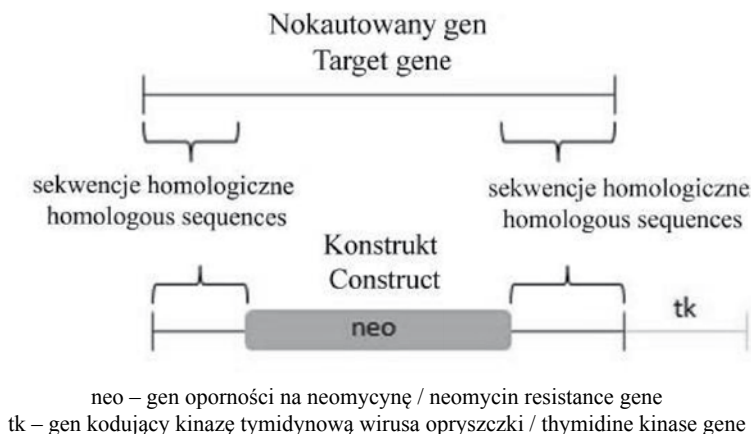
Standardowo, szczepy wsobne uzyskuje się poprzez kojarzenie siostry z bratem przez kolejnych 20 pokoleń. Procent homozygotycznych genów określa współczynnik inbrodu, który w ostatnim pokoleniu szacuje się na 98,6% (Brylińska i Kwiatkowska, 1996). Zadanie to jest utrudnione przez fakt, iż wraz ze wzrostem homozygotyczności kolejnych pokoleń dochodzi do tzw. depresji inbredowej, w wyniku której u zwierząt obserwuje się obniżenie płodności, żywotności oraz odporności. Ze względu na geny koloru sierści myszy ze szczepów: 129/Sv i C57BL są zwykle wykorzystywane do uzyskania osobników z nokautem określonych genów.

Szczep 129/Sv o genotypie AABBC (aguti) został uzyskany w Jackson Laboratory na początku XX wieku. Posiada on kolor sierści aguti w przeciwieństwie do innych szczepów 129 pozyskanych w innych laboratoriach, które są kremowe (www.animalab.pl). Szczepy 129 swoje szerokie zastosowanie zawdzięczają dużej liczbie bezmielinowych aksonów motoneuronów lędźwiowych oraz częstemu występowaniu potworniaka jądra (www.animalab.pl). Z kolei szczep C57BL o genotypie aaBBCC (czarny) charakteryzują wysoka płodność, znaczna żywotność oraz mała podatność na nowotwory. Tworzenie szczepów wsobnych myszy z nokautem genowym daje nadzieję, że w przyszłości uda się poznać sekwencje warunkujące niezaburzoną spermatogenezę.

Technika nokautu

Tworzenie modeli zwierzęcych chorób człowieka opiera się na dwóch głównych metodach: transgenezie i nokaucie genowym. Otworzyły one przed naukowcami szereg nowych możliwości badań chorób genetycznych. Transgeneza polega na wprowadzeniu do komórek licznych kopii genu, często innego gatunku, za pomocą mikroinjekcji lub wektorów (np. wirusowych). Tak uzyskane osobniki zyskują ekspresję wprowadzonych genów i produkują obcogatunkowe białka. Technika nokautu polega na zniszczeniu ciągłości wybranego genu, w wyniku czego można prześledzić (na poziomie komórki, tkanki czy całego organizmu) zmiany fenotypowe towarzyszące brakowi danego białka. Z mysiej blastocysty pochodzącej ze skojarzenia osobników o kolorze agouti (genotyp AA) należy pobrać pluripotencjalne komórki macierzyste. Do komórek tych, np. poprzez proces elektroporacji, wprowadza się konstrukt zbudowany z dwóch podstawowych części (rys. 1): genu oporności na antybiotyk, taki jak np. neomycyna (neo) oraz genu kodującego kinazę tymidynową (tk) z wirusa opryszczki (*Herpes simplex*). Gen oporności na antybiotyk otoczony jest sekwencjami homologicznymi do tych, które występują w genie, który chcemy inaktywować.

Gen kodujący kinazę tymidynową wbuduje się do genomu myszy jedynie w wyniku przypadkowego, nieprawidłowego włączenia konstrukt w obrębie DNA i spowoduje aktywację toksycznego gancyklowiru (Górska i Kowalski, 1997).



Rys. 1. Schemat budowy konstrukt wykorzystywanego do przeprowadzenia techniki nokautu
Fig. 1. The scheme of the construct used for knockout technique

W kolejnym kroku komórki poddaje się podwójnej selekcji: pozytywnej i negatywnej. Początkowo komórki traktuje się antybiotykiem – neomycyną, w wyniku czego giną te komórki, które w ogóle nie wbudowały konstrukt. Następnie działa się gancyklowirem, powodując eliminację wszystkich tych komórek, które wbudowały cały konstrukcję w dowolnym, niepożądanym miejscu genomu. Pozostaną komórki z nokautem genu, który miał zostać inaktywowany. Tak przygotowane komórki wprowadza się poprzez mikroiniekcję do blastocyst uzyskanych ze skojarzenia myszy czarnych, które następnie implantuje się w macicy matki zastępczej.

W pokoleniu pierwszym otrzymane zostaną tzw. osobniki chimerowe (łaciate). Samce chimerowe kojarzy się z samicą o kolorze czarnym, a w pokoleniu F2 z częstotnością 25% pojawiają się osobniki ze znokautowanym allelem danego genu (Górska i Kowalski, 1997). Posłużą one następnie do kojarzeń typu siostra x brat, w wyniku których otrzyma się pokolenie homozygotyczne z nokautem genowym.

U tak uzyskanych zwierząt na podstawie zmian w fenotypie można określić funkcję białek kodowanych przez nokautowane geny. Jeśli osobniki z nokautem danego genu są żywotne, można pozwolić sobie na utrzymywanie tej hodowli w postaci homozygotycznej (szczep wsobny, w którym wszystkie osobniki posiadają nokaut genu). Może się jednak okazać, że nokaut ten u różnych szczepów wsobnych daje różne efekty fenotypowe. Produkty innych genów mogą bowiem maskować niedobory związane z wyłączeniem konkretnego genu, co powoduje trudności w identyfikacji jego roli. Efekt ten zwany jest homeostazą rozwojową. Przykładem mogą tu być geny *Trp53* czy *Tex18*, których nokaut nie zawsze powoduje zaburzenia w fenotypie (Paul i in., 2007; Jaroszynski i in., 2007). Bardzo często na skutek nokautu genu osobniki

mają mocno zaburzone parametry rozrodu – wtedy hodowlę taką utrzymuje się na heterozygotycznym tle genetycznym, umożliwiającym zachowanie płodności i utrzymanie szczepu z nokautem genowym w hodowli. Z tego też powodu istnieje potrzeba okresowego badania stopnia heterozygotyczności posiadanych szczepów, np. poprzez analizę sekwencji mikrosatelitarnych.

Sekwencje mikrosatelitarne

Wiadomo, iż geny odpowiedzialne za spermatogenezę leżą zarówno na chromosomie Y (Krzanowska, 1969), jak i na autosomach (np. geny kodujące hormony płciowe oraz ich receptory) (Huhtaniemi, 2006). Jednak bardziej szczegółowa wiedza na ten temat w dalszym ciągu nie jest dostatecznie znana i wymaga kolejnych analiz i badań. Kolejną z technik umożliwiającą zlokalizowanie genów kontrolujących jakość nasienia opiera się na badaniu sekwencji mikrosatelitarnych w szczepach wsobnych rekombinacyjnych (RI; ang. recombinant inbred). Ludzki genom składa się z ponad 20 000 genów. Sekwencje kodujące stanowią zaledwie około 3%, natomiast sekwencje związane z genami, takie jak introny, promotory czy pseudogeny – 27%. Pozostałe 70% to sekwencje unikatowe (ok. 55%) oraz sekwencje repetytywne (powtarzalne) (15%). Wśród sekwencji powtarzalnych można wyróżnić dwie grupy. Do pierwszej zalicza się kilka rodzin rozproszonych sekwencji jądrowych, wśród nich najbardziej znane są długie (LINEs; ang. long interspersed nuclear element) oraz krótkie (SINEs; ang. short interspersed nuclear elements) rozproszone sekwencje (Bennett, 2000). Elementy te w czasie procesu transpozycji występują w postaci RNA. Transpozycja jest procesem zachodzącym w obecności ruchomej jednostki genetycznej (transpozonu lub retrotranspozonu w przypadku cząsteczek SINEs i LINEs), która posiada zdolność przemieszczania do innego miejsca w genomie (Gadzalski i Sakowicz, 2008).

LINEs to sekwencje o długości około 5000–6400 pz (par zasad), natomiast SINEs posiadają około 100–400 pz i stanowią więcej niż 5% całkowitego DNA. Najbardziej znaną krótką rozproszoną sekwencją jądrową u naczelnych jest sekwencja Alu. Podczas gdy elementy LINEs posiadają zdolność do autonomicznej transpozycji, cząsteczki SINEs zmuszone są wykorzystywać do tego procesu enzymy kodowane przez inne retrotranspozony (np. LINEs) (Gadzalski i Sakowicz, 2008). Drugą grupę sekwencji powtarzalnych tworzą tandemowe sekwencje repetytywne, które ze względu na długość jednostki podstawowej oraz częstotliwość jej występowania zostały podzielone na trzy podgrupy: satelity, minisatelity oraz mikrosatelity. DNA satelitarne stał się niezwykle ważny w badaniach nad mapowaniem genomu, kryminalistyce, a także w badaniach związanych z określaniem pokrewieństwa. Tak szerokie zastosowanie wynika z jednej, bardzo istotnej cechy – dużego polimorfizmu długości w danych loci. Szczególnie ważne okazały się tu mikrosatelity. Jednostka powtarzalna sekwencji satelitarnych zbudowana jest z od pięciu do kilku tysięcy par zasad, a całkowita wielkość wynosi od 100 kilo par zasad do kilku mega par zasad (Bennett, 2000). W ludzkim genomie satelity nie ulegają transkrypcji i zlokalizowane są w obrębie heterochromatyny, a szczególnie w heterochromatynie centromerowej. Obecnie nie ma żadnych dowodów, które dowodziłyby, iż te repetytywne sekwencje spełniają znaczącą funkcję we wspomnianych regionach. Ze względów na duże rozmiary cząsteczek satelity nie są wykorzystywane w praktyce.

W przeciwieństwie do sekwencji satelitarnych, minisatelity znalazły zastosowanie w badaniach naukowych. Dzieli się je na dwie podgrupy: minisatelity telomerowe oraz hiperprzemienne (VNTRs). Pierwsza grupa to powtórzenia tandemowe głównie „TTAGGG” dodawane do odcinków telomerowych chromosomów dzięki specjalnemu enzymowi – telomerazie. Minisatelity spełniają tutaj bardzo istotną funkcję, chroniąc końcowe odcinki chromosomów przed uszkodzeniem. Odgrywają także ważną rolę w procesie parowania się chromosomów oraz podczas podziału komórkowego. Minisatelity hiperprzemienne budują jednostki rdzeniowe o długości 6–50 nukleotydów powtarzane od dwóch do kilkuset razy w pojedynczym locus. Ich wysoce polimorficzna natura (obecna m.in. dzięki nierównemu crossing-over pomiędzy tandemowymi powtórzeniami) sprawiła, iż zostały one użyte do indentyfikacji indywidualnej wykorzystywanej w badaniach pokrewieństwa, poradnictwie genetycznym, transplantologii oraz w sprawach sądowych (DNA fingerprinting) (Jeffreys, 2005). Dziś są jednak zastępowane przez sekwencje mikrosatelitarne. W przeciwieństwie do satelit mających tendencję do skupiania się w obrębie chromatyny centromerowej, VNTRs występują zwykle w regionach telomerowych. Mimo że nie ma dowodów sugerujących, że ich lokalizacja jest związana z pełnieniem jakichkolwiek funkcji, minisatelity są uważane za gorące miejsca rekombinacji homologicznej.

Mikrosatelity są obecnie najważniejszą i najszerzej wykorzystywaną grupą spośród DNA satelitarnego. Szacuje się, iż stanowią one 3% ludzkiego genomu (Lygo i in., 1994). Składają się z mono-, di-, tri-, tetra-, penta- lub heksanukleotydowych sekwencji powtórzonych od 2 do 100 razy. W przypadkach patologicznych liczba ta może sięgać setek, a nawet tysięcy (Bal, 1998). STR (ang. short tandem repeat) zwykle występują w regionach euchromatyny, jednak część sekwencji jest zlokalizowanych w centromerach i telomerach. Występują w postaci powtórzeń jednakowych sekwencji lub przedzielone kilku nukleotydowymi wstawkami. Większość mikrosatelit umiejscowionych jest w obrębie intronów, wyjątek stanowią powtórzenia tri- i heksanukleotydowe, które są charakterystyczne głównie dla eksonów, przez co istnieje przypuszczenie, iż pełnią one nie do końca poznaną jeszcze funkcję. Stawia to w nowym świetle hipotezę sugerującą przynależność większości sekwencji STR do tzw. „śmieciewego DNA”. Dzięki dużemu polimorfizmowi sekwencje mikrosatelitarne mogą być wykorzystywane jako markery różnicujące osobniki. Jest to możliwe dzięki skłonnościom STR do ulegania mutacjom, w wyniku których otrzymujemy różne formy mikrosatelit w danym locus w populacji. Mutacje, którym najczęściej podlegają sekwencje STR, polegają na addycji lub delecji podstawowej jednostki repetytywnej – ma się wtedy do czynienia z tzw. polimorfizmem długości. Nieco rzadziej w wyniku mutacji może dojść do powstania niepełnego elementu rdzeniowego lub mutacji punktowej (Möller i in., 1994). W przypadku zwiększenia lub zmniejszenia sekwencji mikrosatelitarnej o 1 powtórzenie mówimy o tzw. SSM (ang. stepwise mutation model), gdy dochodzi do zwiększenia większej ilości powtórzeń – two-phase model.

Krótkie powtórzenia tandemowe zawdzięczają swoją różnorodność dwóm procesom: dużej podatności na błędy w czasie procesu replikacji oraz nierównomiernemu crossing-over. W trakcie pierwszego procesu często dochodzi do nieprawidłowego działania polimerazy, w wyniku którego zostaje dobudowany lub odcięty motyw. Jest to tzw. „ślizganie się polimerazy” (ang. polymerase slippage). Enzym opuszcza lub

dobudowuje pojedynczą jednostkę rdzeniową, zależnie od tego, czy do pomyłki doszło na nici matrycowej, czy potomnej. Wykazano, iż sekwencje trójnukleotydowe rzadziej ulegają tego typu błędom niż np. sekwencje dwunukleotydowe. W czasie mejozy może zadziałać drugi czynnik wpływający na zmiany w danym locus mikrosatelitarnym – nierównomierny crossing-over. W wyniku błędnego sparowania chromosomów homologicznych w obrębie powtarzalnych sekwencji tandemowych, a następnie wymiany fragmentów chromatyd, może dojść do wymiany odcinków o różnej długości, co w efekcie doprowadzi do powstania 2 różnych alleli (Sołtyszewski i in., 2006).

Sekwencje mikrosatelitarne, ze względu na prosty schemat dziedziczenia, wysoki polimorfizm i szerokie występowanie w obrębie euchromatyny, wyparły analizę innych typów satelitarnego DNA w badaniach pokrewieństwa, kryminalistyce etc. i okazały się idealnymi markerami różnicującymi osobniki. Główną metodą pozwalającą analizować odcinki STR jest łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. polymerase chain reaction). Po namnożeniu odpowiedniej sekwencji mikrosatelitarnej rozdziela się elektroforetycznie otrzymane produkty w żelu, uzyskując informację o długości mikrosatelity występującej u danego osobnika w analizowanym locus.

Zastosowanie sekwencji mikrosatelitarnych w mapowaniu genów kontrolujących jakość nasienia

Proces mapowania genów rozpoczyna się od opracowania markerów genetycznych (np. mikrosatelitów) różniących się ilością jednostek repetytywnych (długością) w dwóch homozygotycznych szczepach wsobnych, z których chce się otrzymać szczepy rekombinacyjne. Należy też poddać analizie odpowiednie cechy tych szczepów wsobnych, np.:

- liczbę martwych lub żywych plemników,
- obecność lub brak kropli cytoplazmatycznej (świadcząca o stopniu dojrzałości),
- ruchliwość,
- odsetek morfologicznie nieprawidłowych plemników,
- integralność błony cytoplazmatycznej witki plemnika.

Najlepiej, jeśli ma się do czynienia z dwoma szczepami różniącymi się parametrami, których geny chcemy mapować (np. szczep z dużym oraz szczep z małym procentem amorficznych główek). Zwierzęta krzyżuje się i metodami hodowlanymi uzyskuje się tzw. szczepy wsobne rekombinacyjne. Następnie u otrzymanego potomstwa porównuje się wzór rozkładu cechy (SDP; ang. strain distribution pattern) z wzorem rozkładu mikrosatelit różnicujących dwa szczepy wsobne wyjściowe. W ten sposób, np. przy pomocy programu MapManager QTX, ustala się obszar chromosomu, w obrębie którego znajduje się gen odpowiedzialny za daną cechę. Badania te mają na celu wskazanie roli różnego rodzaju białek w spermatogenezie i jednocześnie pokazanie, jak duży wpływ na jakość plemników ma tło genetyczne, czyli geny zlokalizowane na autosomach.

Dzięki zastosowaniu szczepów wsobnych myszy z nokautami genowymi potwierdzono obecność wielu genów zaangażowanych w proces gametogenezy. Należą do nich m.in. geny: *Tnp2* (ang. transition protein 2; Adham, 2001), *Acr* (ang. proacrosin; Nayernia, 2002), *Creb3l4* (Adham i in., 2005) czy *Trp53* (Yin i in. 1998; Paul i in.,

2007). W przypadku inaktywacji genu dla enzymu proakrozyny dochodziło do znacznego opóźnienia penetracji otoczki przejrzystej w wyniku niesprawnego przebiegu reakcji akrosomowej. Plemniki takie w warunkach *in vitro* nie miały szans na zapłodnienie, konkurując z prawidłowymi gametami. O 20% mniej plemników w nasieniu zaobserwowano u myszy z wyłączonym genem *Creb3l4*, podczas gdy pozostałe parametry pozostawały w normie. Znaczny wzrost odsetka gamet o amorficznej główce występował u myszy 129/Sv z unieczynnionym genem *Tnp2*. Za wady morfologii odpowiadał nieprawidłowo zbudowany akrosom uniemożliwiający zapłodnienie. Nasienie tak zmodyfikowanych myszy wykazywało również zmniejszoną liczbę plemników w ejakulacie oraz upośledzoną ruchliwość. Stopień nasilenia tego zjawiska był jednak zależny od tła genetycznego i w niektórych szczepach nie powodował żadnych zaburzeń. Przykładem genu, który przejawia podobną zależność, jest gen *p53*. Jego inaktywacja w niektórych szczepach nie wpływa znacząco na pogorszenie parametrów płodności podczas gdy u samców 129/Sv powoduje całkowitą niepłodność (Rotter, 1993).

Dane literaturowe podają, że m.in. na chromosomach 3, 6, 11 i 12 zlokalizowane są geny kontrolujące spermiogenezę u myszy (L'Hote i in., 2007). Za pomocą szczepów wsobnych wyjściowych KE oraz CBA/Kw potwierdzono obecność 3 regionów chromosomowych biorących udział w spermatogenezie, znajdujących się na autosomalnych: 6, 11 oraz 18 (Gołas i in., 2008). Region q15.6 chromosomu 6 związany jest z pojawieniem się amorficznych główek plemników. Zlokalizowano w nim m.in. 2 geny: *Hipk2* oraz *Casp2*, których produkty kontrolują proliferację oraz apoptozę komórek odbiegających od normy w czasie powstawania plemników. W chromosomie 11 wyróżniono region 11q24 – 11q31, a w nim 6 genów leżących u podstaw regulacji jakości nasienia oraz gen *Sparc* kontrolujący rozwój jąder. Pozostałe 6 genów to: *Kit3a* oraz *Tekt3* związane są z mikrotubulami i ich prawidłowym rozwojem, *Aurkb*, który ulega ekspresji w diplotenie, wpływając na segregację w trakcie procesu mejozy i procent normalnie ukształtowanych główek oraz geny *Hist3h2ba*, *Hist3h2bb* i *Hist3h2a* kodujące trzy podjednostki histonowe.

Nowe techniki wspomagania rozrodu u zwierząt hodowlanych

Prawidłowy rozród zwierząt hodowlanych jest ważnym aspektem ekonomicznym oraz istotnym etapem w przypadku chęci utrzymania planu hodowlanego ukierunkowanego na pożądaną cechę użytkową czy eksterierową. Płodność uwarunkowana jest zarówno przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Wśród knurów całkowicie niezdolnych do zapłodnienia najczęstszą przyczyną są nieprawidłowe parametry jakości nasienia: brak plemników w ejakulacie, zbyt duży odsetek plemników o patologicznej budowie (Gasiński, 2002). Prawidłowa jakość nasienia jest szczególnie istotna w przypadku wprowadzenia sztucznego zapłodnienia. Użycie nasienia o obniżonych parametrach płodności do zapłodnienia loch przyniosłoby ogromne straty. Do oceny seminologicznej zwierząt hodowlanych bierze się pod uwagę, takie cechy jak: koncentrację spermy, ruchliwość oraz liczbę morfologicznie prawidłowych plemników (Colenbrander i in., 1993). Jednak uzyskiwane z laboratoriów dane wykazują duże rozbieżności i nie rozstrzygają ostatecznie o zdolności rozrodczej zwierzęcia (Braundmeier i Miller, 2001). Z pomocą przychodzą tutaj zaawansowane techniki molekular-

ne. Dzięki analizie potencjalnych genów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg spermatogenezy można by w sposób bardziej precyzyjny określić płodność samców. Kwestia płodności loch jest dużo lepiej zbadana, jako że samice mają większy wpływ na prawidłowy rozród, jednak coraz częściej zwraca się również uwagę na zdolności reprodukcyjne samców. Obecnie do genów – kandydatów, mogących świadczyć o potencjale rozplodowym knura, zalicza się geny: *HSP70.2* (ang. heat shock protein 70.2), *RYR1* (ang. ryanodine receptor gene), *OPN* (ang. osteopontin gene), *RBP4* (ang. retinol-binding protein 4). Doświadczenie wykonane przez Lina i in. (2005) potwierdziło wpływ dodatkowych genów, takich jak: *GnRHR* (ang. gonadotropin releasing hormone receptor), *INHBA* (ang. inhibin beta A), *INHBB* (ang. inhibin beta B) (Lin i in., 2005). Locus *GNRHR* wykazuje znaczące oddziaływanie na ruchliwość, obecność kropli cytoplazmatycznej (świadczącej o niedojrzałości komórek rozrodczych) oraz odsetek nieprawidłowych morfologicznie plemników. Podobne obserwacje dotyczą również nieplodnych mężczyzn (Layman i in., 1997). W przypadku bydła duży postęp poczyniono nie tylko w zrozumieniu genetycznego podłoża mleczości, chorób genetycznych, ale także płodności. Liczbę genów kandydatów zaangażowanych w prawidłowy proces gametogenezy u buhaja określa się na 200 (Leeb i in., 2007). Wśród nich typuje się geny: *TNPI*, *CRISP2*, *PRND*, *TNFA*, *CATSPER2*, *CNGA3*, *STAT5A*. Jednak ostatnie wyniki badań donoszą, iż markerów płodności należy szukać nie tylko w obrębie genomu jądrowego, ale także mitochondrialnego (Crepaldi i in., 2010).

Mniejszy postęp w zakresie powyższych badań obserwuje się w przypadku owiec czy ogierów, ze względu na ich mniejsze znaczenie ekonomiczne, jednak otrzymane wyniki mogą być ekstrapolowane na wyżej wymienione gatunki. Niektóre aberracje chromosomowe występujące u ludzi czy myszy są także spotykane u nieplodnych ogierów. Mimo że brak jest oficjalnych danych na temat genetycznych markerów płodności w tej grupie, cel ten może zostać osiągnięty w najbliższej przyszłości. Już dziś takimi genami – kandydatami są geny: *CRISP1*, *CRISP2*, *CRISP3* (Giese i in., 2002 a, b). Wśród koni zlokalizowanie takich markerów byłoby szczególnie cenne w przypadku najbardziej wartościowych ogierów hodowlanych.

Podsumowanie

Opracowanie genów płodności jest ważne w procesie określanym jako MAS (ang. marker assisted selection), czyli selekcji wspomagananej markerami. Mogłaby ona rozstrzygać o potencjale rozrodczym już we wczesnych etapach życia i pomóc w podjęciu szybkiej decyzji o przynależności zwierzęcia do określonej grupy produkcyjnej. Zadanie to jest realizowane dzięki zastosowaniu szczepów wsobnych myszy z nokautami genowymi lub przy użyciu sekwencji mikrosatelitanych. Wskazano już na obecność wielu genów związanych ze spermatogenezą położonych zarówno na autosomach, jak i chromosomach płci. Efekt ich działania nie zawsze jest taki sam, w znacznym stopniu zależy od tła genetycznego, co utrudnia proces mapowania. Jednak możliwość wykorzystania genów jako obiektywnego wskaźnika płodności wy-

daje się być obiecująca. Poprzez prawidłowy dobór hodowlany mogłaby wpłynąć na ograniczenie strat ekonomicznych ponoszonych przez hodowców w przypadku przeniesienia do reprodukcji samca o słabych parametrach rozrodczych.

Piśmiennictwo

- Adham I.M., Nayernia K., Burkhardt-Gottges E., Topaloglu O., Dixkens C., Holstein A.F., Engel W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol. Hum. Reprod.*, 7: 513–520.
- Adham I.M., Eck T.J., Mierau K., Muller N., Sallam M.A., Paprotta I., Schubert S., Hoyer-Fender S., Engel W. (2005). Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-Deficient Mice. *Mol. Cell Biol.*, 25: 7657–7664.
- Bal J. (1998). *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Springer, PWN.
- Bennett P. (2000). Demystified microsatellites. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 53: 177–183.
- Braundmeier A.G., Miller D. (2001). The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J. Dairy Sci.*, 84: 1915–1925.
- Brylińska J., Kwiatkowska J. (1996). *Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń*. Kraków, Universitas, ss. 36–40.
- Colenbrander B., Feitsma H., Grooten H.J. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 207–215.
- Crepaldi P., Nicoloso L., Milanesi E., Santus E., Negrini R. (2010). Towards the understanding of bull fertility: phenotypic traits description and candidate gene approach. *It. J. Anim. Sci.*, 8: 60–62.
- Gadzalski M., Sakowicz T. (2008). SINE – rozproszone elementy genomów eukaryota. *Post. Biol. Kom.*, 35: 153–167.
- Gasiński M. (2002). Zaburzenia w rozrodzie trzody chlewnej. *Trz. Chl.*, 40: 20–22.
- Giese A., Jude R., Kuiper H., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Distl O., Töpfer-Petersen E., Leeb T. (2002 a). Molecular characterization of the equine AEG1 locus. *Gene*, 292: 65–72.
- Giese A., Jude R., Kuiper H., Raudsepp T., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Chowdhary B.P., Distl O., Töpfer-Petersen E., Leeb T. (2002 b). Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene*, 299: 101–109.
- Gołas A., Dzieza A., Kuzniarz K., Styrna J. (2008). Gene mapping of sperm quality parameters in recombinant inbred strains of mice. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 287–293.
- Górska M., Kowalski L.M. (1997). Knock-out genoway – zastosowanie w badaniach medycznych. *Alergia Astma Immunol.*, 3: 162–169.
- Huhtaniemi I. (2006). Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: Novel information from transgenic and knockout mice. *Mol. Cell Endocrinol.*, 254–255: 84–90.
- Jaroszynski L., Dev A., Li M., Meinhardt A., De Rooij D.G., Mueller C., Bohm D., Wolf S., Adham I.M., Wulf G., Engel W., Nayernia K. (2007). Asthenoteratozoospermia in mice lacking testis expressed gene 18 (Tex18). *Mol. Hum. Reprod.*, 13: 155–163.
- Jeffreys A.J. (2005). Genetic fingerprinting. *Nat. Med.*, 11: 1035–1039.
- Krzanowska H. (1969). Factor responsible for spermatozoan abnormality located on the Y chromosome in mice. *Genet. Res.*, 13: 17–24.
- L'Hôte D., Serres C., Laissue P., Oulmouden A., Rogel-Gaillard C., Montagutelli X., Vaiman D. (2007). Centimorgan-Range One-Step Mapping of Fertility Traits Using Interspecific Recombinant Congenic Mice. *Genetics*, 176: 1907–1921.
- Layman L.C., Peak D.B., Xie J., Sohn S.H., Reindollar R.H., Gray M.R. (1997). Mutation analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil. Steril.*, 68: 1079–1085.
- Leeb T., Sieme H., Töpfer-Petersen E. (2007). The horse genome project—sequence based insights into male reproductive mechanisms. *Anim. Reprod. Sci.*, 89: 21–29.

- Lin C.L., Ponsuksili S., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K., Wimmers K. (2005). Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 349–363.
- Lygo J.E., Johnson P.E., Holdaway D.J., Woodroffe S., Whitaker J.P., Clayton T.M., Kimpton C.P., Gill P. (1994). The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int. J. Leg. Med.*, 107: 77–89.
- Möller A., Meyer E., Brinkmann B. (1994). Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Hum. Med.*, 106: 319–323.
- Nayernia K., Adham I.M., Shamsadin R., Muller C., Sanncken U., Engel W. (2002). Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 8: 434–440.
- Paul C., Povey J.E., Lawrence N.J., Selfridge J., Melton D.W., Saunders P.T.K. (2007). Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS*, 10, p. e989.
- Rotter V., Schwartz D., Almon E., Goldfinger N., Kapon A. (1993). Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc. National Acad. Sci. USA*, 90: 9075–9079.
- Sołtyszewski I., Purzycka J.K., Powierska-Czarny J., Olewiecki I. (2006). Zmiany nowotworowe – implikacje w genetycznej identyfikacji osób. *Problemy Kryminalistyki*, 253: 6–9.
- Yin Y., Stahl B.C., DeWolf W.C., Morgentaler A. (1998). p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 204: 165–171.
- www.animalab.pl
www.jax.org

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

DOROTA BEDERSKA

Application of gene knockout techniques, analysis of microsatellite sequences and inbred strains of mice in mapping genes responsible for spermatogenesis

SUMMARY

This review describes mapping techniques of the genes responsible for mammalian spermatogenesis. Two most frequent methods: knockout and analysis of microsatellite sequences in chosen inbred strains are presented. Identification of the sequences that influence gametogenesis could be a useful tool to maintain undisturbed reproduction of farm animals. The effect of genes on fertility has been adequately studied in mice and humans, but also farm animals are increasingly investigated.

Key words: microsatellite sequences, gene mapping, spermatogenesis, inbred mouse strains

CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY GENETYCZNEJ POLSKIEJ OWCY GÓRSKIEJ ODMIANY BARWNEJ*

Aldona Kawęcka¹, Katarzyna Piórkowska²

¹Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt, ²Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt,
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa

W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę charakterystyki struktury genetycznej polskiej owcy górskiej odmiany barwnej na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Do analizy wykorzystano 15 markerów zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec: DYMS1, INRA063, ILSTS28, OarAE129, OarFCB20, OarFCB226, OarFCB304, OarHH47, OarJMP29, OarJMP58, OarVH72, MAF65, MAF214, MCM527, SRCRSP5. U polskiej owcy górskiej odmiany barwnej zidentyfikowano 129 alleli w 15 loci. Średnia liczba alleli obserwowanych dla rasy wynosiła 8,6, a efektywnych 5,28. Średnia heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana osiągnęła wysokie wartości, które wynosiły odpowiednio 0,709 i 0,795. Wyliczony współczynnik inbredu wynosił 0,108. Uzyskane wyniki wskazują na stosunkowo duże zróżnicowanie genetyczne badanej populacji. Wykorzystując narzędzie, jakim są markery mikrosatelitarne, można porównywać poziom zmienności rodzimych ras owiec i monitorować zmiany zachodzące w tych niewielkich populacjach.

Produkcja owczarska w Polsce charakteryzuje się ogromną różnorodnością na tle innych krajów europejskich. Obecnie użytkowanych jest ponad trzydzieści ras owiec i innych grup genetycznych, takich jak linie hodowlane i mieszańce pełne. Zmiany zachodzące w skutek pracy hodowlanej stwarzają niebezpieczeństwo ograniczenia tej różnorodności. Coraz większego znaczenia nabierają zatem badania struktury genetycznej tego gatunku służące monitorowaniu zmian zachodzących w populacjach. Wiele ośrodków naukowych na świecie wykorzystuje w tym celu markery mikrosatelitarne, szczególnie do szacowania zmienności genetycznej rodzimych ras owiec, często zagrożonych wyginięciem (Oliveira i in., 2003; Paiva i in., 2005; Bozzi in., 2009). Działania takie przewidziane są również w ramach Światowego Planu działań na rzecz Zasobów Genetycznych Zwierząt (Global Plan of Action). W programie MoDAD (Measurement of Domestic Animal Diversity – Analiza Różnorodności Biologicznej Zwierząt Gospodarskich) zaproponowano zestaw markerów przydatnych do badań struktury genetycznej zwierząt gospodarskich (FAO, 2004). Na podstawie frekwencji alleli w loci mikrosatelitarnych szacuje się zmienność genetyczną.

* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ-PIB, Temat 1333.1.

W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Zootechniki PIB podjęto próbę charakterystyki struktury genetycznej barwnej owcy górskiej na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 96 maciorkach polskiej owcy górskiej odmiany barwnej. Zwierzęta pochodziły z dwóch największych stad biorących udział w programie ochrony zasobów genetycznych, zlokalizowanych na terenie powiatu nowotarskiego.

Izolację DNA z krwi przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do izolacji genomowego DNA Wizard® *Genomic DNA Purification Kit*. Do analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA wykorzystano 15 markerów zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec (FAO, 2004): *DYMS1*, *INRA063*, *ILSTS28*, *OarAE129*, *OarFCB20*, *OarFCB226*, *OarFCB304*, *OarHH47*, *OarJMP29*, *OarJMP58*, *OarVH72*, *MAF65*, *MAF214*, *MCM527*, *SRCRSP5*.

Do każdego markera mikrosatelitarnego dobrano sekwencje starterowe wyznaczone znacznikami fluorescencyjnymi typu „well red”. Sekwencje starterowe pozyskano z internetowej bazy danych (<http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>). Amplifikację wyizolowanego DNA przeprowadzono w trzech reakcjach typu multiplex. Pierwszy zestaw reakcyjny zawierał startery dla fragmentów mikrosatelitarnych: *OarJMP29*, *OarJMP58*, *OarFCB226*, *INRA063*, *OarVH72*; drugi: *OarHH47*, *DYMS1*, *SRCRSP5*, *ILSTS28*; trzeci: *MAF65*, *OarFCB20*, *OarFCB304*, *OarAE129*, *MAF214*, *MCM527*. Reakcję dla pojedynczej próbki DNA przeprowadzono w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała: 100 ng DNA, 1,2 μ l 25 mM $MgCl_2$, 0,4 μ l 10mM dNTP, 1 μ l buforu (10 \times), 0,2–0,9 10mM primerów i 2 U polimerazy AmplitaqGold. Amplifikację dla wybranych sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C – 10 min, 31 cykli: 94°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 1 min, wydłużanie: 72°C – 5 min. Produkty PCR poddano rozdzielaniu w sekwenatorze kapilarnym Beckman Coulter CEQ8000. Wielkość analizowanych fragmentów mikrosatelitarnych określono w parach zasad, a uzyskane dane stanowiły podstawę do przeprowadzenia analiz statystycznych. Analizy przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego POPGENE 3.2 (www.ualberta.ca/~fyeh/). Na podstawie częstości alleli obliczono parametry zmienności genetycznej: heterozygotyczność obserwowaną (H_o) i oczekiwaną (H_e), liczbę alleli obserwowanych (N_o) i efektywnych (N_e) dla poszczególnych *loci*, indeks stopnia polimorfizmu (PIC) oraz współczynnik inbrodu (F_{IS}).

Wyniki

U polskiej owcy górskiej odmiany barwnej zidentyfikowano 129 alleli w 15 *loci*. Wszystkie badane sekwencje mikrosatelitarne były polimorficzne. Największą liczbą alleli (12) o długości od 126 do 154 pz charakteryzował się *locus OarHH47*, w któ-

Tabela 2. Obserwowana liczba alleli (No), efektywna liczba alleli (Ne), heterozygotyczność obserwowana (Ho) i oczekiwana (He), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) i wartość F_{IS} dla badanych loci i średnia dla rasy

Table 2. Observed number of alleles (No), effective number of alleles (Ne), observed (Ho) and expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC), and F_{IS} value at the loci and mean for breed

Locus	No	Ne	Ho	He	PIC	F_{IS}
DYMS1	10	8,13	0,906	0,882	0,865	-0,033
INRA063	9	4,91	0,479	0,801	0,770	0,398
ILSTS28	9	5,12	0,739	0,809	0,778	0,081
OarAE129	5	3,35	0,406	0,705	0,647	0,421
OarFCB20	10	5,73	0,635	0,829	0,807	0,230
OarFCB226	9	5,21	0,760	0,812	0,779	0,059
OarFCB304	7	2,95	0,656	0,665	0,621	0,008
OarHH47	12	6,15	0,865	0,842	0,821	-0,032
OarJMP29	11	5,04	0,729	0,806	0,783	0,09
OarJMP58	10	6,65	0,760	0,854	0,832	0,105
OarVH72	8	6,39	0,750	0,848	0,824	0,111
MAF65	7	4,46	0,635	0,779	0,737	0,181
MAF214	8	3,82	0,812	0,742	0,698	-0,100
MCM527	10	8,45	0,895	0,886	0,870	-0,016
SRCRSP5	4	2,92	0,615	0,661	0,608	0,066
	8,6	5,28	0,709	0,795	0,763	0,108

Średnia liczba alleli obserwowanych dla rasy wynosiła 8,6, a efektywnych 5,28. Średnia heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana osiągnęła wysokie wartości, które wynosiły odpowiednio $Ho = 0,709$ i $He = 0,795$. Wyliczony współczynnik in-bredu wynosił 0,108.

Omówienie wyników

Trzynaście rodzimych ras owiec objęto w Polsce programem ochrony zasobów genetycznych, ponieważ uznano je za zagrożone wyginięciem. Należą do nich wspomniana już barwna owca górską, korideil, owca kamieniecka, olkuska, pomorska, uhruska, wielkopolska, żelaźnieńska, świniarka, wrzosówka, merynos barwny, merynos polski w starym typie i cakiel podhalański.

Barwna owca górską jest rodzimą odmianą starej, prymitywnej i licznej grupy rasowej cakiel, występującej od wieków na terenie polskich Karpat. Ceniono ją szczególnie ze względu na kolorową, ciemną wełnę i skóry, które wykorzystywano do produkcji strojów regionalnych i elementów dekoracyjnych. Owce te są doskonale przystosowane do surowych warunków klimatycznych, odporne na choroby, mają niewielkie wymagania paszowe i silnie rozwinięty instynkt stadny. Użytkowane są w kierunku wełnisto-mlecznym. Obecnie populacja barwnych owiec górskich liczy około 600 osobników.

Na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych podejmowano próby oceny struktury genetycznej rodzimej rasy wrzosówki (Radko i in., 2006) i merynosa barwnego (Rychlik i in., 2007). Wśród 57 europejskich ras owiec, których strukturę genetyczną analizowali Peter i in. (2007), znalazły się takie polskie rodzime rasy jak wrzosówka, owca kamieniecka, pomorska, żelaźnieńska oraz polska owca górską. Badania te stanowią część większego projektu ECONOGENE (<http://www.econogene.eu>), finansowanego przez Unię Europejską, którego celem było pogłębienie istniejącej wiedzy na temat bioróżnorodności owiec i kóz Europy i Środkowego Wschodu, przy pomocy technik biologii molekularnej, z uwzględnieniem socjo-ekonomicznych warunków w regionach ich występowania.

Zastosowane w badaniach własnych sekwencje mikrosatelitarne charakteryzowały się wysokim polimorfizmem. Indeks stopnia polimorfizmu (PIC) dla wszystkich *loci* przekraczał 0,76. Wskazuje to na przydatność zastosowanych markerów w badaniach struktury genetycznej owiec. Średnia liczba alleli dla barwnej owcy górskiej wynosiła 8,6. Peter (2005) uzyskała dla polskiej owcy górskiej podobną liczbę alleli (8,42). Pozostałe polskie lokalne rasy wymienione przez autorkę charakteryzowały się niższymi wartościami: No = 7,6 dla owcy pomorskiej i kamienieckiej, 6,84 dla wrzosówki i 6,16 dla owcy żelaźnieńskiej. W badaniach Rychlika i in. (2007) średnia liczba alleli dla najmniej licznej rasy rodzimej – barwnego merynosa, była znacznie wyższa i wynosiła 9,4. Liczba alleli w populacjach cakła występujących na terenie Rumunii (Ruda), Albanii (Ruda, Bardhoke), Turcji (Sakiz, Gokceada) i Serbii (Pramenka) wahała się od 5,9 do 7,8, a u bułgarskiej rasy Martiza wyniosła 8,6 (Kusza i in., 2008). Dalvit i in. (2008) badając genetyczną strukturę ośmiu alpejskich ras owiec zaobserwowali od 7,4 (Tiroler Bergschaf) do 9 alleli (Biellesse). Pomimo wysokiej liczby obserwowanych alleli u owcy barwnej, liczba efektywnych alleli była dużo niższa w poszczególnych *loci*. Niską liczbę alleli efektywnych u merynosa barwnego ($N_e = 4,2$) stwierdził również we wspomnianej już pracy Rychlik i in. (2007).

W badaniach własnych uzyskano wysokie wartości heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), z wyjątkiem *loci OarAE129* i *INRA063*, gdzie H_o nie przekroczyła 0,5. Średnia heterozygotyczność obserwowana u barwnej owcy górskiej wynosiła 0,71. Zbliżoną wartość H_o dla polskiej owcy górskiej (0,7) uzyskała Peter (2005). Inne polskie rodzime rasy w badaniach tej autorki charakteryzowały się również stosunkowo wysokimi wartościami H_o : 0,65 dla owcy pomorskiej i żelaźnieńskiej oraz 0,75 dla kamienieckiej. Barwna owca górską charakteryzowała się wyższą heterozygotycznością niż większość ras zaliczanych do grupy rasowej cakiel występującej na terenie Europy południowo-wschodniej. Heterozygotyczność obserwowana dla różnych odmian cakła zaobserwowana przez Kusza i in. (2008) była znacznie niższa i wahała się od 0,4 u owiec rasy Pramenka do 0,57 dla bułgarskiej rasy Martiza. Według Peter (2005) dla innych ras zaliczanych do grupy rasowej cakiel, H_o wynosiła 0,62 u greckiej owcy Skopelos do 0,75 u albańskiej rasy Ruda. Zbliżone wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej wskazują na równowagę w populacji owcy barwnej.

Uzyskane w pracy wyniki świadczą o dużej zmienności genetycznej rodzimej rasy. Do podobnych wniosków doszli Rychlik i Krawczyk (2009), którzy analizowali polimorfizm markerów klasy I u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej.

Narastające spokrewnienie osobników i wynikający stąd inbred jest problemem zarówno małych, zamkniętych populacji, jak i większych, poddanych intensywnej selekcji. Wzrost inbredu jest przeważnie zjawiskiem niekorzystnym, może powodować spadek żywotności, zdrowotności i użytkowości. W hodowli owiec najczęściej powoduje on obniżenie masy ciała i tempa wzrostu jagniąt, płodności i plenności maciorek. Miarą stopnia zimbredowania populacji jest współczynnik inbredu (F_{IS}), który określa proporcję heterozygotyczności obserwowanej do oczekiwanej w populacji. Wartości współczynnika inbredu stwierdzone dla większości europejskich ras owiec wynosiły od 0,07 do 0,2 (Peter, 2005; Dalvit i in., 2008). Znacznie wyższy poziom tego wskaźnika dla kilkunastu populacji cygaja i cakla ($F_{IS} = 0,3$) zaobserwowali Kusza i in. (2008). Niskie prawdopodobieństwo inbredu (wartości $F_{IS} < 0$) dla ukraińskich i rosyjskich ras owiec zaobserwowali natomiast Ozerov i in. (2004). Wyliczony w badaniach własnych współczynnik inbredu przyjmował stosunkowo niską wartość. Z powodu ograniczonej liczebności populacji barwnej owcy górskiej należy zwracać w pracy hodowlanej szczególną uwagę na właściwy dobór tryków, z zachowaniem rotacji między stadami, tak aby nie dopuścić do wzrostu zimbredowania.

Uzyskane wyniki pokazały stosunkowo duże zróżnicowanie genetyczne badanej populacji barwnej owcy górskiej. Jednak ze względu na zagrożenie, jakie niesie za sobą wzrost inbredu, szczególnie w niewielkich populacjach rodzimych ras owiec, wskazane jest okresowe monitorowanie tych zmian przy użyciu markerów mikrosatelitarnych.

Piśmiennictwo

- Bozzi R., Degl'Innocenti P., Rivera Diaz P., Nardi L., Crovetto A., Sargentini C., Giorgetti A. (2009). Genetic characterization and breed assignment in five Italian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Res.*, 85, 1: 50–57.
- Dalvit C., Saccà E., Cassandro M., Gervaso M., Pastore E., Piasentier E. (2008). Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Res.*, 80, 1–3: 45–51.
- FAO (2004). Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers. FAO, Rome (Italy).
- Kusza S., Nagy I., Sasvári Z., Stágel A., Németh T., Molnár A., Kume K., Bösze Z., Jávör A., Kukovics S. (2008). Genetic diversity and population structure of Tsigai and Zackel type of sheep breeds in the Central-, Eastern- and Southern-European regions. *Small Ruminant Res.*, 78, 1–3: 13–23.
- Oliveira C., Barbosa E., Oliveira J., Arranz J.J., Bayon Y., Brito N.V., San Primitivo F. (2003). Genetic variability in Bordaleira de Entre Douro e Minho and Serra da Estrela Portuguese sheep breeds using microsatellites. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 2, 4: 484–486.
- Ozerov M., Marzanov N., Tapió M., Kiselyova T., Kantanen J. (2004). Microsatellite analysis of genetic diversity in Russian and Ukrainian sheep breeds. *Animal breeding in the Baltics. Proc. 10th Baltic Animal Breeding Conference, Tartu (Estonia), 13–14.05.2004.*
- Paiva S.R., Faria D.A., Silvério V.C., McManus C., Egito A.A., Dergam J.A., Guimarães S.E.F., Castro S.R., Albuquerque M.S.M., Mariante A.S. (2005). Genetic variability among Brazilian sheep using microsatellites. *Proc. Conf.: The role of Biotechnology, Villa Gualino, Turin (Italy), 5–7.03.2005*, pp. 195–196.
- Peter C. (2005). Molekulargenetische Charakterisierung von schaffrasen Europas und des nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten, PhD Thesis no 2729, Justus-Liebig-Universität Giessen (<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/2729/pdf/PeterChristina-2005-12-01.pdf>).

- Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. (2007). Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim. Genet.*, 38: 37–44.
- Radko A., Rychlik T., Słota E. (2006). Genetyczna charakterystyka owcy wrzosówka na podstawie 14 markerów mikrosatelitarnych DNA. *Med. Wet.*, 62, 9: 1073–1075.
- Rychlik T., Natonek-Wiśniewska M., Pakulski T. (2007). Characteristics of the genetic structure of a Coloured Merino genetic reserve flock. *Ann. Anim.Sci., Suppl.*, 1: 63–67.
- Rychlik T., Krawczyk A. (2009). Class I marker polymorphism in Polish Mountain Sheep of coloured and white varieties. *Ann. Anim. Sci.*, 9, 4: 385–393.

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

ALDONA KAWĘCKA, KATARZYNA PIÓRKOWSKA

Characteristics of the genetic structure of Polish Coloured Mountain sheep

SUMMARY

This study attempted to characterize the genetic structure of Polish Coloured Mountain sheep based on microsatellite DNA sequences. Analysis was made using 15 markers recommended by FAO for evaluation of biodiversity in sheep: DYMS1, INRA063, ILSTS28, OarAE129, OarFCB20, OarFCB226, OarFCB304, OarHH47, OarJMP29, OarJMP58, OarVH72, MAF65, MAF214, MCM527, and SRCRSP5. A total of 129 alleles at 15 loci were identified in Polish Coloured Mountain sheep. The mean number of observed and effective alleles for the breed was 8.6 and 5.28, respectively. The mean observed and expected heterozygosity reached high values of 0.709 and 0.795, respectively. The coefficient of inbreeding was 0.108. The results show relatively high genetic variation of the analysed population. Microsatellite markers can be used as a tool to compare the level of variation in the native sheep breeds and to monitor changes taking place in these small populations.

Key words: sheep, genetic structure, microsatellites

POLIMORFIZM GENU KALPASTATYNY W POPULACJI OWIEC RASY MERYNOS POLSKI*

Magdalena Szkudlarek-Kowalczyk, Ewa Wiśniewska,
Sławomir Mroczkowski

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy,
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Niektóre badania wykazały, że polimorficzne warianty genu kalpastatyny są powiązane z cechami takimi, jak masa ciała jagniąt przy urodzeniu oraz tempo wzrostu do momentu odsadzenia, co jest bardzo ważne przy dominującym obecnie mięsnym kierunku użytkowania owiec. Dlatego też celem badań było określenie polimorfizmu w genie kalpastatyny (CAST) w grupie 206 owiec rasy merynos polski, pochodzących z sześciu stad utrzymywanych na terenie województwa kujawsko-pomorskiego. Polimorfizm w owczym genie kalpastatyny został zidentyfikowany metodą PCR-RFLP według metodyki Palmera i in. (1998). Zamplifikowany produkt o długości 622 pz poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi MspI i NcoI. Częstość allele M/MspI wyniosła średnio 84,5% i wahała się w granicach od 74,7 do 100,0% w zależności od stada, natomiast częstość allele M/NcoI wyniosła średnio 99,5% w badanej grupie owiec (od 96,9 do 100,0% w poszczególnych stadach).

Kalpastatyna jest endogennym inhibitorem endogennych proteaz sakroplazmatycznych – kapalin. Układ kalpainowy złożony jest z kilku form izomerowych kapalin zależnych od stężenia jonów wapnia oraz ich specyficznego inhibitora – kalpastatyny. Kalpastatyna hamując aktywność kapalin w istotny sposób wpływa na proces kruszenia mięsa podczas jego dojrzewania (Kończak, 2008). Badania przeprowadzone na owcach wykazały, że istnieje powiązanie pomiędzy genotypami tego genu identyfikowanymi metodą PCR-SSCP, a cechami takimi jak: masa ciała przy urodzeniu oraz tempo wzrostu do momentu odsadzenia (Byun i in., 2008), a także tempem wzrostu w poszczególnych okresach życia jagniąt (Nassiry i in., 2006). Wykazano także związek między polimorfizmem genu CAST (identyfikowanym metodą PCR-RFLP), a jakością mięsa innych gatunków zwierząt gospodarskich, m.in. bydła (Juszczuk-Kubiak i in., 2004) i świń (Kurył i in., 2003). U świń stwierdzono, że najcieńszą słoniną w niektórych punktach pomiaru oraz najmniejszą zawartością słoniny w połędwicy charakteryzowały się zwierzęta o genotypie DD w locus CAST/MspI i EF w locus CAST/RsaI. Z kolei zwierzęta o genotypach DD w locus CAST/MspI i FF w locus CAST/RsaI były najlepsze pod względem powierzchni „oka” połędwicy. Podobną zależność odnotowano dla masy mięsa w półtuszy (Kurył i in., 2003). Badania przeprowadzone na bydle dowiodły natomiast, że mięso zwierząt o genotypie GC

*Praca naukowa współfinansowana w ramach Projektu „Stypendia dla doktorantów 2008/2009 – ZPORR” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Budżetu Państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego.

identyfikowanym przez enzym restrykcyjny *AluI* okazało się najmniej wartościowe pod względem kulinarnym. Charakteryzowało się ono większym wyciekaniem termicznym niż stwierdzony w mięsie buhajów o genotypie CC i GG. Mięso buhajów GC było ciemniejsze niż mięso zwierząt o genotypie GG. Ogólna zawartość barwników hemowych oznaczona metodą Hornsey'a była najwyższa w mięsie buhajów o genotypie GC i różniła się od stwierdzonej w mięsie zwierząt CC (Juszczuk-Kubiak i in., 2004).

W Polsce dotychczas podjęto badania mające na celu identyfikację genotypów genu *CAST* w następujących rasach owiec: plenna owca olkuska, polska owca górską, suffolk, polska owca długowłnista oraz u mieszańców (F1) merynos polski × owca romanowska (Kaczor, 2006) i w populacji plenno-mięsnych owiec linii syntetycznych BCP i SCP (Greguła-Kania i Gruszecki, 2007). Nie ma natomiast wiadomości na temat frekwencji alleli genu *kalpastatyny* w populacji merynosa polskiego, dominującej rasy owiec w województwie kujawsko-pomorskim, jak też jednej z najliczniej reprezentowanych w Polsce. Rasa ta przeznaczona jest do użytkowania zarówno wełnistego, jak i mięsnego. Jednak w obecnych realiach polskiego owczarstwa bardziej interesujący dla hodowców, z ekonomicznego punktu widzenia, jest mięsny kierunek użytkowania owiec merynosowych. Celem podjętych badań było określenie polimorfizmu genu *kalpastatyny* w grupie 206 owiec rasy merynos polski.

Material i metody

Badaniom poddano 206 owiec (12 tryków i 194 maciorki) rasy merynos polski pochodzących z 6 stad utrzymywanych na terenie województwa kujawsko-pomorskiego w standardowych warunkach środowiskowo-żywniowych. Materiał biologiczny stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły jarzmowej do probówek zawierających antykoagulant K_2EDTA . DNA wyizolowano z krwi przy użyciu zestawu odczynników Master Pure DNA Purification Kit for Blood (Epicentre Biotechnologies) według instrukcji producenta. DNA powielono następnie za pomocą techniki PCR według metodyki Palmera i in. (1998). Zamplifikowany produkt o długości 622 pz poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi: *MspI* i *NcoI* (Fermentas). Trawienie tymi endonukleazami pozwoliło rozróżnić allele M i N. Enzym *MspI* rozpoznając allel M ciął produkt na fragmenty o długości 336 pz i 286 pz, natomiast enzym *NcoI* wykrywając allel N powodował powstanie produktów o długości 374 pz i 248 pz (Palmer i in., 1998).

Rozdział produktów trawienia przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym w buforze $1\times TBE$ przez 60 minut, pod napięciem 120 V w obecności markera wielkości pUC19 DNA/*MspI* (Fermentas). Wyliczono następnie frekwencje alleli i genotypów genu *kalpastatyny* (*MspI* i *NcoI*) dla całej badanej grupy zwierząt oraz w obrębie płci i poszczególnych stad.

Wyniki

Przeprowadzona analiza molekularna wykazała obecność alleli M i N w *locus* *CAST/MspI* w czterech spośród sześciu stad poddanych badaniom własnym, natomiast dwa z nich (stado I i III) okazały się być homozygotyczne pod względem allele

M. Allel N identyfikowany przez restryktazę *NcoI* wykryto tylko w jednym stadzie owiec merynosowych (nr IV), a jego średnia częstość dla całej grupy wyniosła tylko 0,5% (Tab. 1). Ponadto, tylko w dwóch stadach (V i VI) wykryto genotypy NN w *locus* CAST/*MspI*. W żadnym z sześciu stad nie zidentyfikowano natomiast genotypów NN w *locus* CAST/*NcoI*.

Tabela 1. Frekwencje (%) alleli genu kalpastatyny w zależności od stada owiec merynosowych
Table 1. Frequencies (%) of calpastatin gene alleles according to the flock of Merino sheep

Stado Flock	Allel Allele	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
I	M	100,0	100,0
	N		
II	M	90,0	100,0
	N	10,0	
III	M	100,0	100,0
	N		
IV	M	90,6	96,9
	N	9,4	3,1
V	M	74,7	100,0
	N	25,3	
VI	M	84,0	100,0
	N	16,0	
Razem	M	84,5	99,5
Total	N	15,5	0,5

Tabela 2. Frekwencje (%) genotypów genu kalpastatyny w zależności od stada owiec merynosowych
Table 2. Frequencies (%) of calpastatin genotypes according to the flock of Merino sheep

Stado Flock	Genotyp Genotype	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
I (n = 12)	MM	100,0	100,0
	MN		
	NN		
II (n = 20)	MM	80,0	100,0
	MN	20,0	
	NN		
III (n = 18)	MM	100,0	100,0
	MN		
	NN		
IV (n = 32)	MM	81,0	93,7
	MN	19,0	6,3
	NN		
V (n = 77)	MM	53,2	100,0
	MN	42,9	
	NN	3,9	
VI (n = 47)	MM	70,2	100,0
	MN	27,7	
	NN	2,1	
Razem	MM	70,9	99,0
Total (n = 206)	MN	27,2	1,0
	NN	1,9	

Tabela 3. Frekwencje (%) alleli genu kalpastatyny w zależności od płci owiec merynosowych
 Table 3. Frequencies (%) of calpastatin gene alleles according to the sex of Merino sheep

Płeć Sex	Allel Allele	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
Tryki Rams	M	87,5	91,7
Maciorki Ewes	N	12,5	8,3
	M	84,3	100,0
	N	15,7	

Tabela 4. Frekwencje (%) genotypów genu kalpastatyny w zależności od płci owiec merynosowych
 Table 4. Frequencies (%) of calpastatin genotypes according to the sex of Merino sheep

Płeć Sex	Genotyp Genotype	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
Tryki Rams (n = 12)	MM	75,0	83,3
	MN	25,0	16,7
	NN		
Maciorki Ewes (n = 194)	MM	70,6	100,0
	MN	27,3	
	NN	2,1	

Genotyp MM/*MspI* wystąpił ze średnią częstością 70,9%, a MN i NN w tym *locus* z częstością odpowiednio 27,2% i 1,9%. Frekwencja genotypów w *locus* CAST/*MspI* na poziomie zbliżonym do średniej całej populacji owiec objętej badaniami własnymi wystąpiła tylko w stadzie VI. Co ciekawe, wszystkie allele wystąpiły w grupie tryków, a w grupie maciorek nie stwierdzono obecności allele N/*NcoI* (Tab. 3).

Omówienie wyników

Badania przeprowadzone przez Kaczor (2006) na grupie mieszańców merynos polski × owca romanowska wykazały występowanie genotypów MM, MN i NN w *locus* CAST/*MspI* z częstością zbliżoną, jak w badanej populacji zwierząt, która wyniosła 68%, 27% i 5% odpowiednio dla genotypów MM, MN i NN. Podobnie jak w objętej badaniami własnymi populacji owiec merynosowych, frekwencje alleli M i N w *locus* CAST/*MspI* z częstością 85% i 15% oraz genotypów MM, MN i NN z częstością odpowiednio 70,27%, 28,82% i 0,9% wystąpiły w grupie 111 tryków rasy Arabic utrzymywanych w Iranie (Mohhamadi i in., 2008). Ponadto, frekwencje alleli i genotypów identyfikowane restryktazą *MspI* zbliżone do wykrytych w grupie tryków poddanych badaniom własnym wystąpiły w grupie irańskich owiec rasy Kurdi i wyniosły 88% i 12% odpowiednio dla alleli M i N, oraz 76% i 24% dla genotypów MM i MN (Nassiry i in., 2007).

Generalnie większy polimorfizm genu kalpastatyny w *locus* CAST/*MspI* oraz CAST/*NcoI* obserwowano w stadach: V i VI. Powodem mniejszego zróżnicowania genotypów kalpastatyny w stadach: I, II, III i IV w porównaniu ze stadami V i VI mogła być ich mniejsza liczebność. W konsekwencji, w stadach V w danym sezo-

nie użytkowano rozplodowo mniej tryków (od 2 do 3), co prawdopodobnie mogło wpłynąć na zmniejszenie różnorodności genotypów kalpastatyny.

Wyższe od średnich frekwencje alleli genu kalpastatyny dla owiec merynosowych objętych badaniami własnymi zidentyfikowano w *locus* CAST/*MspI* w populacji 95 owiec ras: tsigai, valachian, east fresian, lacaune oraz mieszańców tsigai i lacaune utrzymywanych na terenie Słowacji. Allele M i N wystąpiły z częstością odpowiednio 94% i 6% (Gábor i in., 2009).

W odróżnieniu od badań własnych, w których frekwencja allela N/*MspI* była niska i wahała się od 0 do 25,3% w poszczególnych stadach (średnio 15,5% dla całej grupy), w badaniach przeprowadzonych przez Elyasi i in. (2009) na grupie 137 owiec ras: Ghezel, Arkhamerino i ich mieszańców, częstość tego allela była dość wysoka i wynosiła od 31% w grupie owiec rasy Ghezel do 52% w grupie owiec rasy Arkhamerino, średnio aż 47% dla całej badanej grupy owiec (Elyasi i in., 2009).

W znanej literaturze nie odnotowano dotychczas informacji na temat frekwencji alleli i genotypów w owczym genie kalpastatyny identyfikowanych przy użyciu restryktazy *NcoI*.

Polimorfizm w owczym genie CAST identyfikowano również przy użyciu metody PCR-SSCP (Byun i in., 2008; Nassiry i in., 2006). W badaniach tych stwierdzono obecność trzech alleli: A, B i C. Wykazano również, że ww. allele są powiązane z cechami takimi jak: masa ciała jagniąt przy urodzeniu i tempo wzrostu do momentu odsadzenia (Byun i in., 2008) oraz przyrosty dobowe w poszczególnych okresach życia jagniąt (Nassiry i in., 2006). Dlatego też przypuszcza się, że polimorfizm w owczym genie kalpastatyny identyfikowany metodą PCR-RFLP może istotnie wpływać na cechy mięsne jagniąt. Z tego względu konieczne jest wykonanie badań na większej populacji zwierząt oraz przeprowadzenie oceny przyżyciowej i analizy poubojowej jagniąt celem stwierdzenia powiązań lub ich braku z polimorficznymi wariantami występującymi w genie kalpastatyny owiec.

Piśmiennictwo

- Byun S.O., Zhou H., Forrest R.H., Frampton C.M., Hickford J.G. (2008). Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning. *Anim Genet.*, 39 (5): 572–573.
- Elyasi G., Shoja J., Nassiry M.R., Pirahary O., Javanmard A. (2009). Allelic and genotypic frequency of calpastatin gene in Ghezel and Arkhamerino sheep and their crossbreds. *J. New Agr. Sci.*, 4 (13), p. 3.
- Gábor M., Trakovicá A., Miluchová M. (2009). Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. *Lucrari Stiintifice Zootehnie si Biotehnoilogii*, 42 (2): 470–476.
- Greguła-Kania M., Gruszecki T.M. (2007). Analiza polimorfizmu w genie kalpastatyny u owiec linii syntetycznych BCP I SCP. *Mat. konf. LXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego im. Michała Oczapowskiego*, Warszawa, 11–16.09.2007.
- Juszczuk-Kubiak E., Rosochaci S.J., Wicińska K., Szreder T., Sakowski T. (2004). A novel RFLP/*AluI* polymorphism of the bovine calpastatin (CAST) gene and its association with selected traits of beef. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22 (2): 195–204.
- Kaczor U. (2006). Identyfikacja polimorfizmu (*MspI*) genu kalpastatyny (*locus* CAST) w wybranych populacjach owiec. *Mat. konf. LXXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, Bydgoszcz, 18–20.09.2006, *Kom. Nauk.*, 4, s. 16.

- Kończak T. (2008). Jakość wołowiny. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 1 (56): 5–22.
- Kurył J., Kapelański W., Pierzchała M., Grajewska S., Bocian M. (2003). Preliminary observations on the effect of calpastatin gene (CAST) polymorphism on carcass traits in pigs. Anim. Sci. Pap. Rep., 21 (2): 87–95.
- Mohammadi M., Beigi Nasir M.T., Alami-Saeid K., Fayazi J., Mamoe M., Sadr A.S. (2008). Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR-RFLP. Afr. J. Biotechnol., 7 (15): 2682–2684
- Nassiry M.R., Tahmoorespour M., Javadmanesh A., Soltani M., Far S.F. (2006). Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iran. J. Biotechnol., 4 (3): 188–192.
- Nassiry M.R., Shahrudi F.E., Tahmoorespour M., Javadmanesh A. (2007). Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. Pak. J. Biol. Sci., 10 (7): 1062–1067.
- Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G., Bickerstaffe R. (1998). Rapid communication: PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. J. Anim. Sci., 76: 1499–1500.

Zatwierdzono do druku 19 VI 2011

MAGDALENA SZKUDLAREK-KOWALCZYK, EWA WIŚNIEWSKA,
SŁAWOMIR MROCZKOWSKI

Polymorphisms of the calpastatin gene in Polish Merino sheep

SUMMARY

Some studies have shown that polymorphic variants of calpastatin gene are associated with characteristics such as birth weight of lambs and growth rate until weaning. These characteristics are very important considering the dominant meat-type breeding of sheep. Therefore, the aim of the study was to identify polymorphisms in the calpastatin gene (CAST) in 206 Polish Merino sheep from six flocks maintained in the Kujawsko-Pomorskie province. Polymorphism in the ovine calpastatin gene was identified using the PCR-RFLP method in accordance with the method described by Palmer et al. (1998). Amplified product of 622 bp was digested with restriction enzymes *MspI* and *NcoI*. The frequency of *M/MspI* allele averaged 84.5% and ranged from 74.7% to 100.0% depending on the flock, while the frequency of *M/NcoI* allele averaged 99.5% in the tested group of sheep (from 96.9% to 100,0% in different flocks).

Key words: sheep, polymorphism, calpastatin, PCR-RFLP

PARAMETRY PRODUKCYJNE I GENETYCZNE DWÓCH RODÓW KUR RHODE ISLAND WHITE PODDAWANYCH PRACY HODOWLANEJ

Jolanta Calik

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

Celem badań było określenie kształtowania się parametrów genetycznych i produkcyjnych kur nieśnych Rhode Island White (A-22 i A-88) w ciągu 8 pokoleń, doskonalonych tą samą metodą w ujednoliconych warunkach środowiskowych. W wyniku realizacji programu genetycznego doskonalenia w oparciu o system elektronicznego przetwarzania danych NOVASEL, w rodach A-22 i A-88 odnotowano zwiększenie liczby zniesionych jaj, obniżenie masy ciała, przy zachowaniu średniej masy jaja wynoszącej około 58 g. Stwierdzono na ogół niskie i wyraźne ujemne trendy czasowe odziedziczalności nieśności. Oszacowane wskaźniki h^2 masy ciała, masy jaja i dojrzałości płciowej przyjmowały wysokie i średnie wartości przy dodatnich trendach czasowych.

Doskonalenie genetyczne populacji zwierząt gospodarskich, w tym drobiu, ukierunkowane jest z reguły na maksymalizację efektów ekonomicznych. Dlatego też, w selekcji drobiu nieśnego uwzględnia się przede wszystkim cechy produkcyjne (Albers i Van Sambeek, 2002; Flock, 2002; Wężyk i Jankowski, 2003). W Polsce jak i w większości krajów europejskich selekcja kur w stadach zarodowych opiera się na indeksie selekcyjnym zaproponowanym przez Hazela (1943), systemie SELEKT z pewnymi jego modyfikacjami (Wężyk, 1978) oraz NOVASEL (Bednarczyk i in., 1997). Praca hodowlana prowadzona jest w miarę stabilnych warunkach środowiskowych, w populacji o strukturze hierarchicznej o stosunkowo dużej liczebności podklas – grup pełnego rodzeństwa.

Z analizy krajowych stad zarodowych kur nieśnych wynika, że dysponujemy interesującym pod względem genetycznym i produkcyjnym materiałem hodowlanym (Wencek, 2008). Posiadanie zróżnicowanego materiału genetycznego zabezpiecza hodowców przed zakłóceniami towarzyszącymi importowi materiału hodowlanego, a ponadto stwarza szerokie możliwości realizowania w kraju własnej myśli hodowlanej. Istnieje ciągle konieczność monitorowania wyników pracy hodowlanej i oceny wartości uzyskiwanych parametrów genetycznych rodów kur nieśnych, w tym m. in. Rhode Island White: A-22 i A-88. Do Polski rody te sprowadzono z Francji w połowie lat 80-tych XX wieku. Ptaki umieszczono na fermie w Zakładzie Selekcji Drobiu

w Brodziszewie, a następnie przeniesiono do Zarodowej Fermi Kur Nieśnych w Dusznikach należącej do Centralnego Ośrodka Badawczo-Rozwojowego w Poznaniu z siedzibą w Zakrzewie (COBRD). Ptaki uznane zostały jako rody zarodowe w 1989 r. Rody te wykorzystywano w programie krzyżowania towarowego w celu uzyskania zestawów rodzicielskich do produkcji komercyjnych mieszańców kur nieśnych, charakteryzujących się wysoką produktywnością w intensywnym chowie klatkowym i na ściółce o handlowej nazwie ASTRA.

Celem badań było określenie kształtowania się parametrów genetycznych i produkcyjnych kur nieśnych Rhode Island White dwóch rodów: A-22 i A-88 – w ciągu 8 pokoleń, doskonalonych tą samą metodą w ujednoliconych warunkach środowiskowych.

Material i metody

Material badawczy stanowiły zarodowe rody kur nieśnych Rhode Island White (A-22 i A-88), poddane genetycznemu doskonaleniu w latach 2000/2001–2008/2009 (pokolenie 1–8) w Zarodowej Fermie Kur Nieśnych w Dusznikach. W 18. tygodniu życia ptaki ww. rodów przeniesiono z wychowalni do kurnika zachowując liczebność podaną w tabeli 1. Kury utrzymywano w intensywnym systemie, w budynkach wyposażonych w nowoczesne urządzenia technologiczne. Zarówno w okresie odchowu jak i produkcji ptaki żywiono *ad libitum* standardowymi mieszankami pełnoporcjowymi. W czasie trwania doświadczenia nie wystąpiły epidemie ani inwazje chorób.

Tabela 1. Liczebność kogutów-ojców, kur-matek i kur-córek oraz kształtowanie się efektywnej liczebności populacji (N_e) oraz współczynnika inbrodu (F_x %) w obrębie rodów i pokoleń
Table 1. Number of sires, mother and daughter hens, effective population size (N_e) and coefficient of inbreeding (F_x %) within lines and generations

Pokolenie Generations	Ród/Line A-22					Ród/Line A-88				
	liczba/number			N_e	F_x	liczba/number			N_e	F_x
	ojców sires	matek mothers	córek daughters			ojców sires	matek mothers	córek daughters		
1	54	469	2126	193,69	0,26	45	406	2061	162,04	0,31
2	54	303	1389	183,33	0,27	45	317	1363	157,62	0,32
3	54	444	1577	192,58	0,26	50	381	1236	176,79	0,28
4	58	417	989	203,67	0,24	45	243	499	151,88	0,33
5	45	267	612	154,04	0,32	40	189	498	132,05	0,38
6	40	265	725	139,02	0,36	36	266	724	126,83	0,39
7	36	288	809	128,00	0,39	36	281	672	127,65	0,39
8	36	290	794	128,10	0,39	36	264	638	126,72	0,39
x	47	343	1128	150,8	0,31	42	293	961	145,13	0,35

Stosując wzory Wrighta (1931) obliczono tzw. efektywną liczebność populacji (N_e), czyli tempo eliminacji genów w wyniku działania losowego dryftu genetycznego.

go oraz wzrost homozygotyczności stada (F_x), który jest odwrotnie proporcjonalny do efektywnej wielkości populacji według wzorów:

$$N_e = \frac{4N_m \times N_f}{N_m \times N_f}$$

gdzie:

N_m – liczba ojców

N_f – liczba matek

$$F_x = \frac{I}{2N_e}$$

W każdym rodzie indywidualną kontrolą użytkowości objęto:

- masę ciała w 33. tygodniu życia kur (g),
- masę jaja w 30. tygodniu życia kur (g),
- wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej (dni),
- liczbę zniesionych jaj do 39. tygodnia życia kur (szt.).

Parametry produkcyjne i genetyczne scharakteryzowano ogólnie przyjętymi metodami statystyki matematycznej i genetyki populacji. Stosując w obliczeniach analizę wariancji dla każdej cechy objętej selekcją oszacowano współczynniki odziedziczalności (h^2). Ocenę parametrów genetycznych przeprowadzono systemem NOVASEL. Program ten obejmuje zbiór informacji o indywidualnej użytkowości ptaków, szacowanie parametrów genetycznych i ocenę wartości hodowlanej kur oraz ich selekcję na podstawie rodzinnego indeksu selekcyjnego. Źródłem informacji o genetycznej wartości kury jest użytkowość własna pełnego- i półrodzeństwa. Na podstawie wartości oszacowanych indeksów selekcyjnych dokonuje się wyboru osobników na rodziców następnego pokolenia, wybierając ze stada selekcyjnego osobniki o najwyższym indeksie – łącznej wartości hodowlanej. W zależności od zakładanej wartości oczekiwanego postępu hodowlanego można zmieniać nacisk selekcyjny na poszczególne cechy różnicując tzw. „wagi ekonomiczne”.

W celu określenia kształtowania się reakcji poszczególnych rodów na selekcję, przy pomocy równań regresji liniowej wyznaczone zostały trendy czasowe. Dla każdej prostej regresji liniowej na poziomie istotności 0,05 wyznaczono granice ufności oraz średni błąd oszacowania (SE), który informuje w jakim stopniu poszczególne obserwacje odbiegają od prostej trendu (Statgraphics Plus 5.1).

Wyniki

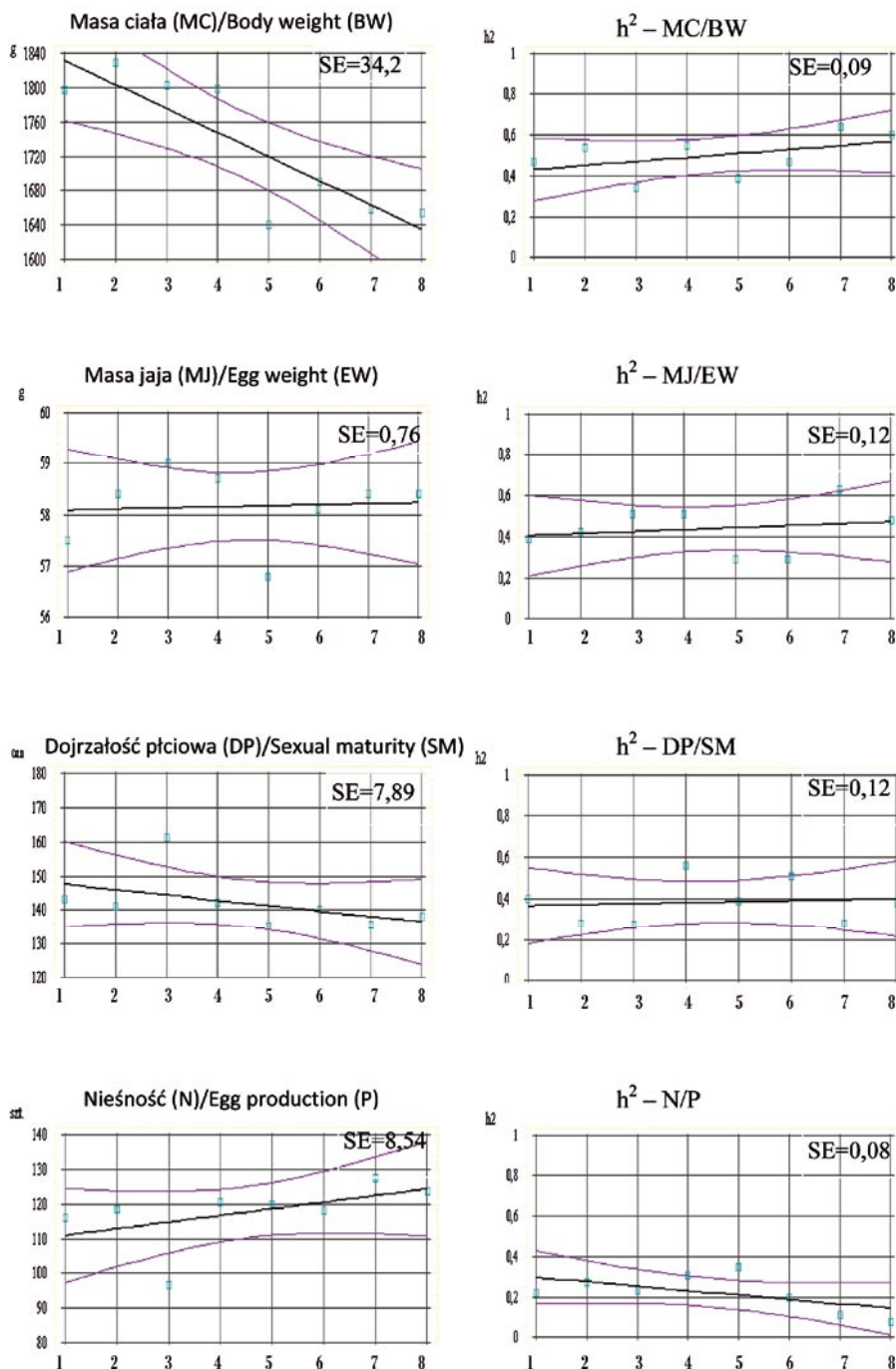
Jak wynika z tabeli 1 średnia liczebność w rodach A-88 i A-22 wynosiła odpowiednio 42 i 47 kogutów-ojców, 293 i 343 kury-matki oraz 961 i 1128 kur-córek.

Efektywna wielkość ocenianych populacji zależna od liczby samców i samic wahała się od $N_e = 145,13$ (A-88) do $N_e = 150,80$ (A-22), co miało bezpośredni wpływ na niski poziom zimbredowania stad ($F_x = 0,31-0,35$).

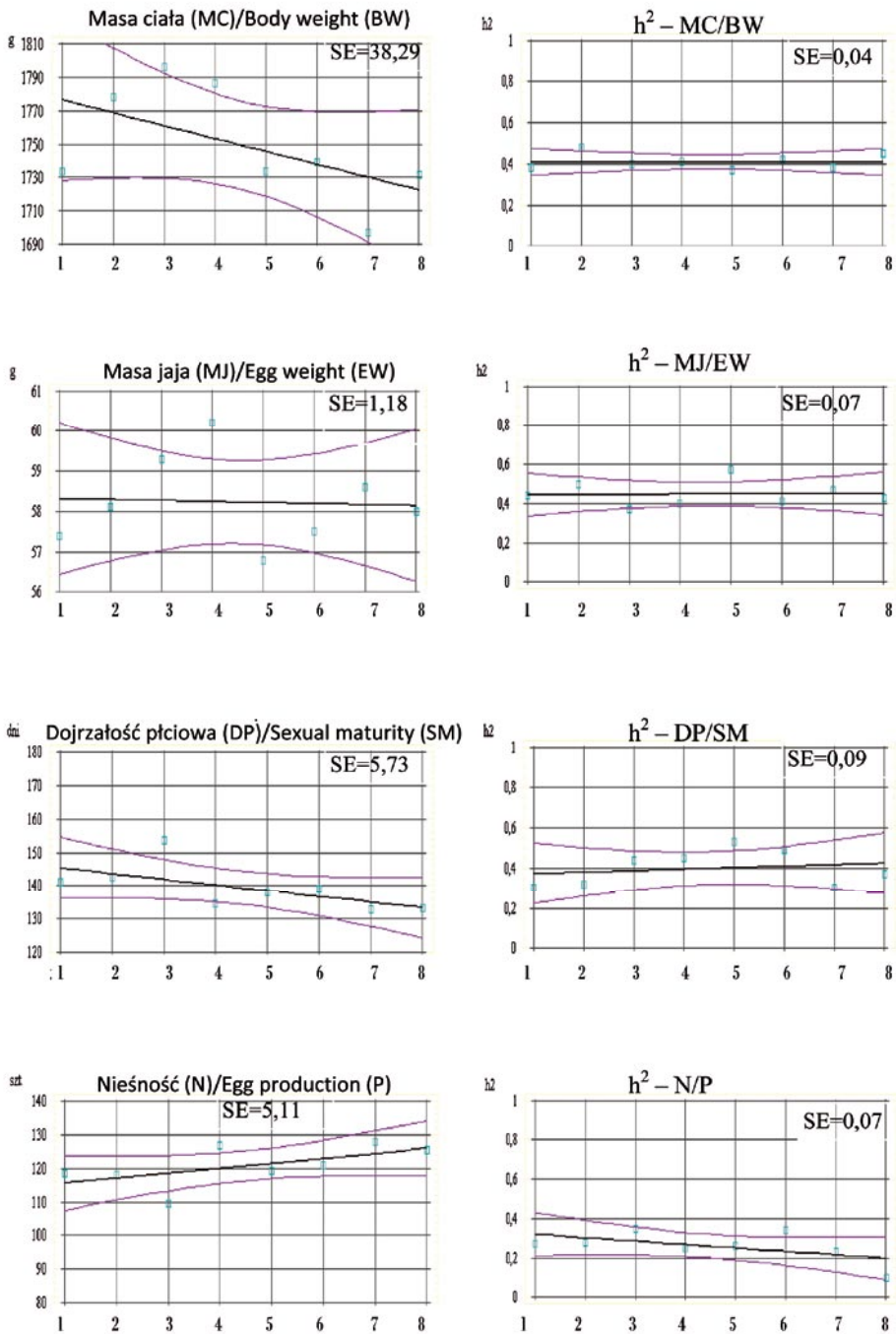
Tabela 2. Kształtowanie się nacisków selekcyjnych (w), produktywności oraz współczynników odziedziczalności (h^2) w obrębie rodów i lat

Table 2. Trends in selection pressure (w), productivity and coefficients of heritability (h^2) within lines and years

Cechy Traits	Poko- lenie Genera- tions	Ród/Line A-22					Ród/Line A-88				
		w	x	SD	V%	$h^2SD \pm SE$	w	x	SD	V%	$h^2SD \pm SE$
Masa ciała – MC Body weight – BW (g)	1	–0,20	1797	180	10,02	0,47±0,08	–0,20	1734	185	10,67	0,38±0,07
	2	0,00	1828	166	9,08	0,54±0,10	–0,10	1778	189	10,62	0,48±0,10
	3	–0,10	1802	213	11,82	0,34±0,08	0,00	1796	210	11,69	0,40±0,10
	4	–0,10	1798	183	10,18	0,55±0,13	–0,10	1786	199	11,14	0,41±0,22
	5	–0,10	1640	196	11,95	0,39±0,14	0,00	1734	200	13,04	0,37±0,15
	6	0,00	1690	201	11,89	0,47±0,15	0,00	1739	163	9,37	0,42±0,15
	7	–0,10	1658	154	9,3	0,64±0,16	–0,10	1697	168	9,90	0,38±0,13
	8	–0,10	1654	139	7,5	0,60±0,15	–0,10	1732	160	9,2	0,45±0,15
Masa jaja – MJ Egg weight – EW (g)	1	0,30	57,5	4,1	7,13	0,39±0,08	0,25	57,4	4,3	7,49	0,44±0,08
	2	0,30	58,4	4,1	7,02	0,42±0,10	0,20	58,1	4,5	7,75	0,50±0,10
	3	0,20	59,0	4,2	7,12	0,51±0,10	0,20	59,3	4,3	7,25	0,37±0,09
	4	0,20	58,7	4,4	7,50	0,51±0,10	0,10	60,2	4,3	7,14	0,40±0,16
	5	0,20	56,8	4,1	7,22	0,29±0,12	0,20	56,8	4,2	7,53	0,57±0,19
	6	0,30	58,1	3,8	6,54	0,29±0,08	0,25	57,5	4,1	7,13	0,41±0,14
	7	0,20	58,4	3,3	6,2	0,63±0,16	0,15	58,6	4,0	6,83	0,47±0,15
	8	0,10	58,4	4,1	7,0	0,48±0,14	0,25	58,0	4,2	7,20	0,43±0,14
Dojrzałość płciowa – DP Sexual maturity – SM (dni/days)	1	0,00	143,1	9,9	6,92	0,40±0,07	0,00	141,2	8,6	6,09	0,30±0,07
	2	0,00	141,1	9,3	6,59	0,28±0,08	0,00	142,6	10,7	7,50	0,32±0,08
	3	0,00	161,3	12,6	7,81	0,27±0,07	0,00	153,7	15,4	10,02	0,44±0,10
	4	0,00	142,2	12,9	9,07	0,56±0,13	0,00	134,7	12,2	9,06	0,45±0,17
	5	0,00	135,3	8,9	6,58	0,39±0,14	0,00	138,0	10,00	7,25	0,53±0,21
	6	0,00	140,0	7,8	5,57	0,51±0,15	0,00	139,0	9,2	6,62	0,49±0,15
	7	0,00	135,6	7,7	5,7	0,28±0,10	0,00	132,9	7,3	5,50	0,30±0,03
	8	0,00	138,2	8,5	6,27	0,38±0,11	0,00	133,4	8,9	6,67	0,37±0,11
Nieśność do 39. tyg. – N Egg production to 39 weeks – P (szt./eggs)	1	0,50	116,1	14,7	12,66	0,22±0,05	0,55	118,3	14,0	11,83	0,27±0,03
	2	0,70	118,6	12,4	10,46	0,27±0,08	0,70	118,1	12,8	10,84	0,28±0,08
	3	0,70	96,6	14,4	14,91	0,23±0,06	0,80	109,6	16,0	14,60	0,35±0,09
	4	0,70	120,6	15,5	12,85	0,31±0,11	0,80	126,8	15,4	12,15	0,25±0,12
	5	0,70	120,0	15,7	13,08	0,35±0,09	0,80	119,0	15,9	13,36	0,26±0,13
	6	0,70	118,0	10,5	8,90	0,20±0,09	0,75	121,0	12,90	10,66	0,34±0,13
	7	0,70	127,4	12,4	9,70	0,11±0,06	0,75	127,9	12,7	9,90	0,23±0,09
	8	0,80	123,7	10,1	8,20	0,08±0,05	0,65	125,2	10,5	8,40	0,10±0,10



Rys. 1. Trendy czasowe cech produkcyjnych i współczynnika odziedziczalności (h^2) w rodzie A-22
 Fig. 1. Trends in productive traits and coefficients of heritability (h^2) in line A-22



Rys. 2. Trendy czasowe cech produkcyjnych i współczynnika odziedziczalności (h^2) w rodzie A-88
 Fig. 2. Trends in productive traits and coefficients of heritability (h^2) in line A-88

Informacje dotyczące wag ekonomicznych (w) i charakterystyki statystycznej parametrów produkcyjnych oraz współczynników odziedziczalności (h^2) przedstawiono w tabeli 2 oraz na Rysunkach 1–2. Z analizy danych wynika, że we wszystkich ocenianych rodach największy nacisk selekcyjny (w) położono na zwiększenie nieśności ($w = 0,50-0,80$) i średniej masy jaja ($w = 0,10-0,30$) oraz obniżenia masy ciała ($w = -0,10- -0,20$). W rodzie A-22 średnia masa ciała wahała się od 1654 do 1828 g, natomiast w rodzie A-88 od 1697 do 1796 g. Tendencji przyrostu i obniżania masy ciała w rodach towarzyszyło niewielkie zwiększanie i zmniejszanie ich średniej masy jaja. Najpóźniej, bo w 161. (ród A-22) i w 154. dniu (ród A-88) nieśność rozpoczęły kury w trzecim pokoleniu, a najwcześniej w 7–8 pokoleniu (A-22 = 135,6–138,2 dniu; A-88 = 132,9–133,4 dniu). Fluktuacje te miały wyraźny wpływ na średnią liczbę zniesionych jaj, która w obu rodach była najwyższa pod koniec okresu oceny, tj. w 7–8 pokoleniu i wynosiła średnio 126 jaj.

Z wyznaczonych prostych regresji (Rys. 1–2) wynika, że masa ciała wykazuje ujemny trend czasowy przy błędzie oceny, który wahał się od $SE = 34,22$ (A-22) do $SE = 38,29$ (A-88). Odnotowano ustabilizowany trend masy jaja, która wynosiła około 58 g. Uwagę zwraca szeroki rozrzut poszczególnych obserwacji (średnich), przy SE od 0,76 w rodzie A-22 do 1,18 w rodzie A-88. W ocenianych rodach odnotowano ujemny trend czasowy dojrzałości płciowej ($SE = 5,73-7,89$), co miało bezpośredni wpływ na nieśność, która w kolejnych latach/pokoleniach wykazywała dodatni trend czasowy ($SE = 5,11-8,54$).

Klasyfikację poziomu współczynników odziedziczalności i korelacji przyjęto za Wężykiem (1978) jako „niski”, gdy $h^2 < 0,30$; „średni”, przy $h^2 = 0,31-0,59$ oraz „wysoki”, gdy $h^2 > 0,6$. Współczynniki odziedziczalności masy ciała kur kształtowały się na niskim i średnim poziomie, bez wyraźnych tendencji czasowych w rodzie A-88 i dodatnim trendzie w rodzie A-22. Podobne tendencje odnotowano w przypadku odziedziczalności masy jaja ($h^2_{A-22} = 0,31-0,63$ i $h^2_{A-88} = 0,37-0,57$). Oszacowane błędy oceny zarówno dla masy ciała jak i dla masy jaja były niskie i zawierały się w przedziale od 0,04 do 0,09 i od 0,07 do 0,12. Odziedziczalność dojrzałości płciowej w rodach przyjmowała na ogół wartości średnie przy braku wyraźnych tendencji czasowych. W odniesieniu do nieśności wskaźniki odziedziczalności były na ogół niskie ($h^2 = 0,08-0,35$) z wyraźną tendencją spadkową. Jednocześnie w odniesieniu do tej cechy odnotowano najwęższe przedziały ufności przy $P < 0,05$ i bardzo niskie błędy oceny ($SE = 0,07-0,08$).

Omówienie wyników

Podstawowym celem programów genetycznego doskonalenia kur nieśnych jest uzyskanie ptaków wcześniej dojrzewających, o szybkim tempie nieśności, pożądanej i wyrównanej masie jaja oraz stosunkowo małej masie ciała (Szwaczkowski, 1995). Z analizy danych wynika, że w rodach A-22 i A-88 odnotowano korzystne zmiany zarówno w poziomie parametrów genetycznych, jak i cech produkcyjnych. Obliczone współczynniki F_x były niskie, stąd też stopień homozygotyczności nie miał istotnego wpływu na kształtowanie się produktywności oraz wielkości oszacowanych

parametrów genetycznych. W badaniach zaobserwowano pożądane obniżenie masy ciała kur, a tak wyraźną reakcję stad na selekcję należy przypisać stosunkowo wysokiej odziedziczalności tej cechy. Jednocześnie w obydwu ocenianych rodach nie odnotowano ujemnych trendów masy jaja, co ma istotne znaczenie, gdyż znana jest z literatury dodatnia korelacja pomiędzy masą ciała kury a masą jaja (Calik, 2002; Krawczyk, 2006). Ponadto, badania własne jak i publikacje Anang i in. (2000) i Szwaczkowskiego i in. (2000) wskazują, że nieśność jest silnie genetycznie, środowiskowo i fenotypowo związana z wczesnością dojrzwania. Prowadząc zatem selekcję w kierunku zwiększenia nieśności przyspieszamy również dojrzałość płciową kur. Generalnie uważa się, że im kura wcześniej kończy rozwój somatyczny, tzn. wcześniej osiąga standardową dla danego typu masę ciała, tym również wcześniej wchodzi w nieśność. Na zależność między zwiększeniem masy ciała kur nieśnych, a obniżaniem się ich nieśności i innymi komponentami zdolności reprodukcyjnej wskazują Sewalem i in. (1998) i Singh i in. (2000). Ponadto autorzy wskazują, że u zbyt intensywnie przyrastających kurek typu nieśnego może dojść do nadmiernego otłuszczenia, co może ujemnie wpływać na funkcję jajnika. Jednocześnie zbyt wczesne osiągnięcie dojrzałości płciowej w dużym stopniu przyczynia się do zwiększenia liczby jaj bardzo małych oraz liczby jaj niezaplodnionych. Badania Masso i in. (1998) wskazują natomiast na nieopłacalność produkcji zbyt dużych jaj, uzyskiwanych zwłaszcza pod koniec okresu nieśności. Ponadto, z jaj zbyt dużych pisklęta lęgą się dłużej, stąd też zakłady wylęgowe jak i właściciele stad hodowlanych są zainteresowani metodami umożliwiającymi zwiększenie masy jaj w początkowym okresie nieśności oraz zmniejszenie jej u starszych niosek.

W ciągu 8 pokoleń wskaźniki odziedziczalności masy ciała, masy jaja i dojrzałości płciowej nie wykazywały istotnych zmian wskazujących na ograniczenie zmienności genetycznej. Kuhn i Arthur (1999) prowadząc badania w rodzie kur rasy Leghorn wykazali, że pomimo kontynuowanej przez 40 lat selekcji nie stwierdzili ograniczenia zmienności genetycznej w odniesieniu do takich cech jak: masa ciała niosek, masa jaja, dojrzałość płciowa osiągnięcia „plateau” czyli wyczerpania zmienności genetycznej. W przypadku nieśności obniżenie wartości wskaźników h^2 potwierdza ogólnie znany fakt, że selekcja prowadzi do zmniejszenia zmienności genetycznej. Równie niskie wartości wskaźników odziedziczalności nieśności odnotowano w pracy Szwaczkowskiego (1995), Anang (2000) i Calik (2009).

Podsumowując należy stwierdzić, że w wyniku realizacji programu genetycznego doskonalenia rodów A-22 i A-88 w oparciu o system elektronicznego przetwarzania danych NOVASEL stwierdzono zadowalające wyniki hodowlane i produkcyjne, co świadczy o poprawnej strategii doskonalenia populacji. W ciągu 8 pokoleń odnotowano zwiększenie liczby zniesionych jaj, obniżenie masy ciała przy zachowaniu średniej masy jaja wynoszącej około 58 g. Stwierdzono na ogół niskie i wyraźne ujemne trendy czasowe odziedziczalności nieśności. Oszacowane wskaźniki h^2 masy ciała, masy jaja i dojrzałości płciowej przyjmowały wysokie i średnie wartości, przy dodatnich trendach czasowych. Ponadto potwierdzono, że zastosowany w reprodukcji stad system kojarzeń skutecznie chroni populację przed wzrostem zimbredowania.

Piśmiennictwo

- Albers G.A.A., Van Sambeek F.M.J.P. (2002). Breeding strategies for layers in view of new technologies. Proc. 11th Europ. Poultry Symp., Brema, 6–10.09.2002, Arch. Geflügelk., 1, 5: 1–31.
- Anang A., Mielenz N., Schüler L. (2000). Genetic and phenotypic parameters for monthly egg production in White Leghorn hens. J. Anim. Breed. Genet., 117: 407–415.
- Bednarczyk M., Lisowski M., Kiełczewski K., Skórnicki G. (1997). Konstrukcja optymalna indeksów selekcyjnych w oparciu o zastosowanie elektronicznej kontroli nieśności kur. Maszynopis. COBRD Poznań, 5/96.
- Calik J. (2002). Kształtowanie się zależności między masą ciała kury a masą jaja. Roczn. Nauk. Zoot., Supl., 16: 95–102.
- Calik J. (2009). Kształtowanie się parametrów produkcyjnych i genetycznych w trzech rodach kur nieśnych w ciągu 8 pokoleń. Roczn. Nauk. Zoot., 36, 1: 31–43.
- Flock D.K. (2002). Poultry breeders challenged by a changing market. Poultry Int., 41, 2: 45–49.
- Hazel N.L. (1943). The genetic basis for constructing selection indexes. Genetics, 28: 476–490.
- Krawczyk J. (2006). Zależność między masą ciała kury a masą jaja w kontekście opłacalności produkcji jaj. Roczn. Nauk. Zoot., 33, 2: 255–262.
- Kuhn M.T., Arthur J.A. (1999) Selection for egg quality traits in layers. Proc. XIV Europ. Symp. on the Quality of Poultry Meat, Bologna, 19–23.09.1999, pp. 3–8.
- Masso R.J., Dottavio A.M., Canet Z.E., Font M.T. (1998). Body weight and egg weight dynamics in layers. Poultry Sci., 77: 791–796.
- Sewalem A., Lillpers K., Johansson K., Wilhelmson M. (1998). Genetic trends of production and reproduction traits in White Leghorn lines selected for production traits. Proc. 6th World Congress, Armidale, 11–16.01.1998, 24, pp. 286–289.
- Singh B., Singh H., Singh C.V. (2000). Genetic parameters of growth egg production and egg quality traits in White Leghorn. J. Poultry Sci., 35: 13–16.
- Szwaczkowski T. (1995). Analiza genetycznego uwarunkowania wybranych cech użytkowych kur nieśnych. Rozpr. Nauk., AR Poznań, 260 ss.
- Szwaczkowski T., Wężyk S., Piotrowski P., Cywa-Benko K. (2000). Direct and maternal genetic and environmental effects of fertility and hatchability in laying hens. Archiv. Geflügelk., 34: 115–120.
- Wenciek E. (2008). Wyniki oceny wartości użytkowej drobiu w 2006 r. Warszawa, ss. 65–86.
- Wężyk S. (1978). System SELEKT dla stad zarodowych drobiu. Wyniki Prac Badawczych Zakładu Hodowli Drobiu, Wyd. IZ PIB, Kraków, 7: 7–22.
- Wężyk S., Jankowski J. (2003). Application of mixed model methodology in breeding strategies for meat-type birds. In: Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology (Eds W.M. Muir, S.E. Aggrey), CAB International, 11: 147–164.
- Wright S. (1931). Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16: 97–159.

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

JOLANTA CALIK

Production and genetic parameters of two lines of Rhode Island White hens subjected to selective breeding

SUMMARY

The aim of the study was to determine genetic and production parameters of Rhode Island White laying hens (A22 and A88) over 8 generations, which were improved using the same method under uniform environmental conditions. Implementation of the genetic improvement programme based on electronic

data processing system NOVASEL in lines A-22 and A-88, resulted in an increased number of eggs laid and lower body weight, while the average egg weight of about 58 g remained unchanged. The time trends for heritability of egg production were generally low and clearly negative. The estimated h^2 values of body weight, egg weight and sexual maturity were high and intermediate, with positive time trends.

WPLYW SYSTEMÓW DOJRZEWANIA *IN VITRO* OOCYTÓW ŚWINI NA ROZWÓJ ZARODKÓW UZYSKIWANYCH TECHNIKĄ KLONOWANIA SOMATYCZNEGO*

Marcin Samiec, Maria Skrzyszowska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa
e-mail: msamiec@izoo.krakow.pl

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie optymalnych metod mejotycznego dojrzewania in vitro (IVM) oocytów oraz strategii indukowalnej modyfikacji epigenomowej zarówno oocytów-biorców jąder, jak i komórek-dawców jąder w procedurze klonowania świń. Enukleowane, dojrzałe mejotycznie oocyty loszek lub loch były rekonstruowane z jąder komórkowych transformowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów (grupa I) lub dorosłych osobników (grupa II). Transformacja epigenetyczna hodowanych komórek fibroblastycznych przeprowadzana była za pośrednictwem trichostatyny A (TSA), która należy do rodziny niespecyficznych lub nieselektywnych blokerów aktywności deacetylaz histonów. W zależności od zastosowanego systemu IVM oocytów oceniano potencjał rozwojowy zarodków klonalnych w oparciu o odsetek moruli i blastocyst uzyskanych w warunkach hodowli in vitro. W grupach IA oraz IIA do pozaustrojowego dojrzewania oocytów użyto TSA. Z kolei w grupach IB oraz IIB procedura dojrzewania in vitro oocytów obejmowała ich preinkubację w pożywce uzupełnionej roskowityną (RSCV), która jest specyficznym/selektywnym inhibitorem kinaz cyklino-zależnych i odwracalnym blokerem cyklu mejotycznego w stadium diktiotenu profazy I. Natomiast w grupach IC oraz IIC nie wykorzystano RSCV bądź TSA w strategii IVM oocytów. W grupach IA oraz IIA do stadium moruli i blastocysty rozwinęło się odpowiednio 45/68 (66,2%) i 27/68 (39,7%) oraz 36/69 (52,2%) i 20/69 (29,0%) zrekonstruowanych zarodków. W grupach IB oraz IIB stadium moruli i blastocysty osiągnęło odpowiednio 26/60 (43,3%) i 17/60 (28,3%) oraz 20/62 (32,3%) i 9/62 (14,5%) zarodków. Z kolei w grupach IC oraz IIC udział moruli i blastocyst w populacji hodowanych in vitro zarodków klonalnych utrzymywał się na poziomie odpowiednio 24/56 (42,9%) i 15/56 (26,8%) oraz 19/58 (32,8%) i 10/58 (17,2%). Podsumowując, pozaustrojowe dojrzewanie oocytów świni z użyciem TSA skutkowało znacznie wyższymi kompetencjami rozwojowymi i jakością zarodków klonalnych niż IVM oocytów poddawanych preinkubacji w obecności RSCV oraz IVM oocytów bez wykorzystania RSCV lub TSA.

W procedurze klonowania somatycznego świń jedno ze źródeł biorców egzogennych jąder komórkowych stanowią dojrzałe *in vivo* (owulowane) oocyty. Są one pozyskiwane z jajowodów stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń (Boquest i in., 2002; Lee i in., 2003). Kolejnym źródłem komórek-biorców allogenicznego

*Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2009–2011 jako działalność statutowa w ramach tematu nr 3342.1.

genomu jądrowego są oocyty pozyskiwane poubojowo z jajników loch lub loszek, a wtedy osiągają one dojrzałość jądro-cytoplazmatyczną, a także epigenomową w warunkach hodowli *in vitro* (Hyun i in., 2003; Hölker i in., 2005). Znamioną cechą dojrzałych *in vivo* lub *in vitro* oocytów jest przejściowe zatrzymanie się cyklu komórkowego w stadium metafazy II (MII) podziału mejotycznego.

Morfologiczna i biochemiczna kondycja zarodków klonalnych świni, a w konsekwencji ich zdolności rozwojowe w znacznym stopniu uwarunkowane są wysoką jakością oocytów wykorzystanych w procedurze klonowania, charakteryzującą się pełną synchronią dojrzałości mejotycznej (jądrowej), epigenomowej i cytoplazmatycznej. Warunkiem niezbędnym do synchronizacji procesów dojrzewania jądrowego, epigenomowego oraz cytoplazmatycznego w oocytach-biorcach jąder komórek somatycznych, których cykl mejotyczny ulega progresji *ex vivo* od momentu ich poubojowego wyizolowania z pęcherzyków jajnikowych loszek lub loch, jest zastosowanie kilkustopniowych metod hodowli *in vitro* oocytów. Metody te obejmują długotrwałą (najczęściej 22-godzinną) preinkubację oocytów w pożywce hodowlanej z dodatkiem specyficznych związków blokujących odwracalnie aktywność kinaz cyklino-zależnych, których przedstawicielem jest roskowityna (RSCV; Coy i in., 2005; Schoevers i in., 2005). Roskowityna jako inhibitor nadrzędnej kinazy białkowej p34^{cdc2}, regulującej przebieg cyklu mejotycznego, powoduje przejściowe zatrzymanie mejozy w stadium diktiotenu profazy I podziału redukcyjnego, w celu wydłużenia czasu niezbędnego do uruchomienia molekularnych mechanizmów dojrzewania cytoplazmatycznego i w konsekwencji do nabycia kompetencji mejotycznej przez oocyty, czyli zdolności do wznowienia i ukończenia cyklu mejotycznego. Po okresie preinkubacji oocytów w obecności roskowityny rozpoczyna się proces właściwego dojrzewania jądro-cytoplazmatycznego w warunkach dwustopniowej hodowli *in vitro* ze zmiennym udziałem różnych związków regulatorowych cyklu mejotycznego, w tym m.in. liofilizowanych hormonów gonadotropowych, egzogennych analogów cyklicznych nukleotydów czy polipeptydowych czynników wzrostowych (Le Beux i in., 2003; Coy i in., 2005; Kawakami i in., 2005).

Drugi kierunek optymalizacji warunków pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów-biorców jąder komórkowych dotyczy wykorzystania w hodowli *in vitro* niedojrzałych oocytów związków z grupy syntetycznych modulatorów procesów epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych DNA genomowego oraz białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Procesy te obejmują odpowiednio metylację/demetylację reszt cytozyny DNA oraz deacetylację/acetylację reszt lizyny i/lub argininy histonów H3 i H4 (Kishigami i in., 2006; Bui i in., 2007). Do związków wywołujących wyżej wspomniane transformacje epigenomowe należą: 1. trichostatyna A, będąca niespecyficznym inhibitorem deacetylaz histonowych (HDACs; ang. histone deacetylases) oraz 2. 5-aza-2'-deoksycytydyna, będąca nieselektywnym inhibitorem metylotransferaz DNA (DNMTs; DNA methyltransferases). Wykazano, że wykorzystanie tych modulatorów epigenetycznego przemodelowania/przoprogramowania chromatyny jądrowej hodowanych *in vitro* oocytów może mieć korzystny wpływ na osiągnięcie przez nie stanu koordynacji między mejotyczną dojrzałością epigenomową a dojrzałością jądro-cytoplazmatyczną (Rybouchkin i in., 2006; Yang i in., 2007 a).

Osiągnięcie stanu dojrzałości epigenomowej jest związane z uzyskaniem przez oocyt właściwego stopnia zaawansowania epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych DNA genomowego (tj. metylacji/demetylacji reszt cytozyny) oraz białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (tj. deacetylacji/acylacji reszt lizyny i argininy). Epigenetyczne przemodelowanie konfiguracji przestrzennej oraz przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej chromatyny jądrowej dojrzałych mejotycznie oocytów jest również ściśle skoordynowane z zakończeniem procesów regulujących zjawisko rodzicielskiego piętna genomowego (matczynego imprintingu gametycznego). Jedynie po wprowadzeniu do dojrzałego epigenetycznie, enukleowanego oocytu-biorcy (ooplastu) w stadium MII cyklu mejotycznego, silnie skondensowana chromatyna somatycznej komórki-dawcy jądra w stadium G0/G1 cyklu mitotycznego, z wyraźnymi symptomami represji nukleosomowej wielu regionów DNA genomowego, prawidłowo reaguje na sygnały biochemiczne płynące z jego środowiska cytoplazmatycznego. Sygnały te obejmują inhibicję aktywności enzymatycznej izoform 1o i 3a/b metylotransferaz DNA (DNMTs 1o i 3a/b) oraz deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego H3 i H4 (HDACs), a także wzrost aktywności biokatalitycznej acetylaz białek histonowych H3 i H4 (HATs; ang. histone acetyltransferases/acetylases). Umożliwiają one pełne przeprogramowanie pamięci epigenetycznej egzogenego jądra komórkowego (Beaujean i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005; Rybouchkin i in., 2006; Bui i in., 2007).

Stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA genomowego, a także histonów chromatyny jądrowej za pośrednictwem endogennych metylotransferaz DNA oraz deacetylaz histonów można modulować egzogennymi inhibitorami tych enzymów podczas dojrzewania *in vitro* (IVM; ang. *in vitro* maturation) oocytów. Ponadto, zastosowanie sztucznych modulatorów epigenomowo-uwarunkowanej ekspresji genów, takich jak trichostatyna A (TSA) prowadzi – poprzez niespecyficzne/nieselektywne blokowanie aktywności deacetylaz histonów – do zahamowania represji transkrypcyjnej DNA genomowego hodowanych *ex vivo* oocytów, stanowiących źródło komórek-biorców jąder w technologii klonowania somatycznego ssaków.

W niniejszej pracy optymalizowano warunki pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego diktiotenowych oocytów loch lub loszek, w celu zwiększenia stopnia synchronizacji między dojrzałością jądrową, cytoplazmatyczną oraz epigenomową oocytów w stadium MII, stanowiących źródło biorców dla egzogennych jąder komórkowych w procedurze klonowania somatycznego. Ponadto, celem tej pracy było opracowanie optymalnych metod egzogennej modulacji epigenetycznej zarówno hodowanych *in vitro* oocytów-biorców jąder, jak i komórek-dawców jąder w klonowaniu świń.

Material i metody

Pozyskiwanie i dojrzewanie mejotyczne *in vitro* oocytów-biorców egzogennych jąder komórkowych

Źródłem oocytów były jajniki loszek i loch uzyskiwane w lokalnej rzeźni. Niedojrzałe oocyty świni [w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV; ang. germinal vesicle),

czyli diktiotenu profazy I podziału mejotycznego] pozyskiwane były metodą aspiracji z antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2–6 mm. W doświadczeniach testowane były trzy systemy dojrzewania *in vitro* (IVM) diktiotenowych oocytów. W każdym systemie oocyty hodowane były w grupach liczących 50–60 sztuk, w 500 μL zbuforowanej 25,07 mM L^{-1} NaHCO_3 pożywki NCSU-23 (ang. North Carolina State University-23) lub w 500 μL zbuforowanej 25 mM L^{-1} kwasu N-2-hydroksyetylopiperazyjno-N'-2-etanosulfonowego (HEPES) i 26,18 mM L^{-1} NaHCO_3 pożywki TCM 199 (ang. Tissue Culture Medium 199, Gibco BRL, Life Technologies Inc., USA). Pożywka do IVM nawarstwiona była lekkim olejem mineralnym (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA). Hodowla oocytów przeprowadzana była w inkubatorze o ściśle określonych warunkach termiczno-atmosferycznych (39°C, 5% CO_2 w powietrzu, maksymalna wilgotność względna).

System I (IVM-I), określane jako jednostopniowy, obejmował 42–44-godziną inkubację oocytów w pożywce uzupełnionej 4 mg mL^{-1} frakcji V albuminy surowicy bydłowej (BSA-V; ang. bovine serum albumin – fraction V, Sigma-Aldrich), 0,1 IU mL^{-1} ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG; ang. human menopausal gonadotropin, Sigma-Aldrich) lub mieszaniną 10 IU mL^{-1} gonadotropiny kosmówkowej źrebnych kłaczy (eCG/PMSG; ang. equine chorionic gonadotropin/pregnant mare serum gonadotropin, Sigma-Aldrich) i 10 IU mL^{-1} ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG; ang. human chorionic gonadotropin, Sigma-Aldrich). Ponadto, pożywka hodowlana wzbogacona była dodatkiem 10% płynu wyizolowanego z antralnych pęcherzyków jajnikowych świni (pFF; ang. porcine follicular fluid), 0,6 mM L^{-1} L-cysteiny (Sigma-Aldrich) oraz 10 ng mL^{-1} rekombinowanego epidermalnego czynnika wzrostowego człowieka (rhEGF; ang. recombinant human epidermal growth factor, Sigma-Aldrich).

System II (preRSCV-IVM-II) określane był jako sekwencyjny, dwustopniowy z zastosowaniem roskowityny (RSCV), która jest przedstawicielem rodziny specyficznych/selektywnych inhibitorów kinazy białkowej p34^{cdc2}, stanowiącej podjednostkę katalityczną czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF; ang. maturation/meiosis-promoting factor). W systemie tym, wyselekcjonowane do hodowli oocyty poddawane były 22-godzinnej preinkubacji w pożywce z dodatkiem 50 $\mu\text{M L}^{-1}$ enancjomeru (stereoizomeru optycznego) R roskowityny (R-RSCV, Sigma-Aldrich). W kolejnym etapie, oocyty podlegały właściwemu dojrzewaniu mejotycznemu poprzez 42–44-godziną inkubację w medium hodowlanym uzupełnionym 4 mg mL^{-1} BSA-V, 0,1 IU mL^{-1} hMG lub mieszaniną 10 IU mL^{-1} eCG/PMSG i 10 IU mL^{-1} hCG, a także 10% pFF, 0,6 mM L^{-1} L-cysteiny oraz 10 ng mL^{-1} rhEGF.

System III (IVM-III/TSA) zdefiniowany był jako sekwencyjny, dwustopniowy z zastosowaniem trichostatyny A (TSA), która należy do grupy syntetycznych analogów endogennych inhibitorów deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej (HDACs). Ten niespecyficzny/nieselektywny inhibitor HDACs pośrednio hamuje także procesy metylacji DNA jądrowego katalizowane przez DNMTs. W systemie IVM-III/TSA oocyty umieszczane były w pożywce hodowlanej uzupełnionej 4 mg mL^{-1} BSA-V, 0,1 IU mL^{-1} hMG lub mieszaniną 10 IU mL^{-1} eCG/PMSG i 10 IU mL^{-1} hCG, a także 10% pFF, 0,6 mM L^{-1} L-cysteiny oraz 10 ng mL^{-1} rhEGF. Po około 20 godzinach oocyty były przenoszone do tej samej pożywki, lecz dodat-

kowo wzbogaconej 80 nM L^{-1} TSA (Sigma-Aldrich). W tych warunkach fizykochemicznych oocyty były hodowane *in vitro* przez kolejne 22–24 godziny, aż do czasu osiągnięcia dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej.

Po hodowli we wszystkich trzech systemach IVM, dojrzałe *in vitro* oocyty z wyraźnie wyodrębnionymi ciałkami kierunkowymi I rzędu i jednolicie granulowaną cytoplazmą, nie wykazującą zmian degeneracyjnych (nekrotycznych lub apoptotycznych), stanowiły źródło biorców dla jąder komórek somatycznych.

Egzogenna (TSA-zależna) modyfikacja epigenomowa hodowanych *in vitro* fibroblastycznych komórek-dawców jąder

Konfluentne linie klonalne fibroblastów układu skórno-powłokowego płodów lub dorosłych osobników (loch lub knurów) były pasażowane (podwojenie populacji). Uzyskane subpopulacje (szczepy) komórkowe były wysiewane w naczynkach hodowlanych wypełnionych podstawową pożywką Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM/EMEM; ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Dulbecco's Minimum Essential Medium lub Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco Invitrogen Co., UK). Pożywka DMEM/EMEM wzbogacona była dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FBS; ang. foetal bovine serum, Sigma-Aldrich), 5 ng mL^{-1} rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF; ang. recombinant human basic fibroblast growth factor, Sigma-Aldrich) i 2 mM L^{-1} mieszaniny aminokwasów endogennych (NEAA; ang. non-essential amino acids, Sigma-Aldrich). Ponadto, uzupełniona ona była 2 mM L^{-1} L-glutaminy (Sigma-Aldrich), $0,36 \text{ mM L}^{-1}$ pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich) oraz 1% mieszaniny antybiotyków i mykostatyków (AAS; ang. antibiotic-antimycotic solution). W wyniku pokrycia gęstą, pojedynczą warstwą całej dostępnej powierzchni dna butelki hodowlanej, przylegające ściśle zarówno do siebie, jak i do substratu komórki fibroblastyczne podlegały inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu przez 24–72 godziny. W tych warunkach cykl mitotyczny fibroblastów był sztucznie synchronizowany w fazach G1/G0. Przed wykorzystaniem jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania, linie komórek fibroblastycznych, które poddawano zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, inkubowane były przez 24 godziny w pożywce uzupełnionej 50 nM L^{-1} trichostatyny A (TSA). Do klonowania somatycznego użyte były transformowane epigenetycznie (za pośrednictwem TSA) komórki pochodzące z wczesnych pasaży (2–6). Na potrzeby klonowania, poszczególne subpopulacje komórkowe fibroblastów były intensywnie przemywane świeżą pożywką pozbawioną modulatora epigenetycznego TSA, trypsynizowane i wirowane, w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek.

Technika klonowania somatycznego

Enukleacja mikrochirurgiczna oocytów wspomagana chemicznie

Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego, dojrzałe *in vitro* oocyty inkubowane były przez 1 godzinę w pozbawionej jonów Ca^{2+} pożywce TC-199/HEPES (Gibco BRL). Ta ostatnia uzupełniona była mieszaniną $0,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ demekolcyny (DMCC, Sigma-Aldrich) oraz $0,05 \text{ M L}^{-1}$ sacharozy (Sigma-Aldrich). Następnie oocyty z wyraźnie widocznym w przestrzeni okołozółtkowej stożkowatym uwypukleniem

plazmolemmy (w pobliżu I ciała kierunkowego) przenoszone były do pożywki z dodatkiem $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ cytochalazyny B (CB, Sigma-Aldrich). Niewielki fragment cytoplazmy oocyty (zawierający płytkę metafazową wrzeczona II podziału mejotycznego) usuwany był wraz z polocytem I rzędu za pomocą pipety enukleacyjnej.

Rekonstrukcja enukleowanych oocytów

Wyjądrowane oocyty świni rekonstruowane były przy wykorzystaniu techniki fuzji indukowanej impulsami prądu stałego (elektrofuzji). Wyselekcjonowane, pojedyncze komórki fibroblastyczne wprowadzane były mikrochirurgicznie do przestrzeni okołozółtkowej wyjądrowanych oocytów. Kompleksy ooplast-komórka somatyczna umieszczane były w komorze do elektroporacji wypełnionej roztworem izotonicznego dielektryku, który stanowił $0,3 \text{ M } D\text{-mannitol}$ (Sigma-Aldrich). Roztwór ten uzupełniony był $1,0 \text{ mM L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ (Sigma-Aldrich), $0,1 \text{ mM L}^{-1} \text{ MgSO}_4$ (Sigma-Aldrich) i $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ wolnej od kwasów tłuszczowych frakcji albuminy surowicy bydłowej (FAF-BSA, Sigma-Aldrich). Fuzja kompleksów komórkowych indukowana była generowanymi bezpośrednio po sobie 2 impulsami prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego $1,2 \text{ kV cm}^{-1}$ i czasie trwania $60 \mu\text{sek}$. każdy.

Sztuczna aktywacja zrekonstruowanych oocytów

Do stymulacji programu rozwojowego zrekonstruowanych oocytów zastosowany był protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji fizycznej. W systemie tym impulsy elektryczne, indukujące fuzję kompleksów cytoplast-komórka somatyczna, stanowiły równocześnie bodźce inicjujące aktywację zrekonstruowanych oocytów. Elektroporacja błon cytoplazmatycznych hybryd klonalnych indukowana była przy użyciu dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego $1,2 \text{ kV cm}^{-1}$ i czasie trwania $60 \mu\text{sek}$. każdy. Zabieg przeprowadzany był w roztworze izotonicznego dielektryku o podwyższonym do 1 mM L^{-1} stężeniu jonów Ca^{2+} .

Hodowla *in vitro* zarodków klonalnych

Sztucznie aktywowane cybrydy klonalne uzyskane w wyniku rekonstrukcji oocytów z jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników hodowane były w $50\text{-}\mu\text{L}$ kroplach pożywki NCSU-23 z dodatkiem $0,4\%$ BSA-V, w temperaturze 39°C , w atmosferze $5\% \text{ CO}_2$ i $100\% \text{ H}_2\text{O(g)}$ w powietrzu. Po 3–4-dniowej inkubacji, zarodki przenoszone były do pożywki uzupełnionej 10% FBS. Zarodki hodowane były przez 6–7 dni do osiągnięcia stadium moruli/blastocysty. Po wybarwieniu fluorochromem Hoechst 33342 (bisbenzimidem, Sigma-Aldrich) o stężeniu $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ pożywki NCSU-23 z dodatkiem 10% FBS, blastocysty klonalne poddawane były cytobiochemicznej ocenie jakości morfologicznej. Przeprowadzana ona była w oparciu o całkowitą liczbę komórek, tj. sumaryczną liczbę komórek wężła zarodkowego oraz komórek trofoblastycznych w zarodkach.

Analiza statystyczna

W celu porównania liczby dojrzałych mejotycznie oocytów, liczby zarodków klonalnych zaklasyfikowanych do hodowli *in vitro* w oparciu o ocenę zabiegu fuzji

kompleksów ooplast-komórka somatyczna, liczby dzielących się zarodków, liczby zarodków w stadium moruli oraz blastocysty między różnymi grupami hybryd jądroowo-ooplazmatycznych (cybryd klonalnych), zastosowano procedurę analityczną przy użyciu testu niezależności zmiennych losowych (cech) χ^2 . Grupy doświadczalne utworzono w zależności od badanego czynnika, który stanowiła metoda dojrzewania *ex vivo* oocytów-biorców jąder z wykorzystaniem pożywek hodowlanych o zróżnicowanej suplementacji (tj. o zróżnicowanym składzie jakościowym).

Natomiast w celu porównania średniej liczby komórek w blastocystach między różnymi grupami cybryd klonalnych świni, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przy wykorzystaniu testu *t*-Studenta dla grup niezależnych, czyli dla zmiennych niepowiązanych. Grupy eksperymentalne utworzono w zależności od badanego czynnika, czyli metody pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów w odmiennych warunkach mikrośrodowiska hodowlanego (różnice w składzie jakościowym pożywek wynikające z odmiennych suplementów).

Wyniki

Wyniki dotyczące wpływu różnych warunków hodowli *in vitro* (system **IVM-I** – bez użycia roskowityny lub trichostatyny A, system **preRSCV-IVM-II** – z wykorzystaniem roskowityny oraz system **IVM-III/TSA** – z wykorzystaniem trichostatyny A) na efektywność jądroowo-cytoplazmatycznego dojrzewania oocytów świni – biorców jąder komórek somatycznych w procedurze klonowania przedstawiono w tabeli 1. Z kolei tabele 2 i 3 przedstawiają wyniki dotyczące potencjału rozwojowego *in vitro* i jakości klonalnych zarodków świni zrekonstruowanych z jąder dwóch typów epigenetycznie modulowanych komórek fibroblastycznych (fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników), w zależności od zastosowania trzech systemów pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów (**IVM-I**, **preRSCV-IVM-II** oraz **IVM-III/TSA**).

Tabela 1. Efektywność dojrzewania mejotycznego oocytów świni w różnych warunkach hodowli *in vitro*
Table 1. Efficiency of meiotic maturation of pig oocytes under different *in vitro* culture conditions

System IVM IVM system	Liczba (szt.) hodowanych oocytów No. of oocytes cultured	Liczba (szt.) dojrzałych oocytów-biorców (%) No. of mature oocytes (%)
IVM-I	152	128/152 (84,2%) a
preRSCV-IVM-II	155	133/155 (85,8%) a
IVM-III/TSA	163	154/163 (94,5%) b

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,05$.

a, b – values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of $0,01 < P \leq 0,05$.

Tabela 2. Wpływ różnych systemów mejotycznego dojrzewania *ex vivo* oocytów na kompetencje rozwojowe *in vitro* i jakości zarodków klonalnych zrekonstruowanych z jąder komórkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów

Table 2. Effect of different systems of meiotic maturation *ex vivo* on developmental competence *in vitro* and quality of cloned embryos reconstructed from nuclei of epigenetically transformed cutaneous tissue fibroblasts of fetuses

System IVM oocytów Oocyte IVM system	Liczba (szt.) zrekonstruowanych oocytów No. of reconstructed oocytes	Liczba (szt.) hodowanych zarodków klonalnych (%) No. of embryos cultured (%)	Liczba (szt.) dzielących się zarodków (%) No. of embryos cleaved (%)	Liczba moruli (%) No. of morulae (%)	Liczba blastocyst (%) No. of blastocysts (%)	Średnia (\bar{x}) i maksymalna (max) liczba komórek w blastocystach (n) Mean (\bar{x}) and maximum (max) number of cells in blastocysts (n)
IVM-I	64	56/64 (87,5) a	43/56 (76,8) aB	24/56 (42,9) aB	15/56 (26,8%) aC	\bar{x} = 25,8 a max = 29,0 (n = 15)
preRSCV-IVM-II	66	60/66 (90,9) a	48/60 (80,0) aB	26/60 (43,3) aB	17/60 (28,3) aC	\bar{x} = 26,3 a max = 30,0 (n = 17)
IVM-III/TSA	77	68/77 (88,3) a	64/68 (94,1) A	45/68 (66,2) A	27/68 (39,7) D	\bar{x} = 30,2 b max = 35,0 (n = 27)

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,05$.

A, B – oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,001$.

C, D – oznaczają statystycznie wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P \leq 0,01$.

a, b – next to values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of $0,01 < P \leq 0,05$.

A, B – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of $0,01 < P \leq 0,001$.

C, D – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of $P \leq 0,01$.

Tabela 3. Wpływ różnych systemów mejotycznego dojrzewania *ex vivo* oocytów na kompetencje rozwojowe *in vitro* i jakość zarodków klonalnych zrekonstruowanych z jąder komarkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników

Table 3. Effect of different systems of meiotic oocyte maturation *ex vivo* on developmental competence *in vitro* and quality of cloned embryos reconstructed from nuclei of epigenetically transformed cutaneous tissue fibroblasts of adults

System IVM oocytów Oocyte IVM system	Liczba (szt.) zrekonstruowanych oocytów No. of reconstructed oocytes	Liczba (szt.) hodowanych zarodków (%) No. of embryos cultured (%)	Liczba dzielących się zarodków (%) No. of cleaved embryos (%)	Liczba morul (%) No. of morulae (%)	Liczba blastocyst (%) No. of blastocysts (%)	Średnia (\bar{x}) i maksymalna (max) liczba komórek w blastocystach (n) Mean (\bar{x}) and maximum (max) number of cells in blastocysts (n)
IVM-I	64	58/64 (90,6) a	36/58 (62,1) aB	19/58 (32,8) aB	10/58 (17,2) aC	\bar{x} = 25,4a max = 28,0 (n = 10)
preRSCV-IVM-II	67	62/67 (92,5) a	41/62 (66,1) aB	20/62 (32,3) aB	9/62 (14,5) aB	\bar{x} = 25,9a max = 29,0 (n = 9)
IVM-III/TSA	77	69/77 (89,6) a	56/69 (81,2) A	36/69 (52,2) A	20/69 (29,0) A	\bar{x} = 29,1b max = 33,0 (n = 20)

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,05$.

A, B – oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,001$.

a, b – next to values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of $0,01 < P \leq 0,05$.

A, B – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of $0,01 < P \leq 0,001$.

A, C – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of $P \leq 0,01$.

Omówienie wyników

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują na poprawę wydajności klonowania świń poprzez wzrost potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków klonalnych zrekonstruowanych z epigenomowo-dojrzałych oocytów o wysokiej jakości oraz z jąder fibroblastów układu skórno-powłokowego płodów lub dorosłych osobników, które poddane zostały epigenetycznym modulacjom aktywności transkrypcyjnej w warunkach hodowli *ex vivo*. Do hodowli *ex vivo* oocytów wykorzystano *R*-roskowitynę z grupy specyficznych inhibitorów kompetycyjnych kinaz cyklicznych oraz trichostatynę A z grupy niespecyficznych inhibitorów izosterycznych deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, w celu synchronizacji procesów dojrzewania jądrowego, cytoplazmatycznego i epigenomowego. W pracy tej przeprowadzono analizę porównawczą trzech systemów IVM oocytów, stanowiących źródło komórek-biorców jąder w procedurze klonowania. W zależności od zastosowania różnych strategii hodowli *in vitro* oocytów, obejmujących odmienne warianty suplementacji pożywek do dojrzewania, oceniano zarówno efektywność systemów IVM, którą mierzono odsetkiem oocytów osiągających stan dojrzałości jądro-cytoplazmatycznej w stadium MII, jak i przedimplantacyjne zdolności rozwojowe oraz jakość morfologiczną zarodków klonalnych świń.

W dostępnej literaturze z zakresu klonowania somatycznego świń stwierdzono brak prac, w których porównywany jest potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków zrekonstruowanych z oocytów uzyskujących dojrzałość mejotyczną w warunkach inkubacji w pożywkach hodowlanych o zróżnicowanym składzie jakościowym. Według naszej wiedzy, po raz pierwszy w badaniach nad klonowaniem świń oraz innych gatunków ssaków wykorzystano trichostatynę A do sztucznej modyfikacji epigenetycznej komórkowej pamięci o stopniu aktywności transkrypcyjnej genomu oocytów-biorców jąder komórek somatycznych. Bezpośrednia, ektopowa transformacja epigenetycznych modyfikacji białek histonowych chromatyny jądrowej (tj. poziomu acetylacji reszt lizyny i arginyiny histonów H3 i H4 rdzenia nukleosomowego) oraz pośrednia transformacja modyfikacji kowalencyjnych DNA jądrowego (tj. poziomu metylacji reszt cytozyny) doprowadziła prawdopodobnie do zmniejszenia stopnia asynchronii między dojrzałością epigenomową a dojrzałością jądro-cytoplazmatyczną oocytów-biorców jąder. Z kolei pełna lub maksymalnie zbliżona do pełnej synchronizacja procesów dojrzewania epigenomowego oraz mejotycznego i cytoplazmatycznego oocytów mogła przyczynić się do podwyższenia przedimplantacyjnych kompetencji rozwojowych oraz jakości zarodków klonalnych świń wskutek zwiększenia zdolności do przeprogramowania ekspresji genów jąder komórek somatycznych po ich transplatacji do epigenetycznie dojrzałej ooplazmy-biorcy. Stwierdzono bowiem, że efektywność dojrzewania *in vitro* oocytów świń była znacznie wyższa w systemach hodowli z zastosowaniem trichostatyny A niż w systemach hodowli z zastosowaniem *R*-roskowityny lub w pożywce pozbawionej odwracalnych blokerów cyklu mejotycznego lub niespecyficznych represorów modyfikacji epigenetycznych białek histonowych oraz DNA jądrowego (tab. 1). Ponadto, wyższy potencjał rozwojowy i jakość zarodków klonalnych świń odnotowano w wyniku zastosowania do dojrzewania *in vitro* oocytów trichostatyny A niż w przypadku zastosowania roskowityny, a także

w przypadku niezastosowania jakiegokolwiek z wymienionych represorów modyfikacji epigenetycznych białek histonowych i DNA jądrowego lub blokerów cyklu mejotycznego (tab. 2 i 3).

Jednakże, trichostatyna A została użyta nie tylko do epigenetycznej transformacji komórkowej pamięci oocytów świni o profilu aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego, lecz także do sztucznej modulacji epigenomowo-uwarunkowanej ekspresji genów w hodowanych *in vitro* komórkach fibroblastycznych, stanowiących źródło dawców jąder w zabiegach rekonstrukcji enukleowanych oocytów metodą klonowania somatycznego. Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder hodowanych komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się ich ekspozycja na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność enzymów DNMTs oraz HDACs. Do pierwszej grupy sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należy 5-aza-2'-deoksytydyna (5-aza-dC), a do drugiej – trichostatyna A (TSA) oraz butanian/maślan sodu (NaBu) (Enright i in., 2005; Kishigami i in., 2006; Wee i in., 2007; Yang i in., 2007 b). Wyniki badań własnych, a także badań innych autorów (Enright i in., 2003; Wee i in., 2007) sugerują, że zastosowanie trichostatyny A do egzogennej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* fibroblastycznych komórek-dawców jąder może mieć pozytywny wpływ na złożone procesy strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania DNA genomowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych. Scenariusz prawidłowego i pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej jąder somatogenicznych w komórkach zarodków klonalnych może zostać bowiem zrealizowany jedynie przez zwiększenie częstotliwości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji reszt lizyny i argininy histonów chromatyny komórek-dawców jąder, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym (Yang i in., 2007 a; Zhang i in., 2007; Shi i in., 2008). Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest ich wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy. W eksperymentach własnych, najwyższą aktywnością podziałową, a także odsetkiem morul i blastocyst charakteryzowały się zarodki klonalne pochodzące z modulowanych epigenetycznie, dojrzałych *in vitro* oocytów, które zrekonstruowane były z jąder komórek fibroblastycznych poddanych także transformacji epigenomowej. Niemniej jednak, kompetencje jąder komórkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów do pokierowania rozwojem *in vitro* zarodków klonalnych świni do stadium moruli oraz blastocysty były wyższe niż kompetencje jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników, niezależnie od zastosowanych do dojrzewania *ex vivo* oocytów blokerów cyklu mejotycznego lub represorów modyfikacji kowalencyjnych białek histonowych oraz DNA jądrowego (tj., odpowiednio deacetylacji oraz metylacji).

Zarówno w badaniach własnych, jak i w doświadczeniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) zaobserwowano podobną zależność między fenotypem/rodowodem komórek-dawców jąder wykorzystanych w procedurze klonowania so-

matycznego świń a przedimplantacyjnymi zdolnościami rozwojowymi do stadium blastocysty zarodków klonalnych uzyskanych techniką równoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów. W obu przypadkach stwierdzono niższy odsetek blastocyst klonalnych rozwijających się z zarodków zrekonstruowanych z dojrzałych *in vitro* enukleowanych oocytów oraz z jąder komórek fibroblastycznych tkanki skórnej ucha dorosłych osobników w porównaniu do zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych. W badaniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) potencjał rozwojowy do stadium blastocysty zarodków klonalnych świni zrekonstruowanych z jąder głodzonych fibroblastów skórnych niedojrzałych płciowo loszek był dwukrotnie niższy niż zarodków zrekonstruowanych z jąder głodzonych fibroblastów płodowych (ok. 8% vs. 16%). Podobna tendencja utrzymywała się w eksperymentach własnych, a potencjał rozwojowy do stadium blastocysty wahał się w granicach 15–29% oraz 27–40%, odpowiednio, w przypadku zarodków klonalnych zrekonstruowanych z genomu jądrowego konfluentnych i transformowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórnej dojrzałych płciowo loch lub knurów oraz zarodków zrekonstruowanych z genomu jądrowego płodowych komórek fibroblastycznych (tab. 2 i 3). Istotnie niższy w porównaniu do badań własnych odsetek uzyskanych w doświadczeniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) blastocyst rozwijających się z cybrydowych zygot klonalnych zrekonstruowanych z jąder fibroblastów skóry dorosłych osobników lub fibroblastów płodowych może wynikać z faktu niezastosowania TSA-zależnej transformacji epigenetycznej hodowanych komórek-dawców jąder. Do znacznych różnic w potencjale rozwojowym zarodków klonalnych między badaniami Lee i in. (2003) a eksperymentami własnymi mogło przyczynić się także wykorzystanie innej metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0 (deprywacja troficzna vs. inhibicja kontaktowa migracji i proliferacyjnego wzrostu komórek w warunkach pełnej konfluencji). Kolejnym powodem niższych niż w badaniach własnych kompetencji rozwojowych *in vitro* zarodków klonalnych mogą być odmienne parametry fizyko-techniczne impulsów elektrycznych użytych do protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów ($1 \times 200 \text{ V/mm} \times 50 \text{ } \mu\text{sek.}$ vs. $2 \times 120 \text{ V/mm} \times 60 \text{ } \mu\text{sek.}$).

W przeciwieństwie do wyników badań własnych oraz badań Lee i in. (2003), w eksperymentach przeprowadzonych przez Parka i in. (2002) nie stwierdzono istotnych różnic w zdolnościach rozwojowych *in vitro* do stadium blastocysty między zarodkami klonalnymi świni zrekonstruowanymi z jąder głodzonych fibroblastów tkanki skórnej ucha 4-dniowych prosiąt a zarodkami zrekonstruowanymi z jąder głodzonych fibroblastów płodowych (ok. 10,0% vs. 9,5%). Jednakże brak statystycznie istotnych różnic w odsetku blastocyst rozwijających się z obu typów zarodków klonalnych może być spowodowany inną niż zastosowana w badaniach własnych długością trwania impulsów prądu stałego, które były generowane w celu indukcji jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów ($2 \times 1,2 \text{ kV/cm} \times 30 \text{ } \mu\text{sek.}$ vs. $2 \times 1,2 \text{ kV/cm} \times 60 \text{ } \mu\text{sek.}$). Inną tego przyczyną mogą być także odnotowane między eksperymentami różnice w wieku zwierząt, od których pobrano biopaty tkankowe małżowiny usznej (osobniki w okresie neonatalnym rozwoju ontogenetycznego oraz dojrzałe płciowo i/lub rozplodowo/somatycznie osobniki żeńskie lub męskie).

Podsumowując, w oparciu o uzyskane wyniki badań własnych stwierdzono istotny wpływ zróżnicowanej suplementacji pożywek do pozaustrojowego dojrzewania oocytów świni na zdolności rozwojowe *in vitro* oraz morfologiczną jakość klonalnych zarodków zrekonstruowanych z jąder transformowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych. Ponadto, sugeruje się, że wykorzystanie trichostatyny A do modulacji komórkowej pamięci epigenetycznej dojrzewających *ex vivo* oocytów może zwiększać częstotliwość synchronizacji oraz przyspieszać tempo/kinetykę procesów dojrzewania epigenomowego oraz dojrzewania jądro-cytoplazmatycznego hodowanych *in vitro* oocytów-biorców jąder komórek somatycznych w procedurze klonowania świń. Zarodki klonalne świni, które rozwijały się z oocytów dojrzewających *ex vivo* w obecności trichostatyny A, wykazywały stosunkowo wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy. Niemniej jednak, niezbędne jest prowadzenie dalszych, szczegółowych badań w tym zakresie w celu potwierdzenia, czy zastosowane systemy IVM oocytów świni z użyciem *R*-roskowitzyny lub trichostatyny A mogą doprowadzić do uzyskania potomstwa klonalnego w wyniku transferu do samic-biorczyń zarodków zrekonstruowanych z jąder dwóch typów komórek fibroblastycznych, poddanych epigenetycznym modyfikacjom w warunkach hodowli *in vitro*.

Piśmiennictwo

- Beaujean N., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 71: 185–193.
- Boquest A.C., Grupen C.G., Harrison S.J., McIlpatrick S.M., Ashman R.J., d'Apice A.J.F., Nottle M.B. (2002). Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 66: 1283–1287.
- Bui H.T., Van Thuan N., Kishigami S., Wakayama S., Hikichi T., Ohta H., Mizutani E., Yamaoka E., Wakayama T., Miyano T. (2007). Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction*, 133: 371–382.
- Coy P., Romar R., Ruiz S., Canovas S., Gadea J., Vazquez F.G., Matas C. (2005). Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with *R*-roscovitine. *Reproduction*, 129: 747–755.
- Enright B.P., Kubota C., Yang X., Tian X.C. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 69: 896–901.
- Enright B.P., Sung L.Y., Chang C.C., Yang X., Tian X.C. (2005). Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 72: 944–948.
- Hölker M., Petersen B., Hassel P., Kues W.A., Lemme E., Lucas-Hahn A., Niemann H. (2005). Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells*, 7: 35–44.
- Hyun S.H., Lee G.S., Kim D.Y., Kim H.S., Lee S.H., Kim S., Lee E.S., Lim J.M., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2003). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59: 1641–1649.
- Kawakami M., Kato Y., Tsunoda Y. (2005). Maintenance of meiotic arrest and developmental potential of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 7: 167–177.
- Kishigami S., Mizutani E., Ohta H., Hikichi T., Thuan N.V., Wakayama S., Bui H.T., Wakayama T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340: 183–189.

- Le Beux G., Richard F.J., Sirard M.A. (2003). Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology*, 60: 1049–1058.
- Lee G.-S., Hyun S.-H., Kim H.-S., Kim D.-Y., Lee S.-H., Lim J.-M., Lee E.-S., Kang S.-K., Lee B.-C., Hwang W.-S. (2003). Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59: 1949–1957.
- Park K.-W., Lai L., Cheong H.-T., Cabot R., Sun Q.-Y., Wu G., Rucker E.B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S. (2002). Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol. Reprod.*, 66: 1001–1005.
- Rybouchkin A., Kato Y., Tsunoda Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 74: 1083–1089.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005). Molecular conditions of the cell nucleus remodelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intraooplasmic karyoplast injection technique. *Czech J. Anim. Sci.*, 50: 185–195.
- Schoevers E.J., Bevers M.M., Roelen B.A., Colenbrander B. (2005). Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 63: 1111–1130.
- Shi L.H., Ai J.S., Ouyang Y.C., Huang J.C., Lei Z.L., Wang Q., Yin S., Han Z.M., Sun Q.Y., Chen D.Y. (2008). Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J. Anim. Sci.*, 86: 1106–1113.
- Wee G., Shim J.J., Koo D.B., Chae J.I., Lee K.K., Han Y.M. (2007). Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*, 134: 781–787.
- Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V. (2007 a). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 133: 219–230.
- Yang J., Yang S., Beaujean N., Niu Y., He X., Xie Y., Tang X., Wang L., Zhou Q., Ji W. (2007 b). Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 76: 36–42.
- Zhang Y., Li J., Vиллемoes K., Pedersen A.M., Purup S., Vajta G. (2007). An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Wells*, 9: 357–363.

Zatwierdzono do druku 21 VI 2011

MARCIN SAMIEC, MARIA SKRZYSZOWSKA

Effect of different systems for *in vitro* maturation of porcine oocytes on development of embryos generated by somatic cell cloning

SUMMARY

The present study was conducted in order to develop both the optimal methods for *ex vivo* oocyte meiotic maturation and the strategies of inducible epigenomic modification of nuclear recipient oocytes as well as nuclear donor cells for the purposes of somatic cell cloning of pigs. Enucleated, meiotically-matured gilt/sow oocytes were reconstituted with the cell nuclei of either foetal fibroblast cells (Group I) or adult cutaneous fibroblast cells (Group II), which had been previously epigenetically-transformed by trichostatin A (TSA). TSA is a member of the family that includes non-specific/non-selective blockers for the activity of histone deacetylases. Depending on the systems of *in vitro* maturation (IVM), the capabilities of cloned embryos to develop up to morula and blastocyst stages were examined on Days 6 to 7 under *in vitro* culture circumstances, respectively. The IVM systems involved the treatment of oocytes with

TSA (Groups IA and IIA). In turn, in Groups IB and IIB, the oocytes were pre-matured with roscovitine (RSCV), which is a specific/selective inhibitor of cyclin-dependent kinases and thereby reversible blocker of meiotic cell cycle at prophase I dictyotene stage. But, in Groups IC and IIC, immature oocytes were cultured in the medium lacking RSCV or TSA. In Groups IA and IIA, the frequencies of nuclear-transferred embryos that developed to the morula and blastocyst stages were 45/68 (66.2%) and 27/68 (39.7%) or 36/69 (52.2%) and 20/69 (29.0%), respectively. The morula and blastocyst formation rates yielded 26/60 (43.3%) and 17/60 (28.3%) or 20/62 (32.3%) and 9/62 (14.5%) in Groups IB or IIB, respectively. In turn, in Groups IC and IIC, the proportions of nuclear-transferred embryos that reached the morula and blastocyst stages were 24/56 (42.9%) and 15/56 (26.8%) or 19/58 (32.8%) and 10/58 (17.2%), respectively. In conclusion, the *in vitro* maturation of porcine oocytes in the culture medium enriched with TSA resulted both in the higher developmental competences and in the improved quality of cloned embryos as compared to the IVM of oocytes that had been pre-incubated with RSCV and to that in the medium depleted of RSCV and TSA.

Key words: pig, *in vitro* maturation, nuclear recipient oocyte, epigenomic maturity, epigenetic transformation/modulation, trichostatin A, roscovitine, cloned embryo

EFEKTYWNOŚĆ WYCHOWU CIELĄT OTRZYMUJĄCYCH PASZE WZBOGACONE W GLUTAMINĘ, GLUKOZĘ LUB MAŚLAN SODU*

Barbara Niwińska¹, Ewa Hanczakowska¹, Karol Węglarzy²

¹Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwo, 32-083 Balice k. Krakowa

²Zakład Doświadczalny IZ PIB Grodziec Śląski Sp. z o.o., 43-386 Świętoszówka

Celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu wzbogacenia pasz dla cieląt w glutaminę, glukozę lub maślan sodu na przyrosty masy ciała oraz zużycie pasz i składników pokarmowych na przyrosty masy ciała w okresach żywienia paszami płynnymi (od 7. do 56. dnia życia) i paszami stałymi (od 57. do 90. dnia życia). Utworzono 4 grupy żywieniowe (n = 6), w których cieliczki rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej od 7. dnia życia otrzymywały preparaty mekozastępcze oraz mieszanki treściwe: w grupie kontrolnej (K) podstawowe, w grupie GT z dodatkiem glutaminy (10 g · kg⁻¹ suchej masy, SM), w grupie GK glukozy (10 g · kg⁻¹ SM), oraz w grupie MS maślanu sodu (3 g · kg⁻¹ SM). Wartość pokarmowa pasz oraz program żywieniowy były zgodne z normami (IZ PIB-INRA, 2009). Cieliczki żywione paszami z dodatkiem maślanu sodu uzyskiwały wyższe dzienne przyrosty masy ciała zarówno w okresie od 7. do 56. dnia życia (P ≤ 0,05), jak i w całym okresie badań (tendencja statystyczna, P ≤ 0,1) w porównaniu do tych zwierząt, które otrzymywały pasze z dodatkiem glutaminy lub glukozy. W okresie od 7. do 56. dnia życia cielęta z grupy MS w porównaniu do cieląt z grupy GK zużywały mniej (tendencja statystyczna) mieszanki treściwej i energii, a także suchej masy pasz (P ≤ 0,05) na 1 kg przyrostu masy ciała. Dodatek glutaminy lub glukozy, stosowany w ilości 10 g · kg⁻¹ SM dawki, nie wpłynął na wskaźniki wychowu cieląt (P > 0,1). Wyniki badań wykazały, że wprowadzenie maślanu sodu do pasz poprawiło przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz i składników pokarmowych na przyrost masy ciała cieląt, a wpływ ten był statystycznie istotny w okresie wychowu od 7. do 56. dnia życia.

Budowa i funkcjonowanie przewodu pokarmowego mają podstawowy wpływ na prawidłowy wzrost i rozwój zwierząt. Pomimo że przewód pokarmowy stanowi około 10% masy ciała przeżuwacza, jego potrzeby energetyczne sięgają 40% zapotrzebowania całego organizmu na adenozyntrifosforan, a równocześnie w jego tkankach przebiega około 26% przemian białkowych (Gill i in., 1989; McBride i Kelly, 1990). Tak wysokie potrzeby białkowo-energetyczne wskazują na konieczność poszukiwania składników, które dodawane do pasz, wpływając korzystnie na aktywność metabo-

*Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Projekt nr N N311 034134.

liczną przewodu pokarmowego, wspomagają także jego funkcje trawienne i chłonne. W wychowie cieląt szczególnie ważna jest stymulacja rozwoju przewodu pokarmowego w okresie żywienia paszami płynnymi, kiedy ich system trawienny podlega procesowi przystosowania do trawienia pasz stałych. Wyniki badań Drackleya i in. (2006) wykazały, że oczekiwania te spełnia glutamina. Autorzy, analizując wpływ wzbogacenia paszy podawanej cielętom w glutaminę, uzyskali poprawę wskaźników morfologicznych jelita cienkiego, potwierdzającą wzrost powierzchni chłonnej tego organu. Podobny efekt wykazuje dodatek kwasu masłowego. Gorka i in. (2009) stwierdzili zwiększenie masy i powierzchni chłonnej rozwijającego się żwacza u cieląt, którym w pierwszych 4 tygodniach życia podawano pasze z dodatkiem kwasu masłowego (w postaci soli sodowej). Korzystny wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego może spełniać również dodatek glukozy. Wyniki badań Aschenbacha i in. (2000 a, b) wykazały, że zarówno ścianę żwacza, jak i jelito cienkie charakteryzuje intensywne pobieranie tego składnika z treści pokarmowej. Autorzy wykazali także, że glukoza zawarta w treści pokarmowej przewodu pokarmowego stanowi łatwo dostępne źródło energii i jest wykorzystywana dla własnego metabolizmu tych organów. Wydaje się, że wzbogacenie pasz w glukozę pozwoli na lepsze pokrycie potrzeb energetycznych rozwijającego się przewodu pokarmowego cieląt.

Wyniki cytowanych badań wskazują, że glutamina, glukoza oraz kwas masłowy, stanowiąc substraty metabolizmu przewodu pokarmowego, wprowadzone do pasz poprawiają funkcjonowanie przewodu pokarmowego. W przedstawionych badaniach przyjęto hipotezę, że wzbogacenie pasz w wyżej wymienione substancje poprawia także przyrosty masy ciała oraz zużycie pasz i składników pokarmowych na uzyskane przyrosty. W celu weryfikacji hipotezy przeprowadzono badania porównujące użytkiwane wskaźniki efektywności wychowu cieląt otrzymujących pasze bez dodatków lub pasze z dodatkiem glutaminy, glukozy lub soli sodowej kwasu masłowego.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego Grodziec Śląski Sp. z o.o. w roku 2010. Badania realizowano z udziałem 24 cieliczek rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, w okresie wychowu od 7. do 90. dnia życia.

Czynnikiem doświadczalnym był rodzaj dodatku wprowadzonego do preparatów mlekozastępczych i mieszanek treściwych podawanych zwierzętom doświadczalnym. Do pasz wprowadzono: L-glutaminę (Shanghai Brightol International Co., Ltd., Chiny), glukozę krystaliczną (Cargill Sp. z o.o., Polska) lub kwas masłowy w postaci maślanu sodu (Norel S.A., Madryt, Hiszpania). Cieliczki w 7. (± 1 , 1) dniu życia przydzielano równolegle, według terminów urodzeń, do 4 grup żywieniowych ($n = 6$), w których otrzymywały izobiałkowe i izoenergetyczne pasze: w grupie kontrolnej (K) podstawowe pasze, w grupie GT w skład pasz wprowadzono glutaminę, w grupie GK glukozę, natomiast w grupie MS maślan sodu. Skład komponentowy pasz doświadczalnych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład komponentowy pasz doświadczalnych, ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy)
 Table 1. Composition of experimental feeds ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry matter)

Wyszczególnienie Item	K	GT	GK	MS
Preparaty mlekozastępcze Milk replacers				
podstawowy preparat mlekozastępczy basic milk replacer	1000	990	990	997
glutamina glutamine		10		
glukoza glucose			10	
maślan sodu sodium butyrate				3
Mieszanki treściwe Concentrates				
gniecione ziarno jęczmienia crushed barley grain	499	499	499	499
gniecione ziarno pszenicy crushed wheat grain	249	249	239	246
poekstrakcyjna śruta sojowa soybean meal	169	159	169	169
otręby pszenne wheat bran	60	60	60	60
glutamina glutamine		11		
glukoza glucose			11	
maślan sodu sodium butyrate				3
mieszanka mineralno-witaminowa ¹ mineral and vitamin mixture	23	22	22	23

¹ Mieszanka mineralno-witaminowa zawierała ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$): Ca, 165; P, 90; Mg, 36,2; Na, 72,5; Fe, 2,24; Se, 0,011; Zn, 2,95; Cu, 1,31; Co, 0,08; Mn, 3,0; I, 0,09; biotyne, 0,0015; witaminę E, 0,20 oraz witaminę A, 11250 IU.

¹ Mineral and vitamin mixture contained ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$): Ca, 165; P, 90; Mg, 36,2; Na, 72,5; Fe, 2,24; Se, 0,011; Zn, 2,95; Cu, 1,31; Co, 0,08; Mn, 3,0; I, 0,09; biotin, 0,0015; vitamin E, 0,20 and vitamin A, 11250 IU.

Żywienie i utrzymanie zwierząt

Ilości podawanych preparatów mlekozastępczych oraz wartość pokarmowa pasz były zgodne z zaleceniami zawartymi w opracowaniu „Normy żywienia bydła, owiec i kóz. Wartość pokarmowa francuskich i krajowych pasz dla przeżuwaczy” (IZ PIB-INRA, 2009). Zwierzęta żywiono indywidualnie, a ilość pobieranych pasz była kontrolowana codziennie poprzez ważenie podawanych pasz oraz niedojadów.

Do 28. dnia życia cielęta otrzymywały preparat mlekozastępczy-1 zawierający głównie komponenty mleczne, a następnie preparat mlekozastępczy-2 zawierający komponenty roślinne. Preparaty te zostały wyprodukowane przez firmę Blattin Polska Sp. z o.o. z siedzibą w Ozimku (Polska). Cieliczki doświadczalne od 7. do 56.

dnia życia otrzymywały ograniczone ilości pójła sporządzonego z preparatu mlekozastępczego, wynoszące: od 7. do 42. dnia życia – 8 kg, od 43. do 49. dnia życia – 6 kg oraz od 50. do 56. dnia życia – 3 kg dziennie. Pójło było wodnym roztworem preparatu mlekozastępczego w stosunku wagowym 7:1 (woda : preparat mlekozastępczy w proszku). Cielęta karmiono paszą płynną dwukrotnie w ciągu dnia (o godzinie 8⁰⁰ oraz 13⁰⁰).

Mieszanekę treściwą cieliczki pobierały do woli przez cały okres trwania doświadczenia. Mieszanki doświadczalne wykonano z pasz własnych Zakładu Doświadczalnego realizującego badania. Skład chemiczny oraz wartość pokarmową pasz doświadczalnych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Skład chemiczny i wartość pokarmowa pasz doświadczalnych ($n = 3$)¹
Table 2. Chemical composition and nutritive value of experimental feeds ($n = 3$)¹

1	Pasze Feeds			
	K 2	GT 3	GK 4	MS 5
Preparat mlekozastępczy-1 – Milk replacer-1				
Skład chemiczny Chemical composition				
Sucha masa ($g \cdot kg^{-1}$) Dry matter ($g \cdot kg^{-1}$)	969	970	971	974
$g \cdot kg^{-1}$ SM	176	206	167	167
$g \cdot kg^{-1}$ DM				
białko ogólne crude protein				
tłuszcz surowy crude fat	143	139	151	145
popiół surowy crude ash	72	68	66	68
włókno surowe crude fibre	2	2	2	2
Wartość pokarmowa Nutritive value				
$g \cdot kg^{-1}$ SM	168	197	160	160
$g \cdot kg^{-1}$ DM				
kg^{-1} SM	1,5	1,5	1,5	1,5
kg^{-1} DM				
Preparat mlekozastępczy-2 – Milk replacer-1				
Skład chemiczny Chemical composition				
Sucha masa ($g \cdot kg^{-1}$) Dry matter ($g \cdot kg^{-1}$)	944	944	941	940
$g \cdot kg^{-1}$ SM	179	193	176	172
$g \cdot kg^{-1}$ DM				
białko ogólne crude protein				
tłuszcz surowy crude fat	135	151	136	142
popiół surowy crude ash	84	87	89	87
włókno surowe crude fibre	19	19	19	19

cd. tabeli 2 – table 2 contd.

	1	2	3	4	5
Wartość pokarmowa					
Nutritive value					
g · kg ⁻¹ SM	BTJ	164	159	162	159
g · kg ⁻¹ DM	PDI				
kg ⁻¹ SM	JPM	1,5	1,5	1,5	1,5
kg ⁻¹ DM	UFL				
Mieszanka treściwa – Concentrate mixture					
Skład chemiczny					
Chemical composition					
Sucha masa (g · kg ⁻¹)		871	872	872	871
Dry matter (g · kg ⁻¹)					
g · kg ⁻¹ SM	białko ogólne	189	194	188	189
g · kg ⁻¹ DM	crude protein				
	tłuszcz surowy	15	15	15	15
	crude fat				
	popiół surowy	51	50	51	52
	crude ash				
	NDF	186	185	184	185
	ADF	63	63	63	63
	ADL	13	13	13	13
Wartość pokarmowa					
Nutritive value					
g · kg ⁻¹ SM	BTJP	58	57	58	58
g · kg ⁻¹ DM	PDIA				
	BTJN	130	132	129	130
	PDIN				
	BTJE	127	126	127	127
	PDIE				
kg ⁻¹ SM	JPM	1,1	1,1	1,1	1,1
kg ⁻¹ DM	UFL				

¹ Liczba wykonanych analiz.

Number of analyses.

² Białko trawione w jelicie cienkim (wg IZ PIB-INRA, 2009), białko strawne w preparatach mlekozastępczych = BTJ.

Protein digested in the small intestine (acc. to IZ PIB-INRA, 2009), digestible protein in milk replacer formulations = PDI.

³ Jednostka paszowa produkcji mleka (wg IZ PIB-INRA, 2009).

Feed unit for milk production (acc. to IZ PIB-INRA, 2009).

W czasie trwania doświadczenia zwierzęta przebywały w indywidualnych budkach dla cieląt, wyścielanych słomą oraz wyposażonych w poidła automatyczne.

Oceniane wskaźniki

W trakcie realizacji doświadczenia kontrolowano masę ciała: na początku badań (7. dzień życia), po zakończeniu okresu podawania pasz płynnych (56. dzień życia) oraz na koniec doświadczenia (90. dzień życia). Pomiar masy ciała stanowił średnią

z pomiarów przeprowadzanych przez kolejne dwa dni, zawsze rano, przed zadaniem pasz. W okresach od 7. do 56. dnia życia, od 57. do 90. oraz od 7. do 90. dnia życia cieląt określono dzienne przyrosty masy ciała, dzienne pobranie i zużycie na 1 kg przyrostu masy ciała pasz i składników pokarmowych.

Analizy chemiczne

Podstawową analizę chemiczną pasz wykonano metodami standardowymi, zawartość włókna detergentowego neutralnego (NDF) oraz kwaśnego (ADF), a także lignin (ADL) oznaczono według metod przedstawionych przez Van Soesta i in. (1991) w Centralnym Laboratorium IZ PIB.

Obliczenia

Wartość pokarmową pasz oraz skład komponentowy mieszanki treściwej opracowano według IZ PIB-INRA (2009), posługując się programem komputerowym INRAration (ver. 4.05, Copyright INRA, 1988-2004).

Ocena statystyczna

Ocenę różnic statystycznych średnich wartości ocenianych wskaźników przeprowadzono przy zastosowaniu programu Statistica 8 PL (StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków), posługując się analizą jednoczynnikową i testem Duncana, przyjmując grupę jako czynnik. Różnice między średnimi przyjęto jako istotne statystycznie dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,05$ oraz jako tendencję statystyczną dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,1$.

Wyniki

Zawartość składników pokarmowych w preparatach mlekozastępczych oraz mieszankach treściwych podawanych cielętom oraz ich wartość pokarmowa (tab. 2) odpowiadały wartościom zalecanym w normach IZ PIB-INRA (2009).

Początkowa masa ciała cieląt we wszystkich grupach doświadczalnych była podobna ($P > 0,1$) (tab. 3). Rodzaj podawanej cielętom paszy nie wpłynął istotnie ($P > 0,1$) na uzyskiwane przez cielęta masy ciała w 56. dniu, a także w 90. dniu życia. Cielęta otrzymujące pasze MS uzyskały wyższe dzienne przyrosty masy ciała zarówno w okresie od 7. do 56. dnia życia ($P \leq 0,05$), jak i w całym okresie trwania doświadczenia (tendencja statystyczna $P \leq 0,1$) w porównaniu do cieląt otrzymujących pozostałe pasze.

Dzienne pobranie białka trawionego w jelicie cienkim (BTJ) oraz energii (JPM) pokrywało zapotrzebowanie określone dla cieliczek ras mlecznych uzyskujących w okresie od 7. do 90. dnia życia dzienne przyrosty masy ciała $600\text{--}650 \text{ g} \cdot \text{dzień}^{-1}$ (IZ PIB-INRA, 2009) (tab. 4). We wszystkich grupach doświadczalnych cielęta pobierały dziennie podobne ilości mieszanki treściwej, pójła z preparatów mlekozastępczych, suchej masy pasz oraz JPM w okresach od 7. do 56. dnia, od 57. do 90. dnia życia, oraz w całym okresie trwania doświadczenia ($P > 0,1$). Wyższe dzienne pobranie białka ogólnego w okresie od 7. do 56. dnia życia oraz w całym okresie

doświadczenia charakteryzowało cielęta z grupy GT w porównaniu do pobrania charakteryzującego cielęta w pozostałych grupach ($P \leq 0,05$).

Tabela 3. Średnie masy ciała oraz średnie dzienne przyrosty masy ciała cieliczek
Table 3. Average body weights and average daily weight gains of female calves

Wyszczególnienie Item	Grupy Groups				M ¹	SEM ²	Poziom istotności różnic ³ Level of stati- stical significance
	K	GT	GK	MS			
Liczebność Number of animals	6	6	6	6	24		
Średnia masa ciała (kg) Average body weight (kg)							
wiek cieląt (dni): age of calves (days):							
7	42,1	42,1	41,8	42,4	42,1	0,42	ns
56	63,1	63,3	62,3	65,0	63,4	0,54	ns
90	90,9	91,5	90,6	93,3	91,6	0,57	ns
Średni dzienny przyrost masy ciała (g) Average daily weight gains (g)							
w okresie od do (dni życia): in the period from – to (days of age):							
7–56	420 b	424 b	410 b	452 a	426	5,64	x
57–90	818	830	833	832	828	7,87	ns
7–90	581 b	588 b	581 b	606 a	589	4,14	t

¹ Średnia ogólna.

Total mean.

² Błąd standardowy średniej.

Standard error of the mean.

³ Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie x dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,05$ oraz t dla $P \leq 0,1$; brak statystycznie istotnych różnic ns dla $P > 0,1$.

Means in the rows marked with different letters differ significantly: x for a probability level of $P \leq 0.05$ and t for $P \leq 0.1$; no statistically significant differences (ns) for $P > 0.1$.

Cielęta z grupy MS w porównaniu do cieląt z grupy GK zużywały mniej mieszanki treściwej oraz JPM (tendencja statystyczna $P \leq 0,1$), a także suchej masy pasz ($P \leq 0,05$) na uzyskanie 1 kg przyrostu masy ciała w okresie od 7. do 56. dnia życia (tab. 5). W grupach K oraz GT cielęta zużywały podobne ilości mieszanki treściwej, suchej masy pasz oraz JPM na uzyskanie kg przyrostu masy ciała, jak w pozostałych grupach ($P > 0,1$).

Cielęta z grupy MS w porównaniu do cieląt z grupy GT zużywały mniej białka ogólnego na uzyskanie kg przyrostu masy ciała w okresie od 7. do 56. dnia życia ($P \leq 0,05$) oraz w całym okresie doświadczenia (tendencja statystyczna $P \leq 0,1$).

Tabela 4. Średnie dzienne pobranie pasz i składników pokarmowych przez cieliczki
Table 4. Average daily intake of feed and nutrients by female calves

Wyszczególnienie Item	Grupy Groups				M	SEM	Poziom istotności różnic ¹ Level of statistical significance
	K	GT	GK	MS			
Liczebność Number of animals	6	6	6	6	24		
W okresie od 7. do 56. dnia życia: In the period from 7 to 56 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	0,37	0,36	0,38	0,37	0,37	0,01	ns
pójło (kg) liquid feed (kg)	6,92	6,90	6,88	6,94	6,91	0,02	ns
SM (kg)	1,15	1,14	1,16	1,16	1,15	0,05	ns
DM (kg)							
BO (g)	207b	226a	204b	203b	210	2,10	x
CP (g)							
BTJ (g)	178b	186a	175b	174b	178	1,19	x
PDI (g)							
JPM	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	0,01	ns
UFL							
W okresie od 57. do 90. dnia życia: In the period from 57 to 90 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	2,26	2,24	2,27	2,26	2,26	0,03	ns
SM (kg)	1,97	1,96	1,98	1,97	1,97	0,02	ns
DM (kg)							
BO (g)	373	379	372	373	374	4,24	ns
CP (g)							
BTJ (g)	251	246	251	251	250	2,81	ns
PDI (g)							
JPM	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	0,02	ns
UFL							
W okresie od 7. do 90. dnia życia: In the period from 7 to 90 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	1,14	1,12	1,15	1,14	1,14	0,01	ns
pójło (kg) liquid feed (kg)	4,13	4,14	4,15	4,13	4,14	0,01	ns
SM (kg)	1,48	1,47	1,49	1,49	1,48	0,01	ns
DM (kg)							
BO (g)	274 b	288 a	272 b	271 b	276	2,14	x
CP (g)							
BTJ (g)	207	211	206	205	207	1,17	ns
PDI (g)							
JPM	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0,01	ns
UFL							

¹ Średnia ogólna – Total mean.

² Błąd standardowy średniej – Standard error of the mean.

³ Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie x dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,05$ oraz t dla $P \leq 0,1$; brak statystycznie istotnych różnic ns dla $P > 0,1$ – Means in the rows marked with different letters differ significantly: x for a probability level of $P \leq 0.05$ and t for $P \leq 0.1$; no statistically significant differences (ns) for $P > 0.1$.

Tabela 5. Średnie zużycie pasz oraz składników pokarmowych na uzyskanie 1 kg przyrostu masy ciała przez cieliczki

Table 5. Average feed and nutrient utilization per kg weight gain by female calves

Wyszczególnienie Item	Grupy Groups				M ¹	SEM ²	Poziom istotności różnic ³ Level of statistical significance
	K	GT	GK	MS			
Liczebność Number of animals	6	6	6	6	24		
W okresie od 7. do 56. dnia życia: In the period from 7 to 56 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	0,87 ab	0,85 ab	0,94 a	0,83 b	0,87	0,02	t
pójło (kg) liquid feed (kg)	16,51	16,29	16,80	15,46	16,26	0,20	ns
SM (kg) DM (kg)	2,74 ab	2,69 ab	2,83 a	2,57 b	2,71	0,03	x
BO (g) CP (g)	494 ab	532 a	498 ab	451 b	494	7,76	x
BTJ (g) PDI (g)	424 ab	440 a	427 ab	386 b	419	5,84	x
JPM UFL	3,8 ab	3,7 ab	3,9a	3,6b	3,8	0,04	t
W okresie od 57. do 90. dnia życia: In the period from 57 to 90 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	2,77	2,71	2,73	2,73	2,74	0,05	ns
SM (kg) DM (kg)	2,41	2,37	2,39	2,38	2,38	0,04	ns
BO (g) CP (g)	456	459	448	449	453	7,75	ns
BTJ (g) PDI (g)	306	298	303	302	302	5,15	ns
JPM UFL	2,65	2,60	2,62	2,61	2,62	0,04	ns
W okresie od 7. do 90. dnia życia: In the period from 7 to 90 days of age:							
mieszanka treściwa (kg) concentrate mixture (kg)	1,95	1,91	1,98	1,88	1,93	0,02	ns
pójło (kg) liquid feed (kg)	7,12	7,05	7,13	6,83	7,03	0,05	ns
SM (kg) DM (kg)	2,55	2,50	2,57	2,46	2,52	0,03	ns
BO (g) CP (g)	472 ab	490 a	468 ab	449 b	470	5,60	t
BTJ (g) PDI (g)	357	359	354	338	352	3,69	ns
JPM UFL	3,1	3,1	3,2	3,0	3,1	0,03	ns

¹ Średnia ogólna – Total mean.² Błąd standardowy średniej – Standard error of the mean.³ Średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie x dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,05$ oraz t dla $P \leq 0,1$; brak statystycznie istotnych różnic ns dla $P > 0,1$ – Means in the rows marked with different letters differ significantly: x for a probability level of $P \leq 0,05$ and t for $P \leq 0,1$; no statistically significant differences (ns) for $P > 0,1$.

Omówienie wyników

Uzyskane wyniki wskazują, że maślan sodu wprowadzony do preparatu mleko-zastępczego oraz mieszanki treściwej w ilości $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy paszy poprawił przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz i składników pokarmowych na przyrost 1 kg masy ciała cieląt w okresie wychowu od 7. do 56. dnia życia. Podobny wpływ wzbogacenia w maślan sodu pasz podawanych cielętom obserwowali Gorka i in. (2009). W cytowanych badaniach wykazano, że suplementacja pasz w okresie wychowu od 5. do 26. dnia życia poprawiła ich dzienne przyrosty masy ciała w porównaniu do przyrostów charakteryzujących zwierzęta nieotrzymujące tego dodatku. Poprawie tej towarzyszył zarówno wzrost powierzchni chłonnej żwacza, określonej na podstawie pomiarów długości i szerokości brodawek żwaczowych, jak i wzrost jego masy, określonej na podstawie udziału masy żwaczo-czepca w masie całego żołądka. W badaniach prowadzonych przez Guilloteau i in. (2009) porównywano wskaźniki efektywności wychowu cieląt, a także wskaźniki rozwoju przewodu pokarmowego w zależności od wprowadzenia maślanu sodu lub antybiotykowego stymulatora wzrostu do składu pasz. Stwierdzono, że cielęta otrzymujące dodatek maślanu sodu charakteryzowało wyższe tempo wzrostu oraz niższe zużycie paszy na przyrost masy ciała w porównaniu do tych zwierząt, które otrzymywały antybiotyk. Autorzy wykazali, że poprawa wskaźników efektywności wychowu wynikała ze wzrostu produkcji enzymów zwiększających zdolności trawienne oraz wzrostu mikrostruktur w jelicie cienkim (długości kosmków oraz głębokości krypt jelitowych) zwiększających zdolności chłonne przewodu pokarmowego. Wydaje się, że uzyskana w naszych badaniach poprawa wskaźników efektywności wychowu cieląt otrzymujących pasze wzbogacone w maślan sodu wynikała z poprawy funkcjonowania ich przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki wskazują, że w późniejszym okresie wychowu (od 57. do 90. dnia życia), w okresie pobierania wyłącznie mieszanek treściwych, wprowadzenie maślanu sodu w wysokości $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy paszy nie poprawiło wskaźników efektywności wychowu. Wydaje się, że brak poprawy mógł wynikać z jego zbyt niskiej zawartości. W badaniach Ślusarczyk i in. (2010) wprowadzono dodatek maślanu sodu wysokości 3 g , 10 g lub $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ pasz do mieszanek treściwych podawanych cielętom od 9. do 90. dnia życia. Jednak tylko w grupie zwierząt otrzymujących dodatek w wysokości 30 g w porównaniu do otrzymujących 10 g lub 3 g stwierdzono poprawę zużycia mieszanki treściwej na przyrost masy ciała. Wyniki te sugerują, że w okresie podawania cielętom wyłącznie pasz stałych, zawartość maślanu sodu może decydować o jego skuteczności. Wyniki badań potwierdziły hipotezę, że w żywieniu cieląt wzbogacenie pasz w maślan sodu poprawia przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz i składników pokarmowych na uzyskany przyrost w okresie od 7. do 56. dnia życia.

W prezentowanych badaniach uzyskano wyniki wskazujące, że wprowadzenie do składu pasz glutaminy w wysokości $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ SM lub podobnej ilości glukozy nie wpłynęło na wskaźniki efektywności wychowu cieląt. Glutamina jest ważnym substratem przemian metabolicznych przewodu pokarmowego, a większość (powyżej 50%) dostarczonej dojelitowo glutaminy wykorzystywana jest przez tkanki jelita (Janeczko i in., 2007; Burrin i Stoll, 2009). W badaniach przeprowadzonych na prosię-

tach Wu i in. (1996) wykazali, że wprowadzenie do składu pasz dodatku glutaminy w wysokości $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ SM pasz poprawiło właściwości chłonne jelita cienkiego, a zmianom tym towarzyszyła poprawa przyrostów masy ciała oraz zużycia pasz na uzyskiwane przyrosty. Jednak w badaniach z udziałem cieląt nie potwierdzono tej zależności (Drackley i in., 2006). Mimo poprawy zdolności chłonnych jelita cienkiego nie nastąpiła poprawa przyrostów masy ciała. Na podstawie uzyskanych wyników Drackley i in. (2006) sugerują, że w żywieniu cieląt dodatek glutaminy w wysokości $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ może być zbyt niski, aby równocześnie poprawił funkcjonowanie przewodu pokarmowego oraz przyrosty masy ciała. Wydaje się, że określenie optymalnej ilości glutaminy wprowadzonej do pasz podawanych cielętom we wczesnym okresie wychowu pozostaje zagadnieniem czekającym na rozwiązanie. Podobnie jak dodatek glutaminy również dodatek glukozy nie poprawił wskaźników efektywności wychowu zwierząt doświadczalnych. Komórki śluzówki przewodu pokarmowego przeżuwaczy intensywnie pobierają glukozę z treści pokarmowej w celu pokrycia potrzeb własnego metabolizmu (Aschenbach i in., 2000 a, b). Wprowadzony w naszych badaniach dodatek glukozy prawdopodobnie w całości został wykorzystany na pokrycie potrzeb energetycznych przewodu pokarmowego.

Wyniki badań nie potwierdziły hipotezy, że wzbogacenie pasz w glutaminę lub glukozę poprawia przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz i składników pokarmowych na 1 kg przyrostu masy ciała cieląt.

Podsumowując wyniki przedstawionego doświadczenia, można stwierdzić, że wzbogacenie preparatów mlekozastępczych oraz mieszanek treściwych podawanych cielętom w okresie od 7. do 56. dnia życia w maślan sodu w ilości $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy paszy, poprawia przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz i składników pokarmowych na przyrost 1 kg masy ciała cieląt. Dodatki glutaminy a także glukozy, stosowane w ilościach $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ SM pasz nie wpływają na wskaźniki efektywności wychowu cieląt.

Uzyskane wyniki sugerują, że maślan sodu może znaleźć zastosowanie jako dodatek do pasz podawanych cielętom.

Piśmiennictwo

- Aschenbach J.R., Bhatia S.K., Pfannkuche H., Gäbel G. (2000 a). Glucose is absorbed in sodium dependent manner from forestomach contents of sheep. *J. Nutr.*, 30: 2797–2000.
- Aschenbach J.R., Wehning H., Kurze M., Schaberg E., Nieper H., Burckhardt G., Gäbel G. (2000 b). Functional and molecular biological evidence of SGLT-1 in the ruminal epithelium of sheep. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 279: G20–G27.
- Burrin D.B., Stoll B. (2009). Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, 9 (Suppl.) 90: 850S–856S.
- Drackley J.K., Blome R.M., Bartlett K.S., Bailey K.L. (2006). Supplementation of 1% L-glutamine to milk replacer does not overcome the growth depression in calves caused by soy protein concentrate. *J. Dairy Sci.*, 89: 1688–1693.
- Gill M., France J., Summers M., McBride B.W., Milligan L. P. (1989). Simulation of the energy costs associated with protein turnover and Na^+ , K^+ - transport in growing lambs. *J. Nutr.*, 119: 1287–1299.
- Gorka P., Kowalski Z.M., Pietrzak P., Kotunia A., Kiljanczyk R., Flaga J., Holst J.J., Guilloteau P., Zabielski R. (2009). Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J. Physiol. Pharmacol.*, 60, (Suppl.) 3: 47–53.

- Guilloteau P., Zabielski R., David J.C., Blum W.J., Morisset J.A., Biernat M., Woliński J., Laubitz D., Hamon Y. (2009). Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. *J. Dairy Sci.*, 92: 1038–1049.
- Janecko M.J., Stoll B., Chang X., Guan X., Burrin D.G. (2007). Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. *J. Nutr.*, 137: 2384–2390.
- McBride B.W., Kelly J.M. (1990). Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. *J. Anim. Sci.*, 68: 2997–3010.
- Okine E.K., Glimm D.R., Thompson J.R., Kennelly J.J. (1995). Influence of stage of lactation on glucose and glutamine metabolism in isolated enterocytes from dairy cattle. *Metabolism*, 44: 325–331.
- Ślusarczyk K., Strzetelski J.A., Furgał-Dierżuk I. (2010). The effect of sodium butyrate on calf growth and serum level of β -hydroxybutyric acid. *J. Anim. Feed Sci.*, 19: 348–357.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583–3597.
- Wu G., Meier S.A., Knabe D.A. (1996). Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *J. Nutr.*, 126: 2578–2584.

Zatwierdzono do druku 21 VI 2011

BARBARA NIWIŃSKA, EWA HANCZAKOWSKA, KAROL WĘGLARZY

The effectiveness of rearing calves receiving diets enriched with glutamine, glucose or sodium butyrate

SUMMARY

The aim of this study was to analyse the effects of supplementing calf diets with glutamine, glucose or sodium butyrate on body weight gains and on feed and nutrient utilization during the liquid feeding period (from 7 to 56 days of age) and when solid feeds were provided (from 57 to 90 days of age). Polish Holstein-Friesian female calves (7 days old) allocated to 4 groups ($n = 6$) were fed milk replacers and concentrate mixtures: unsupplemented in the control group (K), supplemented with glutamine ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of dry matter, DM) in the GT group, supplemented with glucose ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM) in the GK group, and supplemented with sodium butyrate ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, DM) in the MS group. The nutritive value of the diets and the feeding programme conformed with the standards (IZ PIB-INRA, 2009).

The calves receiving MS diet were characterized by higher daily weight gains both in the liquid feeding period ($P \leq 0.05$) and in all experimental periods (statistical trend at $P \leq 0.1$) as compared to those receiving other diets. During the liquid feeding period calves receiving MS diet in comparison with calves fed GK diet utilized lower (statistical trend at $P \leq 0.1$) amounts of concentrate and energy and lower amounts of feed dry matter ($P \leq 0.05$) per kg of body weight gain. Glutamine or glucose supplements, added in amounts of $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM did not have a significant influence on rearing performance. The results obtained indicate that the addition of sodium butyrate improved body weight gains and feed and nutrient utilization, and this effect was statistically significant during the liquid feeding period.

Key words: calves, rearing efficiency, sodium butyrate, glutamine, glucose

WPLYW ZASTOSOWANIA PŁYNNEGO ZAKWASZACZA Z MIESZANKĄ TYPU PRESTARTER NA WYNIKI ODCHOWU PROSIĄT

Marek Rajchert, Paweł Gajewczyk, Edyta Płazak

Uniwersytet Przyrodniczy, Zakład Hodowli Trzody Chlewniej, ul. Chelmońskiego 38 C,
51-630 Wrocław

Celem przeprowadzonego doświadczenia było zbadanie wpływu dodawania zakwaszacza do pełnoporcjowej mieszanki paszowej typu prestarter dla prosiąt ssących na poprawę ich wyników odchowu. Eksperyment przeprowadzono w fermie przemysłowej, której stado podstawowe składało się z 1170 loch. W doświadczeniu wzięto pod uwagę 20 miotów, które podzielono na dwie grupy: kontrolną i doświadczalną, w każdej po 10 miotów. Czas trwania doświadczenia wyniósł 20 dni. Prosięta z grupy kontrolnej przez cały okres trwania eksperymentu, od 7. do 28. dnia życia, otrzymywały paszę bez dodatku czynnika doświadczalnego. Prosięta z grupy doświadczalnej przez 20 dni otrzymywały dodatek zakwaszacza naturalnego wraz z mieszanką paszową, z tym że przez okres 10 dni dawka zakwaszacza wynosiła 15% w stosunku do masy paszy, a po 10 dniach została zwiększona do 30%. Uzyskane wyniki badań wskazują, że zakwaszacz mógł korzystnie wpłynąć na smakowitość podawanej mieszanki paszowej dla prosiąt, co miało przełożenie na zwiększenie pobrania paszy w grupie doświadczalnej aż o 112% w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono również, że zastosowany dodatek paszowy miał wpływ na zmniejszenie upadków osesków o 45% w okresie trwania doświadczenia oraz na uzyskanie wyższych o 15,7% przyrostów dobowych masy ciała prosiąt. Zakwaszacz naturalny w sposób istotny pozytywnie wpłynął na wielkość spożycia paszy oraz ograniczenie upadków prosiąt.

Jeszcze kilkadziesiąt lat temu powszechnie odsadzano prosięta od loch pomiędzy 42. a 56. dniem ich życia. W wielu krajach zaczęto stosować wczesne odsadzanie prosiąt w wieku 21 i 28 dni, a w USA nawet w wieku 14 i 16 dni (Cromwell, 1995). Prawdą jest, że im wcześniej prosięta zostaną odsadzone, tym mniejsze jest obciążenie maciory podczas laktacji. Ma to szczególne znaczenie u loch wysokomlecznych, gdyż pozwala na zachowanie dobrej kondycji hodowlanej i przez to wpływa korzystnie na zaoszczędzenie paszy, którą należałoby przeznaczyć na jej poprawę.

Skracanie okresu laktacji z 56 do 28 dni wpłynęło na zwiększenie liczby urodzonych miotów od lochy w ciągu roku, szacunkowo o 20%, co potwierdzono w literaturze (Bolduan i in., 1990; Cromwell, 1995; Kirchgessner i Roth, 1982; Korniewicz i in., 1996). Skracanie laktacji poniżej 3 tygodni ma jednak negatywne skutki

ze względu na wydłużający się okres jałowienia, na zmniejszenie skuteczności krycia loch oraz na pogorszenie się wyników odchowu prosiąt.

Ze względu na krótki czas przebywania osesków z matką zachodzi potrzeba podawania im łatwo strawnej paszy już w pierwszych dniach życia. Wiąże się to z racjonalnym wykorzystaniem loch w laktacji oraz szybszym przyzwyczajeniem się prosiąt do pobierania pasz stałych i dobrym ich wykorzystaniem, przy jednoczesnym zmniejszeniu zaburzeń, przede wszystkim na tle pokarmowym. Prosięta przed odsadzeniem powinny mieć normalnie rozwinięty przewód pokarmowy, aby mogły w pełni wykorzystać składniki odżywcze zawarte w pobieranej przez nie paszy.

W poprawie odchowu prosiąt sama mieszanka pełnoporcjowa bez dodatków nie spełni oczekiwań. Mieszanki dla prosiąt w swoim składzie zawierają komponenty wysokobiałkowe o odczynie alkalicznym, wykazujące się wysoką buforowością. Spożywanie paszy o takich właściwościach przez prosięta powoduje alkalizację żołądka, a tym samym wzrost wartości pH jego treści powyżej krytycznego poziomu 4. Zmieniająca się kwasowość treści żołądka hamuje aktywność pepsyny, głównego enzymu odpowiedzialnego za rozkład białka. Żołądek najlepiej spełnia swoją funkcję przy utrzymującym się pH od 2,5 do 3 (Eckel i in., 1992; Blank i in., 1998). Negatywnym efektem bardzo niskiej kwasowości jest hamowanie rozwoju bakterii o charakterze dobroczynnym oraz możliwość rozwoju chorobotwórczej mikroflory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym. Obecność tych patogenów, a szczególnie wydzielanie przez nich toksyn powoduje uszkodzenie nabłonka jelitowego, w tym też zmniejszenie wchłaniania wody, co w rezultacie prowadzi do pojawienia się biegunek. Prosięta same nie potrafią zniwelować negatywnego skutku działania paszy. Do 8. tygodnia życia produkcja kwasu solnego w żołądku prosiąt jest ograniczona. Wydzielanie HCl w żołądku u 3–4 tygodniowego prosięcia wystarcza na strawienie jedynie 60% pobranej paszy (Blank i in., 1998). Dopiero po upływie około 8. tygodnia życia kwasowość treści żołądka prosiąt stabilizuje się (Pejsak, 2007).

Przewód pokarmowy kilkudniowych osesków nie jest jeszcze przystosowany do pobierania paszy. W związku z wczesnym odsadzaniem prosięta należy szybko przyzwyczajać do pobierania paszy. W celu ograniczenia negatywnych skutków działania paszy w przewodzie pokarmowym, a tym samym uzyskania poprawnych wyników odchowu prosiąt wcześniej odsadzanych stosuje się różne dodatki paszowe.

Kwasy uzyskane bezpośrednio z roślin oraz na drodze fermentacji należą do ekologicznych oraz bezpiecznych dodatków paszowych w żywieniu prosiąt. Najczęściej są to kwasy: mlekowy, octowy, propionowy, sorbowy i cytrynowy. Zakwaszaczki dostępne są w postaci stałej lub płynnej. Preparaty te mają właściwości konserwujące oraz ograniczają i zapobiegają rozwojowi szkodliwej dla organizmu mikroflory. Uczestniczą one w regulacji procesów trawiennych oraz działają stabilizująco na mikroflorę przewodu pokarmowego poprzez zmianę odczynu pH. Przy ich zastosowaniu obniżeniu ulega także poziom toksycznego amoniaku i amin biogennych w jelicie cienkim, przyczyniając się do polepszenia wchłaniania białek i tłuszczów. Dodatek kwasów organicznych wpływa także korzystnie na gospodarkę mineralną prosiąt (Kirchessner i Roth, 1982).

Zasadniczym problemem w wielkostadnym chowie świń jest walka z ograniczeniem upadków poprzez poprawę vitalności prosiąt, co ma związek z uzyskaniem optymalnych wyników ich odchowu.

Dysponując fermą o odpowiedniej obsadzie loch (1300 sztuk) można było wykonać w tym samym czasie eksperyment na 20 miotach prosiąt ssących wybranych losowo z grupy technologicznej liczącej 44 mioty. W tym eksperymencie chodziło o zastosowanie w odchowu prosiąt ssących zakwaszacza w formie płynnej, uzyskanego na drodze naturalnej fermentacji. Celem realizowanego eksperymentu było zbadanie skuteczności oddziaływania naturalnego zakwaszacza podawanego w ilości 15 i 30% w stosunku do zadawanej codziennie porcji masy paszy.

Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzone zostało w fermie trzody chlewnej w województwie dolnośląskim. Badania przeprowadzono w dniach od 10.07.2008 do 31.07.2008.

Produkcja trzody chlewnej w fermie była realizowana w systemie otwartym (produkcja finalna – warchlaki), przy zachowaniu zasady: „całe pomieszczenie pełne; całe pomieszczenie puste”. Grupy technologiczne loch tworzone w siedmiodniowym rytmie produkcji. Liczba loch w grupie technologicznej w dniu porodu wynosiła 44 sztuki i zasiedlała jedną porodówkę. Z kolei potomstwo tej grupy loch tworzyło nową grupę technologiczną prosiąt w fazie laktacji. Po ukończeniu laktacji, w 28. dniu życia prosięta przechodziły do odchowalni warchlaków.

Kojce porodowe wyposażone były w płyty grzewcze oraz promienniki podczerwieni. W strefie kojca wydzielonej dla prosiąt znajdowały się poidła smoczkowe i miseczki do zadawania paszy. Podczas prowadzenia badań karmniki dla prosiąt były każdorazowo opróżniane z niedojadów i czyszczone. Wentylacja w pomieszczeniach była typu mechanicznego, regulowana przez automatyczny sterownik. Wentylatory i okna umieszczone były tylko w jednej ze ścian bocznych. Wylot zużytego powietrza odbywał się poprzez kominy wywiewne znajdujące się w suficie budynku.

Średnia temperatura w porodówce podczas doświadczenia wynosiła 23,7°C, a temperatura zewnętrzna kształtowała się średnio na poziomie 25,5°C.

Materiał doświadczalny stanowiły prosięta z 20 miotów, które podzielono na 2 grupy po 10 miotów w każdej. Przynależność miotów do grup uzależniona była od masy prosiąt ważonych w grupie technologicznej w 6. dniu życia. Wybór 20 spośród 44 miotów odbył się na podstawie uzyskanych wyników ważenia prosiąt. W tabeli 1 przedstawiono liczebność i średnią masę miotu oraz pojedynczego prosięcia w 6. dniu życia.

Obie grupy zwierząt żywione były granulowanymi mieszankami pełnoporcjowymi pasz treściwych. Zadawanie paszy lochom w porodówkach odbywało się ręcznie do koryt. W pierwszym dniu po porodzie otrzymywały 2,5 kg paszy, w drugim 5 kg. Przez pozostały okres laktacji lochy były żywione do woli, z tym że w ostatnim tygodniu z ograniczeniem. Skład i wartość pokarmową paszy dla loch objętych doświadczeniem przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1 . Materiał doświadczalny
Table 1. Experimental material

Wyszczególnienie Item	Masy miotów (kg) Litter weight (kg)	Liczba prosiąt w grupie (szt) Number of piglets in group (head)	Średnia masa ciała prosięcia (kg) Average weight of piglet (kg)
Grupa kontrolna Control group	249,80	113	2,21
Grupa doświadczalna Experimental group	228,70	101	2,26

Tabela 2. Skład i wartość pokarmowa mieszanek dla loch
Table 2. Composition and nutritional value of diets for sows

Lp. No.	Wyszczególnienie Item	Jednostki miary Units	Mieszanka LK All mash LK
1.	Komponenty: Components: Śruty Ground		
	pszenna wheat	%	5
	jęczmienna barley	%	25
	z pszenżyta triticale	%	10
	żytnia rye	%	25
	Otręby pszenne Wheat bran	%	10
	Koncentrat „locha prośna” “Pregnant sow” concentrate	%	25
2.	Wartość pokarmowa w 1 kg: Nutritive value of 1 kg mixture:		
	Białko ogólne Crude protein	%	15,5
	Energia metaboliczna Metabolizable energy	MJ	12,8
	Włókno surowe Crude fibre	%	7
	Lizyna Lysine	%	0,83
	Met. + cyst. Met. + cyst.	%	0,53
	Ca	%	0,95
	P	%	0,75
	Na	%	0,20

Mleko lochy stanowi podstawowy pokarm dla prosiąt od urodzenia aż do ich odsadzenia. W fermie, prosiętom od 7. dnia życia aż do odsadzenia w wieku 28 dni podawano do woli mieszankę paszową pełnoporcjową typu prestarter. W grupach kontrolnej i doświadczalnej oseski dokarmiano taką samą paszą prestarter. Skład i wartość pokarmową paszy przedstawiono w tabeli 3. Mioty z grupy doświadczalnej oprócz paszy treściwej otrzymywały codziennie dodatek zakwaszacza naturalnego.

Tabela 3. Wartość pokarmowa 1 kg mieszanki pełnoporcjowej typu prestarter
 Table 3. Nutritive value of 1 kg all-mash prestarter

Wyszczególnienie Item	Jednostki miary Units	Wartość Value
Energia metaboliczna Metabolizable energy	MJ	14,20
Białko ogólne Crude protein	%	19,50
Tłuszcz surowy Crude fat	%	7,60
Włókno surowe Crude fibre	%	2,70
Popiół Ash	%	5,00
Ca	%	0,76
P	%	0,60
Na	%	0,25
Lizyna Lysine	%	1,40
Metionina z cystyną Met.+cyst.	%	0,50
Witamina A Vitamin A	j.m.- i.u.	200000
Witamina D ₃ Vitamin D ₃	j.m.- i.u.	2000
Witamina E Vitamin E	mg	80
Siarczan miedzi Copper sulphate	mg	165

Czynnikiem doświadczalnym w tym eksperymencie był zakwaszacz naturalny w postaci płynnej. Nazwa zakwaszacza i jego skład chronione są prawami autorskimi. Dawka zakwaszacza przez pierwsze 10 dni eksperymentu stanowiła objętościowo 15% mieszanki paszowej (I okres żywieniowy). Po upływie tego czasu dawkę preparatu zwiększono dwukrotnie do poziomu 30% podawanej masy mieszanki paszowej (II okres żywieniowy). Taki poziom zakwaszacza stosowano do zakończenia doświadczenia. Zakwaszacz był podawany do karmideł razem z paszą.

W 6. dniu życia prosiąt każdy miot został zważony na wadze elektronicznej o maksymalnym obciążeniu do 50 kg. Codziennie rano, przez cały okres doświadczenia, z karmideł dla prosiąt zbierane były niedojady paszy z dnia poprzedniego, które suszono, a następnie ważono. Świeżą porcję paszy wsypywano do karmników, a w grupie doświadczalnej dodatkowo zalewano zakwaszaczem. Dawki podawanej paszy i niedojady były ważone na wadze elektronicznej o maksymalnym obciążeniu 1000 g. W ostatnim dniu badań (28. dzień życia prosiąt) każdy z miotów zważony był na wadze o dopuszczalnym obciążeniu do 100 kg.

Średnią temperaturę w pomieszczeniach oceniono na podstawie odczytu wartości ze sterownika o godzinie 9 rano i 15 po południu. Każdego dnia, przez cały okres doświadczenia prowadzono obserwację prosiąt.

Dane zbierane w czasie doświadczenia:

- masa ciała początkowa (6. dzień życia prosiąt) i końcowa miotów (28. dzień życia prosiąt),
- liczebność prosiąt w miocie w 6. i 28. dniu życia,
- dzienne spożycie paszy przez mioty w grupach,
- temperatura w porodówce i na zewnątrz budynku.

W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji i test Duncana. Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 6,0.

Wyniki

W tabeli 4 dokonano porównania średnich wartości badanych cech w obu grupach. Łączna liczba prosiąt w 1. dniu rozpoczęcia eksperymentu (6. dzień życia) wynosiła 214 szt., a odsadzonych w 28. dniu życia 190 szt. Średnia liczebność prosiąt w miocie w grupie kontrolnej w dniu rozpoczęcia doświadczenia była na poziomie 11,3 szt. Średnia liczba prosiąt w miocie w grupie doświadczalnej liczyła mniej, bo 10,1 prosięcia. Różnica między średnimi z grup pod względem liczebności prosiąt w miocie w dniu rozpoczęcia doświadczenia wynosiła 1,20 osobnika na korzyść grupy kontrolnej.

Zasadniczą przyczyną zejść śmiertelnych prosiąt były biegunki. W grupie kontrolnej suma padłych prosiąt podczas eksperymentu wynosiła 16 szt., co stanowiło 14,2% w stosunku do liczby prosiąt ustalonych w 6. dniu życia, a w grupie doświadczalnej suma padłych zwierząt w czasie doświadczenia wynosiła już tylko 8 szt., co stanowiło 7,9% (tabela 4). Największe nasilenie upadków prosiąt w grupie kontrolnej zanotowano w pierwszym tygodniu trwania eksperymentu, co w stosunku do wszystkich strat osobników w grupie stanowiło aż 62,5%. Tak więc w grupie doświadczalnej było o 44,4% mniej upadków prosiąt w porównaniu do grupy kontrolnej (tabela 4). Stwierdzone różnice między upadkami w grupach były statystycznie udowodnione ($P \leq 0,05$). Można sądzić, że czynnik doświadczalny, jakim był zakwaszacz miał istotny wpływ na poprawny przebieg trawienia, a tym samym na witalność prosiąt już po 7. dniu jego stosowania.

W grupie kontrolnej średnia liczebność prosiąt w miocie na koniec doświadczenia wynosiła 9,7 prosięcia, a w doświadczalnej 9,3 (tabela 4).

W dniu rozpoczęcia eksperymentu masa osobników w grupie kontrolnej kształtowała się średnio na poziomie 2,21 kg (tabele 1 i 4). Średnia masa ciała osobnika w grupie doświadczalnej wynosiła 2,26 kg (tabele 1 i 4).

Średnie dzienne przyrosty masy ciała prosięcia w grupie kontrolnej były na poziomie 236 g. Średni dzienny przyrost masy ciała prosięcia w grupie doświadczalnej wyniósł 262 g (tabela 4). Różnica w przyrostach masy ciała wynosiła 11%. Analiza statystyczna nie potwierdziła istotności tej różnicy. W ostatnim dniu doświadczenia średnia masa prosięcia z grupy kontrolnej wynosiła 6,92 kg, a w grupie doświadczalnej 7,50 kg (tabela 4). W odniesieniu do końcowej masy ciała prosiąt odnotowano różnicę 8,4%.

Tabela 4. Wskaźniki odchowu prosiąt
Table 4. Rearing parameters of piglets

Wyszczególnienie Item	Jednostka miary Units	Grupy – Groups		Istotność różnic Significance of	SEM
		kontrolna control	doświadczalna experimental		
Ilość prosiąt Number of piglets	szt./head	113	101		
Masa miotu w dniu rozpoczęcia doświadczenia Initial litter weight	kg	24,98	22,87	ns	0,211
Średnia liczba prosiąt w miocie w 6. dniu życia Average number of piglets in farrow on day 6 of age	szt./head	11,30	10,10	*	0,126
Średnia masa prosięcia na początku doświadczenia Average initial body weight of piglet	kg	2,21	2,26	ns	0,036
Masa miotu po 20 dniach do- świadczenia Weight of litter at 20 days of experiment	kg	67,10	69,79	ns	0,336
Liczba prosiąt w miocie w 20. dniu doświadczenia Number of piglets in farrow at 20 days of experiment	szt./heads	9,70	9,30	ns	0,133
Upadki prosiąt Piglet mortality	szt./% heads/%	16/14,2	8/ 7,9	*	0,089
Masa ciała prosięcia w miocie w 20. dniu Body weight of piglet in farrow at 20 days of experiment	kg	6,92	7,50	ns	0,075
Średni dzienny przyrost masy ciała prosięcia Average daily gain of piglet	g	236	262	ns	0,325

*Różnica statystyczna przy $P \leq 0,05$.*Significant difference at $P \leq 0,05$.

Na samym początku przedstawienia wyników spożycia paszy należałoby wyjaśnić, dlaczego w grupie doświadczalnej w pierwszym dniu dokarmiania wystąpił wynik ujemny $-0,14$ (wykres 1). Obserwując zachowanie prosiąt w pierwszym dniu zauważono, że w niektórych miotach osobniki oddawały kał i mocz do paszy, co miało wpływ na masę wyważanych niedojadów. W następnych dniach prowadzenia badań nie zaobserwowano takiego zachowania prosiąt.

W pierwszym okresie żywieniowym średnie spożycie paszy przez prosię w grupie kontrolnej kształtowało się na poziomie 1,6 g dziennie. W pierwszym dniu eksperymentu pobranie karmy w przeliczeniu na 1 prosię wynosiło 0,17 g, a w ostatnim dniu pierwszego okresu żywieniowego (10 dni) 4,98 g (wykresy 1 i 3). Średnie pobranie paszy (za okres 10 dni) przez prosię z grupy doświadczalnej wyniosło 2,4 g w przeliczeniu na dzień, a w grupie kontrolnej 1,64 g (tabela 5). W pierwszym dniu

doświadczenia spożycie paszy w grupie z dodatkiem zakwaszacza kształtowało się na poziomie $-0,14$ g, a w 10. dniu wyniosło już $6,32$ g w przeliczeniu na 1 prosię (wykresy 1 i 3).

Tabela 5. Wyniki kontroli spożycia paszy przez prosięta od 6. do 28. dnia życia
Table 5. Results of recording feed intake by piglets from 6 to 28 days of age

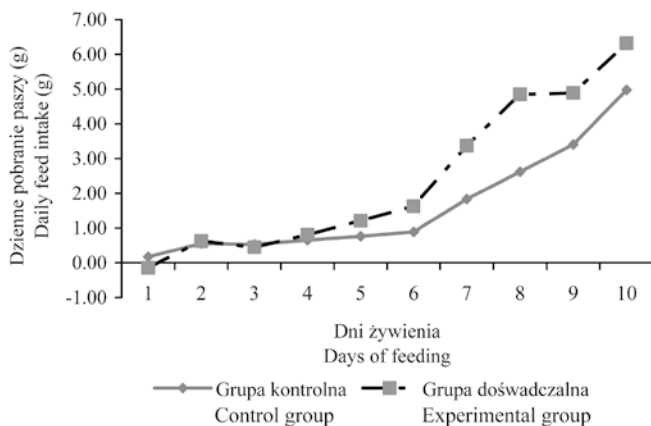
Wyszczególnienie Item	Jednostka miary Units	Grupy – Groups		Istotność różnic Significance of differences	SEM
		kontrolna control	doświadczalna experimental		
Średnie dobowe pobranie paszy przez miot Average daily feed intake by the litter	g	52,03	103,80	**	4,310
Średnie pobranie paszy w przeliczeniu na 1 prosię Average feed intake per piglet	g	5,19	11,03	**	0,584
Średnie pobranie paszy przez 1 prosię w I okresie eksperymentu Average feed intake per piglet in the first period of experiment	g	1,64	2,40	*	0,016
Średnie pobranie paszy przez 1 prosię w II okresie badań Average feed intake per piglet in the second period of experiment	g	8,75	19,67	**	0,365

** – Różnice statystycznie wysokoistotne przy $P \leq 0,01$. Statistically significant differences at $P \leq 0,01$.

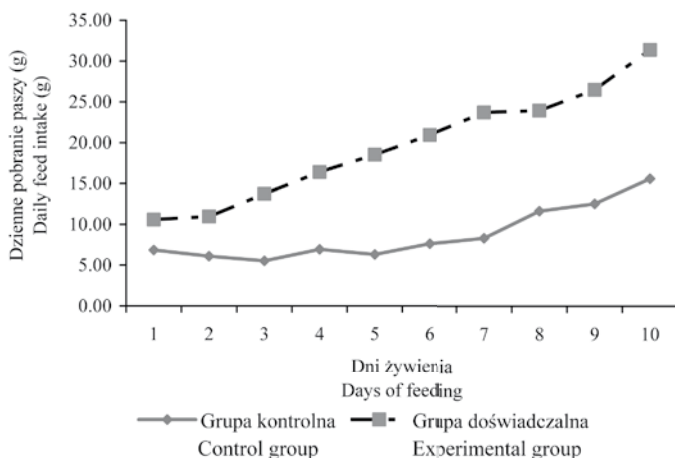
* – Różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$. Statistically significant differences at $P \leq 0,05$.

Tak więc w grupie kontrolnej w pierwszej dekadzie trwania doświadczenia średnie spożycie paszy przez 1 prosię było o $46,4\%$ mniejsze w porównaniu z grupą doświadczalną. Wykres 1 przedstawia kształtowanie się pobrania karmy w pierwszym okresie żywieniowym od 1. do 10. dnia. Spożycie paszy w obydwu grupach przez 4 dni trwania doświadczenia było na podobnym poziomie. Może to wynikać z faktu, że przez pierwsze dni prosięta oswajały się z paszą i uczyły się jej pobierania. Od 5. dnia eksperymentu do jego zakończenia różnice między grupami pod względem spożycia paszy były widoczne. W grupie doświadczalnej odnotowano wyraźnie większe spożycie paszy przez prosięta. Można przypuszczać, że większe pobranie paszy przez mioty doświadczalne było skutkiem podawania im zakwaszacza.

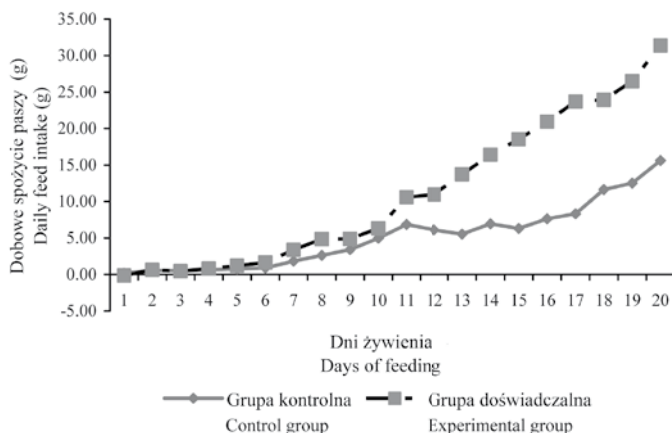
W drugim okresie żywieniowym (od 11. do 20. dnia) średnie dzienne pobranie karmy przez prosię w populacji z grupy kontrolnej wynosiło $8,75$ g (wykresy 2 i 3). W 11. dniu żywienia spożycie paszy przez prosięta z grupy kontrolnej było na poziomie $6,86$ g, natomiast w ostatnim dniu doświadczenia zwiększyło się do $15,61$ g (wykresy 2 i 3). W grupie doświadczalnej, w drugim okresie żywieniowym średnia dzienna konsumpcja paszy w przeliczeniu na prosię osiągnęła poziom $19,67$ g (tabela 5). W pierwszym dniu drugiego okresu żywieniowego średnie dzienne pobranie mieszanki prestarter w grupie doświadczalnej wyniosło $10,59$ g, natomiast w ostatnim dniu doświadczenia było już na poziomie $31,37$ g (wykresy 2 i 3).



Rys. 1. Dziennie spożycie mieszanki prestarter w pierwszym okresie doświadczenia w przeliczeniu na 1 prosię
 Fig. 1. Daily intake of prestarter mixture per piglet in the first period of experiment



Rys. 2. Dziennie spożycie mieszanki prestarter w drugim okresie doświadczenia w przeliczeniu na 1 prosię
 Fig. 2. Daily intake of prestarter mixture per piglet in the second period of experiment



Rys. 3. Średnie dzienne spożycie mieszanki prestarter przez 1 prosię w okresie przeprowadzonego doświadczenia

Fig. 3. Average daily consumption of prestarter mixture by piglet throughout the experimental period

Pomiędzy 11. a 20. dniem trwania doświadczenia między grupami wystąpiły znaczne różnice w pobraniu paszy. Najwięcej paszy, bo aż o 125% pobrały oseski z grupy doświadczalnej (tabela 5, wykresy 1, 2 i 3). Średnie spożycie paszy przez prosię w drugim okresie badań w grupie doświadczalnej było o 86% większe w porównaniu z grupą kontrolną. Różnica ta okazała się statystycznie wysoko istotna ($P \leq 0,01$).

Średnie spożycie paszy w przeliczeniu na 1 prosię w grupie kontrolnej w całym okresie badań kształtowało się na poziomie 5,19 g, natomiast w grupie doświadczalnej na poziomie 11,03 g (tabela 5).

Na podstawie danych z wykresu 3 można stwierdzić, że prosięta pobierające prestarter z dodatkiem zakwaszacza charakteryzowały się bardziej ustabilizowanym pobieraniem paszy z dnia na dzień. W drugim okresie badań w grupie tej nie było większych odchyleń w pobraniu paszy, tak jak to miało miejsce w grupie kontrolnej.

Omówienie wyników

Uzyskane wyniki wyraźnie dowodzą, że płynny zakwaszacz dodawany do mieszanki prestarter w ilościach 15% (I faza) i 30% (II faza) spowodował uzyskanie korzystnych wyników w odchowcie prosiąt. Odnotowano o 44,4% niższe upadki prosiąt w porównaniu z grupą kontrolną. Najczęstszą przyczyną upadków prosiąt były biegunki. W innych doświadczeniach przeprowadzonych przez Poznańskiego i in. (1997) oraz Kamyczka i Kujawiaka (1999) wykazano, że przy zastosowaniu w odchowcie prosiąt węgla brunatnego i kwasów organicznych oraz zakwaszacza SanoCid upadki osesków zmniejszyły się o ponad 50%. Batorska i Mieńkowska-Stępniewska (2000), używając Aciprolu oraz CAF uzyskały również o połowę mniejsze upadki osesków w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. W badaniach przeprowadzonych przez Fuhsa i in. (1998), nie odnotowano wogóle upadków prosiąt, dokarmianych paszą z dodatkiem kwasu fumarowego oraz Agracidu. Z kolei Urbańczyk i Hanczakowska (1995) uważają, że wprowadzenie kwasu fumarowego do mieszanki dla prosiąt nie wywiera wyraźnego wpływu na ograniczenie ich śmiertelności. Chociaż zdania na ten temat są podzielone, to jednak większość badaczy uważa, że podanie zakwaszaczy do pasz w sposób wyraźny ogranicza upadki prosiąt.

Średnie dzienne przyrosty masy ciała prosiąt w grupie doświadczanej w porównaniu z kontrolną były o 11,5% wyższe. W doświadczeniu wykonanym przez Korniewicza (2004) wykazano pozytywny wpływ zakwaszacza chronionego na przyrosty masy ciała prosiąt. Stwierdzono poprawę wartości średnich dziennych przyrostów prosiąt o 10,7%. Rewelacyjne wyniki w tym zakresie uzyskali Eckel i in. (1992) dodając 1,2% kwasu mrówkowego do paszy. Przyrosty prosiąt były o 22% wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Urbańczyk i Hanczakowska (1995) stosując dodatek kwasu fumarowego w odchowcie prosiąt odnotowali poprawę przyrostów masy ciała o 7,5%. Kamyczek i Kujawiak (1999) stwierdzili, że zastosowanie preparatu SanoCid przyczyniło się do zwiększenia masy ciała prosiąt o 5,5%. Zdaniem Korniewicza i in. (1996) dodanie dostępnych na naszym rynku zakwaszaczy powoduje zwiększenie przyrostów masy prosiąt o około 10%. Fuchs i in. (2003) stosując dodatek kwasu cytrynowego do paszy w ilości 0,5% uzyskali zwiększenie tempa wzrostu prosiąt o 5%, a dodanie kwasu

cytrynowego do paszy w ilości 4,5% przyczyniło się do wzrostu średnich dobowych przyrostów masy ciała prosiąt nawet o 20%.

Zastosowanie w badaniach własnych płynnego zakwaszacza spowodowało wzrost spożycia paszy przez prosięta. Biorąc pod uwagę 2 okresy żywieniowe związane z użyciem czynnika doświadczalnego widać wyraźnie, że w porównaniu z grupą kontrolną wzrost pobrania paszy przez prosięta w grupie doświadczalnej był bardzo widoczny.

W pierwszym okresie eksperymentu była to różnica 46,3%, a w drugim już prawie 124,8%. W przeliczeniu całego okresu badań wzrost spożycia paszy w grupie doświadczalnej w porównaniu z kontrolną był o 112% większy. Fakt pozytywnego oddziaływania zakwaszacza na wzrost i rozwój prosiąt potwierdzają wyniki badań uzyskane przez Korniewicza i in. (1990) oraz Korniewicza (2004). W doświadczeniach tych, prosięta które otrzymywały w mieszance dodatek zakwaszacza pobierały do 12% więcej paszy, co korzystnie wpływało na poprawę ich cech witalnych. W badaniach Eckela i in. (1992) dodatek 0,6 i 1,2% kwasu mrówkowego do paszy przyczynił się do większego jej spożycia (o 14%). Falkowski i in. (2000 a) stwierdzili, że dodatek 2% kwasu fumarowego do paszy spowodował zwiększenie jej smakowości.

Wyniki badań własnych wyraźnie wskazują na to, że połączenie zakwaszacza płynnego z paszą typu prestarter oddziałuje pozytywnie na ograniczenie upadków prosiąt, poprawę przyrostów masy ciała oraz na zwiększenie pobrania paszy przez oseski. Trudno wytłumaczyć tak wysoką poprawę wskaźników odchowu prosiąt nie znając składu zakwaszacza. Niestety produkt ten jest chroniony prawami autorskimi.

Opinie oddziaływania zakwaszacza na badane cechy (ograniczenie upadków, wzrost masy ciała i pobieranie paszy przez prosięta) też są zróżnicowane. Dla przykładu, Partanen i Mróz (1999) uzyskali mniejsze przyrosty masy ciała u prosiąt dokarmianych paszą z dodatkiem zakwaszacza w porównaniu do grupy kontrolnej. Zdaniem Falkowskiego i in. (2000 b) na pobranie paszy wpływają też jej walory smakowe. Wykonane przez tych autorów doświadczenie z udziałem kwasu fumarowego jako dodatku do mieszanki wskazuje, że zwiększone dawki kwasu fumarowego z 2 do 4% w paszy spowodowały zmniejszenie pobrania paszy przez prosięta.

Przeprowadzone przez Mroza i in. (1998), Rotha i in. (1993), Partanena i Mroza (1999), Blanka i in. (1998) oraz Eckela i in. (1992) doświadczenia wykazały, że dodawanie kwasów organicznych do mieszanki paszowej dla prosiąt przyczyniło się zawsze do wyraźnej poprawy wyników odchowu osesków. W doświadczeniach tych udowodniono, że ilość i forma podawanego zakwaszacza miały na celu ograniczenie działania niekorzystnej flory bakteryjnej, co miało też pozytywny wpływ na wyniki odchowu prosiąt.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań własnych w odchowu prosiąt można stwierdzić, że ilość i forma podania płynnego zakwaszacza jako dodatku do mieszanki prestarter przyczyniła się do wyraźnej poprawy wskaźników w odchowu prosiąt.

Wnioski

Z przeprowadzonego eksperymentu wynikają następujące wnioski:

- rozpoczęcie dokarmiania od 7. dnia życia prosiąt ssących mieszanką prestarter z dodatkiem płynnego zakwaszacza w ilości 15 i 30% masy mieszanki przyczyniło się do wyraźnego zwiększenia jej pobrania i tym samym do poprawy wyników odchowu,
- zastosowanie zakwaszacza płynnego wraz z mieszanką prestarter przyczyniło się do ograniczenia upadków prosiąt w grupie doświadczalnej o 44,4% w porównaniu z grupą kontrolną. Różnica statystycznie istotna przy ($P \leq 0,05$),
- zakwaszacz w połączeniu z mieszanką pełnoporcjową typu prestarter mógł mieć pozytywny wpływ na smakowitość paszy, o czym świadczyć może zwiększenie o 112% jej spożycia przez prosięta w grupie doświadczanej w porównaniu z grupą kontrolną, co miało korzystny wpływ na poprawę tempa wzrostu prosiąt. W zakresie pobrania paszy przez prosięta, pomiędzy grupami odnotowano różnice statystycznie istotne i wysoko istotne ($P \leq 0,05$ i $0,01$).

Piśmiennictwo

- Batorska M., Mieńkowska-Stępniewska K. (2000). Wpływ różnych zakwaszaczy w mieszankach typu prestarter na wyniki odchowu prosiąt. *Biul. Nauk. UWM Olsztyn*, 7: 5–12.
- Blank R., Mosenthin R., Sauer W.C. (1998). Gastrointestinal response of early-weaned pigs to supplementation of wheat-soyabean meal diets with fumaric acid and sodium bicarbonate. *J. Anim. Feed Sci.*, 7(Suppl. 1): 185–189.
- Bolduan G., Morgenthum R., Jung H., Nitz H. (1990). Saureinsatz bei Ferkeln und Sauen. *Kraftfutter*, 7: 286–288.
- Cromwell P.D. (1995). *Development and Survival*, ed. M.A Varley. CAB International, Oxon, pp. 99–154.
- Eckel B., Kirchgessner M., Roth F.X. (1992). Zum Einfluss von Aminosäure auf tägliche Znahmen, Futteraufnahme, Futterverwertung und Verdaulichkeit. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 67: 93–100.
- Falkowski J., Bugnacka D., Kozera W., Milewska W. (2000 a). Wpływ kwasu fumarowego i lubinu wąskolistnego na smakowitość mieszanek stosowanych w żywieniu odsadzonych prosiąt. *Biuletyn Naukowy UWM Olsztyn*, 7: 59–65.
- Falkowski J., Bugnacka D., Kozera W. (2000 b). Wpływ różnego poziomu kwasu fumarowego w mieszankach na ich smakowitość w żywieniu odsadzonych prosiąt. *Zesz. Nauk. PTZ*, 48: 321–323.
- Kamyczek M., Kujawiak R. (1999). Wpływ zakwaszania paszy preparatem z kwasem mrówkowym SanoCid na efekty odchowu prosiąt. *Zesz. Nauk. AR Kraków*, 352: 97–101.
- Kirchgessner M., Roth F. (1982). Propionic acid as feed additive in the rearing of piglets and fattening of pigs. *Futter*, 28: 225–234.
- Korniewicz A., Paleczek B., Korniewicz D., Kozik E. (1990). Wpływ cytroniku i Avotanu na wyniki odchowu prosiąt. *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 28: 185–192.
- Korniewicz D., Korniewicz A., Kozik E., Paleczek B., Korniewicz M. (1996). Efektywność kwasu fumarowego w mieszankach dla prosiąt i warchlaków. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 23, 1: 175–187.
- Korniewicz D. (2004). Możliwość substytucji antybiotyków paszowych w mieszankach dla trzody chlewnej. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Rozprawy*, 485: 88–98.
- Mróz Z., Jongbloed A.W., Partanen K., van Diepen JThM., Vreman K., Kogut K. (1998). Ileal digestibility of amino acids in pigs fed diets of different buffering capacity and with supplementary organic acids. *J. Anim. Feed Sci.*, 7, Suppl. 1: 191–197.

- Partanen K.H., Mróz Z. (1999). Organic acid for performance enhancement in pigs diet. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 117–145.
- Pejsak Z. (2007). *Ochrona zdrowia świń*. PWR, Poznań, 663 ss.
- Poznański W., Jasek S., Kalinowska R., Gajewczyk P., Knecht D., Rząsa A. (1997). Wpływ węgla brunatnego i kwasów organicznych na wyniki odchowu prosiąt ssących i odsadzonych. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Zoot.*, 323: 155–163.
- Roth F.X., Kirchgessner M., Eidelsburger U. (1993). Zur nutritiven Wirksamkeit von Milchsäure in der Ferkelaufzucht. *Agribiol. Res.*, 46: 229–239.
- Urbańczyk J., Hanczakowska E. (1995). Wpływ kwasu fumarowego w dawce pokarmowej dla prosiąt i warchlaków na wyniki odchowu oraz niektóre wskaźniki biochemiczne i mikrobiologiczne w jelicie ślepym. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 22: 269–278.

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

MAREK RAJCHERT, PAWEŁ GAJEWCZYK, EDYTA PŁAZAK

Effect of using liquid acidifier with prestarter diet on rearing performance of piglets

SUMMARY

The aim of the experiment was to determine the effect of adding an acidifier to the complete prestarter diet for suckling pigs on improving their rearing performance. The experiment was conducted in a commercial farm with a base herd of 1170 sows. Analysis was made of 20 litters, which were divided into two groups: experimental and control, each consisting of 10 litters. The experiment lasted 20 days. Throughout the experiment, piglets were fed a diet without the acidifier from 7 to 28 days of age. Piglets in the experimental group were fed a diet with natural acidifier for 20 days. During the first 10 days the acidifier formed 15% of the feed weight and during the next 10 days it was increased up to 30%.

The results of the experiment proved that the acidifier could positively influence feed palatability, which translated into increased feed consumption in the experimental group by 112% in comparison to the control group. The feed supplement also had a positive effect on decreasing mortality among the sucklings by 45% and on increasing piglet weight by 17.5%. It is concluded that the natural acidifier had a favourable and significant effect on the amount of consumed feed and on reducing piglet mortality.

Key words: piglets, natural acidifier, rearing results

ROLA WAPNIA I ŻELAZA W ŻYWIENIU INTENSYWNIE UŻYTKOWANYCH SAMIC KRÓLIKÓW

Agnieszka Chełmińska, Dorota Kowalska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Ochrony Zarodków Genetycznych Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

U intensywnie użytkowanych królic wzrasta zapotrzebowanie pokarmowe na składniki mineralne, a zwłaszcza Ca, P, Fe i Zn. Niedobór tych pierwiastków w paszy powoduje, że samice uruchamiają rezerwy własnego organizmu na pokrycie potrzeb wynikających z szybko rosnącej produkcji mleka i jednoczesnego wzrostu masy kostnej rozwijających się płodów. Celem prowadzonych badań było określenie wpływu zróżnicowanego poziomu Ca i Fe dla królic intensywnie użytkowanych na liczebność miotu, skład mleka, liczbę odchowanych królicząt oraz ich masę ciała w okresie od urodzenia do 35. dnia życia. Materiał badawczy stanowiły samice królików rasy NB (40 szt.) podzielone na dwie grupy i całość uzyskanego potomstwa z 5 kolejnych miotów. Grupa I żywiona była pełnoporcjową mieszanką granulowaną z 1% udziałem premiksu witaminowo-mineralnego. W grupie II królicom podawano premiks mineralno-witaminowy ze zwiększonym o 50% udziałem Ca i Fe. Stwierdzono, że zwiększony udział Ca i Fe w paszy miał dodatni wpływ na mleczność samic, masę miotu w poszczególnych dniach odchowu oraz procent odchowanych do 35. dnia życia królicząt.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat chów i hodowla królików przeszły wiele przemian. Przy malejącej systematycznie roli użytkowości futerkowej coraz większej wagi zaczęły nabierać badania nad wzrostem królików w aspekcie użytkowania mięsnego. Jest to związane z większą dbałością społeczeństwa o zdrowie i z poszukiwaniem żywności niskotłuszczowej o wysokich walorach dietetycznych.

Aby sprostać wzrastającemu zapotrzebowaniu na ten gatunek mięsa, krajowi producenci mięsa króliczego wprowadzili na fermach intensywny system rozplodu polegający na kryciu samic w 2. dniu lub od 7. do 10. dnia po wykocie. Prowadzi to do nakładania na siebie dwóch faz – laktacji i kolejnej ciąży. U tak eksploatowanych królic wzrasta zapotrzebowanie pokarmowe na składniki mineralne, a zwłaszcza na Ca, P, Fe i Zn (Xiccato, 1996). Niedobór tych pierwiastków w paszy powoduje uruchamianie rezerw własnego organizmu na pokrycie potrzeb wynikających z szybko rosnącej produkcji mleka i jednoczesnego wzrostu masy kostnej rozwijających się płodów. Może to być przyczyną wielu schorzeń, a także uniemożliwiać regenerację organizmu samicy, co negatywnie wpływa na użytkowość rozplodową.

W ostatnim czasie zwrócono również uwagę na wysoką śmiertelność królicząt w okresie odchowu przy matkach, jak też na ich stosunkowo niskie przyrosty dzienne. Badając wskaźniki hematologiczne u młodych królicząt często stwierdza się zmniejszenie liczby krwinek czerwonych i obniżenie wartości wskaźników czerwonych, co może wskazywać na niedobór Fe w mleku matek. Dla młodych królicząt do wieku 19–21 dni życia mleko matki jest jedynym pokarmem; dopiero po tym okresie zaczynają one pobierać pasze stałe.

W krajowym piśmiennictwie występuje stosunkowo niewiele pozycji dotyczących zapotrzebowania królików na mikro-, i makroelementy. Utrudnia to pracę ferm towarowych, w których intensyfikacja produkcji stawia szczególne wymagania dotyczące żywienia i jakości paszy. Składniki mineralne są najczęściej wprowadzane do diety królików w ilościach zgodnych z zaleceniami zawartymi w Normach Żywienia Mięsożernych i Roślinożernych Zwierząt Futerkowych opracowanych w 1994 roku. Normy te nie uwzględniają jednak potrzeb samic jednocześnie kotnych i karmiących. Dla tej grupy przyjmuje się zalecenia żywieniowe jak dla samic ciężarnych, stąd ilości te mogą być niewystarczające.

Wapń jest podstawowym pierwiastkiem budulcowym organizmu zwierzęcego. Stanowi on ponad 1,5% masy ciała, co odpowiada 40% udziału wszystkich składników mineralnych. Wapń prawie w całości (99%) wchodzi w skład kości i zębów. Tylko 1% występuje w tkankach i płynach ustrojowych. Żelazo jest pierwiastkiem warunkującym erytropoezę, wchodzi bowiem w skład cząsteczki hemoglobiny, w której występuje w około 50% ogólnej ilości żelaza w organizmie. Głównym jego źródłem jest pasza. Dostępność jest regulowana głównie przepuszczalnością błony śluzowej jelit.

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu zróżnicowanego dodatku Ca i Fe dla królic intensywnie krytych (w 2. dniu po wykocie) na liczebność miotów, skład mleka, liczbę królicząt odchowanych do 35. dnia życia oraz masę ciała w poszczególnych dniach odchowu.

Material i metody

Material badawczy stanowiły 5-miesięczne samice królików rasy nowozelandzkiej białej (NB), podzielone na dwie grupy po 20 sztuk w każdej oraz całość uzyskanego po nich potomstwa w 5 kolejnych miotach. Wszystkie zwierzęta pochodziły z fermi uznanej należącej do Instytutu Zootechniki PIB.

Utworzono dwie grupy żywieniowe:

- Grupa I – kontrolna – żywiona granulowaną mieszanką podstawową o standardowej recepturze;
- Grupa II – żywiona granulowaną mieszanką ze zwiększonym o 50% udziałem Ca i Fe.

Samice wraz z młodymi utrzymywane były pojedynczo, w klatkach na głębokiej ściółce, w pomieszczeniu zamkniętym nieogrzewanym.

Pełnoporcjowa mieszanka granulowana, którą żywione były zwierzęta, zawierała w swoim składzie susz z lucerny (26%), śrutę jęczmienną (25%), śrutę kukurydzianą

(18%), śrutę sojową poekstrakcyjną (8%), otręby pszenne (18,6%), mleko w proszku (2%), drożdże pastewne (1%), NaCl (0,4%) i premiks mieszanki witaminowo-mineralnej (1%). W grupie doświadczalnej (II) zwierzęta otrzymywały premiks mieszanki witaminowo-mineralnej ze zwiększonym o 50% udziałem Ca i Fe. Potrzebne do doświadczenia dodatki mineralno-witaminowe wykonano w Wytwórni Premiksów LNB Poland Sp. z o.o. w Kiszkuwie. Premiks podstawowy dla królików zawierał w 1 kg witaminy: A – 1 000 000 j.m., D₃ – 150 000 j.m., E (Dl-Alpha Tokoferol) – 2727 mg, K₃ – 52 mg, B₁ – 50 mg, B₂ – 400 mg, B₃ – 2000 mg, B₅ – 787 mg, B₆ – 50 mg, B₁₂ – 1500 mcg, biotyna – 10 000 mcg, chlorek choliny – 12 500 mg, kwas foliowy – 57 mg, minerały: Fe – 5000 mg, Mn – 7500 mg, Cu – 750 mg, Zn – 5000 mg, I – 100 mg, Co – 100 mg, Se – 20 mg, Ca – 27,8%.

Warunki zoohigieniczne i technologiczne na fermie były zgodne z ogólnymi założeniami dla tego rodzaju produkcji. Zwierzęta objęte zostały programem profilaktyki weterynaryjnej przewidzianej dla tej grupy zwierząt.

Z wyprodukowanej partii pasz z 7 miejsc zostały pobrane próbki cząstkowe, do przeprowadzenia podstawowych analiz chemicznych. Oznaczona została zawartość suchej masy (SOP* M.011:2006), białka surowego (SOP* M.007:2006), tłuszczu surowego (SOP* M.013:2006), włókna surowego (SOP* M.012:2006) i popiołu surowego (SOP* M.014:2007) oraz wapnia i żelaza metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS).

Analiza chemiczna podstawowej mieszanki paszowej wykazała zawartość składników pokarmowych na poziomie: sucha masa – 84,05%, popiół surowy – 5,27%, białko ogólne – 16,21%, tłuszcz surowy – 3,24%, włókno surowe – 13,12%, bezazotowe wyciągowe – 46,21%.

Oznaczona w badaniach zawartość wapnia i żelaza w pełnoporcjowych mieszankach treściwych wynosiła odpowiednio: Ca w grupie I – 9,95 mg/g, w II – 12,1 mg/g i Fe w grupie I – 207,32 µg/g, w II – 313,52 µg/g.

Samice kryto intensywnie w 2. dniu po wykocie. W 10. dniu laktacji pobrano od nich próbki mleka, oznaczając zawartość suchej masy, białka, tłuszczu i laktozy oraz poziom Ca i Fe. Mleko pobierano ręcznie do próbki zbiorczej (łącznie 150 ml) od 5 samic z każdej grupy w każdym z 5 miotów. Analizę chemiczną mleka wykonano przy użyciu aparatu Milko Scan 133B.

Oznaczenie wapnia i żelaza w mleku przeprowadzono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) – metodą płomieniową.

W czasie trwania doświadczenia zbierano następujące dane: liczba królików urodzonych w miocie, masę 1 sztuki w 1 dobie po urodzeniu oraz w 21. i 35. dniu życia, liczebność królicząt w poszczególnych dniach odchowu.

W 35. dniu życia młodych królicząt pobrano po 1 ml krwi od 10 losowo wybranych sztuk (pochodzących od różnych samic), z każdej grupy i z każdego z 5 miotów w celu oznaczenia wskaźników hematologicznych. Krew pobierano z żyły usznej, a parametry oznaczano przy pomocy aparatu ABC Vet.

*Standard Operation Procedure, M – numer procedury w Centralnym Laboratorium IZ PIB.

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu Statistica 7. Dla zbadania różnic między miotami w obrębie poszczególnych grup zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji.

Wyniki

Skład chemiczny mleka króliczego pobranego w 10. dniu laktacji królic przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład chemiczny mleka króliczego dla kolejnych 5 miotów samic
Table 1. Chemical composition of rabbit milk for 5 consecutive litters

Składniki pokarmowe (%) Nutrients (%)	Grupa I/miot Group I/litter					Grupa II/miot Group II/litter				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Sucha masa Solids	30,55	32,51	30,25	33,25	34,25	31,56	32,21	33,21	34,56	32,33
Białko Protein	12,90	12,64	13,20	11,61	9,97	12,52	13,43	12,12	12,32	11,90
Tłuszcz Fat	15,55	15,95	16,19	16,95	17,29	16,12	15,42	15,32	16,95	17,91
Laktoza Lactose	2,11	2,25	2,31	2,16	2,29	2,64	2,89	2,33	2,22	2,39

Tabela 2. Zawartość wapnia i żelaza w mleku króliczym
Table 2. Calcium and iron content of rabbit milk

Wyszczególnienie Item	Miot Litter	Grupa I Group I	Grupa II Group II
mgCa/g	1	5,24	5,74
	2	6,34	6,54
	3	3,81	4,88
	4	3,39	6,14
	5	4,17	4,68
	Średnia dla 5 miotów Average for 5 litters		4,59±0,53 A
mcgFe/g	1	3,72	4,44
	2	3,09	5,15
	3	4,44	6,94
	4	4,44	4,20
	5	4,63	5,70
	Średnia dla 5 miotów Average for 5 litters		4,06±0,28 A

Liczby w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (a, b – $P \leq 0,05$, A, B – $P \leq 0,01$).
Means marked with different letters differ significantly (a, b – $P \leq 0,05$, A, B – $P \leq 0,01$).

Wyższe ilości wapnia w mleku królic stwierdzono w grupie II, wysokie wartości utrzymywały się we wszystkich 5 miotach samic. Począwszy od trzeciej laktacji zarówno w grupie I jak i II ilość wapnia wydzielonego w mleku zaczynała maleć.

Wyższe wartości poziomu żelaza stwierdzono w mleku samic grupy II, przy czym ilość tego pierwiastka była najwyższa w 2., 3. i 5. laktacji (tab. 2).

Zwiększenie udziału Ca i Fe w premiksie mieszanki granulowanej spowodowało istotny wzrost liczby królicząt urodzonych i odchowanych w miocie (tab. 3). Pod względem liczebności miotu w dniu urodzenia stwierdzono istotne różnice ($P \leq 0,05$) pomiędzy badanymi grupami, natomiast wysoko istotne ($P \leq 0,01$) w masie ciała królicząt. Nie stwierdzono interakcji pomiędzy badanymi cechami.

W 21. dniu życia młodych królicząt stwierdzono statystycznie wysoko istotne różnice w liczebności miotu i w masie ciała zwierząt pomiędzy badanymi grupami. Wykazano również interakcję ($P \leq 0,01$) między grupą i kolejnym miotem a masą ciała 1 sztuki.

Statystycznie wysoka istotność różnic w liczebności miotu i masie ciała pomiędzy grupami utrzymywała się w dalszym okresie odchowu, tj. w 35. dniu życia. Istotność interakcji przy $0,01 < P \leq 0,05$ wystąpiła pomiędzy grupą i kolejnym miotem a masą ciała 1 sztuki w 35. dniu życia.

Tabela 3. Wpływ czynników: grupa żywieniowa i kolejny miot na liczebność i masę miotu w wybranych dniach odchowu

Table 3. Effect of feeding group and litter number on litter size and weight on some days of rearing

Dane	Liczebność (szt.) Litter size (head)	Masa ciała 1 szt. (g) Body weight of 1 animal (g)	Liczebność (szt.) Litter size (head)	Masa ciała 1 szt. (g) Body weight of 1 animal (g)	Liczebność (szt.) Litter size (head)	Masa ciała 1 szt. (g) Body weight of 1 animal (g)
	w dniu urodzenia at birth		w 21. dniu życia at 21 days of age		w 35. dniu życia at 35 days of age	
	x	x	x	x	x	x
Ogółem Total	7,09±26,03	62,74±62,74	6,29±53,97	326,62±22,48	6,23±24,65	737,86±20,84
Grupa Group						
I	6,77±26,61 a	58,28±29,92 A	5,84±27,35 A	317,60±21,35 A	5,80±27,0 A	696,84±22,36 A
II	7,41±25,45 b	67,20±27,95 B	6,74±26,62 B	335,65±23,62 B	6,66±22,3 B	778,88±19,33 B
Miot Litter						
1	6,70±25,32	55,89±26,42 A	5,78±26,61 Aa	295,25±24,61 A	5,64±28,2 A	695,28±21,61 A
2	7,28±22,73	56,86±22,45 AC	6,58±21,75 b	293,52±20,55 AC	6,51±21,9B	717,14±19,05 B
3	7,35±24,01	62,82±27,72 BCD	6,41±26,14 b	347,94±23,23 B	6,39±25,9	778,09±22,32 B
4	7,27±21,36	67,03±29,91 BDa	6,66±21,36 Bb	329,60±17,45 B	6,66±21,3B	724,48±19,01 B
5	7,10±30,80	60,58±34,94 b	6,11±29,38 ac	351,29±19,92 B	6,09±29,1	787,09±23,56 B
				**		*
Interakcja Inte- raction						

Liczby w kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (a, b – $P \leq 0,05$, A, B, C, D – $P \leq 0,01$).

Numbers in columns marked with different letters differ significantly (a, b – $P \leq 0,05$, A, B, C, D – $P \leq 0,01$).

*Istotność interakcji przy $0,01 < P \leq 0,05$; *Significant interaction at $0,01 < P \leq 0,05$.

**Istotność interakcji przy $P \leq 0,01$; **Significant interaction at $P \leq 0,01$.

W grupie I procent upadków w okresie od urodzenia do odsadzenia w 35. dniu życia wynosił 14,3, natomiast w grupie II 10,1 (tab. 4).

Tabela 4. Upadki w poszczególnych okresach odchowu (%) (średnie dla 5 kolejnych miotów samic)
Table 4. Mortality in different rearing periods (%) (means for 5 consecutive litters)

Grupa Group	Upadki do 21. dnia życia Mortality to 21 days of age	Upadki od 21. do 35. dnia życia Mortality from 21 to 35 days of age	Upadki ogółem Total mortality
I	13,73	0,68	14,32
II	9,04	1,18	10,12

Wszystkie uzyskane wartości wskaźników hematologicznych u młodych królicząt (35. dzień życia) mieściły się w zakresie wartości referencyjnych podawanych przez Winnicką (1998) dla tej grupy zwierząt (tab. 5). Niemniej jednak od 3. miotu samic z grupy kontrolnej obserwowano tendencję spadkową dla RBC, PLT, MCV, MCH i MCHC. U 3 sztuk z miotów 4. i 5. w grupie I stwierdzono spadek wartości wskaźnika RBC poniżej wartości referencyjnych. W grupie II wartości te utrzymywały się w kolejnych miotach na zbliżonym poziomie.

Omówienie wyników

Uwalnianie dużych ilości wapnia (od 1,5 do 2 g/dzień) w mleku królic, a także wykorzystanie tego pierwiastka do budowy układu kostnego rozwijającego się płodu, może powodować niedobór tego składnika u intensywnie eksploatowanych samic. W przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt, poziom Ca w osoczu krwi królików zależy głównie od ilości Ca zawartego w diecie (Cheeke, 1987). Niedobór Ca w paszy dla dorosłych królików powoduje często konieczność uruchomienia rezerw własnych organizmu, co może powodować odwapnienie oraz osteomalację (rozmiękanie, łamkost) kości, trudności w krzepnięciu krwi, nieprawidłowości metaboliczne, a także być przyczyną poronień i małej żywotności miotów czy tężyzki poporodowej. U młodych królicząt mogą wystąpić zaburzenia w kostnieniu, co uwidacznia się krzywicą, osłabionym tempem wzrostu czy allotriofagią (lizawość). Nadmiar wapnia jest u królików wydalany głównie w kale oraz w mniejszym stopniu z moczem (McDowell, 1992).

Do prawidłowego wchłaniania wapnia z paszy i zachowania homeostazy niezbędne jest utrzymanie w organizmie równowagi między kationami i anionami, tzn. między Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ a Cl^- , HCO_3^- , PO_4^- . Ważną rolę w gospodarce wapniowej pełni też witamina D_3 .

Kampheus (1991) stwierdził, że u królików zwiększona obecność Ca w osoczu krwi, aortie i nerkach jest stymulowana obecnością cholekalcyferolu. Absorpcji wapnia sprzyja laktoza zakwaszająca środowisko przewodu pokarmowego, a także uzupełnienie diety lizyną. Stopień wchłaniania tego pierwiastka może zatem wahać się w szerokim zakresie od 30 do prawie 80%.

Tabela 5. Wartości wskaźników hematologicznych u młodych królicząt w wieku 35 dni
Table 5. Haematological indices of young rabbits at 35 days of age

Miot Litter	WBC(103/mm ³)		RBC(106/mm ³)		HGB(g/dl)		HCT (%)		PLT(103/mm ³)		MCV(µm ³)		MCH(pg)		MCHC (g/dl)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	11,1	12,2	5,76	5,82	12,5	12,6	38,0	41,7	252	283	66	67	21,6	21,6	32,8	32,5
2	11,2	12,5	6,02	6,84	12,3	12,8	37,3	42,5	238	210	62	69	20,4	22,1	32,9	31,4
3	10,9	14,1	5,84	6,77	11,3	13,3	36,8	44,4	259	283	61	71	19,4	24,2	31,8	32,4
4	11,0	12,2	5,57	7,11	12,0	13,7	37,2	42,2	285	574	60	68	19,2	22,5	28,5	31,2
5	7,7	12,4	4,25	6,52	12,2	14,4	38,4	41,0	246	468	57	72	17,1	23,5	26,4	32,0
średnia mean	10,38	12,68	5,49	6,61	12,06	13,36	37,54	42,36	256	363,6	61,20	69,40	19,54	22,78	30,48	31,9

Wyższa zawartość Ca w paszy dla samic grupy II wpłynęła na wielkość miotu oraz zmniejszenie śmiertelności pourodzeniowej i poodsadzeniowej. Podobne wyniki uzyskali Assane i in. (1994). Autorzy uważają, że zmniejszenie śmiertelności i zwiększenie wielkości miotu można tłumaczyć wyższą proporcją Ca do P, która zwiększa retencje Ca.

Zwiększenie o 50% ilości Fe w mieszance treściwej samic królików spowodowało wyższe wydzielanie tego pierwiastka w mleku. Było ono najwyższe w 3. laktacji, natomiast w pozostałych utrzymywało się na podobnym poziomie, co wskazuje na pozytywny efekt zwiększenia ilości tego pierwiastka w paszy dla samic jednocześnie kotnych i karmiących.

Wchłanianie żelaza oceniane jest na około 5–10%, przy czym niższą absorpcję cechuje żelazo niehemowe. Proces wchłaniania żelaza zmniejszają liczne składniki pokarmowe jak fosforany, szczawiany, fityniany, witamina E czy niektóre pierwiastki jak cynk, kobalt, mangan i nikiel. Absorpcję zwiększają natomiast witamina C oraz wapń i miedź. Stąd ważne wydaje się odpowiednie zbilansowanie w wapń pasz dla królic intensywnie krytych.

Podstawowe objawy niedoboru Fe w organizmie to zmniejszenie syntezy hemoglobiny i w efekcie niedokrwistość, zaburzenia metabolizmu witamin z grupy B czy zmiany behawioralne, jak: mniejsza aktywność, osłabienie czy szybkie męczenie się. Niedobory żelaza w diecie powodują głównie uruchomienie jego rezerw ze szpiku kostnego (Frewin i in., 1997; Anders, 1999). Przy głębokim deficycie Fe obniża się poziom hemoglobiny, co prowadzi do anemii. Niedokrwistość u samic obniża płodność (młode rodzą się słabe i większość z nich ginie w pierwszych dniach życia) natomiast u samców spermatogenezę (Emerit i in., 2001; Floriańczyk, 1996). Następstwem niedokrwistości u królików jest również odbarwienie futra, utrata sprężystości i jedwabistości włosów (tzw. futro bawełniane).

Wykorzystanie Fe u królików, podobnie jak u przeżuwaczy, jest wyższe niż u innych zwierząt gospodarskich, gdyż w gospodarce tym pierwiastkiem uczestniczą także bakterie przewodu pokarmowego. Dostępność Fe regulowana jest głównie przepuszczalnością błony śluzowej jelit. Żelazo w ilości powyżej 1250 mg/kg paszy może powodować hemochromatozę prowadzącą do uszkodzenia narządów, stąd według dyrektyw Unii Europejskiej dopuszczalna zawartość Fe w paszy nie może przekraczać tej wartości (Hirayama i Yasutake, 1998).

Zwiększone zapotrzebowanie na żelazo występuje u zwierząt w okresie intensywnego wzrostu, nasilonej produkcji i ciąży. Głównym objawem niedoboru żelaza w organizmie w takich okresach jest zahamowanie tempa wzrostu, niewydolność fizjologiczna, tachykardia, duszność oraz bladeść błon śluzowych w wyniku niedokrwistości.

Stwierdzono, że w mleku samic zawartość tego pierwiastka jest z reguły niewielka, pomimo to jednak u królic, w związku z rodzeniem licznych i szybko rosnących miotów, zapotrzebowanie na ten pierwiastek jest stosunkowo wysokie. Wielkość rezerw Fe wystarcza na pierwsze 4–5 dni życia królicząt (Anders, 1999). Stąd też przy bardzo licznych miotach (powyżej 8 sztuk) niedobór Fe może być szczególnie niebezpieczny. Na niektórych fermach we Włoszech i Francji młodym króliczkom podaje się uzupełniające preparaty żelazowe.

Najwięcej żelaza wiąże hemoglobina (60–70%), dalej mioglobina (10–15%). Pozostała ilość zawarta jest w cytochromach, enzymach (katalaza, peroksydaza) oraz w takich związkach, jak: transferyna, laktoferyna, ferrytyna i hemosyderyna (Ponka, 1999).

Analizując upadki zwierząt należy stwierdzić, że udział premiksu o wyższej zawartości żelaza i wapnia przyczynił się do zmniejszenia upadków zwierząt o 4% w porównaniu do grupy kontrolnej. Za zwiększeniem ilości omawianych pierwiastków w paszy przemawia również prawidłowy obraz krwinkowy u młodych króliczek.

Podsumowując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że zwiększenie w mieszance paszowej dla królic intensywnie krytych poziomu Ca i Fe spowodowało większe uwalnianie tych pierwiastków do mleka. Wpłynęło to korzystnie na liczebność ($P \leq 0,05$) i masę urodzonego miotu ($P \leq 0,01$) oraz przyrosty młodych króliczek do 21. dnia życia – w okresie, kiedy mleko matki stanowi ich jedyny pokarm, jak również w okresie między 21. a 35. dniem, kiedy zaczynają one pobierać pasze stałe.

Piśmiennictwo

- Anders N.C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.*, 341 (26): 1986–1994.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis. Heldrich K. (Ed.). Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition, Arlington, VA, USA.
- Assane M., Gongnet G., Coulibaly A., Sere A., Gaye O. (1994). Effect of the calcium: phosphorus ratio in the diet on phosphorus and calcium metabolism and reproductive performance in rabbits under Sahelian conditions. *Nutr. Abstr. Rev. Series B*, 1995, 65 (2), p. 805.
- Cheeke P.R. (1987). Rabbit feeding and nutrition. Academic Press Inc., Orlando, Florida, 32887 pp.
- Emerit J., Beaumont C., Trivin F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.*, 55: 333–339.
- Floriańczyk B. (1996). Wpływ mikroelementów na metabolizm. *Mag. Med.*, 7: 47–49.
- Frewin R., Henson A., Provan D. (1997). Iron deficiency anaemia. *Brit. Med. J.*, 314: 360–363.
- Hirayama K., Yasutake A. (1998). Free radicals and trace elements. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11: 209–217.
- Kamphues J. (1991). Calcium metabolism of rabbits as an etiological factor for urolithiasis. *J. Nutrition*, 121: 95–96.
- McDowell R.E. (1992). Minerals in animal and human nutrition. Acad. Press. 3rd Edition 1250, San Diego, California USA.
- Ponka P. (1999). Cellular iron metabolism. *Kidney Int.*, 55 (Suppl. 69): s2–s11.
- Winnicka A. (1997). Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wydawnictwo SGGW, 1: 3–115.
- Xiccato G. (1996). Nutrition of lactating does. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 1: 29–47.

AGNIESZKA CHELMIŃSKA, DOROTA KOWALSKA

Role of calcium and iron in the feeding of intensively reared rabbit does

SUMMARY

Intensively reared rabbit does show an increasing nutrient requirement for minerals, in particular Ca, P, Fe and Zn. Dietary deficiency of these elements makes rabbit does mobilize their body reserves to support rapidly increasing milk production and bone mass of developing fetuses. The aim of the study was to determine the effect of different Ca and Fe levels in the diets of intensively reared does on litter size, milk composition, number of reared rabbits and their body weight from weaning to 35 days of age.

Subjects were 40 New Zealand White rabbit does divided into two groups and all of their offspring from 5 successive litters. Group I was fed a complete pelleted feed with 1% vitamin-mineral premix. Group II received the vitamin-mineral premix with a 50% higher proportion of Ca and Fe. The increased proportion of Ca and Fe in the diets had a positive effect on milk yield, litter weight on different days of rearing, and percentage of rabbits reared to 35 days.

Key words: rabbits, calcium, iron, milk, rearing of rabbits

ODDZIAŁYWANIE BODŹCÓW ZAPACHOWYCH NA WARCHLAKI W OKRESIE OKOŁODSADZENIOWYM

Agata Szewczyk

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Technologii Ekologii i Ekonomiki Produkcji
Zwierzęcej, 32-083 Balice k. Krakowa

Celem pracy było określenie wpływu bodźców zapachowych na możliwość zredukowania objawów stresu odsadzenia u warchlaków. Materiał doświadczalny stanowiło 2250 warchlaków mieszańców towarowych, utrzymywanych w identycznych liczbowo grupach, beźściolowo, z żywieniem według przyjętego na fermie schematu, w ogrzewanych i mechanicznie wentylowanych pomieszczeniach. Przeprowadzono dwa zadania: jedno dotyczące wpływu odorantów maskujących na ograniczenie agresji warchlaków w trakcie łączenia w grupy oraz drugie, polegające na określeniu wpływu stymulatorów zapachowych na zachowania pokarmowe w stresie poodsadzeniowym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zapachami, które ograniczyły występowanie zachowań agresywnych były: zapach knura, a także skatol i ocet. Natomiast pozytywny wpływ na częstotliwość pobierania paszy mają zapachy trawy, mleka i jabłek.

Jednym z procesów technologicznych przeprowadzanych na świniach jest zabieg odsadzania prosiąt, który zarówno dla prosiąt, jak i loch jest silnym bodźcem stresowym. Jest to zabieg, który poprzez swoją wysoką stresogenność powoduje w organizmie świń wiele zmian, zarówno fizjologicznych, jak i psychiczno-emocjonalnych, prowadzących do obniżenia poziomu dobrostanu. Badanie skutków stresu odsadzenia nastrocza wiele trudności, gdyż pomimo że sam zabieg jest bodźcem chwilowym, to jego oddziaływanie jest rozciągnięte w czasie. Oceniając jego wpływ na organizm prosiąt, można oprzeć się jedynie na definicjach stresu chwilowego i chronicznego, choć żadna z nich nie odzwierciedla w pełni zmian zachodzących pod wpływem tego zabiegu.

Zabieg odsadzania gwałtownie i całkowicie zmienia status młodych zwierząt: od pełnego uzależnienia od matki-lochy, związanego z żywieniem i zależnościami socjalnymi do kompletnej niezależności, wraz ze zmianą środowiska i przejściem na odżywianie się paszą stałą. Jest to jedna z najbardziej stresujących praktyk zootechnicznych przeprowadzanych na prosiętach.

Zabieg ten, szczególnie przy wczesnych terminach, powoduje okresowe zahamowanie wzrostu, które rzutuje na dalszy rozwój oraz zmniejszone pobranie paszy

i obniżone przyrosty masy ciała prosiąt (Held, 2001). Większość zwierząt adaptuje się po stresie odsadzenia w ciągu 1 do 2 tygodni, nadrabiając straty masy ciała. Jednak niektóre świnie nie przystosowują się do zmienionych warunków środowiskowych oraz socjalnych, co skutkuje rozwojem poodsadzeniowego syndromu zahamowania wzrostu.

Wielu badaczy stwierdza, że dwuetapowy system odsadzania, czyli odłączanie lochy i pozostawianie prosiąt jeszcze przez tydzień w kojcu porodowym, korzystniej oddziałuje na prosięta, rozkładając stres w czasie (Lengerken i Pfeiffer, 1991). Jest to jednak z technologicznego punktu widzenia bardziej kłopotliwe i pracochłonne. Próbuje się również utrzymywać zwierzęta od porodu aż do końca tuczu w tym samym środowisku, na przykład w systemach rodzinnych, co w znacznym stopniu podwyższa efekty produkcyjne, poprzez ograniczenie stresogennych zabiegów odsadzania, transportu i łączenia w grupy oraz konieczności adaptacji do nowych warunków (Duija, 1989; Hahn i Nienaber, 1989; Lengerken i Pfeiffer, 1991; Ekkel, 1995). Łączenie miotów narusza ustaloną wcześniej hierarchię i powoduje dużą stresogenność oraz występowanie zachowań agresywnych (Lengerken i Pfeiffer, 1991; Friend i in., 1983).

Krótkotrwałe zmiany temperatury ciała spowodowane przez stres pobudzają specyficzną i niespecyficzną odporność i przez to zapobiegają infekcjom wywołanym przez czynniki stresowe. Jednakże długo trwająca gorączka towarzysząca zmianom behawioralnym i hormonalnym, wynikająca ze stresu spowodowanego na przykład przez łączenie grup może uszkadzać komórki, szczególnie nerwowe, a także powodować osłabienie aktywności, zmniejszenie pobrania paszy, jak również zanik czynności troszczenia się o ciało (DeJong, 2000).

Intensywne utrzymanie niosące za sobą zubożenie środowiska i zmniejszające dostępną powierzchnię ogranicza w znacznym stopniu naturalne zachowania prosiąt, takie jak rycie, wykonywanie ruchu, zabawy, grupowe gonitwy, gwałtowne zatrzymywanie się, nagle zwroty i skakanie. Do zabaw wlicza się też pierwsze zachowania agonistyczne, kontakty nosowe między osobnikami, wzajemne popychanie, szturchanie nosem i grożenie. Po zabiegu odsadzenia w odpowiedzi na drastyczne zmiany w środowisku prosięta reagują różnymi charakterystycznymi zachowaniami. Występują wtedy zaburzenia w proporcjach pomiędzy naturalnymi zachowaniami, takimi jak leżenie, ruch, rycie, pobieranie paszy, picie, zabawy, walki. W nowych grupach między prosiętami z różnych miotów często występują zachowania agresywne, związane z walkami, kąsaniem i gryzieniem. Występowanie agresji skorelowane jest z poziomem kortyzolu w plazmie krwi (Gardner, 2000), chociaż bezpośrednim skutkiem jej występowania jest wzrost adrenaliny. Według tego samego autora więcej zachowań agresywnych występuje u prosiąt utrzymywanych w kojcach o większej powierzchni, natomiast w mniejszych kojcach zdarza się więcej zachowań oralno-nosowych związanych z wąchaniem i gryzieniem innych świń.

Inaczej przedstawia się sytuacja w grupach łączonych ze sztuk z różnych miotów. Kowalski (1996) wskazuje na różnice w odpowiedzi na stres prosiąt łączonych po odsadzeniu w zależności od statusu socjalnego osobników. W dniu łączenia grup najwyższy poziom kortyzolu występuje u subdominantów. W 3. dniu od połączenia zwierząt najwyższy poziom kortyzolu występuje u dominantów, a poziom kortyzo-

lu wyrównuje się u wszystkich zwierząt do wartości fizjologicznych w 7. dniu od połączenia. Osobniki marginesowe reagują niewielkim wzrostem poziomu kortyzolu tylko w dniu łączenia. W 3. dniu jest on już na poziomie fizjologicznym. Fitko i in. (1992) w podobnych badaniach potwierdzają wystąpienie stresu emocjonalnego i somatycznego po łączeniu prosiąt w grupy technologiczne, związanego z występowaniem walk o ustalenie hierarchii. Stwierdzają oni u osobników dominujących wyższą odpowiedź związaną z wydzielaniem adrenaliny i noradrenaliny, natomiast u osobników podporządkowanych wyższą odpowiedź związaną z poziomem kortyzolu. Fizjologiczne poziomy tych hormonów odnotowuje się u osobników dominujących już po 7 dniach. Natomiast u podporządkowanych sztuk nadal występują poziomy podwyższone.

Zapach jest pierwszym odczuciem wykrywanym przez świnię, daje pierwszy impuls, który zachęca świnię do pobierania paszy lub ucieczki czy walki. Może być przyjemny, zachęcający lub przeciwnie – odstręczający. Spożycie paszy jest jednym z czynników limitujących produkcję zwierzęcą. Zmniejszenie spożycia paszy u świń występuje po odsadzeniu prosiąt, kiedy prosięta przechodzą stres spowodowany oddzieleniem od matki, zmianą diety z mlecznej na stałą, zmianą środowiska i łączeniem grup. Osłabienie apetytu na tym etapie powoduje zahamowanie wzrostu i straty. Dlatego używanie różnych atraktantów smakowych i zapachowych w tym okresie powoduje złagodzenie skutków zabiegu i poprawę spożycia paszy, także znaczną poprawę przyrostów masy ciała (Torrallardon, 2000, 2001; McLaughlin, 1983; Jacela, 2010; Pluske, 1996, Roura, 2004).

Według Sommerville'a (1998) węch odgrywa bardzo ważną rolę w świadomości zwierząt i można wykorzystywać ten zmysł, gdy próbuje się poprawiać dobrostan zwierząt. Wykorzystanie zmysłu węchu i zachowań węchowych może być nieinwazyjną metodą zmniejszania stresu, spowodowanego na przykład odsadzeniem. Badanie poziomu kortyzolu i występowanie walk i agresji pokazuje, że łączenie zwierząt z różnych miotów zaburza strukturę grupy i powoduje stres trwający kilka dni. Sytuacja ta może być złagodzona poprzez umożliwienie świniom kontaktu węchowego przez pięć dni przed łączeniem, lub przynajmniej kontaktu z zapachem obcych osobników. Mc Glone (1988) dowodzi, że androsteron hamuje agresję wśród młodych świń. Ta odpowiedź u świń w okresie wzrostu jest wywołana skojarzeniem węchowym prowadzącym do zachowań podporządkowania się dorosłemu męskiemu osobnikowi. Sommerville (1998) sugeruje, że feromony, a w szczególności androsteron, można wykorzystywać do zmniejszania poziomu agresji w grupach świń.

Celem pracy było określenie wpływu bodźców zapachowych na ograniczenie zachowań agresywnych oraz pobudzenie apetytu u warchlaków, czyli możliwość zredukowania u nich objawów stresu odsadzenia.

Material i metody

Material doświadczalny stanowiło 2250 warchlaków mieszańców towarowych. Zwierzęta utrzymywane były w identycznych liczbowo grupach, bezściołowo, z żywieniem według przyjętego na fermie schematu w ogrzewanych i mechanicznie wentylowanych pomieszczeniach.

Doświadczenie objęło dwa zadania. Każde z nich przeprowadzone było w 3 powtórzeniach, realizowanych w okresie wiosna-jesień.

Zadanie pierwsze polegało na określeniu wpływu odorantów maskujących na ograniczenie agresji zwierząt w trakcie łączenia w grupy. Podjęte zostały obserwacje wpływu zastosowania środków zapachowych, takich jak skatol, ocet, mleko, knur, lawenda, trawa, na ograniczenie zachowań agresywnych warchlaków w trakcie łączenia w grupy. Grupę kontrolną stanowiły warchlaki, u których nie zastosowano żadnych substancji zapachowych. Liczebność zwierząt w każdej grupie wynosiła 50 sztuk. Odoranty zostały zastosowane zarówno zwierząt przed połączeniem, jak i w kocy po połączeniu przez okres 24 godzin z częstotliwością co 20 minut z automatycznych atomizerów. Badaniom poddano behavior warchlaków w zakresie zachowań agonistycznych oraz pobudzenia lokomotorycznego i poziom hormonów stresu w okresie 48 godzin po połączeniu miotów. Poziom hormonów kortyzolu i ACTH oznaczono przy pomocy metody radioimmunologicznej, krew pobierana była z żyły jarzmowej zawsze rano o tej samej porze (godz. 8.00).

W zadaniu drugim przebadano wpływ stymulatorów zapachowych na zachowania związane z pobieraniem pokarmu w stresie poodsadzeniowym. Przebadany został wpływ bodźców zapachowych na stymulację pobierania paszy przez odsadzone warchlaki. Jako aromaty użyte zostały syntetyczne substancje zapachowe dostępne na rynku. Dawkowane one były z automatycznych atomizerów umieszczonych w niedostępnej części automatów paszowych z częstotliwością co 5 min. Grupę kontrolną stanowiły warchlaki żywione standardową paszą z zakupu. Zastosowane zostały następujące zapachy: trawa, ściółka, jabłko, pot, knur, mleko, gleba. Zwierzęta utrzymywano w grupach po 50 sztuk.

Badaniom poddano behavior warchlaków w zakresie zachowań pokarmowych – częstotliwości i czasu pobierania paszy. Zebrane dane opracowano przy pomocy programu komputerowego Statgraph, wykorzystując metodę wieloczynnikowej analizy wariancji.

Wyniki

Na podstawie 24-godzinnych obserwacji etologicznych realizowanych przy pomocy kamer wideo dokonano analizy zachowania się warchlaków poddanych działaniu odorantów maskujących w zakresie zachowań agonistycznych oraz pobudzenia lokomotorycznego (tab. 1). Najbardziej pobudzone lokomotorycznie były warchlaki w grupie, u której zastosowano zapach knura i były to różnice wysoko istotne w porównaniu do pozostałych grup. Odnotowano istotność różnic w ruchliwości zwierząt pomiędzy grupami, w których zastosowano skatol i ocet. Występowały tu różnice wysoko istotne w porównaniu do grup, u których zastosowano zapachy mleka, lawendy a także do grupy kontrolnej, gdzie zaobserwowano najwięcej zachowań agresywnych i niższe pobudzenie lokomotoryczne.

Poziom kortyzolu (tab. 2) w surowicy krwi warchlaków, u których zastosowano zapach mleka, różnił się wysoko istotnie w porównaniu do poziomu w krwi warchlaków, u których zastosowano zapach knura, skatol, ocet, zapach lawendy i trawy.

Poziom kortyzolu w surowicy krwi warchlaków, u których zastosowano zapach knura różnił się istotnie w porównaniu do poziomu w krwi warchlaków, u których zastosowano zapach lawendy, a obydwie wymienione od poziomu w krwi warchlaków u których zastosowano zapach trawy, skatol, ocet oraz od grupy kontrolnej. Poziom ACTH (tab. 2) w surowicy krwi warchlaków, u których zastosowano zapach mleka był najwyższy i różnił się istotnie od pozostałych, również poziom ACTH w surowicy krwi warchlaków, u których zastosowano zapach lawendy, był istotnie wyższy niż w krwi warchlaków, u których zastosowano zapach knura, trawy, skatol i ocet oraz od grupy kontrolnej.

Tabela 1 Wpływ zapachów na ograniczenie agresji zwierząt w trakcie łączenia w grupy. Zadanie 1

Table 1. Influence of smell on reduction of piglet aggression during grouping. Task 1

Frekwencja Frequency	Zapach – Smell						
	mleko milk	knur boar	ocet vinegar	skatol skatole	lawenda lavender	trawa grass	bez zapachu odourless
Ruch (min/szt/dobę) Movement (min/pig/day)	174,6 A	280,16 B	249,87 Cd	255,00 Ce	208,04 D	231,2 E	198,4 D
Zachowania agresywne (min/szt/dobę) Aggressive behaviour (min/pig/day)	13,29 D	0,66 Cd	0,83 Cc	0,83 Cc	4,08 B	1,66 Ab	1,97 Aa

ab – różnice istotne przy $P \leq 0,05$.

ab – significant difference at $P \leq 0,05$.

AB – różnice istotne przy $P \leq 0,01$.

AB – significant difference at $P \leq 0,01$.

Tabela 2. Poziom hormonów stresu w okresie 48 godzin po połączeniu miotów. Zadanie 1

Table 2. Level of stress hormones during 48 hours after grouping of litters. Task 1

Hormon Hormone	Zapach – Smell						
	mleko milk	knur boar	ocet vinegar	skatol skatole	lawenda lavender	trawa grass	bez zapachu odourless
Kortyzol (nmol/l) Cortisol (nmol/l)	66,90 Bd	58,19 Ab	59,60 Aa	59,12 Aa	62,14 Ac	60,01 Aa	60,10 Aa
ACTH (pg/ml)	15,28 c	11,18 a	11,27 a	11,35 A	13,18 b	11,66 a	11,56 a

ab – różnice istotne przy $P \leq 0,05$.

ab – significant difference at $P \leq 0,05$.

AB – różnice istotne przy $P \leq 0,01$.

AB – significant difference at $P \leq 0,01$.

Na podstawie 24-godzinnych obserwacji etologicznych rejestrowanych przez kamery wideo dokonano analizy zachowania się warchlaków w zakresie wpływu bodźców zapachowych na stymulację pobierania paszy (tab. 3). Najczęściej i najdłużej pasza pobierana była przez zwierzęta, u których zastosowano zapach trawy. Wystąpiły tu wysoko istotne różnice w stosunku do innych grup. Podobne zależności od-

notowano w przypadku zapachów mleka oraz jabłek. Stwierdzono istotność różnic między grupą kontrolną a grupami, u których zastosowano zapachy ściółki, gleby i knura. Najrzadziej i najkrócej pobierały paszę zwierzęta, u których zastosowano zapach potu; stwierdzono istotności różnic w porównaniu do grup, u których zastosowano zapachy ściółki i gleby, natomiast nie stwierdzono różnic między grupą, u której zastosowano zapach potu, a grupą kontrolną.

Tabela 3. Wpływ zapachów na zachowania pokarmowe w stresie poodsadzeniowym. Zadanie 2
Table 3. Influence of smell on feeding behaviour during postweaning stress. Task 2

	Zapach – Smell							bez zapachu odourless
	trawa grass	ściółka litter	jabłko apple	pot sweat	knur boar	mleko milk	gleba soil	
Czas pobierania paszy (min/szt/dobę) Duration of feeding (min/pig/day)	134 C	78 Da	109 E	72,2 Db	79,83 Da	122,3 F	80,75 Da	75 Db

ab – różnice istotne przy $P \leq 0,05$.
ab – significant difference at $P \leq 0,05$.
AB – różnice istotne przy $P \leq 0,01$.
AB – significant difference at $P \leq 0,01$.

Omówienie wyników

Zapach knura wprowadza wśród warchlaków stan zaniepokojenia. Pobudza je ruchowo, ale z drugiej strony jako zapach osobnika dominującego obniża częstotliwość zachowań agonistycznych na tle walki o pozycję w hierarchii stada (Adkins-Regan, 1998).

Zapach mleka z jednej strony wpływa na zmniejszenie ruchliwości zwierząt, ale podnosi ilość zachowań agresywnych. Zapach ten kojarzony jest z obecnością lochy, zwierzęta nie są pobudzone motorycznie, ale zapach wpływa na silniejsze wykazywanie zachowań agonistycznych, doprowadzając do demonstracji hierarchii stada na tle konkurencji o pokarm (Wiepkema, 1987).

Ocet będący związkiem o intensywnym zapachu, powoduje zaniepokojenie zwierząt, o czym świadczy wzrost ruchliwości, jednak blokując odruchy węchowe, powoduje zmniejszenie odczuwania zapachu innych warchlaków, przez co obniża ilość aktów agresji związanej z ustalaniem się hierarchii stada. Bardzo podobną reakcję powoduje część składowa zapachu knura – skatol. Ilość zachowań agresywnych jest nieznacznie większa niż w przypadku zapachu knura, a ruchliwość warchlaków jest mniejsza. W związku z tym porównując oba te zapachy, trzeba interpretować je jako zagrożenie. Sam skatol oddziałuje łagodniej jako bardziej identyfikowalny przez warchlaki. Zapach knura interpretowany jest jako większe zagrożenie.

Zapach trawy pobudza zwierzęta motorycznie, jest zapachem przyjemnym dla warchlaków, zwiększenie ruchliwości powodowane jest chęcią odnalezienia jego źródła. W porównaniu do grupy kontrolnej obniża nieznacznie zachowania agresywne, które występują tu zarówno poprzez kształtowanie się hierarchii stada, jak i na

tle konkurencji o potencjalny pokarm. Na podstawie wyników można stwierdzić, że lawenda negatywnie pobudza zwierzęta, zwiększając ilość zachowań agresywnych.

Analizując poziom kortyzolu w surowicy krwi warchlaków, wobec których zastosowano odoranty maskujące (Zadanie 1) można stwierdzić, że podwyższony jego poziom w surowicy krwi warchlaków, wobec których zastosowano zapach mleka, świadczy o reakcji ich organizmu na stres, którego czynnikiem jest tu zapach kojarzony z obecnością lochy i powodujący większą manifestację zachowań agresywnych na tle konkurencji o pokarm. Podobnie podwyższenie poziomu kortyzolu w surowicy krwi warchlaków, wobec których zastosowano zapach lawendy, świadczy o reakcji ich organizmu na stres spowodowany nierozpoznawalnym nieprzyjemnym zapachem. Analizując pozostałe poziomy kortyzolu w surowicy krwi u warchlaków w innych grupach nie można stwierdzić podwyższonej odpowiedzi na stres po 48 godzinach od wystawienia na bodziec.

Analizując poziom ACTH w surowicy krwi warchlaków można stwierdzić podobną co w przypadku poziomu kortyzolu zależność. W grupach, u których zastosowano zapach mleka i lawendy, podwyższony poziom ACTH jest reakcją na stres. Natomiast w pozostałych grupach poziom ACTH nie odbiega od wartości normatywnych.

Konsekwencją rzadkiego pobierania paszy jest obniżenie odporności, podatność na choroby i pasożyty oraz słabe przyrosty. Pobieranie paszy zmniejszają niekorzystne warunki środowiskowe, socjalne, choroby i stres (McLaughlin, 1983). Przyjemne zapachy oddziałują na mózg, wzmagając apetyt. Warchlaki preferują zapachy słodkie, owocowe, maślane i zielone, pobierają wtedy więcej paszy, można również wtedy odnotować wśród nich większe przyrosty (Matteri, 2001).

Analizując zachowanie warchlaków poddanych działaniu atraktantów zapachowych w zadaniu drugim, dotyczącym wpływu zapachów na zachowania pokarmowe, stwierdzono, podobnie jak inni autorzy, pozytywny wpływ na częstotliwość pobierania paszy gdy zastosowano zapachy trawy, mleka i jabłek. Dezodoryzację różnymi zapachami można z powodzeniem stosować w produkcji trzody chlewnej jako środek ograniczający agresję przy łączeniu grup oraz jako stymulator pobierania paszy.

Piśmiennictwo

- Adkins-Regan E. (1998). Hormonal Mechanisms of Mate Choice. *Amer. Zool.*, 38: 166–178.
- Duija M.J.M. (1989). 80 suckling piglets in one large group. *Prakt. Verk.*, 3: 25–26.
- Ekkel E.D., Doornvan C.E.A., Hessing M.J.C., Tielens M.J.M., (1995). The Specific-Stress-Free Housing System has positive effects on productivity, health and welfare of pigs. *Vet. Quart.*, 14: 217–231.
- Fitko R., Kowalski A., Zieliński H. (1992). Poziom hormonów stresowych u prosiąt w różnej pozycji hierarchicznej w grupach. *Med. Wet.*, 48 (2): 66–68.
- Friend T.H., Knabe D.A., Tanksley Jr. T.D. (1983). Behaviour and performance of pigs grouped by three different methods at weaning. *J. Anim. Sci.*, 57 (6): 1406–1411.
- Gardner J.M., Widowski T.M., de Lange C.F.M., Duncan I.J.H. (2000). Investigation into the causation of belly-nosing in early-weaned piglets. 5th ISAE North American Regional Meeting University of Guelph, Ontario, Canada, June 10–11.
- Hahn G.L., Nienaber A. (1989). Air temperature selection guides for growing-finishing swine based on performance and carcass composition. *Swine Res. Prg. Rep.*, 3: 72–76.

- Held S., Mendl M. (2001). Behaviour of the young weaner pig. CAB International: The Weaner Pig: Nutrition and Management (eds M.A. Varley and J. Wiseman).
- Jacela J.Y., De Rouchey J.M., Tokach M.D., Goodband R.D., Nelssen J.L., Renter D.G., Dritz S.S. (2010). Feed additives for swine: Fact sheets – flavors and mold inhibitors, mycotoxin binders, and antioxidants. *J. Swine Health Prod.*, 18 (1): 27–32.
- De Jong I.C. (2000). Chronic stress parameters in pigs: Indicators of animal welfare? PhD Thesis, Department of Behaviour, Stress Physiology and Management, Institute for Animal Science and Health, Lelystad and University of Groningen, The Netherlands.
- Kowalski A. (1996). Behavioralne i hormonalne wskaźniki adaptacyjne u szczurów i świń. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst. Vet.*, 22 (512), suppl. C: 1–61.
- Lengerken G., Pfeiffer H. (1991). Reduction of stress and stress susceptibility in pigs as prerequisite for quality and quantitatively high results. *Z. Arch. Tierz.*, 34 (3): 241–247.
- Matteri R.L. (2001). Overview of central targets for appetite regulation. *J. Anim. Sci.*, 79 (E. Suppl.): E148–E158.
- Mc Glone J.J., Morrow J.L. (1988). Reduction of pig agonistic behavior by androstenone. *J. Anim. Sci.*, 66: 880–884.
- Mc Laughlin C.L., Baile C.A., Buckholtz L.L., Freeman S.K. (1983). Preferred flavors and performance of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 56, 6: 1287–1293.
- Pluske J.R., Williams I.H., Aherne F.X. (1996). Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Anim. Sci.*, 62 (01): 131–144.
- Roura E. (2004). Recent studies on the biology of taste and olfaction in mammals. New approaches in pig nutrition. *Lucta SA, AVESUI 2004 Tp_Lucta_2004_piglet_behav_florianopolis_en.pdf*
- Sommerville B.A., Broom D.M. (1998). Olfactory awareness. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 57: 269–286.
- Torrallardona D., Llauradó L.L., Roura E., Matas J., Fort F. (2000). The use of flavours in feed improves performance of piglets weaned at 21 days of age. In: Book of abstracts of the 51st Annual Meeting of the EAAP, The Hague, The Netherlands, 21–24 August, 6, p. 346.
- Torrallardona D., Salvadó R., Matas J., Fort F., Roura E. (2001). In: Book of abstracts of the 52nd Annual Meeting of the EAAP, The Hague, The Netherlands, 21–24 August, 7, p. 297.
- Wiepkema P.R. (1987). Developmental Aspects of Motivated Behavior in Domestic Animals *J. Anim. Sci.*, 65: 1220–1227.

Zatwierdzono do druku 21 VI 2011

AGATA SZEWCZYK

Effect of olfactory stimuli on weaners

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of odour stimuli on the possibility of reducing the signs of weaning stress in piglets. The experimental material consisted of 2,250 commercial crosses of piglets kept in groups of the same size without litter. They were fed according to the farm's feeding scheme in heated and mechanically ventilated rooms. Two tasks were performed in this experiment. The first was to determine the influence of masking odorants on reducing aggression in piglets during grouping. The second task was to determine the impact of olfactory stimulants on feeding behaviour during postweaning stress. The results showed that aggressive behaviour was reduced by such odours as boar odour, skatole and vinegar. The smell of grass, milk and apple had a positive impact on feeding frequency.

Key words: weaned piglets, stress, attractant smells, reduction of aggression

**INSTRUKCJA DLA AUTORÓW
PRAC NAUKOWYCH
DRUKOWANYCH
W „ROCZNIKACH NAUKOWYCH ZOOTECHNIKI”**

I. Zasady ogólne

1. W „Rocznikach Naukowych Zootechniki” drukuje się oryginalne prace naukowe, które zarówno w części, jak i w całości nie były dotąd publikowane w innym czasopiśmie naukowym, z wyjątkiem doniesień w materiałach sympozjów i konferencji naukowych. Zgłoszone prace winny być tak zredagowane i udokumentowane, by stanowiły zamkniętą całość.
2. W „Rocznikach Naukowych Zootechniki” publikuje się również artykuły o charakterze przeglądowym. Maksymalna objętość pracy nie może przekraczać 20 stron maszynopisu, a literatura 30 pozycji. Na końcu artykułu należy umieścić streszczenie w języku polskim oraz słowa kluczowe. Prace winny zawierać najnowszą wiedzę z danej dziedziny nauki oraz aktualną literaturę.
3. „Roczniki Naukowe Zootechniki” obejmują następujące działy tematyczne: genetyka i hodowla zwierząt gospodarskich, biologia, fizjologia i rozród zwierząt, żywienie zwierząt i paszoznawstwo, środowisko, zoohigiena i technologia produkcji zwierzęcej, ekonomika i organizacja produkcji zwierzęcej. Druk w odpowiednim dziale winien być sugerowany przez autora(ów) pracy z tym, że wiążącą decyzję podejmuje Redakcja.
4. Do druku przyjmowane są prace w języku polskim wraz ze streszczeniem w języku angielskim.
5. Maksymalna objętość prac oryginalnych przeznaczonych do druku wraz z tabelami, rysunkami, fotografiami itp. oraz streszczeniami nie może przekraczać 16 stron maszynopisu formatu A4 oraz 20 pozycji piśmiennych.
6. Prace są oceniane przez dwóch recenzentów, samodzielnych pracowników naukowych – specjalistów w zakresie problematyki poruszanej w pracy. Już jedna negatywna recenzja oznacza nieprzyjęcie pracy do druku.
7. Korekta autorska tekstu winna być przeprowadzona w ciągu 5 dni od daty jej otrzymania. Poprawki w stosunku do maszynopisu nie mogą przekraczać 1% objętości pracy.
8. Koszty publikowania prac ponoszą autorzy lub instytucje, z których prace zostały nadesłane, według aktualnie obowiązujących stawek przygotowania do druku i druku prac.

II. Zgłaszanie prac

1. Prace przeznaczone do druku zgłaszają redaktorowi naczelnemu pracownicy naukowcy, naukowo-badawczy lub kierownicy placówek naukowych, w których zgłoszona praca została wykonana, biorąc na siebie odpowiedzialność za ich treść, poziom naukowy i przygotowanie tekstu.
2. Prace należy nadsyłać w trzech jednakowo brzmiących egzemplarzach pod adresem: Redakcja „Roczników Naukowych Zootechniki”, Instytut Zootechniki, ul. Sarego 2, 31-047 Kraków, tel. 12 422-7333 w. 29; e-mail: roczniki@izoo.krakow.pl; mbielska@izoo.krakow.pl, uwzględniając następujące wymogi:

Płytki CD

Wydruk: w 3 egzemplarzach

Edytor: Word for Windows

Format strony: A4 (210 × 297 mm)

Czcionka: CG Times 11 punktów lub Times New Roman 12 punktów

Marginesy: 25 mm (lewy, prawy, górny, dolny)

Interlinia: odstęp podwójny

Wyrównanie: do lewej i prawej

Wzory matematyczne: edytor równań

Tabele: funkcja tworzenia tabel

Uwaga: klawisza ENTER należy używać wyłącznie w celu rozpoczęcia nowego akapitu.

3. Do maszynopisu pracy należy dołączyć kartę zgłoszenia według wzoru podanego na końcu tej instrukcji.
4. Oprócz maszynopisu prosimy również o przysłanie pracy pocztą elektroniczną na e-mail: roczniki@izoo.krakow.pl lub mbielska@izoo.krakow.pl

III. Układ pracy

1. Strona tytułowa (nienumerowana), której nie wlicza się do objętości pracy, winna zawierać:

- tytuł pracy,
- pełne imiona i nazwiska autora(ów) z odnośnikami cyfrowymi dotyczącymi miejsca pracy autorów w czasie wykonywania pracy i nazwę placówki z dokładnym adresem (kod miejscowości, ulica, nr), w której praca została wykonana, np.:

Jan Kowalski¹, Maria Anna Rokicka², Adam Nowacki³

¹ Uniwersytet Jagielloński, Katedra Zoologii, ul. św. Anny 12, 30-017 Kraków

² Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Immuno- i Cytogenetyki,
32-083 Balice k. Krakowa

³ Zakład Doświadczalny Instytutu Zootechniki, 39-331 Chorzelów

- tytuł skrócony (5–6 słów jak w tytule pracy lub synonimów),
- źródło finansowania badań, np. praca finansowana z: działalności statutowej, temat nr..., projektu autorskiego KBN nr..., funduszy MR i GŹ, EWG, itp., projekt nr...

2. Praca winna zawierać:

- a) **Abstrakt** nieprzekraczający 15–20 wierszy obejmujący: cel badań, główne założenia metodyczne i najważniejsze wyniki. Na końcu artykułu należy na osobnej stronie umieścić identyczne streszczenie w języku polskim i angielskim (streszczenia polskiego nie wlicza się do objętości tekstu), z podaniem imienia i nazwiska autora(ów) i tytułu pracy.
- b) **Słowa kluczowe**. Należy podać maksimum pięć słów kluczowych, które najtrafniej ujmują treść pracy, rozpoczynając od słów o szerszym znaczeniu, kończąc na znaczeniu węższym, np.: przeżuwacze, krowy mleczne, somatotropina, prolaktyna, mleko.
- c) **Wstęp** – winien zawierać uzasadnienie podjętych badań na podstawie przeglądu piśmiennictwa oraz w zakończeniu jasno sformułowany cel badań lub hipotezę badawczą.
- d) **Materiał i metody**. Rozdział ten winien zawierać wszystkie niezbędne informacje dla ewentualnego powtórzenia badań, np.: czynniki doświadczalne, układ doświadczenia, gatunek, rasa i płeć oraz liczba zwierząt, czas trwania doświadczeń, dawki pokarmowe i ich skład, techniki laboratoryjne i zastosowane metody statystyczne. W opisie metod (biologicznych, chemicznych, statystycznych) wystarczy powołać się na dane źródłowe, jeśli zastosowano je w sposób wierny. Modyfikacje metod należy szczegółowo opisać.
- e) **Wyniki** można przedstawić w postaci tabel lub w formie graficznej (wykresy, diagramy, zdjęcia) oraz ich syntetycznego opisu. Tekst opisu nie powinien powtarzać danych liczbowych zawartych w tabelach.
- f) **Omówienie wyników**. W tej części pracy należy przedstawić interpretację wyników badań w aspekcie oddziaływania badanych czynników doświadczalnych, zgodnie z celem badań lub hipotezą zawartą we wstępie pracy. Wyniki należy interpretować w oparciu o dotychczasowy stan wiedzy, tak by zainteresowanemu nimi czytelnikowi pozwolić odrzucić lub potwierdzić hipotezę badawczą. Rozdział ten winien się kończyć podsumowaniem i uogólnieniem uzyskanych wyników. Można tu zamieścić również sugestie dotyczące kierunków dalszych badań w tym zakresie.
- g) **Ewentualne podziękowania**.

h) **Piśmiennictwo.** Pozycje literatury cytowanej w pracy należy zamieścić w porządku alfabetycznym według nazwisk autorów. Każda z nich powinna zawierać nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), rok wydania, pełny tytuł pracy, skrót nazwy czasopisma, nr tomu i zeszytu oraz pierwszą i ostatnią stronę pracy. Jeśli cytuje się więcej niż jedną pracę tego samego autora(ów) wydaną w tym samym roku a autorzy występują w tej samej kolejności, prace należy oznaczyć kolejnymi literami alfabetu, np. 1983 a, 1983 b i zamieścić w porządku chronologicznym. Poniżej podano prawidłowy sposób cytowania pozycji piśmiennictwa z czasopism naukowych, doniesień kongresowych i pozycji książkowych (podręcznikowych).

Prace w czasopismach periodycznych: Jenkins K.J., Hidioglou M. (1991). Tolerance of the preruminant calf for excess manganese or zinc in milk replacer. *J. Dairy Sci.*, 74: 1047-1053.

Prace w monografiach wielu autorów, wydawnictwach okazjonalnych, doniesieniach z sympozjów i kongresów: Miller E.L. (1982). Forage protein in ruminant animal nutrition. The nitrogen needs of ruminants. In: DJ. Thomas (Editor), *Proceedings of an International Symposium on Protein Requirements for Cattle*. Kansas State University, Kansas City, KN, pp. 254-269.

Książki wielu autorów: Bock H.D., Eggum B.O., Low A.G., Simon O., Zebrowska T. (1989). *Editors, Protein metabolism in farm animals: evaluation, digestion, absorption and metabolism*. Oxford, UK, Oxford University Press (1989), 452 pp.

Książki: Cuhna T.J. (1991). *Horse feeding and nutrition*. San Diego, USA, Academic Press, Inc. (1991). Second edition, 445 pp.

3. Sposób cytowania literatury. Należy cytować wyniki badań (lub ich autorów) ściśle wiążących się z tematem pracy lub stosowanymi metodami badawczymi. Liczba piśmiennictwa nie powinna przekraczać 20 najistotniejszych pozycji cytowanych w tekście pracy. Jeśli w cytowanej pracy występuje więcej niż dwóch autorów, wówczas po nazwisku pierwszego autora należy stosować formę „i in.”, np. Nowacki i in. (1992). Prace niepublikowane należy cytować w tekście następująco: Błoński (informacja własna) lub (Błoński, dane nieopublikowane).

4. Tabele powinny zawierać najważniejsze dane. Kolumna z lewej strony powinna zawierać wykaz badanych parametrów a kolumny w środku i po prawej stronie — wyniki badań dla poszczególnych czynników doświadczalnych. Tabele winny zawierać dane liczbowe będące wartościami średnimi dla zbioru obserwacji lub pomiarów, powtórzeń itp. oraz ich statystyczną interpretację (np. błąd standardowy, współczynnik zmienności). Tabele oznaczone kolejnymi cyframi arabskimi należy przestać na oddzielnych kartkach. Tytuły winny być zwięzłe. Opis tabel winien zawierać tłumaczenie na język angielski umieszczone pod tekstem polskim. Każda kolumna winna posiadać nagłówek. W celu oddzielenia kolumn i wierszy należy stosować odstęp. Nie umieszczają linii pionowych. Linie poziome mogą być użyte tylko w ściśle uzasadnionych przypadkach.

Danych zawartych w tabelach nie należy powtarzać w postaci graficznej (wykresy, diagramy itp.). Jeśli brak jest danych dla określonego parametru, należy pozostawić puste miejsce. Jeśli konieczny jest komentarz wyjaśniający, należy użyć skrótu (np. NO) a jego znaczenie wyjaśnić pod dolną linią tabeli, np. NO – nie oznaczono lub nie wykryto. Aby oznaczyć istotność różnic dwóch średnich lub interakcji czynników, należy stosować dodatkową kolumnę z nagłówkiem „poziom istotności różnic” oraz posługiwać się znakami x, xx, xxx dla poziomu prawdopodobieństwa $P \leq 0,05$, 0,01 i 0,001. Przy większej od dwóch liczbie średnich, istotność różnic należy oznaczyć literami umieszczonymi w tabelach za danymi liczbowymi. Pod dolną linią tabeli należy objaśnić ich znaczenie, np.:

a, b, c, d – wartości w wierszach (lub kolumnach) oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$).

A, B, C, D – jak wyżej dla $P \leq 0,01$.

Interpretacja statystyczna wyników winna być adekwatna do układu doświadczenia i testowanych hipotez badawczych.

5. **Rysunki i zdjęcia.** Graficzne opracowanie wyników badań w formie rysunków, wykresów i diagramów winno być dostarczone na dyskietce, wykonane na kalce technicznej lub w innej formie gotowej do reprodukcji. Pojedynczy rysunek lub wykres winien mieścić się na połowie jednej strony tekstu. Zdjęcia czarno-białe lub kolorowe o wymiarach pocztówki powinny być kontrastowe. Każdy rysunek lub zdjęcie powinny posiadać dołączony opis zawierający syntetyczną informację o treści i ewentualne objaśnienia (legende) w języku polskim. W tekście pracy powołanie się na rysunek lub zdjęcie winno być zaznaczone stosownym odnośnikiem lub informacją.

Rysunki i fotografie należy składać w dwóch kompletach.

6. Przy użyciu skrótów należy je objaśnić w miejscu, gdzie pojawiają się po raz pierwszy. Jednostki miar należy podawać według Międzynarodowego Układu Jednostek Miar SI. Dotyczy to również charakterystyki wartości energetycznej pasz, która winna być podawana w dżulach.
7. Dodatkowe informacje. Autor pracy po otrzymaniu recenzji winien się do nich ustosunkować, uwzględnivszy zawarte w nich wskazówki dotyczące zmian i poprawek, i w terminie maksimum 3 tygodni odesłać komplet otrzymanych materiałów wraz z poprawioną wersją pracy. Nieprzesłanie pracy w terminie spowoduje przesunięcie jej druku do następnego zeszytu.

miejsowość

data

„Roczniki Naukowe Zootechniki”
Karta zgłoszenia pracy

nr kolejny RNZ
(wypełnia redakcja)

Proszę o ocenę i druk załączonej pracy w „Rocznikach Naukowych Zootechniki”:

1. Autorzy, tytuł pracy

.....
.....
.....

2. Zgłaszający: Imię i nazwisko

Adres miejsca pracy (uczelnia, katedra, kod, miejscowość, ulica, nr)

Telefon, e-mail, faks

3. Propozycja działu w RNZ:

genetyka i hodowla zwierząt gospodarskich
biologia, fizjologia i rozród zwierząt
żywienie zwierząt i paszoznawstwo
środowisko, zoohigiena i technologia produkcji zwierzęcej
ekonomika i organizacja produkcji zwierzęcej

4. Oświadczam, że zgłoszona do druku praca tak w całości jak i części nie była dotąd publikowana ani też zgłoszona do druku w innym czasopiśmie naukowym.
5. Oświadczam, że treść pracy znana jest współautorom pracy i że wyrazili oni zgodę na jej druk w przedstawionej postaci.
6. Zobowiązuję się do pokrycia kosztów publikacji pracy po jej ukazaniu się, zgodnie z aktualną ceną druku (NIP płatnika).

.....
podpis zgłaszającego

Czasopismo indeksowane przez bazę danych

POLISH SCIENTIFIC JOURNAL CONTENTS
— AGRIC.&BIOL. SCI.

prezentowaną w sieci **INTERNET** pod adresem URL (Uniform Resource
Locator):

<http://psjc.icm.edu.pl>

Kolportaż

Zamówienia na prenumeratę oraz sprzedaż pojedynczych egzemplarzy prosimy kierować pod adresem:
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zespół Wydawnictw i Poligrafii, ul. Sarego 2,
31-047 Kraków. Cena: prenumerata roczna krajowa 40,00 zł.

SPIS TREŚCI

Artykuły przeglądowe

1. E. Hanczakowska, A. Szewczyk – Krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe w żywieniu prosiąt 3
2. D. Bederska – Zastosowanie techniki nokautu genowego, analizy sekwencji mikrosatelitarnych oraz szczepów wsobnych myszy w mapowaniu genów odpowiedzialnych za spermatogenezę. . . 11

Genetyka i hodowla zwierząt gospodarskich

3. A. Kawęcka, K. Piórkowska – Charakterystyka struktury genetycznej polskiej owcy górskiej odmiany barwnej 21
4. M. Szkudlarek-Kowalczyk, E. Wiśniewska, S. Mroczkowski – Polimorfizm genu kalpastatyny w populacji owiec rasy merynos polski 29
5. J. Calik – Parametry produkcyjne i genetyczne dwóch rodów kur rhode island white poddawanych pracy hodowlanej 35

Biologia, fizjologia i rozród zwierząt

6. M. Samiec, M. Skrzyszowska – Wpływ systemów dojrzewania *in vitro* oocytów świni na rozwój zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego 45

Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo

7. B. Niwińska, E. Hanczakowska, K. Węglarzy – Efektywność wychowu cieląt otrzymujących pasze wzbogacone w glutaminę, glukozę lub maślan sodu 61
8. M. Rajchert, P. Gajewczyk, E. Płazak – Wpływ zastosowania płynnego zakwaszacza z mieszkanką typu prestarter na wyniki odchowu prosiąt 73
9. A. Chełmińska, D. Kowalska – Rola wapnia i żelaza w żywieniu intensywnie użytkowanych samic królików 87

Środowisko, zoohigiena i technologia produkcji zwierzęcej

10. A. Szewczyk – Oddziaływanie bodźców zapachowych na warchlaki w okresie okołoodsadzeniowym 97