

nienie się. Wiąże się to ze znacznym wzrostem ryzyka pojawienia się niekorzystnych efektów w postaci fenotypowej. Kompleks tych niepożądanych efektów jest określany jako depresja inbredowa. Są one głównie związane z reprodukcją i przeżywalnością oraz wpływają niekorzystnie na produktywność, wzrost i wydajność rzeźną.

Skutki inbredu

Wartość inbredu dla poszczególnego osobnika jest mierzona procentowym wskaźnikiem inbredu, który jest prawdopodobieństwem wystąpienia określonych genów odziedziczonych po wspólnym przodku. Wskaźnik inbredu mierzy procent wzrostu homozygotyczności osobnika w stosunku do średniej populacji, z której ten osobnik pochodzi.

Przy pomocy programów komputerowych można szybko obliczyć wskaźnik inbredu dla poszczególnych zwierząt, jeśli znane są ich rodowody. W tabeli zamieszczono wskaźniki inbredu potomstwa pochodzącego z określonych rodzajów kojarzeń przy założeniu, że rodzice tych zwierząt nie byli spokrewnieni.

Tabela

Wskaźniki inbredu przy różnych rodzajach kojarzeń

Rodzaj kojarzenia	Wskaźnik inbredu (%)
Brat x siostra	25
Półbrat x siostra	12,5
Ojciec x córka	25
Babka x wnuk	12,5
Wspólni dziadkowie (kuzynostwo)	6,25

Z definicji pojęcia „hodowla” wynika, że jest to wybór (selekcja) lepszych genów w populacji. To niejako automatycznie oznacza, że inbred jest rezultatem selekcji. Nie byłoby w tym nic złego, gdybyśmy sobie radzili z kontrolowaniem i utrzymywaniem inbredu na niskim poziomie. Jeśli wskaźnik inbredu rośnie powoli, wystarczająco staranne brakowanie i ostre kryteria selekcyjne, aby wyeliminować z populacji niepożądane geny i słabe zwierzęta.

Stwierdzono, że najniebezpieczniejszy jest szybki i niekontrolowany przyrost inbredu w ciągu jednego pokolenia, mogący prowadzić do depresji inbredowej. Największe negatywne skutki inbredu to:

- obniżenie zmienności genetycznej i redukcja potencjalnego postępu genetycznego;
- pogorszenie cech funkcjonalnych i reprodukcji zwierząt, np. niższy wskaźnik płodności;
- możliwy wzrost występowania defektów genetycznych.

Inbred opanowany

Najczęściej celem hodowców bydła holsztyńskiego jest uzyskanie wzrostu średniej wydajności w stadzie, dlatego niedopuszczenie

do wzrostu inbredu jest zadaniem zarówno dla nich samych, jak i zrzeszających ich organizacji.

Hodowcy holsztyńsko-fryzów mogą kontrolować wzrost inbredu, szczegółowo analizując rodowody zarejestrowane w księgach hodowlanych przed podjęciem decyzji o kojarzeniu krowy z danym buhajem oraz korzystając z profesjonalnych programów do kojarzeń, które głęboko kontrolują rodowody i w założeniach unikają doboru prowadzącego do wzrostu inbredu powyżej wyznaczonego poziomu. Organizacje prowadzące księgi dla rasy holsztyńsko-fryzyskiej oraz podmioty inseminacyjne powinny monitorować inbred w populacji i stosować taką politykę hodowlaną, aby nie przekroczyć wyznaczonego wskaźnika.

Wkrótce zastosowanie selekcji genomowej może pomagać w unikaniu negatywnych aspektów inbredu w hodowli bydła. Odbywać się to będzie różnymi drogami:

- w porównaniu z ostrzejszą selekcją tradycyjną selekcja genomowa umożliwi uzyskanie wyższego postępu genetycznego przy takim samym poziomie inbredu;
- genomika umożliwi wczesną detekcję niepożądanych genów recesywnych i określenie, czy dane zwierzę jest nosicielem schorzenia, a informację tę będzie można wykorzystać przy doborze do kojarzenia;
- nie mniej ważne jest to, że dzięki genomice można obliczyć wskaźnik inbredu i stopień pokrewieństwa już na poziomie DNA.

Cała prawda o inbredzie

- Inbred jest rezultatem kojarzenia spokrewnionych osobników i pojawia się w każdej populacji, w której jest prowadzona selekcja.
- Spokrewnione zwierzęta wprowadzają do populacji zarówno geny korzystne, jak i niepożądane.
- Depresja inbredowa wpływa negatywnie na cechy związane z reprodukcją (np. płodność) oraz na wzrost, produkcję mleka i minimalnie na wydajność rzeźną.
- W krajach wiodących w hodowli rasy holsztyńskiej uznano, że dopuszczalny poziom inbredu w populacji tej rasy nie może przekroczyć 5%.
- Kontrolowanie tempa przyrostu inbredu podczas jednego pokolenia ma większe znaczenie niż całkowity poziom inbredu w populacji.
- Obniżenie zmienności genetycznej poprzez wzrost inbredu prowadzi do niższego postępu genetycznego.
- Selekcja genomowa może ułatwić zarządzanie wzrostem inbredu.
- Rośnie rola organizacji prowadzących księgi rasy holsztyńskiej w monitorowaniu poziomu inbredu w populacji.
- Hodowcy muszą aktywnie włączyć się w zwalczanie inbredu, kojarząc zwierzęta po wnikliwej analizie ich rodowodów i korzystając z profesjonalnych komputerowych programów doboru.

Laparoskopowe przenoszenie zarodków świń – metody i wyniki

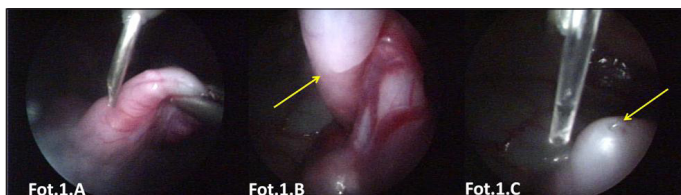
Jarosław Wieczorek, Yuriy Kosenyuk,
Izabela Grad, Mirosław Cegła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

W ostatnich kilkunastu latach dokonał się znaczący postęp w dziedzinie biotechnologii rozrodu zwierząt, dotyczący pozaustrojowego uzyskiwania zarodków i ich kriokonserwacji, transgenezy, klonowania, regulacji płci na poziomie gamet i zarodków oraz klonowania. Rozwój tych kierunków biotechnologii napotyka też na ograniczenia, m.in. z powodu braku prostych, efektywnych i nieinwazyjnych

metod przenoszenia zarodków. Dlatego celem badań prowadzonych w Instytucie Zootechniki było opracowanie laparoskopowej metody przenoszenia zarodków u świń, jako alternatywy dla stosowanej obecnie metody chirurgicznej.

Metoda chirurgiczna przenoszenia zarodków u świń jest inwazyjna, wiąże się z przerwaniem ciągłości powłok brzusznych i otrzewnej na długości 10-15 cm, wyjęciem macicy, jajowodów i jajnika na zewnątrz, ich repozycją po zdeponowaniu zarodków, a następnie założeniem 3 pięter szwów na powstałą ranę oraz stosowaniem środków przeciwbólowych i profilaktycznej antybiotykoterapii przez około 3-5 dni. Wysoka traumatyzacja tkanek w trakcie zabiegu wiąże się z długim okresem gojenia i bardzo dużym ryzykiem wystąpienia zrostów w obrębie macicy, jajowodów i jajników, które często eliminują zwierzęta z rozrodu. Doświadczenie własne wskazuje, że do powstawania zrostów dochodzi niemal po każdym zabiegu chirurgicznego przenoszenia czy pozyskiwania zarodków. Ponadto metody chirurgiczne, jako metody inwazyjne, coraz trudniej znajdują akceptację społeczną. Tendencje te znajdują odzwierciedlenie w regulacjach prawnych, które stają się coraz bardziej restrykcyjne. Obecne regulacje prawne dotyczące doświadczeń na zwierzętach wprowadzają obowiązek zastępowania do-



Fot. 1. Domaciczne laparoskopowe przenoszenie zarodków u świń

A – róg macicy przed wprowadzeniem kateteru; B – kateter w świetle macicy, przed zdeponowaniem zarodków (koniec zaznaczony strzałką), C – elastyczny kateter po usunięciu z macicy (strzałką zaznaczono miejsce po punkcji)

świadczeń inwazyjnych mało lub nieinwazyjnymi metodami alternatywnymi. Alternatywą dla metod chirurgicznych przenoszenia zarodków są mało inwazyjne techniki laparoskopowe. Pozwalają one na wykonanie zabiegu przy minimalnej inwazyjności oraz ograniczają ingerencję chirurgiczną do bezwzględniego minimum, przy minimalnej ingerencji w ciągłość powłok brzusznych. W ogólnie przyjętym modelu laparoskopowego przenoszenia zarodków do jamy brzusznej zakłada się 3-5 trokarów o grubości 5-10 mm. Powstałe po ich usunięciu rany w obrębie otrzewnej nie wymagają szycia, zakłada się jedynie pojedyncze szwy na skórę. Nie dochodzi także do powstawania zrostów w obrębie narządów wewnętrznych. Z doświadczeń na kozach i owcach wynika, że do powstawania powikłań po zabiegach laparoskopowych w postaci zrostów w obrębie otrzewnej i narządów wewnętrznych może dojść dopiero po czwartym lub piątym zabiegu u tego samego zwierzęcia [8, 9]. Bezsrodkowo po zabiegu zwierzę może powrócić do stada i swojego środowiska. W porównaniu z metodami chirurgicznymi, techniki laparoskopowe pozwalają znacznie skrócić czas wykonywania zabiegu [1, 3, 4], dają też możliwość zastosowania metody w warunkach terenowych, zapewniają łatwy dostęp do środkowych czy końcowych odcinków rogów macicy, umożliwiają wielokrotne stosowanie zabiegu u tych samych dawczyń czy biorczyń, są bezpieczne dla zwierząt ze względu na brak lub minimalną podaż i krótki czas stosowania środków anestetycznych [2], wykluczają lub ograniczają do bezwzględniego minimum urazowość zabiegu, eliminują możliwość wystąpienia wtórnych powikłań pooperacyjnych [1]. Ponadto pozwalają na znaczne zmniejszenie ryzyka przenoszenia chorób zakaźnych [3, 5] oraz na znaczące ograniczenie kosztów związanych ze zużyciem materiałów chirurgicznych oraz opieki około- i pooperacyjnej.

U świń zabieg laparoskopowego przenoszenia zarodków jest najtrudniejszy do wykonania ze wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich. Bariery i utrudnieniem jest tutaj specyficzna budowa anatomiczna macicy. Wyjątkowa długość rogów macicy, sięgająca 50 cm, a u niektórych zwierząt nawet 100 cm, sprawia, że metody nieinwazyjne są u świń trudne technicznie i wymagają dużej wprawy manualnej oraz użycia oryginalnych zestawów kateterów. W przeprowadzonych badaniach zakładano opracowanie własnej oryginalnej metody przenoszenia zarodków świni do macicy oraz przygotowania odpowiedniego zestawu kateterów. Wstępna seria badań

Tabela 1

Efektywność pozyskiwania hodowli zarodków *in vitro*

Liczba uzyskanych zarodków	Liczba zarodków zakwalifikowanych do hodowli <i>in vitro</i>	Liczba zarodków rozwiniętych do stadium blastocysty
577	575 (99,6%)	547 (94,8%)

Tabela 2

Efektywność laparoskopowej metody przenoszenia zarodków u świń

Liczba biorczyń	Łączna liczba przenoszonych zarodków	Średnia liczba zarodków przenoszonych do 1 biorczynie	Liczba ciężarnych biorczyń
15	547	36,7	6 (40%)

Tabela 3

Przeżywalność prosiąt urodzonych po laparoskopowym przeniesieniu zarodków

Wyszczególnienie	Liczba prosiąt urodzonych	Liczba prosiąt żywo urodzonych	Liczba prosiąt padłych po urodzeniu	Liczba prosiąt odsadzonych
Łącznie	57	47 (82,5%)	6 (10,5%)	41 (71,9%)
Średnio na 1 biorczynię	9,5	7,8	1	6,8



Fot. 2. Pierwsze w Polsce prosięta urodzone po laparoskopowym przeniesieniu zarodków

na narządach izolowanych, uzyskiwanych od zwierząt poubojowo, wykazała realną możliwość opracowania metody szybkiego, skutecznego i mało urazowego wprowadzania zarodków do macicy świni. Badania polegały na przeniesieniu zarodków do światła macicy metodą laparoskopową, przy użyciu oryginalnego zestawu kateterów, których prototyp opracowano. Do światła macicy przenoszono zarodki w stadiach rozwojowych późnej moruli lub wczesnej blastocysty, których wiek i stadium rozwojowe odpowiadało zarodkom w macicy w stanie naturalnym. Przy przeniesieniu zarodków do macicy przyjmuje się zasadę deponowania ich w miejscu pozyskania, natomiast gdy uzyskano je *in vitro* o miejscu deponowania decyduje wiek i stadium rozwojowe zarodków.

Dawczyniami (n=40) i biorczyniami (n=15) zarodków były loszki w wieku 6-8 miesięcy, o masie ciała od 80 do 110 kg, bez widocznych objawów chorobowych, pochodzące z jednego gospodarstwa. Biorczynie i dawczynie poddawano standardowej synchronizacji cyklu płciowego, a dawczynie superowulacji, według schematu stosowanego w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB. Zarodki w stadium 2-4 blastomerów były chirurgicznie wyplukiwane z jajowodu. Pozyskane zarodki hodowano *in vitro* przez 4 dni do stadium blastocysty, po czym przenoszono je laparoskopowo zsynchronizowanym biorczyniom. W tym celu do jamy brzusznej wprowadzano trzy trokary, przez które zakładano endoskop i dwie chwytaki do stabilizacji macicy. W pierwszej kolejności do jamy brzusznej wprowadzano endoskop między 3. a 4. parą sutek, 5-10 cm lewostronnie od linii środkowej brzucha. Po wprowadzeniu endoskopu jamę brzuszną wypełniano gazem i dokonywano oględzin narządów wewnętrznych. Po oględzinach zakładano kolejne dwa trokary, jeden w linii środkowej brzucha między 2. a 3. parą sutek, drugi prawostronnie 5-10 cm od linii środkowej brzucha, między 4. a 5. parą sutek. Przez trokary wprowadzano chwytaki do stabilizacji rogu macicy. Róg macicy stabilizowano przez zaciśnięcie macicy możliwie blisko ujścia jajowodu (Fot.1.A), a zarodki deponowano w początkowym odcinku rogu macicy. Zbyt głębokie deponowanie zarodków w końcowym odcinku rogu wydaje się być niekorzystne i dawać mniejszą liczbę ciąży i prosiąt w miocie [6, 7]. Dlatego za optymalne miejsce do deponowania zarodków u świń przyjmuje się początkową lub środkową część rogu macicy [6, 7]. Po ustabilizowaniu macicy do jamy brzusznej wprowadzano igłę, którą nakłuwno macicę (Fot.1.A). Przez igłę do światła macicy wprowadzano tępy, giętki kateter z zarodkami, na głębokość 3-5 cm (Fot.1.B i C). Zarodki umieszczano na początku kateteru (1-2 cm) w minimalnej objętości płynu do hodowli. Zarodki deponowano przez

wstrzyknięcie ich do światła macicy. Po zdeponowaniu kateter, chwytki i trokary były usuwane w odwrotnej kolejności niż przy zakładaniu. Po usunięciu trokarów na skórę zakładano szwy pojedyncze proste. Otrzewna i mięśnie, ze względu na minimalną ranę średnicy 5-10 mm, nie wymagały szycia. Skuteczność metody oceniano na podstawie odsetka ciężarnych biorczyń, badanych USG między 28. a 31. dniem po zabiegu, oraz liczby urodzonych i odchowanych prosiąt.

W trakcie badań od 40 dawczyń poddanych superowulacji pozyskano łącznie 577 zarodków. W tabeli 1 przedstawiono dane dotyczące efektywności hodowli zarodków. Zarodki, które rozwinęły się do stadium blastocysty przenoszono metodą laparoskopową 15 biorczyniom. W tabelach 2 i 3 przedstawiono informacje dotyczące efektywności prezentowanej metody. Ciężę zdiagnozowano u 6 biorczyń (40%). W 6 miotach urodziło się 57 prosiąt, z których 10 było martwych. W okresie poprzedzającym odsadzenie padło dalszych 6 prosiąt, odsadzono 41 prosiąt (71,9%).

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy w Polsce zastosowano laparoskopową metodę przenoszenia blastocyst świńskich

do macicy biorczyń i uzyskano pierwsze prosięta. Sposób transplantacji blastocyst świńskich do macicy oraz zestaw kateterów do realizacji metody został zgłoszony w Urzędzie Patentowym RP i zarejestrowany pod numerem P392128. Zastosowanie metody potwierdziło założenia kliniczne i pozwoliło na wyeliminowanie wad metody chirurgicznej związanych ze znaczną traumatyzacją tkanek i komplikacjami pooperacyjnymi. Proponowana metoda jest alternatywą dla chirurgicznych metod przenoszenia zarodków.

Literatura: 1. Altenhof R.L., Tanksley Jr T.D., Knabe D.A., Harms P.G., Bowen M.J. Kraemer D.C., 1982 – Theriogenology 17, 75. 2. Li J., Rieke A., Day B.N., Prather R.S., 1996 – J. Anim. Sci. 74, 2262-2268. 3. Niemann H, Rath D, Wrenzycki C., 2003 – Reprod. Domest. Anim., Apr. 38 (2), 82-89. 4. Niemann H., Rath D., 2001 – Theriogenology 56, 1291-1304. 5. Riha J., Vejnar J., 2003 – Czech J. Anim. Sci. 48, 508-5189. 6. Stein-Stefani J., Holtz W., 1987 – Theriogenology 27, 278. 7. Tervit H.R., 1996 – Anim. Rep. Sci. 42, 227-238. 8. Wieczorek J., Kosenyuk Y., Rynska B., Cegla M., 2009 – 25th Annual Meeting A.E.T.E. – Poznan, Poland, 11-12 September 2009, p. 272. 9. Wieczorek J., Kosenyuk Y., Cegla M., Rynska B., 2010 – Ann. Anim. Sci. 10 (1), 39-48.

Laparoscopic method for embryo transfer in pigs – methods and results

Summary

The aim of the studies was to develop intrauterine laparoscopic method for embryo transfer in pigs. Five hundred forty seven blastocytes were transferred into uteri of 15 synchronized recipients. The uterus was stabilized by clamping of its horn as soon as possible near Fallopian tube and the embryos were deposited as near as possible at the beginning of the horn. The blastocytes were introduced by original catheter by puncture of uterine wall horn and insertion of elastic blunt catheter inside uterus to the depth of 3-5 cm. The embryos, as being found in minimal quantity of medium, were placed on the front part of the catheter (1-2 cm) and injected into uterus cavity. A single injection contained 36.7 blastocytes. After embryo' insertion, the catheter, grasps and trochars were removed in a reverse sequence than during their insertion. After trochars' removal, the simple single sutures were performed. Peritoneum and muscles were not sutured as the wound size was very small. The effectiveness of the method was evaluated on the ground of the percentage of pregnant recipients, being examined by ultrasonographic method between the 28th – 31st day after embryo transfer and on the basis of the born piglets and the number of the reared piglets. Pregnancy was diagnosed in 6 recipients (40%). In 6 litters, 57 piglets were born (9.5 /1 sow); from this quantity, 41 piglets were reared (71.9%; 6.8/1 sow). The application of the discussed method confirmed the clinical assumptions and allowed eliminating shortcomings of the surgical method. The suggested laparoscopic method is an alternative method to surgical methods for embryo transfer.

KEY WORDS: pigs, embryo transfer, laparoscopy

Lis białoszyjny polski

Piotr Przysiecki¹, Andrzej Filistowicz²,
Włodzimierz Gajzler³, Aneta Filistowicz¹,
Sławomir Nowicki⁴

¹Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Lesznie,

²Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,

³Gospodarstwo Hodowlano-Rolne „Batorówka” w Moszczenicy,

⁴Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Mija właśnie 25 lat od decyzji Ministerstwa Rolnictwa, Leśnictwa i Gospodarki Żywnościowej (PZSf III 4121-13/86), w której uznano oficjalnie lisa białoszyjnego polskiego za nową odmianę lisa pospolitego (na podstawie ustawy z dnia 02.12.1960 roku o hodowli zwierząt gospodarskich, art. 1.1.).

Pierwszy osobnik, który dał początek odmianie polskiego lisa białoszyjnego pojawił się w 1970 roku na fermie „Batorówka” w Moszczenicy (woj. łódzkie), w miocie samicy odmiany srebrzystej [1]. Para lisów odmiany srebrzystej (Trans i Tama) dała 5 młodych, spośród których jedno od początku rozwoju wyróżniało się inną

barwą okrywy włosowej. Najpierw barwa jego okrywy przypominała lisa odmiany białopskiej, ale w miarę wzrostu podobieństwo to zanikało. Lis – nazwany Zwiastunem – dał początek nowej polskiej odmianie barwnej lisa pospolitego. W 1971 roku powtórzone kojarzenie wyjściowej pary lisów srebrzystych (Trans x Tama), jednak nie uzyskano kolejnego mutanta.

W początkowym okresie samice odmiany srebrzystej i platynowej kryto Zwiastunem, a w kolejnych latach wybrane losowo samice odmiany srebrzystej i platynowej kryto „zmutowanymi” samcami. W 1972 roku wprowadzono po raz pierwszy do stada podstawowego samice o umaszczeniu białoszyjnym. Ich liczba w stadzie podstawowym wzrastała do roku 1981, kiedy wyniosła 80 sztuk, następnie się zmniejszała, osiągając w 1995 roku najniższy stan 16 samic (rys. 1). Począwszy od 1996 roku liczba wprowadzanych do stada samic odmiany białoszyjnej ulegała zwiększeniu, osiągając w 2011 roku najwyższy poziom (84 samice). W latach 1970-2011 odsadzono łącznie 3501 samic o umaszczeniu białoszyjnym. Liczba odsadzonych od matek młodych lisów nowej odmiany była zróżnicowana w poszczególnych latach (rys. 2).

Lis odmiany białoszyjnej ma pysk czarny lub ciemnosrebrzysty, z białą obwódką wokół nosa, przechodzącą w strzałkę wzdłuż pyska i czoła. Uszy są czarne, umaszczenie szyi i tułowia jest identyczne jak u lisa ciemnego srebrzystego, ale na szyi występuje biały, symetryczny kołnierz, o szerokości 6-10 cm, który przechodzi pasmem bieli na