

Genetycznie modyfikowana kukurydza MON 810 i poekstrakcyjna śruta sojowa Roundup Ready w żywieniu bydła

Iwona Furgal-Dierzuk¹, Juliusz Strzetelski¹, Krzysztof Kwiatek², Marta Twardowska¹, Małgorzata Mazur², Zbigniew Sieradzki¹, Wojciech Kozaczyński², Dariusz Bednarek², Michał Reichert²

¹*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa*
²*Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Aleja Partyzantów 57, 24-100 Puławy*

Rośliny uprawne genetycznie modyfikowane (GM)

Określenia GM lub GMOs (genetycznie modyfikowane organizmy) są najczęściej używane w odniesieniu do roślin uprawnych, które zostały genetycznie zmodyfikowane przy wykorzystaniu najnowszych technik biologii molekularnej poprzez dodanie obcych genów w celu pojawienia się pożądanej cechy. Uwydatnienie pożądanych cech, podejmowane na drodze tradycyjnych metod hodowli roślin, jest bardzo czasochłonne i często niezbyt dokładne. Z drugiej strony, inżynieria genetyczna pozwala wprowadzić do rośliny wybraną cechę bardzo szybko i z wielką dokładnością. Genetycy roślin mogą wyizolować np. gen odpowiedzialny za tolerancję na suszę i wprowadzić go do różnych roślin. Nowa, genetycznie modyfikowana roślina uzyskuje zwiększoną tolerancję na suszę. Geny mogą być przenoszone nie tylko z jednej rośliny na drugą, ale także z mikroorganizmów na rośliny. Najbardziej znanym przykładem jest wykorzystanie genów bakterii *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) w różnych roślinach, a szczególnie w kukurydzy. Bakteria ta wytwarza białka krystaliczne, które są śmiertelne dla larw owadów z rodzaju błonkówek. Geny *Bt* wytwarzające krystaliczne białko zostały przeniesione do kukurydzy, umożliwiając jej produkcję własnych toksyn przeciwko

insektom, a przede wszystkim przeciwko omacnicy prosowiance (*Ostrinia nubilalis*).

W Polsce istnieje zakaz produkcji, wprowadzania do obrotu i żywienia zwierząt paszami genetycznie modyfikowanymi (GM). W związku z tym, że w kraju nie prowadzono dotychczas badań nad wpływem pasz genetycznie modyfikowanych na produktywność zwierząt gospodarskich i transfer transgenicznego DNA z przewodu pokarmowego do tkanek i narządów oraz do produktów zwierzęcych, zaistniała konieczność przeprowadzenia takich badań.

Badania, prowadzone na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, dotyczyły oprócz zwierząt monogastrycznych (drób, świnie), także zwierząt przeżuwających (krowy, cielęta).

Badania własne

Celem badań było określenie:

- wpływu genetycznie modyfikowanej kukurydzy i poekstrakcyjnej śruty sojowej pochodzącej z GM soi na pobranie suchej masy, produktywność i skład mleka krów oraz na wyniki wychowu cieląt do 3. miesiąca życia;
- zdrowotności krów poprzez oznaczenie profilu metabolicznego krwi;
- transferu fragmentów transgenicznego DNA

- do mleka, mięsa, krwi i wybranych organów;
- obecności fragmentów tDNA w treści zwacza, dwunastnicy, jelicie cienkim i grubym;
- obecności tDNA w populacji mikroorganizmów zwacza;
- współczynników rozkładu w zwaczu suchej masy i białka ogólnego badanych pasz genetycznie modyfikowanych.

Hipoteza

Uzyskane dotychczas wyniki badań nad zastosowaniem w żywieniu bydła genetycznie modyfikowanej kukurydzy i poekstrakcyjnej śruty sojowej przeważnie nie wykazały ujemnego wpływu tych pasz na produktywność i wzrost zwierząt. Stwierdzono jednak, że w mleku, tkankach i organach oraz w treści przewodu pokarmowego pojawiają się niewielkie fragmenty roślinnego DNA. Założono, że jeżeli roślinny DNA jest absorbowany, to istnieje możliwość, że transgeniczny DNA będzie także absorbowany.

Przegląd badań na bydło

W ostatnich latach w coraz większym stopniu zwiększa się uprawa (James, 2008) i zużycie w produkcji zwierzęcej (Guertler i in., 2010) genetycznie modyfikowanej kukurydzy, co ma miejsce także w Polsce. W Europie najczęściej uprawianą kukurydzą GM jest Bt-kukurydza (MON 810), której odporność na owady jest wynikiem wprowadzenia genu *cry1Ab* od *Bacillus thuringiensis* (Whiteley i Schnepf, 1986) do roślinnego genomu. Wydzielane przez ten gen *Bt* krystaliczne białko Cry1Ab niszczy komórki epitelium środkowego jelita, które służą u owadów do formowania porów w błonie komórkowej (Bravo i in., 2007). Prowadzi to do pęcznienia komórki, wynikającego z zakłócenia równowagi osmotycznej i do jej rozpadu (English i Slatin, 1992). Soja jest najbardziej rozpowszechnioną w świecie rośliną uprawną zmodyfikowaną genetycznie (Chen i in., 2005). Dostępna na rynkach europejskich poekstrakcyjna śruta sojowa pochodzi przede wszystkim z soi genetycznie modyfikowanej linii Roundap Ready, która posiada wbudowany do genomu gen, wyizolowany z *Actobacterium sp.* szczep CP4, kodujący enzym, powodujący odporność na glifosat, aktywny składnik herbicydu Roundup.

W doświadczeniach prowadzonych na

zwierzętach różnych gatunków porównywano skład chemiczny oraz wartość pokarmową stosowanych odmian konwencjonalnych i linii genetycznie modyfikowanych. Nie wykazano różnic między składem i wartością pokarmową roślin GM a ich izogenicznymi odpowiednikami. Brake i Vlachos (1998), prowadząc doświadczenie na brojlerach stwierdzili podobną wartość pokarmową dla kukurydzy odmiany *Bt176* w porównaniu do odmiany konwencjonalnej. Nieznaczące różnice w zawartości białka ogólnego, tłuszczu i włókna surowego pomiędzy kukurydzą MON 810 a linią izogeniczną wykazali Rossi i in. (2005), jednak wszystkie porównywane wartości mieściły się w zakresie wartości prawidłowych dla tych materiałów paszowych. W przypadku śruty sojowej genetycznie modyfikowanej w kierunku odporności na glifosat (odmiana 40-30-2 i 61-67-1) i odmiany konwencjonalnej również nie stwierdzono różnic między ich składem chemicznym (Padgette i in., 1996; McCann i in., 2005). Odnotowano również brak różnic w wartości pokarmowej oraz składzie aminokwasowym i mineralnym pomiędzy kiszoną z kukurydzy GM, odpornej na glufosynat amonu (T25) a kiszoną z odmiany nie modyfikowanej (Phipps i in., 2005).

Badania, prowadzone przeważnie w krótkich okresach czasu (do 13 tygodni), nad wykorzystaniem w żywieniu krów tradycyjnych i genetycznie modyfikowanych odmian kukurydzy wykazały, że kukurydza genetycznie modyfikowana, skarmiana w postaci kiszonki i ziarna, nie miała istotnego wpływu na produkcję i skład mleka (Faust i Miller, 1997; Barriere i in., 2001; Clarck i Ipharraguerre, 2001; Donkin i in., 2003; Grant i in., 2003; Ipharraguerre, i in., 2003; Calsamiglia i in., 2007). W prowadzonych na krowach rasy Simental doświadczeniach długoterminowych, trwających 25 miesięcy, również nie wykazano, pomimo zastosowania bardzo czułych metod, obecności *cry1Ab* DNA i białka Cry1Ab w próbkach mleka (Guertler i in., 2010). Steinke i in. (2010) w podobnym doświadczeniu nie stwierdzili istotnych różnic w zawartości składników pokarmowych i energii w skarmianej Bt kukurydzy MON 810 i w izogenicznej odmianie CON, a także w produktywności krów. Pewne różnice wystąpiły w składzie mleka, autorzy uważają jednak, że nie było to związane z rodzajem paszy. Nie odnotowano także w ży-

wieniu krów żadnych różnic w strawności włókna, proporcjach lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu i odczynie treści żwacza przy skarmianiu dawek pokarmowych z kukurydzą tradycyjną i odmianą Bt (Folmer i in., 2000 b). Donkin i in. (2000), a także Phipps i in. (2005), stosując w żywieniu krów mlecznych ziarno i kiszonkę z kukurydzy tradycyjnej i transgenicznej, charakteryzującej się cechą odporności na substancje czynne herbicydów (glifosat, glufosynat amonu), stwierdzili, że rodzaj skarmianej paszy nie miał wpływu na pobranie suchej masy, produkcję mleka, a także zawartość białka, laktozy i tłuszczu w mleku. Wydajność mleczna krów żywionych tymi dwoma rodzajami kiszonki była podobna. Yonemochi i in. (2003) wykazali, że skarmianie transgenicznej kukurydzy CBH351 nie miało ujemnego wpływu na kondycję zdrowotną krów i ich funkcje fizjologiczne oraz nie spowodowało transferu białka Cry9C do mleka, krwi, wątroby i mięśni krów.

W doświadczeniach na bydle mięsnym nie odnotowano różnic w pobraniu i wykorzystaniu paszy oraz dziennych przyrostach masy ciała, gdy w mieszankach treściwych stosowano tradycyjne odmiany kukurydzy oraz kukurydzę Bt (Russell i Petersen, 1999; Russell i in., 2000 a, b). Podobne wyniki uzyskali także Petty i in. (2001), którzy skarmiając kiszonkę z całych roślin transgenicznej odmiany kukurydzy odpornej na herbicydy, również stwierdzili brak wpływu skarmiania kukurydzy Bt na parametry charakteryzujące jakość tuszy.

W badaniach Erickson i in. (2003), prowadzonych na bydle opasowym, w których porównano wpływ ziarna kukurydzy genetycznie modyfikowanej w kierunku odporności na glifosat (odmiany GA21 i nk 603) oraz odmiany konwencjonalnej, również nie stwierdzono statystycznych różnic w przyrostach masy ciała, pobraniu paszy oraz suchej masy. Z kolei, w doświadczeniach przeprowadzonych przez Folmera i in. (2000 a, 2002), również na bydle opasowym, zanotowano różnice statystycznie istotne w dziennych przyrostach masy ciała w zależności od odmiany kukurydzy przeznaczonej na kiszonkę dla badanych zwierząt. Odmiana kukurydzy N4242 Bt w porównaniu do odmiany

konwencjonalnej N4242 poprawiła o 7% dzienne przyrosty masy ciała opasów, a odmiana N7333 Bt w porównaniu do odmiany izogenicznej N7333 negatywnie wpłynęła na przyrosty masy ciała.

W trwających 3 miesiące badaniach na cielętach nie stwierdzono, aby transgeniczna kukurydza Bt11 miała negatywny wpływ na wskaźniki kliniczno-biochemiczne zwierząt (Shimada i in., 2006).

Prowadzono także badania nad możliwością transferu fragmentów transgenicznego DNA (tDNA) do tkanek zwierząt żywionych genetycznie modyfikowanymi paszami, między innymi soją, kukurydzą i bawełną. Nie stwierdzono obecności tDNA w żadnych tkankach i organach zwierzęcych, jak również w mleku krów (Klotz i Einspanier, 1998; Phipps i in., 2002, 2003, 2005). Niektórzy autorzy wykazali obecność roślinnego DNA w wątrobie, nerkach, krwi i mięśniach zwierząt. Wykrycie go w materiale biologicznym jest jednak trudne ze względu na jego niewielką koncentrację w ogólnym DNA całej dawki pokarmowej, pobieranej przez zwierzęta (Beever i Kemp, 2000).

Pobieranie przez zwierzęta gospodarskie kilku gramów dziennie „obcego” (pochodzącego z paszy) DNA jest naturalnym procesem (Flachowsky i in., 2005). DNA pochodzące z pobranej przez zwierzęta paszy jest więc głównym źródłem kwasów nukleinowych, które następnie ulegają skróceniu na drodze hydrolizy oraz działania DNazy I i DNazy II (Beever i Kemp, 2000). W badaniach niektórych autorów (Mazza i in., 2005; Rehout i in., 2008) wykryto w tkankach zwierząt małe fragmenty transgenicznego DNA, pochodzącego z roślin GM. Endogenne DNA kukurydzy wykryto także w mleku i krwi krów (Phipps i in., 2003).

Biologiczna aktywność transgenów roślin modyfikowanych genetycznie wynosi kilka tysięcy par zasad. W przypadku kukurydzy odmiany MON 810 oraz śruty sojowej RR długość aktywnego transgeny wynosi odpowiednio 1800 oraz 3500 par zasad. Wykrywane przez niektórych autorów niewielkie fragmenty transgenów są więc biologicznie nieaktywne (Chowdhury i in., 2003).

Materiał i metody

Badania prowadzono na:

- trzech nie dojonych krowach z przetokami do żwacza,
- czterdziestu krowach rasy polskiej HF odmiany nizinnej czarno-białej,
- czterdziestu cielętach-buhajkach rasy polskiej HF odmiany nizinnej czarno-białej.

Zwierzęta żywiono według zaleceń systemu IZ PIB – INRA (2009). Wartość pokarmową pasz, skład mieszanek paszowych i dawki pokarmowe ustalono, stosując program komputerowy INRAtion-PrevAlim (ver. 3 x 2005) w oparciu o własne analizy chemiczne i własne współczynniki rozkładu białka w żwaczu (EDR), określone dla pasz wchodzących w skład mieszanek. Ze względu na funkcje rynienki przełykowej u cieląt, przyjęto dla preparatu mlekozastępczego, zgodnie z programem, wartość EDR = 0,10. Dla wszystkich pasz przyjęto tabelaryczne wartości współczynników strawności jelitowej białka nie rozkładanego w żwaczu.

Zawartość genetycznie modyfikowanej soi i kukurydzy w próbkach mieszanek paszowych określono w Państwowym Instytucie Weterynarii – PIB w Puławach oraz w Krajowym Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Szczecinie.

Badania na krowach z przetokami do żwacza **Oznaczenie współczynników efektywnego rozkładu w żwaczu (*effective rumen degradability, ERD*) suchej masy (ERD_{SM}) i białka ogólnego (ERD_{BO})**

Oznaczenia wykonano na ziarnie kukurydzy niemodyfikowanym i GM oraz na niemodyfikowanej i GM poekstrakcyjnej śrucie sojowej. Badania przeprowadzono na trzech nielaktujących krowach rasy polskiej HF o średniej masie ciała 715 ± 50 kg z założonymi trwałymi przetokami do żwacza, żywionych dietą podstawową, zawierającą 60% SM siana i 40% SM mieszanki paszowej o składzie (%): poekstrakcyjna śruta

sojowa (15), otręby pszenne (7), pszenica (34), jęczmień (40), kreda (1), mieszanka mineralno-witaminowa (3). Dawka pokarmowa zapewniała pokrycie zapotrzebowania na poziomie bytowym (około 0,5 kg mleka/dzień). Oznaczenie współczynników ERD wykonano metodą *in sacco* według Kowalskiego i in. (2008). Inkubację w żwaczu prowadzono przez 2, 4, 8, 16, 24 i 48 godzin dla wszystkich komponentów paszowych. Po kolejnych godzinach inkubacji w żwaczu w próbkach badanych materiałów paszowych oznaczono obecność specyficznej sekwencji DNA dla ziarna kukurydzy odmiany MON 810 oraz śruty sojowej RR, wykorzystując metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Dodatkowo, na przetokowanych zwierzętach przeprowadzono badania w celu określenia, czy istnieje możliwość transferu tDNA modyfikowanej soi lub kukurydzy z mieszanki paszowej, stosowanej w żywieniu krów, do plazmidowego DNA mikroorganizmów żwacza. Od trzech krów żywionych przez 2 tygodnie doświadczalną mieszanką paszową pobrano przez przetokę dwukrotnie (w odstępach miesięcznych) próbki treści żwacza po 2, 4 i 8 godzinach od zadania paszy.

Z każdej próbki bezpośrednio po pobraniu wyizolowano DNA. Do izolacji DNA zastosowano zestaw odczynników, pozwalający na wyizolowanie plazmidowego DNA specyficznego dla mikroorganizmów. Wyizolowane DNA zamrożono w temperaturze -20°C . W celu wykonania oceny poziomego transferu DNA, pochodzącego z roślin modyfikowanych genetycznie (soja RR i kukurydza MON 810), zastosowano badanie jakościowe metodą PCR, zgodnie z procedurą badawczą PB-34/PS. Analizy materiałów biologicznych, pochodzących od zwierząt przetokowanych wykonano w Krajowym Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Szczecinie.

Wyniki badań na zwierzętach przetokowanych

Nie stwierdzono ujemnego wpływu pasz genetycznie modyfikowanych na efektywny rozkład w żwaczu suchej masy i białka ogólnego (tab. 1).

Tabela 1. Efektywny rozkład w żwaczu suchej masy oraz białka ogólnego pasz tradycyjnych oraz modyfikowanych genetycznie

Table 1. Effective rumen degradability of dry matter and crude protein in traditional and modified corn and soybean meal

Wyszczególnienie Items	Sucha masa – Dry matter				Białko ogólne – Crude protein			
	a	b	c	EDR _{SM}	a	b	c	EDR _{BO}
Ziarno kukurydzy MON 810, śruta <i>Corn grain MON 810, ground</i>	27,7	69,8	0,046	58,0	17,1	94,4	0,024	44,0
Kukurydza tradycyjna, śruta <i>Traditional corn, ground</i>	29,5	71,6	0,04	58,1	20,1	127,2	0,012	41,3
Poekstrakcyjna śruta sojowa RR <i>Soybean meal RR</i>	21,6	80,5	0,08	67,6	2,7	103,3	0,072	59,0
Poekstrakcyjna śruta sojowa tradycyjna <i>Traditional soybean meal</i>	21,7	81,0	0,089	70,1	3,0	101,7	0,085	62,6

a – frakcja natychmiast ulegająca rozkładowi w żwaczu, b – frakcja wypływająca ze żwacza w tempie, c – tempo wypływu frakcji b, ERŻ – efektywny rozkład w żwaczu; k = 0,06.

a – readily degradable fraction, b – fraction disappearing at a measurable rate, c – disappearance rate of fraction b, EDR – effective rumen degradation; k = 0.06.

Po 2 i 4 godzinach inkubacji w próbkach soi genetycznie modyfikowanej stwierdzono u trzech krów obecności specyficznej sekwencji Roundup Ready na poziomie 2%. Po dwóch godzinach inkubacji w zmodyfikowanej śrucie kukurydzianej wykryto obecność specyficznej sekwencji dla kukurydzy MON 810 u trzech krów, również w ilości 2%, natomiast po 4 godzinach inkubacji jedynie u dwóch krów. U jednej krowy nie stwierdzono obecności specyficznej sekwencji dla kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie. Po inkubacji w żwaczu, trwającej 8 godzin, nie stwierdzono obecności transgenicznego DNA w próbkach ziarna zmodyfikowanej kukurydzy oraz śruty sojowej.

Nie stwierdzono poziomego transferu DNA, pochodzącego z pasz GM, do DNA plazmidowego mikroorganizmów, bytujących w żwaczu krów z przetokami, żywionych mieszankami paszowymi na bazie materiałów paszowych genetycznie modyfikowanych.

Badania na krowach produkcyjnych i cielętach w pierwszych tygodniach życia

W badaniach przeprowadzonych na krowach i cielętach skarmiano mieszanki paszowe, zawierające niemodyfikowane i/lub modyfikowane materiały paszowe (ziarno kukurydzy, poekstrakcyjna śruta sojowa). Do badań wybrano genetycznie zmodyfikowane (GM) materiały paszowe:

- poekstrakcyjną śrutę sojową, produkowaną

z soi MON 40-3-2 (Roundup Ready), zmodyfikowaną w kierunku tolerancji na glifosaf, składnik czynny wielu herbicydów,

- śrutę kukurydzianą produkowaną z ziarna kukurydzy *Bt*, zmodyfikowanej w kierunku odporności na żerowanie owada szkodnika z rodziny łuskoskrzydłych – omacnicy prosowianki (odmiany MON 810; DKC 3421YG).

Śruta kukurydziana z kukurydzy MON 810 oraz śruta sojowa Roundup Ready są odmianami dopuszczonymi do obrotu handlowego na terenie Unii Europejskiej, również w Polsce. W celach porównawczych, użyto do badań również poekstrakcyjną śrutę sojową i śrutę z ziarna kukurydzy, pochodzące z roślin konwencjonalnych. W przypadku kukurydzy była to odmiana DKC 3420, rodzicielska w stosunku do badanej odmiany GM, natomiast w przypadku poekstrakcyjnej śruty sojowej – komercyjna (certyfikowana) śruta wyprodukowana z odmian konwencjonalnych (niemodyfikowanych).

Utworzono 4 grupy krów oraz cieląt, po 10 zwierząt, żywionych mieszankami paszowymi, w których głównym źródłem energii i białka były:

- Grupa KT/ST – tradycyjne ziarno kukurydzy i tradycyjna poekstrakcyjna śruta sojowa,
- Grupa KT/SM – tradycyjne ziarno kukurydzy i genetycznie modyfikowana poekstrakcyjna śruta sojowa,

- Grupa KM/ST – genetycznie modyfikowane ziarno kukurydzy i tradycyjna poekstrakcyjna śruta sojowa,
- Grupa KM/SM – genetycznie modyfikowane ziarno kukurydzy i genetycznie modyfikowana poekstrakcyjna śruta sojowa.

Doświadczenie na krowach

Utrzymanie i żywienie

Doświadczenie realizowano w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB Rudawa Sp. z o.o. w oborze wolno wybiegowej z halą udojową. Do poszczególnych grup krowy przydzielano metodą analogów, biorąc pod uwagę kolejność laktacji (od 1. do 3.) i datę planowanego wycielenia oraz maksymalną wydajność matek pierwiastek lub wieloródek w poprzedniej laktacji.

Trzy tygodnie przed planowanym wycieleniem krowy przemieszczano do porodówki, gdzie przebywały do końca pierwszego tygodnia laktacji. Grupy skompletowano w ciągu 2 miesięcy. Zwierzęta żywiono grupowo dawkami pełnoskładnikowymi (TMR), kontrolując pobranie paszy poprzez ważenie zadawanej paszy

i pozostawionych niedojadów. Doświadczenie trwało od 3. tygodnia przed wycieleniem do 305. dnia laktacji. Proporcje poszczególnych pasz w TMR i wielkość dziennej dawki pokarmowej na sztukę odpowiadały początkowo średniej wydajności w grupie, wynoszącej 35 l mleka/dzień/krowę. Następnie, proporcje pasz i dzienną dawkę TMR zmieniano przy średniej wydajności w grupie 28 i 18 l mleka/dzień/krowę.

Skład procentowy mieszanek paszowych dla wszystkich grup był podobny, a różniły się one jedynie obecnością pasz niemodyfikowanych (tradycyjnych) i/lub modyfikowanych. Średni skład TMR w okresie doświadczenia przedstawiono w tabeli 2.

Pomiary i pobieranie próbek do analiz

Pomiary masy ciała krow wykonywano początkowo co 2 tygodnie, począwszy od 5. do 89. dnia laktacji, a następnie co 50 dni. Codziennie na hali udojowej określano dzienną wydajność mleka. Skład mleka oznaczano w odstępach 14-dniowych, wykonując pierwszy pomiar nie później niż w 10. dniu laktacji, po przejściu krowy z porodówki do obory.

Tabela 2. Skład procentowy mieszanek paszowych i TMR dla wszystkich grup (zależnie od grupy, mieszanki paszowe zawierały modyfikowaną lub tradycyjną kukurydzę lub/i soję)

Table 2. Composition of concentrates (%) and TMR for all groups (in groups, concentrates consisted of transgenic or/and nontransgenic corn and transgenic or/and nontransgenic soybean meal)

Mieszanki paszowe – Concentrates		TMR	
Pasze Feeds	% paszy brutto % feed, gross	Pasze Feeds	% SM % DM
Śruta kukurydziana – <i>Ground maize</i>	51,5	Mieszanka paszowa – <i>Concentrate mixture</i>	35
Poekstrakcyjna śruta sojowa <i>Soybean oilmeal</i>	25	Kiszonka z traw – <i>Grass silage</i>	7
Śruta jęczmienna – <i>Ground barley</i>	10	Kiszonka z kukurydzy – <i>Corn silage</i>	45
Śruta z pszenżyta – <i>Ground triticale</i>	5	Kiszonka z przewiędniętej lucerny <i>Wilted lucerne silage</i>	6
Śruta pszenna – <i>Ground wheat</i>	5	Młóto kiszzone – <i>Ensiled brewers grains</i>	6
Kreda pastewna – <i>Limestone</i>	1	Makuch rzepakowy (9,6% tłuszczu w SM) – <i>Rapeseed cake (9.6% fat in DM)</i>	1
Mieszanka mineralno-witaminowa Blatin TMR Mix ¹ (BASF) <i>Vitamin and mineral premix Blatin</i> TMR Mix ¹ (BASF)	2,5	–	–

¹ 93,1% SM; g/kg SM: 32,2 P, 182,6 Ca, 107,4 Mg, 85,9 Na; mg/kg SM: 1288 Cu, 9344 Zn, 4339 Mn, 18,26 Co, 43,0 Se, 89,2 I; IU/kg SM: 107411 wit. A, 85929 wit. D, 4027 wit. E.

¹ 93,1% DM; g/kg DM: 32,2 P, 182,6 Ca, 107,4 Mg, 85,9 Na; mg/kg DM: 1288 Cu, 9344 Zn, 4339 Mn, 18,26 Co, 43,0 Se, 89,2 I; IU/kg DM: 107411 wit. A, 85929 wit. D, 4027 wit. E.

Trzykrotnie, w 80. 120. i 220. dniu laktacji, pobierano próbki mleka w celu oznaczenia poziomego transferu DNA, pochodzącego z roślin modyfikowanych genetycznie (soja RR i kukurydza MON 810), do mleka. W okresie od ostatniego tygodnia przed planowanym porodem (7 ± 3 dni) oraz kilkakrotnie w odstępach tygodniowych po wycieleniu (w 3. dniu każdego tygodnia) pobierano z żyły jaramowej (*vena jugularis*), po 4 godzinach po zadaniu paszy, próbki krwi od 6 do 8 krów w grupie w celu oznaczania profilu metabolitów w surowicy krwi. W czasie laktacji, po przejściu z porodówki do obory odważano niedojady, początkowo dwa razy w tygodniu do 4. tygodnia laktacji, a następnie co 2 tygodnie.

Analizy chemiczne

Pasze i niedojady analizowano według metod podanych w AOAC (2005). Lotne kwasy tłuszczowe (LKT) w TMR oznaczano metodą chromatografii gazowej przy użyciu aparatu Varian 3400 i Auto Samplera 8200CX, kolumny CP-WAX58 (25 m x 53 mm x 1 mm). Początkowa temperatura kolumny (80°C) wzrastała o 7°C/min do 270°C. Temperatura dozownika wynosiła 200°C, a detektora 260°C. Gazem nośnym był hel o szybkości przepływu 6 ml/min. Na kolumnę nanoszono 1 ml wodnego ekstraktu TMR. Odczyn kiszzonek oznaczano przy użyciu aparatury AutoKjeldahl Unit K-370 firmy Bischi, stosując funkcję do oznaczania pH. Kwas mlekowy oznaczano posługując się wysokosprawną chromatografią cieczą po odseparowaniu wodnego przesączu z 24% kwasem meta-fosforowym przy użyciu kolumny Lichrocart Superspher RP 18 250 cm, detektora UV 210 nm, eluentu (1 µL H₂O + 100 µL H₂SO₄, 1 mL/min) i iniekcji 20 µL.

Skład mleka oznaczano przy użyciu aparatu Milko-Scan model FT 120, duńskiej firmy Foss Electric. W próbkach surowicy krwi, pobranych od krów w 3., 10., 17. i 24. dniu laktacji, oznaczano stężenie: niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) metodą kolometryczną przy użyciu syntetazy acylo-CoA, oksydazy i peroksydazy (odczynniki WAKO), kwasu D-3 hydroksymasłowego (BHBA) metodą kinetycznej reakcji enzymatycznej, stosując analizator Cobas-Bio (Roche) i wysoko czuły kit (RANDOX), glukozy metodą chemii suchej na analizatorze VITROS 950 (Ortho-Clinical Dia-

gnostic, Test Methodology Manual, 1997). W 7., 14. i 21. dniu laktacji oznaczano w surowicy krwi insulinę, a w 14. i 21. dniu po porodzie progesteron, stosując analizę radioimmunologiczną (BioSource INS-IRMA Kit i BioSource PROG-RIA-CT Kits).

W celu przeprowadzenia oceny możliwości transferu do mleka transgenicznego DNA, pochodzącego z roślin modyfikowanych genetycznie (soja RR i kukurydza MON 810), zastosowano badanie jakościowe metodą reakcji polimerazy łańcuchowej (PCR), zgodnie z procedurą badawczą PB-34/PS. Analizy wykonano w Krajowym Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Szczecinie.

Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzono według procedury GML, stosując pakiet SAS (1999/2001). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji, oceniając różnice między grupami metodą LMS. Przyjęto, że przy $P > 0,05$ różnice nie są statystycznie istotne. Dla całego okresu laktacji, w oparciu o wydajność mleka każdej krowy w kolejnych dniach laktacji, oszacowano przy pomocy pakietu statystycznego Quick Statistica (1992) krzywą matematyczną, ilustrującą produktywność krów w czasie laktacji, według równania:

$$Y = a \log x = bx + c$$

gdzie: Y – dzienna wydajność mleka, x – dzień laktacji.

Wyniki i ich omówienie

Wyniki analiz na zawartość pasz genetycznie modyfikowanych w mieszankach paszowych przedstawiono w tabeli 3. Analizy na obecność soi RR wykazały, że mieszanki treściwe charakteryzowały się prawidłową, zgodną z planowanym układem doświadczenia, zawartością tradycyjnej lub/i zmodyfikowanej genetycznie poekstrakcyjnej śruty sojowej. W grupach KT/ST i KM/ST zawartość soi RR wynosiła poniżej 0,9% soi ogółem w próbce mieszanki. Mieszanki dla grup KT/SM i KM/SM zawierały odpowiednio 100 i 82% soi GM w stosunku do całej ilości śruty sojowej w mieszance. Zawartość kukurydzy GM (MON 810) lub/i kukurydzy

tradycyjnej w mieszankach paszowych dla poszczególnych grup zwierząt okazała się także zgodna z założeniem doświadczenia. Poziom kukurydzy MON 810 powyżej 0,9% stwierdzono w mieszankach dla grup KM/ST i KM/SM, wynosił on 25–28%. Wartość pokarmową pasz

podano w tabeli 4, a TMR w tabeli 5. Pobranie suchej masy, białka i energii było podobne we wszystkich grupach, a wskaźnik aktywności mikrobiologicznej żywca: (BTJN– BTJE)/JPM świadczy o właściwym zbilansowaniu TMR (tab. 6).

Tabela 3. Zawartość pasz GM w mieszankach paszowych dla krów (%)
Table 3. Content of GM plants in concentrates for cows (%)

Modyfikacja <i>Modification</i>	Mieszanki treściwe dla grup <i>Concentrates for groups</i>			
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM
Poekstrakcyjna śruta sojowa RR – <i>Soybean meal RR</i>	0,05	100	0,23	82
Ziarno kukurydzy MON 810, śruta – <i>Corn MON 810, ground</i>	0,01	0,05	27,6	24,6

Tabela 4. Wartość pokarmowa kukurydzy i poekstrakcyjnej śruty sojowej (tradycyjnej lub modyfikowanej) oraz mieszanek paszowych (w 1 kg SM)
Table 4. Nutritive value of corn and soybean meal (transgenic or non transgenic) and concentrates (in 1 kg DM)

Wyszczególnienie <i>Items</i>	Sucha masa <i>Dry matter</i> (g)	Białko ogólne <i>Crude protein</i> (g)	BTJN <i>PDIN</i> (g)	BTJE <i>PDIE</i> (g)	JPM <i>UFL</i>
Pasze – Feeds					
Kukurydza tradycyjna, śruta <i>Traditional corn, ground</i>	862	89	70	95	1,21
Kukurydza modyfikowana, śruta <i>Corn MON 810, ground</i>	863	89	70	95	1,21
Poekstrakcyjna śruta sojowa tradycyjna <i>Traditional soybean meal</i>	878	554	404	276	1,24
Poekstrakcyjna śruta sojowa modyfikowana <i>Soybean meal RR</i>	887	515	376	260	1,25
Mieszanki – Concentrates					
KT/ST	872	210	154	138	1,16
KT/SM	874	201	155	138	1,16
KM/ST	872	211	155	138	1,16
KM/SM	874	201	148	134	1,16

Nie stwierdzono istotnych różnic w całkowitej i dziennej produkcji mleka oraz w składzie mleka krów (tab. 7).

Obserwowano również podobny przebieg dziennej wydajności mleka w czasie trwania laktacji (rys. 1).

Tabela 5. Skład chemiczny i wartość pokarmowa TMR dla grup doświadczalnych, średnio w okresie doświadczenia (w 1 kg SM)

Table 5. Chemical composition and nutritive value of TMR in groups, average in experiment (in kg DM)

Grupy Groups	Sucha masa Dry matter (%)	Białko ogólne Crude protein (g)	Ekstrakt eterowy Ether extract (g)	Włókno surowe Crude fibre (g)	Popiół surowy Ash (g)	BTJN PDIN (g)	BTJE PDIE (g)	BTJP PDIP (g)	JPM UFL	JWK
KT/ST	42,9	159	30	163	75	97	91	34	0,97	0,85
KT/SM	41,1	163	30	168	80	100	91	35	0,96	0,87
KM/ST	43,4	159	30	161	74	98	91	35	0,97	0,85
KM/SM	41,1	165	30	178	88	102	91	36	0,94	0,88

PF (produkty fermentacji) w kolejnych grupach wynosiły odpowiednio (g/kg SM): 38, 39, 39, 34).

PF (fermentation products) in successive groups were (g/kg DM): 38, 39, 39, 34, respectively.

Tabela 6. Pobranie TMR i składników pokarmowych (średnio w grupie/dzień/krowę)

Table 6. Intake of TMR and nutrients (average in group/day/cow)

Grupy Groups	Sucha masa Dry matter (%)	Białko ogólne Crude protein (g)	BTJN PDIN (g)	BTJE PDIE (g)	BTJP PDIP (g)	JPM UFL	(BTJN – BTJE)/JPM (PDIN – PDIE)/ UFL (g)
KT/ST	19,4	3085	1882	1765	660	18,82	6,2
KT/SM	18,7	3048	1870	1702	654	17,95	9,5
KM/ST	19,4	3085	1901	1765	679	18,82	7,2
KM/SM	18,8	3102	1918	1711	677	17,61	8,7

Tabela 7. Całkowita i dzienna produkcja mleka oraz skład mleka

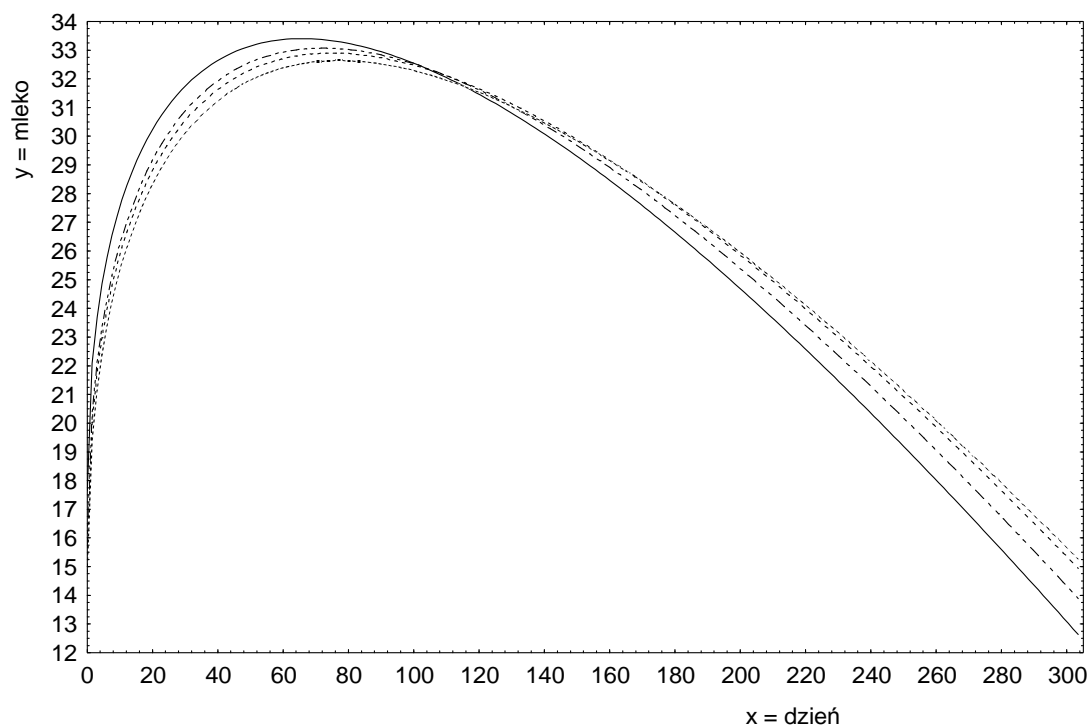
Table 7. Total and daily milk production and milk composition

Wyszczególnienie Items	Grupy – Groups				P	SE
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM		
Produkcja całkowita (kg/krowę) Total milk yield (kg/cow)	7900	7998	8043	8079	0,99	206,2
Wydajność (kg/dzień/krowę) Daily milk yield (kg/day/cow)	27,69	26,66	26,90	27,52	0,94	0,68
Okres laktacji (dni) Period of lactation (days)	285,3 A	300,0 B	299,0 B	293,3 AB	<0,01	1,85
Skład mleka – Milk composition						
sucha masa – solids (%)	12,58	12,28	12,95	12,48	0,07	0,09
tłuszcz – fat (%)	3,78	3,55	3,48	3,94	0,24	0,08
białko – protein (%)	3,23	3,24	3,19	3,29	0,38	0,02
stosunek tłuszczu do białka fat/protein	1,17	1,10	1,10	1,19	0,39	0,02
laktoza – lactose (%)	4,74	4,81	4,80	4,77	0,70	0,02
mocznik – urea (mg/L)	203	183	190	212	0,55	7,44
kazeina – casein (%)	2,59	2,60	2,74	2,58	0,08	0,03

Analiza próbek mleka metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) nie wykazała obecności tDNA o sekwencji specyficznej dla kuku-

rydzy MON 810 oraz soi RR, co może wskazywać na brak poziomego transferu tDNA z tych transgenicznych pasz do mleka krów.

kg/dzień – kg/day



Rys. 1. Zmiany w dziennej wydajności mleka w czasie trwania laktacji ($\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$)

Fig. 1. Changes in daily milk yield during lactation ($\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$)

grupa – group KT/ST	————	$y = -0,23986x + 3,89075\sqrt{x} + 17,6282$	$R^2 = 0,48$
grupa – group KT/SM	— · — · — ·	$y = -0,24053x + 4,08662\sqrt{x} + 15,7091$	$R^2 = 0,44$
grupa – group KM/ST	- · - · - · - ·	$y = -0,23426x + 4,05519\sqrt{x} + 15,3556$	$R^2 = 0,33$
grupa – group KM/SM	-----	$y = -0,23202x + 4,07205\sqrt{x} + 14,762$	$R^2 = 0,4$

$x = \text{dzień} - \text{day}, y = \text{mleko} - \text{milk}$

Średnie wykorzystanie suchej masy, białka i energii oraz pasz treściwych było podobne w poszczególnych grupach w całym okresie doświadczenia (tab. 8).

Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w początkowej i końcowej masie ciała krów (tab. 9), a zmiany w masie ciała krów w czasie trwania laktacji przebiegały podobnie (rys. 2).

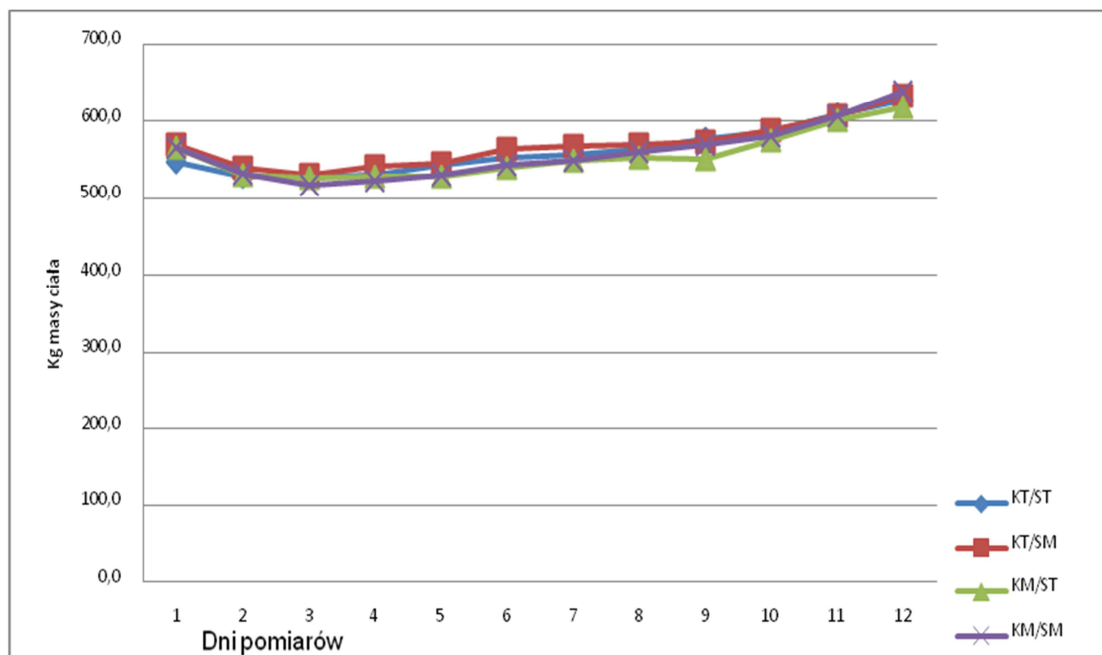
Tabela 8. Wykorzystanie paszy i składników pokarmowych na 1 kg wyprodukowanego mleka (średnio/krowę w grupie)

Table 8. Feed and nutrient conversion per kg milk (mean/cow in group)

Grupy Groups	Sucha masa Dry matter (kg)	Białko ogólne Crude protein (g)	BTJ PDI (g)	JPM UFL	Pasze treściwe Concentrates (kg)
KT/ST	0,70	111,41	63,74	0,67	0,25
KT/SM	0,70	114,32	63,84	0,67	0,25
KM/ST	0,70	114,68	65,61	0,70	0,26
KM/SM	0,70	112,72	62,17	0,64	0,25

Tabela 9. Masa ciała krów w poszczególnych okresach doświadczenia
 Table 9. Cows' body weight in experiment

Grupy Groups	Początkowa masa ciała (5. dzień po porodzie) Initial body weight (day 5 after calving)	Końcowa masa ciała po zakończeniu laktacji Final body weight after lactation
KT/ST	547	628
KT/SM	570	633
KM/ST	565	606
KM/SM	565	639
SE	10,19	9,59
P	0,87	0,66



Rys. 2. Zmiany masy ciała krów w czasie laktacji

Począwszy od 5. dnia po porodzie masę ciała krów określano co 2 tygodnie (cyfry: 1–7), a następnie co 50 dni. Skład mieszanek paszowych: K – ziarno kukurydzy, S – poekstrakcyjna śruta sojowa, T – pasza tradycyjna, nie modyfikowana, M – pasza modyfikowana.

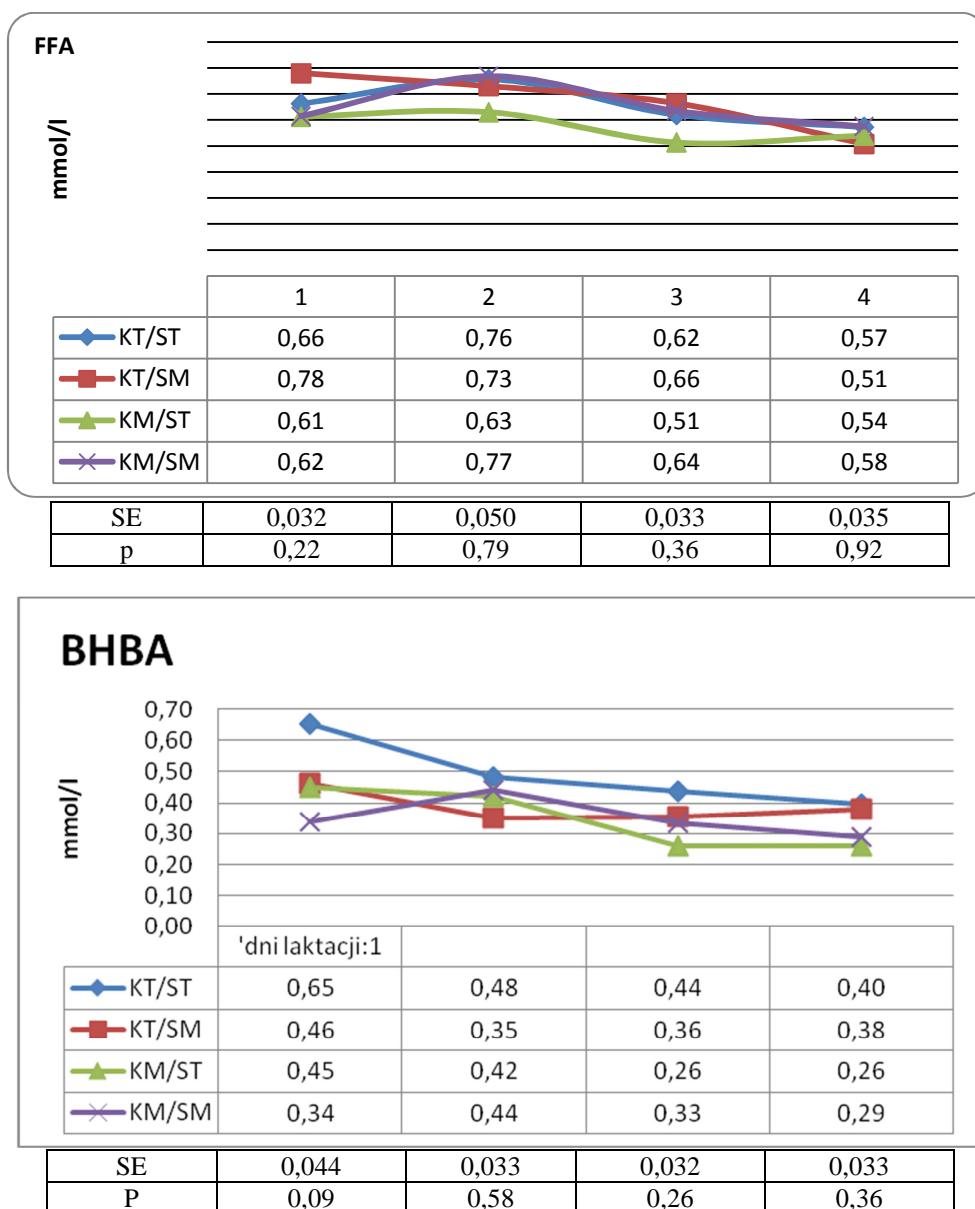
Fig. 2. Changes in cows' body weight during lactation

Beginning from day 5 post calving, cows' body weight was determined every 2 weeks (1–7), and later at 50-day intervals. The composition of concentrates: K – corn grain, S – soybean meal, T – traditional feed, non-modified, M – genetically modified feed.

dni pomiarów – days of measurement, kg masy ciała – kg of body weight

Krzywe, przedstawiające stężenia metabolitów (BHBA, FFA, glukoza, insulina, progesteron) w surowicy krwi, w ciągu pierwszych 4. tygodni laktacji, kształtowały się na podobnym

poziomie (rys. 3, 4, 5). Nie stwierdzono także w tym okresie statystycznie istotnych różnic w średnich stężeniach poszczególnych metabolitów krwi (tab. 10).

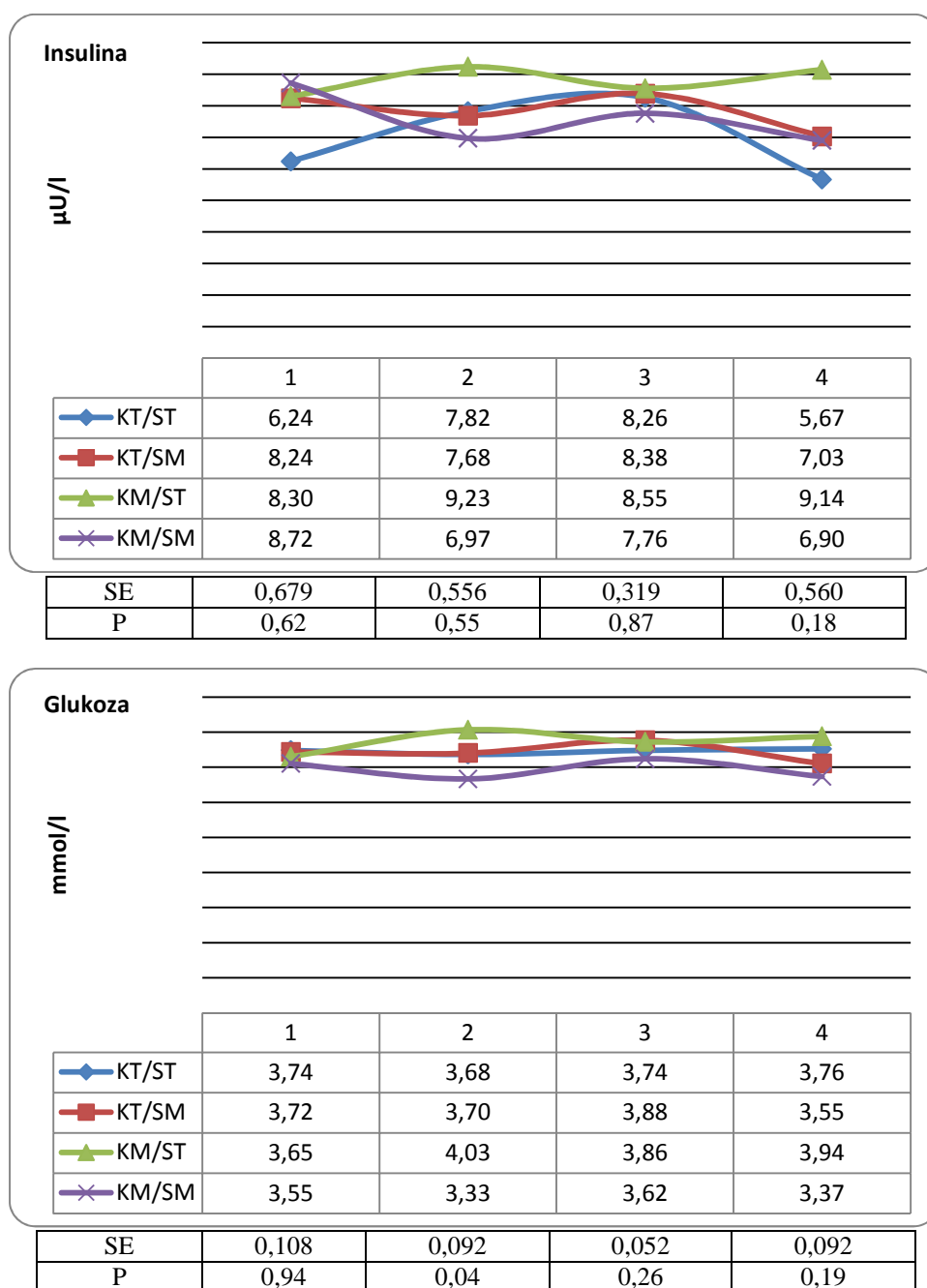


Rys. 3. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) i kwasu β -hydroksymasłowego (BHBA) w surowicy krwi

Cyfry 1,2,3,4 – dzień pobrania próbki krwi, odpowiednio: 3., 10., 17., 24. dzień po wycieleniu.
 Skład mieszanek paszowych: K – ziarno kukurydzy, S – poekstrakcyjna śruta sojowa, T – pasza tradycyjna, nie modyfikowana, M – pasza modyfikowana.

Fig. 3. Concentration of free fatty acids (FFA) and β -hydroxybutyric acid (BHBA) in blood serum
 1, 2, 3 and 4 stand for blood sampling days: 3, 10, 17 and 24 days after calving, respectively.

The composition of concentrates: K – corn grain, S – soybean meal, T – traditional feed, non-modified,
 M – genetically modified feed.
 dni laktacji – days of lactation



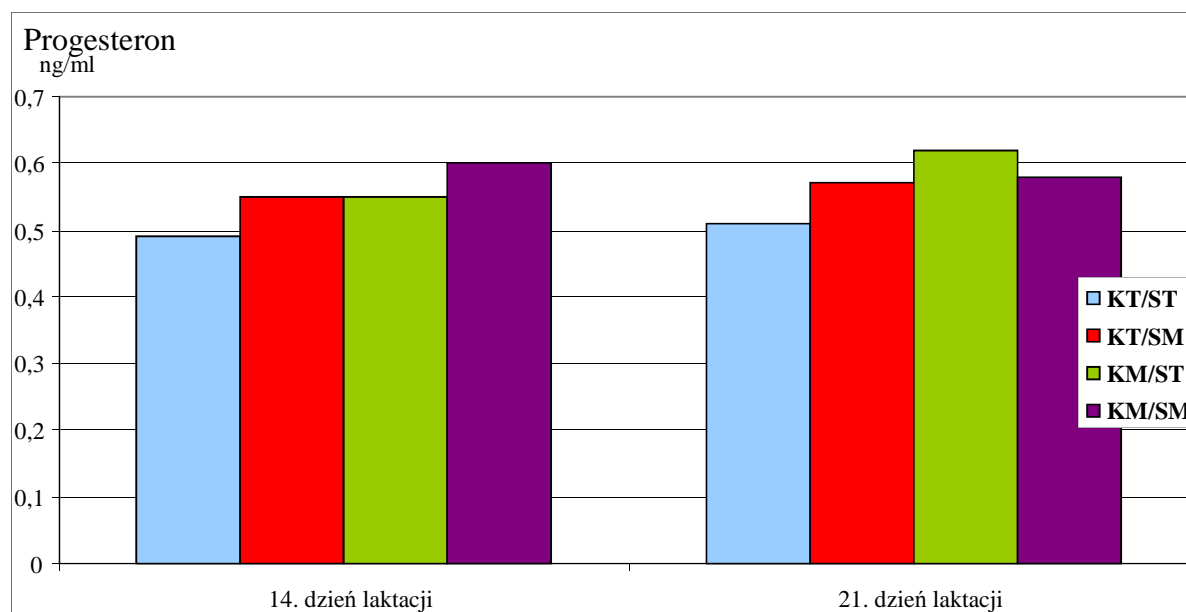
Rys. 4. Stężenie insuliny i glukozy w surowicy krwi

Cyfry 1, 2, 3, 4 oznaczają dzień pobrania próbki krwi, odpowiednio: 3., 10., 17., 24. dzień po wycieleniu. Skład mieszanek paszowych: K – ziarno kukurydzy, S – poekstrakcyjna śruta sojowa, T – pasza tradycyjna, nie modyfikowana, M – pasza modyfikowana.

Fig. 4. Concentration of insulin and glucose in blood serum

1, 2, 3 and 4 stand for blood sampling days: 3, 10, 17 and 24 days after calving, respectively.

The composition of concentrates: K – corn grain, S – soybean meal, T – traditional feed, non-modified, M – genetically modified feed.



Rys. 5. Stężenie progesteronu w surowicy krwi

Skład mieszanek paszowych: K – ziarno kukurydzy, S – poekstrakcyjna śruta sojowa,
T – pasza tradycyjna, nie modyfikowana, M – pasza modyfikowana

Fig. 5. Concentration of progesterone blood serum

The composition of concentrates K – corn, ground, S – soybean meal, T – traditional feed, non-modified,
M – genetically modified feed
Dni laktacji – days of lactation

Tabela 10. Średnie stężenie metabolitów krwi

Table 10. Average concentration of blood biochemical components

Grupa Group	Średnio za pierwsze 4 tygodnie laktacji Mean of 4 weeks of lactation				Progesteron – Progesterone (ng/ml)	
	FFA (mmol/l)	BHBA (mmol/l)	insulina insulin (μ U/l)	glukoza glucose (mmol/l)	14. dzień laktacji 14th day of lactation	21. dzień laktacji 21st day of lactation
KT/ST	0,66	0,49	7,28	3,73	0,49	0,51
KT/SM	0,68	0,39	7,76	3,71	0,55	0,57
KM/ST	0,58	0,35	8,88	3,99	0,55	0,62
KM/SM	0,66	0,37	8,27	3,62	0,60	0,58
SE	0,024	0,022	0,340	0,055	0,016	0,023
P	0,45	0,12	0,40	0,08	0,09	0,44

Doświadczenie na cielętach

Układ doświadczenia, utrzymanie i żywienie

Doświadczenie przeprowadzono na cielętach – byczkach, które podzielono, podobnie jak w doświadczeniu na krowach, na 4 grupy po 10 sztuk. Doświadczenie trwało od 10. (± 3) do 90. dnia życia. Do poszczególnych grup cielęta wstawiano metodą analogów, sukcesywnie

w miarę wycieleń krów, biorąc pod uwagę wiek i masę ciała. Wszystkie grupy cieląt skompletowano w ciągu 3 miesięcy. Przed rozpoczęciem doświadczenia cielęta przebywały na porodowce, gdzie pojono je siarą i mlekiem pełnym.

Cielęta przebywały w indywidualnych klatkach firmy *Alfa-Laval*, wyścielanych słomą i wyposażonych w poidła, żłoby i obręcze na

wiadra. Do 56. dnia życia wszystkie zwierzęta otrzymywały z wiader ze smoczką paszę płynną przygotowaną z preparatu mlekozastępczego SanoRot (firmy Sano). Zawartość preparatu mlekozastępczego w 1 litrze paszy płynnej wynosiła 125 g. Paszę płynną podawano dwukrotnie w ciągu dnia (o godzinie 8⁰⁰ i 17⁰⁰), zgodnie z zaleceniami norm IZ – INRA (2009).

Od początku doświadczenia cielęta we

wszystkich grupach otrzymywały *ad libitum* mieszanki paszowe o takim samym udziale poekstrakcyjnej śruty sojowej, ziarna kukurydzy, ziarna owsa oraz kredy i premiksu CJ Komplet. Zależnie od grupy, mieszanki nie zawierały lub zawierały w swoim składzie modyfikowane ziarno kukurydzy *Bt* odmiany MON 810 lub/i modyfikowaną śrutę sojową pochodzącą z soi Roundup Ready odmiany MON-40-30-2 (tab. 11).

Tabela 11. Skład mieszanek paszowych (%)
Table 11. The composition of concentrates (%)

Składnik <i>Ingredient</i>	Grupy – <i>Groups</i>			
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM
Ziarno kukurydzy MON 810, śruta <i>Corn MON 810, ground</i>	–	–	56,0	56,0
Ziarno kukurydzy tradycyjne, śruta <i>Traditional corn, ground</i>	56,0	56,0	–	–
Poekstrakcyjna śruta sojowa RR <i>Soybean meal RR</i>	–	25,0	–	25,0
Poekstrakcyjna śruta sojowa tradycyjna <i>Traditional soybean meal</i>	25,0	–	25,0	–
Ziarno owsa, śruta – <i>Oats, ground</i>	15,0	15,0	15,0	15,0
Premix CJ Komplet ¹	3,0	3,0	3,0	3,0
Kreda – <i>Limestone</i>	1,0	1,0	1,0	1,0

¹ BASF w 1 kg (g): Ca (212,8), P (60), Na (88), Mg (25), Zn (4), Mn (2,5), Fe (1,5), wit. E (0,8); (j.m.) wit. A (4 500 000), wit. D₃ (100 000).

¹ BASF Mineral in 1 kg (g): Ca (212.8), P (60), Na (88), Mg (25), Zn (4), Mn (2.5), Fe (1.5), vit. E (0.8); (IU) vit. A (4 500 000), vit. D₃ (100 000).

W trakcie realizacji doświadczenia kontrolowano masę ciała na początku (10±3 dzień życia), po zakończeniu okresu podawania pasz płynnych (56. dzień życia) oraz na koniec doświadczenia (90. dzień życia).

W celu przeprowadzenia oceny odporności humoralnej cieląt, w trakcie trwania doświadczenia przeprowadzono dwukrotne szczepienie poliwalentną szczepionką Risposal 3 (firmy Pfizer) – pierwsze w wieku 14 dni, kolejne – po 2–3 tygodniach. Szczepionka zawierała żywe, atenuowane szczepy wirusa syncytialnego układu oddechowego bydła (BRISV) i parainfluenzy typu 3 (PI3V) oraz inaktywowany wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych typu 1 (BVDV 1). Podawano ją domięśniowo w ilości 4 ml, po uprzednim rozpuszczeniu liofilizatu, zawierającego żywe komponenty wirusa BRS

i PI3, płynnym rozcieńczalnikiem, stanowiącym nośnik dla wirusa BVD.

Dodatkowo, przed samym szczepieniem od dwóch wybranych losowo zwierząt w każdej grupie pobrano krew do ww. badań immunologicznych w celu ustalenia wyjściowego poziomu odporności, zarówno komórkowej jak i humoralnej.

Pięć cieląt z każdej grupy, w wieku 90 dni, ubijano w rzeźni komercyjnej w celu pobrania treści pokarmowej z różnych odcinków przewodu pokarmowego oraz próbek tkanek i organów. Na przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń oraz ubój zwierząt uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie.

Pobieranie próbek do analiz

Reprezentatywne próbki komponentów mieszanek treściwych oraz mieszanek treściwych

pobrano dwukrotnie podczas doświadczenia. Dodatkowo, pobrano próbki mieszanek treściwych w celu określenia w nich procentowej zawartości genetycznie modyfikowanej soi i kukurydzy.

Podczas uboju pobrano krew z żyły szyjnej zewnętrznej na podłoże EDTAK2 oraz do próbek bez dodatku antykoagulantu do badań w kierunku oceny statusu immunologicznego oraz wskaźników hematologicznych krwi. Pobrano fragmenty tkanek oraz wybranych organów (płuca, wątroba, nerki, śledziona, trzustka, dwunastnica, mięsień najdłuższy grzbietu – *musculus thoracis*, *MT*), które wkładano do plastikowych pojemników i przetrzymywano w temperaturze -18°C. Próbki mięsa z mięśnia najdłuższego grzbietu (*MT*) pobierano z prawej półtuszy 24 godziny po uboju.

Analizy materiałów paszowych oraz materiału biologicznego

Skład chemiczny pasz i kwasów tłuszczowych tłuszczu MT

Analizę podstawowego składu chemicznego pasz oraz niedojadów wykonano w oparciu o AOAC (2005). W tłuszczu śródmięśniowym mięśnia najdłuższego grzbietu (*MT*) oznaczono skład kwasów tłuszczowych przy użyciu chromatografu VARIAN 3400 z kolumną Rtx2330 (105 m, 0,32 mm, 0,2 µm). Kwasy tłuszczowe oznaczano w postaci estrów metylowych w oparciu o metodę Folcha i in. (1957).

Ocena statusu zdrowotnego

W Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – PIB w Puławach wykonano ocenę wskaźników hematologicznych krwi i efektywności odpowiedzi immunologicznej u 5 losowo wybranych cieląt z każdej grupy doświadczalnej, łącznie u 20 zwierząt.

Badania ogólnych wskaźników zdrowia, tj. erytrocytarnych (liczba czerwonych krwinek – RBC, ilość hemoglobiny – HGB, hematokryt – HCT, średnia objętość erytrocytu – MCV, średni ciężar i stężenie hemoglobiny w jednej krwince – MCH i MCHC) i trombocytarnych (liczba płytek krwi – PLT i ich średnia objętość – MVP) oraz wybranych parametrów odporności komórkowej, takich jak liczba białych ciałek krwi (WBC) i leukogram, tj. jakościowy skład poszczególnych subpopulacji leukocytów z podziałem na granulocyty obojętnochłonne – PMNL,

komórki średniej wielkości – MID (sumaryczna wartość monocytów, bazofilów, eozynofilów w jednostce objętości krwi) i limfocyty – LYM, wykonano przy użyciu analizatora typu AC 920 AutoCounter Swelab Instrument AB. Immunofenotypowanie limfocytów, tj. szczegółowa ocena poszczególnych subpopulacji obwodowych limfocytów krwi cieląt z uwzględnieniem frakcji komórek typu CD2+ (limfocyty T), CD4+ (Limfocyty T pomocnicze – Th), CD8+ (limfocyty cytotoksyczno-supresorowe – Tc/s) i WC4 (limfocyty B) została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometru przepływowego Epics 4C XL, firmy Beckman Coulter.

W celu przeprowadzenia oceny swoistej odporności humoralnej analizowano efekty immunizacji cieląt szczepionką Risposal 3, badając poziom odpowiedzi poszczepiennej w odniesieniu do trzech antygenów szczepionkowych, tj. BRSV, PI3V i BVDV, testem Elisa o nazwie Pentakit, produkcji BIO-X-Diagnostics (Belgia). Test ten umożliwia badanie obecności przeciwciał przeciwko pięciu różnym wirusom występującym u bydła (BHV1, BVDV, BRSV, PI3V, Adenowirus 3). W obecnych badaniach skoncentrowano się przede wszystkim na analizie rezultatów swoistej odpowiedzi humoralnej w odniesieniu do trzech wirusów: BVDV, BRSV, PI3V, tj. tych, których antygeny zawierała stosowana szczepionka.

Analiza DNA

Ocena możliwości poziomego transferu tDNA, pochodzącego z materiałów paszowych modyfikowanych genetycznie (kukurydza *Bt* MON 810 i soja RR MON 40-3-2), do wybranych tkanek, narządów oraz bakterii, zasiedlających poszczególne odcinki przewodu pokarmowego, została przeprowadzona w materiale biologicznym, pobranym podczas uboju od 5 zwierząt z każdej grupy. Analiza możliwości transferu poziomego transgenicznego DNA do bakterii przewodu pokarmowego obejmowała takie gatunki, jak: *Escherichia coli* oraz *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Bakterie izolowano z jelita cienkiego i grubego. Do hodowli mikroorganizmów wykorzystywano podłoża selektywne. Dla *E. coli* stosowano podłoże TBX tryptono-zółciowo-glukuronidynowe, a dla *Enterococcus* podłoże Slanetza z azydkiem sodu. Do namnażania tych drobnoustrojów wybrano pod-

łoże płynne – BHI – wyciąg mózgowo-sercowy. Z homogenizowanych próbek treści pokarmowej, pobranych z poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego oraz z wybranych tkanek i narządów wyizolowano DNA i poddano je analizie metodą CTBA (PN-EN ISO/IEC 21571, 2007). DNA z próbek krwi wyizolowano, stosując zestaw komercyjny Blood Genomic AX Kit by DNA, Poland. Po izolacji DNA otrzymany

materiał genetyczny poddano analizie jakościowej metodą PCR w celu wykrycia transgenów: promotora 35S, terminatora NOS oraz genów referencyjnych: lektyny dla soi i inwertazy dla kukurydzy (tab. 12). Analizę jakościową wyizolowanego DNA przeprowadzono w Krajowym Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Szczecinie oraz w Państwowym Instytucie Weterynarii PIB w Puławach.

Tabela 12. Sekwencje modyfikowanego DNA soi i kukurydzy oznaczane w doświadczeniu
Table 12. Primers used in the study for the detection of corn and soybean genes

Promotor Primer	Sekwencja 5' – 3' Sequence 5' – 3'	Element docelowy Target element	Długość fragmentu (ilość par zasad) Amplicon size, bp
35S-f2 Petu-r1	TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T	Region integracji pomiędzy sekwencją promotora 35S a sekwencją CTP dla soi RR <i>Transition site of 35S promoter sequence to the chloroplast-transit-signal sequence in Roundup Ready soybean</i>	172
VW01 VW03	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G	Region graniczny integracji między promotorem 35S a sekwencją genomową kukurydzy <i>Transition site of the genomic DNA into the 35S promoter in MON 810 corn</i>	170
p35S-cf3 p35S-cf4	CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C	CaMV 35S promotor soi RR i kukurydzy MON 810 <i>CaMV 35S promoter of RR soybean and MON 810 corn</i>	123
HA-NOS 118-f HA-NOS 118-r	GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC	NOS terminator soi RR <i>NOS terminator of RR soybean</i>	118
GM03 GM04	GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG	Gen referencyjny lektyny (soja) <i>Soybean lectin gene (endogenous)</i>	118
IVR1-F IVR1-R	CCG CTG TAT CAC AAG GGG TGG TAC C GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C	Gen referencyjny inwertazy (kukurydza) <i>Maize invertase gene (endogenous)</i>	226

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna otrzymanych w doświadczeniu wyników, dotyczących wskaźników

odchowu cieląt, została przeprowadzona za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu Duncana (SAS Enterprise Guide 2001). Dla

różnic statystycznie istotnych przyjęto poziom istotności $P \leq 0,05$.

Wyniki dotyczące statusu zdrowotnego i immunologicznego cieląt poddano analizie statystycznej z zastosowaniem średniej arytmetycznej (\bar{x}) i odchylenia standardowego ($\pm SD$), a istotność różnic pomiędzy porównywanymi średnimi wyliczano przy użyciu testu t-Studenta. Obliczenia matematyczne wykonano według Łomnickiego (1995) oraz w oparciu o komputerowy pakiet statystyczny STATGRAPHICS.

Wyniki i ich omówienie

W badaniach własnych nie stwierdzono różnic w podstawowym składzie chemicznym i wartości pokarmowej pomiędzy ziarnem kukurydzy odmiany genetycznie modyfikowanej (MON 810) oraz odmianą konwencjonalną (tab. 13). W przypadku poekstrakcyjnej śruty sojowej

zaobserwowano nieznacznie większe różnice w podstawowym składzie chemicznym i wartości pokarmowej pomiędzy dwiema badanymi odmianami, jednak wartość ocenianych składników mieściła się w zakresie wartości prawidłowych dla tych materiałów paszowych.

Mieszanki paszowe były izobiałkowe i izoenergetyczne. Analiza mieszanek paszowych wykazała, że w paszy stosowanej w grupach KT/ST i KM/ST zawartość GM śruty sojowej była poniżej dopuszczalnego poziomu 0,9%, a mieszanki dla grup KT/SM i KM/SM zawierały 100% soi GM (tab. 14).

Zawartość kukurydzy GM odmiany MON 810 w mieszankach paszowych dla cieląt z grup KT/TS i KT/SM wskazuje na śladowe ilości MON 810.

Zawartość kukurydzy MON 810 na poziomie bliskim 33% stwierdzono natomiast w paszy dla grup KM/ST i KM/SM, co wskazuje na właściwy skład mieszanek paszowych.

Tabela 13. Analiza chemiczna (% w kg SM) i wartość energetyczno-białkowa mieszanek paszowych (w kg SM)
Table 13. Chemical composition (% of DM) and nutritive value of the concentrates (in kg DM)

Wyszczególnienie <i>Items</i>	Sucha masa <i>Dry matter</i>	Białko ogólne <i>Crude protein</i>	Ekstrakt eterowy <i>Ether extract</i>	Włókno surowe <i>Crude fibre</i>	Popiół surowy <i>Ash</i>	BTJN <i>PDIN</i> (g)	BTJE <i>PDIE</i> (g)	JPM <i>UFL</i>
Mieszanki paszowe – <i>Concentrates</i>								
KT/ST	88,67	20,78	3,97	4,13	6,82	156	138	1,08
KT/SM	88,87	20,34	3,51	3,73	7,09	153	138	1,08
KM/ST	88,25	20,84	4,09	4,35	7,00	156	136	1,08
KM/SM	88,41	20,37	3,52	4,09	7,02	153	137	1,07

Tabela 14. Zawartość komponentów GM w mieszankach treściwych (%)
Table 14. Content of GM plants in concentrates (%)

Modyfikacja <i>Modification</i>	Mieszanki treściwe dla grup – <i>Concentrates for groups</i>			
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM
Poekstrakcyjna śruta sojowa RR – <i>Soybean meal RR</i>	0,1	100	0,5	100
Ziarno kukurydzy MON 810, śruta <i>Corn MON 810, ground</i>	0,06	0,04	32,3	32,9

Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu badanych pasz genetycznie modyfikowanych na przyrosty masy ciała cieląt (tab. 15).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami w pobraniu paszy i składników pokarmowych za cały okres odchowu cieląt (tab. 16).

Tabela 15. Masa ciała i dzienne przyrosty masy ciała cieląt
Table 15. Liveweight and daily liveweight gains

Wyszczególnienie Items	Grupy – Groups				P	SE
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM		
Masa ciała – Body weight (kg):						
początkowa – initial	45,25	42,75	42,85	47,22	0,19	0,84
przy odsadzeniu w 56. dniu życia at weaning (56th day of age)	73,75 ab	68,95 a	70,05 a	76,00 b	0,03	0,96
końcowa w 90. dniu życia final (90th day of age)	113,00	109,15	107,65	119,50	0,11	1,85
Dzienne przyrosty masy ciała (g.dzień ⁻¹): Daily liveweight gains (g.day ⁻¹):						
od 10. do 56. dnia życia from 10 to 56 days of age	605,70	558,80	577,30	626,00	0,51	16,42
od 56. do 90. dnia życia from 56 to 90 days of age	1154,40	1182,50	1105,80	1279,44	0,40	39,35
od 10. do 90. dnia życia from 10 to 90 days of age	837,40	820,10	799,70	902,77	0,49	21,72

Tabela 16. Pobranie paszy i składników pokarmowych za cały okres odchowu cieląt
Table 16. Daily intake of feed and nutrients during the whole period of experiment

Wyszczególnienie Items	Grupy – Groups				P	SE
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM		
Mieszanka paszowa (kg/dzień) Concentrate (kg.day ⁻¹)	1,63	1,46	1,59	1,80	0,08	0,047
Sucha masa (kg/dzień) Dry matter (kg.day ⁻¹)	1,91	1,76	1,87	2,08	0,07	0,040
Białko ogólne (g/dzień) Crude protein (g.day ⁻¹)	395	359	388	425	0,07	8,76
BTJN (g/dzień) PDIN (g.day ⁻¹)	316	289	310	339	0,07	6,59
BTJE (g/dzień) PDIE (g.day ⁻¹)	290	270	281	315	0,06	5,93
JPM/dzień UFL (day ⁻¹)	2,35	2,18	2,29	2,54	0,06	0,04

a, b – P ≤ 0,05, A,B ≤ 0,01.

Tabela 17. Skład chemiczny mięśnia *musculus thoracis* (% SM)
Table 17. Chemical composition of *musculus thoracis* (% DM)

Wyszczególnienie Items	Grupy – Groups				P	SE
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM		
Sucha masa – Dry matter	22,79	22,19	22,14	22,42	0,15	0,11
Białko ogólne – Crude protein	92,42	91,47	91,79	90,49	0,30	0,36
Tłuszcz surowy – Crude fat	3,92	3,87	3,99	3,54	0,72	0,14
Popiół – Ash	4,89	4,73	4,84	4,68	0,60	0,06

Tabela 18. Skład kwasów tłuszczowych mięśnia *musculus thoracis* (g/100 g wszystkich oznaczonych kwasów tłuszczowych)Table 18. Composition of fatty acid in *musculus thoracis* (g/100 g of all estimated acids)

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Grupy – <i>Groups</i>				P	SE
	KT/ST	KT/SM	KM/ST	KM/SM		
C _{8:0}	0,036	0,033	0,165	0,018	0,374	0,033
C _{10:0}	–	–	0,090	0,077	0,582	0,028
C _{12:0}	0,660	0,598	0,576	0,609	0,998	0,141
C _{14:0}	1,798	1,856	1,490	1,540	0,952	0,253
C _{16:0}	23,901	21,833	20,941	20,951	0,745	1,031
C _{16:1}	1,261	1,096	0,846	0,850	0,247	0,085
C _{18:0}	11,298	12,102	12,011	12,524	0,672	0,338
C _{18:1}	27,668	25,043	22,976	21,822	0,534	1,446
C _{18:2 n-6}	23,329	25,279	27,674	28,291	0,448	1,176
C _{18:3 n-6}	0,0378	0,0884	0,118	0,092	0,592	0,020
C _{18:3 n-3}	0,4333	0,664	0,541	0,631	0,292	0,045
C _{20:0}	0,263	0,207	0,171	0,187	0,853	0,037
CLA c-9-t 11	0,338	0,507	0,386	0,379	0,679	0,049
CLA t10-c12	0,235	0,194	0,208	0,149	0,781	0,030
CLA c-9-c 11	0,071	0,163	0,126	0,097	0,658	0,031
CLA t9-t11	0,086	0,109	0,178	0,096	0,301	0,019
C _{22:0}	0,014	0,176	0,257	0,258	0,428	0,058
C _{20:4}	7,760	9,099	10,017	10,163	0,573	0,649
C _{22:1}	0,357	0,304	0,375	0,389	0,914	0,042
C _{20:5 n-3} EPA	0,218	0,290	0,372	0,319	0,836	0,056
C _{22:6 n-3} DHA	0,231	0,358	0,480	0,553	0,489	0,075
SFA	37,971	36,805	35,702	36,166	0,958	1,436
UFA	62,029	63,195	64,298	63,834	0,958	1,433
MUFA	29,287	26,443	24,196	23,061	0,494	1,483
PUFA	32,742	36,753	40,102	40,772	0,434	1,869
<i>n-6</i>	31,127	34,467	37,809	38,546	0,448	1,754
<i>n-3</i>	0,884	1,312	1,393	1,503	0,488	0,145
DFA	73,327	75,297	76,309	76,357	0,860	1,330
OFA	26,673	24,703	23,690	23,643	0,860	1,335
UFA/SFA	1,699	1,790	1,855	1,845	0,945	0,094
DFA/OFA	2,882	3,264	3,444	3,417	0,765	0,198
MUFA/SFA	0,800	0,738	0,697	0,656	0,797	0,050
PUFA/SFA	0,899	1,052	1,158	1,188	0,620	0,081
<i>n-6/n-3</i>	47,839	29,061	37,881	30,835	0,554	4,905
CLA	0,731	0,973	0,899	0,723	0,467	0,065

Na podstawie analizy podstawowego składu chemicznego mięsa cieląt oraz oznaczonego profilu kwasów tłuszczowych mięśnia *musculus thoracis* (tab. 17 i 18) nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w badanych składnikach.

W ramach wykonanego doświadczenia analizowano także pasaż transgenicznego DNA w organizmie cieląt. Wyniki analiz wykazały, że w treści zwacza wszystkich zwierząt otrzymujących materiał GM stwierdzono DNA pochodzące

z soi RR i/lub kukurydzy MON (tab. 19). Obecność transgenicznego DNA w treści żwacza cieląt sugeruje, że pochodziły one z niestrawionych jeszcze w żwaczu cząstek genetycznie modyfikowanej paszy. Fragmentów tych nie obserwowano już w dwunastnicy, w treści jelita cienkiego oraz grubego. Można przypuszczać, że wcześniej zostały one całkowicie strawione.

Nie stwierdzono również obecności transgenicznego DNA w badanych narządach i tkankach, tj. w płucach, wątrobie, śledzionie i w mięśniach. Treść żwacza cieląt z grupy zwierząt żywionych mieszankami paszowymi na bazie odmian konwencjonalnych zawierała jedynie referencyjne geny lektyny i inwertazy. W pozostających grupach zwierząt KT/SM oraz KM/SM zostały wykryte elementy transgeniczne: terminator NOS i promotor 35S, charakterystyczne dla stosowanych modyfikacji. W grupie KM/ST zidentyfikowano promotor 35S występujący w kukurydzy MON 810. W bakteryjnym DNA również nie wykazano obecności elementów transgenicznego promotora 35S i terminatora NOS. Nie stwierdzono istotnych różnic ilościowych między grupami w składzie badanych mikroorganizmów.

W czasie trwania doświadczenia dokonano oceny wpływu pasz genetycznie modyfikowanych na parametry charakteryzujące status immunologiczny cieląt.

Tabela 19. Wyniki analizy obecności transgenicznego DNA w przewodzie pokarmowym oraz tkankach cieląt (analizy wykonane w PIWet – PIB Puławy)

Table 19. Results of detection of the transgenic DNA fate in digestive tract content and tissues of calves (performed at PIWet – PIB Pulawy)

Wyszczególnienie Items	KT/ST				KT/SM				KM/ST				KM/SM			
	NOS	35S	lektyna lectin	inwertaza invertase	NOS	35S	lektyna lectin	inwertaza invertase	NOS	35S	lektyna lectin	inwertaza invertase	NOS	35S	lektyna lectin	inwertaza invertase
Krew – Blood	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerka – Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wątroba – Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Śledziona – Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tkanka mięśniowa – Muscles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Płuca – Lungs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trzustka – Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zawartość żwacza – Rumen content	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dwunastnica – Duodenum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelito czcze – Jejunum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelito grube – Colon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W badaniach wskaźników erytrocytarnych i trombocytarnych (tab. 20) nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupami cieląt, a średnie wartości badanych wskaźników utrzymywały się na poziomie uznanym za fizjologiczny dla tego gatunku zwierząt i badanej grupy wiekowej. Nieznacznie wyższe średnie wartości zaobserwowano w odniesieniu do liczby erytrocytów (RBC) i hemoglobiny (HGB) we

krwi cieląt grupy KT/SM w porównaniu do pozostałych zwierząt, jednak nie były to różnice statystycznie istotne.

Z kolei, nieco niższe wartości notowano w tej grupie cieląt, a także w grupie KT/ST w zakresie ogólnej liczby płytek krwi (PLT) we krwi obwodowej tych zwierząt, przy czym i w tym wypadku nie były to różnice statystycznie istotne.

Tabela 20. Średnie wartości wskaźników układu erytrocytarnego i trombocytarnego cieląt
 Table 20. Average values of peripheral blood erythrocyte and thrombocyte indices in calves' blood

Grupa Group	RBC (10 ¹² /l)	HCT (l/l)	MCV (fl)	HGB (mmol/l)	MCH (fmol)	MCHC (mmol/l)	PLT (10 ⁹ /L)	MPV (fl)
K0	6,28 ±1,07	0,21 ±0,05	33,43 ±2,15	7,40 ±1,01	1,13 ±0,08	35,43 ±4,41	623,29 ±237,06	6,49 ±0,50
KT/ST	7,87 ±1,24	0,28 ±0,06	35,25 ±2,63	8,30 ±3,01	0,98 ±0,25	28,78 ±6,69	417,50 ±221,75	6,48 ±0,15
KT/SM	8,54 ±0,66	0,31 ±0,03	36,50 ±2,08	10,23 ±1,02	1,13 ±0,05	32,83 ±0,92	445,75 ±251,39	6,78 ±0,60
KM/ST	7,55 ±1,26	0,26 ±0,06	34,80 ±1,79	9,10 ±1,34	1,16 ±0,05	35,02 ±2,83	629,00 ±201,60	6,78 ±0,55
KM/SM	7,83 ±1,63	0,27 ±0,07	42,75 ±17,17	7,95 ±2,07	1,13 ±0,10	34,93 ±3,73	504,00 ±139,30	8,20 ±3,00

Grupa K0 – kontrolna ujemna, wartości przed immunizacją. – Group K0 – negative control, values before immunization.

Podobnie kształtowały się u cieląt grupy KT/SM niektóre parametry odporności komórkowej (tab. 21). Ogólna liczba leukocytów we krwi obwodowej tych zwierząt była bowiem podwyższona w porównaniu do pozostałych grup cieląt, w głównej mierze jako następstwo zdecydowanie wyższej liczby granulocytów obojętnochłonnych – PMNL i tzw. komórek MID, których dominującą frakcją są monocyty. Względne wartości tych subpopulacji leukocytów, tj. PMNL i MID, zachowywały się analogicznie.

W tym miejscu należy jednak pokreślić, że ogólna liczba leukocytów oraz liczebność

omawianych subpopulacji komórkowych była wyraźnie wyższa we wszystkich grupach doświadczalnych, jeśli porówna się ich wartości z notowanymi w kontroli ujemnej (K0), tj. uzyskanymi przed immunizacją cieląt szczepionką Rispoval 3.

Zmiany te były najwyraźniej skutkiem stymulującego wpływu szczepienia na kształtowanie się poziomu analizowanych komórek. Z kolei, zmiany w poszczególnych subpopulacjach limfocytów obwodowych krwi cieląt zachowywały się różnie w zależności od badanego parametru i były bardziej zbliżone do siebie (rys. 6, 7, 8, 9).

Tabela 21. Średnie wartości wskaźników układu leukocytnego cieląt
 Table 21. Average values of peripheral blood leukocyte indices in calves

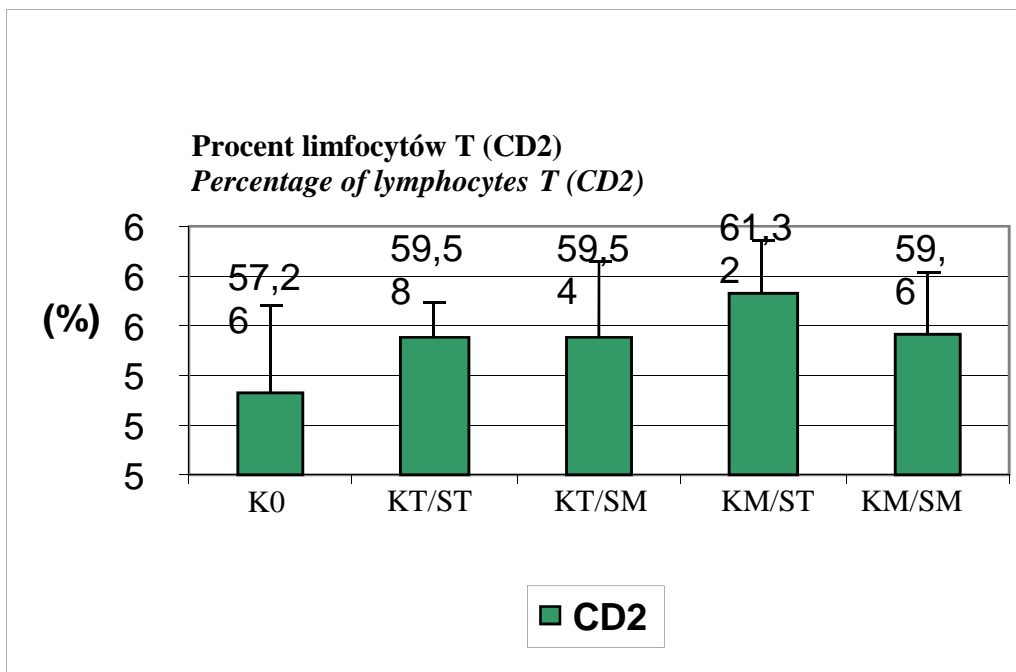
Grupa Group	WBC (10 ⁹ /L)	LYM (10 ⁹ /L)	MID (10 ⁹ /L)	PMNL (10 ⁹ /L)	LYM (%)	MID (%)	PMNL (%)
K0	0,64 ±2,44	7,10 ±2,06	0,73 ±0,25	2,81 ±0,89	67,43 ±9,02	6,29 ±1,60	26,29 ±7,59
KT/ST	2,23 ±2,08	7,73 ±2,44	0,93 ±0,28	3,58 ±1,48	64,00 ±13,7	7,00 ±2,00	29,00 ±11,8
KT/SM	3,98 ±5,12	6,60 ±1,78	1,23 ±0,46	6,15 ±3,05	49,75 ±5,56	8,50 ±1,73	41,75 ±6,24
KM/ST	2,46 ±4,24	6,24 ±1,84	0,94 ±0,67	5,28 ±2,00	52,00 ±5,10	6,60 ±3,05	41,40 ±5,13
KM/SM	1,43 ±1,76	7,25 ±1,30	0,73 ±0,15	3,45 ±0,75	53,95 ±32,4	9,00 ±6,38	37,50 ±7,85

Grupa K0 – kontrolna ujemna, wartości przed immunizacją. – Group K0 – negative control, values before immunization.

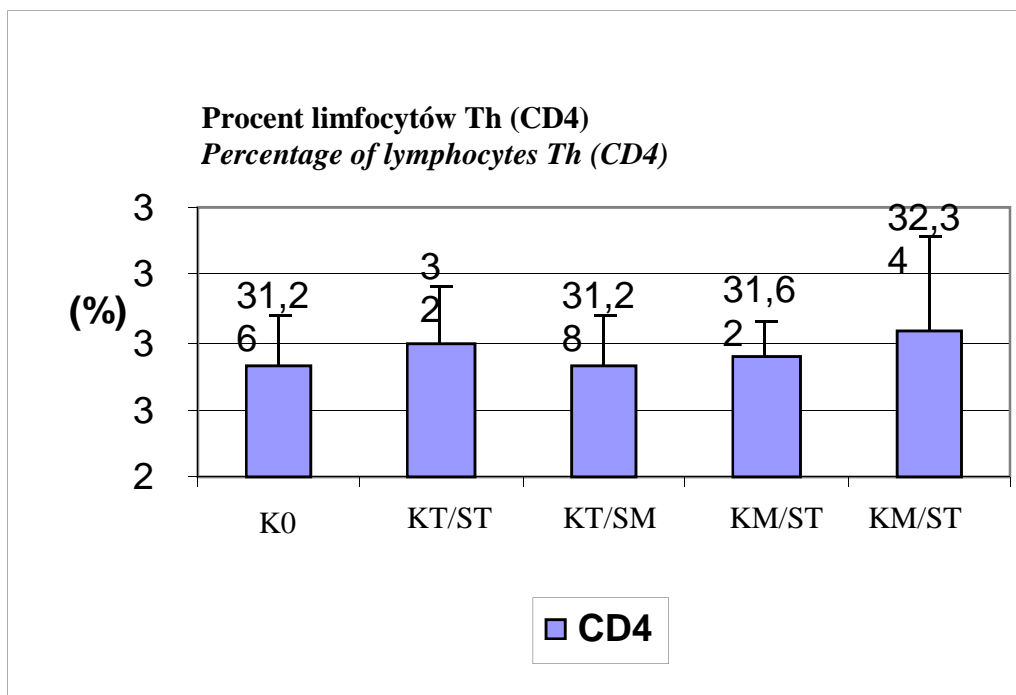
Najbardziej jednak widoczne różnice, choć nieistotne statystycznie, zaobserwowano w wartościach odsetka limfocytów T i subpopulacji Tc/s. W odniesieniu do pierwszej z tych subpopulacji najwyższe wartości odsetka limfocytów T we krwi obwodowej cieląt zaobserwowano w grupie KM/ST. Z kolei, w subpopulacji limfocytów Tc/s zmiany te były zbliżone do poprzednich, bowiem i w tym wypadku wyższe wartości niż w grupach K0, KT/ST i KM/SM notowano w grupie KM/ST. Jednak, najwyższy odsetek tych komórek został wykazany w grupie KT/SM. Trzeba jednak pamiętać, że wykazane w tych badaniach różnice nie były istotne statystycznie, a efekt zwiększonej liczebności badanych frakcji komórek we wszystkich grupach doświadczalnych mógł być wynikiem niespecy-

ficznego działania na odporność komórkową zastosowanej immunizacji.

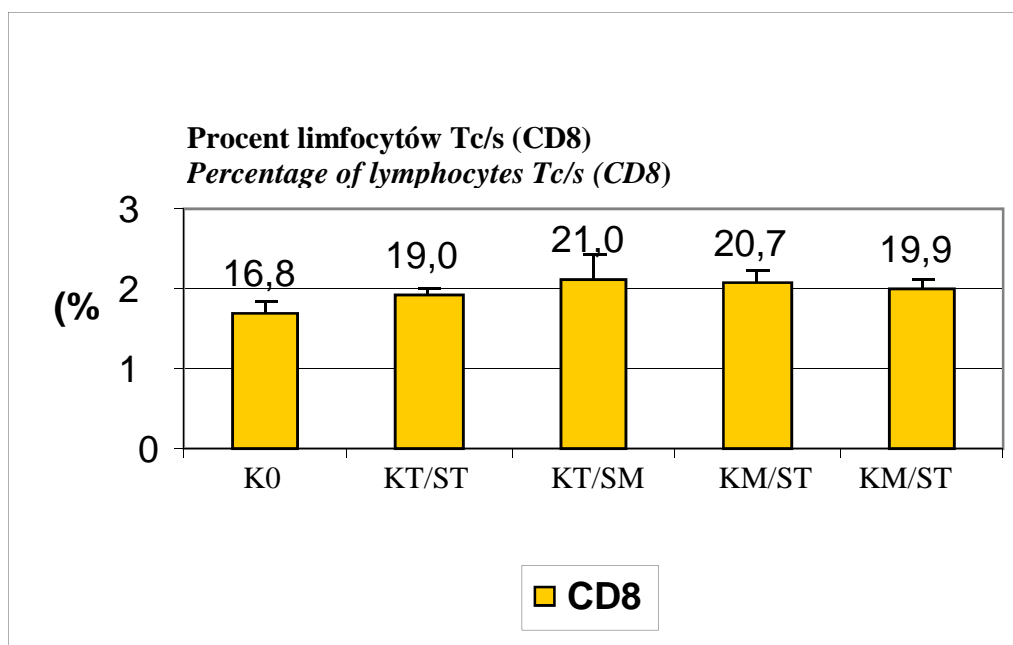
W badaniach odporności humoralnej zanotowano istotne podwyższenie średnich wartości, wskazujących na wzrost miana swoistych przeciwciał po szczepieniu we wszystkich badanych grupach cieląt w porównaniu do kontroli ujemnej (K0). Otrzymane rezultaty jednoznacznie wskazują na pełną efektywność tej odpowiedzi i związaną z nią syntezę specyficznych przeciwciał anty BRSV, PI3V i BVDV (tab. 22). Wzrost ten był najbardziej nasilony ($P \leq 0,01$) w odniesieniu do wirusa BRS. Dla pozostałych antygenów wirusowych, tj. BVDV i PI3, uzyskane wartości również były wyższe niż w grupie wyjściowej (K0), a różnice te utrzymywały się na poziomie istotności wynoszącym $P \leq 0,05$.



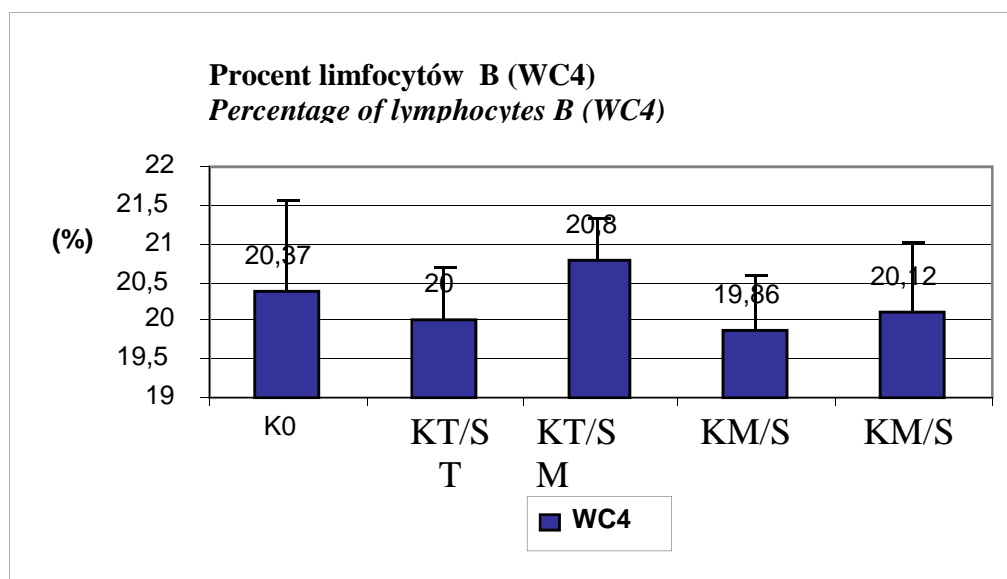
Rys. 6. Zmiany w subpopulacjach limfocytów CD2 we krwi obwodowej cieląt
 Fig. 6. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte subpopulations CD2 in calves



Rys. 7. Zmiany w subpopulacjach limfocytów CD4 we krwi obwodowej cieląt
Fig. 7. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte subpopulations CD4 in calves



Rys. 8. Zmiany w subpopulacjach limfocytów CD8 we krwi obwodowej cieląt
Fig. 8. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte subpopulations CD8 in calves



Rys. 9. Zmiany w subpopulacjach limfocytów WC4 we krwi obwodowej cieląt
Fig. 9. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte subpopulations WC4 in calves

Tabela 22. Zmiany w swoistej odpowiedzi humoralnej cieląt po immunizacji szczepionką Risposal 3
Table 22. Change in immunological responses in calves vaccinated with Risposal 3

Grupa Group	BHV-1 (%)	BVDV (%)	BRSV (%)	PI 3 (%)	Adeno3 (%)
K0	9,71	18,94	2,36	43,87	14,99
	±4,94	± 9,72	±1,0	±16,28	±7,27
KT/ST	7,47	49,59	7,21	78,57	20,07
	±1,59	±15,35**	±21,14***	±32,37**	±11,47
KT/SM	8,77	23,50	6,92	81,98	3,06
	±2,59	±11,49**	±24,58***	±32,03**	±1,95
KM/ST	3,84	33,67	4,82	90,27	12,88
	±1,60	±16,99**	±35,25***	±29,94**	±6,48
KM/SM	10,17	50,19	6,25	83,89	24,73
	±5,91	±19,65**	±35,07***	±39,85**	±10,30

Grupa K0 – kontrolna ujemna, wartości przed immunizacją. – Group K0 – negative control, values before immunization.

Podsumowanie wyników badań na krowach mlecznych i cielętach

Uzyskane wyniki badań wskazują, że modyfikowane ziarno kukurydzy odmiany MON 810 i modyfikowana poekstrakcyjna śruta sojowa, pochodząca z soi RR nie wpłynęły ujemnie na efekty produkcyjne krow mlecznych żywionych dawkami pokarmowymi z ich udziałem, Skarmianie modyfikowanych pasz nie miało również wpływu, w porównaniu do pasz niemo-

dyfikowanych, na wartości współczynników rozkładu suchej masy i białka ogólnego w zwacu krow. Nie wystąpił także poziomy transfer DNA, pochodzącego z pasz genetycznie modyfikowanych, do plazmidowego DNA mikroorganizmów bytujących w zwacu krow. Całkowita i dzienna produkcja mleka oraz średnie wykorzystanie suchej masy, białka, energii i pasz treściwych we wszystkich grupach były podobne. Skład mleka krow w niektórych przypadkach różnił się wprawdzie istotnie, ale nie wydaje się,

aby było to spowodowane rodzajem skarmianej mieszanki paszowej. Analiza próbek mleka metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) nie wykazała obecności transgenicznego DNA (tDNA) o sekwencji specyficznej dla kukurydzy MON 810 oraz soi RR, co może wskazywać na brak poziomego transferu tDNA z tych roślin do mleka krów. Badane pasze genetycznie modyfikowane nie wpłynęły ujemnie na profil metabolitów w surowicy krwi krów i ich zdrowotność.

Pasze genetycznie modyfikowane nie wpłynęły ujemnie na wyniki wychowu cieląt oraz nie spowodowały zmian w składzie chemicznym mięsa i profilu kwasów tłuszczowych w tłuszczu mięśnia najdłuższego grzbietu (*MT*). Nie zaobserwowano transferu DNA, pochodzącego z pasz

genetycznie modyfikowanych do krwi i narządów cieląt oraz nie stwierdzono obecności tDNA w treści jelita cienkiego i grubego. Stosowanie w żywieniu cieląt pasz genetycznie modyfikowanych (GM) nie wpłynęło na skład ilościowy mikroflory przewodu pokarmowego, jak również nie nastąpił transfer transgenicznego DNA do bakterii zasiedlających wybrane odcinki przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki badań wykazały również brak istotnego wpływu pasz GM na procesy odporności komórkowej cieląt oraz reaktywności immunologicznej zwierząt. Mieszanki paszowe z udziałem pasz genetycznie modyfikowanych nie miały również wpływu na powstawanie zmian histopatologicznych w badanych narządach i tkankach cieląt.

Literatura

- AOAC (2005). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 18th ed., Arlington, VA.
- Barriere Y.R., Verite P., Brunshwig F., Surault J., Emile C. (2001). Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of Bt176 resistance to *Ostrinia nubilalis*. *J. Dairy Sci.*, 84 (8): 1863–1871.
- Beever D.E., Kemp C.F. (2000). Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr. Abstr. Rev.*, Ser. B, 70: 175–182.
- Brake J., Vlachos D. (1998). Evaluation of transgenic event 176 Bt corn in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 77: 648–653.
- Bravo A.S., Gill S., Soberon M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 4 (4): 423–435.
- Calsamiglia S., Hernandez B., Hartnell G.F., Phipps R. (2007). Effects of corn silage derived from a genetically modified variety containing two transgenes on feed intake, milk production, and composition, and the absence of detectable transgenic deoxyribonucleic acid in milk in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90 (10): 4718–4723.
- Chen Y., Wang Y., Ge Y., Xu B. (2005). Degradation of endogenous and exogenous genes of Roundup-Ready soybean during food processing. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (26): 10239–10243.
- Chowdhury E.H., Kuribara H., Hino A., Sultana P., Mikami O., Shimada N., Guruge K.S., Saito M., Nakajima Y. (2003). Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.*, 81: 2546–2551.
- Clark J.H., Ipharraguerre I.R. (2001). Livestock Performance: Feeding Biotech. Crops. *J. Dairy Sci.*, 84 (E-Suppl.): E9–18.
- Donkin S.S., Velez J.C., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2000). Effect of feeding Roundup Ready corn silage and grain on feed intake, milk production and milk composition in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83 (Suppl. 1), p. 273 (abstract).
- Donkin S.S., Velez J.C., Totten A.K., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2003). Effects of feeding silage and grain from glyphosate-tolerant or insect-protected corn hybrids on feed intake, ruminal digestion, and milk production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 86 (5): 1780–1788.
- English L., Slatin S.L. (1992). Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 22: 1–7.
- Erickson G.E., Robbins N.D., Simon J.J., Berger L.L., Klopfenstein T.J., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2003). Effect of feeding glyphosate-tolerant (Roundup-Ready events GA21 or nk603) corn compared with reference hybrids on feedlot steer perfor-

- mance and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.*, 10: 2600–2608.
- Faust M.A., Miller L. (1997). Study finds no Bt in milk. Iowa State Univ, Integrated Crop Manage, Newsl./ IC-478, Special Livest. ed., Ames, IA.
- Flachowsky G.A., Chesson A., Aulrich K. (2005). Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Arch. Anim. Nutr.*, 59: 1–40.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497–509.
- Folmer J.D., Erickson G.E., Milton C.T., Klopfenstein T.J., Beck J.F. (2000 a). Utilization of Bt corn residue and corn silage for growing beef steers. Abstract 271 presented at the Midwestern Section ASAS and Midwest Branch ADSA 2000 Meeting, Des Moines, IA.
- Folmer J.D., Grant R.J., Milton C.T., Beck J.F. (2000 b). Effect of Bt corn silage on short-term lactational performance and ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83 (5): 1182, Abstract 272.
- Folmer D., Grant R.J., Milton C.T., Beck J. (2002). Utilization of Bt corn hybrids in growing beef steers. *J. Anim. Sci.*, 80: 1352–1361.
- Grant R.J., Fanning K.C., Kleinschmit D., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2003). Influence of glyphosate-tolerant (event nk603) and corn rootworm protected (event MON863) corn silage and grain on feed consumption and milk production in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 86 (5): 1707–1715.
- Guertler P., Paul V., Steinke K., Wiedemann S., Preißinger W., Albrecht C., Spiekers H., Schwarz F.J., Meyer H.H.D. (2010). Long-term feeding of genetically modified corn (MON 810) – Fate of *cryIAb* DNA and recombinant protein during the metabolism of the dairy cow. *Livest. Sci.*, 131: 250–259.
- Ipharraguerre I.R., Younker R.S., Clark J.H., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2003). Performance of lactating dairy cows fed corn as whole plant silage and grain produced from a glyphosate-tolerant hybrid (event NK603). *J. Dairy Sci.*, 86 (5): 1734–1741.
- INRA-tion 3,3 (2005).
- IZ PIB – INRA (2009). Standards for ruminant feeding (in Polish). National Research Institute of Animal Production, Kraków.
- James C. (2008). Preview: Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), Briefs No. 34, ISAAA, Ithaca, New York.
- Klotz A., Einspanier R. (1998). Detection of "novel-feed" in animals? Injury of consumers of meat or milk is not expected, 3: 109–111.
- Kowalski Z.M., Strzetelski J.A., Niwińska B., Nowak W., Pająk J., Szyszkowska A. (2008). Standardowe metody oznaczania rozkładu białka pasz w przewodzie pokarmowym zwierząt przeżuwających. *Wiad. Zoot.*, XLVI, 4: 53–58.
- Łomnicki A. (1995). Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN, Warszawa.
- Mazza R., Soave M., Morlacchini M., Piva G., Marocco A. (2005). Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res.*, 14 (5): 775–784.
- McCann M.C., Liu K., Trujillo W.A., Dobert C.D. (2005). Glyphosate-tolerant soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max* L.) during three years of field testing. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5331–5335.
- Padgett S.R., Taylor N.B., Nida D.L., Bailey M.R., MacDonald J., Holden L.R., Fuchs R.L. (1996). The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.*, 126: 702–716.
- Petty A., Hendrix K.S., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2001). Performance of beef cattle fed Roundup Ready corn harvested as whole plant silage or grain. *J. Anim. Sci.*, 79 (Suppl. 2): 102, Abstract 321.
- Phipps R.H., Beever D.E., Humphries D.J. (2002). Detection of transgenic DNA in milk from cows receiving herbicide tolerant (CP4EPPS) soybean meal. *Livest. Prod. Sci.*, 73: 269–273.
- Phipps R.H., Beever D.E., Maddison B.C. (2003). Detection of transgenic DNA and protein in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood and faeces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86: 4070–4078.
- Phipps R.H., Jones A.K., Tingey A.P., Abeyasekera S. (2005). Effect of corn silage from a herbicide-tolerant genetically modified variety on milk production and absence of transgenic DNA in milk. *J. Dairy Sci.*, 88: 2870–2878.

Řehout V., Hanusová L., Kadlec J., Čítek J., Hosnedlová B. (2008). Detection of DNA fragments from Roundup Ready soya and Bt maize in organs of broilers. *J. Agrobiol.*, 25: 141–144.

Rossi F., Morlacchini M., Fusconi G., Pietri A., Mazza R., Piva G. (2005). Effect of *Bt* corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. *Poultry Sci.*, 84: 1022–1030.

Russell J., Petersen T.S. (1999). Bt corn and non-Bt corn crop residues equal in grazing value. Iowa State University Extension, 1-17-2001.

Russell J.R., Hersom M.J., Pugh A., Barrett K., Farnham D. (2000 a). Effects of grazing crop residues from Bt-corn hybrids on the performance of gestating beef cows. *J. Anim. Sci.*, 78 (Suppl. 2): 79–80.

Russell J.R., Farnham D., Berryman R.K., Hersom M.J., Pugh A., Barrett K. (2000 b). Nutritive value of the crop residues from bt-corn hybrids and their effects on performance of grazing beef cows. Beef Research Report – Iowa State University; pp. 56–61.

SAS (2001). Release 2.6 for Windows. SAS Institute INC. SAS Campus Drive Cary. NC.

Shimada N., Murata H., Mikami O., Yoshioka M., Guruge K.S., Yamanaka N., Nakajima Y., Miyazaki S. (2006). Effects of feeding calves genetically modified corn bt11: a clinico-biochemical study. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (10): 1113–1115.

Steinke K., Guertler P., Paul V., Wiedemann S., Ertle T., Albrecht C., Meyer H.H., Spiekers H., Schwarz F.J. (2010). Effects of long-term feeding of genetically modified corn (event MON 810) on the performance of lactating dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 94 (5): 185–193.

Whiteley H.R., Schnepf H.E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1, 40: 549–576.

Yonemochi Ch., Ikeda T., Harada Ch., Kusama T., Hanuzami M. (2003). Influence of transgenic corn (CBH 351, named Starlink) on health condition of dairy cows and transfer of Cry9C protein and *cry9C* gene to milk, blood, liver and muscle. *Anim. Sci. J.*, 74: 81–88.

GENETICALLY MODIFIED MAIZE MON 810 AND ROUNDUP READY SOYBEAN MEAL IN CATTLE FEEDING

Summary

An experiment was conducted to evaluate the effect of feeding transgenic corn MON 810 and soybean meal Roundup Ready (HT) on cow productivity, milk composition, serum metabolite profiles and transfer of tDNA into milk as well as on rearing performance, health status and presence of transgenic DNA in the gastrointestinal tract (GIT) and tissues of calves. The experiment was carried out on 40 Holstein-Friesian dairy cows and 40 Black-and-White bulls allotted into 4 groups: KT/ST – conventional soybean meal and maize; KT/SM – conventional maize and GM soybean meal; KM/ST – GM maize and conventional soybean meal; and KM/SM – GM maize and GM soybean. There were no significant differences in cow productivity and milk composition and metabolite profiles (BHBA, FFA, glucose, insulin and progesterone) between animals fed transgenic and non-transgenic plants. Transgenic DNA sequences of MON 810 and RR soybean meal were not detectable by PCR in milk of cows. There were no effects of GM components on body weight gain and meat composition of calves. The transgenic DNA was detectable in content of rumen and duodenum of calves but not in the distal part of GIT, blood, muscles and evaluated organs. Results indicated that feeding calves with mixtures containing genetically modified maize MON 810 or/and soybean meal RR did not significantly affect the immunological indices of calves.

