

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Dyscyplina Zootechnika i rybactwo

Mgr inż. Kamila Janicka

Rozprawa doktorska

**Profil behawioralny kur nieśnych jako czynnik determinujący parametry użytkowe i fizjologiczne
ptaków**

***The behavioural profile of laying hens as a determinant of the birds’
performance and physiological traits***

Rozprawa doktorska wykonana w Instytucie Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej

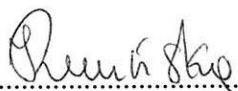
Promotor: Prof. dr hab. Iwona Rozempolska – Rucińska

Lublin, 2025 rok

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 4.05.2025r.

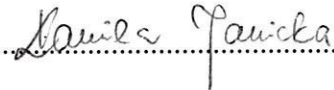
Podpis promotora 

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/ ~~Promotorów~~/ ~~Promotora pomocniczego~~* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 4.05.2025r.

Podpis autora 

*niepotrzebne skreślić

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

Publikacja nr 1 (P1)

Iwona Rozempolska-Rucińska, **Kamila Janicka**, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288, <https://doi.org/10.22358/jafs/159910/2023>

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 100, IF = 1,400**

Indywidualny wkład pracy w publikację - 50 %: Merytoryczne opracowanie koncepcji pracy, założeń metodycznych, przeprowadzenie badań, opis i interpretacja wyników badań, przygotowanie rycin i wizualizacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, redakcja publikacji, korespondencja z redakcją, korekta pracy po recenzjach.

Publikacja nr 2 (P2)

Kamila Janicka, Kamil Drabik, Karolina Wengerska, Iwona Rozempolska-Rucińska (2025) Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. Animals 15, 604, <https://doi.org/10.3390/ani15040604>

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 100, IF = 2,700**

Indywidualny wkład pracy w publikację – 80 %: Koncepcja pracy, merytoryczne opracowanie, założenia metodyczne, zaplanowanie i przeprowadzenie badań, przygotowanie bazy danych, opis i interpretacja wyników badań, przygotowanie rycin i wizualizacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, redakcja publikacji, korespondencja z redakcją, korekta pracy po recenzjach.

Publikacja nr 3 (P3)

Kamila Janicka, Iwona Rozempolska-Rucińska, Grzegorz Zięba (2024) Personality profile of laying hens as a selection criterion trait. Med. Weter. 80(12), 645-651, doi: [dx.doi.org/10.21521/mw.6938](https://doi.org/10.21521/mw.6938)

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 70, IF = 0,400**

Indywidualny wkład pracy w publikację – 80%; Koncepcja pracy, merytoryczne opracowanie, przeprowadzenie badań, przygotowanie rycin i wizualizacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, redakcja publikacji, korespondencja z redakcją, korekta pracy po recenzjach.

Łączna liczba punktów MEiN = 270

Sumaryczny Impact Factor = 4,5

Udział w publikacjach = 70%

Spis treści

Streszczenie	6
Summary	7
Wstęp	8
Hipotezy i cele badań.....	12
Material i metody.....	13
Material.....	13
Testy behawioralne	13
<i>Obserwacje behawioralne (P1).....</i>	13
<i>Zmodyfikowany test otwartego pola (P2)</i>	14
<i>Test nowego obiektu (P3).....</i>	16
Pomiar parametrów fizjologicznych i mikrobiologicznych.....	17
Analiza statystyczna	19
Omówienie wyników	21
Dyskusja	28
Podsumowanie i wnioski	34
Bibliografia.....	36
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	43
Oświadczenia współautorów.....	44

Streszczenie

Celem rozprawy było określenie, czy profil behawioralny kur nieśnych, określony przez indywidualne reakcje behawioralne, determinuje wskaźniki użytkowe i fizjologiczne kur nieśnych, a tym samym czy jest to cecha, którą należy uwzględniać w kryterium selekcyjnym ptaków. Materiał badawczy stanowiło łącznie 4735 ptaków, w tym 224 ptaki rasy Zielononóżka kuropatwiana (Zk), 1333 ptaki rasy Rhode Island White (RIW) i 3180 ptaków rasy Rhode Island Red (RIR). Przeprowadzono analizę wybranych wskaźników behawioralnych pod kątem: 1) wpływu pozycji w strukturze stada na dobrostan kur nieśnych, 2) znaczenia gęstości obsady dla kształtowania zachowania kur nieśnych podczas zmodyfikowanego testu otwartego pola, oraz 3) reakcji na test nowego obiektu pod kątem profilu behawioralnego i jego wpływu na cechy użytkowe kur w hodowli zarodowej. Analizowano czas i częstotliwość różnych zachowań, które pozwoliły przypisać ptakom pozycję w hierarchii lub profil behawioralny. Ponadto oceniono parametry fizjologiczne: poziom serotoniny, dopaminy, adrenaliny, noradrenaliny, kortykosteronu, kortyzolu i testosteronu, a także skład mikrobioty jelitowej. Wykazano, że brak ustalonej pozycji w grupie może zwiększać stres u kur niosek. Osobniki określone jako neutralne i podporządkowane przejawiały silniejszą motywację do zmiany swojego statusu. Poza pozycją w grupie istotnym czynnikiem modulującym zachowanie ptaków była niska gęstość obsady. Ptaki z tej grupy przejawiały większą zmienność zachowań. Na podstawie wyników testu nowego obiektu wydaje się, że ptaki proaktywne, wykazujące silne reakcje behawioralne i podejmujące decyzje zgodnie ze swoją motywacją, powinny być pożądanym typem behawioralnym w warunkach fermowych. Jednakże pomimo prezentowania różnych tendencji behawioralnych nie wykazano różnic w wartości użytkowej ptaków reaktywnych i proaktywnych. Może to prowadzić do błędnych wniosków, że profil behawioralny nie jest istotną cechą w hodowli i nie wiąże się z poziomem stresu. W chowie fermowym należy dążyć do stabilizacji warunków utrzymania, ponieważ szeroko rozumiane zmiany środowiska zaburzają homeostazę organizmu.

Słowa kluczowe: kury nieśne, profil behawioralny, kryterium selekcyjne, parametry fizjologiczne, cechy użytkowe

Summary

The aim of this dissertation was to investigate whether the behavioural profile of laying hens, as specified by individual behavioural responses, determines the performance and physiological indices of laying hens, and thus whether this is a trait that should be taken into account in the selection criterion for birds. The study material consisted of a total of 4735 birds, including 224 Green-legged Partridge (Zk) birds, 1333 Rhode Island White (RIW) birds and 3180 Rhode Island Red (RIR) birds. Analysis of selected behavioural indices was carried out for: (1) the influence of position in flock structure on laying hen welfare, (2) the importance of stocking density in shaping laying hen behaviour during a modified open-field test, and (3) the response to a new-object test in terms of behavioural profile and its influence on performance traits of hens in brood-rearing. The timing and frequency of different behaviours were analysed to assign a hierarchical position or behavioural profile to the birds. In addition, physiological parameters were assessed: levels of serotonin, dopamine, adrenaline, noradrenaline, corticosterone, cortisol and testosterone, as well as the composition of the gut microbiota. It has been shown that the lack of a fixed group position can increase stress in laying hens. Individuals identified as neutral and subordinate showed stronger motivation to change their status. In addition to group position, low stocking density was an important factor modulating bird behaviour. Birds in this group showed greater behavioural variability. Based on the results of the new-object test, it seems that proactive birds, showing strong behavioural responses and making decisions according to their motivation, should be the desired behavioural type under farm conditions. However, despite presenting different behavioural tendencies, no differences were shown in the performance value of reactive and proactive birds. Results This may lead to the misleading conclusion that the behavioural profile is not an important trait in breeding and is not related to stress levels. In breeding, stable maintenance conditions should be targeted, as wide-ranging environmental changes disturb the homeostasis of the organism

Keywords: laying hens, behavioural profile, selection criterion, physiological parameters, performance traits

Wstęp

Przemysł drobiarski na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat uległ dynamicznemu rozwojowi [Hofmann i in., 2020]. Było to możliwe dzięki pracy hodowlanej, a w szczególności selekcji skierowanej na optymalizację produkcji pod kątem wysoko wydajnej produkcji jaj i mięsa [Cheng, 2010; Hofmann i in., 2020; Shynkaruk i in., 2023]. Doprowadziło to do znaczących zmian w praktykach zarządzania, ze specjalistycznymi i zintensyfikowanymi procesami produkcyjnymi pozwalającymi na maksymalizację zysków przy jednoczesnym zmniejszeniu nakładu pracy [Hofmann i in., 2020]. Warto jednak podkreślić, że postęp biologiczny i naukowy, taki jak selekcja w celu zwiększenia produkcji, często wiąże się z kompromisami i negatywnymi konsekwencjami dla kur [Van Marle-Köster i Visser, 2021]. Selekcja pod kątem jednej cechy może wpływać niekorzystnie na inne prowadząc do szkodliwych skutków dla zwierząt. W związku z tym selekcja powinna być wyważona, szczególnie w kontekście systemów utrzymania, tak aby poprawić zdolność radzenia sobie zwierzęcia w określonym środowisku produkcyjnym [Cheng, 2010].

Kwestia dobrostanu kur jest obecnie jednym z największych wyzwań, przede wszystkim w intensywnych systemach produkcji drobiu [Hofmann i in., 2020]. Obawy opinii publicznej dotyczące negatywnego wpływu produkcji na dobrostan niosek i bezpieczeństwo żywności [Cheng, 2010; Heng i in., 2013; Hofmann i in., 2020] są szeroko dyskutowane na świecie, a kury nieśne zostały zidentyfikowane jako zwierzęta gospodarskie najbardziej potrzebujące poprawy dobrostanu [Heng i in., 2013; Hofmann i in., 2020; Sinclair i in., 2022; Heng i in., 2013]. Biorąc pod uwagę, że mięso drobiowe i jaja stanowią podstawowe źródło żywności na świecie [Hofmann i in., 2020], nie dziwi fakt, że konsumenci zwracają dużą uwagę na pochodzenie produktów drobiarskich [Fiorilla i in., 2024]. Co więcej, wydaje się, że rosnąca świadomość społeczeństwa na temat jakości tych produktów jest główną siłą napędową dla podejmowanych badań na temat dobrostanu niosek [Weeks i Nicol, 2006; Fiorilla i in., 2024], tym bardziej że jest on kluczowym czynnikiem dla nowoczesnego, zrównoważonego i etycznego przemysłu spożywczego [Fiorilla i in., 2024]. Zrozumienie sposobu, w jaki kury nieśne wchodzą w interakcje między sobą oraz ze środowiskiem, umożliwia opracowanie bardziej skutecznych strategii [Fiorilla i in., 2024], co ma istotny wpływ na ekonomiczny aspekt produkcji [Zimmerman i in., 2011; Matur i in., 2015; Carvahlo i in., 2018]. Szczególnie że konsumenci są skłonni zapłacić więcej za produkty pozyskane z gospodarstw uwzględniających zasady dobrostanu [Heng i in., 2013].

Powszechnie wiadomo, że intensywna praca hodowlana stwarza wiele problemów i

stanowi zagrożenie dla dobrostanu niosek [Dudde i in., 2018], zwłaszcza że obecność czynników stresogennych jest częstym zjawiskiem w produkcji drobiarskiej [Kang i in., 2011; Hofmann i in., 2020]. W złożonym środowisku, do którego możemy zaliczyć warunki hodowlane, ptaki muszą dostosowywać się do zmieniających się okoliczności (zarówno negatywnych, jak i pozytywnych) [Boissy i in., 2007; Cockrem, 2007; Cockrem 2013]. Optymalny poziom stresu powoduje szereg reakcji, które mają na celu przystosowanie się osobnika do zachodzących zmian [Cockrem, 2007]. Jednak w wyniku długotrwałego stresu funkcjonowanie organizmu jest zaburzone, a tym samym zdolność adaptacji do danej sytuacji [Osadcha i Pavlovych, 2023]. Powszechną praktyką mającą na celu poprawę dobrostanu kur jest modyfikacja środowiska [Rozempolska-Rucińska i in., 2020; Evans i in., 2023]. Stosowanie wzbogaceń środowiskowych ma na celu poprawę biologicznego funkcjonowania zwierząt, tj. zmniejszenie częstotliwości nieprawidłowych zachowań przy jednoczesnym wzroście naturalnych zachowań, poprawie zdrowia fizycznego oraz lepszym wykorzystaniu dostępnych zasobów [Newberry, 1995; Campbell i in., 2019]. Należy jednak zwrócić uwagę, że dostosowanie środowiska hodowlanego tak, aby zapewnić dobrostan każdemu osobnikowi jest niemożliwe. Można za to podjąć próbę wyselekcjonowania osobników o cechach osobowości odpowiednich do warunków hodowlanych, tzn. dobrze adaptujących się [Mench, 1992; Craig i Swanson, 1994; Jones, 1996; Cheng, 2010]. Jak wykazują badania, potrzeby kur mogą być odmienne w zależności od gatunku, rasy, a także pomiędzy poszczególnymi osobnikami [Rozempolska-Rucińska i in., 2020]. Kury różnych ras różnią się nie tylko preferencjami dotyczącymi elementów środowiska, ale również stopniem pobudliwości i reaktywności emocjonalnej [Nelson i in., 2020; Rozempolska-Rucińska i in., 2020]. Indywidualna zmienność osobnicza i reakcje behawioralne mogą wyraźnie wpływać na sposób, w jaki ptaki wchodzi w interakcje ze środowiskiem, co dodatkowo może mieć konsekwencje dla ich życia społecznego [Cockrem, 2007].

Właściwy poziom dobrostanu jest powiązany z profilem behawioralnym ptaków. Wzorce zachowań zależą nie tylko od środowiska życia i doświadczeń ptaków, ale także od uwarunkowań genetycznych, warunków środowiskowych podczas rozwoju embrionalnego i efektów epigenetycznych [Rozempolska-Rucińska i in., 2020; Campbell i in., 2021]. Charakterystyczne wzorce zachowań u poszczególnych zwierząt reprezentują strategie (style), które zwierzęta wykorzystują do radzenia sobie z wymaganiami środowiska [Cockrem, 2007]. Wspomniane cechy są często oceniane za pomocą indywidualnych testów behawioralnych, np. test otwartego pola czy test nowej areny [Cockrem, 2013; Campbell i in., 2021; Campbell i Horton, 2023]. Należy podkreślić, że użycie tylko jednego testu nie

określa w pełni osobowości ptaków, która obejmuje spójne „zestawy” reakcji behawioralnych na szereg bodźców [Arndt i in., 2022]. Dlatego właściwe będzie użycie terminu „profil behawioralny”, gdyż wskazuje na pewne tendencje osobnika. Określając profil behawioralny ptaków ocenę poddaje się takie cechy jak aktywność, szybkość eksploracji i śmiałość. Na tej podstawie osobniki o zwiększonej aktywności, dłuższej eksploracji nowego środowiska, a także bardziej agresywne klasyfikowane są jako proaktywne. Natomiast osobniki reaktywne to te wykazujące większą pasywność, mniejszą śmiałość, eksplorację i agresję. Jednak nie wszystkie badania są w stanie konsekwentnie kategoryzować kury do konkretnej strategii radzenia sobie. Niektóre badania sugerują, że cechy osobowości różnią się od stylów radzenia sobie [Campbell i in., 2021]. Różnice w stylach radzenia sobie są również przynajmniej częściowo wyjaśnione różnicami w profilach hormonów stresu, przy czym osobniki proaktywne mają bardziej wyraźną aktywację stresu współczulnego (ucieczka/walka), podczas gdy osobniki reaktywne często reagują na stresującą sytuację wyższą aktywacją stresu przywspółczulnego (reakcja wycofania) [Favati i in., 2014a].

Innymi cechami, które mogą określać profil behawioralny jest lękliwość, agresywność i częstotliwość podejmowania konfliktów z innymi osobnikami [Favati i in., 2017; Campbell i Horton, 2023]. Indywidualna reakcja w agonistycznych interakcjach wewnątrzgatunkowych jest plastyczną cechą, zależną od kontekstu, w którym się pojawia [Favati i in., 2017]. Wspomniane cechy osobowości są powiązane z miejscem kury w hierarchicznej strukturze stada i wpływają na pozycję, jaką ptak zajmuje w grupie społecznej. Kury nioski są zwierzętami społecznymi, należy brać to pod uwagę przy interpretacji indywidualnych ocen behawioralnych [Campbell i Horton, 2023]. Zwierzęta tego samego gatunku można podzielić na fenotypy behawioralne, które wydają się być dostosowane do życia w różnych środowiskach. Charakteryzują się one stałą zmiennością zachowań agresywnych, lękowych i eksploracyjnych, a także różnicami w reakcjach fizjologicznych [Pusch i in., 2017; Pusch i Navara, 2018]. Stado kur może różnić się temperamentem czy innymi cechami, np. poznawczymi, ze względu na wpływy społeczne. Dlatego zrozumienie, w jaki sposób interakcje społeczne mogą oddziaływać na wzorce zachowań, czy cechy temperamentu poszczególnych kur, może poprawić nasze pojmowanie przyczyn zmienności grupowej [Campbell i Horton, 2023].

Aby można było wykorzystać profil behawioralny w praktyce hodowlanej, niezbędne są szczegółowe badania określające powiązania pomiędzy zachowaniem kur, a poziomem ich użyteczności oraz wskaźnikami fizjologicznymi. Organizm tworzy

nirozzerwalną całość i modyfikując jedne cechy trzeba sobie zdawać sprawę, w jaki sposób wpłynie to na inne. W tym przypadku celem badań była ocena, czy i ewentualnie w jaki sposób profil behawioralny jest powiązany z cechami użytkowymi i fizjologicznymi.

Hipotezy i cele badań

Hipotezy

W prowadzonych badaniach przyjęto założenie, że profil behawioralny kur nieśnych odgrywa istotną rolę w radzeniu sobie poszczególnych osobników z pojawiającymi się wyzwaniami środowiskowymi w hodowli. Ponadto jest to czynnik, który może determinować cechy użytkowe i fizjologiczne niosek. W związku z tym w poszczególnych etapach badań weryfikowano następujące hipotezy częściowe:

1. Dobrostan kur nieśnych jest uzależniony od zajmowanej pozycji w grupie, dlatego osobniki o niższej bądź neutralnej (nieustalonej) pozycji odczuwają większy stres wyrażony zmianą wskaźników biologicznych (P1).
2. Gęstość obsady jest istotnym czynnikiem modulującym zachowanie kur nieśnych. Większa przestrzeń życiowa (niska gęstość obsady) w codziennym utrzymaniu, umożliwiającą prezentowanie szerszego repertuaru zachowań, kształtuje ptaki bardziej aktywne i zainteresowane nowymi elementami środowiska (P2).
3. Profil behawioralny może determinować cechy użytkowe kur nieśnych i powinien stanowić kryterium selekcyjne ptaków (P3).

Cele

Celem rozprawy było określenie czy profil behawioralny kur nieśnych, określony przez indywidualne reakcje behawioralne, determinuje wskaźniki użytkowe i fizjologiczne nieśnych, a tym samym czy jest to cecha, którą należy uwzględnić w kryterium selekcyjnym ptaków. Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Ocena związku między pozycją społeczną w grupie a poziomem stresu u kur niosek, określonym za pomocą wybranych wskaźników biologicznych (P1).
2. Ocena wpływu gęstości obsady na wybrane wskaźniki behawioralne i fizjologiczne kur niosek (P2).
3. Ocena zmienności genetycznej profilu behawioralnego kur nieśnych jako ewentualnego kryterium selekcyjnego (P3).

Material i metody

Material

Badanie składało się z trzech części, które zostały zaprezentowane w publikacjach (P1, P2, P3) wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej. Doświadczeniem objęto łącznie 4735 ptaków, w tym 224 ptaki rasy Zielononóżka kuropatwiana (Zk), 1333 ptaki rasy Rhode Island White (RIW) i 3180 ptaków rasy Rhode Island Red (RIR). Ze względu na charakter doświadczenia w każdym etapie badań wykorzystano inne osobniki. W pierwszym badaniu (P1) do określenia wpływu pozycji w hierarchicznej strukturze stada na dobrostan niosek wykorzystano 80 osobników rasy Zk. Następnie, w doświadczeniu drugim (P2), ocenie poddano wpływ gęstości obsady na wybrane parametry fizjologiczne i behawioralne u 144 osobników rasy Zk. W ostatnim, trzecim badaniu (P3), oceniono potencjał wykorzystania profilu behawioralnego jako kryterium selekcyjnego w hodowli zarodowej. W tym celu w doświadczeniu wykorzystano 1333 osobniki rasy RIW i 3180 osobniki rasy RIR.

Wszystkie ptaki miały zapewniony stały dostęp do pełnowartościowej paszy komercyjnej oraz wody, zgodnie ze standardowymi wymogami hodowli drobiu. Kury rasy RIR i RIW jako stado zarodowe były utrzymywane w indywidualnych klatkach i oznakowane indywidualnym kodem kreskowym. Natomiast kury rasy Zk utrzymywano w systemie ściółkowym. Ptaki podlegały standardowemu nadzorowi weterynaryjnemu.

Testy behawioralne

Obserwacje behawioralne (P1)

Ptaki ($n = 80$) w wieku 53 tygodni zostały losowo przydzielone do jednego z czterech boksów, w każdym znajdowało się 20 osobników. W trakcie trwania doświadczenia skład każdej grupy nie ulegał zmianie. Ptaki zostały oznaczone indywidualnym numerem w celu późniejszej identyfikacji. Rejestracja wideo (kamera Xblitz MOVE 4K Plus) była prowadzona przez osiem godzin dziennie, cztery godziny rano (6:00 – 10:00) i cztery godziny po południu (14:00 – 18:00). Ocena zachowania kur nieśnych została przeprowadzona w pierwszym (dzień 1 – 3) i w końcowym okresie badania (dzień 14 – 16). Na podstawie analizy nagrań pod kątem częstotliwości zachowań „dziobanie/atak” i „ucieczka”, określono pozycję każdej kury w danym boksie. Wyniki zsumowano dla każdego okresu. Analiza nagrań została przeprowadzona przez jednego obserwatora. Na tej podstawie ptaki sklasyfikowano jako:

- dominujące (atakujące) – przewaga zachowania ‘dziobanie’ nad częstotliwością

prezentowania zachowania ‘ucieczka’,

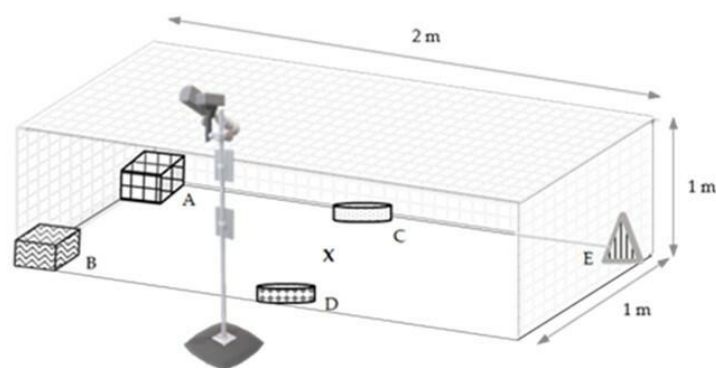
- podporządkowane (uciekające) – przewaga zachowania ‘ucieczka’ nad częstotliwością prezentowania zachowania ‘dziobanie’
- neutralne – brak przewagi któregoś z zachowań.

Zmodyfikowany test otwartego pola (P2)

W badaniu uwzględniono 144 ptaki (12 samców i 132 samice) rasy Zk (w wieku 45 tygodni), które zostały połączone w stada eksperymentalne. W każdej zagrodzie, przez okres 21 dni, znajdowało się 12 ptaków (1 samiec : 11 samic; stosunek płci typowy dla stad hodowlanych). Przygotowano cztery replikacje dla każdej grupy w zależności od gęstości obsady, co dało łącznie 12 boksów doświadczalnych. Aby uniknąć wystąpienia potencjalnego stresu dla niosek związanego z brakiem koguta w grupie, zdecydowano się je pozostawić w zagrodach eksperymentalnych. Ptaki podzielono na trzy grupy w zależności od gęstości obsady:

- standardowa gęstość obsady dla stad reprodukcyjnych – 12 osobników utrzymywano w zagrodzie o powierzchni 2 m^2 (6 ptaków/ m^2);
- niska gęstość obsady – 12 osobników utrzymywano w zagrodzie o powierzchni 4 m^2 (3 ptaki/ m^2);
- wysoka gęstość obsady – 12 osobników utrzymywano w zagrodzie o powierzchni $1,5 \text{ m}^2$ (9 ptaków/ m^2).

Indywidualne testy behawioralne przeprowadzono na 36 losowo wybranych kurach spośród trzech grup. Testy przeprowadzono w ciągu dwóch kolejnych dni, między godziną 8:00 a 16:00. Dostęp do paszy nie był ograniczony w dniu testu, aby zapobiec wpływowi tego czynnika na zainteresowanie pojemnikami z paszą. Zagroda testowa znajdowała się w sąsiednim pomieszczeniu (identyczne warunki oświetlenia i ogrzewania), co uniemożliwiło ptakom nawiązanie kontaktu wzrokowego lub dźwiękowego z innymi osobnikami. Wzdłuż dłuższych ścian zagrody testowej umieszczono elementy nieznane ptakom. Obejmowały one: pojemnik imitujący gniazdo, piaskownicę, pojemnik z paszą komercyjną, pojemnik z paszą wzbogaconą dodatkiem ziół oraz poidło (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat zagrody testowej (P2); A – imitacja gniazda, B – piaskownica, C – pasza komercyjna, D – pasza wzbogacona, E – poidło, X – pozycja kury w momencie rozpoczęcia testu.

Znany ptakom eksperymentator przenosił kurę bezpośrednio z boksu eksperymentalnego do testowego i umieszczał ją w jego centralnym punkcie – X. Po zamknięciu boksu eksperymentator włączał kamerę, prezentował tablicę z numerem badanego ptaka (nr 1 – 36), a następnie opuszczał pomieszczenie. Zachowanie było rejestrowane (660 s) za pomocą szerokokątnej kamery (Xblitz MOVE 4K Plus) umieszczonej poza boksem. Ze względu na obecność czynników, które potencjalnie mogły zakłócić przebieg testu tj. widok eksperymentatora opuszczającego pomieszczenie, odgłos kroków i zamykające się drzwi, początkowy fragment nagrania był usuwany. Analiza nagrania testu trwającego 600 s została przeprowadzona w oprogramowaniu BORIS (wersja 7.10.2., 2021) przez jednego obserwatora (tab. 1).

Tab. 1. Zachowania oceniane podczas zmodyfikowanego testu otwartego pola (P2)

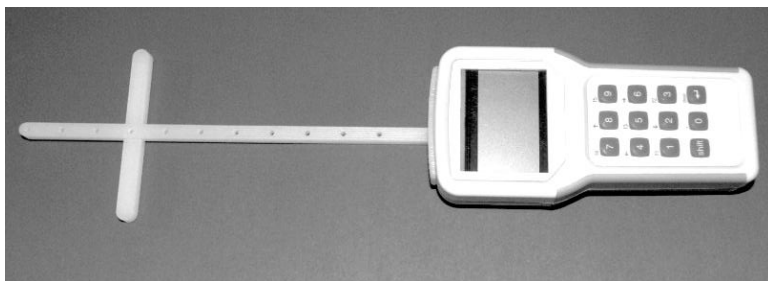
Zachowanie	Opis zachowania
latencja 1 [s]	czas od rozpoczęcia testu do rozpoczęcia lokomocji
latencja 2 [s]	czas od rozpoczęcia testu do podejścia do dowolnego elementu
lokomocja_t [s]	całkowity czas lokomocji (kura nioska musi wykonać co najmniej dwa kroki)
lokomocja_f [częst.]	całkowita liczba epizodów lokomocji
pasza 1_t [s]	całkowity czas spędzony na pobieraniu paszy/przebywaniu w bezpośredniej bliskości karmidła z paszą komercyjną
pasza 1_f [częst.]	całkowita liczba powtórzeń pobierania/pozostawiania paszy w bezpośredniej bliskości karmidła z paszą komercyjną
pasza 2_t [s]	całkowity czas spędzony na pobieraniu paszy/przebywaniu w bezpośredniej bliskości karmidła ze wzbogaconą paszą
pasza 2_f [częst.]	całkowita liczba powtórzeń pobierania paszy/pozostawiania w bezpośredniej bliskości karmidła ze wzbogaconą paszą
woda_t [s]	całkowity czas spędzony na pobieraniu wody/przebywaniu w bezpośredniej bliskości

	poidła
woda_f [częst.]	całkowita liczba powtórzeń pobierania wody/przebywania w bezpośredniej bliskości poidła
piaskownica_t [s]	całkowity czas spędzony na kąpieli piaskowej/przebywaniu w bezpośredniej bliskości piaskownicy
piaskownica_f [częst.]	całkowita liczba powtórzeń kąpieli piaskowej/przebywania w bezpośredniej bliskości piaskownicy
gniazdo_t [s]	całkowity czas spędzony na przebywaniu w imitacji gniazda/przebywaniu w bezpośredniej bliskości imitacji gniazda
gniazdo_f [częst.]	całkowita liczba powtórzeń pozostawiania w imitacji gniazda/pozostawiania w bezpośredniej bliskości imitacji gniazda
o2l	stosunek średniego czasu spędzonego przy elementach w kojcu testowym do średniego czasu lokomocji

Test nowego obiektu (P3)

Każda z kur została indywidualnie poddana testowi nowego obiektu (NOT). Test był przeprowadzany co cztery klatki, aby uniemożliwić ptakom utrzymywanym w sąsiadujących klatkach wcześniejsze zapoznanie się z nowym obiektem. Zastosowano metodę rejestrowania i gromadzenia danych z wykorzystaniem elektronicznego rejestratora (ryc. 2) wyposażonego w:

- nowy obiekt – pręt z kolorową, błyszczącą końcówką, który miał dodatkową blokadę zapewniającą taką samą odległość, w jakiej obiekt był wprowadzany do każdej klatki, tj. 1 cm od ściany klatki; w ten sposób test został ustandaryzowany, nie było żadnych różnic, które mogłyby mieć wpływ na reakcję kur,
- skaner kodów kreskowych HD42 – bezpośrednia identyfikacja badanego osobnika.



Ryc. 2. Elektroniczny rejestrator behawioralny.

Reakcja behawioralna kury była rejestrowana w czasie rzeczywistym, podczas trwania NOT. Zachowanie oceniano w systemie binarnym, gdzie 0 oznaczało brak reakcji,

a 1 pojawienie się reakcji. Test trwał 30 sekund, podczas których eksperymentator obserwował zachowanie kury i wprowadzał na klawiaturze urządzenia określoną liczbę do konkretnej sekwencji zachowań. Rejestrowano również czas trwania określonego zachowania prezentowanego przez ptaka. Częstotliwość zachowań, system oceny i klasyfikacja według profilu behawioralnego (PB) zostały przedstawione w tabeli 2. Klasyfikacja na ptaki proaktywne i reaktywne została oparta na pracy Cockrem [2007]. Ptaki wykazujące szybkie, specyficzne reakcje niezależnie od tego, czy wiązały się one z ucieczką czy podejściem, zostały uznane za proaktywne. Kury, które nie były w stanie aktywnie zareagować na obiekt, zostały zdefiniowane jako reaktywne.

Tab. 2. Frekwencja zachowań, system oceny oraz klasyfikacja według profilu behawioralnego (P3)

Reakcja osobnika	Opis zachowania podczas testu	PB	Frekwencja	
			RIR	RIW
ucieczka	ptak ucieka od obiektu, przemieszcza się w przeciwną stronę końca klatki, próbuje się wydostać z klatki, wykazuje aktywną postawę sygnalizującą chęć ucieczki od obiektu	proaktywne	46.95	31.21
podchodzenie	wykazuje zainteresowanie obiektem i podchodzi do obiektu, może dotknąć dziobem lub z bardzo bliskiej odległości obserwuje obiekt		9.20	13.68
brak decyzji	ptak pozostaje w jednym miejscu i nie przemieszcza się wyraźnie w żadnym kierunku, zmienia ustawienie ciała względem obiektu – raz kierując się w jego stronę raz odwracając ale nie podejmuje żadnej, konkretnej decyzji	reaktywne	8.64	9.96
nieruchomieje	zamiera, nie porusza się, pozostaje w takiej odległości i kierunku względem obiektu jak w momencie, kiedy spostrzegł obiekt		35.21	45.15

PB – profil behawioralny, RIR – kury rasy Rhode Island Red, RIW – kury rasy Rhode Island White

Na fermie prowadzona jest standardowo indywidualna kontrola cech użytkowych, tj. masy ciała (MC) w 18 tygodniu życia kur niosek, wieku uzyskania dojrzałości płciowej ptaków – wiek w momencie zniesienia pierwszego jaja (DOJ), średniej masy jaja z cotygodniowego zbioru w 34 (MJ34) i 54 tygodniu życia (MJ54), nieśności początkowej, tj. liczby jaj zniesionych w ciągu pierwszych 15 tygodni nieśności (NP), niedestrukcyjnej oceny grubości skorupy (GS), nieśności hodowlanej, tj. liczby jaj zniesionych w ciągu 54 tygodni nieśności (NH) oraz liczby wykłutych piskląt (PW). Dane dotyczące użyteczności kur wykorzystane w analizach pochodziły z dokumentacji fermowej.

Pomiar parametrów fizjologicznych i mikrobiologicznych

W celu oceny wskaźników fizjologicznych kur nieśnych oznaczono stężenie

serotoniny, dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny (P1), a także stężenie testosteronu, kortyzolu oraz kortykosteronu z krwi (P2) i piór (P1) ptaków. Krew została pobrana z żyły skrzydłowej do probówek zawierających K₃EDTA jako antykoagulantu. W pierwszym doświadczeniu (P1) materiał do badań pobrano od wszystkich ptaków 14 dnia, natomiast w drugim (P2) pierwszego (pomiar oznaczony jako kontrolny) i 21 dnia (pomiar dla różnych gęstości obsady oznaczone jako standardowa, niska i wysoka) od 36 losowo wybranych niosek. Pomiar kontrolny i 21 dnia wykonano na tych samych osobnikach. Po pobraniu próbek probówki umieszczano na mieszadle hematologicznym i odwirowywano w wirówce laboratoryjnej przez 10 minut przy 3000 obr/min, a osocze przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu analizy. Ilościowe oznaczenie poziomu serotoniny w osoczu przeprowadzono przy użyciu zestawu Eagle Biosciences Serotonin ELISA Assay Kit. Poziom hormonów (adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy) w osoczu oznaczono przy użyciu testów CAT ELISA (enzymatyczne testy immunologiczne do oznaczania adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy) zgodnie z procedurą zaproponowaną przez producenta testów. Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu czytnika płytek Elisa (Sunrise™) a absorbancję odczytano przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$ (P1).

Poziom testosteronu [pg/ml], kortyzolu [pg/ml] i kortykosteronu [pg/ml] (P2) mierzono za pomocą komercyjnych zestawów do testów immunoenzymatycznych (zestawy ELISA). Przygotowanie krzywej kalibracyjnej i procedura pomiaru były zgodne z wytycznymi producenta zestawu analitycznego. Analizę przeprowadzono z 10 μL surowicy, a każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach, przy czym wynik był średnią z trzech pomiarów. Wyniki odczytano za pomocą czytnika mikropłytek Biotek Synergy H1 przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$ (P2).

Poziom kortykosteronu w piórach (P1) określono przy użyciu metody zmodyfikowanej przez Bortolotti i wsp. [2008]. Do ekstrakcji zastosowano 10 ml metanolu (cz.d.a.). Próbkę piór, stanowiące niewielkie fragmenty nie przekraczające 5 mm, zanurzono w metanolu i homogenizowano przez 20 minut przy użyciu wyrzaskarki laboratoryjnej Vortex. Następnie próby inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 50°C. Po inkubacji, w celu oddzielenia fazy metanolowej od pozostałości piór, przeprowadzono wirowanie w wirówce laboratoryjnej z prędkością 5000 obr/min przez 10 minut. Otrzymany supernatant przeniesiono do nowych probówek i odparowywano pod dygestorium przez około 6 godzin. Po odparowaniu suchą pozostałość ekstraktu rozpuszczono w 2 ml buforu fosforanowego (PBS, 0,05 M, pH 7,6), a następnie wykorzystano do oznaczania stężenia kortyzolu w piórach. Do analizy pobrano drugie pierwotne pióro z lewego skrzydła każdego ptaka.

Poziomy kortykosteronu określono za pomocą testu immunoenzymatycznego przy użyciu zestawu Chicken CORT (Corticosterone) ELISA Kit zgodnie z procedurą producenta. Pod koniec badania ptaki poddano ubojowi w celach komercyjnych.

Treść jelit z trzech odcinków przewodu pokarmowego (P1): jelita cienkiego, jelita ślepego i jelita grubego, została pobrana od każdej kury, a następnie przetransportowana (w odpowiedniej temperaturze) do laboratorium. Próbkę treści jelit ptaków homogenizowano, odważono 20 g materiału i umieszczono w pojemnikach z roztworem Ringera (BTL Industries Ltd.). Następnie przygotowano dziesięciokrotne rozcieńczenia w roztworze Ringera i wysiewano na przygotowanych szalkach Petriego z odpowiednią pożywką mikrobiologiczną (tab. 3). Każda próbka została posiana w trzech powtórzeniach. Po inkubacji zliczano wyrosłe kolonie przy użyciu licznika Scan 300 i określono liczebność każdego typu, wyrażoną jako liczba jednostek tworzących kolonie na g treści jelit (CFU/g).

Tab. 3. Analizy mikrobiologiczne (P1)

Parametr	Rodzaj podłoża	Inkubacja
ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych	podłoże agarowe	inkubacja 48 godz. w 37°C PN EN ISO 4833 2
ogólna liczba grzybów	podłoże Sabouraud'a	inkubacja 5–7 dni w temp 25°C PN ISO 21527-1/2
ogólna liczba bakterii z grupy coli	podłoże Endo LES	inkubacja 24 godz. w 37°C PN-ISO 4832:2007
ogólna liczba bakterii <i>Escherichia coli</i> typu kałowego	podłoże mFC	inkubacja 18–24 godz. w 44°C PN- ISO-16649-2
ogólna liczba bakterii <i>Clostridium perfringens</i>	podłoże TSC	inkubacja 48 godz. w 37°C warunki beztlenowe - system GasPak Plus PN-EN ISO 7937
ogólna liczba bakterii kwasu mlekowego z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	podłoże MRS	inkubacja 3–5 dni w 30°C
obecność pałeczek z rodzaju <i>Salmonella</i>	zbuforowana woda peptonowa, podłoże XLD	inkubacja 24 godz. w 37°C; ostateczna identyfikacja - testy biochemiczne i surowice poliwalentne PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007P

PN EN ISO 4833 2 - ISO 4833-2:2013 określa horyzontalną metodę liczenia drobnoustrojów zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii na powierzchni podłoża stałego po inkubacji tlenowej w temperaturze 30 °C; PN ISO 21527-1/2 określa horyzontalną metodę oznaczania liczby drożdży i pleśni; PN-ISO-16649-2 określa horyzontalną metodę oznaczania liczby beta-glukuronidazododatnich *Escherichia coli*; PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007P określa horyzontalną metodę wykrywania *Salmonella* spp.

Analiza statystyczna

Wskaźniki analizowane w pierwszej pracy (P1) nie wykazywały rozkładu

normalnego, stąd dane zostały poddane transformacji rangowej. Różnice pomiędzy rasami, dla badanych cech szacowano stosując porównania wielokrotne, z korektą Bonferroniego. Wykorzystano model jednocechowy uwzględniając stały wpływ grupy, do której przydzielono kurę (atakująca, uciekająca, neutralna). Liczba boksów, w których trzymane były kury, nie była istotnym czynnikiem i dlatego została wykluczona z dalszych analiz. Do oceny istotności różnic między badanymi grupami zastosowano procedurę GLIMMIX (SAS Institute, 2018).

W artykule nr 2 normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka (procedura PROC UNIVARIATE). Ponieważ uzyskane dane nie miały rozkładu normalnego, zastosowano analizę nieparametryczną jako aproksymację F testu Friedmana i powiązany z nim test wielokrotnych porównań sumy rang [Ipe, 1987]. Wpływ grupy eksperymentalnej (standardowa gęstość obsady, niska gęstość obsady, wysoka gęstość obsady) analizowano wykorzystując procedurę PROC GLIMMIX SAS, 9.4).

W artykule nr 3, konstruując modele do oceny wariancji i kowariancji, kierowano się istotnością wpływu stałych czynników środowiskowych, które uprzednio weryfikowano za pomocą analizy wariancji modelami stałymi (procedura GLMMIX, SAS, 9.4). Czynniki ostatecznie uwzględniane w modelach przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Czynniki w modelach obliczeniowych dla analizowanych cech (P3)

Cecha \ Czynniki	Typ ²	Cechy użytkowe: MC, DOJ, GS, MJ	PW	NP, NH	Reakcja behawioralna ¹	Profil behawioralny ³
rok lęgu x kolejny nakład	F	x		x	x	x
rok reprodukcji	F		x		x	x
liczba zniesionych jaj	C		x			
liczba dni kontroli	C			x		
addytywny wpływ osobnika	A	x	x	x	x	x

reakcja behawioralna¹: ucieczka, podejście, bezruch, brak decyzji; typ²: A - losowy, związany z macierzą spokrewnień, F - stały, C - regresja; profil behawioralny³: proaktywny, reaktywny; cechy użytkowe: MC - masa ciała, DOJ - wiek dojrzałości płciowej ptaków odnotowany w momencie zniesienia pierwszego jaja, GS - niedestrukcyjna ocena grubości skorupy, MJ - średnia masa jaj, PW - liczba wyklutych piskląt, NP - nieśność początkowa, NH - nieśność hodowlana

Rodowód obejmował 6 pokoleniową populację ptaków (w tym 5 pokoleń o znanej użyteczności i 3 pokolenia z oceną zachowania). Oszacowanie wariancji i kowariancji cech behawioralnych przeprowadzono za pomocą oprogramowania GIBBSF90+ z pakietu BLUPF90 [Misztal i in., 2002; Tsuruta i Misztal, 2006].

Omówienie wyników

Pozycja w hierarchicznej strukturze grupy (P1) okazała się czynnikiem istotnie różnicującym stężenia hormonów steroidowych. Ptaki uciekające (podporządkowane) w porównaniu do atakujących (dominujące) i neutralnych wykazywały wyższy poziom dopaminy i niższy serotoniny. Osobniki neutralne uzyskały wyższe wartości noradrenaliny niż osobniki dominujące (tab. 5).

Tab. 5. Estymatory różnic w poziomie neuroprzekaźników w zależności od statusu społecznego (P1)

Neuroprzekaźniki	Behawior		Estymator	se	<i>p</i>	CI-L	CI-U
dopamina	A	F	-5.76	2.00	0.005	-9.75	-1.76
	N	F	-7.43	2.44	0.003	-12.29	-2.57
serotonina	A	F	18.80	5.30	0.001	8.22	29.38
	N	F	16.54	6.44	0.012	3.69	29.39
noradrenalina	A	N	-1.05	0.36	0.005	-1.77	-0.32

A - ptaki dominujące, F – ptaki podporządkowane, N – ptaki neutralne, se – błąd standardowy, *p* – wartość istotności statystycznej, CI-L – dolny przedział granicy ufności, CI-U – górny przedział granicy ufności

Ptaki początkowo neutralne, które po ustaleniu hierarchii zmieniły strategię na ucieczkę, miały wyższy poziom dopaminy oraz niższy poziom serotoniny i noradrenaliny w porównaniu do kur, które przez cały okres badania pozostawały neutralne. W przypadku kur początkowo uciekających, których status społeczny w dalszym etapie ustalania struktury społecznej zmienił się na dominujący, wykazano niższy poziom dopaminy i noradrenaliny przy jednocześnie wyższym poziomie serotoniny w stosunku do osobników, których status był neutralny przez cały analizowany okres, albo zmienił się na podporządkowany. Natomiast u kur początkowo uciekających, które po ustaleniu struktury w dalszym ciągu prezentowały taką strategię lub stały się neutralne, stwierdzono wysokie wartości serotoniny oraz niskie noradrenaliny i dopaminy względem kur zachowujących przez cały czas neutralną pozycję lub zmieniającą się na podporządkowaną. Ponadto ptaki dominujące w początkowym okresie badania, które stały się neutralne lub podporządkowane, miały niższy poziom dopaminy i adrenaliny oraz wyższy serotoniny w porównaniu do ptaków, które zmieniły pozycję z neutralnej na podporządkowaną, albo prezentowały cały czas neutralną postawę. Analiza składu mikroflory jelitowej wykazała, że u ptaków, które podczas łączenia stada zachowywały neutralny status, a po upływie 11 dni atakowały inne kury, poziom bakterii *Escherichia Coli* był istotnie wyższy, niż w przypadku osobników dominujących zarówno na początku, jak i na końcu doświadczenia. W przypadku ptaków uciekających, które po ustaleniu struktury

zajmowały neutralną pozycję, oznaczono znacząco wyższy poziom bakterii z rodzaju *Clostridium* w stosunku do osobników, które początkowo również przejawiały zachowania podporządkowane, jednak po ustaleniu hierarchii ich status zmienił się na dominujący (tab. 6).

Tab. 6. Estymatory różnic w wartości wybranych wskaźników w odniesieniu do statusu społecznego ptaków (P1)

Parametry	Behawior dzień 1_14				Estymator	se	p	CI-L	CI-U
dopamina	A	A	N	F	-17.90	3.93	0.000	-25.74	-10.07
	A	N	N	F	-19.69	4.29	0.000	-28.26	-11.12
	A	F	N	F	-19.43	4.38	0.000	-28.16	-10.70
	N	A	N	F	-16.51	4.38	0.000	-25.25	-7.78
	N	N	N	F	-20.15	5.79	0.001	-31.71	-8.60
	N	F	F	A	20.11	4.09	0.000	11.95	28.28
	N	F	F	N	19.70	4.09	0.000	11.53	27.87
	N	F	F	F	17.83	4.38	0.000	9.10	26.56
noradrenalina	A	A	N	N	-2.61	0.81	0.002	-4.23	-0.99
	A	N	N	N	-2.60	0.86	0.004	-4.33	-0.88
	A	F	N	N	-2.64	0.88	0.004	-4.39	-0.89
	N	A	N	N	-2.49	0.88	0.006	-4.24	-0.75
	N	N	N	F	2.32	1.00	0.023	0.33	4.31
	N	N	F	A	2.59	0.84	0.003	0.93	4.26
	N	N	F	N	1.96	0.84	0.022	0.29	3.62
	N	N	F	F	1.91	0.88	0.033	0.16	3.66
serotonina	A	A	N	F	49.29	10.38	0.000	28.57	70.02
	A	N	N	F	50.62	11.31	0.000	28.04	73.21
	A	F	N	F	52.71	11.53	0.000	29.68	75.73
	N	A	N	F	52.79	11.53	0.000	29.77	75.81
	N	N	N	F	53.35	15.25	0.001	22.90	83.81
	N	F	F	A	-51.41	10.88	0.000	-73.14	-29.68
	N	F	F	N	-42.75	10.88	0.000	-64.48	-21.02
	N	F	F	F	-44.40	11.53	0.000	-67.42	-21.37
całkowita liczba <i>Escherichia coli</i>	A	A	N	A	-0.61	0.32	0.058	-1.25	0.02
całkowita liczba <i>Clostridium</i>	A	A	F	A	0.50	0.25	0.050	0.00	1.01
	A	N	F	A	0.79	0.31	0.014	0.16	1.41

	N	A	F	A	0.88	0.33	0.009	0.23	1.53
	F	A	F	N	-0.66	0.29	0.024	-1.23	-0.09

A - ptaki dominujące, F – ptaki podporządkowane, N – ptaki neutralne, se – błąd standardowy, se – błąd standardowy, *p* – wartość istotności statystycznej, CI-L – dolna granica przedziału ufności, CI-U – górna granica przedziału ufności

Średni czas [s] latencji, lokomocji oraz czas spędzony w bezpośrednim kontakcie z elementami zagrody testowej, a także częstotliwość [częst.] prezentowania tych zachowań podczas zmodyfikowanego testu otwartego pola (P2) zostały przedstawione w tabeli 7.

Tab. 7. Średni czas i częstotliwość zachowań ocenianych podczas testu behawioralnego (P2)

Cecha ¹	Gęstość obsady	Estymator	se	CI-L	CI-U
latencja 1	standardowa	221.94	61.83	96.14	347.74
	wysoka	264.50	61.83	138.70	390.30
	niska	156.90	61.83	31.10	282.70
latencja 2	standardowa	349.40	59.12	229.12	469.68
	wysoka	277.15	59.12	156.87	397.43
	niska	155.23	59.12	34.95	275.51
lokomocja_t	standardowa	33.50	15.67	1.61	65.38
	wysoka	24.50	15.67	-7.38	56.39
	niska	81.14	15.67	49.25	113.02
lokomocja_f	standardowa	8.25	2.61	2.93	13.57
	wysoka	7.08	2.61	1.77	12.40
	niska	14.83	2.61	9.52	20.15
pasza 1_t	standardowa	11.09	6.29	-1.71	23.90
	wysoka	12.63	6.29	-0.18	25.43
	niska	10.29	6.29	-2.51	23.09
pasza 2_f	standardowa	1.75	1.39	-1.08	4.58
	wysoka	2.92	1.39	0.09	5.75
	niska	2.50	1.39	-0.33	5.33
pasza 2_t	standardowa	10.54	5.59	-0.82	21.91
	wysoka	9.08	5.59	-2.29	20.45
	niska	9.17	5.59	-2.20	20.53
pasza2_f	standardowa	0.92	0.60	-0.31	2.14
	wysoka	1.00	0.60	-0.23	2.23
	niska	1.67	0.60	0.44	2.89
woda_t	standardowa	13.04	6.05	0.73	25.34
	wysoka	20.38	6.05	8.07	32.68
	niska	36.58	6.05	24.27	48.88
woda_f	standardowa	6.92	2.84	1.14	12.69
	wysoka	10.83	2.84	5.06	16.61
	niska	15.67	2.84	9.89	21.44
piaskownica_t	standardowa	3.40	19.71	-36.71	43.51
	wysoka	40.33	19.71	0.22	80.44
	niska	4.62	19.71	-35.49	44.73
piaskownica_f	standardowa	0.17	0.55	-0.95	1.28
	wysoka	1.08	0.55	-0.03	2.20
	niska	1.08	0.55	-0.03	2.20
gniazdo_t	standardowa	1.52	2.91	-4.40	7.44
	wysoka	4.04	2.91	-1.88	9.96
	niska	5.01	2.91	-0.91	10.93
gniazdo_f	standardowa	0.08	0.45	-0.84	1.00
	wysoka	0.33	0.45	-0.59	1.25
	niska	0.83	0.45	-0.09	1.75
o2l	standardowa	1.27	1.05	-0.90	3.43

wysoka	4.69	1.05	2.52	6.85
niska	1.20	0.95	-0.76	3.15

Cecha¹ – opis w rozdziale Materiał i metody, tab. 1, _t – czas, _f – częstotliwość, se – błąd standardowy, CI-L – dolna granica przedziału ufności, CI-U – górna granica przedziału ufności

Istotne różnice pomiędzy grupami wykazano dla cech: latencja 2, lokomocja_t, lokomocja_f, woda_t, woda_f oraz o2l (tab. 8). W porównaniu do grupy o standardowej obsadzie ptaki o niskiej gęstości obsady potrzebowały znacznie więcej czasu, zanim zaczęły poruszać się w kierunku dowolnego elementu w zagrodzie testowej ($p = 0.027$). Czas lokomocji ptaków o standardowej ($p = 0.039$), jak i o zwiększonej ($p = 0.015$) obsadzie był znacząco krótszy, niż czas uzyskany przez ptaki z grupy o niskiej gęstości obsady. Ponadto grupa ptaków o niskiej obsadzie istotnie częściej podejmowała aktywność lokomotoryczną ($p = 0.044$) w stosunku do grupy o zwiększonej obsadzie. Ptaki z grupy o niskiej gęstości obsady dłużej pobierały wodę i znajdowały się w bezpośrednim sąsiedztwie poidła ($p = 0.010$) oraz z większą częstotliwością ($p = 0.036$) do niego podchodziły w porównaniu do ptaków utrzymywanych w standardowej obsadzie. Stosunek czasu spędzonego przy elementach wzbogacających do czasu lokomocji u ptaków z grupy o wysokiej gęstości obsady był wyższy w porównaniu do ptaków utrzymywanych zarówno w standardowej ($p = 0.030$), jak i o niskiej gęstości obsady ($p = 0.021$).

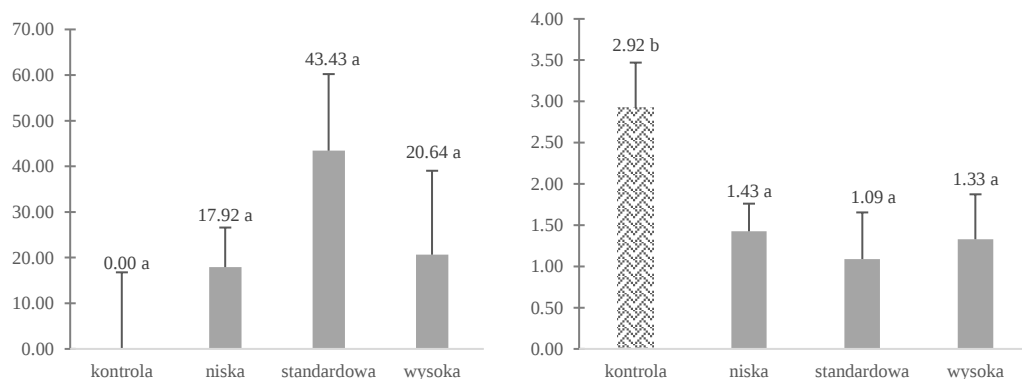
Tab. 8. Estymatory różnic w prezentowaniu wybranych zachowań przez kury w zależności od gęstości obsady (P2)

Cecha	Gęstość obsady	_Gęstość obsady	Estymator	se	p	CI-L	CI-U
latencja 2	standardowa	niska	194.17	83.61	0.027	-10.98	399.32
lokomocja_t	standardowa	niska	-47.64	22.16	0.039	-102.02	6.75
lokomocja_t	wysoka	niska	-56.63	22.16	0.015	-111.02	-2.25
lokomocja_f	wysoka	niska	-7.75	3.69	0.044	-16.82	1.32
woda_t	standardowa	niska	-23.54	8.55	0.010	-44.53	-2.56
woda_f	standardowa	niska	-8.75	4.01	0.036	-18.60	1.10
o2l	standardowa	wysoka	-3.42	1.49	0.030	-7.11	0.28
o2l	wysoka	niska	3.49	1.42	0.021	-0.04	7.01

_t – czas, _f – częstotliwość, p – wartość istotności statystycznej, se – błąd standardowy, CI-L – dolna granica przedziału ufności, CI-U – górna granica przedziału ufności

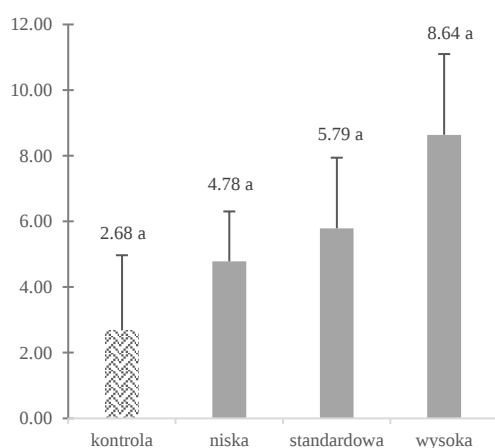
Średnie wartości kortykosteronu [pq/ml], testosteronu [pq/ml] i kortykosteronu [pq/ml] dla kur rasy Zielononóżka kuropatwiana zostały przedstawione na rycinie 3. Istotne różnice zaobserwowano wyłącznie dla testosteronu. W przypadku ptaków ze wszystkich grup średni poziom testosteronu był istotnie niższy ($p = 0.0223$, $p = 0.025$, $p = 0.046$) w porównaniu do pomiaru kontrolnego, wykonanego przed przydzieleniem ptaków do jednej z grup. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic pomiędzy ptakami z grup o niskim, wysokim i standardowym zagęszczeniu obsady. W przypadku kortyzolu i kortykosteronu nie wykazano istotnych różnic zarówno pomiędzy grupami o różnym zagęszczeniu

(standardowe, wysokie, niskie), jak i w stosunku do wartości przed rozpoczęciem doświadczenia (kontrola).



(i)

(ii)



(iii)

Ryc. 3. (i) Średnie stężenie (+ se) kortykosteronu (pg/ml), (ii) testosteronu (pg/ml) oraz (iii) kortyzolu (pg/ml) we krwi kur przed rozpoczęciem badania (kontrola) i po okresie trzech tygodni w grupach o różnej gęstości obsady (niska, standardowa, wysoka). Średnie oznaczone różnymi literami (a, b) różnią się istotnie przy $p < 0.05$ (P2)

Szacunki parametrów genetycznych (P3) dla profilu behawioralnego wahały się od 0.23 do 0.29 i były analogiczne zarówno dla rasy Rhode Island Red (RIR), jak i Rhode Island White (RIW). Zmienność genetyczna dla poszczególnych reakcji behawioralnych w obu rasach różniła się. Najwyższy poziom zmienności genetycznej oszacowano dla reakcji ucieczka w przypadku rasy RIR (0.23 ± 0.07) i najniższy dla brak decyzji (0.10 ± 0.08). Natomiast u kur rasy RIW stwierdzono przeciwną sytuację. Najwyższa zmienność genetyczna była oszacowana dla reakcji brak decyzji (0.31 ± 0.13), a najniższa dla ucieczki (0.12 ± 0.07) (tab. 9).

Pomimo, że szacunki współczynnika odziedziczalności dla profilu behawioralnego i

konkretnych reakcji behawioralnych nie odbiegały w znacznym stopniu od siebie, to błędy standardowe były niższe dla ogólnego profilu behawioralnego w porównaniu do błędów oszacowanych dla konkretnych reakcji.

Tab. 9. Współczynniki odziedziczalności (h^2) oraz błąd standardowy (se) profilu behawioralnego i poszczególnych reakcji w rasie RIR i RIW (P3)

Rasa	PB	h^2	se	Reakcja	h^2	se
RIR	reaktywne	0.24	0.03	brak decyzji	0.10	0.08
				nieruchomieje	0.11	0.06
	proaktywne	0.29	0.03	podchodzi	0.17	0.09
				ucieka	0.23	0.07
RIW	reaktywne	0.23	0.03	brak decyzji	0.31	0.13
				nieruchomieje	0.13	0.06
	proaktywne	0.29	0.04	podchodzi	0.21	0.10
				ucieka	0.12	0.07

RIR – kury Rhode Island Red, RIW – kury rasy Rhode Island White, PB – profil behawioralny

Korelacje genetyczne pomiędzy profilem behawioralnym a cechami użytkowymi kur nieśnych okazały się różne w obu rasach (tab. 10). W przypadku kur rasy RIR uwagę zwraca przede wszystkim wysoka korelacja genetyczna przy stosunkowo niskim błędzie standardowym pomiędzy wstępną oceną profilu behawioralnego a nieśnością początkową. Jednocześnie jest ona ujemna dla ptaków ocenionych jako reaktywne (-0.547 ± 0.096) i dodatnia dla ocenionych jako proaktywne (0.519 ± 0.059). Powiązania pomiędzy profilem behawioralnym ptaków a nieśnością stwierdzono także dla rasy RIW. Korelacja genetyczna wynosiła odpowiednio $0.505 (\pm 0.138)$ i $0.494 (\pm 0.142)$ pomiędzy nieśnością początkową i nieśnością hodowlaną a profilem proaktywnym. W przypadku rasy RIR uwagę zwraca korelacja pomiędzy profilem behawioralnym a masą jaj określaną w 34 i 54 tygodniu życia, która dla ptaków reaktywnych wynosiła odpowiednio: 0.227 ± 0.088 ; 0.277 ± 0.099 , a proaktywnych: -0.183 ± 0.086 ; -0.203 ± 0.090 . Jeżeli chodzi o rasę RIW, odnotowano wysoką, dodatnią korelację pomiędzy zachowaniem ptaków a masą jaj, zarówno dla ptaków proaktywnych, jak i reaktywnych. Analizując korelacje genetyczne pomiędzy profilem ptaków a cechami użytkowymi uwagę zwracają również wyraźnie powiązania pomiędzy cechami reprodukcyjnymi dla rasy RIW, określanymi w tym przypadku liczbą wykłutych piskląt. Spadek wylęgowości dotyczy profilu reaktywnego kur ($r_g = -0.373 \pm 0.154$), natomiast

u ptaków proaktywnych można się spodziewać wzrostu wylęgowości ($r_g = 0.242 \pm 0.092$). Oszacowane korelacje genetyczne pomiędzy profilami behawioralnymi (reaktywne-proaktywne) wykazały wysokie, ujemne współzależności, odpowiednio: -0.930 (± 0.026) w rasie RIR i -0.533 (± 0.080) dla kur rasy RIW.

Tab. 10. Korelacje genetyczne (r_g) i błędy standardowe szacunku (se) pomiędzy profilem behawioralnym a cechami użytkowymi (P3)

Cecha	RIR				RIW			
	Reaktywne		Proaktywne		Reaktywne		Proaktywne	
	r_g	se	r_g	se	r_g	se	r_g	se
Masa ciała	-0.107	0.096	0.141	0.074	-0.007	0.155	0.133	0.083
Dojrzałość płciowa	0.181	0.086	-0.177	0.091	-0.011	0.138	-0.097	0.111
Nieśność początkowa	-0.547	0.096	0.519	0.059	-0.157	0.237	0.505	0.138
Masa jaja ₃₄	0.227	0.088	-0.183	0.086	0.376	0.061	0.487	0.061
Grubość skorupy	0.079	0.094	-0.058	0.103	-0.398	0.103	0.050	0.105
Nieśność hodowlana	-0.129	0.124	0.257	0.122	-0.121	0.237	0.494	0.142
Masa jaja ₅₄	0.277	0.099	-0.203	0.090	0.297	0.064	0.437	0.065
Pisklęta wylęzione	-0.024	0.151	-0.108	0.106	-0.373	0.154	0.242	0.092

RIR - kury rasy Rhode Island Red, RIW – Rhode Island White

Dyskusja

Kury nieśne jako zwierzęta społeczne żyją w wymagającym i ulegającym zmianom środowisku. Ptaki muszą się do niego dostosowywać w dynamiczny sposób prezentując reakcje behawioralne, z którymi powiązane są wartości parametrów fizjologicznych [Weeks i Nicol, 2006; Favati i in., 2014a; Kang i in., 2016]. Ocena profilu behawioralnego ptaków pozwala określić strategie, jakie kury wykorzystują do radzenia sobie w środowisku fermowym, co wyraźnie wpływa na ich interakcje z otoczeniem, a dodatkowo może mieć konsekwencje dla ich życia społecznego [Cockrem, 2007; Campbell i in., 2021]. Wiele badań, w tym przeprowadzone badanie własne (P1) dowiodły, że zajmowany status społeczny w grupie jest ważnym czynnikiem w funkcjonowaniu ptaków w środowisku (Bhanja i Bhadauria, 2018; Wang i in., 2022), a różnice w prezentowanym zachowaniu stanowią formę komunikacji odpowiadającej za utrzymanie równowagi i stabilności w grupie (Queiroz i Cromberg, 2006). Różne pozycje w hierarchii społecznej mogą być powiązane z różnymi tendencjami behawioralnymi i/lub stanem hormonalnym [Cornawallis i Birkhead, 2008; Favati i in., 2014b]. Badanie wpływu pozycji ptaków w strukturze stada potwierdziło różnice w poziomie noradrenaliny, serotoniny, dopaminy oraz składu mikrobioty jelitowej (P1). Chociaż mechanizmy pośredniczące w osi mikrobiota – jelita – mózg, wpływające na zachowanie nie są w pełni poznane, uznaje się, że mikrobiota jelitowa może odgrywać ważną rolę w modulacji zachowań społecznych i afektywnych, w tym agresji, eksploracji (dociekliwości) oraz zachowań depresyjnych i lękowych [Villageliu i Lyte, 2017; Bryden i in., 2021; Chen i in., 2021]. Wyniki uzyskane w badaniach własnych (P1) wykazały, że ptaki, które zajmowały wyższą pozycję w grupie, miały niższą liczbę *E. coli* i bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Clostridium*. Może to dowodzić, że osobniki te nie doświadczyły stresu, a bariera przewodu pokarmowego prawdopodobnie nie została naruszona. Inaczej wyglądała sytuacja ptaków, których pozycja została określona jako neutralna. W ich przypadku wykazano wyższą liczebność bakterii *Clostridium*. Można wnioskować, że ptaki, które nie są pewne zajmowanej pozycji w grupie społecznej, doświadczają większego stresu, co z kolei ma niekorzystny wpływ na ich mikroflorę. Dennis [2016] wskazuje, że noradrenalina (NE), adrenalina (EP), a także dopamina (DE) i serotonina (5-HT) mogą być odpowiedzialne za wzrost ilości kilku gatunków bakterii, w tym *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* i *Pseudomonas*. Osobniki, u których zachodzą zmiany w poziomie tych neuroprzekaźników, stają się podatne na pojawienie się pewnych mikroorganizmów, a tym samym są w większym stopniu narażone na problemy zdrowotne

i obniżoną produktywność. Noradrenalina i adrenalina odgrywają ważną rolę w utrzymaniu równowagi behawioralnej i fizjologicznej [Cheng i Fahey, 2009; Dennis, 2016]. Reaktywność adrenergiczna, w tym reakcja EP i NE, jest ściśle związana ze stresem i zdolnością radzenia sobie z nim. Zwiększony stres może prowadzić do zahamowania wzrostu i występowania zachowań szkodliwych, takich jak niewłaściwie ukierunkowane dziobanie czy stereotypie [Dennis, 2016]. W przypadku kur neutralnych wykazano wyższy poziom noradrenaliny w stosunku do ptaków dominujących. Może to dodatkowo wyjaśniać różnice w składzie mikrobioty. Ptaki, które prezentowały pozycję dominującą albo podporządkowaną, charakteryzowały się niższym stężeniem noradrenaliny, co może wskazywać na niższy poziom stresu z powodu możliwości uwolnienia napięcia emocjonalnego. Neutralne ptaki mogły w rzeczywistości odczuwać większy dyskomfort, a niezdolność do dziobania lub ucieczki mogła wynikać z konfliktu motywacyjnego, gdy ptak nie był w stanie podjąć decyzji. Ponadto w badaniu wykazano różnice w poziomie dopaminy i serotoniny, a jak wskazuje Karpiński i in. [2021], równowaga neuroprzekaźników stanowi jeden z kluczowych czynników niezbędnych do zapewnienia homeostazy. W porównaniu do ptaków atakujących (dominujących) i neutralnych kury uciekające (podporządkowane) miały wyższy poziom dopaminy. Dopamina zwiększa motywację i koncentrację [Barron i in., 2010], można założyć, że jej wyższy poziom u ptaków uciekających był odpowiedzialny za wysoką determinację do zmiany pozycji. Z kolei analiza poziomu serotoniny wykazała, że ptaki dominujące miały wyższy poziom serotoniny, niż kury podporządkowane. Obniżone stężenie serotoniny (5-HT) jest związane z agresją, dlatego też jest ona uważana za główny neuroprzekaźnik odpowiedzialny za tego typu zachowania [De Boer i in., 2015]. Wyższy poziom tego neuroprzekaźnika u ptaków dominujących może sugerować, że doświadczały one niższego poziomu stresu ze względu na swoją pozycję w grupie. Pomiar parametrów biologicznych (P1) potwierdził, że dobrostan kur nieśnych jest uzależniony od zajmowanej pozycji w grupie.

Oceniając stres u kur nieśnych najczęściej oznaczanym parametrem jest kortykosteron. Jest to główny hormon stresu u ptaków promujący zmiany w zachowaniu i metabolizmie, które pomagają osobnikom dostosować się do otoczenia [Cockrem, 2007; Cockrem, 2013; Jain i in., 2019; Arndt i in., 2022]. W sytuacji, gdy kura doświadcza stresu, jego poziom wzrasta. Jednak zarówno w doświadczeniu pierwszym, jak i drugim, nie wykazano istotnych zmian tego parametru, mimo że w obu przypadkach ptaki znajdowały się w potencjalnie stresującej sytuacji. Stwierdzony w badaniu brak zmienności w odpowiedzi kortykosteronu może sugerować, że kury nie znajdowały się w stresujących

warunkach (różna gęstość obsady), które wymagałyby od nich konkurencji o zasoby. Mogłoby się wydawać, że różne gęstości nie miały wpływu na poziom stresu w danym momencie, ale niekoniecznie tak jest. Warto również zauważyć, że brak zmian w poziomach badanych hormonów niekoniecznie musi wskazywać na środowisko wolne od stresu. Cockrem [2007] wskazuje, że odpowiedzi na kortykosteron są zwykle przedstawiane jako średnie odpowiedzi grup ptaków. Istnieją jednak znaczne różnice między osobnikami we wzorcu ich odpowiedzi na kortykosteron, a indywidualne odpowiedzi na kortykosteron mogą znacznie różnić się od średniej odpowiedzi grupy ptaków.

Testosteron jest uznawany za najważniejszy hormon przygotowujący osobniki do intensywnej rywalizacji społecznej. Osobniki dominujące, u których oznacza się najwyższe poziomy tego hormonu, wykazują tendencję do bycia bardziej agresywnymi i najprawdopodobniej odniosą sukces w rywalizacji [Queiroz i Cromberg, 2006]. Wyniki badań własnych (P2) wykazały znaczny spadek poziomu testosteronu we wszystkich grupach w porównaniu do początkowych pomiarów wykonanych pierwszego dnia eksperymentu. Kury nioski przebywające w małych grupach wykazują zachowania społeczne podobne do zachowań ich dzikich przodków, a organizacja społeczna jest stabilna. W stabilnych grupach struktura społeczna ma tendencję do stabilizowania się, aby uniknąć kosztów i ryzyka związanego ze zwiększoną i ciągłą walką. Umożliwienie rozwoju i utrzymania stabilnych połączeń może stworzyć pozytywne środowisko społeczne i poprawić zdolność radzenia sobie z nowymi stresorami [Carvalho i in., 2018].

Wyniki zmodyfikowanego testu otwartego pola pozwoliły na dalszą weryfikację badanych hipotez. Potwierdzono, że gęstość obsady jest istotnym czynnikiem modulującym zachowanie kur nieśnych. Kury utrzymywane w grupach o różnej gęstości obsady wykazały różnice w zachowaniach, takich jak lokomocja czy wykorzystanie elementów znajdujących się w zagrodzie testowej. Większa przestrzeń życiowa (niska gęstość obsady) w codziennym utrzymaniu kształtuje ptaki bardziej aktywne i zainteresowane nowymi elementami środowiska. Ptaki utrzymywane w zagrodach o wysokiej i standardowej gęstości obsady podczas testu poruszały się mniej, niż te trzymane w zagrodach o niskiej gęstości, u których dodatkowo stwierdzono większą częstotliwość epizodów lokomocji. Autorzy innych badań zaobserwowali podobną zależność [Van der Eijk i in., 2022; Shynkaruk i in., 2023; Wan i in., 2023]. Van der Eijk [2022] stwierdził, że przestrzeń życiowa wpływa na poziom aktywności, pobierania paszy i komfortu ptaków, co jest konsekwencją dostępu do wolnej przestrzeni, lepszej jakości ściółki i możliwości chodzenia. Ma to szczególne znaczenie dla młodych, rozwijających się ptaków [De Jong i in., 2022]. Ptaki, gdy mają zapewnioną

większą przestrzeń życiową umożliwiającą prezentowanie szerszego repertuaru zachowań, wykazują większą ciekawość do eksploracji środowiska. I odwrotnie, gdy ptaki przebywają w środowisku o wysokiej gęstości obsady, ich ruch w dużym stopniu jest ograniczony, a zaspokojenie ich podstawowych potrzeb staje się trudniejsze. Dlatego też mogą spędzać mniej czasu na odkrywaniu nieznanych im środowisk, tak jak wykazano w przeprowadzonym doświadczeniu. Wydaje się, że analiza czasu spędzonego na wykorzystaniu elementów środowiska testowego w celu oceny wpływu gęstości obsady na zachowanie kur nieśnych dostarcza istotnych informacji. Przeprowadzone testy behawioralne wykazały większą częstotliwość korzystania z poidła, a także dłuższy czas przeznaczony na konsumpcję wody przez ptaki z grupy o niskiej obsadzie w stosunku do grupy o standardowej gęstości obsady. Co więcej, stosunek czasu spędzonego na wykorzystaniu elementów wzbogacających do czasu lokomocji był niższy u ptaków utrzymywanych w zagrodach o niskiej i standardowej gęstości obsady w porównaniu do osobników pochodzących z zagród o wysokiej obsadzie. Obserwacje te sugerują, że wysoka gęstość obsady ogranicza różnorodność zachowań i eksploracji kur. Natomiast ptaki z dwóch pozostałych grup (standardowa i niska gęstość obsady) wykazywały większą potrzebę ruchu i dokładniej eksplorowały swoje otoczenie. Może to świadczyć o tym, że kury czuły się pewniej i bardziej komfortowo w takich warunkach. Obserwacje te potwierdzają, że wysokie zagęszczenie ogranicza różnorodność zachowań i eksplorację kur.

Współczesne zarządzanie dobrostanem zwierząt coraz częściej skupia się na dopasowaniu środowiska do potrzeb zwierząt [Arndt i in., 2022]. Dostosowanie środowiska hodowlanego w taki sposób, aby zapewnić dobrostan każdemu osobnikowi jest niemożliwe. W takim wypadku, zasadne jest podjęcie próby wyselekcjonowania osobników o cechach osobowości odpowiednich do warunków hodowlanych, tzn. dobrze adaptujących się [Mench, 1992; Craig i Swanson, 1994; Jones, 1996; Cheng, 2010]. Wyniki trzeciego badania (P3) wskazują, że profil behawioralny ptaków jest w dużej mierze determinowany wpływami addytywnymi. Zmienność genetyczna znacznie przekraczająca 20% całkowitej zmienności fenotypowej jest niewątpliwie odpowiednim parametrem do uwzględnienia w kryterium selekcyjnym. Wykazano skuteczność selekcji ukierunkowanej na cechy o niższym współczynniku odziedziczalności, np. cechy reprodukcyjne [Rozempolska – Rucińska i in., 2008; Rozempolska – Rucińska i in., 2009]. Jednocześnie stwierdzono, że zmienność genetyczna profilu proaktywnego/reaktywnego jest wyższa, niż w przypadku oceny pojedynczych reakcji. Jak sugeruje Cockrem [2005], ptaki proaktywne mogą odnosić większy sukces w niezmiennych/przewidywalnych warunkach, podczas gdy ptaki o

reaktywnej osobowości będą lepiej sobie radzić w zmiennych/nieprzewidywalnych warunkach. Wydaje się zatem, że ptaki o proaktywnym typie osobowości wykazujące określone reakcje niezależnie od tego, czy uciekają, czy zbliżają się do obiektu, powinny być preferowane do hodowli klatkowej. Jak wskazują inni autorzy [Cockrem, 2005; Brown i in., 2022], ptaki o takiej osobowości mają obniżony poziom stresu, co jest bardzo ważne w hodowli kur niosek. Na podstawie wyników innych badań [Cockrem, 2007; 2013] można sądzić, że kury proaktywne (reagujące ucieczką) miały niższy poziom stresu niż ptaki reaktywne, nawet jeśli mogły doświadczyć negatywnych emocji, w przeciwieństwie do ptaków zbliżających się. Reakcja ucieczki pozwala zwierzęciu kontrolować środowisko; dlatego jest czynnikiem redukującym stres [Inglis, 2000] i niekoniecznie zwiększa poziom hormonów stresu. Warto zauważyć, że reakcje zwierzęcia wskazujące na emocje strachu nie są wyraźnymi wskaźnikami aktywacji osi HPA [Cockrem, 2007]. Ptaki, które w przeprowadzonym doświadczeniu zostały sklasyfikowane jako reaktywne, nie były w stanie podjąć decyzji. Ich reakcje wskazują na konflikt motywacji („podejście-ucieczka”) i prawdopodobnie nabytą bezradność, silny strach blokujący zdolność do reagowania lub niezdolność do oceny sytuacji i podjęcia decyzji (brak ruchu i bezruch). Teorię, że kury wykazujące konflikt motywacyjny mogą doświadczać silnego stresu, potwierdzają wyniki badań, które wykazały, że reakcja „podejście-ucieczka” była silnie genetycznie skorelowana pozytywnie z reakcjami ucieczki i negatywnie z reakcjami podejścia [Rozempolska – Rucińska i in., 2017]. W związku z tym dwa przeciwstawne systemy emocjonalne są stymulowane w przypadku braku określonej decyzji [Choi i in., 2019], co może wywołać silny stres [Meehan i Mench, 2007].

W doświadczeniu przeprowadzonym na kurach ras Rhode Island White (RIW) i Rhode Island Red (RIR) analizowano również korelacje genetyczne między cechami użytkowymi a profilem behawioralnym ptaków. Korelacje te różniły się nie tylko siłą, ale także kierunkiem zależności, w zależności od rasy. Może to być prawdopodobnie związane z linią matczyną kur RIR i linią ojcowską RIW, które są poddane nieco innej presji selekcyjnej dla poszczególnych cech. Różnice w kierunkach korelacji genetycznych w obu rasach mogą wynikać z selekcji pośredniej. Istotne znaczenie odgrywają powiązania genetyczne pomiędzy profilem behawioralnym ptaków a poziomem wylęgowości. Cechy reprodukcyjne charakteryzują się niską odziedziczalnością [Almeida i in., 2017; Wen i in., 2022], a stres jest niewątpliwie czynnikiem zakłócającym reprodukcję u różnych gatunków zwierząt [Ericsson i in., 2014; Van Marle-Köster i Visser, 2021]. W badaniu własnym profil reaktywny był skorelowany negatywnie z liczbą wyklutych piskląt i pozytywnie z profilem

proaktywnym. Co ważne, te zależności stwierdzono tylko u rasy RIW. Jednocześnie wskutek białego upierzenia kur tej rasy są bardziej pobudliwe niż ptaki o barwnym upierzeniu (RIR) [Fraisie i Cockrem, 2006; Uitdehaag i in., 2008; Nordquist i in., 2011]. Kierunek korelacji genetycznych wskazuje, że wybór ptaków proaktywnych może przyczyniać się do wzrostu wartości hodowlanej kur w przypadku takich cech, jak poziom wylęgowości i liczba zniesionych jaj. Jednocześnie wysokie ujemne korelacje między profilem reaktywnym i proaktywnym mogą ułatwiać selekcję w kierunku profilu proaktywnego. Wysokie ujemne współczynniki korelacji wskazują, że reakcje behawioralne są powiązane z dwoma różnymi obwodami neurohormonalnymi [Forkman i in., 2007]. Niniejsze badanie nie wykazało korelacji między fenotypowym poziomem cech użytkowych a profilem behawioralnym. Może to mieć ogromne znaczenie dla oceny dobrostanu kur niosek. Jednym z argumentów potwierdzających wysoki poziom dobrostanu zwierząt jest wysoka wartość użytkowa [Muir i in., 2014]. Jednakże niniejsze wyniki mogą wskazywać, że wydajność nie musi być wskaźnikiem dobrostanu. Niezależnie od profilu osobowości, kury nie różniły się pod względem poziomu wydajności.

Podsumowanie

1. Brak ustalonej pozycji w grupie może pełnić rolę stresora społecznego dla kur niosek. Ptaki określone jako neutralne i podporządkowane prawdopodobnie miały silniejszą motywację i potrzebę „poprawienia” swojej pozycji, co potwierdziły wyniki poziomu neuroprzekaźników.
2. Nie udało się jednoznacznie stwierdzić, czy wyższy poziom stresu występuje u kur dominujących czy podporządkowanych, ale wyniki stężenia dopaminy, serotoniny, noradrenaliny i składu mikrobioty jelitowej sugerują, że zajmowanie niższej pozycji w grupie jest bardziej niekorzystne.
3. Gęstość obsady jest czynnikiem, który odgrywa istotną rolę w kształtowaniu zachowań kur nieśnych. Przy czym zwiększonej zmienności zachowań można oczekiwać w przypadku ptaków utrzymywanych przy niskiej obsadzie.
4. Współczynnik odziedziczalności profilu behawioralnego jest dobrym predyktorem skutecznej selekcji mającej na celu modyfikację zachowania ptaków na poziomie addytywnym. Wydaje się, że ptaki proaktywne, wykazujące silne reakcje behawioralne i zdolne do podejmowania decyzji zgodnie ze swoją motywacją, powinny być pożądanym typem osobowości w warunkach fermowych.
5. Korelacje genetyczne między profilem behawioralnym a cechami użytkowymi również wydają się potwierdzać, że proaktywne ptaki powinny być preferowane do hodowli. Należy jednak wziąć pod uwagę, że powiązania genetyczne między tymi cechami mogą zależeć od kierunku selekcji.
6. Niezależnie od różnic w zachowaniu proaktywnych/reaktywnych kur, wartość użytkowa tych ptaków nie zmienia się, co może łatwo prowadzić do błędnych wniosków, że osobowość ptaków nie jest ważną cechą w zakresie hodowli i nie jest związana z poziomem stresu

Wnioski

1. Profil behawioralny można wykorzystywać do zmian zachowania kur na poziomie addytywnym. Jednak niezbędna jest ocena powiązań genetycznych pomiędzy profilem a cechami użytkowymi.
2. Wydajność kur, czyli fenotypowa wartość cech użytkowych nie powinna stanowić o ocenie dobrostanu ptaków, a w szczególności o dobrostanie emocjonalnym ptaków.
3. W chowie fermowym należy dążyć do stabilizacji warunków utrzymania, ponieważ szeroko rozumiane zmiany środowiska zaburzają homeostazę organizmu.

Bibliografia

Alm, M., Tauson, R., Holm, L., Wichman, A., Kalliokoski, O., Wall, H. (2016) Welfare indicators in laying hens in relation to nest exclusion. *Poult. Sci.* 95, 1238–1247.

Almeida, T.P., Kern, E.L., Daltro, D.D.S., Braccini Neto, J., McManus, C., Thaler Neto, A., Cobuci, J.A. (2017) Genetic associations between reproductive and linear-type traits of Holstein cows in Brazil. *Rev. Bras. Zootecn.* 46, 91-98.

Arndt, S.S., Goerlich, V.C., Van Der Staay, F.J. (2022) A dynamic concept of animal welfare: The role of appetitive and adverse internal and external factors and the animal's ability to adapt to them. *Front. Anim. Sci.* 3, 908513.

Barron, A.B., Søvik, E., Cornish, J.L. (2010) The Roles of Dopamine and Related Compounds in Reward-Seeking Behavior Across Animal Phyla. *Front. Behav. Neurosci.* 4:163.

Bhanja, S.K., Bhadauria, P. (2018) Behaviour and welfare concepts in laying hens and their association with housing system. *Indian J. Poult. Sci.* 53, 1–10.

Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., Aubert, A. (2007) Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol. Behav.* 92, 375–397.

Bortolotti G.R., Marchant T.A., Blas J., German T. (2008) Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Funct. Ecol.* 22, 494–500.

Brown, A.A., Sobotik, E.B., House, G.M., Nelson, J.R., Archer, G.S. (2022) Differences in fear response strategy and stress susceptibility amongst four different commercial layer strains reared cage free. *Front. Physiol.* 13, 943471.

Bryden, W.L., Li, X., Ruhnke, I., Zhang, D., Shini, S. (2021) Nutrition, feeding and laying hen welfare. *Anim. Prod. Sci.* 61, 893–914.

Campbell, D.L.M., De Haas, E.N., Lee, C. (2019) A review of environmental enrichment for laying hens during rearing in relation to their behavioral and physiological development.

Poult. Sci. 98, 9–28.

Campbell, D.L.M., Horton, B.J. (2023) The necessity of pen replication to account for and understand the impacts of social dynamics on individual laying hen behavior. *Front. Anim. Sci.* 4, 1284419.

Campbell, D.L.M., Whitten, J.M., Slater, E., Lee, C. (2021) Rearing enrichments differentially modified hen personality traits and reduced prediction of range use. *Anim. Behav.* 179, 97–109.

Carvalho, R.R., Palme, R., Da Silva Vasconcellos, A. (2018) An integrated analysis of social stress in laying hens: The interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. *Behav. Process.* 149, 43–51.

Chen, S., Luo, S., Yan, C. (2022) Gut Microbiota Implications for Health and Welfare in Farm Animals: A Review. *Animals* 12, 93.

Chen, S., Xiang, H., Zhang, H., Zhu, X., Wang, D., Wang, J., Yin, T., Liu, L., Kong, M., Li, H., Zhao, X. (2019) Rearing system causes changes of behavior, microbiome, and gene expression of chickens. *Poult. Sci.* 98, 3365–3376.

Cheng, H.-W. (2010) Breeding of tomorrow's chickens to improve well-being. *Poult. Sci.* 89, 805–813.

Cheng, H.-W., Fahey, A.G. (2009) Effects of group size and repeated social disruption on the serotonergic and dopaminergic systems in two genetic lines of White Leghorn laying hens. *Poult. Sci.* 88, 2018–2025.

Choi, E.A., Jean-Richard-Dit-Bressel, P., Clifford, C.W.G., McNally, G.P. (2019) Paraventricular thalamus controls behavior during motivational conflict. *J. Neurosci.* 39, 4945–4958.

Cockrem, J.F. (2005) Conservation and behavioral neuroendocrinology. *Horm. Behav.* 48, 492–501.

Cockrem, J.F. (2007) Stress, corticosterone responses and avian personalities. *J. Ornithol.* 148, 169–178.

Cockrem, J.F. (2013) Corticosterone responses and personality in birds: Individual variation and the ability to cope with environmental changes due to climate change. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 156–163.

Cornwallis, C.K., Birkhead, T.R. (2008) PLASTICITY IN REPRODUCTIVE PHENOTYPES REVEALS STATUS-SPECIFIC CORRELATIONS BETWEEN BEHAVIORAL, MORPHOLOGICAL, AND PHYSIOLOGICAL SEXUAL TRAITS, *Evolution*, 62, 1149–1161.

Craig, J.V., Swanson, J.C. (1994) Review: Welfare Perspectives on Hens Kept for Egg Production. *Poult. Sci.* 73, 921–938.

De Boer, S.F., Olivier, B., Veening, J., Koolhaas, J.M. (2015) The neurobiology of offensive aggression: revealing a modular view. *Physiol. Behav.* 146, 111–127.

De Jong, I.C., Schokker, D., Gunnink, H., Van Wijhe, M., Rebel, J.M.J. (2022) Early life environment affects behavior, welfare, gut microbiome composition, and diversity in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 9, 977359.

Dennis, R.L. (2016) Adrenergic and noradrenergic regulation of poultry behavior and production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56, S94–S100.

Dudde, A., Krause, E.T., Matthews, L.R., Schrader, L. (2018) More Than Eggs – Relationship Between Productivity and Learning in Laying Hens. *Front. Psychol.* 9, 2000.

Ericsson, M., Fallahsharoudi, A., Bergquist, J., Kushnir, M.M., Jensen, P. (2014) Domestication effects on behavioural and hormonal responses to acute stress in chickens. *Physiol. Behav.* 133, 161-169,

Evans, L., Brooks, G.C., Anderson, M.G., Campbell, A.M., Jacobs, L. (2023) Environmental Complexity and Reduced Stocking Density Promote Positive Behavioral Outcomes in Broiler Chickens. *Animals* 13, 2074.

Favati, A., Leimar, O., Løvlie, H. (2014a) Personality Predicts Social Dominance in Male Domestic Fowl. *PLoS ONE* 9, e103535.

Favati, A., Leimar, O., Radesäter, T., Løvlie, H. (2014b) Social status and personality: stability in social state can promote consistency of behavioural responses. *Proc. R. Soc. B*

281: 20132531.

Favati, A., Løvlie, H., Leimar, O. (2017) Individual aggression, but not winner-loser effects, predicts social rank in male domestic fowl. *Behav. Ecol.* 28, 874–882.

Fiorilla, E., Ozella, L., Sirri, F., Zampiga, M., Piscitelli, R., Tarantola, M., Ponzio, P., Mugnai, C. (2024) Effects of housing systems on behaviour and welfare of autochthonous laying hens and a commercial hybrid. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 274, 106247.

Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.-C., Canali, E., Jones, R.B. (2007) A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* 92, 340–374.

Forss, S., Willems, E. (2022) The curious case of great ape curiosity and how it is shaped by sociality. *Ethology* 128, 552–563.

Fraisse, F., Cockrem, J.F. (2006) Corticosterone and the measurement of stress and fear in cage housed laying chickens. *Br. Poult. Sci.* 47, 1-10.

Heng, Y., Hanawa Peterson, H., Li, X. (2013) Consumer Attitudes toward Farm-Animal Welfare: The Case of Laying Hens. *JARE* 38, 418-434.

Hofmann, T., Schmucker, S.S., Bessei, W., Grashorn, M., Stefanski, V. (2020) Impact of Housing Environment on the Immune System in Chickens: A Review. *Animals* 10, 1138.

Inglis, I. (2000) Review: The central role of uncertainty reduction in determining behaviour. *Behaviour* 137, 1567-1599.

Ipe, D. (1987) Performing the Friedman Test and the Associated Multiple Comparison Test Using PROC GLM. In *Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference*, Dallas, TX, USA, 8–11 February 1987; SAS Institute: Cary, NC, USA.

Jain, T., Meena, M., Barupal, T., Sharma, K., Chittora, D., Sharma, K. (2019) Adaptation. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*; Vonk, J., Shackelford, T., Eds.; Springer: Cham, Switzerland.

Jones, R.B. (1996) Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives. *World's Poult. Sci. J.* 52, 131–174.

Kang, H.K., Park, S.B., Kim, S.H., Kim, C.H. (2016) Effects of stock density on the laying performance, blood parameter, corticosterone, litter quality, gas emission and bone mineral density of laying hens in floor pens. *Poult. Sci.* 95, 2764–2770.

Kang, S.-Y., Ko, Y.-H., Moon, Y.-S., Sohn, S.-H., Jang, I.-S. (2011) Effects of the Combined Stress Induced by Stocking Density and Feed Restriction on Hematological and Cytokine Parameters as Stress Indicators in Laying Hens. *Asian Australas. J. Anim. Sci* 24, 414–420.

Karpiński, M., Ognik, K., Garbiec, A., Czyżowski, P., Krauze, M. (2021) Effect of stroking on serotonin, noradrenaline, and cortisol levels in the blood of right- and left-pawed dogs. *Animals* 11, 331.

Matur, E., Eraslan, E., Akyazi, I., Ergul Ekiz, E., Eseceli, H., Keten, M., Metiner, K., Aktaran Bala, D. (2015) The effect of furnished cages on the immune response of laying hens under social stress. *Poult. Sci.* 94, 2853–2862.

Meehan, C.L., Mench, J.A. (2007) The challenge of challenge: can problem solving opportunities enhance animal welfare? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 246-261.

Mench, J.A. (1992) The welfare of poultry in modern production systems. *Poult. Sci. Rev.* 1992, 4, 107-128.

Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., Lee, D. H. (2002) BLUPF90 and related programs (BGF90), [in:] 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France.

Muir, W.M., Cheng, H.W. (2014) Genetic influences on the behavior of chickens associated with welfare and productivity, [in:] *Genetics and the Behavior of Domestic Animals*. Elsevier, 317-359.

Nelson, J.R., Settar, P., Berger, E., Wolc, A., O’Sullivan, N., Archer, G.S. (2020) Brown and white egg-layer strain differences in fearfulness and stress measures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 231, 105087.

Newberry, R.C. (1995) Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44, 229–243.

Nordquist, R.E., Heerkens, J.L.T., Rodenburg, T.B., Boks, S., Ellen, E.D., van Der Staay,

F.J. (2011) Laying hens selected for low mortality: Behaviour in tests of fearfulness, anxiety and cognition. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 131, 110-122.

Osadcha, Y., Pavlovych, O. (2023) Influence of Different Stocking Densities on Some Blood Parameters in Laying Hens. *YYU J AGR SCI* 33, 111–118.

Pusch, E.A., Bentz, A.B., Becker, D.J., Navara, K.J. (2018) Behavioral phenotype predicts physiological responses to chronic stress in proactive and reactive birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 255, 71–77.

Pusch, E.A., Navara, K.J. (2018) Behavioral phenotype relates to physiological differences in immunological and stress responsiveness in reactive and proactive birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 261, 81–88.

Queiroz, S.A., Cromberg, V.U. (2006) Aggressive behavior in the Gallus sp. *Braz. J. Poult. Sci.* 8, 1–14.

Rozempolska-Rucińska, I., Czech, A., Kasperek, K., Zięba, G., Ziemiańska, A. (2020) Behaviour and stress in three breeds of laying hens kept in the same environment. *SA J. An. Sci.* 50, 272–280.

Rozempolska-Rucinska, I., Kibała, L., Próchniak, T., Zieba, G., Łukaszewicz, M. (2017) Genetics of the novel object test outcome in laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 193, 73-76

Rozempolska-Rucińska, I., Twardowska, M., Zięba, G., Łukaszewicz, M., Witkowski, A. (2008) Our knowledge of hens' reproductive breeding value is limited upon selecting birds for flock reproduction. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 26, 79-84.

Rozempolska-Rucińska, I., Zięba, G., Łukaszewicz, M. (2009) Hatchability traits as selection criteria in breeding of laying hens. *Arch. Geflugelkd.* 73, 263-267

Shynkaruk, T., Long, K., LeBlanc, C., Schwean-Lardner, K. (2023) Impact of stocking density on the welfare and productivity of broiler chickens reared to 34 d of age. *JAPR* 32, 100344.

Sinclair, M., Lee, N.Y.P., Hötzel, M.J., De Luna, M.C.T., Sharma, A., Idris, M., Islam, M.A., Iyasere, O.S., Navarro, G., Ahmed, A.A., Curry, M., Burns, G.L., Marchant, J.N. (2022)

Consumer attitudes towards egg production systems and hen welfare across the world. *Front. Anim. Sci.* 3, 995430.

Tsuruta, S., Misztal, I. (2006) THRGIBBS1F90 for estimation of variance components with threshold and linear models, [in:] 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006.

Uitdehaag, K.A., Rodenburg, T.B., Komen, H., Kemp, B., van Arendonk, J.A.M. (2008) The association of response to a novel object with subsequent performance and feather damage in adult, cage-housed, pure-bred Rhode Island Red laying hens. *Poult. Sci.* 87, 2486-2492.

Van Der Eijk, J.A.J., Gunnink, H., Melis, S., Van Riel, J.W., De Jong, I.C. (2022) Reducing stocking density benefits behaviour of fast- and slower-growing broilers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 257, 105754.

Van Marle-Köster, E., Visser, C. (2021) Unintended consequences of selection for increased production on the health and welfare of livestock. *Arch. Anim. Breed.* 64, 177–185.

Villageliu, D.N., Lyte, M. (2017) Microbial endocrinology: why the intersection of microbiology and neurobiology matters to poultry health. *Poult. Sci.* 96, 2501–2508.

Wan, Y., Guan, H., Wang, D., Ma, R., Qi, R., Li, J., Liu, W., Li, Y., Zhan, K. (2023) Effects of cage stocking density on the production performance, serum biochemistry, immune level, and intestinal morphology of 2 laying hen breeds. *J. Appl. Poult. Res.* 32, 100375.

Wang, Y., Zhang, R., Wang, L., Li, J., Su, Y., Li, X., Bao, J. (2022) Effect of social order, perch, and dust-bath allocation on behavior in laying hens. *Anim. Biosci.* 35, 299–307.

Weeks, C.A., Nicol, C.J. (2006) Behavioural needs, priorities and preferences of laying hens. *World's Poult. Sci. J.* 62, 296–307.

Wen, C., Mai, C., Cai, R., Gou, Q., Zhang, B., Li, J., Sun, C., Yang, N. (2022) Inheritance of the duration of fertility in chickens and its correlation with laying performance. *Genet. Sel. Evol.* 54, 41.

Zimmerman, P.H., Buijs, S.A.F., Bolhuis, J.E., Keeling, L.J. (2011) Behaviour of domestic fowl in anticipation of positive and negative stimuli. *Anim. Behav.* 81, 569–577.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Does social position affect well-being in laying hens?

I. Rozempolska-Rucińska¹, K. Janicka^{1,*}, A. Ziemiańska¹, K. Kasperek¹, K. Drabik¹,
B. Nowakowicz-Dębek², Ł. Wlazło², A. Czech³ and G. Zięba¹

¹ University of Life Sciences in Lublin, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,
Institute of Biological Basis of Animal Production,
20-950 Lublin, Poland

² University of Life Sciences in Lublin, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,
Department of Animal Hygiene and Environmental Hazards, Lublin 20-950, Poland

³ University of Life Sciences in Lublin, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, Department of Biochemistry and Toxicology,
Lublin 20-950, Poland

KEY WORDS: behaviour, laying hens, social structure, stress level, well-being

Received: 3 October 2022

Revised: 26 January 2023

Accepted: 26 January 2023

* Corresponding author:
e-mail: kamila.janicka@up.lublin.pl

ABSTRACT. The level of stress is undoubtedly related to the position occupied by an individual in a social group. Research shows that this relationship is complex and can be ambiguous. The study involved 53-week-old 80 Green-legged Partridge hens kept in four independent identical boxes divided by opaque partitions, 20 individuals each. Behaviour was recorded for the following activities: pecking and flight. Behavioural observations began when four flocks were established with combined birds (day 1, 2, 3). Subsequent observations were carried out after the flock structure was established (day 14, 15, 16). Counting was conducted for 8 h/day, 4 h in the morning (6:00–10:00), and 4 h in the afternoon (14:00–18:00). Stress level was assessed using physiological indicators such as steroid hormone levels (serotonin, dopamine, noradrenaline, and adrenaline), corticosterone level and intestinal microflora composition. Changes in group structure were observed and only a small percentage remained constant in terms of belonging to a dominant, subordinate or neutral group. Significant differences in hormone levels were found between birds belonging to the above groups. The results indicated that the lack of an established position in the group structure was a social stressor for laying hens.

Introduction

Domestic hens are social birds living naturally in a defined territory in groups composed of males and females (Quiroz and Cromberg, 2006). When kept in small flocks, laying hens exhibit behaviour similar to their wild ancestors when environmental conditions allow it (Campderrich et al., 2016; Carvahlo et al., 2018; Kozak et al., 2019). Behavioural disorders resulting from social stress can be observed in the case of excessive density (Cheng et al., 2002).

Chickens acquire social behaviour from each other by learning to identify visual and auditory stimuli (Wang et al., 2022). The flock structure is hierarchical with male dominance over hens, and the hierarchy determined by the pecking order. The competition is authoritarian in nature, implying dominance of the strongest individuals (Quiroz and Cromberg, 2006). Since behavioural synchronization occurs in social animals, resources should depend on the size and density of the flock (Du et al., 2022). Otherwise, a struggle for resources can ensue, which can already be observed in one-week-old chickens when food

is restricted (Quiroz and Cromberg, 2006; Wang et al., 2022). Dominance-subordination interactions, maintained by means of aggressive behaviour, contribute to maintaining stability in the group (Bhanja and Bhadauria, 2018; Wang et al., 2022). Social relationships between members of a poultry group in which one (subordinate) avoids confrontation with another (dominant) are called the dominance hierarchy. Aggression is usually rare in a small and stable poultry group, because subordinates avoid dominants whenever possible (Shimmura et al., 2007). Aggression is directed primarily towards individuals with a lower social status or with specific phenotypic traits, e.g. low body weight or small comb size (Campderrich et al., 2016). The addition of unfamiliar hens to the flock disrupts the hierarchy, which needs to be re-established. Consequently, social disruption has been indicated as one of the greatest stressors for hens (Fahey and Cheng, 2008; Matur et al., 2015). In response to a social stressor, a reaction involving the release of glucocorticoids along with hormones secreted by the sympathetic nervous system is triggered. Long-term stress has a negative impact on reproduction and can reduce the performance of laying hens, which in turn results in economic losses (Matur et al., 2015; Carvahlo et al., 2018).

The level of stress is undoubtedly related to the position occupied by an individual in a social group, but as research shows, this is not a clear correlation. There is a complex relationship between the stability of the in-group structure, as well as the role played by the dominant and subordinated individual in the group (Wang et al., 2022). Increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) may be a consequence of subordination or represent a cost associated with dominance (Bortolotti et al., 2008). Interestingly, elevated stress hormone levels were observed in both dominant and subordinate birds (Carvahlo et al., 2018). A chronically activated stress response appears to be a low-rank indicator in many animal species. However, there are numerous other species in which social subordination is not associated with an overreaction to stress. A lower position in the group is not necessarily associated with the presence of physical or psychological stressors. Moreover, group instability and the need to re-establish the hierarchy may be more stressful for dominant individuals (Kotrschal et al., 1998).

We assumed that by assessing the levels of selected stress-related indicators, we would evaluate whether being a group leader or being a subordinate

individual was more stressful for the hens. The aim of the study was to analyse the relationship between social position in the group and the stress level in laying hens, as determined by various biological indices.

Material and methods

Ethical statement

All experimental procedures were approved by the 2nd Local Ethics Committee for Animal Studies at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (Approval no. 69/2017 of 28 September 2017).

Animals and housing

Before the study, the birds were examined by a veterinarian to confirm that their health status would not affect the results.

The research material consisted of 80 Green-legged Partridge hens, aged 53 weeks, kept at the Educational Research Centre in Lublin. The birds were provided with constant access to a complete diet and water in accordance with standard requirements for poultry rearing. Four independent identical boxes were divided by opaque partitions and each box was equipped with drip drinkers, a feeding tube, and nests lined with straw litter. The hens were maintained under a 16 h light/8 h darkness schedule. The birds were randomly allocated to one of four groups kept in the same farm building in boxes, 20 hens each, which ensured identical rearing conditions. The composition of each group did not change throughout the experiment. The density of birds in each box was 0.3 m²/hen. For focal sampling, all 20 birds in a group were individually tagged on the wing. To record the hens' behaviour, a camera was mounted above covering the entire area of each cage. Stress level were assessed using physiological indicators such as steroid hormone level, corticosterone level and intestinal microflora composition.

Behavioural observation

Observations of the hens' behaviour at the time of grouping were used to assess group position. It is at this time when the hens' behavioural reactions are most vivid and easy to observe. Behaviour was recorded for the pecking and flight activities. Aggressive pecking included the head of the recipient, and excluded both severe feather pecking (forceful pecks, sometimes with feather pulling, and recipi-

ent bird moving away) and gentle feather pecking (cautious pecks, not resulting in feather pulling and usually without reaction from the recipient bird) (Shimmura et al., 2008). Flight was defined as an instinctive physiological response to a threatening situation that prepared a bird to flee from another one. Based on behavioural analysis, the hen's position in the group was classified as dominant (pecking had a higher frequency than flight), subordinate (fleeing had a higher frequency than pecking) or neutral (no pecking or flight). Counting was conducted separately for each hen during the first and last 3 days, and the results were summed for each period. The position of the hen was determined independently in the first study period (first 3 days after grouping) and in the last period (last 3 days). Behavioural observations began when four flocks were established (days 1, 2, 3), and subsequent observations were carried out after the flock structure was established (days 14, 15, 16). Counting was conducted for 8 h/day, 4 h in the morning (6:00–10:00), and 4 h in the afternoon (14:00–18:00). Analysis of all recordings was carried out by one observer.

Experimental procedures and sample collection

Concentrations of serotonin, dopamine, nor-epinephrine and adrenaline steroid hormones were measured to assess stress levels. To determine the level of hormones, blood was collected from the wing vein from all birds on day 14. Directly after sample collection, blood was aliquoted and transferred into tubes containing EDTA (MEDLAB-PRODUCTS, Sp. z o.o., Raszyn, Poland) as an anticoagulant. Blood samples were centrifuged for 10 min at 3000 g (MPW-260R, MPW MED. INSTRUMENTS, Warsaw, Poland) and plasma was stored at -80°C until analysis. Quantitative determination of plasma serotonin levels was performed using the Eagle Biosciences Serotonin ELISA Assay Kit (catalog no.: SER39-K01; Eagle Biosciences, Inc., Nashua, NH, USA). Plasma levels of hormones (adrenaline, noradrenaline and dopamine) were determined using CAT ELISA assays (enzyme immunoassays for adrenaline, noradrenaline and dopamine quantification) in accordance with the manufacturer's procedure (DLD Diagnostika GMBH – catalog no.: EA603/288; Eagle Biosciences, Inc., Nashua, NH, USA). Determinations were performed using an Elisa reader (SunriseTM, Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) and the absorbance was read at 450 nm.

Next, the level of corticosterone in the feathers was determined using the method modified by Bortolotti et al. (2008). The second primary feather was collected from the left wing of each bird for analysis. Corticosterone levels were determined by immunoenzymatic assay using the Chicken CORT (Corticosterone) ELISA Kit (Biorbyt Ltd, Cambridge, United Kingdom) according to the manufacturer's procedure. At the end of the study, the birds were slaughtered for commercial purposes.

The composition of the intestinal microflora was also considered as a factor related to hormone levels, indirectly shaping the behaviour of individuals (Wlaził et al. 2021a; b). Intestinal contents from three sections of the gastrointestinal tract: small intestine, caecum, and large intestine were collected to sterile containers from each hen and transported in thermal bags to the laboratory. Samples of the birds' intestinal contents were homogenised, and 20 g of material was weighed and placed in containers with Ringer's solution (BTL Industries Ltd, Warsaw, Poland). Ten-fold dilutions were then prepared in Ringer's solution and plated onto prepared Petri dishes with the appropriate microbial medium (Table 1). Each sample was plated in triplicate. After incubation, colonies were counted using a Scan 300 counter (Interscience Laboratories, Saint Nom la Bretèche, France) and the abundance of each type was determined, expressed as the number of colony-forming units per g of intestinal content (CFU/g).

Statistical analyses

The recorded indices did not show a normal distribution, hence, the data were subjected to a rank transformation. Multiple comparisons with the Bonferroni correction of estimates of differences in the examined traits between the breeds were analysed in univariate models, taking into account the effect of the group to which the hen was assigned (attacking, fleeing, neutral). The number of the pen, in which the hens were kept was not a significant factor and was therefore excluded from the analyses. The GLIMMIX procedure (SAS Institute, 2018) was applied to evaluate the significance of differences between the study groups.

Results

More than 57% of the birds that mainly exhibited pecking behaviour on the day of the establishment of new flocks (day 1) showed the same response

Table 1. Microbiological assays

Parameter	Microbiological medium	Incubation
Total number of mesophilic aerobic bacteria	Agar medium	Incubation for 48 h at 37 °C in accordance with PN EN ISO 4833 2
Total number of fungi	Sabouraud agar medium	Incubation for 5–7 d at 25 °C in accordance with PN ISO 21527-1/2
Total number of coliform bacteria	Endo LES agar medium	Incubation for 24 h at 37 °C in accordance with PN-ISO 4832:2007
Total number of <i>Escherichia coli</i>	mFC agar medium	Incubation for 18–24 h at 44 °C in accordance with PN-ISO-16649-2
Total number of <i>Clostridium perfringens</i>	Tryptose-sulphite-cycloserine (TSC) medium	Incubation for 48 h at 37 °C in anaerobic conditions using the GasPak Plus system (Anaerobic System Envelopes with Palladium Catalyst, BD BBL) in accordance with PN-EN ISO 7937
Number of lactic acid bacteria of the genus <i>Lactobacillus</i>	MRS agar medium	Incubation for 3–5 d at 30 °C
<i>Salmonella</i> presence	Buffered peptone water Rappaport-Vassiliadis, XLD medium	Incubation for 24 h at 37 °C; final identification was carried out using biochemical tests and polyvalent sera in accordance with PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007P

PN EN ISO 4833 2 – ISO 4833-2:2013 specifies a horizontal method for counting microorganisms that are able to grow and form colonies on the surface of a solid medium after aerobic incubation at 30 °C; PN ISO 21527-1/2 specifies a horizontal method for determining yeast and mould counts; PN-ISO-16649-2 specifies a horizontal method for determining the count of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*; PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007P specifies a horizontal detection method for *Salmonella* spp.

after flock hierarchy was established (day 14). Over 38% of the hens, whose primary behaviour was flight changed their strategy and showed aggressive behaviour. The behaviour of exactly the same percentage of hens changed to neutral. After establishing the hierarchy, almost 60% of neutral hens began to show aggression, and only less than 17% remained neutral (Table 2).

The behaviour of the hens was assessed by recording the number of pecks and flee attempts. Analysis of the hens' behaviour after establishment of the hierarchy (day 14) showed that more than half of the birds classified as attackers (51.3%) exhibited aggressive behaviour on the first day of social structure formation. Hens that initially avoided conflicts constituted only 18% of the

group of aggressive hens. Birds showing primarily flight responses at the beginning of hierarchy establishment employed both pecking and flight strategies. Birds that initially tried to remain neutral accounted for the lowest percentage. Particularly noteworthy was the group of neutral hens, which on day 1 constituted only 9%, and most of them, i.e. nearly 55%, demonstrated mainly the flight reaction (Table 3).

The mean levels of neurotransmitters (adrenaline, dopamine, noradrenaline, and serotonin), intestinal microflora composition (fungilog, mesophlog, lactobaclog, colilog, ecolilog, clostridlog), and corticosterone levels are presented in Table 4. Statistically significant differences between the means are presented in Tables 5 and 6.

Table 2. Behavioural changes during flock hierarchy establishment

Behaviour		Percentage, %
Day 1	Day 14	
Attack	Attack	57.1
	Flight	20.0
	Neutral	22.9
Flight	Attack	38.7
	Flight	22.6
	Neutral	38.7
Neutral	Attack	58.3
	Flight	25.0
	Neutral	16.7

Table 3. Percentage of hens after hierarchy establishment relative to their behaviour on day 1

Behaviour		Percentage, %
Day 14	Day 1	
Attack	Attack	51.3
	Flight	30.8
	Neutral	18.0
Flight	Attack	41.2
	Flight	41.2
	Neutral	17.7
Neutral	Attack	36.4
	Flight	54.6
	Neutral	9.1

Table 4. Mean levels of the analysed indicators relative to the social status of hens

Parameter	Day 14	Mean	StdErr	Lower	Upper
Adrenaline, ng/ml	A	0.46	0.06	0.34	0.59
	F	0.42	0.10	0.23	0.62
	N	0.44	0.09	0.26	0.63
Dopamine, ng/ml	A	3.21	1.11	0.99	5.42
	F	1.54	1.78	-2.01	5.09
	N	8.96	1.66	5.64	12.28
Noradrenaline, ng/ml	A	0.60	0.19	0.22	0.98
	F	1.65	0.31	1.03	2.26
	N	0.88	0.29	0.30	1.45
Serotonin, ng/ml	A	117.60	2.98	111.65	123.55
	F	115.35	4.71	105.94	124.76
	N	98.81	4.38	90.06	107.55
Corticosterone	A	3.51	0.49	2.53	4.49
	F	4.64	0.79	3.07	6.21
	N	3.66	0.74	2.18	5.15
Total number of fungi log CFU/g	A	2.93	0.13	2.68	3.18
	F	2.64	0.20	2.24	3.03
	N	2.78	0.19	2.41	3.15
Total number of mesophilic aerobic bacteria log CFU/g	A	7.41	0.07	7.27	7.55
	F	7.31	0.11	7.08	7.53
	N	7.37	0.11	7.16	7.58
LAB log CFU/g	A	7.26	0.10	7.06	7.46
	F	7.16	0.16	6.84	7.48
	N	7.32	0.15	7.02	7.62
Total number of coliform bacteria log CFU/g	A	5.69	0.12	5.44	5.94
	F	5.70	0.20	5.30	6.09
	N	5.54	0.18	5.18	5.91
Total number of <i>Escherichia coli</i> log CFU/g	A	5.67	0.13	5.41	5.92
	F	5.64	0.20	5.24	6.05
	N	5.67	0.19	5.30	6.05
Total number of <i>Clostridium perfringens</i> log CFU/g	A	5.94	0.12	5.70	6.18
	F	6.16	0.19	5.79	6.54
	N	6.01	0.18	5.65	6.36

laying hen behaviour: A – attack, F – flight, N – neutral; StdErr – standard error, CFU – colony-forming unit, LAB – *Lactobacillus*

In comparison to the attacking (dominant) and neutral hens, the fleeing (subordinate) birds had higher dopamine and lower serotonin levels. Neutral hens had higher noradrenaline levels than pecking individuals (Table 5). Initially neutral birds, which changed their strategy into fleeing after establishing the hierarchy, showed higher dopamine and lower serotonin and noradrenaline levels (Table 6). This was recorded in 25% of hens (Table 2). Almost 40% of hens that represented the fleeing type during the

hierarchy setting, but whose social position changed to the dominant type, had lower levels of dopamine and noradrenaline and higher levels of serotonin. High serotonin and low noradrenaline and dopamine levels were determined in the blood of initially fleeing hens that retained this strategy (23%) or became neutral (39%) after the new social structure was established. Initially attacking birds that became subordinate (20%) or neutral (23%) after 14 days showed lower dopamine and norepinephrine levels and higher

Table 5. Estimators of differences in neurotransmitter levels relative to social status

Neurotransmitters	Behaviour		Estimate	StdErr	Probt	Lower	Upper
Dopamine	A	F	-5.76	2.00	0.005	-9.75	-1.76
	N	F	-7.43	2.44	0.003	-12.29	-2.57
Serotonin	A	F	18.80	5.30	0.001	8.22	29.38
	N	F	16.54	6.44	0.012	3.69	29.39
Noradrenaline	A	N	-1.05	0.36	0.005	-1.77	-0.32

laying hen behaviour: A – attack, F – flight; N – neutral, StdErr – standard error, Probt – probability

Table 6. Estimators of differences in selected indicators relative to social status of birds; standard error, significance of differences, and confidence interval

Parameter	Behaviour Day 1–14				Estimate	StdErr	Probt	Lower	Upper
Dopamine	A	A	N	F	-17.90	3.93	0.000	-25.74	-10.07
	A	N	N	F	-19.69	4.29	0.000	-28.26	-11.12
	A	F	N	F	-19.43	4.38	0.000	-28.16	-10.70
	N	A	N	F	-16.51	4.38	0.000	-25.25	-7.78
	N	N	N	F	-20.15	5.79	0.001	-31.71	-8.60
	N	F	F	A	20.11	4.09	0.000	11.95	28.28
	N	F	F	N	19.70	4.09	0.000	11.53	27.87
	N	F	F	F	17.83	4.38	0.000	9.10	26.56
Noradrenaline	A	A	N	N	-2.61	0.81	0.002	-4.23	-0.99
	A	N	N	N	-2.60	0.86	0.004	-4.33	-0.88
	A	F	N	N	-2.64	0.88	0.004	-4.39	-0.89
	N	A	N	N	-2.49	0.88	0.006	-4.24	-0.75
	N	N	N	F	2.32	1.00	0.023	0.33	4.31
	N	N	F	A	2.59	0.84	0.003	0.93	4.26
	N	N	F	N	1.96	0.84	0.022	0.29	3.62
	N	N	F	F	1.91	0.88	0.033	0.16	3.66
Serotonin	A	A	N	F	49.29	10.38	0.000	28.57	70.02
	A	N	N	F	50.62	11.31	0.000	28.04	73.21
	A	F	N	F	52.71	11.53	0.000	29.68	75.73
	N	A	N	F	52.79	11.53	0.000	29.77	75.81
	N	N	N	F	53.35	15.25	0.001	22.90	83.81
	N	F	F	A	-51.41	10.88	0.000	-73.14	-29.68
	N	F	F	N	-42.75	10.88	0.000	-64.48	-21.02
	N	F	F	F	-44.40	11.53	0.000	-67.42	-21.37
Total number of <i>Escherichia coli</i>	A	A	N	A	-0.61	0.32	0.058	-1.25	0.02
Total number of <i>Clostridium perfringens</i>	A	A	F	A	0.50	0.25	0.050	0.00	1.01
	A	N	F	A	0.79	0.31	0.014	0.16	1.41
	N	A	F	A	0.88	0.33	0.009	0.23	1.53
	F	A	F	N	-0.66	0.29	0.024	-1.23	-0.09

StdErr – standard error, Probt – probability

serotonin concentrations (Tables 2, 6). Analysis of the intestinal microflora composition revealed significantly higher *Escherichia coli* counts in hens that were assessed as neutral on day 1 but attacked other hens on day 14. The abundance of these bacteria was lower in hens classified as dominant on day 1 and day 14. Lower levels of Gram-

positive bacteria of the genus *Clostridium* were determined in the initially fleeing hens which became dominant during hierarchy establishment. In contrast, a significantly higher level of *Clostridium* bacteria was determined in fleeing birds which remained neutral after establishing the social structure in the flock (Table 6).

Discussion

Many studies have shown that social hierarchy is an important factor in the adaptation of an individual in a group (Bhanja and Bhadauria, 2018; Wang et al., 2022). Differences in behaviour are a form of communication that helps maintain balance and stability in the group (Queiroz and Cromberg, 2006). Our research has shown that flock structure is maintained through threatening or attacking behaviour, which is replaced by demonstrations of dominance and submission once structure is established. Therefore, hens were classified as dominant (pecking had a higher frequency than flight), submissive (fleeing had a higher frequency than pecking) and neutral (no pecking or flight) based on their behaviour.

Endocrine balance, reflected in the level of neurotransmitters, is the key factor necessary to ensure homeostasis (Karpiński et al., 2021). Differences were shown in the concentration of dopamine (DA) and dopaminergic receptors in dominant and subordinate hens (Cheng et al., 2002), which was confirmed by the present results. In comparison to the attacking (dominant) and neutral birds, the fleeing (subordinate) hens had higher levels of dopamine. As indicated by Favati et al. (2013) and Cheng and Fahley (2009), changes in dopamine and corticosteroid concentrations could stimulate harmful behaviours or result in the inability to cope with environmental stress. Therefore, it could be assumed that the dominant hens experienced higher levels of stress, which was probably due to the need to demonstrate their dominance. Analysis of DA levels and behaviour showed that the fleeing birds had a higher concentration of dopamine, which may have suggested that their behaviour was more impulsive than that of the other hens. The subordinate (fleeing) birds also exhibited aggressive behaviour in certain situations that depended on the confronted hen. Since these birds tried not only to flee but also to fight, their reactivity may have been high, as evidenced by higher blood dopamine levels compared to other hens. Since dopamine increases motivation and concentration, it could be assumed that its higher level in the fleeing birds was responsible for the high determination of birds to change their position. Therefore, it seemed that the fleeing birds showed the greatest need to change their position in the group.

It is widely believed that serotonin (5-HT) is the major neurotransmitter responsible for aggression. Reduced concentrations of 5-HT are associated with aggression; thus, it is considered a modulator of this type of behaviour (de Boer et al., 2015). In the central

nervous system, serotonin is also involved in modulating stress responses, including social and environmental adaptation (Cheng and Fahey, 2009). The present analysis of serotonin levels in hens revealed that dominant birds had higher serotonin levels than subordinate hens. This could suggest that the emotion of anger/rage was not a motivator for such behaviour as pecking the other individual. Higher levels of this neurotransmitter in dominant birds could suggest that they experienced a lower level of stress because of their position in the group. Compared to the other hens, the fleeing birds had lower levels of serotonin, which is specifically involved in psychological comfort levels (increased fearfulness). Simultaneously, lower serotonin levels may contribute to increased dopamine concentration. The comparison of dopamine and serotonin levels with the strategy adopted by the birds yielded very interesting results. Higher dopamine and lower serotonin levels could indicate depression in birds. This could be related to their lower (subordinate) position after establishing the hierarchy compared to their initial (neutral) position. These birds lived in a state of constant alertness and showed symptoms of emotional arousal. In turn, lower dopamine and higher serotonin levels suggested a lower degree of arousal, accompanied by an elevated mood in laying hens. This was observed in initially fleeing birds that later became dominant.

Noradrenaline and adrenaline play an important role in maintaining behavioural and physiological balance (Cheng and Fahey, 2009; Dennis, 2016). Higher noradrenaline levels in neutral birds compared to pecking birds could mean that a lack of response did not indicate a lack of stress. Birds that responded with flight or pecking were characterised by lower concentration of noradrenaline, which could indicate lower levels of stress due to the opportunity to release emotional tension. Neutral birds could in fact experience greater discomfort, and the inability to peck or flee could result from a motivational conflict when the bird was unable to make a decision. Differences in behavioural patterns between dominant and subordinate individuals result not only from the different functioning of the neuroendocrine system, but also genetic factors, environmental conditions during the development, and previous experiences of birds (Cheng et al., 2002; Fahey and Cheng, 2008; Rozempolska-Rucińska, 2020).

There is ample evidence of the significant impact of the gut microbiota composition on physical and mental health (Villageliu and Lyte, 2017; Bryden et al., 2021). The barrier of the gastrointestinal system limits the negative effects of stress-

ors, among others, by maintaining the correct pH or bacteriocin production (Truszczyński and Pejsak, 2012). In the present study, there were differences in the abundance of bacteria of the genus *Clostridium* and *E. coli*. Truszczyński and Pejsak (2012) reported that a prolonged stress response decreased the cellular response in birds, which could result in infections due to increased sensitivity to certain microorganisms, especially conditionally pathogenic organisms such as *E. coli*. Our results showed that birds that ranked higher after structure establishment had lower counts of *E. coli* and Gram-positive bacteria of the genus *Clostridium*. This suggested that due to their high rank, the birds did not experience stress, thus it was likely that their digestive tract barrier was not compromised, and the birds were not exposed to infections. The situation was different for birds that occupied a neutral position after the hierarchy was established, as they showed higher abundance of *Clostridium* bacteria. It can be concluded that birds whose position is uncertain experience more stress, which in turn has an adverse effect on their microflora. Such individuals become susceptible to certain microorganisms and are more likely to develop health problems and reduced productivity.

Summarizing the research results, it could be concluded that birds of different social position differed in the level of catecholamine neurotransmitters and microflora composition. The relationships between these indicators were associated with animal behaviour. Importantly, environmental and social effects also played a significant role in the ultimate type of behaviour. It is difficult to clearly define the role of these substances at the moment, and therefore research must be continued.

Conclusions

The results indicated that the lack of an established position in the group structure was a social stressor for laying hens. Hens with an undetermined position in the group, defined as neutral and subordinate hens, could have a strong motivation and need to re-establish their position, which was crucial for their emotional well-being. Subordinate birds appeared to be very impulsive as evidenced by dopamine levels. Thus, they seemed to show the greatest need to change position in the group. At this stage of the research, it is not yet possible to conclusively answer whether higher level of stress occur in dominant or subordinate birds, but the results have suggested that higher stress levels are associated with lower group position.

Conflict of interest

The Authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Bhanja S.K., Bhadauria P., 2018. Behaviour and welfare concepts in laying hens and their association with housing system. *Indian J. Poult. Sci.* 53, 1–10, <https://doi.org/10.5958/0974-8180.2018.00009.0>
- Bortolotti G.R., Marchant T.A., Blas J., German T., 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Funct. Ecol.* 22, 494–500, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01387.x>
- Bryden W.L., Li X., Ruhnke I., Zhang D., Shini S., 2021. Nutrition, feeding and laying hen welfare. *Anim. Prod. Sci.* 61, 893–914, <https://doi.org/10.1071/AN20396>
- Campderrich I., Liste G., Estevez I., 2016. Group size and phenotypic appearance: their role on the social dynamics in pullets. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 189, 41–48, <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.014>
- Carvahlo R.R., Palme R., da Silva Vasconcellos A., 2018. An integrated analysis of social stress in laying hens: the interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. *Behav. Processes* 149, 43–51, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.01.016>
- Cheng H.-W., Fahey A.G., 2009. Effects of group size and repeated social disruption on the serotonergic and dopaminergic systems in two genetic lines of White Leghorn laying hens. *Poult. Sci.* 88, 2018–2025, <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00302>
- Cheng H.W., Singleton P., Muir W.M., 2002. Social stress in laying hens: differential dopamine and corticosterone responses after intermingling different genetic strains of chickens. *Poult. Sci.* 81, 1265–1272, <https://doi.org/10.1093/ps/81.9.1265>
- de Boer S.F., Olivier B., Veening J., Koolhaas J.M., 2015. The neurobiology of offensive aggression: revealing a modular view. *Physiol. Behav.* 146, 111–127, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.040>
- Dennis R.L., 2016. Adrenergic and noradrenergic regulation of poultry behavior and production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56, S94–S100, <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.02.007>
- Du X., Qin P., Liu Y., Amevor F.K., Shu G., Li D., Zhao X., 2022. Effects of key farm management practices on pullets welfare - a review. *Animals* 12, 729, <https://doi.org/10.3390/ani12060729>
- Fahey A.G., Cheng H.-W., 2008. Effects of social disruption on physical parameters, corticosterone concentrations, and immune system in two genetic lines of White Leghorn layers. *Poult. Sci.* 87, 1947–1954, <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00477>
- Favati A., Leimar O., Radesäter T., Løvlie H., 2013. Social status and personality: stability in social state can promote consistency of behavioural responses. *Proc. Biol. Soc. B* 281, 20132531, <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2531>
- Karpiński M., Ognik K., Garbiec A., Czyżowski P., Krauze M., 2021. Effect of stroking on serotonin, noradrenaline, and cortisol levels in the blood of right- and left-pawed dogs. *Animals* 11, 331, <https://doi.org/10.3390/ani11020331>
- Kotrschal K., Hirschenhauser K., Möstl E., 1998. The relationship between social stress and dominance is seasonal in graylag geese. *Anim. Behav.* 55, 171–176, <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0597>

- Kozak A., Kasperek K., Zięba G., Rozempolska-Rucińska I., 2019. Variability of laying hen behaviour depending on the breed. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 32, 1062–1068, <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0645>
- Matur E., Eraslan E., Akyazi I., Ergül Ekiz E., Eseceli H., Keten M., Metiner K., Aktaran Bala D., 2015. The effect of furnished cages on the immune response of laying hens under social stress. *Poult. Sci.* 94, 2853–2862, <https://doi.org/10.3382/ps/pev297>
- Queiroz S.A., Cromberg V.U., 2006. Aggressive behavior in the *Gallus* sp. *Braz. J. Poult. Sci.* 8, 1–14, <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2006000100001>
- Rozempolska-Rucińska I., Czech A., Kasperek K., Zięba G., Ziemiańska A., 2020. Behaviour and stress in three breeds of laying hens kept in the same environment. *South Afr. J. Anim. Sci.* 50, 272–280, <https://doi.org/10.4314/sajas.v50i2.10>
- SAS Institute, 2018. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC (USA)
- Shimmura T., Azuma T., Hirahara S., Eguchi Y., Uetake K., Tanaka T., 2008. Relation between social order and use of resources in small and large furnished cages for laying hens. *Br. Poult. Sci.* 49, 516–524, <https://doi.org/10.1080/00071660802302203>
- Shimmura T., Eguchi Y., Uetake K., Tanaka T., 2007. Differences of behavior, use of resources and physical conditions between dominant and subordinate hens in furnished cages. *Anim. Sci. J.* 78, 307–313, <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00440.x>
- Truszczyński M., Pejsak Z., 2012. Importance and mechanism of stress in disease syndromes of food animals, caused by facultatively pathogenic bacteria (in Polish). *Med. Weter.* 68, 712–716
- Villageliu D.N., Lyte M., 2017. Microbial endocrinology: why the intersection of microbiology and neurobiology matters to poultry health. *Poult. Sci.* 96, 2501–2508, <https://doi.org/10.3382/ps/pex148>
- Wang Y., Zhang R., Wang L., Li J., Su Y., Li X., Bao J., 2022. Effect of social order, perch, and dust-bath allocation on behavior in laying hens. *Anim. Biosci.* 35, 299–307, <https://doi.org/10.5713/ab.21.0198>
- Wlazio Ł., Kowalska D., Bielański P., Chmielowiec-Korzeniowska A., Ossowski M., Łukaszewicz M., Czech A., Nowakowicz-Dębek B., 2021a. Effect of fermented rapeseed meal on the gastrointestinal microbiota and immune status of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animals* 11, 716, <https://doi.org/10.3390/ani11030716>
- Wlazio Ł., Nowakowicz-Dębek B., Czech A., Chmielowiec-Korzeniowska A., Ossowski M., Kułaczyński M., Łukaszewicz M., Krasowska A., 2021b. Fermented rapeseed meal as a component of the mink diet (*Neovison vison*) modulating the gastrointestinal tract microbiota. *Animals* 11, 1337, <https://doi.org/10.3390/ani11051337>

Article

Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens

Kamila Janicka * , Kamil Drabik , Karolina Wengerska  and Iwona Rozempolska-Rucińska

Institute of Biological Basis of Animal Production, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; kamil.drabik@up.lublin.pl (K.D.); karolina.wengerska@up.lublin.pl (K.W.); iwona.rucinska@up.lublin.pl (I.R.-R.)

* Correspondence: kamila.janicka@up.lublin.pl; Tel.: +48-606798531

Simple Summary: The presence of stressors is common in hens. Stocking density seems to play a special role in poultry production. Changes in stocking density are reflected in behavioural and physiological traits. The present study aimed to investigate the effects of stocking density on the behavioural and physiological traits of laying hens. The study hypothesized that stocking density could affect the behaviour of hens, with the expectation that hens in the low-stocking-density group would be more active and interested in the test environment. In addition, higher stocking densities were expected to create a more stressful environment, which would be reflected in blood parameters. Birds kept at low densities showed the greatest variety in behaviour, as well as the most frequent and longest locomotion. There were no differences between groups in terms of stress hormone scores. All groups showed a significant decrease in testosterone levels compared to the control group. The changes observed in the birds' behaviour indicate the possible effect of stocking density on their welfare. When hens are free to move around and explore their environment, they exhibit a wider range of behaviours in a new location.

Abstract: This study analysed stocking density as a major stress factor for laying hens and assessed its impact on selected behavioural and physiological traits of the birds. The study population included 142 birds of the Green-legged Partridge breed (12 males and 132 females). The birds were randomly assigned to three experimental groups of standard, low, and high stocking density, and a modified open-field test was conducted to assess their behavioural traits. The following blood parameters were analysed: corticosterone, cortisol, and testosterone. The behavioural test results demonstrated an impact of stocking density on laying hens' behaviour. The birds kept at a low density exhibited the greatest diversity in behaviour as well as the most frequent and longest locomotion. There were no differences between the groups in terms of stress hormone results. All groups showed a significant decrease in testosterone levels compared to the control. This may suggest that, despite differences in stocking, the structure was established quickly, resulting in decreased competition and, consequently, a positive impact on the birds. When kept in lower-stocking-density groups with a stable structure, birds are less competitive; this stable structure improves their well-being to a greater extent than the stocking density.

Keywords: laying hens; stocking density; behaviour; stress hormones



Academic Editors: Birgit Spindler and Carolin Adler

Received: 28 October 2024

Revised: 19 December 2024

Accepted: 17 February 2025

Published: 19 February 2025

Citation: Janicka, K.; Drabik, K.; Wengerska, K.; Rozempolska-Rucińska, I. Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. *Animals* **2025**, *15*, 604. <https://doi.org/10.3390/ani15040604>

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rapid and unpredictable changes may have significant effects on survival and coping ability. In order to survive, animals need to gain information about the environment [1,2].

The concept of animal welfare developed by Ohl and van der Staay [3] states: “An individual is in a positive welfare state when it is able to actively adapt to its living conditions and to reach the state that it perceives as a positive” [4]. Adaptation to change may be a variable trait and is likely to be influenced by conditions during an individual’s development [1,2]. Adaptation is the ability of any living organism to survive and reproduce successfully under the existing environment [5]. In a complex environment, birds must adapt to changing circumstances (both negative and positive) [6–8]. There is a growing research interest aimed at assessing personality, as it is important to understand how and why animals differ in their reactions despite facing similar life conditions [9]. Some birds have little or no response to stressors that evoke a relatively large response in other birds [6]. If the changes are potentially harmful, the animals adapt to them by generating appropriate reactions [6,7,10]. Diverse coping styles may, to a certain extent, be attributed to differences in stress hormone profiles. Proactive individuals have a more pronounced sympathetic stress activation (flight or fight), whereas reactive individuals often respond to a stressful situation with a higher level of parasympathetic stress activation (withdrawal response) [11]. However, the expression of adaptive behaviour depends on a certain optimal stress level [7]. Strong and/or prolonged stress weakens the activity of all physiological structures responsible for the adaptation process [12].

The presence of stressors is common for hens, and birds are exposed to stressors such as stocking density, temperature, food limitations, transport, and pollution [13]. The first two are among the most important factors in the poultry industry [13–15]. However, stocking density seems to play a special role [13,16,17]. Animal welfare largely depends on the possibility of the animal exhibiting natural behaviour [18], which, in hens, is associated with sufficient living space [16,17]. Keeping too many birds per square meter (m²) can seriously impact their welfare [19–21]. Changes in stocking density are reflected in behavioural and physiological traits [13,22]. A restricted breeding environment can significantly limit or even eliminate the manifestation of natural behaviour in hens [22]. When the space is overcrowded, it can lead to discomfort and anxiety, which can result in changes in behaviour [21]. In such conditions, the laying hens’ activity decreases [15], their comfort behaviour is limited [23], and the use of cage elements is reduced, which can lead to lower consumption of feed and water and result in injuries and diseases. Furthermore, an increase in aggressive behaviour and pecking out feathers is observed [23]. In addition to changes in behaviour, there may be signs of physiological stress [15], such as alterations in leukocyte [12] and corticosterone levels [13,22]. In birds, the main glucocorticoid is corticosterone. This hormone can affect multiple regulatory and behavioural changes [23,24] that are thought to help birds to adjust to stressful situations [7]. Therefore, stocking density is crucial in poultry management as it impacts welfare, productivity, and economic viability [16,17,25]. Continuous improvement is essential in poultry production, so it is important to implement standards that optimise the welfare of poultry. The rearing environment can present poultry with a number of challenges that can lead to frustration. Understanding these challenges makes it possible to adapt the environment to the needs of the animals. This allows birds to control the environment to a certain point [26].

The continued study of stress in relation to stocking density is important. In research and industry, the use of the Green-legged Partridge is becoming more common. Due to increasing pressure from high-producing commodity hybrids, bird breeds with lower productivity have lost ground. Due to the need to protect their often-unique characteristics, some breeds were included in the Conservation of Genetic Resources (CYT) Programme. One of the breeds protected is the Green-legged Partridge [27]. The Green-legged Partridge is one of the oldest breeds of hen kept in Europe [28]. Due to the need to maintain generational continuity in the primogenitor of this breed, intensive breeding work is not

applied, but rather, work is undertaken to preserve the genotype [27]. This makes the birds of this breed a valuable research material both for studies of the behaviour of hens and their physiology [29] and of the quality of the raw materials obtained [28]. Although they are not a typical commercial hybrid, their popularity is increasing due to their high adaptability to extensive rearing and also the reduced cholesterol content of their egg yolks [28]. Furthermore, due to their maintenance under conservative breeding conditions, they have become an excellent model for behavioural studies as a reference for breeds and lines undergoing intensive breeding work [29,30]. In addition, due to the qualities of the eggs obtained from them, the popularity of this breed is steadily increasing, and selection lines to be used as laying hens have already been produced.

This study aimed to investigate the effect of stocking density on certain behavioural and physiological traits in laying hens. The study assumed that stocking density could influence the behaviour of hens during the test, with hens in the low-stocking-density group expected to be more active and interested in the test environment. Additionally, higher stocking density was expected to create a more stressful environment, which would be reflected in blood parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Housing

The study was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments acting at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (no. 69/2017).

The study population included 142 birds (12 males and 132 females) of the Green-legged Partridge breed aged 45 weeks. The birds were randomly selected from four separate flocks kept in the same building, in identical zoohygienic conditions, and they were combined to make experimental flocks on the first day of the experiment. The birds were divided into three experimental groups:

- standard—kept at the standard stocking density for reproductive flocks (6 birds/m²),
- low—kept at a low stocking density (3 birds/m²)
- high—kept at a high stocking density (9 birds/m²)

For experimental purposes, the groups of birds were kept for 21 days in pens with dimensions of 2 m², 1.5 m², and 4 m², respectively (4 replications in each; the total number of experimental pens $n = 12$), equipped with automatic drinking and feeding lines. Each box was equipped with nest boxes, with each box containing 4 individual nests. The material for bedding the nests was hay. The area of the nest box was not included in the usable area of the box. There were 12 birds in each pen (1 male and 11 females; this sex ratio is typical of breeding herds). To avoid inflicting potential stress on the laying hens related to the absence of a male in the group, it was decided to leave the roosters in the experimental pens. The roosters were not assessed for physiological and behavioural parameters. The birds had continuous access to water and a fodder mix suited to their age. The birds were kept in a litter system (straw litter) with access to four individual nests per pen. The lighting scheme typical of laying hens (16 h light: 8 h darkness) was followed throughout the experiment, and the temperature was maintained at 20 °C. LED lighting was used (4000 K, intensity 80 lx).

2.2. Blood Samples

On the first day of the experiment (measurement labelled as control) and after 21 days (measurements for various stocking densities labelled as low, standard, high) of keeping the birds in experimental conditions, the corticosterone, cortisol, and testosterone levels were measured by drawing blood from the wing vein to vacuum tubes with an anticoagulant K3-EDTA (MEDLAB-PRODUCTS, Ltd., Raszyn, Poland) from 12 randomly selected laying

hens in each group (total number $n = 36$). After sampling, the tubes were placed on a hematologic stirrer and centrifuged on a laboratory centrifuge for 10 min at 3000 rpm. Next, serum was collected and taken for further analysis. The levels of testosterone [pg/mL], cortisol [pg/mL], and corticosterone [pg/mL] were measured with commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kits (ELISA kits, Qayee Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China). The calibration curve preparation and the measurement procedure were in line with the test kit producer's guidance. The analysis was performed with 10 μ L of serum, and each sample was analysed in triplicate, with the result being the mean of the three measurements. The results were read with the Biotek Synergy H1 microplate reader ((BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at the wavelength of $\lambda = 450$ nm.

2.3. Behavioural Test

Individual behavioural tests, based on that described by Kozak et al. [31], were conducted on 12 randomly selected hens for each experimental group (standard $n = 12$; low $n = 12$; high $n = 12$; total number of hens tested during individual behavioural test $n = 36$). The tests were conducted on two consecutive days (Days 21 and 22) between 8.00 a.m. and 4.00 p.m. The impact of bird immobilisation during blood drawing on a behaviour change was eliminated by the test being conducted only on birds from which samples had not been taken. Moreover, the birds' access to fodder was not limited on the test day to prevent the impact of this factor. The test pen was situated in the same building as the experimental pens. However, it was placed in an adjoining room with identical lighting and heating conditions. This prevented the birds from making eye or sound contact with other individuals during the test. Elements unknown to birds were placed along the longer walls of the test pen. They included a container that imitated a nest (A), a sandpit (B), a container with commercial fodder (C), a container with enriched fodder (commercial fodder supplemented with herbs) (D), and a drinking trough (E) (Figure 1).

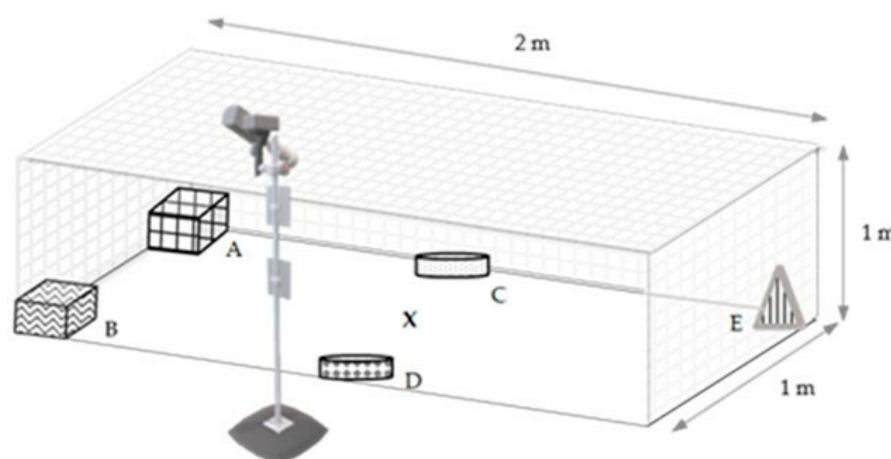


Figure 1. Experimental pen with elements and camera; A—nest imitation; B—sandpit; C—commercial fodder; D—enriched fodder; E—water trough; X—localisation of laying hens' 'start position'.

An experimenter known to the hens transferred the bird being tested directly from the experimental pen to the test one (at its central point X). After the pen was closed, the experimenter switched on the camera, exhibited a plate with the number of birds being tested (No. 1–36), and subsequently left the room. The behaviour was recorded (660 s) with a wide-angle camera (Xblitz MOVE 4K Plus, KGK Trend, Ltd., Kraków, Poland) placed behind the test pen. Due to the presence of some factors (the view of the experimenter leaving the room, the sound of footsteps, and the closing door), which could have affected

the bird's reactions, the initial section of the recording was deleted. An analysis of the recording lasting 600 s was performed in the BORIS (version 7.10.2., 2021) software, following Table 1. The observer was blind to the density group of the birds observed in a given recording.

Table 1. Behaviours assessed during the modified open field test.

Trait	Description
latency 1 [s]	Latency time to start locomotion
latency 2 [s]	Latency time to approach the random element
locomotion_t [s]	Total time spent on locomotion (laying hen takes a minimum of two steps)
locomotion_f [freq.]	Total number of repetitions of the locomotion episodes
fodder 1_t [s]	Total time spent on feed intake/staying in direct proximity of the container filled with commercial fodder
fodder 1_f [freq.]	Total number of repetitions of the feed intake/staying in direct proximity to the container filled with commercial fodder
fodder 2_t [s]	Total time spent on feed intake/staying in direct proximity to the container filled with enriched fodder
fodder 2_f [freq.]	Total number of repetitions of feed intake/staying in direct proximity to the container filled with enriched fodder
water_t [s]	Total time spent on water intake/staying in direct proximity to the watering trough
water_f [freq.]	Total number of repetitions of water intake/staying in direct proximity to the watering trough
sandpit_t [s]	Total time spent dust bathing/staying in direct proximity to the sandpit
sandpit_f [freq.]	Total number of repetitions of dust bathing/staying in direct proximity to the sandpit
nest_t [s]	Total time spent staying in the nest imitation/staying in direct proximity to the nest imitation
nest_f [freq.]	Total number of repetitions of staying in the nest imitation/staying in direct proximity to the nest imitation
o2l	The ratio of the average time spent at the elements in the test pen to the average time of locomotion

2.4. Statistics

The normality of the distribution was checked using the Shapiro–Wilk test (PROC UNIVARIATE procedure). Since the obtained data were not normally distributed, a non-parametric analysis was used as the F-approximation of the Friedman test and the associated rank-sum multiple comparison test [32]. The effects of the experimental groups (standard density, low density, high density) were analysed with PROC GLIMMIX (SAS software Statistical Analysis System, 9.4).

3. Results

3.1. The Impact of Stocking Density on Hen Behavioural Traits

The mean time [s] and frequency [freq.] of the behaviours under study that were exhibited in each group are shown in Table 2. Significant inter-group differences were shown for latency 2, locomotion_t, locomotion_f, water_t, water_f, and o2l (Table 1). The medium time and frequency of the other attributes (fodder 1_t, fodder 1_f, fodder 2_t, fodder 2_f, sandpit_t, sandpit_f, water_f, nest_t, and nest_f) accounted only for a portion part of overall activity during the test. Since the inter-group differences (Table S1) for these attributes were not significant, they are not shown in Table 3.

Table 2. Mean time in seconds and frequency [freq.] of behaviours evaluated during the behavioural test.

Trait	Density	Estimate	SE	Lower	Upper
latency 1	standard	221.94	61.83	96.14	347.74
	high	264.50	61.83	138.70	390.30
	low	156.90	61.83	31.10	282.70
latency 2	standard	349.40	59.12	229.12	469.68
	high	277.15	59.12	156.87	397.43
	low	155.23	59.12	34.95	275.51
locomotion_t	standard	33.50	15.67	1.61	65.38
	high	24.50	15.67	−7.38	56.39
	low	81.14	15.67	49.25	113.02
locomotion_f	standard	8.25	2.61	2.93	13.57
	high	7.08	2.61	1.77	12.40
	low	14.83	2.61	9.52	20.15
fodder1_t	standard	11.09	6.29	−1.71	23.90
	high	12.63	6.29	−0.18	25.43
	low	10.29	6.29	−2.51	23.09
fodder1_f	standard	1.75	1.39	−1.08	4.58
	high	2.92	1.39	0.09	5.75
	low	2.50	1.39	−0.33	5.33
fodder2_t	standard	10.54	5.59	−0.82	21.91
	high	9.08	5.59	−2.29	20.45
	low	9.17	5.59	−2.20	20.53
fodder2_f	standard	0.92	0.60	−0.31	2.14
	high	1.00	0.60	−0.23	2.23
	low	1.67	0.60	0.44	2.89
water_t	standard	13.04	6.05	0.73	25.34
	high	20.38	6.05	8.07	32.68
	low	36.58	6.05	24.27	48.88
water_f	standard	6.92	2.84	1.14	12.69
	high	10.83	2.84	5.06	16.61
	low	15.67	2.84	9.89	21.44
sandpit_t	standard	3.40	19.71	−36.71	43.51
	high	40.33	19.71	0.22	80.44
	low	4.62	19.71	−35.49	44.73
sandpit_f	standard	0.17	0.55	−0.95	1.28
	high	1.08	0.55	−0.03	2.20
	low	1.08	0.55	−0.03	2.20
nest_t	standard	1.52	2.91	−4.40	7.44
	high	4.04	2.91	−1.88	9.96
	low	5.01	2.91	−0.91	10.93
nest_f	standard	0.08	0.45	−0.84	1.00
	high	0.33	0.45	−0.59	1.25
	low	0.83	0.45	−0.09	1.75
o2l	standard	1.27	1.05	−0.90	3.43
	high	4.69	1.05	2.52	6.85
	low	1.20	0.95	−0.76	3.15

SE—standard error; lower—lower confidence interval; upper—upper confidence interval

Compared with those in the standard-stocking-density group (standard), birds in the low-density group (low) needed much more time before they started to move towards any element in the test pen ($p = 0.027$) (Table 3). The locomotion time was significantly shorter for the birds in the standard- ($p = 0.039$) and high-stocking-density ($p = 0.015$) groups than that observed in the birds in the low-stocking-density group. Moreover, birds in the latter group initiated any locomotor activity significantly more frequently ($p = 0.044$) than those

in the high-density group. Compared to the birds in the standard-density group, the birds in the low-density group drank water for a longer time, stayed close to the drinking trough more often ($p = 0.010$), and approached it more frequently ($p = 0.036$). The ratio of time spent at enriching elements to the locomotion time for birds in the high-density group was higher than that for the birds in the standard- ($p = 0.030$) and low-stocking-density ($p = 0.021$) groups.

Table 3. Estimators of differences in exhibition of selected behaviours by hens depending on the stocking density.

Trait	Density	_Density	Estimate	SE	<i>p</i>	Lower	Upper
latency 2	standard	low	194.17	83.61	0.027	24.07	364.26
locomotion_t	standard	low	−47.64	22.16	0.039	−92.73	−2.55
locomotion_t	high	low	−56.63	22.16	0.015	−101.72	−11.54
locomotion_f	high	low	−7.75	3.69	0.044	−15.27	−0.23
water_t	standard	low	−23.54	8.55	0.010	−40.94	−6.14
water_f	standard	low	−8.75	4.01	0.036	−16.92	−0.58
o2l	standard	high	−3.42	1.49	0.030	−6.48	−0.36
o2l	high	low	3.49	1.42	0.021	0.57	6.40

SE—standard error; *p*—probability value; lower—lower confidence interval; upper—upper confidence interval.

3.2. The Impact of Stocking Density on Hen Physiological Traits

The mean levels of corticosterone [pq/mL], testosterone [pq/mL], and cortisol [pq/mL] are shown in Figure 2. Significant differences were observed only for testosterone. The mean testosterone level was significantly lower in birds in all the groups ($p = 0.022$, $p = 0.023$, $p = 0.046$) compared with the control. However, no significant differences were observed between birds in the low-, high-, and standard-stocking-density groups. No significant differences were demonstrated for cortisol or corticosterone, either between different density groups (low, standard, high) or compared to the pre-experiment levels (control).

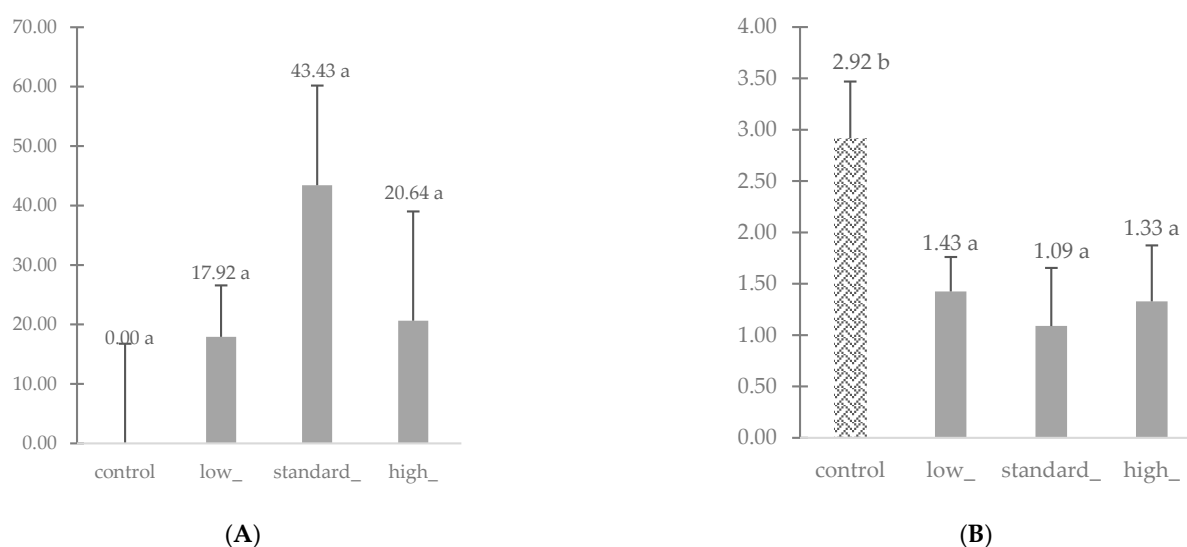


Figure 2. Cont.

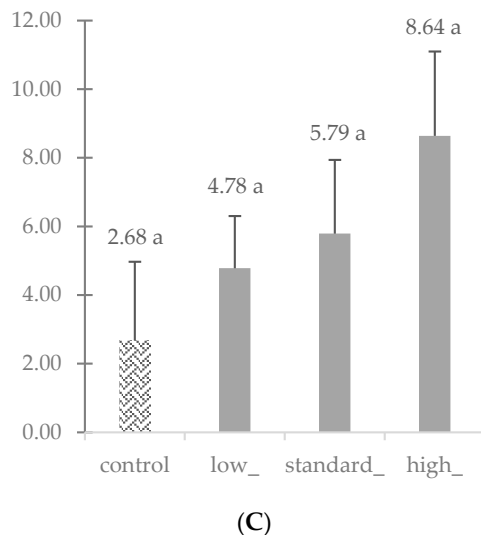


Figure 2. (A) Mean concentration (LSM + SE) of corticosterone (pg/mL), (B) testosterone (pg/mL), and (C) cortisol (pg/mL) in the hens' blood before the experiment (control) and after three weeks in various stocking density groups (low, standard, high). Means marked with different letters (a, b) differ significantly at $p < 0.05$.

4. Discussion

The current study revealed that behaviour may indicate the effect of stocking density on bird comfort. Hens are eager to explore their environment and display a wider range of behaviours when they have access to more space. However, in order to evaluate the welfare of laying hens, it is necessary to consider not only the measurement of behavioural indicators but also physiological and physical indicators. Approaches to animal welfare management are moving away from the concept of adapting the animal to its environment to the concept of adapting the environment to the animal through the planning of appropriate conditions. This is partly related to the fact that external factors are much easier to control and adjust than internal factors [4]. Continuous improvement toward the implementation of the highest standards is a key element in the optimization of animal welfare. Many factors that contribute to the welfare of laying hens affect the success of the poultry industry [16]. According to Broom's concept of animal welfare [29], when the coping capacity of the individual is exceeded, the result is poor welfare. However, this is a major oversimplification; the modern definition of welfare considers much more than just the ability to cope [4].

Corticosterone secretion increases when a bird perceives a stressor. This major glucocorticoid hormone in birds promotes changes in behaviour and metabolism that are thought to help birds to adjust to stressful situations [4–7]. Assessing an individual's perception of its emotional state requires a holistic view and ideally combines physiological and behavioural measures. Physiological indicators of arousal or stress management, such as glucocorticoid levels, can be valuable indicators of welfare [4]. The physiological response to acute or chronic stress is examined routinely by measuring the level of corticosterone [22] or cortisol as an indicator of hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activity [33], although classically, in bird studies, the parameter recorded is corticosterone. However, it is also possible to analyse cortisol levels [33,34]. Despite the fact that stocking density is considered to be one of the most stressful factors in animal production [13,14,17], this study did not reveal significant differences in cortisol or corticosterone levels. It might seem that different densities did not influence the level of stress at a given point in time, but this is not necessarily the case. It is also noteworthy that a lack of change in the levels of the examined hormones does not necessarily indicate a stress-free environment. Cockrem [7]

points out that responses to corticosterone are usually presented in as average responses of groups of birds. However, there is significant variation between individuals in the pattern of their responses to corticosterone, and individual responses to corticosterone may differ significantly from the average response of a group of birds. Our study focused on the mean levels for the group and disregarded hens' individual responses. The large standard errors for the groups in the study indicate that the values for each bird varied widely. In fact, the results might have been different if every hen had been assessed separately. Admittedly, in our study, we focused on the results for the group and did not treat the birds individually, but it is likely that the behaviour of the birds might have influenced the findings [35], so it would be beneficial to consider individual assessment for future research. If we are to strive to improve well-being, then we need to start paying attention to the individual and not just the whole group.

When it comes to assessing behavioural indicators, the expression of normal behaviour does not necessarily equate to good welfare [4]. Therefore, when assessing welfare, both physiological and behavioural measurements should be taken into account, as they will better represent the actual condition of the animal. Being social animals, laying hens live in a complex and demanding environment [7]. Because of this, hens exhibit various ways of coping with environmental changes [7,9], which are dynamic processes [4] that can be attributed to a certain extent to differences in stress hormone profiles [11,23]. Kang et al. [22] indicated that variable stocking density, the establishment of a hierarchy, and competition lead to increased corticosterone secretion. It has been suggested that testosterone is the most important hormone for preparing individuals for intense social competition. Dominant individuals, who tend to be more aggressive, are most likely to be successful in competition by better focusing attention on the target (e.g., food source). The highest levels of testosterone are found in such birds [36]. The lack of variation in the corticosterone response found here may suggest that the hens were not under stressful conditions that would require them to compete for resources. This is supported by the significant decrease in testosterone levels across all groups compared to the initial measurements taken on the first day of the experiment. Laying hens kept in small groups, as in this experiment, exhibit social behaviours similar to those of their wild ancestors, and the social organisation is stable. In stable groups, the social structure tends to stabilise to avoid the costs and risks associated with increased and constant fighting. Enabling the development and maintenance of stable connections can create a positive social environment and improve the ability to cope with new stressors [37]. It seems that the examined hens were likely to accept the leading role of the rooster and the structure of the group, which is why testosterone levels were lower than in the control group [36]. Therefore, it is worth including this aspect in future research. The hormones measured are an essential indicator to be taken into account in research on the welfare of laying hens. However, it should be emphasized that assessing welfare status requires multiple measurements over time, as this will reflect the dynamics of an individual's interaction with the environment. The number of measurements used in our study is a limitation, as it only allowed us to determine the momentary state of the animal. Nevertheless, the results are valuable as they provide an indication of urgent action being taken to improve the condition.

Behaviour is an essential indicator of an animal's welfare status, and it allows the identification of changes [4]. Many authors [10,12,13,15,23] have indicated that stressors can modify birds' behaviour as well as changing their physiological traits. The behavioural test results in hens revealed certain differences in behaviours such as locomotion or the use of environmental elements. The effect of the stocking density is rather apparent in the former. The birds in pens with both high and standard stocking densities moved less than those kept at a lower density, which also moved more frequently. Other authors have

observed similar effects [15,16,38]. Van der Eijk [38] found that living space impacts the level of activity, feeding, and comfort of birds, which is a consequence of access to free space, a better quality of litter, and the ability to walk. The presence of proper litter is one of the most important factors and integral elements in ensuring a better environment for fast and healthy growth [39]. This is of particular importance in young, developing birds [40]. One could argue that when birds live in a spacious area with low population density, they have more freedom and curiosity to explore their surroundings. Conversely, when birds are crowded together in a high-density environment, their movement is restricted, so meeting their basic needs becomes more challenging. This is why they can tend to spend less time exploring unfamiliar environments.

It seems worthwhile to include an analysis of the time spent on using elements of the environment to assess the impact of stocking density, as this can be associated with birds' general motivation. This study demonstrated an increased frequency of instances and time spent on water consumption by birds kept at a lower density than those in the standard-density group. Moreover, the ratio of the time spent at enriching elements to the locomotion time was lower in birds kept in the lowest- and standard-density pens compared to those in the high-density pen. These observations suggest that high density limits the variety of behaviours and exploration of hens. Unlike birds in the highest-density group, those in the other two groups (the standard- and the low-density groups) exhibited a greater need for movement and explored their environment more thoroughly. This may show that hens felt more confident and comfortable in these conditions. These observations suggest that high density limits the variety of behaviours and exploration of hens. Birds of various breeds can show different behavioural and physiological responses to stimuli. The fact that the hens were not seen to be interested in the elements in the test pen can indicate that the breed under study has different preferences [41]. Interestingly, the standard-density group, rather than the low-density group, needed much less time to approach any element, so, in theory, they were more willing to explore. According to the authors, such behaviour can be attributed to increased motivation caused by competing for resources, which would not necessarily indicate a positive affective state.

5. Conclusions

Our study led us to the conclusion that the behaviour observed in the study could indicate the effect of stocking density on the birds' comfort. When hens are free to move and explore their environment, they exhibit a wider range of behaviours in a new location. However, the increased activity may be due to their desire to return to an environment that satisfies their needs. Although the blood results obtained provided little support for behavioural indicators, we want to emphasise that we need to take a comprehensive approach when assessing welfare. In order to demonstrate a permanent deterioration in animal welfare, numerous measurements of behavioural, physiological, and physical indicators over a long period of time must be taken into account. It should be noted that the responses of individual birds may differ significantly from the average response of a group of birds. Therefore, the effectiveness of welfare interventions may be enhanced by knowledge of individual behavioural and physiological response norms.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani15040604/s1>, Table S1: Estimators of differences in exhibiting selected behaviours by hens depending on the stocking density.

Author Contributions: Conceptualization, K.J., K.D. and I.R.-R.; methodology, K.J. and K.D.; software, K.W.; validation, K.W. and I.R.-R.; formal analysis, K.W. and I.R.-R.; investigation, K.J. and K.D.; resources, K.D.; data curation, K.J.; writing—original draft preparation, K.J.; writing—review and

editing, K.J.; visualization, K.J.; supervision, I.R.-R.; project administration, K.J. and K.D.; funding acquisition, I.R.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments acting at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (no. 69/2017).

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Garnham, L.; Løvlie, H. Sophisticated Fowl: The Complex Behaviour and Cognitive Skills of Chickens and Red Junglefowl. *Behav. Sci.* **2018**, *8*, 13. [\[CrossRef\]](#)
- Rowell, M.K.; Pillay, N.; Rymer, T.L. Problem Solving in Animals: Proposal for an Ontogenetic Perspective. *Animals* **2021**, *11*, 866. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ohl, F.; van der Staay, J. Animal welfare: At the interface between science and society. *Vet. J.* **2012**, *192*, 13–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Arndt, S.S.; Goerlich, V.C.; van der Staay, J. A dynamic concept of animals welfare: The role of appetitive and adverse internal and external factors and the animal's ability to adapt to them. *Front. Anim. Sci.* **2022**, *3*, 908513. [\[CrossRef\]](#)
- Jain, T.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K.; Chittora, D.; Sharma, K. Adaptation. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*; Vonk, J., Shackelford, T., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019. [\[CrossRef\]](#)
- Cockrem, J.F. Corticosterone responses and personality in birds: Individual variation and the ability to cope with environmental changes due to climate change. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2013**, *190*, 156–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cockrem, J.F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. *J. Ornithol.* **2007**, *148*, 169–178. [\[CrossRef\]](#)
- Boissy, A.; Gerhard, M.; Jensen, M.B.; Moe, R.O.; Spruijt, B.; Keeling, L.J.; Winckler, C.; Forkman, B.; Dimitrov, I.; Langbein, J.; et al. Assessment of Positive Emotions in Animals to Improve Their Welfare. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 375–397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Campbell, D.L.M.; Whitten, J.M.; Slater, E.; Lee, C. Rearing enrichments differentially modified hen personality traits and reduced prediction of range use. *Anim. Behav.* **2021**, *179*, 97–109. [\[CrossRef\]](#)
- Hofmann, T.; Schmucker, S.S.; Bessei, W.; Grashorn, M.; Stefanski, V. Impact of Housing Environment on the Immune System in Chickens: A Review. *Animals* **2020**, *10*, 1138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Favati, A.; Leimar, O.; Løvlie, H. Personality Predicts Social Dominance in Male Domestic Fowl. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103535. [\[CrossRef\]](#)
- Osadcha, Y.; Pavlovych, O. Influence of Different Stocking Densities on Some Blood Parameters in Laying Hens. *Yuz. Yil Univ. J. Agric. Sci.* **2023**, *33*, 111–118. [\[CrossRef\]](#)
- Kang, S.-Y.; Ko, Y.-H.; Moon, Y.-S.; Sohn, S.-H.; Jang, I.-S. Effects of the Combined Stress Induced by Stocking Density and Feed Restriction on Hematological and Cytokine Parameters as Stress Indicators in Laying Hens. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2011**, *24*, 414–420. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, C.; Kim, J.H.; Kil, D.Y. Comparison of stress biomarkers in laying hens raised under a long-term multiple stress condition. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 101868. [\[CrossRef\]](#)
- Wan, Y.; Guan, H.; Wang, D.; Ma, R.; Qi, R.; Li, J.; Liu, W.; Li, Y.; Zhan, K. Effects of cage stocking density on the production performance, serum biochemistry, immune level, and intestinal morphology of 2 laying hen breeds. *J. Appl. Poult. Res.* **2023**, *32*, 100375. [\[CrossRef\]](#)
- Shynkaruk, T.; Long, K.; LeBlanc, C.; Schwan-Lardner, K. Impact of stocking density on the welfare and productivity of broiler chickens reared to 34 d of age. *J. Appl. Poult. Res.* **2023**, *32*, 100344. [\[CrossRef\]](#)
- Thema, K.K.; Mnisi, C.M.; Mlambo, V. Stocking density-induced changes in growth performance, blood parameters, meat quality traits, and welfare of broiler chickens reared under semi-arid subtropical conditions. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0275811. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Evans, L.; Brooks, G.C.; Anderson, M.G.; Campbell, A.M.; Jacobs, L. Environmental Complexity and Reduced Stocking Density Promote Positive Behavioral Outcomes in Broiler Chickens. *Animals* **2023**, *13*, 2074. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Carvalho, C.L.; Oliveira, C.R.; Galli, G.M.; Camargo, N.O.T.; Pereira, M.M.C.; Stefanello, T.B.; Melchior, R.; Andretta, I. Behavior of domestic chickens—insights from a narrative review. *Rev. Ciênc. Agrovet.* **2022**, *21*, 360–369. [\[CrossRef\]](#)
- Hongchao, J.; Jiang, Y.; Song, Z.; Zhao, J.; Wang, X.; Lin, H. Effect of perch type and stocking density on the behaviour and growth of broilers. *Anim. Prod. Sci.* **2014**, *54*, 930. [\[CrossRef\]](#)
- Von Eugen, K.; Nordquist, R.E.; Zeinstra, E.; Van Der Staay, F.J. Stocking Density Affects Stress and Anxious Behavior in the Laying Hen Chick During Rearing. *Animals* **2019**, *9*, 53. [\[CrossRef\]](#)

22. Kang, H.K.; Park, S.B.; Kim, S.H.; Kim, C.H. Effects of stock density on the laying performance, blood parameter, corticosterone, litter quality, gas emission and bone mineral density of laying hens in floor pens. *Poult. Sci.* **2016**, *95*, 2764–2770. [CrossRef] [PubMed]
23. Weeks, C.A.; Nicol, J. Behavioural needs, priorities and preferences of laying hens. *Worlds Poult. Sci. J.* **2006**, *62*, 296–307. [CrossRef]
24. Baugh, A.T.; Schaper, S.V.; Hau, M.; Cockrem, J.F.; de Goede, P.; van Oers, K. Corticosterone responses differ between lines of great tits (*Parus major*) selected for divergent personalities. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *175*, 488–494. [CrossRef] [PubMed]
25. Campbell, D.L.M.; Dickson, E.J.; Lee, C. Application of open field, tonic immobility, and attention bias tests to hens with different ranging patterns. *PeerJ* **2019**, *7*, e8122. [CrossRef] [PubMed]
26. Meehan, C.L.; Mench, J.A. The challenge of challenge: Can problem solving opportunities enhance animal welfare? *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2007**, *102*, 246–261. [CrossRef]
27. Programy Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich. Available online: <https://bioroznorodnosc.izoo.krakow.pl/drob> (accessed on 19 December 2024).
28. Kasperek, K.; Drabik, K.; Zięba, G.; Batkowska, J. The quality of eggs derived from Polbar and Green partridge hens— Polish conservative breeds. *Acta Sci. Pol. Zootech.* **2023**, *22*, 53–62. [CrossRef]
29. Kasperek, K.; Jaworska-Adamu, J.; Krawczyk, A.; Rycerz, K.; Buszewicz, G.; Przygodzka, D.; Wójcik, G.; Blicharska, E.; Drabik, K.; Czech, A.; et al. Investigation of structural and neurobiochemical differences in brains from high-performance and native hen breeds. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 224. [CrossRef] [PubMed]
30. Kozak, A.; Kasperek, K.; Zięba, G.; Rozempolska-Rucińska, I. Variability of laying hen behaviour depending on the breed. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* **2019**, *32*, 1062–1068. [CrossRef] [PubMed]
31. Kozak, A.; Kasperek, K.; Zięba, G.; Rozempolska-Rucińska, I. Potential of application of a modified open-field test for selection of laying hens. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2019**, *37*, 333–343.
32. Ipe, D. Performing the Friedman Test and the Associated Multiple Comparison Test Using PROC GLM. In Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference, Dallas, TX, USA, 8–11 February 1987; SAS Institute: Cary, NC, USA, 1987.
33. Broom, D.M. Animal welfare: Concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* **1991**, *69*, 4167–4175. [CrossRef] [PubMed]
34. Ramankevich, A.; Wengerska, K.; Rokicka, K.; Drabik, K.; Kasperek, K.; Ziemiańska, A.; Batkowska, J. Environmental Enrichment as Part of the Improvement of the Welfare of Japanese Quails. *Animals* **2022**, *12*, 1963. [CrossRef] [PubMed]
35. Kolakshyapati, M.; Taylor, P.S.; Hamlin, A.; Sibanda, T.Z.; Vilela, J.d.S.; Ruhnke, I. Frequent Visits to an Outdoor Range and Lower Areas of an Aviary System Is Related to Curiosity in Commercial Free-Range Laying Hens. *Animals* **2020**, *10*, 1706. [CrossRef]
36. Queiroz, S.; Cromberg, V. Aggressive behavior in the genus *Gallus* sp. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* **2006**, *8*, 1–14. [CrossRef]
37. Carvalho, R.R.; Palme, R.; Da Silva Vasconcellos, A. An integrated analysis of social stress in laying hens: The interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. *Behav. Process.* **2018**, *149*, 43–51. [CrossRef]
38. Van Der Eijk, J.A.J.; Gunnink, H.; Melis, S.; Van Riel, J.W.; De Jong, I.C. Reducing stocking density benefits behaviour of fast- and slower-growing broilers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2022**, *257*, 105754. [CrossRef]
39. Farghly, M.F.A.; Mahrose, K.M.; Cooper, R.G.; Metwally, K.A.; Abougabal, M.S.; El-Ratel, I.T. Use of available crop by-products as alternative bedding materials to wheat straw for rearing broilers. *Animal* **2021**, *15*, 100260. [CrossRef]
40. De Jong, I.C.; Schokker, D.; Gunnink, H.; Van Wijhe, M.; Rebel, J.M.J. Early life environment affects behavior, welfare, gut microbiome composition, and diversity in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 977359. [CrossRef] [PubMed]
41. Rozempolska-Rucińska, I.; Czech, A.; Kasperek, K.; Zięba, G.; Ziemiańska, A. Behaviour and stress in three breeds of laying hens kept in the same environment. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2020**, *50*, 272–280. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Personality profile of laying hens as a selection criterion trait

✉ KAMILA JANICKA, ✉ IWONA ROZEMPOLSKA-RUCIŃSKA, ✉ GRZEGORZ ZIĘBA

Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

Received 11.06.2024

Accepted 05.07.2024

Janicka K., Rozempolska-Rucińska I., Zięba G.

Personality profile of laying hens as a selection criterion trait

Summary

The aim of the study was to assess whether the personality profile of laying hens can be a selection criterion. The analyses involved two breeds: Rhode Island White (RIW) and Rhode Island Red (RIR), reared in individual cages. The behavioural profile of three generations of birds comprising 1333 RIW hens and 3180 RIR hens was determined with the use of the novel object test (NOT). The following behaviours were recorded: escape, avoidance-approach, immobility, and approach. Based on its reactions, the birds were assigned to: proactive or reactive profile groups. The genetic parameters of the behavioural profile and the phenotypic and genetic dependency between the behavioural profile and the performance traits were estimated. It was found that estimates of the heritability coefficient for the behavioural profile can be a good predictor of effective selection and modification of birds' behaviour at the additive level. Proactive birds (intense behavioural response and being able to make decisions) seem to represent the desirable personality type in farm conditions. The genetic correlations between the personality profile and the performance traits also seem to confirm that the proactive birds should be the preferable type.

Keywords: behavioural profile, genetic correlations, heritability, poultry

The level of stress and the welfare of laying hens are important issues in science and practice related to the poultry industry. This is associated not only with the growing consumer awareness of the impact of stress on the organism and the consequent welfare of animals but also with its effect on the economic aspect of production (45).

It is well known that intensive selection targeted at increasing the performance value poses many problems and reduces the welfare of birds (11). Importantly, the performance traits of laying hens are genetically correlated with personality traits, e.g. fearfulness, curiosity, or aggressiveness (35, 37). Breeding work aimed solely at enhancement of performance traits may lead to modification of behaviour through indirect selection. Unfortunately, behavioural changes are highly unfavourable in many cases (11, 31). Our previous research has shown that the level of genetic variability in fearfulness- or curiosity-related behaviours may allow selection targeted at modification of hens' behaviour. However, our results did not solve the problem of assessment of hens' personality and the possibility of using this indicator for breeding. The use of the proposed "pecking" or "no pecking" indicator (35, 37)

in the selection process facilitates observations during tests and ensures an appropriate level of additive variability allowing the selection criterion to be modified. Concurrently, this indicator is highly correlated with other reactions: positively with curiosity-related behaviours and negatively with fear-indicating behaviours. However, as shown in other studies, excessive curiosity and motivation may lead to an intensification of undesirable behaviours of laying hens, e.g. pterophagy (3, 14, 17). Therefore, selection targeted at increasing the level of curiosity may improve the welfare of birds through reduction of their fearfulness on the one hand, but may also lead to an increase in aggressiveness and/or emergence of pterophagy on the other hand (39). Furthermore, in a poor farm environment, curiosity may expose birds to stress if they cannot satisfy their natural need to explore the surroundings (20, 24, 33, 39). This prompted the need to search for indicators of birds' personality that could be used in the selection model. Such indicators must meet appropriate criteria. The most important element is the appropriate level of genetic variability, as it determines the effectiveness of breeding. The next step should consist in assessment of the relationship between a selected personality trait

and performance traits so that the breeding model could place appropriate emphasis on traits that constitute the selection criterion. A final and equally important criterion is the ease of measurement of the trait. Birds are kept in individual cages on breeding farms, which is a prerequisite for the assessment of the performance and additive value. Hence, the possibility of using various behavioural tests to assess birds' personality is highly limited, but the novel object test (NOT) can definitely be employed (35, 37).

At this point, the emphasis on the high importance of development of an appropriate behavioural indicator that could be included in the selection criterion should be explained. Currently, many activities are being undertaken to improve the welfare of farm animals. However, most of these activities are focused on changes in breeding conditions, e.g. the introduction of environmental enrichments. Such solutions are undoubtedly necessary, but research has shown differences in the environmental requirements between species, breeds, and individual animals (20, 33, 34). It is impossible to adapt the breeding environment so that it can ensure the welfare of each individual; additionally, the potential modifications are limited by economic considerations. Nevertheless, an attempt can be made to select individuals with personality traits matching the breeding conditions. Already in the 1990s, scientists postulated genetic selection and additive-level changes in hens' behaviour as one of the useful tools (9, 19, 25). These solutions would help to adjust the birds' temperament to the breeding conditions through reduction of excessive fear and aggression, thereby ensuring a low level of stress (19). This seems to be simple, but there are still problems with the practical application. First, the use of genetic selection tools is only possible after reliable identification of the temperament and emotional profile of hens (15, 19, 35, 41). Second, as already mentioned, the assessment of birds' personality on breeding farms is highly limited. Therefore, the inclusion of personality in the model of assessment of the additive value of animals is still an open question. The best possible solutions that will ultimately improve the welfare of laying hens are still to be discovered.

Certainly, the use of only one behavioural test for assessment does not fully determine birds' personality, which comprises consistent profiles of behavioural reactions to a number of stimuli (8). Therefore, it will be appropriate to use the term "personality profile" to imply that the test does not definitively define the personality of the hen, but indicates a trend in its personality.

Given the possible behavioural reactions of laying hens in the NOT assessment shown in our previous research (35, 37), the present study was focused on determination of the "personality profile", as in the study conducted by Cockrem (8), where proactive

and reactive personalities related to the level of stress were distinguished. Birds with proactive personality were characterized by relatively active behavioural responses and relatively low levels of corticosterone responses to stress, whereas birds with reactive personality exhibited passive behavioural responses and high levels of corticosterone responses (8).

The aim of the study was to answer the question whether the personality profile of laying hens can be a selection criterion for birds. Another question was whether the heritability coefficient in the case of the proactive/reactive profile will be high enough to expect further behavioural changes in hens and whether there are genetic links between the personality profile and the performance of laying hens that may influence the direction of selection.

Material and methods

Animals and housing. The analyses involved two hen breeds: Rhode Island White (RIW) and Rhode Island Red (RIR) kept in separate cages. The birds were kept in an artificially lit windowless building equipped with a mechanical ventilation system. The cages were equipped with drip drinkers and a mechanical feed distribution system. The birds were subject to standard veterinary surveillance. The farm keepers carried out individual control of performance traits, i.e. body weight in the 18th week of age of the laying hens, the age of sexual maturity of the birds recorded at the time of laying the first egg (MA), average egg weight from the weekly collection in the 34th (EW34) and 54th (EW54) week of age, the initial laying rate, i.e. the number of eggs laid during the first 15 weeks of laying (IP), non-destructive assessment of shell thickness (ST), laying performance, i.e. the number of eggs laid during 54 weeks (BL), and the number of hatched chicks (HC). The performance data used in the analyses were taken from the farm documentation and were not determined in this experiment. The analyses were based on information on the performance of 5 generations comprising 22,258 individuals of the RIR line and 10,531 of the RIW line. The mating system employed on the farm minimised the degree of relatedness between the birds. The maximum inbreeding of subsequent generations was estimated at 15% and involved only 0.18% of the entire population, while 99.5% of the birds exhibited inbreeding that did not exceed 5%.

Behavioural test. The novel object test (NOT) was performed every four cages to prevent hens kept in the adjacent cages from becoming familiar with the object beforehand. The behavioural test was conducted in three consecutive generations, and the behaviour of 4513 birds in total, i.e. 1333 Rhode Island White birds and 3180 Rhode Island Red hens, was assessed. Only female birds were included in the experiment, and the difference in the numbers between the lines was associated with the number of birds kept on the farm, where the RIR is the maternal lineage and the RIW is the paternal lineage.

In the NOT trial, an innovative method for data recording and collection was employed with the use of an electronic recorder equipped with:

– an object required to carry out the NOT experiment: a rod with a colourful, shiny tip, which was shown to the birds as a novel object. The rod had an additional blockage that ensured the same distance at which the object was introduced into each cage, i.e. 1 cm from the cage wall. Thus, the test was standardised and there were no differences that could have exerted an impact on hens' reactions.

– an HD42 barcode scanner, which facilitated immediate identification of the examined object based on individual bird barcodes placed on the cages.

The behaviour was recorded in real time during the Novel Object Test (NOT). The behaviour of the birds was assessed in a binary system, where 0 meant the absence of the reaction and 1 denoted the presence of the reaction. Such reactions as escape, avoidance-approach (no decision), immobility, and approach were recorded. The technical device used in the experiment allowed very quick assessment of birds' behaviour.

The test lasted 30 seconds, during which the experimenter observed the hen's behaviour and entered a specific number assigned to a specific sequence of behaviour on the device's keyboard. The duration of the specific behaviour exhibited by the bird was recorded as well. After the test, the data were transferred to the computer database; they did not require further processing and were directly used for statistical analyses. The test was always performed by the same person. Frequency of behaviour, assessment system, and classification according to the personality profile (PP) are presented in Table 1.

The classification into proactive and reactive birds was based on the information provided by Cockrem (8). Birds exhibiting quick specific reactions, irrespective of whether they involved an escape or an approach, were regarded as proactive in the initial assessment. Hens that were unable to respond to the object actively were defined as reactive.

Statistics. Models for estimation of variance and covariance were developed based on the significance of the fixed environmental effects, which were first verified using general linear models for fixed models (procedure GLIMMIX) in SAS 9.4 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Mean comparisons were performed using the LSMEANS statement with the Tukey-Kramer adjustment for all significant effects. Factors included in the mathematical models are presented in Table 2.

Tab. 1. Frequency of behaviour, assessment system, and classification according to the personality profile (PP)

Reaction	Behaviour during the test	PP	Frequency	
			RIR	RIW
Escape	The bird escapes from the object, moves to the opposite end of the cage, tries to leave the cage, and shows an active attitude signalling the desire to escape from the object	Proactive	46.95	31.21
Approach	The bird shows interest and approaches the object, touches the object with its beak, or observes the object at a very close distance		9.20	13.68
No decision	The bird stays in one place and does not move clearly in any direction or changes its body position relative to the object, turning sometimes towards and sometimes away from the object, but does not make any specific decision	Reactive	8.64	9.96
Immobility	The bird does not move and remains at the same distance and in the same direction to the object as at the time of noticing the object		35.21	45.15

Tab. 2. Factors in the calculation models for the analysed traits

Factor	Trait	Type ²	Performance traits: BW, MA, ST, EW	HC	IP, BL	Behavioural reaction ¹	Personality profile ³
Year of hatching × subsequent set	F		x		x	x	x
Year of reproduction	F			x		x	x
Number of laid eggs	C			x			
Number of inspection days	C				x		
Additive effect of the individual	A		x	x	x	x	x

Explanations: ¹behavioural reaction: escape, approach, immobility, no decision; ²type: A – random, linked to the relationship matrix, F – fixed, C – regression; ³personality profile: proactive, reactive; performance traits: BW – body weight, MA – the age of sexual maturity of the birds recorded at the time of laying the first egg, ST – non-destructive assessment of shell thickness, EW – average egg weight, HC – the number of hatched chicks, IP – initial laying performance, BL – breeding laying

The pedigree was 6 generations deep (including 5 generations of laying performance recording and 3 generations of behaviour recording). The estimation of the (co)variance components of the behavioural traits was performed with the GIBBSF90+ software from the BLUPF90 package (27, 40), which accounted for the discrete character of the behavioural profile denotation. Three hundred thousand samples were obtained, with 100,000 discarded as burn-in, following the graphical inspection using POSTGIBBSf90 of the posterior chain and the inspection of the effective sample size of the parameter of interest.

Results and discussion

The genetic parameters of the personality profile ranged from 0.23 to 0.29 and were analogous in both breeds, while the heritability of the individual reactions, which serves as the basis for the classification of the birds to a specific profile, ranged from 0.1 to 0.23 in RIR and from 0.12 to 0.31 in RIW. Although the heritability estimates for the personality profile and the specific behavioural responses did not differ significantly, the standard errors were lower for the profile than those estimated for the specific responses. The genetic variability of the behavioural responses differed between the breeds. In the case of the RIR breed, the highest level of genetic variability was found for the escape reaction (0.23 ± 0.07) and the lowest level was estimated for the no-decision behaviour

Tab. 3. Heritability coefficients (h^2) and standard error (SE) of the personality profile (PP) and behavioural reactions in the RIR breed

PP	h^2	SE	Reaction	h^2	SE
Reactive	0.24	0.03	No decision	0.10	0.08
			Immobility	0.11	0.06
Proactive	0.29	0.03	Approach	0.17	0.09
			Escape	0.23	0.07

(0.10 ± 0.08). In turn, the opposite was found in the RIW breed, where the highest genetic variability was estimated for the no-decision reaction (0.31 ± 0.13) and the lowest value was estimated for the escape reaction (0.12 ± 0.07) (Tab. 3, 4).

The genetic correlations between the personality profile and the performance traits of the laying hens (Tab. 5) turned out to be different in both breeds. In the RIR breed, the genetic correlation was high, with a relatively low standard error between the profile and the initial egg laying rate. It was negative for birds assessed as reactive (-0.547 ± 0.096) and positive for those identified as proactive (0.519 ± 0.059). Relationships between the bird profile and the egg laying rate were found in the RIW breed as well. The genetic correlations between the initial laying rate and the laying performance in the proactive profile were $0.505 (\pm 0.138)$ and $0.494 (\pm 0.142)$, respectively. Noteworthy in the RIR breed was the correlation between the personality profile and the egg weight determined at weeks 33 and 54, which was 0.227 ± 0.088 and 0.277 ± 0.099 , respectively, in the group of the reactive birds and -0.183 ± 0.086 and -0.203 ± 0.090 in the case of the proactive hens. A high positive correlation between birds' behaviour and the egg weight was noted in the RIW breed. However, these correlations were positive in the groups of both the proactive and reactive birds (Tab. 5). The analysis of the genetic correlations between the birds' profile and their performance traits revealed relationships between reproduction traits, expressed by the number of hatched

Tab. 4. Heritability coefficients (h^2) and standard error (SE) of the personality profile (PP) and behavioural reactions in the RIW breed

PP	h^2	SE	Reaction	h^2	SE
Reactive	0.23	0.03	No decision	0.31	0.13
			Immobility	0.13	0.06
Proactive	0.29	0.04	Approach	0.21	0.10
			Escape	0.12	0.07

chicks, in the RIW breed. A decrease in hatchability was observed in the hens with the reactive profile ($r_g = -0.373 \pm 0.154$), whereas the value of the parameter was expected to increase in the group of the proactive birds ($r_g = 0.242 \pm 0.092$).

The estimated genetic correlations between the personality profiles (reactive-proactive) showed high negative relationships, i.e. $-0.930 (\pm 0.026)$ in the RIR breed and $-0.533 (\pm 0.080)$ in the RIW breed.

The level of the performance traits depending on the personality profile was assessed in the present study (Tab. 6, 7). There was no dependency between the phenotypic level of the traits and the profile of the hens.

The present results indicate that the personality profile of birds is largely determined by additive effects. Genetic variability substantially exceeding 20% of the total phenotypic variability has undoubtedly been proved as a suitable parameter to be included in the selection criterion. The effectiveness of selection targeted at traits with a lower heritability coefficient, e.g. reproduction traits, has been demonstrated (36, 38). Simultaneously, the genetic variability of the proactive/reactive profile was found to be higher than in the case of assessment of single reactions (Tab. 3, 4). However, the question arises which type of hens' personality should be preferred in cage breeding. It has been suggested that proactive animals are likely to be more successful in unchanging environments than those with reactive personality (2, 6, 7, 13). Conversely, the more cautious style of reactive animals may ensure greater success in a changing environment; therefore, there is

Tab. 5. Genetic correlations (r_g) and standard errors (se) between the personality profile and the performance traits in the RIR and RIW breeds

Trait	Breed		RIR				RIW			
			Reactive		Proactive		Reactive		Proactive	
			r_g	se	r_g	se	r_g	se	r_g	se
Body weight [g]			-0.107	0.096	0.141	0.074	-0.007	0.155	0.133	0.083
Sexual maturity [days]			0.181	0.086	-0.177	0.091	-0.011	0.138	-0.097	0.111
Initial laying rate [%]			-0.547	0.096	0.519	0.059	-0.157	0.237	0.505	0.138
Egg weight 34 [g]			0.227	0.088	-0.183	0.086	0.376	0.061	0.487	0.061
Shell thickness [mm]			0.079	0.094	-0.058	0.103	-0.398	0.103	0.050	0.105
Breeding laying [pcs.]			-0.129	0.124	0.257	0.122	-0.121	0.237	0.494	0.142
Egg weight 54 [g]			0.277	0.099	-0.203	0.090	0.297	0.064	0.437	0.065
Number of hatched chicks [%]			-0.024	0.151	-0.108	0.106	-0.373	0.154	0.242	0.092

no optimal personality that would be suitable to all circumstances. As suggested by Cockrem (6), proactive birds may in general be more successful in unchanging or predictable conditions, whereas birds with reactive personality will be more successful in variable or unpredictable conditions. Hence, it may be proposed that birds with the proactive personality type exhib-

Tab. 6. Estimates of differences in the level of performance traits depending on the personality profile of the RIR hens

Trait	PP	Estimate	StdErr	Estimate	StdErr	Probt	Lower	Upper
Body weight [g]	proactive	1381.39	5.50	5.48	7.03	0.436	-8.32	19.27
	reactive	1375.91	4.39					
Sexual maturity [days]	proactive	149.97	0.45	0.32	0.58	0.581	-0.81	1.45
	reactive	149.66	0.36					
Initial laying rate [%]	proactive	121.24	0.44	0.34	0.57	0.549	-0.77	1.46
	reactive	120.89	0.35					
Egg weight 34 [g]	proactive	59.99	0.15	-0.26	0.19	0.166	-0.64	0.11
	reactive	60.25	0.12					
Shell thickness [mm]	proactive	397.53	1.30	-0.67	1.67	0.688	-3.94	2.60
	reactive	398.20	1.04					
Breeding laying [pcs.]	proactive	225.47	0.71	-0.22	0.91	0.813	-2.00	1.57
	reactive	225.69	0.57					
Egg weight 54 [g]	proactive	61.96	0.19	-0.14	0.24	0.549	-0.61	0.33
	reactive	62.11	0.15					
Number of hatched chicks [%]	proactive	20.55	0.30	-0.51	0.39	0.194	-1.27	0.26
	reactive	21.05	0.24					

Tab. 7. Estimates of differences in the level of performance traits depending on the personality profile (PP) of the RIW hens

Trait	PP	Estimate	StdErr	Estimate	StdErr	Probt	Lower	Upper
Body weight [g]	proactive	1492.81	5.24	-14.28	7.86	0.069	-29.70	1.14
	reactive	1507.09	5.86					
Sexual maturity [days]	proactive	147.89	0.43	0.73	0.64	0.258	-0.53	1.99
	reactive	147.17	0.48					
Initial laying rate [%]	proactive	124.01	0.42	-0.70	0.64	0.273	-1.94	0.55
	reactive	124.71	0.47					
Egg weight 34 [g]	proactive	61.40	0.14	0.58	0.21	0.006	0.17	1.00
	reactive	60.81	0.16					
Shell thickness [mm]	proactive	382.49	1.25	-3.58	1.87	0.056	-7.25	0.09
	reactive	386.07	1.40					
Laying performance [pcs.]	proactive	222.37	0.68	-0.09	1.02	0.929	-2.09	1.91
	reactive	222.46	0.76					
Egg weight 54 [g]	proactive	63.97	0.18	0.63	0.26	0.017	0.11	1.14
	reactive	63.34	0.20					
Number of hatched chicks [%]	proactive	20.57	0.29	0.07	0.44	0.874	-0.79	0.93
	reactive	20.50	0.33					

iting definite reactions, regardless of whether they escape or approach the object, should be preferred for cage breeding. As reported by other researchers (2, 6), birds with such a personality have a reduced level of stress, which is highly important in breeding laying hens. The reduced level of stress in birds that approach and explore a novel object seems to be unquestionable, especially given the observations and research carried out in the 1960s and 1970s, showing that animals that are able to prioritize satisfying their curiosity and exploring new stimuli experience positive emotions related to self-reward and secretion of dopamine, i.e.

a neurotransmitter with an important role in the feeling of pleasure (18, 32, 44).

In the present study, hens that escaped from the novel object were assigned to the group of proactive birds. This classification and the assumption that these birds may have a lower level of stress than reactive hens might be challenged at this point. Nevertheless, they were included in the proactive group because they exhibited definite and quick reactions, which is in agreement with the definition proposed by Cockrem (6). The author does not claim that these reactions must be associated with positive emotions; hence, it can be assumed that birds showing any immediate definite reaction will be assigned to the proactive group. Based on relevant knowledge and research results reported by other authors, it may be suggested that the escaping hens had a lower level of stress than the reactive birds, even though they may have experienced negative emotions, unlike the approaching birds. The escape reaction allows the animal to control the environment; therefore, it is a stress-reducing factor (18) and does not necessarily increase the level of stress hormones. Noteworthy, animal's reactions indicating

fear emotions are not clear indicators of the activation of the HPA axis (8).

Birds that were classified as reactive in the present study were unable to make a decision. Their reactions indicate a conflict of motivation ('approach-escape') and, possibly, acquired helplessness, strong fear blocking the ability to react, or the inability to assess the situation and make a decision (lack of movement and immobility). The theory that hens exhibiting motivational conflict may experience severe stress is supported by the results of our previous research, which showed that the 'approach-escape' response was highly

genetically correlated positively with the escape reactions and negatively with the approach responses (35). Thus, two opposing emotional systems are stimulated in the absence of a specific decision (5), which may induce severe stress (23).

Immobility in hens experiencing intense fear is one of the survival strategies (2, 29). This response has been shown by other researchers as an indication of very strong stress in animals (26, 29). Similarly, the inability to make decisions together with the inability to evaluate stimuli as threatening or not is associated with increased stress indicators (4).

The genetic correlations between the performance traits and the birds' profile were analysed in this study as well. These correlations varied not only in the strength but also in the direction of the relationships, depending on the breed. This may probably be related to the maternal lineage of the RIR hens and the paternal lineage of the RIW birds, which indicates varied selection pressure on individual traits. The differences in the correlations may result from indirect selection, hence the frequently different directions of the correlations in both breeds. The values obtained in this study indicate that, when the personality profile serves as a selection criterion, the relationships between traits in each generation should be estimated in order to adjust the selection model properly. The assessment of the correlation estimates highlighted the relationships between hatchability and the profile of the RIW hens. Reproduction traits are characterised by low heritability (1, 43), and stress is undoubtedly a factor that disturbs reproduction in various animal species (12, 22). In the present study, the reactive profile was correlated negatively with the number of hatched chicks and positively with the proactive profile. Importantly, these relationships were only found in the RIW breed, as with its white plumage, it is more excitable than colourfully feathered RIR hens (16, 30, 42).

Our previous research showed negative genetic correlations between the performance of hens and the temperament of hens classified as fearful (37). It was suggested that hens should be assessed for fearfulness in order to eliminate birds with such reactions not only due to the potential reduction of their breeding value in terms of their performance traits but also due to the probably higher level of stress in such birds (35). However, as suggested by other authors (10, 14), selection towards increased curiosity and reduced fear may lead to aggression and enhanced pterophagy. Selection based on the personality profile may be more beneficial. The direction of the genetic correlations indicates that the choice of proactive birds may contribute to the maintenance of an appropriate level of performance traits and an increase in the breeding value of hens in the case of such parameters as hatchability or the number of eggs. Concurrently, the high negative correlations between the reactive and proactive profiles

may facilitate selection towards the proactive profile. The high negative correlation coefficients indicate that the behavioural responses are associated with two different neurohormonal circuits (15).

The present study showed no correlations between the phenotypic level of performance traits and the personality profile. This may be extremely important for the assessment of the welfare of laying hens. One of the arguments proving high levels of animals' welfare is the high performance value (28). However, the present results may indicate that performance does not have to be an indicator of welfare. Regardless of their personality profile, the hens did not differ in terms of performance. The level of stress in each of the profiles was not analysed in the present study; nevertheless, based on research results reported by other authors, there are no grounds to believe that different behavioural reactions in the same environment are associated with different levels of stress (21, 33). Performance-based assessment of welfare may be appropriate in species that have been kept for several years. However, hens are kept on breeding farms for only a year and are simultaneously subject to the very intensive years-long selection towards a high level of performance traits. Therefore, birds can maintain a high level of performance even when their personality is associated with elevated stress. This issue should be further investigated, as the argument of the high performance value, often presented by breeders as an indicator of birds' welfare, may turn out to be a false assumption.

To sum up, it can be concluded that the NOT method distinguishes hens with reactive and proactive personality profiles. The profile heritability coefficient is a good predictor for effective selection aimed at modification of birds' behaviour at the additive level. It seems that proactive birds showing strong behavioural reactions and being able to make decisions in accordance with their motivation should be the desirable personality type in farm conditions. The genetic correlations between the personality profile and performance traits also seem to confirm that proactive birds should be preferred for breeding. However, it should be taken into account that the genetic links between these traits may depend on the direction of selection. Assessment of the level of stress hormones in proactive and reactive birds in a specific farm environment is advisable, as it may confirm the appropriateness of the selection towards the desirable proactive profile. Based on available data, it can only be assumed that proactive hens experience lower levels of stress. Importantly, regardless of the differences in the behaviour of proactive/reactive hens, the performance value of these birds does not change, which may easily lead to erroneous conclusions that the personality of birds is not an important trait in terms of breeding and is not associated with the level of stress.

References

- Almeida T. P., Kern E. L., Daltro D. D. S., Braccini Neto J., McManus C., Thaler Neto A., Cobuci J. A.: Genetic associations between reproductive and linear-type traits of Holstein cows in Brazil. *Rev. Bras. Zootecn.* 2017, 46, 91-98, doi: 10.1590/s1806-92902017000200002.
- Brown A. A., Sobotik E. B., House G. M., Nelson J. R., Archer G. S.: Differences in fear response strategy and stress susceptibility amongst four different commercial layer strains reared cage free. *Front. Physiol.* 2022, 13, 943471, doi: 10.3389/fphys.2022.943471.
- Brunberg E., Jensen P., Isaksson A., Keeling L.: Feather pecking behavior in laying hens: Hypothalamic gene expression in birds performing and receiving pecks. *Poult. Sci.* 2011, 90, 1145-1152, doi: 10.3382/ps.2010-00961.
- Budaev S., Jørgensen C., Mangel M., Eliassen S., Giske J.: Decision-making from the animal perspective: Bridging ecology and subjective cognition. *Front. Ecol. Evol.* 2019, 7, 164, doi: 10.3389/fevo.2019.00164.
- Choi E. A., Jean-Richard-Dit-Bressel P., Clifford C. W. G., McNally G. P.: Paraventricular thalamus controls behavior during motivational conflict. *J. Neurosci.* 2019, 39, 4945-4958, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2480-18.2019.
- Cockrem J. F.: Conservation and behavioral neuroendocrinology. *Horm. Behav.* 2005, 48, 492-501, doi: 10.1016/j.yhbeh.2005.03.008.
- Cockrem J. F.: Corticosterone responses and personality in birds: Individual variation and the ability to cope with environmental changes due to climate change. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013, 190, 156-163, doi: 10.1016/j.ygcen.2013.02.021.
- Cockrem J. F.: Stress, corticosterone responses and avian personalities. *J. Ornithol.* 2007, 148, 169-178, doi: 10.1007/s10336-007-0175-8.
- Craig J. V., Swanson J. C.: Review: welfare perspectives on hens kept for egg production. *Poult. Sci.* 1994, 73, 921-938, doi: 10.3382/ps.0730921.
- D'Eath R., Conington J., Lawrence A., Olsson I., Sandøe P.: Breeding for behavioural change in farm animals: practical, economic and ethical considerations. *Anim. Welf.* 2010, 19, 17-27, doi: 10.1017/S0967278600002207.
- Dudde A., Krause E. T., Matthews L. R., Schrader L.: More than eggs – relationship between productivity and learning in laying hens. *Front. Psychol.* 2018, 9, 2000, doi: 10.3389/fpsyg.2018.02000.
- Ericsson M., Fallahsharoudi A., Bergquist J., Kushnir M. M., Jensen P.: Domestication effects on behavioural and hormonal responses to acute stress in chickens. *Physiol. Behav.* 2014, 133, 161-169, doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.024.
- Favati A., Leimar O., Løvlie H.: Personality predicts social dominance in male domestic fowl. *PLoS ONE* 2014, 9, e103535, doi: 10.1371/journal.pone.0103535.
- Flock D. K., Norman L.: Criteria for the competitiveness of different management systems and strain differences in the adaptability of layer hens to non-cage environments. *Proc. 16th Baltic and Finnish Poultry Conference, Vantaa, Finland. World's Poultry Science Association, Finland Branch, Jokioinen, Finland* 2008.
- Forkman B., Boissy A., Meunier-Salatin M.-C., Canali E., Jones R. B.: A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* 2007, 92, 340-374, doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.016.
- Fraisse F., Cockrem J. F.: Corticosterone and the measurement of stress and fear in cage housed laying chickens. *Br. Poult. Sci.* 2006, 47, 1-10.
- Hierden Y. M. van, van Korte S. M., Ruesink E. W., van Reenen C. G., Engel B., Korte-Bouws G. A. H., Koolhaus J. M., Blokhuis H. J.: Adrenocortical reactivity and central serotonin and dopamine turnover in young chicks from a high and low feather-pecking line of laying hens. *Physiol. Behav.* 2002, 75, 653-659, doi: 10.1016/S0031-9384(02)00667-4.
- Inglis I.: Review: The central role of uncertainty reduction in determining behaviour. *Behaviour* 2000, 137, 1567-1599, doi: 10.1163/156853900502727.
- Jones R. B.: Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives. *World's Poult. Sci. J.* 1996, 52, 131-174, doi: 10.1079/WPS19960013.
- Kozak A., Kasperek K., Zięba G., Rozempolska-Rucińska I.: Potential of application of a modified open-field test for selection of laying hens. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2019, 37 (4), 333-343.
- Marino L.: Thinking chickens: A review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken. *Anim. Cogn.* 2017, 20, 127-147, doi: 10.1007/s10071-016-1064-4.
- Marle-Köster E. van, van Visser C.: Unintended consequences of selection for increased production on the health and welfare of livestock. *Arch. Anim. Breed.* 2021, 64, 177-185, doi: 10.5194/aab-64-177-2021.
- Meehan C. L., Mench J. A.: The challenge of challenge: can problem solving opportunities enhance animal welfare? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2007, 102, 246-261, doi: 10.1016/j.applanim.2006.05.031.
- Mellor D.: Positive animal welfare states and encouraging environment-focused and animal-to-animal interactive behaviours. *N. Z. Vet. J.* 2015, 63, 9-16, doi: 10.1080/00480169.2014.926800.
- Mench J. A.: The welfare of poultry in modern production systems. *Poult. Sci. Rev.* 1992, 4, 107-128.
- Miller K. A., Garner J. P., Mench J. A.: Is fearfulness a trait that can be measured with behavioural tests? A Validation of Four Fear Tests for Japanese Quail. *Anim. Behav.* 2006, 71, 1323-1334, doi: 10.1016/j.anbehav.2005.08.018.
- Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D. H.: BLUPF90 and related programs (BGF90), [in:] 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France 2002.
- Muir W. M., Cheng H. W.: Genetic influences on the behavior of chickens associated with welfare and productivity, [in:] *Genetics and the Behavior of Domestic Animals*. Elsevier 2014, 317-359.
- Nelson J. R., Settler P., Berger E., Wolc A., O'Sullivan N., Archer G. S.: Brown and white egg-layer strain differences in fearfulness and stress measures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2020, 231, 105087, doi: 10.1016/j.applanim.2020.105087.
- Nie C., Ban L., Ning Z., Qu L.: Feather colour affects the aggressive behaviour of chickens with the same genotype on the dominant white (I) Locus. *PLoS ONE* 2019, 14, e0215921, doi: 10.1371/journal.pone.0215921.
- Nordquist R. E., Heerkens J. L. T., Rodenburg T. B., Boks S., Ellen E. D., van Der Staay F. J.: Laying hens selected for low mortality: Behaviour in tests of fearfulness, anxiety and cognition. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011, 131, 110-122, doi: 10.1016/j.applanim.2011.02.008.
- Panksepp J.: Affective consciousness: core emotional feelings in animals and humans. *Conscious. Cogn.* 2005, 14, 30-80, doi: 10.1016/j.concog.2004.10.004.
- Rozempolska-Rucińska I., Czech A., Kasperek K., Zięba G., Ziemiańska A.: Behaviour and stress in three breeds of laying hens kept in the same environment. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 2020, 50, 272-280, doi: 10.4314/sajas.v50i2.10.
- Rozempolska-Rucińska I., Kasperek K., Drabik K., Zięba G., Ziemiańska A.: Behavioural variability in chicks vs. the pattern of behaviour in adult hens. *Animals* 2020, 10, 269, doi: 10.3390/ani10020269.
- Rozempolska-Rucińska I., Kibala L., Prochniak T., Zieba G., Łukaszewicz M.: Genetics of the novel object test outcome in laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 193, 73-76, doi: 10.1016/j.applanim.2017.03.012.
- Rozempolska-Rucińska I., Twardowska M., Zięba G., Łukaszewicz M., Witkowski A.: Our knowledge of hens' reproductive breeding value is limited upon selecting birds for flock reproduction. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2008, 26, 79-84.
- Rozempolska-Rucińska I., Zięba G., Kibala L., Próchniak T., Łukaszewicz M.: Genetic correlations between behavioural responses and performance traits in laying hens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2017, 30, 1674-1678, doi: 10.5713/ajas.16.0436.
- Rozempolska-Rucińska I., Zięba G., Łukaszewicz M.: Hatchability traits as selection criteria in breeding of laying hens. *Arch. Geflügelkd.* 2009, 73, 263-267.
- Taylor P. S., Campbell D. L. M., Jurecky E., Devine N., Lee C., Hemsworth P. H.: Novelty during rearing increased inquisitive exploration but was not related to early ranging behavior of Laying Hens. *Front. Anim. Sci.* 2023, 4, 1128792, doi: 10.3389/fanim.2023.1128792.
- Tsuruta S., Misztal I.: THRGIBBSIF90 for estimation of variance components with threshold and linear models, [in:] 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006.
- Uitdehaag K., Komen H., Rodenburg T. B., Kemp B., van Arendonk J.: The novel object test as predictor of feather damage in cage-housed Rhode Island Red and White Leghorn laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2009, 109, 292-305, doi: 10.1016/j.applanim.2007.03.008.
- Uitdehaag K. A., Rodenburg T. B., Komen H., Kemp B., van Arendonk J. A. M.: The association of response to a novel object with subsequent performance and feather damage in adult, cage-housed, pure-bred Rhode Island Red laying hens. *Poult. Sci.* 2008, 87, 2486-2492.
- Wen C., Mai C., Cai R., Gou Q., Zhang B., Li J., Sun C., Yang N.: Inheritance of the duration of fertility in chickens and its correlation with laying performance. *Genet. Sel. Evol.* 2022, 54, 41, doi: 10.1186/s12711-022-00733-7.
- Wood-Gush D. G. M., Vestergaard K.: The seeking of novelty and its relation to play. *Anim. Behav.* 1991, 42, 599-606, doi: 10.1016/S0003-3472(05)80243-X.
- Zimmerman P. H., Buijs S. A. F., Bolhuis J. E., Keeling L. J.: Behaviour of domestic fowl in anticipation of positive and negative stimuli. *Anim. Behav.* 2011, 81, 569-577, doi: 10.1016/j.anbehav.2010.11.028.

First and corresponding author: Kamila Janicka, MSc, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; e-mail: kamila.janicka@up.lublin.pl

Oświadczenia współautorów

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

mgr inż. Kamila Janicka
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 606798531
kamila.janicka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(1) Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

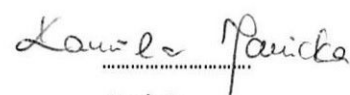
Mój udział wynosił 50 % i polegał na merytorycznym opracowaniu koncepcji pracy, założeń metodycznych, przeprowadzeniu badań, opisie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu rycin i wizualizacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, redakcji publikacji, korespondencji z redakcją i korekcie pracy po recenzjach.

(2) Kamila Janicka, Kamil Drabik, Karolina Wengerska, Iwona Rozempolska-Rucińska (2025) Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. Animals 15, 604.

Mój udział wynosił 80 % i polegał na merytorycznym opracowaniu koncepcji pracy, założeń metodycznych, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań, przygotowaniu bazy danych, opisie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu rycin i wizualizacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, redakcji publikacji, korespondencji z redakcją, korekcie pracy po recenzjach.

(3) Kamila Janicka, Iwona Rozempolska-Rucińska, Grzegorz Zięba (2024) Personality profile of laying hens as a selection criterion trait. Med. Weter. 80(12), 645-651.

Mój udział wynosił 80 % i polegał na merytorycznym opracowaniu koncepcji pracy, założeń metodycznych, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań, udziale w analizie statystycznej, opisie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu rycin i wizualizacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, redakcji publikacji, korespondencji z redakcją, korekcie pracy po recenzjach.


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

prof. dr hab. Iwona Rozempolska-
Rucińska
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 603478574
iwona.rucinska@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(1) Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 15 % i polegał na nadzorze merytorycznym w opracowaniu koncepcji i założeń metodologicznych.

(2) Kamila Janicka, Kamil Drabik, Karolina Wengerska, Iwona Rozempolska-Rucińska (2025) Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. Animals 15, 604.

Mój udział wynosił 10 % i polegał na nadzorze merytorycznym w opracowaniu koncepcji i założeń metodologicznych.

(3) Kamila Janicka, Iwona Rozempolska-Rucińska, Grzegorz Zięba (2024) Personality profile of laying hens as a selection criterion trait. Med. Weter. 80(12), 645-651.

Mój udział wynosił 10 % i polegał na nadzorze merytorycznym w opracowaniu koncepcji i założeń metodologicznych.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

prof. dr hab. Grzegorz Zięba
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456845
grzegorz.zieba@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

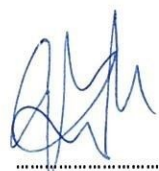
Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(1) Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na udziale w wykonaniu analizy statystycznej.

(2) Kamila Janicka, Iwona Rozempolska-Rucińska, Grzegorz Zięba (2024) Personality profile of laying hens as a selection criterion trait. Med. Weter. 80(12), 645-651.

Mój udział wynosił 10 % i polegał na udziale w wykonaniu analizy statystycznej oraz pomocy w interpretacji wyników.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

prof. dr hab. Anna Czech
Katedra Biochemii i Toksykologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456746
anna.czech@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.



.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

prof. dr hab. Bożena Nowakowicz-
Dębek
Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń
Środowiska
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456998
bozena.nowakowicz@up.lublin.pl

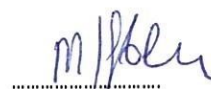
**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

dr hab. Łukasz Wlazło, prof. uczelni
Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń
Środowiska
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456998
lukasz.wlazlo@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

dr hab. inż. Kornel Kasperek
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456759
kornel.kasperek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

dr inż. Agnieszka Ziemiańska
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 504505885
agnieszka.ziemiańska@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.


Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

dr inż. Kamil Drabik
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456739
kamil.drabik@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

(1) Iwona Rozempolska-Rucińska, Kamila Janicka, Agnieszka Ziemiańska, Kornel Kasperek, Kamil Drabik, Bożena Nowakowicz-Dębek, Łukasz Wlazło, Anna Czech, Grzegorz Zięba (2023) Does social position affect well-being in laying hens? Journal of Animal and Feed Science (JAFS) 32(3) 280-288.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.

(2) Kamila Janicka, Kamil Drabik, Karolina Wengerska, Iwona Rozempolska-Rucińska (2025) Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. Animals 15, 604.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 5.05.2025 r.

mgr inż. Karolina Wengerska
Instytut Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950
Tel.: 814456739
karolina.wengerska@up.lublin.pl

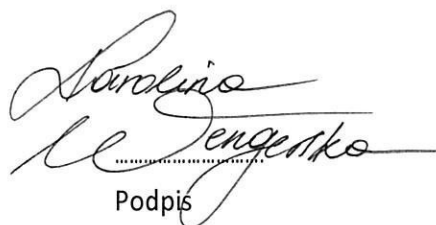
**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kamila Janicka, Kamil Drabik, Karolina Wengerska, Iwona Rozempolska-Rucińska (2025) Effect of Stocking Density on Behavioural and Physiological Traits of Laying Hens. Animals 15, 604.

Mój udział wynosił 5 % i polegał na pomocy w przeprowadzeniu badań.



Podpis