

Instrukcja doradcza

nr 5/RK/2021

Sztuczny rozród lina *Tinca tinca* (L.)

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”;
ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

Instrukcja doradcza

Sztuczny rozród lina *Tinca tinca* (L.)

Autorzy:

dr inż. Sławomir Krejszeff

prof. dr hab. inż. Zdzisław Zakęś

dr inż. Maciej Rożyński

mgr inż. Marek Hopko

Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza
w Olsztynie

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”;
ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

Spis treści

1. Wstęp	4
2. Pozyskiwanie tarlaków	8
3. Warunki przetrzymywania tarlaków	8
4. Anestezja	10
5. Rozród	12
5.1. Ocena stadium dojrzałości oocytów	12
5.2. Stymulacja owulacji i spermacji	17
5.3. Pozyskiwane gamet	19
5.4. Zapłodnienie i pozbawianie jaj kleistości	22
6. Inkubacja jaj i klucie zarodków	24
7. Literatura	28

1. Wstęp



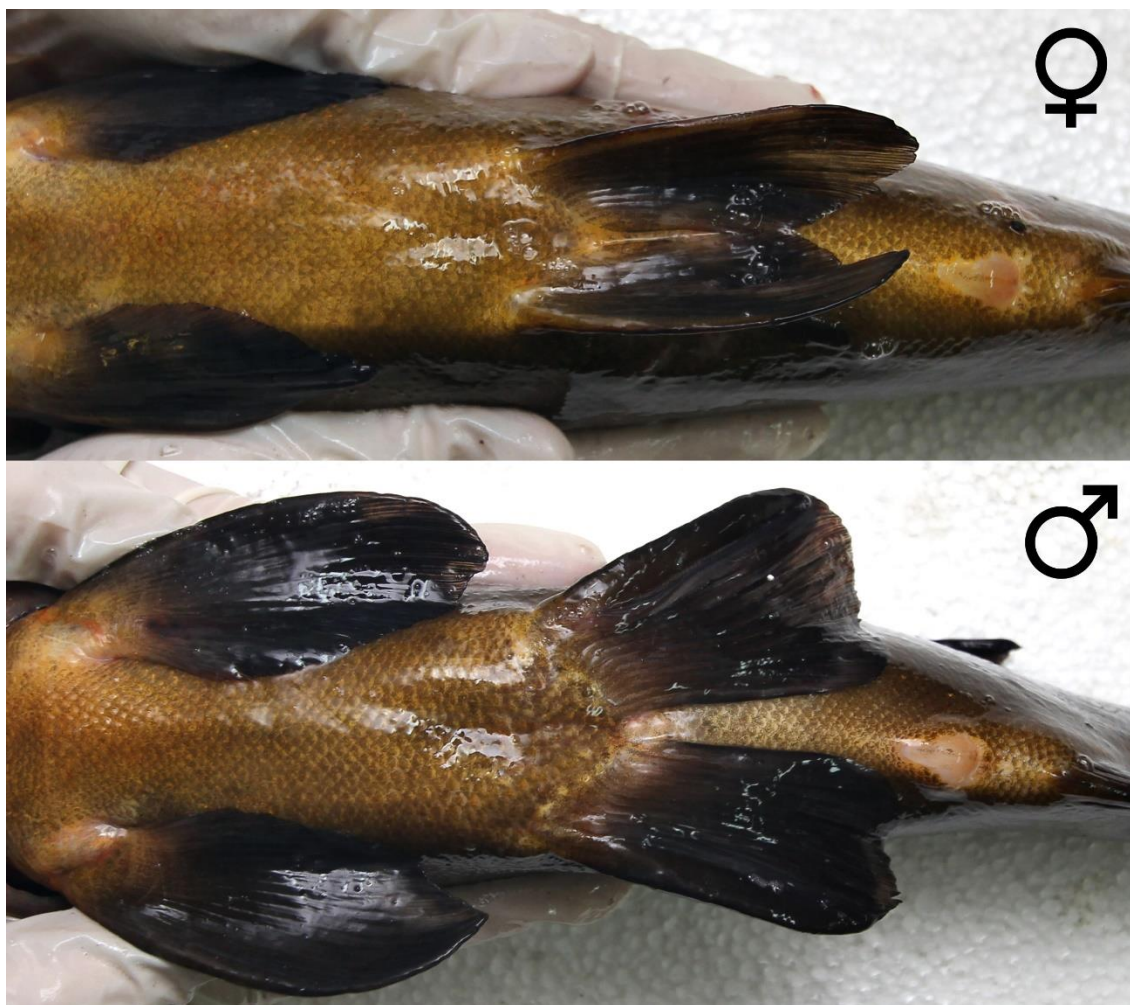
Fot. 1. Portret lina (fot. D. Żarski).

Lin *Tinka tinkka* (L.) (fot. 1) bytuje w wodach śródlądowych prawie całej Europy, z wyjątkiem wód Islandii. Brak także lina w zlewisku mórz arktycznych oraz w wąskim pasie zachodniego wybrzeża Europy i Półwyspu Bałkańskiego. W Azji sięga do środkowego biegu rzek Ob, Irtysz i Jenisej. Występuje także w jeziorze Bajkał. Na południu zasięg jego występowania dochodzi do Kaukazu i Azji Mniejszej. Nie występuje w Azji Centralnej i na Krymie. Ze względu na dużą plastyczność w stosunku do warunków środowiska i znaczenie gospodarcze, aklimatyzowany jest w różnych częściach świata już od XIX wieku (Brylińska, Bryliński 2000).

Lin to gatunek, u którego występuje wyraźna różnica między samcami i samicami. Zaznacza się ona szczególnie w długości płetw brzusznych oraz grubości ich promieni. U samców płetwy brzuszne są dłuższe, sięgają poza otwór odbytowy prawie do płetwy analnej. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej bardzo wyraźnie grubieje drugi nieczłonowy

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

promień. Również płetwy piersiowe są dłuższe u samców i sięgają prawie płetw brzusznych. Płetwy piersiowe samic sięgają zaledwie połowy odległości między nasadą płetw piersiowych i brzusznych, a płetwy brzuszne nie dochodzą do otworu odbytowego (Brylińska, Bryliński 2000) (fot. 2).



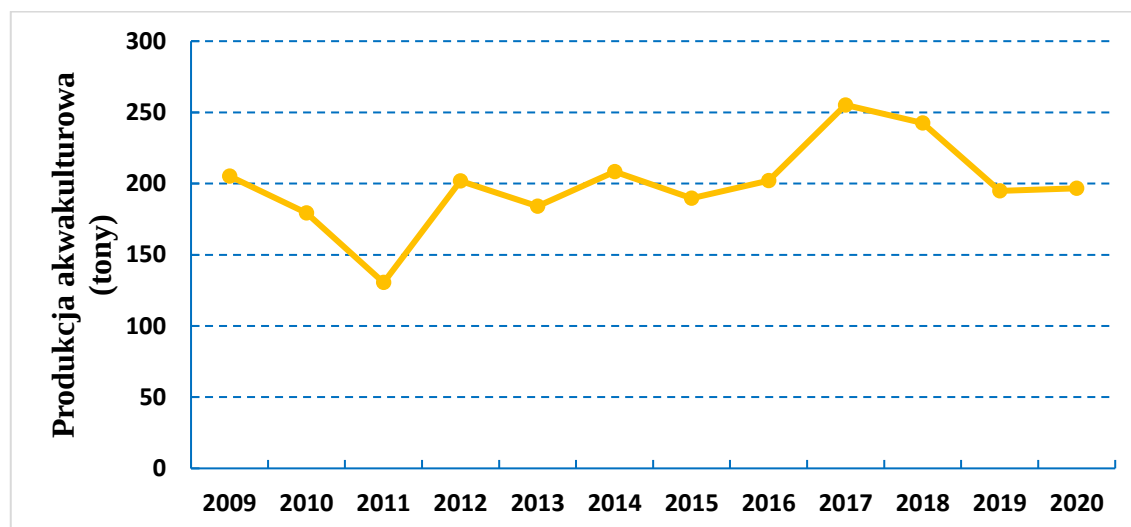
Fot. 2. Dymorfizm płciowy u dorosłych osobników lina (fot. S. Kejszeff).

Mięso lina cenione jest ze względu na smak i delikatność. Według amatorów dań z ryb, lin w śmietanie to poezja kulinarna, ponieważ żadna ryba nie pasuje tak do sosu śmietanowego jak właśnie lin (www.szwaderki.pl). Dlatego w wielu mazurskich

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

restauracjach i smażalniach ryb stanowi jedno z firmowych dań (www.ryby-mikolajki.pl).

Lin jest gatunkiem hodowanym w stawach ziemnych typu karpiego w wielu krajach Europy (Gela i in. 2006). Jest też obiektem połowów gospodarczych na całym areale jego występowania (www.fao.org/fishery/en/home). W Polsce stanowi jeden z ponad 29 hodowanych z przeznaczeniem do konsumpcji oraz odławianych gospodarczo gatunków ryb słodkowodnych (Lirski i Myszkowski 2021, Wołos i in. 2021). Poziom produkcji akwakulturowej lina w okresie ostatnich odnotowanych w statystykach prowadzonych przez Instytut Rybactwa Śródlądowego 11 lat (2009-2020) utrzymuje się na podobnym poziomie oscylując w granicach 200 ton rocznie (Lirski, Wałowski. 2011 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021) (Rys 1.).

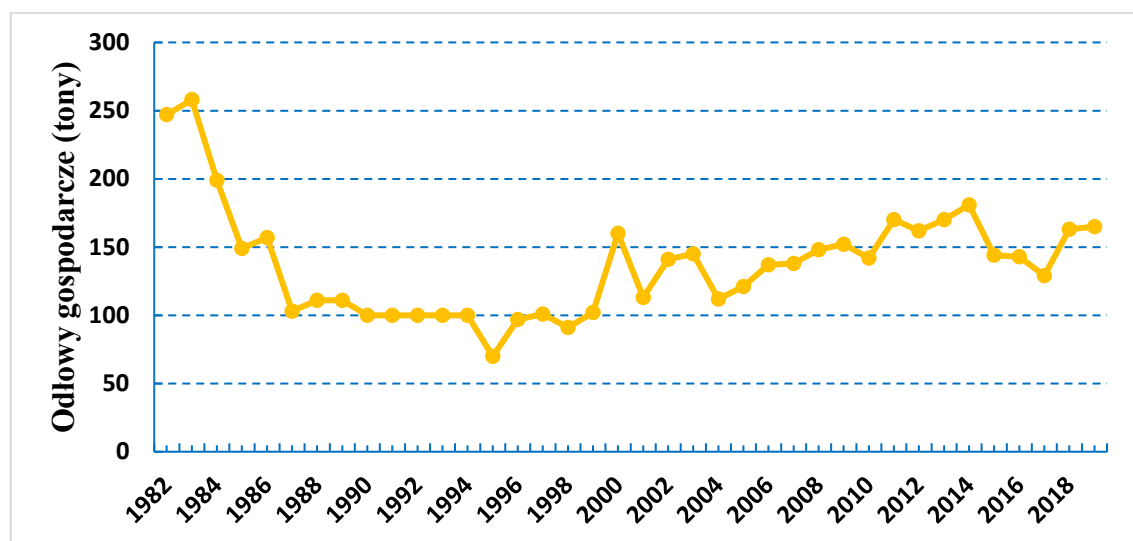


Rys. 1. Wielkość produkcji akwakulturowej lina w latach 2009-2020 (Lirski, Wałowski. 2011 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021).

Poziom gospodarczych odłowów odnotowanych w statystykach FAO w latach 1982-2019 (www.fao.org/fishery/en/home) jest na nieco niższym poziomie ze średnią około 138 ton rocznie (rys. 2). Należy jednak podczas analizy danych dotyczących odłowów zwrócić uwagę na dynamikę zmian ilości odławianych ryb. W okresie od 1982 do 1987 roku obserwowany jest gwałtowny spadek odłowów, z 247 do 103 ton rocznie.

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

Następnie w latach 1987-1999 obserwowana jest stagnacja z średnimi odłowami na poziomie 99 ton rocznie. Po tym okresie ilość pozyskiwanego z wód otwartych lina zaczyna powoli wzrastać ze 102 ton w 1999 roku do 165 ton w roku 2019.



Rys. 2. Odłowy gospodarcze lina w latach 1982-2018 (www.fao.org/fishery/en/home).

Jednym z powodów polepszającej się kondycji dziko żyjących populacji lina jest prowadzenie racjonalnej gospodarki rybackiej opartej na zarybieniach. Materiał zarybieniowy tego gatunku w głównej mierze produkowany jest przez gospodarstwa stawowe typu karpiego, a chów prowadzony jest w polikulturze z karpem. Zazwyczaj materiał zarybieniowy lina w postaci narybku jesienno, narybku wiosennego (po przezimowaniu) krocza i tarlaków pochodzi z tarła naturalnego, co w konsekwencji powoduje, że produkcja jest mało przewidywalna. Dlatego coraz więcej gospodarstw stawowych przechodzi na rozród w warunkach kontrolowanych z wykorzystaniem wspomaganie hormonalnego.

Prace nad kontrolowanym rozrodem lina rozpoczęto w latach 70-tych ubiegłego wieku (Linhart i Billard 1995). Ich efektem było opracowanie protokołów uwzględniających zastosowanie różnych środków hormonalnych, np. odwodnionej w acetonie i zhomogenizowanej w płynie fizjologicznym przysadki mózgowej karpia lub preparatów zawierających analogi gonadoliberyny w połączeniu lub bez, z antagonistami

dopaminy (Kobarelin, Ovopel) (Linhart i Billard 1995, Kucharczyk i in. 2007, Targońska i in. 2012). Ich implementacja w gospodarstwach rybackich może mieć istotny wpływ na zwiększenie efektywności tarła lina, a w konsekwencji wzrost ilości produkowanego materiału zarybieniowego i obsadowego, w tym przypadku wylęgu żerującego i narybku letniego.

Niniejsza instrukcja stanowi kompilację dostępnej wiedzy na temat kontrolowanego rozrodu lina z wykorzystaniem wspomaganie hormonalnego. Zarówno tej zawartej w periodykach naukowych jak własnego doświadczenia autorów i gospodarstw prowadzących produkcję materiału zarybieniowego tego gatunku.

2. Pozyskiwanie tarlaków

Tarlaki lina można pozyskiwać z hodowli stawowych oraz zbiorników naturalnych. Z hodowli stawowych reproductory najlepiej jest pozyskiwać wiosną podczas odłowu zimochowów, czyli na przełomie marca i kwietnia. Odłowione tarlaki należy przenieść do stawów tarlakowych przeznaczonych wyłącznie dla lina. Jeśli istnieje taka możliwość samce i samice należy przetrzymywać oddzielnie w zagęszczeniu 400 kg/ha. W okresie przedtarłowym ryby należy karmić paszą sztuczną. Dzienna dawka paszy powinna wynosić do 5% biomasy tarlaków (Gela i in. 2006).

Ze środowiska naturalnego tarlaki lina można pozyskiwać, za wyjątkiem zimy, przez cały rok. Jednak najlepsze efekty uzyskuje się, gdy ryby pozyskiwane są w trakcie naturalnego tarła. Ryby złowione przed sezonem rozrodczym należy przetrzymać do tarła w stawie ziemnym, podobnie jak tarlaki odłowione z zimochowu. Ryby pozyskane w trakcie sezonu tarłowego należy przewieźć bezpośrednio do wylęgarni i w ciągu 2-3 dni rozpocząć procedurę rozrodu (Kucharczyk i in. 2007, Targońska i in. 2012). W celu ograniczenia okaleczeń zewnętrznych powłok ciała do połowu ryb ze środowiska naturalnego najlepiej używać jest narzędzi pułapkowych lub elektrycznych.

3. Warunki przetrzymywania tarlaków

Tarlaki lina po przetransportowaniu na wylęgarnię powinny być przetrzymywane w recykulacyjnych systemach akwakulturowych (w skrócie RAS) wyposażonych w

minimum 3 baseny tarlakowe o pojemności minimum 0,5 m³. Po jednym na samce i samice oraz jeden na ryby po tarle. Oprócz tego system powinien być wyposażony w termoregulator, pompę obiegową zapewniającą minimum jednokrotną wymianę wody w każdym basenie tarlakovym oraz oświetlenie podłączone do sterownika fotoperiodu.

Kluczową rolę podczas kontrolowanego rozrodu ryb odgrywa reżim termiczny. W przypadku lina, temperatura wody podczas przetrzymywania tarlaków w wylęgarni będzie się wahać w od 18 do 24 °C. Dlatego musi istnieć możliwość utrzymania temperatury wody w w/w zakresie. W celu ograniczenia ilości parującej wody należy również ogrzewać pomieszczenie wylęgarni.

Kluczową rolę podczas kontrolowanego rozrodu ryb odgrywa też utrzymanie odpowiedniego poziomu tlenu rozpuszczonego w wodzie. Minimum na poziomie 80% nasycenia. Przy tak wysokich temperaturach będzie to wymagało dostarczenia go ze źródła zewnętrznego. Razem z powietrzem tłoczonym przez dmuchawę lub w czystej postaci, tj. podawanego z butli z tlenem lub z generatora tlenu.

Oprócz tego należy pamiętać, że ryby w wyniku procesów metabolicznych wydzielają do wody amoniak, który w formie niezdysocjowanej jest toksyczny. Dlatego trzeba dokonywać częściowej podmiany wody krążącej w RAS tarlakovym. Najlepiej w trybie ciągłym, tj. jednocześnie dolewając świeżą i odprowadzając krążącą w RAS wodę. Zalecana ilość powinna oscylować w granicach 10-30% całkowitej objętości wody w basenach tarlakovych na dobę, przy obsadzie ryb nie przekraczającej 30 kg/m³.

Prawidłowo skonstruowany RAS rozrodowy przeznaczony dla lina powinien funkcjonować w następujący sposób. Zmagazynowana w górnym zbiorniku retencyjnym woda jest podawana grawitacyjnie na baseny rozrodowe. Wielkość przepływu wody przez pojedynczy basen rozrodowy jest regulowana za pomocą zaworu zamontowanego na wlocie do basenu. Poziom wody w każdym basenie może być regulowany za pomocą teleskopowego systemu regulacji poziomu i odprowadzania wody, który służy również do całkowitego opróżnienia basenu z wody. Opuszczająca baseny rozrodowe woda jest grawitacyjnie odprowadzana do dolnego zbiornika retencyjnego, z którego jest tłoczona do górnego zbiornika retencyjnego przepływając przez instalację UV i cykl obiegu wody rozpoczyna się od nowa.

Pomieszczenie wylęgarni, w którym znajduje się RAS rozrodowy powinno być wyposażone w stół manipulacyjny, wodoszczelną wagę laboratoryjną o zakresie ważenia minimum do 3 kg i precyzji ważenia 0,01 g (pomiaru masy tarlaków i robienie naważek odczynników chemicznych), zlew i lodówkę. Oprócz tego pomieszczenie powinno być dodatkowo wyposażone w pojemniki o pojemności minimum 30 l, np. kaski budowlane (do wprowadzania i wybudzania ryb ze stanu znieczulenia ogólnego), zestaw misek (do pozyskiwania, zapłodnienia i pozbawiania kleistości jaj), wiaderka o pojemności 5-10 l (do sporządzania płynu Woynarovicha i roztworu taniny), dzbanki z miarką o pojemności 1-2 l (do odmierzania niewielkich ilości płynu Woynarovicha, roztworu taniny i wody w trakcie zapłodnienia i pozbawiania kleistości jaj), ręczniki tetrowe (do osuszania powłok ciała ryb) i plastikowe łyżki (do przeprowadzania manipulacji podczas zapłodnienia i pozbawiania kleistości jaj).

4. Anestezja

Wszystkie manipulacje na tarlakach lina, tj. pobieranie oocytów za pomocą katetera, przeprowadzenie iniekcji hormonalnych, pozyskiwanie gamet, dezynfekcję ran, pomiary masy ciała, znakowanie należy prowadzić po uprzednim wprowadzeniu ryb w stan znieczulenia ogólnego Gomułka i Antychowicz 1999, Gomułka 2008). Anestetyk najlepiej jest podawać przez imersję (w kąpieli). W tym celu ryby należy umieścić w wodzie z rozpuszczonym preparatem i przetrzymać do czasu osiągnięcia znieczulenia ogólnego.

Przebieg znieczulenia ogólnego będzie zależał od gatunku i wieku ryby, temperatury wody, rodzaju użytego preparatu i właściwości fizykochemicznych wody wykorzystywanej do przeprowadzenia kąpieli w roztworze anestetyku (Gomułka i Antychowicz 1999, Hamackowa i in. 2004). Zazwyczaj jest podobny jak przy zastosowaniu preparatu Propanidid u pstręga tęczowego (Siwicki 1984), gdzie można wyróżnić cztery etapy znieczulenia ogólnego, tj. uspokojenie, stadium podniecenia, znieczulenie ogólne (płytkie i pełne) oraz stadium duszenia się. W stadium uspokojenia ryby wykazują niewielką ruchliwość oraz spowolnione ruchy wieczka skrzelowego (fot. 3a). Stadium podniecenia charakteryzują się niepokojem, przyspieszonymi ruchami

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

wentylacyjnymi i gwałtownymi ruchami obronnymi (fot. 3b). W stadium płytkiego znieczulenia ogólnego ryby początkowo pływają przechylając się na bok, następnie przestają się przemieszczać, nie wykazują ruchów obronnych i reakcji na klucie. Ruchy oddechowe są w tym stadium powolne i regularne (fot. 3c). W stadium pełnego znieczulenia ogólnego ryby leżą na dnie zbiornika, pojawiają się drgania gałek ocznych, ruchy oddechowe są nadal regularne (fot. 3d). Faza duszenia objawia się nieregularnymi, zamierającymi ruchami oddechowymi, brakiem odruchu akustycznego (np. odruch na uderzenie w ścianę zbiornika).



Fot. 3. Tarlaki lina podczas kąpieli w roztworze anestetyku (a, b, c) oraz w stanie znieczulenia ogólnego, przygotowane do przeprowadzenia iniekcji hormonalnej (d).

Przed przystąpieniem do przeprowadzania manipulacji danej partii ryb zaleca się przeprowadzenie testu. Podczas określania stężenia preparatu należy postępować zgodnie z wytycznymi, według których efektywne stężenie to takie, w którym w stan znieczulenia ogólnego tarlaki są wprowadzane w czasie do 3 minut oraz wybudzają się z

niego, po 15 minutowej ekspozycji, w czasie nie dłuższym niż 10 minut. Dodatkowym kryterium jest brak śmiertelności wywołanej przeprowadzoną manipulacją (Gilderhus 1990).

Podczas rozrodu lina zaleca się stosowanie preparatów produkowanych na bazie estru metylosulfonowego kwasu 3-aminobenzoowego (MS-222, TMS), np. Finquel. Należy go stosować w stężeniu 0,10-0,15 g substancji czynnej na 1 litr wody. Po przeprowadzeniu manipulacji ryby należy umieścić w odpijalniku wyposażonym w system napowietrzania lub natleniania wody i po wybudzeniu oraz odzyskaniu równowagi przenieść je z powrotem do basenu rozrodowego.

5. Rozród

5.1. Ocena stadium dojrzałości oocytów

Przygotowania do akcji tarłowej należy rozpocząć po ustaniu chłódów występujących w okresie tzw. Zimnych Ogrodników i Zimnej Zośki (https://pl.wikipedia.org/wiki/Zimni_ogrodnicy), czyli pod koniec drugiej połowy maja. Wtedy to, gdy średnia dobową temperatura wody w stawie z tarlakami osiągnie 18,0°C należy dokonać pierwszego przeglądu ryb. W tym celu trzeba wyłowić kilka samic i poddać je ocenie stadium dojrzałości oocytów.

Przed rozpoczęciem poboru oocytów należy przygotować płyn Serra (96% alkohol etylowy, 36-38% formaldehyd i lodowatego kwasu octowego, w proporcji 6:3:1 v/v), roztwór anestetyku i odpijalnik. Następnie wprowadzone w stan znieczulenia ogólnego samice, po jednym osobniku, należy umieszczać na stole manipulacyjnym i za pomocą wprowadzonego w otwór płciowy katetera (zalecany model, to kateter do karmienia niemowląt o średnicy zewnętrznej 2,8 mm) pobrać niewielką próbkę oocytów (około 50 sztuk) (fot. 4). Pobrane oocyty należy niezwłocznie umieścić na szalce Petriego, zalać płynem Serra i odstawić na bok (fot. 5,6). Po pobraniu próbek od 4-5 samic należy przystąpić do oceny stadium dojrzałości z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego (fot. 7, 8) według powszechnie stosowanego u ryb karpiowatych czterostopniowego systemu oceny dojrzałości oocytów.

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

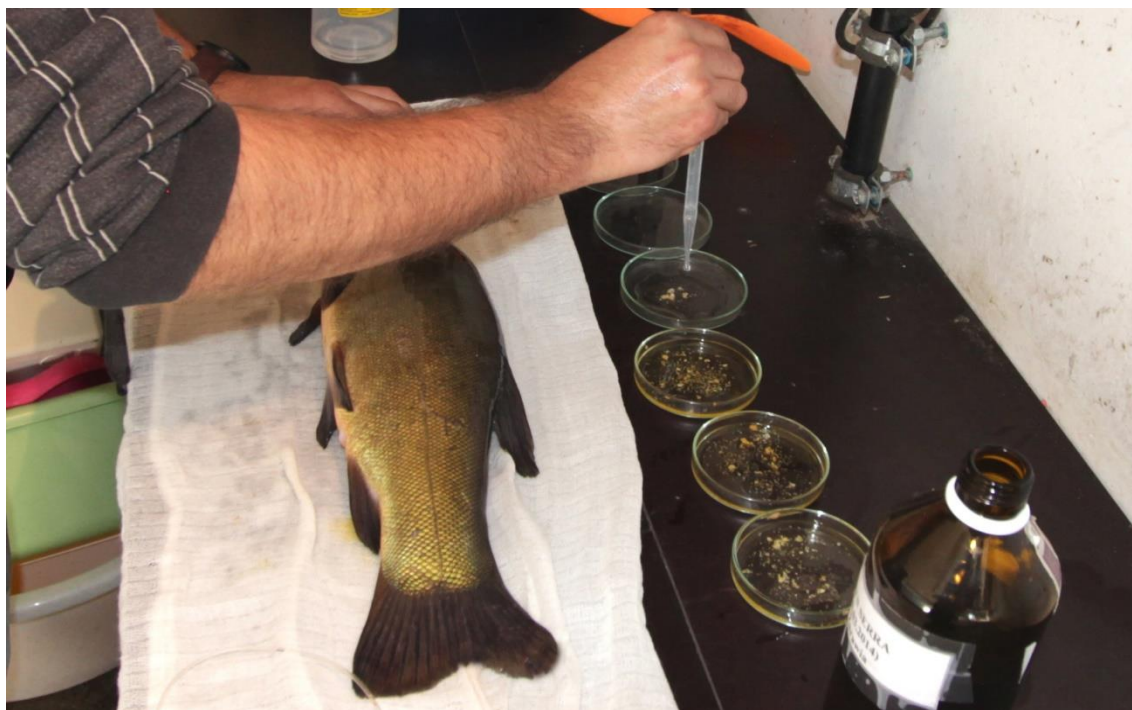


Fot. 4. Pobór próbki oocytów za pomocą katetera (fot.S. Krejszeff).

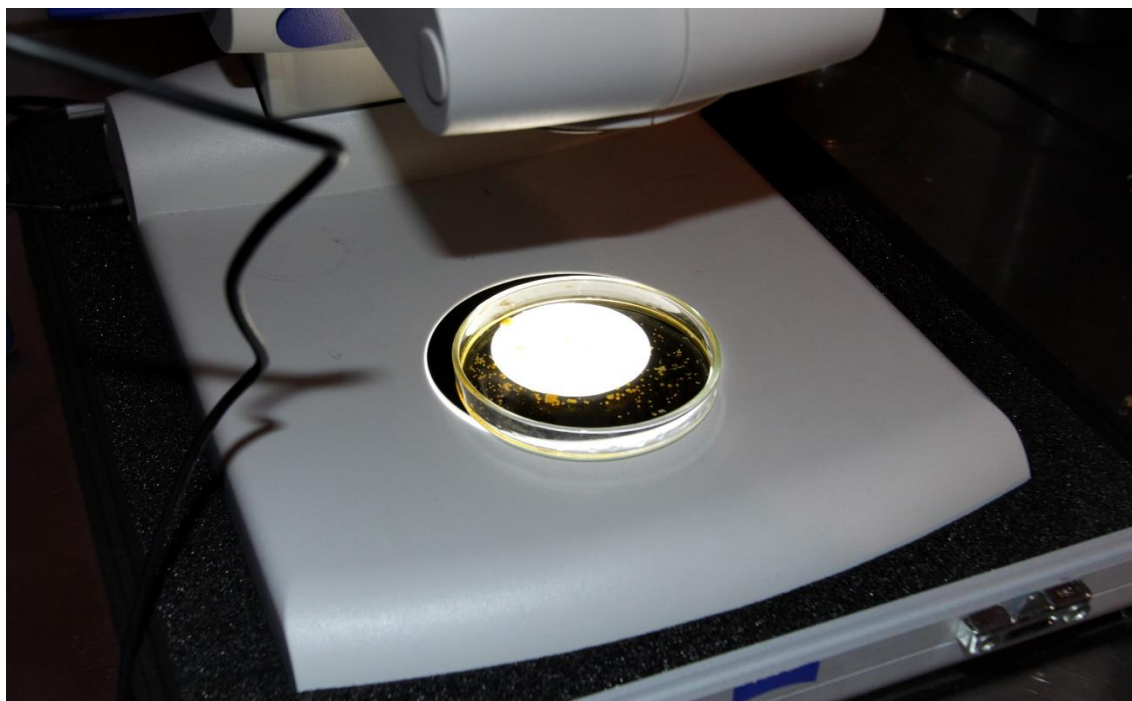


Fot. 5. Próbki oocytów na szalkach Petriego (fot. S. Krejszeff).

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

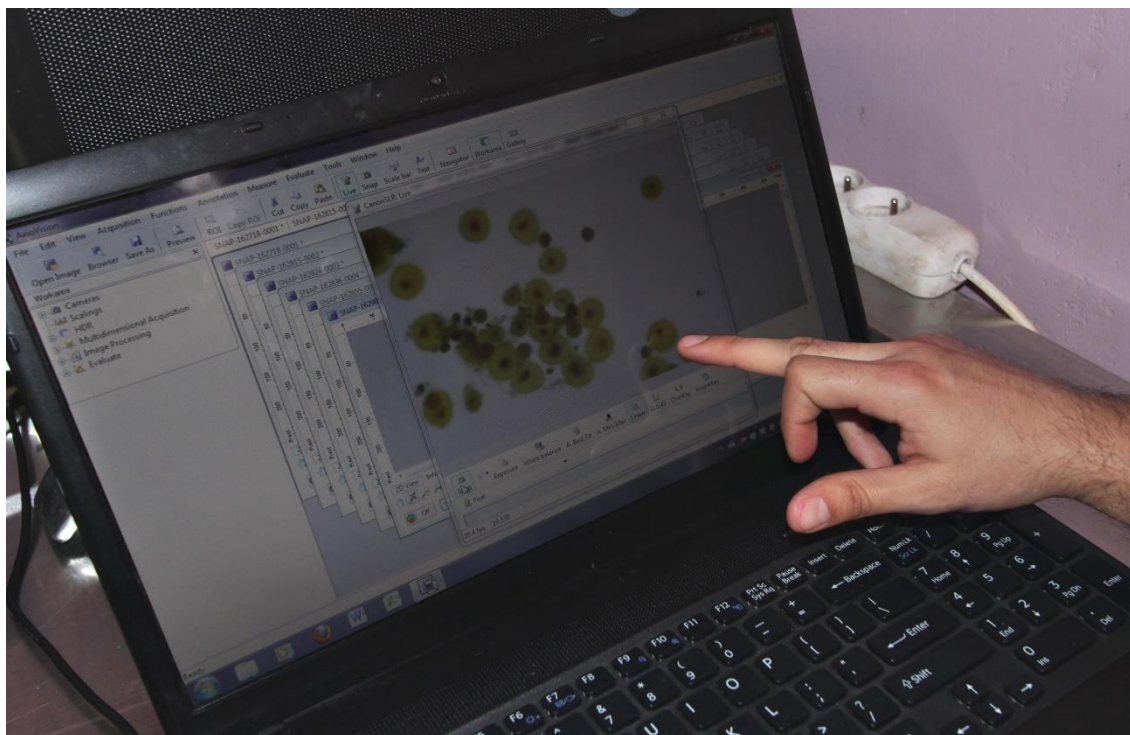


Fot. 6. Próbkki oocytów poddawane prześwietlaniu w płynie Serra (fot. S. Krejszeff).



Fot. 7. Ocena stadium dojrzałości oocytów przy wykorzystaniu mikroskopu stereoskopowego (fot. S. Krejszeff).

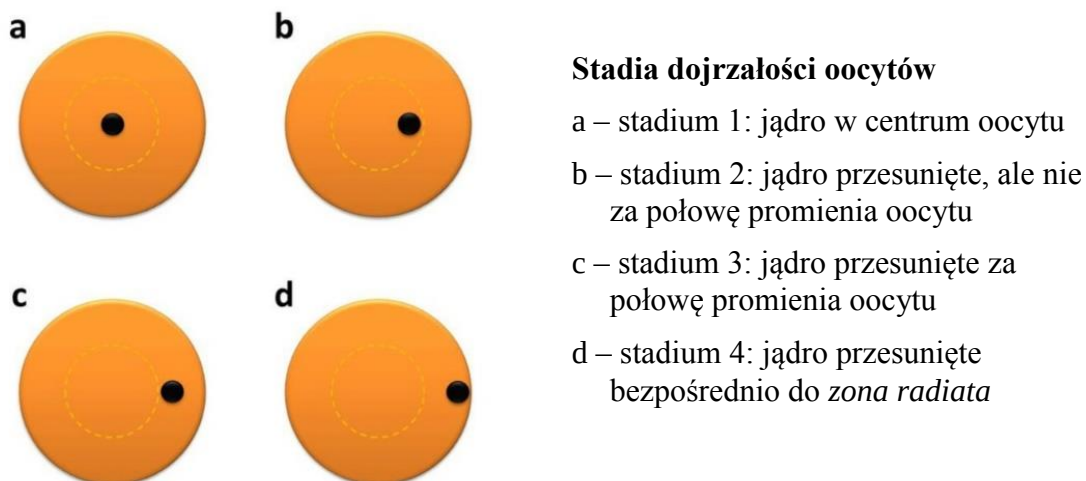
Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**



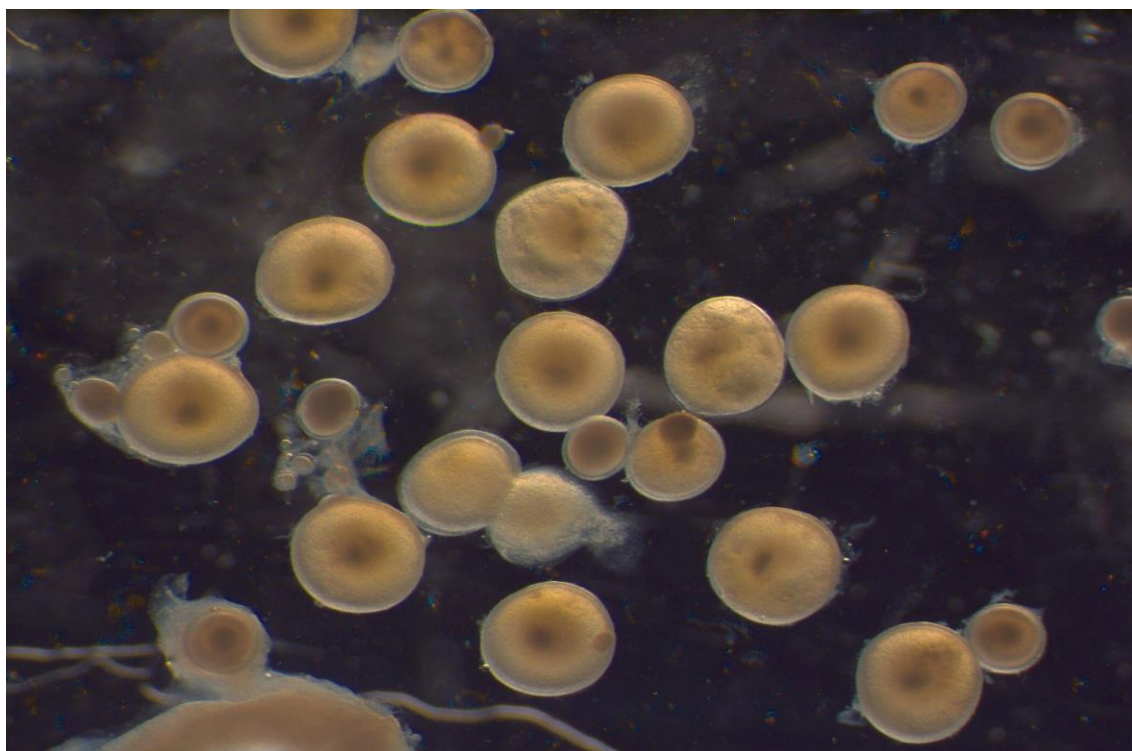
Fot. 8 . Obraz oocytów lina po prześwietleniu w płynie Serra (fot. S. Krejszeff).

Lin jest gatunkiem, który odbywa tarło porcyjne. W związku z tym w pobranej próbce znajdować się będą oocyty w różnych stadiach dojrzałości i różnej wielkości. Ocenie stadium dojrzałości należy poddać te o największej średnicy. Pod uwagę trzeba wziąć położenie jądra komórkowego, tj. fazę jego migracji. Oocyty u których proces finalnego dojrzewania oocytów (FOM) nie został jeszcze rozpoczęty znajdują się w pozycji centralnej (stadium I) (fot. 9). Jądra oocytów, które weszły w FOM i są w stadium drugim posiadają jądro przesunięte, ale nie za połowę promienia komórki jajowej. Oocyty w stadium trzecim mają jądro przesunięte za połowę jego promienia. Natomiast w stadium czwartym przesunięte bezpośrednio do krawędzi (rys. 3). Do przeprowadzenia dalszych procedur rozrodczych należy wybrać te samice, których oocyty znajdują się minimum w stadium 2/3 (fot. 10).

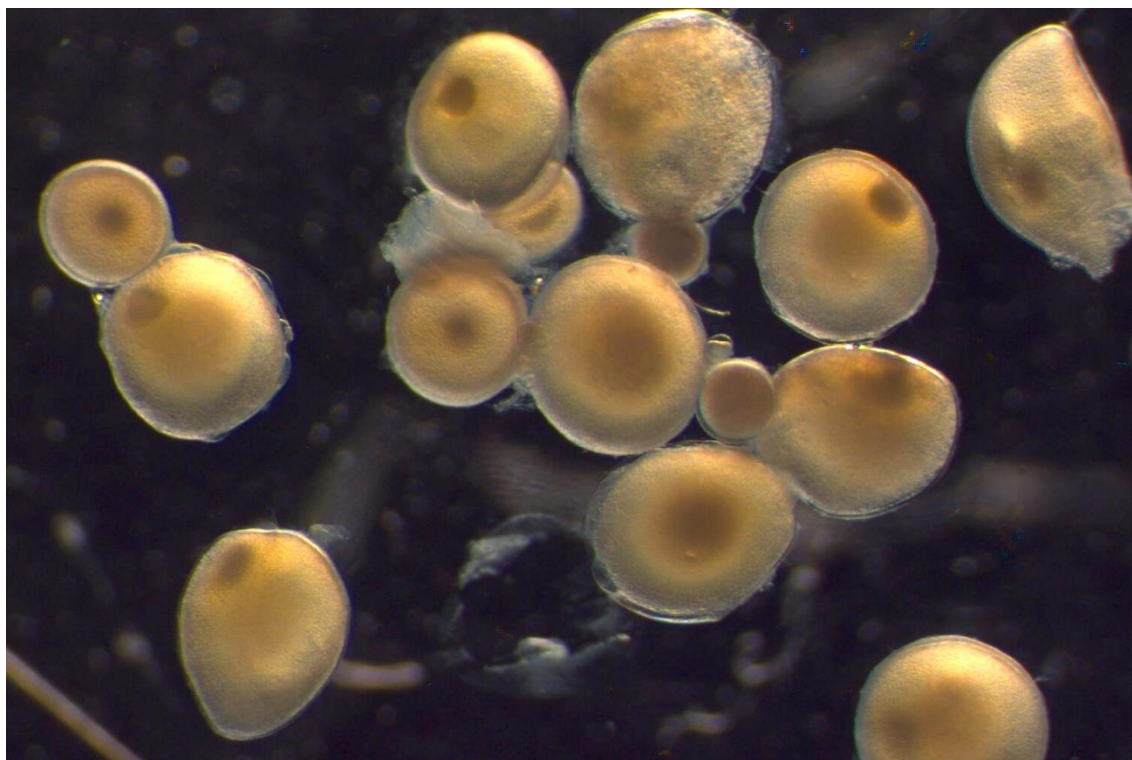
Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**



Rys. 3. Czterostopniowa skala stadiów dojrzałości oocytów (wg Brzuska i Bieniarz 1977).



Rys. 9. Oocyty lina w I stadium dojrzałości (fot.S. Krejszeff).



Rys. 10. Oocyty lina w IV stadium dojrzałości (fot.S. Krejszeff) .

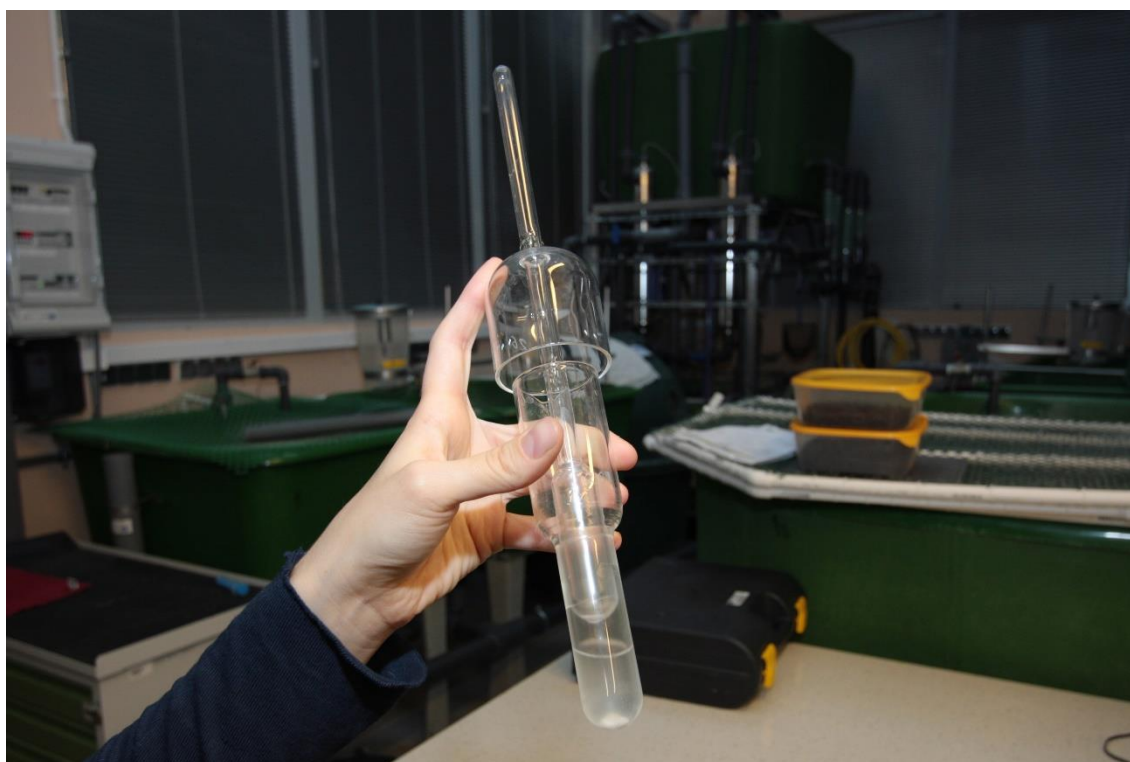
5.2. Stymulacja owulacji i spermacji

Do stymulacji hormonalnej tarlaków lina zaleca się stosowanie preparatów w skład których wchodzi ssacze lub łososiowe analogi gonadoliberyn w połączeniu lub bez, z antagonistami dopaminy (Linhart i Billard 1995, Kucharczyk i in. 2007, Targońska i in. 2012). W praktyce wylęgarniczej w Polsce największą popularność zyskał Ovopel zawierający w swym składzie ssaczy analog i metoklopramid. Preparat dawkuje się rybom przeliczając granule na masę ciała. W przypadku samic zazwyczaj w dwóch iniekcjach (0,2 i 1 granula na kilogram tarlaka). W przypadku samców w jednej iniekcji (0,5 granuli na kilogram masy ciała).

Ovopel produkowany jest w postaci granul, które przed przeprowadzeniem iniekcji trzeba zhomogenizować w płynie fizjologicznym, najlepiej za pomocą homogenizatora w następujący sposób. W przypadku pierwszej iniekcji (tzw. iniekcji inicjującej) samic należy go przygotować poprzez roztarcie z niewielką ilością płynu fizjologicznego (fot. 11). Przygotowaną zawiesinę należy następnie rozcieńczyć tak, żeby

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

w 1 ml znajdowało się 0,2 granuli Ovopelu. W przypadku drugiej iniekcji samic (tzw. iniekcji wyzwalającej) przygotowaną zawiesinę należy rozcieńczyć tak, żeby w 1 ml znajdowała się 1 granula Ovopelu. W przypadku iniekcji samców przygotowaną zawiesinę należy rozcieńczyć tak, żeby w 1 ml znajdowała się 0,5 granuli Ovopelu. Przygotowane w ten sposób zawiesiny należy podawać w ilości 1 ml w przeliczeniu na 1 kg masy ciała tarlaków z dokładnością do 50 g masy ciała. Iniekcje należy przeprowadzać dootrzewnowo (fot. 12).



Fot. 11. Preparat Ovopel po zhomogenizowaniu w płynie fizjologicznym (fot. S. Krejszeff).

Przetransportowane na wylęgarnię tarlaki lina należy przetrzymywać przetrzymywać w temperaturze 18 °C. Po przeprowadzeniu oceny dojrzałości oocytów i wyselekcjonowaniu samic, które można poddać stymulacji hormonalnej, temperaturę wody w RAS tarlakowym należy podnieść do 20 °C. Następnej doby należy podać samicom pierwszą iniekcję oraz podać preparat hormonalny samcom i podnieść

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

temperaturę wody do 22 °C. Po upływie 12 godzin należy podać samicom drugą iniekcję i podnieść temperaturę wody do 24 °C. W trakcie przeprowadzania kontrolowanego rozrodu lina fotoperiod powinien wynosić 16 godzin (Targońska i in. 2012).



Fot. 12. Hormonalna stymulacja samicy lina (fot. S. Krejszeff).

5.3. *Pozyskiwane gamet*

Pierwszego przeglądu samicy należy dokonać po upływie 12 godzin od przeprowadzenia drugiej iniekcji preparatu hormonalnego. Przed przystąpieniem do pozyskania gamet należy przygotować miski, ręczniki, plastikowe łyżki. Należy również zrobić naważki odczynników chemicznych do sporządzenia roztworów zapładniających i rozklejających ikrę. Pozyskiwanie gamet, jak już wcześniej wspomniano, powinno odbywać się po ówczesnym wprowadzeniu ryb w stan znieczulenia ogólnego. Ryby należy wyląwiać z basenu tarlakovego delikatnie i usypiać niewielkimi partiami (po kilka sztuk), pamiętając o tym, że każdy nadmierny ucisk może spowodować zrzucenie części ikry. Po wprowadzeniu ryb w stan znieczulenia ogólnego ryby należy wyjmować

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

brzuchem do góry starając się nie uciskać powłok brzusznych. Następnie należy, za pomocą ręcznika osuszyć zewnętrzne powłoki ciała, zwracając szczególną uwagę na okolice otworu płciowego. Po osuszeniu zewnętrznych powłok ciała można przystąpić do pobierania oocytów. Pozyskiwanie ikry należy przeprowadzać poprzez delikatny ucisk brzucha samicy. Poczynając od głowy w kierunku otworu płciowego. Ikry należy pobierać do momentu, gdy przestanie ona wypływać przy delikatnym ucisku (fot. 13). Wytarte samice należy odkładać do basenu przeznaczonego dla ryb po przeprowadzonym tarle.



Fot. 13. Pobór ikry (fot. S.krejszeff).

Przeglądu ryb, od których nie udało się pozyskać ikry należy dokonać po kolejnych 2 godzinach. Zazwyczaj, jeśli ocena dojrzałości oocytów została dokonana w sposób prawidłowy, po drugim przeglądzie powinno się uzyskać produkty płciowe od wszystkich samic. Jeśli nie można dokonać 3 i 4 przeglądu po kolejnych 2 i 4 godzinach. Większa ilość przeglądów jest niewskazana, gdyż brak owulacji u stymulowanych samic

po tak długim okresie czasu świadczy o tym, że stymulacja hormonalna została przeprowadzona w nieodpowiednim momencie. Ikrę należy przetrzymywać do plastikowych misek i do momentu zapłodnienia przetrzymywać pod przykryciem, na przykład ręcznikiem tetrowym.

Samce lina oddają nasienie wraz z moczem, który aktywuje plemniki, poprzez co obniża jego zdolność do zapłodnienia (Cejko i in. 2010). Dlatego nie należy go pozyskiwać przed poborem ikry i przetrzymywać w warunkach chłodniczych, np. w lodówce, do momentu zapłodnienia. Co jest zalecane w przypadku wielu innych gatunków ryb. W związku z tym zaleca się pozyskiwać je bezpośrednio do miski z ikrą (fot. 14) i jak najszybciej przystąpić do jej zapłodnienia. Zaleca się, żeby do zapłodnienia danej partii ikry użyć nasienia pozyskanego od co najmniej 3 samców w ilości minimum 1 ml (kilka kropel) na każde 100 gram ikry.



Fot. 14. Pobór nasienia (fot. S. Krejszeff)

5.4. Zapłodnienie i pozbawianie jaj kleistości

Zapłodnienie i pozbawianie jaj kleistości należy przeprowadzić zgodnie z metodą opracowaną przez Woynarovich i Horváth (1980), według której do tej operacji używa się płynu Woynarovicha i roztworu taniny. Pierwszy z roztworów przygotowuje się poprzez rozpuszczenie 3 g mocznika i 4 g soli kuchennej w 1 litrze czystej wody. Drugi z roztworów przygotowuje się poprzez rozpuszczenie 0,5-0,8 g taniny również w 1 litrze wody. Obydwa roztwory należy przygotowywać tuż przed ich użyciem.

W zależności od ilości pozyskanej ikry obydwie roztwory zazwyczaj sporządza się w przeliczeniu na 5-10 l wody. Oryginalna receptura do sporządzenia obu płynów zaleca stosowanie wody stawowej. Za pewne ze względu na fakt, że w przeszłości taką wodą w gospodarstwach stawowych zasilano infrastrukturę wylęgarniczą. Obecnie, w celu zapewnienia odpowiedniej ochrony biologicznej i zdrowotnej systemy recyrkulacyjnej zasilane są wodą studzienną lub wodociągową. W związku z tym w/w roztwory sporządza się używając tzw. „wody wylęgarniczej”, tj. takiej, która po pobraniu ze studni głębinowej lub wodociągu krąży w RAS, w którym będzie prowadzona inkubacja jaj.

Pozyskaną ikrę i nasienie należy dokładnie wymieszać i zalać niewielką ilością płynu aktywującego (10-20% objętości jaj). Zazwyczaj do tego celu używana jest „woda wylęgarnicza”, która dobrze spełnia swoje zadanie. Nie jest jednak idealnym płynem aktywującym. Znacznie lepiej w tej roli, w przypadku wielu gatunków ryb, sprawdza się roztwór Woynarovicha. Jego pozytywny wpływ na efekty zapłodnienia przejawia się przede wszystkim w zwiększeniu przeżywalności zarodków, co jest związane z wydłużonym czasem ruchu plemników i wydłużonym okresem czasu podczas którego jaja są zdolne do zapłodnienia. Zostało dobrze udokumentowane na przykład u okonia i jazia (Żarski i in. 2012, Siddique i in. 2016).

Większość plemników po aktywacji wodą wylęgarniczą traci zdolność do zapłodnienia przed upływem 1 minuty (Moczarski i Kołdras 1982). Dlatego w praktyce zapłodnienie prowadzi się nie dłużej niż 1 minutę. Także ze względu na fakt, że po tym czasie również jaja tracą zdolność do zapłodnienia (Woynarovich i Horváth 1980).

W porównaniu do wody, zastosowanie jako płynu aktywującego roztworu Woynarovicha wydłuża czas ruchu plemników i zdolność jaj do zapłodnienia. Zwiększa

też efektywność zapłodnienia. Na przykład u jazia przeżywalność zarodków określana w stadium zaoczkowania może być nawet 1,7 razy większa (Siddique i in. 2016). Dlatego w sytuacji, gdy do aktywacji gamet używa się tego płynu, zapłodnienie należy prowadzić przez minimum 3 minuty.

Od pierwszych sekund, po kontakcie z płynem aktywującym jaja zaczynają wchłaniać wodę i pęcznieć, co może trwać 1,0-1,5 godziny. Żeby proces ten mógł przebiegać prawidłowo, tj. żeby w jego trakcie zapłodnione jaja się nie sklejały, należy przeprowadzić kąpiel roztworze Woynarovicha. Roztwór należy dodawać porcjami w kilkunastominutowych odstępach czasu. Równocześnie należy pozbywając się części (maksymalnie do 50%) znajdującego się w misce roztworu.

Po około 1,0-1,5 godziny jaja lina przestają pęcznieć. Jednak ich osłonki są nadal kleiste i po kontakcie z czystą wodą mają tendencję do sklejania się w grudki. W związku z tym, żeby całkowicie pozbyć się kleistości, jaja należy przepłukać w roztworze taniny. Według oryginalnej receptury opracowanej dla karpia i następnie wdrożonej dla wielu gatunków ryb karpiowatych, w tym lina (Woynarovich i Horváth 1980) po przeprowadzeniu kąpeli jaja należy całkowicie odsączyć i ponownie dwu lub trzykrotnie przepłukać w roztworze Woynarovicha, w celu usunięcia wypłukanych przez płyn substancji powodujących kleistość jaj. Następnie cały roztwór Woynarovicha należy odsączyć i przenieść jaja do naczynia z roztworem taniny. Proporcja roztworu do jaj powinna wynosić minimum 1:1. Po trwającej 3-5 sekund kąpeli mieszaninę jaj i roztworu taniny należy zalać czystą wodą i przemieszczać. Następnie, gdy jaja opadną na dno płyn należy całkowicie zlać i przeprowadzić ponowną kąpiel w roztworze taniny. Tym razem ilość roztworu powinna być o połowę mniejsza. Po krótkiej kąpeli jaja należy kilkakrotnie przepłukać czystą wodą i obsadzić na aparacie inkubacyjnym.

Podobnie jak w przypadku wielu innych technik stosowanych w wylęgarnictwie, również i metoda opracowana przez Woynarovicha i Horvátha (1980) doczekała się modyfikacji. W praktyce zazwyczaj cała operacja przeprowadzana jest w tym samym naczyniu, najczęściej misce. Jej objętość dobierana jest w taki sposób, żeby jaja po napęcznieniu zajmowały max $\frac{1}{4}$ jej objętości. Zapłodnienie przeprowadza się stosując jako płyn aktywujący roztwór Woynarovicha, w którym to prowadzi się dalszą kąpiel jaj

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

podczas ich pęcznienia. Roztwór dodaje się porcjami w kilku, kilkunastominutowych odstępach czasu. Równocześnie w trakcie trwania kąpieli trzy, czterokrotnie usuwa się część znajdującego się w misce roztworu. Po trwającej jedną godzinę kąpieli cały zawarty w misce płyn się zlewa. Następnie zapłodnione i napęczniałe jaja zalewa się roztworem taniny (stężenie 0,8-1,0 g/l) o objętości dwukrotnie większej niż objętość jaj, czyli do około połowy objętości miski i prowadzi kąpiel przez 15 sekund. Następnie mieszanie jaj i roztworu taniny zalewa się wodą wylęgarniczą całkowicie wypełniając miskę i przeprowadza kilkusekundowe płukanie. Gdy jaja osiadą na dnie cały zawarty w niej płyn się zlewa i kąpiel w roztworze taniny przeprowadza po raz drugi (fot. 15).



Fot. 15. Pozbawianie zapłodnionych jaj kleistości na pomocą plastikowej łyżki (fot. S. Krejszeff).

6. Inkubacja jaj i klucie zarodków

Pozbawioną kleistości ikrę lina zazwyczaj inkubuje się w aparatach inkubacyjnych typu Weiss (fot. 16). W ostatnich latach coraz większym powodzeniem

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**

cieszą się aparaty inkubacyjne typu McDonald (oraz różnego rodzaju ich modyfikacje), które również można stosować do inkubacji jaj lina. Przepływ wody przez słoje inkubacyjne powinien być ustawiony w taki sposób aby jaja były delikatnie mieszane i jednocześnie nie były wypłukiwane z aparatów inkubacyjnych.

Najwyższej jakości wylęg pozyskuje się inkubując jaja lina w przedziale temperatur od 20 do 25 °C (Geldhauser 1995, Korzecka-Orkisz i in. 2009). Czas inkubacji będzie zależał w głównej mierze od temperatury wody. Korzecką-Orkisz i in. (2009) podczas inkubacji jaj w temperaturze 20 i 24 °C 50% zarodków uzyskali odpowiednio po 44,3 i 34,5 godzinach. Zastosowanie roztworu taniny do pozbawiania kleistości jaj wydłuża okres inkubacji. Kujawa i in. (2010) po przeprowadzeniu inkubacji jaj eksponowanych przez 30 s na 0,1% roztwór taniny 42,1% wykłutych zarodków uzyskali po 80 h inkubacji w temperaturze 25 °C.



Fot 16. Aparat inkubacyjny typu Weiss z inkubującą się ikrą lina (fot. S. Krejszeff).

Generalnie, masowego klucia larw, przy zastosowaniu taniny do pozbawiania jaj kleistości, należy się spodziewać w pierwszej połowie 4 doby inkubacji. Należy jednak mieć świadomość, że na proces klucia oprócz temperatury ma również wpływ intensywność wydzielania chorionazy. Enzymu, który produkowany jest przez komórki gruczołowe. Trawi on częściowo błonę jajową, która następnie jest rozrywana przez energiczne ruchy zarodka. Intensywność wydzielania chorionazy zależy od wielu czynników. Między innymi od stężenia tlenu rozpuszczonego w wodzie, temperatury i oraz intensywności oświetlenia. Spadek stężenia tlenu, wzrost temperatury oraz intensywne oświetlenie stymulują wydzielanie chorionazy. (Dziekońska 1956, Łuczyński 1985).

W dniu przewidywanego klucia należy pobrać około 50 jaj, umieścić je na szalce Petriego i odstawić na mniej więcej 30 minut. Jeśli liczba wyklutych larw na szalce będzie większa niż 50%, należy rozpocząć „masowe klucie”, jeśli mniejsza – odczekać min. 12 godzin. Gdy rozpoznanie gotowości larw do klucia wypadnie pozytywnie, należy zamknąć dopływ wody do aparatu inkubacyjnego. Po kilkunastu minutach od zamknięcia dopływu należy zlewarować ikrę do miski, którą i w całości wypełnić wodą. Następnie zawartość miski należy delikatnie zamieszać, tak aby ikra wraz z wyklutymi larwami zebrały się w centrum miski, zlać osłonki poza miskę, uważając, żeby nie usunąć wyklutych larw. Czynność należy powtarzać do momentu, gdy na dnie miski pozostanie jedynie wylęg. Wyklute larwy należy umieścić w basenie odbieralnikowym.

Świeżo wyklute wylęg lina będzie się przytwierdzał za pomocą gruczołu cementowego do ścian basenu odbieralnikowego (fot. 17). W zależności od temperatury (zalecana to 20-25 °C) swobodne pływanie i napełnianie pęcherza pławnego rozpocznie się po 3 - 4 dniach (fot. 18). Jeśli pozyskany wylęg przeznaczony będzie do dalszego podchowu w RAS, należy już w trakcie napełniania pęcherza pławnego rozpocząć żywienie świeżo wyklutymi naupliusami solowca. Jeśli pozyskany materiał przeznaczony będzie do pochowu w stawie zimnym, tuż po napełnieniu pęcherza pławnego należy go wyłowić i przeprowadzić zarybianie.

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”;
ETAP II; Akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20** z dnia **16.01.2020 r.**



Fot. 17. Świeżo wykluty wylęg lina przytwierdzony gruczołem cementowym do ścian odbieralnika (fot. D. Żarski).



Fot. 18. Wylęg lina w trakcie napełniania pęcherz pławnego (fot. D. Żarski).

7. Literatura

- Brylińska M., Bryliński E. 2000 – Lin *Tinca tinca* – W: *Ryby słodkowodne Polski* (Red.) M. Brylińska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 226-232.
- Brzuska E., Bieniarz K. 1977 – Metoda przeżyciowego określania dojrzałości płciowej samic karpia w związku z iniekcjami homogenatu przysadki mózgowej karpia – Wyd. IRS, Olsztyn.
- Cejko B.I., Żarski D., Targońska K., Krejszeff S., Kucharczyk D., Glogowski J. 2010. Osmolality of seminal plasma as an indicator of milt contamination with urine based on the example of the tench *Tinca tinca* (L.) – Polish Journal of Natural Sciences 25: 287-298.
- Dziekońska J. 1956 – Studies on embryonic development of fish. I. Observations on the spawning and embryonic development of bream in the Vistula Lagoon – Polish Archives of Hydrobiology 3: 291-305.
- Gela D., Flajshans M., Kocour M., Rodina M., Linhart O. 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture: a review – Aquaculture International 14: 195-203.
- Geldhauser F., 1995 – Some aspects of embryonic and larval development of tench (*Tinca tinca* (L.)) – Polish Archive of Hydrobiology 42: 87-95.
- Gilderhus P.A. 1990 – Benzocaine as fish anesthetic: efficacy and safety for spawning-phase salmon – The Progressive Fish-Culturist 52: 189-191.
- Gomułka P., Antychowicz J. 1999 – Anestetyki stosowane u ryb – Medycyna Weterynaryjna 55: 89-93.
- Gomułka P. 2008 – Anestetyki w hodowli ryb jesiotrowatych – W: *Innowacyjne techniki oceny biologicznej i ochrony cennych gatunków ryb hodowlanych i raków* (Red.) K. Demska-Zakęś. Wyd. IRS, Olsztyn: 109-137.
- Hamačková J., Lepicová A., Kozak P., Stupka Z., Kouřil J., Lepic P. 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature – Veterinary Medicine - Czech 49: 467-472.

- Korzelecka-Orkisz A., Bonisławska M., Pawlos D., Szulc J., Winnicki A., Formicki K.
2009 –Morphophysiological aspects of the embryonic development of tench (*Tinca tinca* (L.)) –EJPAU 12. <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue4/art-21.html>
- Kucharczyk D., Kujawa R., Mamcarz A., Targońska K., Krejszeff S., Wyszomirska E.
2007. – Artificial spawning of common tench (*Tinca tinca*) collected from wild populations – Polish Journal of Natural Sciences 22: 107-115.
- Linhart O. and Billard R. 1995. Biology of gametes and artificial reproduction in common tench, *Tinca tinca* (L.): a review – Polish Archives of Hydrobiology 42: 37–56.
- Lirski A., Wałowski J. 2011 – Polska akwakultura w 2010 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22 – Komunikaty Rybackie 5: 5-12.
- Lirski A., Myszkowski L. 2012 – Polska akwakultura w 2011 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 5: 24-26.
- Lirski A., Myszkowski L. 2013 – Polska akwakultura w 2012 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 21-24.
- Lirski A., Myszkowski L. 2014 – Polska akwakultura w 2013 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 24-27.
- Lirski A., Myszkowski L. 2015 – Polska akwakultura w 2014 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 16-20.
- Lirski A., Myszkowski L. 2016 – Polska akwakultura w 2015 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 23-28.
- Lirski A., Myszkowski L. 2017 – Polska akwakultura w 2016 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 20-27.
- Lirski A., Myszkowski L. 2018 – Polska akwakultura w 2017 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 14-22.
- Lirski A., Myszkowski L. 2019 – Polska akwakultura w 2018 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 16-22.
- Lirski A., Myszkowski L. 2020 – Polska akwakultura w 2019 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 2-9.
- Lirski A., Myszkowski L. 2021 – Polska akwakultura w 2020 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komunikaty Rybackie 6: 2-9.

- Łuczyński M. 1985 – Wykluwanie się ryb – Fizjologia Ryb. Zeszyt 1. ART, Olsztyn.
- Moczarski M., Kołdras M. 1982 – Properties of tench *Tinca tinca* L. sperm and experiments with freezing it at -196 °C – *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 12: 41-49.
- Siddique M.A.M., Linhart O., Kujawa R., Krejszeff S., Butts IAE. Composition of seminal plasma and ovarian fluid in Ide *Leuciscus idus* and Northern pike *Esox Lucius* – *Reproduction of Domestic Animals* 51: 960-969.
- Siwicki A. 1984 – New anaesthetic for fish – *Aquaculture* 38: 171-176.
- Targońska K., Perkowski T., Żarski D., Krejszeff S., Mamcarz A., Kujawa R., Kucharczyk D. 2012 – Method of evaluation of wild common tench, *Tinca tinca* (L.), female suitability for artificial reproduction during the spawning season – *Italian Journal of Animal Science*: 11:e30.
- Wołos A., Draszkievicz-Mioduszevska H., Trella M. 2021 – Gospodarka rybacka w śródlądowych wodach płynących w 2019 roku. Cz. 1. Uprawnieni do rybactwa, obwody rybackie, połowy gospodarcze, zatrudnienie i połowy amatorskie – *Komunikaty Rybackie* 1-10.
- Wojnarovich i Horvath 1980 – The artificial propagation of warm-water finfishes. A manual for extension – *FAO fisheries technical paper* No. 201.
- Żarski D., Horváth Á., Kotrik L., Targońska K., Palińska K., Krejszeff S., Bokor Z., Urbányi B., Kucharczyk D. 2012 – Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs – *Journal of Applied Ichthyology* 28: 967-972.