

## ABC kontrolowanego rozrodu lina

### Wstęp

Lin (fot. 1) jest jednym z najważniejszych gatunków ryb słodkowodnych naszej strefy klimatycznej. Od lat należy do grupy najbardziej cenionych ryb karpiovatych i ma duże znaczenie komercyjne (Gela i in. 2006, Kujawa i in. 2011, Mamcarz i in. 2011). Jako ryba preferująca wody stojące i żyzne jest istotnym elementem ichtiofauny jezior, bardzo chętnie poławianym przez wędkarzy. Stanowi również istotną składową hodowli ryb w stawach ziemnych (Mamcarz i Skrzypczak 2006, Skrzypczak i Mamcarz 2006). Jed-



Fot. 1. Lin (*Tinca tinca*).

nakże wolne tempo wzrostu lina w warunkach naturalnej termiki jezior oraz stawów (Steffens 1995, Wolnicki i in. 2003, 2006) zniechęca hodowców (głównie karpia) do prowadzenia hodowli tego gatunku na dużą skalę, co sprawia, że stanowi on jedynie dodatkowy element produkcji akwakultury. Obecnie na terenie Polski nie są prowadzone żadne regularne hodowle lina mogące zaspokoić zapotrzebowanie rynku. Tym samym ryby pochodzące z akwakultury wciąż ustępują miejsca na sklepowych półkach rybom pozyskanym ze środowiska naturalnego.

Duże znaczenie gospodarcze oraz niewielka produkcja akwakulturowa lina doprowadziła w ostatnich latach do wzmożonej aktywności naukowej, mającej na celu określenie możliwie najbardziej optymalnych parametrów produkcji tego gatunku. W efekcie opracowano szereg procedur rozrodczych oraz podchowowych (Wolnicki i in. 2003ab,

2006, Cejko i in. 2010, Kujawa i in. 2011, Nowosad i in. 2012). Rozpatrywano również możliwości intensywnej produkcji lina w recyrkulacyjnych systemach akwakulturowych – RAS (ang. *Recirculating Aquaculture Systems*) (Rodríguez i in. 2008).

Dotychczas uzyskiwane wyniki hodowlane wciąż jednoznacznie wskazują na zbyt niską opłacalność ekonomiczną akwakultury lina. Relatywnie efektywna produkcja stawowa wskazuje jednakże na możliwości jej zwiększenia, a tym samym podaży ryb konsumpcyjnych pochodzących z akwakultury. Aby to osiągnąć, należałoby możliwie skutecznie skrócić np. okres produkcji narybku. Efekt ten może zostać osiągnięty, gdy pierwszy etap produkcji zostanie przeprowadzony w sposób intensywny, po czym wysokiej jakości biologicznej materiał obsadowy przeniesiony do stawów ziemnych na samym początku sezonu wzrostowego. Pozwoliłoby to zrekomensować niską efektywność wychowu larw i stadiów młodocianych w warunkach stawowych.

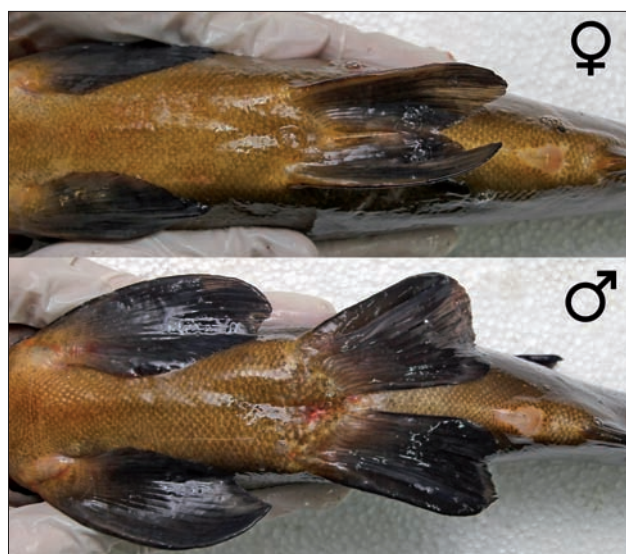
Obecnie produkcja lina w stawach ziemnych oparta jest na materiale pozyskanym w wyniku tarła spontanicznego (niekontrolowanego) bezpośrednio w stawach. Do tarła dochodzi, w większości przypadków, na przełomie maja i czerwca lub też w czerwcu, czyli w zasadzie już w trakcie sezonu produkcyjnego. Sprawia to, że jak dotąd hodowcy mają bardzo znikomy wpływ na liczebność larw i narybku tego gatunku. Nie mają również możliwości kontrolowania poszczególnych etapów produkcji w kontekście np. jakości podchowowanego materiału. Istnieje jednak bardzo duże prawdopodobieństwo, że obsadzenie stawów wysokiej jakości larwami lina wyprodukowanymi w wyniku kontrolowanego rozrodu umożliwi istotne zwiększenie efektywności i wielkości produkcji. Stanowiłoby to ważny krok do opanowania i kontroli procesu produkcji tego gatunku. Dopiero tego typu praktyka hodowlana daje możliwości przeprowadzenia wstępnej selekcji materiału mającej na celu, w dalszej perspektywie, np. doprowadzenie do uzyskiwania wylęgu lina poza sezonem rozrodczym. Potencjalnie umożliwiłoby to obsadzanie stawów wysokiej jakości narybkiem w momencie rozpoczęcia sezonu hodowlanego, a tym samym uzyskiwanie ryb o wielkości handlowej (120-250 g)

przynajmniej rok wcześniej, niż w obecnie stosowanych, tradycyjnych metodach hodowli lina.

Kontrolowany rozród ryb jest pierwszym i jednym z najważniejszych etapów intensywnej produkcji ryb. Efektywność tego etapu hodowli bezpośrednio warunkuje zarówno ilość, jak i jakość uzyskanego wylęgu, a tym samym determinuje efektywność dalszych etapów produkcji. Dlatego w niniejszym opracowaniu przedstawiono zestaw szczegółowych procedur, które należy stosować w trakcie kontrolowanego rozrodu lina przy wykorzystaniu technologii RAS.

## Pozyskiwanie, transport i warunki przetrzymywania tarlaków

Tarlaki lina pozyskiwane są ze środowiska naturalnego lub komercyjnych, stawowych gospodarstw karpowych. W przypadku ryb dzikich (pozyskiwanych z jezior) odtów reproduktorów prowadzony jest zazwyczaj w trakcie sezonu rozrodczego, a odtowione osobniki natychmiast transportowane do wylęgarni. Natomiast ryby hodowlane traktowane są w zupełnie inny sposób. Po zakończeniu sezonu produkcyjnego tarlaki lina odławia się wraz z innymi rybami, sortuje i przenosi do zimochowów. Po zakończeniu zimowania ryby są ponownie odławiane, sortowane i przenoszone do niewielkich stawów ziemnych, gdzie są przetrzymywane aż do sezonu rozrodczego. Zaleca się, żeby w tym okresie samce i samice (fot. 2) były przetrzymywane oddzielnie w zagęszczeniu 400 kg/ha (Gela i in. 2006). Podczas przygotowywania do tarła wraz ze wzrostem temperatury wody zachodzić będzie szereg zmian rozwojowych w gonadach ryb. Dlatego bardzo ważne jest, żeby rybom zapewnić odpowiednie warunki pokarmowe. W związku z tym zaleca się również, żeby w tym tzw. okresie przygotowawczym ryby były każdego dnia dokarmiane, np. dobrej jakości granulatem dla ryb karpowatych. Zalecana dawka



Fot. 2. Dymorfizm płciowy lina. Samica (zdjęcie u góry), samiec (zdjęcie u dołu).

wynosi 5% biomasy ryb (Gela i in. 2006). Jednak w rzeczywistości masa skarmianej paszy zależeć będzie od temperatury wody oraz obfitości pokarmu naturalnego, o którego rozwój również należy zadbać odpowiednio nawożąc staw.

Tarlaki lina należy transportować zgodnie z wytycznymi, które są stosowane przy transporcie karpia. Zbiorniki do przewozu ryb powinny być wykonane z materiałów nie wywierających szkodliwego wpływu na żywe ryby, wyposażone w otwory i rękawy spustowe. Rozpylacze powietrza powinny zapewnić równomierne napowietrzanie całej objętości wody. Sprzęt pomocniczy, czyli kasary, wiadra, nosiłki, wanny itp., musi być odkażony. Różnice temperatur pomiędzy wodą ze zbiornika, w którym przebywały ryby, a wodą w zbiorniku transportowym nie mogą być większe niż 4°C (BN-83/9147-04).

Zaleca się, żeby podczas transportowania ryb w temperaturze wody powyżej 15°C były one dobrze odpite. Załadunek powinien odbywać się szybko, sprawnie, nieprzerwanie i delikatnie, nie powodując okaleczeń i obtarć. Ryby najlepiej jest ważyć w pojemniku częściowo wypełnionym wodą. Po ważeniu należy je przelać do zbiornika transportowego. Maksymalna wysokość, z jakiej ryby mogą spadać do wody nie powinna przekraczać 40 cm. Zbiornik przewozowy należy przed załadunkiem napełnić przynajmniej do  $\frac{1}{3}$  wodą, a po załadunku do  $\frac{2}{3}$  pojemności. W trakcie transportu należy też kontrolować prawidłowość zachowania się ryb. Jeśli wystąpią objawy zaniepokojenia i oznaki osłabienia przeprowadzić wymianę co najmniej połowy wody. Po przybyciu na miejsce docelowe wyładunek ryb trzeba wykonać zgodnie z zasadami obowiązującymi przy załadunku. Przede wszystkim należy wyrównać różnice temperatur między zbiornikiem przewozowym, a nowym środowiskiem ryb (BN-83/9147-04).

Masa tarlaków lina, jaką można bezpiecznie przewozić, zależy w głównej mierze od wielkości ryb i temperatury wody. Jeżeli przewidywany czas transportu będzie się mieścić w przedziale od 5 do 20 godzin do szacowania masy ryb, którą będzie można bezpiecznie przetransportować można wykorzystać wytyczne przedstawione w tab. 1.

TABELA 1

Masa ryb, jaką można transportować w 1000 litrach wody przez okres 5-20 godzin (wg Berki 1986)

Masa tarlaków (kg)	Temperatura wody (°C)				
	5 – 8	8 – 10	10 – 15	15 – 20	20 – 25
0,1 – 0,2	375-400	281-300	250-267	219-233	175-187
0,2 – 0,5	400-462	300-346	267-308	233-269	187-215
0,5 – 1,0	462-500	346-375	308-333	269-292	215-233
1,0	600	450	400	350	280
1,0 – 1,7	660-690	495-518	440-460	385-403	308-322

Po przetransportowaniu do wylęgarni tarlaki lina należy przetrzymywać oddzielnie w RAS rozrodowych w temperaturze wody 19°C. Ponieważ w trakcie przeprowadzania

Okresy kliniczne w trakcie wywoływania znieczulenia ogólnego (wg Trzebiatowskiego i in. 1996)

Okres kliniczny	Charakterystyka	
Okres I - spokoju	Występuje od momentu wprowadzenia ryb do roztworu środka znieczulającego. Ryby pływają spokojnie, omijają bez trudu przeszkody i wykonują regularne ruchy oddechowe.	
Okres II - podniecenia	Ryby wykazują wyraźny niepokój. Pływają bardzo szybko, nie omijają przeszkód, wykazują bardzo silne odruchy obronne, ich ruchy oddechowe są płytkie i nieregularne.	
Okres III – znieczulenia ogólnego	faza A – płytkiego znieczulenia ogólnego	Ryby zaczynają pokładać się na boki. Pływają znacznie wolniej, wykazują gruntowne osłabienie odruchów obronnych, ruchy oddechowe są zwolnione, regularne i głębokie.
	faza B – pełnego znieczulenia ogólnego	Ryby pokładają się na boki, a następnie nieruchomieją. Nie wykazują żadnych odruchów obronnych, występuje jedynie odruch akustyczny, ruchy oddechowe są regularne, zwolnione i głębokie.
Okres IV – duszenia się	Występuje w wyniku przedawkowania anestetyku lub nadmiernego wydłużenia czasu przetrzymywania ryb w roztworze preparatu. Ryby leżą na boku, nie wykazują odruchów obronnych, zanika odruch akustyczny, ruchy oddechowe są płytkie, zanikające. Zbyt długie przetrzymywanie ryb w takim stanie kończy się śnięciem.	

procedur rozrodczych temperatura wody będzie wzrastać do 23°C należy przyłożyć szczególną wagę do prawidłowej pracy instalacji natleniającej wodę. Do momentu rozpoczęcia stymulacji hormonalnej, fotoperiod powinien wynosić 12L:12D.

## Anestezja

Każda manipulacja powinna być przeprowadzana po uprzednim wprowadzeniu tarlaków lina w stan znieczulenia ogólnego. Anestetyk należy podawać przez imersję. W tym celu rybę należy umieścić w wodzie z rozpuszczonym preparatem i przetrzymać do czasu osiągnięcia znieczulenia ogólnego. Od momentu umieszczenia ryby w wodzie będzie można obserwować szereg następujących po sobie zmian w zachowaniu ryb (tab. 2). Warto zwrócić na nie uwagę, gdyż następując jedna po drugiej świadczyć będą o coraz silniejszym oddziaływaniu anestetyku na organizm ryby, co pozwoli na precyzyjne określenie momentu wejścia w stan znieczulenia ogólnego.

W celu wywołania znieczulenia ogólnego u lina można stosować 2-fenoksyetanol w stężeniu 0,6 ml/l. Skuteczność tego związku chemicznego zależeć będzie od temperatury wody. Manipulując rybami w zakresie temperatur pomiędzy 18 a 25°C pełnego znieczulenia ogólnego należy się spodziewać mniej więcej w przedziale od 2,5 do 4 minut (tab. 3). Ze względu na ryzyko śnięcia, ryb nie powinno przetrzymywać w roztworze anestetyku dłużej niż 10 minut (Hamackova i in. 2004). Należy też pamiętać o tym, żeby roztwór ten był nieprzerwanie napowietrzany.

Przystępując do przeprowadzenia anestezji należy mieć na uwadze fakt, że moment osiągnięcia znieczulenia ogólnego będzie również zależał od kondycji ryb. Może się okazać, że podczas kolejnych kąpiei w roztworze anestetyku indukcja znieczulenia ogólnego będzie wymagała więcej czasu (Gilderhus i Marking 1987). Dlatego przygotowując ryby do przewidzianych w protokole rozrodczym zabiegów można postępować na dwa sposoby. Umiesz-

czać ryby w roztworze anestetyku i mierzyć upływający czas. Stosując 2-fenoksyetanol w stężeniu 0,6 ml/l z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że po upływie 5 minut wszystkie ryby będą znieczulone. Osoby bardziej doświadczone mogą poprzestać na prowadzeniu obserwacji zachowania ryb. Osobniki, które pokładają się na boki i następnie nieruchomieją oraz nie wykazują żadnych odruchów obronnych, a ich ruchy oddechowe są regularne, zwolnione i głębokie, wykazują objawy pełnego znieczulenia ogólnego.

Jednorazowo należy usypiać po 4-5 ryb. Po przeprowadzeniu manipulacji tarlaki należy umieścić w odpijalniku wyposażonym w system napowietrzania wody i dopiero gdy się wybudzą i odzyskają równowagę przenieść je z powrotem do basenu tarlakowego. Podobnie jak w przypadku indukcji znieczulenia ogólnego, czas wybudzania również będzie zależał od temperatury wody (tab. 3).

TABELA 3

Czas indukcji i czas wybudzania ze znieczulenia ogólnego wywołanego 2-fenoksyetanolem w stężeniu 0,6 ml/l (wg Hamackovej i in. 2004)

Temperatura wody (°C)	Indukcja (min)	Wybudzenie (min)
17,9	3,55±0,88	11,77±0,97
20,4	3,98±0,87	10,38±0,50
22,5	3,05±0,77	6,88±1,62
25,1	2,48±0,87	5,48±1,50

## Ocena stadium dojrzałości oocytów

Przystępując do oceny stadium dojrzałości oocytów należy postępować według standardów wypracowanych i powszechnie stosowanych dla ryb karpiovatych. Przed rozpoczęciem poboru oocytów należy przygotować płyn Serra (96% alkohol etylowy, 36-38% formaldehyd i lodowaty kwas octowy, w proporcji 6:3:1 v/v), roztwór anestetyku i odpijalnik. Dobrze jest również wyposażyć się w wodoodporny stoper, który umożliwi dokładną kontrolę czasu, jaki ryby spędzają w roztworze anestetyku. U lina,

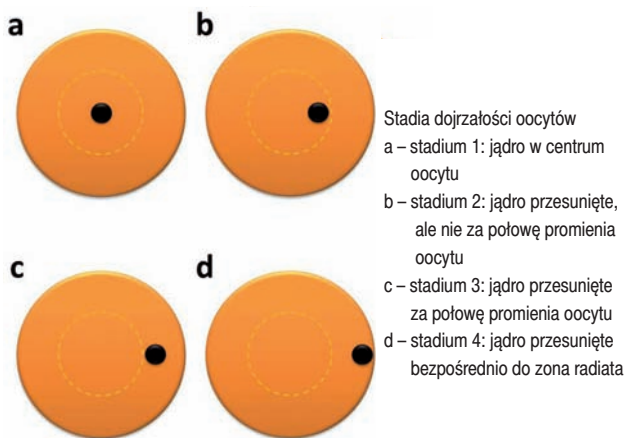


Fot. 3. Pobór oocytów za pomocą katetera.

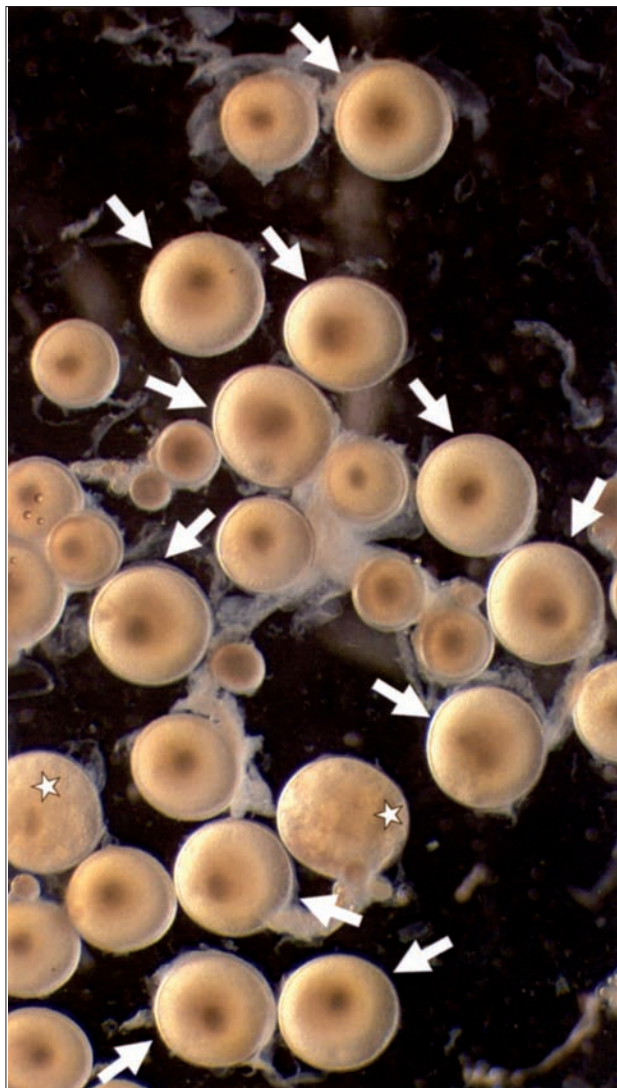
tak samo jak w przypadku jazia (Krejszeff i in. 2018) nie ma potrzeby badania każdej samicy indywidualnie. Dlatego oceny można dokonać na reprezentatywnej próbie liczącej maksymalnie 10% posiadanych samic, jednak nie mniej niż 10 osobników.

Wprowadzone w stan znieczulenia ogólnej samicy, po jednym osobniku, należy umieszczać na stole manipulacyjnym i za pomocą wprowadzonego w otwór płciowy katetera (cewnik do karmienia niemowląt o średnicy zewnętrznej 2,8 mm) pobrać próbkę około 50 oocytów. Pobrane oocyty należy niezwłocznie umieścić na szalce Petriego, zalać płynem Serra i odstawić na bok (fot. 3). Po pobraniu próbek od 4-5 samic należy przystąpić do oceny stadium dojrzałości według powszechnie stosowanego u ryb karpowatych czterostopniowego systemu oceny dojrzałości oocytów (rys. 1) (fot. 4).

Dokonyując oceny stadium dojrzałości oocytów należy pamiętać, że lin jest gatunkiem, który odbywa tarło porcyjne. W związku z tym w pobranej próbce oocytów znajdować się będą oocyty w różnych stadiach dojrzałości. Dlatego, z perspektywy kontrolowanego rozrodu, podczas oceny stopnia dojrzałości trzeba brać pod uwagę dwa parametry: odsetek tzw. największych oocytów oraz stopień ich



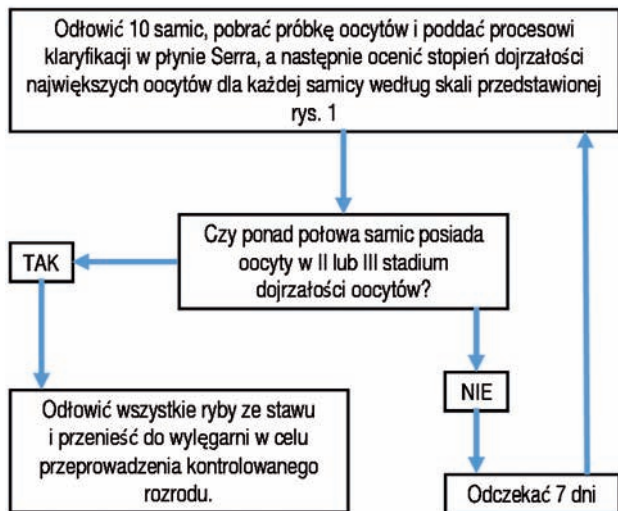
Rys. 1. Czterostopniowa skala stadiów dojrzałości oocytów (wg Brzuski i Bieniaza 1977).



Fot. 4. Przykładowy obraz oocytów lina po klawfikacji w płynie Serra. Łatwo można zauważyć różnej wielkości oocyty. Przy ocenie dojrzałości poszczególnych samic należy uwzględniać tylko największe komórki (wskazane strzałką) oraz pominąć oocyty uszkodzone w procesie cewnikowania (oznaczone gwiazdką).

dojrzałości. Ma to szczególne znaczenie w przypadku ryb dzikich, ponieważ wartość pierwszego parametru zależy od tego, w którym momencie sezonu rozrodczego znajduje się samica (do której „porcji” tarła samica będzie przystępować). W takim przypadku zaleca się, żeby do dalszych procedur rozrodczych przeznaczać samice, u których stwierdzono, że największe oocyty stanowią ponad 30% wszystkich oocytów (Targońska i in. 2012).

W przypadku ryb hodowlanych należy postępować zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 2. Zaleca się, aby w przypadku ryb przetrzymywanych w warunkach opisanych w rozdziale „Pozyskiwanie, transport i warunki przetrzymywania tarlaków” procedurę kontroli stopnia dojrzałości oocytów pierwszy raz przeprowadzić w połowie maja. W przypadku, gdy w pobranych próbkach oocyty nie będą jeszcze wystarczająco dojrzałe, kolejne kontrole



Rys. 2. Schemat postępowania z samicami lina przetrzymywanymi w stawie ziemnym przed sezonem rozrodczym, mający na celu określenie najlepszego momentu rozpoczęcia procedury kontrolowanego rozrodu (rys. Daniel Żarski).

należy prowadzić w 7-dniowych odstępach, jednak nie później niż do połowy czerwca.

## Stymulacja spermacji

Tak jak w przypadku wielu gatunków ryb karpiowatych (Cejko i in. 2010ab, 2011ab, 2014, Cejko i Krejszeff 2016), również w przypadku lina zalecane jest stosowanie stymulacji hormonalnej, w celu zwiększenia ilości oraz podniesienia jakości nasienia. Należy jednak zaznaczyć, że nie zostało jednoznacznie potwierdzone doświadczalnie, że w ten sposób można uzyskać większą objętość i lepszej jakości nasienie lina. Związane jest to z tym, że podczas manualnego pozyskiwania nasienia równocześnie pozyskuje się też mocz, który aktywując plemniki obniża jakość nasienia (Linhart i in. 1995, Caille i in. 2006, Cejko i in. 2010b).

W przypadku lina również należy przyjąć za regułę, że jako pierwsze poddawane są stymulacji hormonalnej samce. Według Caille i in. (2006) najlepszej jakości nasienie można uzyskać od samców 1 dobę od podania preparatu hormonalnego. Możliwe jest również używanie do zapłodnienia nasienia pozyskanego 2 lub 3 doby od przeprowadzenia iniekcji, jednak należy się liczyć z tym, że w przeliczeniu na kg masy ciała samców będzie go mniej (Caille i in. 2006). Dlatego w takim przypadku zaleca się użycie większej liczby ryb.

Do stymulacji hormonalnej samców lina zalecane są preparaty w skład których wchodzi analogi ssaczy lub łososiowych gonadoliberyn. Do najczęściej stosowanych specyfików tego typu należą Ovopel i Ovaprim, które oprócz wspomnianych powyżej analogów GnRH, zawierają również związki chemiczne będące antagonistami dopaminy. Preparat Ovopel sprzedawany jest w postaci granul.

W skład jednej granuli wchodzi 18-20 µg ssaczego analogu gonadoliberyny (GnRH) [(D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-Net)-mGnRH] oraz 8-10 mg metoklopramidu (Hotvath i in. 1997). Preparat Ovaprim sprzedawany jest w postaci oleistej cieczy. W skład 1 ml tego specyfiku wchodzi łososiowy analog GnRH [(D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-Net) sGnRH] oraz 10 mg domperidonu (Peter i in. 1993). Zalecane dawki poszczególnych preparatów przedstawione są w tab. 4.

TABELA 4

Zalecane warianty hormonalnej stymulacji samców lina (wg Cejko i in. 2010, S. Krejszeffa, dane niepublikowane)

Preparat hormonalny	Dawka (na kg masy ciała)	Optymalny czas pozyskania nasienia (po iniekcji)
Ovopel	1 granula	24-72 h
Ovaprim	0,5 ml	

Do procedury hormonalnej stymulacji samców można przystąpić tuż przed przeprowadzeniem procedury hormonalnej stymulacji samic. Można też zrobić to kilkadziesiąt godzin wcześniej, jednak trzeba pamiętać, że nie jest zalecane używanie do zapłodnienia jaj nasienia pozyskanego później niż 72 godziny po podaniu preparatu hormonalnego.

Procedurę hormonalnej stymulacji samców lina należy przeprowadzić według następującego schematu. W pierwszej kolejności należy przygotować preparat hormonalny. Ovopel rozciera się w moździerzu lub homogenizatorze z niewielką ilością płynu fizjologicznego. Przygotowaną w ten sposób zawiesinę rozcieńcza się tak, żeby w 1 ml znajdowała się jedna granula. Tak rozcieńczoną zawiesinę należy podawać w ilości 1 ml w przeliczeniu na 1 kg masy ciała samców. Preparat Ovaprim jest produkowany w postaci gotowego do iniekcji płynu. Zalecana dawka, w przeliczeniu na 1 kg masy ciała młeczaka, wynosi 0,5 ml. Następnie należy przygotować roztwór anestetyku i odpijalnik (fot. 5). Upewniwszy się, że wszystkie niezbędne akcesoria i sprzęt pomocniczy są odpowiednio przygotowane można przystąpić do iniekcji.



Fot. 5. Prawidłowo przygotowany zbiornik z roztworem anestetyku (z lewej) i zbiornik do wybudzania ryb (z prawej).

Każdego samca, po uprzednim wprowadzeniu w stan znieczulenia ogólnego, należy zważyć i umieścić na stole manipulacyjnym. Zaleca się, żeby iniekcje wykonywać dootrzewnowo pod płetwę brzuszną, wprowadzając igłę na głębokość około 0,5 cm. Preparat należy dozować z dokładnością do 50 g masy ciała samca. Po przeprowadzeniu iniekcji rybę należy niezwłocznie umieścić w odpijalniku, a gdy się wybudzi i odzyska równowagę przenieść z powrotem do basenu tarlakowego. W trakcie całego procesu stymulowania spermacji temperaturę wody należy utrzymywać na poziomie 19-22°C, a fotoperiod na poziomie 14L:10D.

## Stymulacja owulacji

Wywołanie owulacji u lina jest możliwe wyłącznie po zastosowaniu stymulacji hormonalnej. Tak samo jak w przypadku samców, również samicom lina zaleca się podawanie preparatów, w skład których wchodzi analogi ssacyjnych lub łososiowych gonadoliberyn (Ovopel i Ovaprim), które zawierają związki chemiczne będące antagonistami dopaminy (Kujawa i in. 2011, Żarski 2011). Zalecane dawki poszczególnych preparatów lub ich kombinacji przedstawione są w tab. 5. W celu wywołania owulacji u lina preparaty hormonalne można podawać w jednej (Kouril i in. 2007, Kucharczyk i in. 2007, Żarski 2011, Targońska i in. 2012) lub w dwóch dawkach (Kujawa i in. 2011). Z doświadczenia autorów niniejszego opracowania wynika jednak, że lepsze efekty daje podwójna stymulacja hormonalna. W związku z tym w kontrolowanym rozrodzie samic lina zaleca się aplikowanie preparatów hormonalnych rozłożonych na dwie iniekcje.

**TABELA 5**

Zalecane warianty hormonalnej stymulacji samic lina (wg Kujawy i in. 2011, Żarskiego 2011, S. Krejszeffa, dane niepublikowane)

Preparat hormonalny	Dawka (na kg masy ciała)		Spodziewany czas owulacji (po II iniekcji)
	I iniekcja	II iniekcja	
Ovopel	0,2 granuli	1 granula	12-16 h
Ovaprim	0,1 ml	0,5 ml	
Ovopel + Ovaprim	0,2 granuli	0,5 ml	

Procedurę hormonalnej stymulacji samic lina należy przeprowadzić podobnie jak hormonalną stymulację samców. W pierwszej kolejności należy przygotować preparat hormonalny. Przygotowując do pierwszej iniekcji Ovopel, rozarte w moździerz lub homogenizatorze granule należy rozcieńczyć płynem fizjologicznym tak, żeby w 5 ml przygotowanej zawiesiny znajdowała się jedna granula preparatu. Natomiast w przypadku drugiej iniekcji tak, żeby w 1 ml przygotowanej zawiesiny znajdowała się jedna granula preparatu. W obu przypadkach przygotowaną zawiesinę należy podawać w dawce 1 ml w przeliczeniu na 1 kg masy ciała samic.

Ovaprim należy rozcieńczyć w alkoholu etylowym. W celu przeprowadzenia pierwszej iniekcji preparat trzeba rozcieńczyć tak, żeby przygotowany roztwór zawierał 1 część preparatu i 9 części alkoholu. W drugiej iniekcji należy podać czysty preparat w dawce 0,5 ml w przeliczeniu na 1 kg masy ciała samic. Można również zrezygnować ze stosowania Ovaprimu w pierwszej iniekcji, zastępując go Ovopelem, tak jak to jest zalecane w przypadku hormonalnej stymulacji samic jazia (Jamróz i in. 2008, Krejszeff i in. 2018).

Przed podaniem preparatu hormonalnego każdą samicę należy wprowadzić w stan znieczulenia, zważyć i umieścić na stole manipulacyjnym. Specyfik należy podać, zarówno podczas pierwszej, jak i drugiej iniekcji, dozując go z dokładnością do 50 g masy ciała ryb (fot. 6 i 7). Po przeprowadzeniu zabiegu samice jak najszybciej wybudzić i przenieść z powrotem do basenu tarlakowego. Obie iniekcje przeprowadzić w 12-godzinny odstępie czasu. Oprócz stymulacji hormonalnej należy również przeprowadzić stymulację termiczną i świetlną. Po pierwszej iniekcji temperaturę wody w RAS tarlakowym należy podnieść od 19,0 do 21,0°C, a fotoperiod wydłużyć do 14L:10D. Po przeprowadzeniu drugiej iniekcji temperaturę w RAS tarlakowym podnieść od 21,0 do 23,0°C i nie zmieniać fotoperiodu.



Fot. 6. Pomiar masy ciała samicy.



Fot. 7. Hormonalna stymulacja samicy lina.

## Pozyskiwanie gamet

W przypadku ryb karpiowatych, między innymi jazia, pozyskiwanie gamet rozpoczyna się od pozyskiwania nasienia (Krejszeff i in. 2018). Mlecz pobiera się za pomocą strzykawek. Tak pozyskane nasienie można przez kilka godzin przetrzymać w lodówce w temperaturze 4°C i wykorzystać do zapłodnienia w odpowiednim momencie. Taki rodzaj postępowania pozwala na przeprowadzenie manipulacji samicami bez zbędnego pośpiechu. Oprócz tego daje możliwość kontroli jakości nasienia. Umożliwia również jego dozowanie w odpowiedniej proporcji, w przeliczeniu na określoną masę pozyskanych jaj.

Ze względu na fakt, że podczas manualnego pozyskiwania nasienia równocześnie pojawia się też mocz, który aktywując plemniki obniża jakość nasienia (Linhart i in. 1995, Caille i in. 2006, Cejko i in. 2010b) pozyskiwanie gamet podczas kontrolowanego rozrodu lina należy rozpocząć od jaj. Samice po wprowadzenia w stan znieczulenia ogólnego należy wyjmować brzuchem do góry, starając się nie uciskać powłok brzusznych. Następnie, za pomocą ręcznika, delikatnie osuszamy powłoki ciała, zwracając szczególną uwagę na okolice otworu płciowego. Ponieważ nie jest możliwe całkowite osuszenie skrzelii, należy je zabezpieczyć przed wydostającą się z nich wodą. Można to zrobić owijając głowę ryby ręcznikiem. Pozyskiwanie ikry należy przeprowadzać poprzez delikatny masaż powłok brzusznych samicy. Poczynając od głowy w kierunku otworu płciowego (fot. 8). Do momentu zapłodnienia pozyskaną ikrę należy przetrzymywać w misce pod przykryciem. Po pozyskaniu ikry samice trzeba jak najszybciej wybudzić i przenieść z powrotem do basenu tarlakowego.

Niezwłocznie po pozyskaniu jaj należy przystąpić do pozyskania nasienia. Po wprowadzeniu w stan znieczulenia ogólnego, samce układają na stole manipulacyjnym i za pomocą ręcznika osuszają powłoki ciała, zwracając szczególną uwagę na okolice otworu płciowego. Po zabezpieczeniu skrzelii przystąpić do pobierania nasienia. Poprzez delikatny masaż powłok brzusznych (ruchem posuwistym



Fot. 8. Pobór ikry.



Fot. 9. Pobór nasienia bezpośrednio na ikrę.

w kierunku od głowy ku otworowi płciowemu samca) nasienie należy pozyskiwać bezpośrednio do miski z ikrą (fot. 9). Na porcję ikry wytartej od jednej samicy użyć porcję nasienia pozyskanego od jednego samca. Po pobraniu nasienia samce jak najszybciej wybudzić i przenieść z powrotem do basenu tarlakowego.

## Zapłodnienie i pozbawianie jaj kleistości

W przypadku ryb karpiowatych roztwory do pozbawiania jaj kleistości zazwyczaj przygotowuje się po pozyskaniu gamet. Zaleca się, żeby u lina zrobić to wcześniej. Ze względów praktycznych naważki poszczególnych odczynników służących do sporządzenia roztworu Woynarovicha oraz roztwór taniny (Woynarovich i Horváth 1980) najlepiej jest przygotowywać w przeliczeniu na 10 l wody. W takim przypadku należy odważyć 30 g chlorku sodu i 40 g mocznika oraz 5,0-8,0 g taniny. Sporządzone naważki rozpuścić w tzw. wodzie wylęgarniczej (krążącej w RAS, w którym inkubowane będą jaja).

Zapłodnienie i pozbawianie jaj kleistości należy przeprowadzić w następujący sposób. Pozyskaną ikrę i nasienie dokładnie wymieszać, zalać niewielką ilością „wody wylęgarniczej” i intensywnie mieszać plastikową łyżką przez mniej więcej 1 minutę (fot. 10). Następnie zapłodnioną ikrę zalać roztworem Woynarovicha w ilości około 10-20% objętości jaj i nieprzerwanie mieszać plastikową łyżką (fot. 11). W kilkunastominutowych interwałach należy dodawać kolejne porcje płynu, równocześnie pozbywając się części (maksymalnie do 50%) roztworu. Po mniej więcej 1,0-1,5 godzinie należy zlać roztwór i przeprowadzić dwukrotną kąpiel jaj (2 x 15 s) w roztworze taniny. Między kąpielami jaja



Fot. 10. Zapładnianie ikry lina z zastosowaniem czystej „wody wylęgarnicznej”.



Fot. 11. Kąpiel ikry lina w roztworze Woynarovicha.

przepłukiwać czystą „wodą wylęgarniczą” (Woynarovich i Horváth 1980). Jaja pozbawione w ten sposób kleistości należy obsadzić na aparacie wylęgarniczym.

### Inkubacja jaj i klucie zarodków

Inkubację ikry lina należy prowadzić w stojach inkubacyjnych Weissa (fot. 12). Okres inkubacji będzie zależał przede wszystkim od temperatury wody. Za optymalny, podczas inkubacji jaj lina, uznaje się zakres temperatur 20-25°C. Zależność pomiędzy temperaturą a czasem inkubacji przedstawia rys. 3. Do przeprowadzenia inkubacji ikry zaleca się stosowanie RAS inkubacyjnych wyposażonych w filtrację mechaniczną. Ze względu na krótki czas inkubacji (kilka dni) nie jest konieczne wyposażanie tych systemów w filtrację biologiczną.

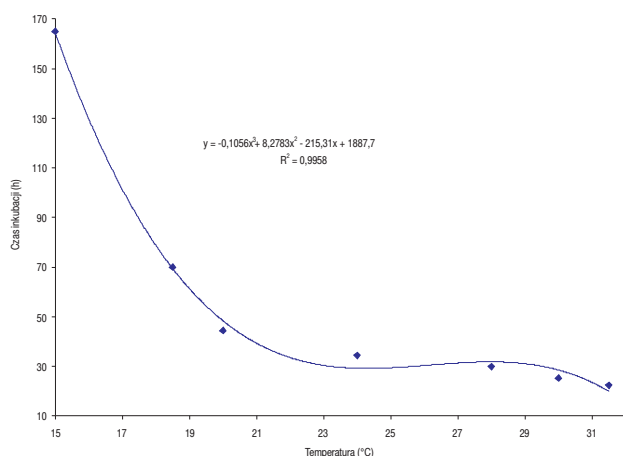
Na kilka godzin przed przewidywanym momentem wyklućcia (wstępnego oszacowania można dokonać za pomocą danych zestawionych na rys. 3) należy rozpoznać moment gotowości larw do „wymuszonego klucia”. W tym



Fot. 12. Ikra lina na początku inkubacji (po lewej) oraz po ok. 20 h inkubacji (po prawej) w stojach Weissa.

celu trzeba pobrać około 50 jaj i umieścić je na szalce Petriego i odstawić na 30 minut. Następnie należy określić odsetek wyklućtych larw. Jeśli liczba wyklućtych larw będzie mniejsza niż 50%, kolejne rozpoznanie wykonać nie wcześniej niż po 4-6 h.

Jeśli rozpoznanie gotowości larw do klucia zakończy się pozytywnie (ponad 50% wyklućtych zarodków), przystąpić do „wymuszonego klucia”. W tym celu należy zamknąć dopływ wody do aparatu inkubacyjnego oraz odebrać (zlewarować) około 15% wody ze stoja (uwzględniając, aby nie usunąć razem z wodą klujących się larw lub ikry). W zależności od zachowania zarodków (nasilenie klucia), po 10-30 minutach zlewarować ikrę do miski, którą następnie należy w całości wypełnić wodą. Następnie zawartością miski delikatnie zamieszać, tak aby ikra wraz z wyklućtymi larwami zebrały się w centrum pojemnika. Odpowiednie rozpoznanie momentu klucia sprawia, że podczas mieszania ostonki jajowe unoszą się w toni wody, podczas gdy wyklućte larwy zbierają się w centrum miski przy dnie. Następnie należy odlewać ostonki poza miskę (również poza RAS), uważając, aby nie usuwać wyklućtych larw. Czynność tę powtarzamy do momentu, gdy na dnie miski pozostanie jedynie wylęg lina.



Rys. 3. Zależność pomiędzy temperaturą a czasem inkubacji na podstawie danych uzyskanych przez Geldhauser (1995) oraz Korzelecką-Orkisz i in. (2009).



## Podsumowanie

Proponowana w ramach niniejszego opracowania procedura rozrodu lina w warunkach kontrolowanych jest wynikiem kilkuletniego doświadczenia i intensywnych prac badawczych dążących do jej standaryzacji. Należy jednak w tym miejscu podkreślić, że nie jest to jedyna metoda umożliwiająca pozyskiwanie larw w warunkach kontrolowanych. W związku z tym zaleca się, aby do opisywanych powyżej metod podchodzić z pewną dozą krytycyzmu, weryfikować każdy etap z perspektywy własnych doświadczeń, jak również konfrontować z dotychczas opublikowanymi danymi, które można odnaleźć w cytowanych poniżej publikacjach naukowych.

## Podziękowania

Autorzy dziękują Panu prof. dr. hab. Zdzisławowi Zakęsiowi za cenne merytoryczne uwagi przy powstawaniu niniejszej pracy.

## Literatura

Berka R. 1986 – The transport of live fish. A review – EIFAC Technical Paper No. 48.

Brzuska E., Bieniarz K. 1977 – Metoda przyżyciowego określania dojrzałości płciowej samic karpia w związku z iniekcjami homogenatu przysadki mózgowej karpia – Broszura Nr 105, Wyd. IRS, Olsztyn.

Caille N., Rodina M., Kocour M., Gela D., Flajshans M., Linhart O. 2006 – Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments – Aquacult. Int. 14(1-2): 75-78.

Cejko B.I., Kowalski R.K., Kucharczyk D., Targońska K., Krejszef S., Żarski D., Glogowski J. 2010a – Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. – Aquacult. Res. 41(6): 804-813.

Cejko B.I., Kowalski R.K., Kucharczyk D., Żarski D., Targońska K., Glogowski J. 2011a – Effect of time after hormonal stimulation on semen quality indicators of common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae) – Acta Ichthyol. Piscat. 41(2): 75-80.

Cejko B.I., Krejszef S. 2016 – Sperm characteristics of chub *Leuciscus cephalus* (L.) collected in artificial condition after Ovopel and Ovaprim treatment – Aquacult. Res. 47(3): 847-856.

Cejko B.I., Krejszef S., Judycka S., Sarosiek B., Dietrich M., Kucharczyk D., Kowalski R.K. 2014 – Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio* L. – Aquacult. Int. 22(1): 111-122.

Cejko B.I., Krejszef S., Żarski D., Targońska K., Kucharczyk D., Glogowski J. 2011b – The effectiveness of selected hormonal preparations in stimulating the spermatation of the chub *Leuciscus cephalus* (L.). – Pol. J. Nat. Sci. 26(3): 235-245.

Cejko B.I., Żarski D., Targońska K., Krejszef S., Kucharczyk D., Glogowski J. 2010b – Osmolality of seminal plasma as an indicator of milt contamination with urine based on the example of the tench *Tinca tinca* (L.) – Pol. J. Nat. Sci. 25(3): 287-298.

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 – Aquacult. Int. 14(1-2): 195-203.

Geldhauser F. 1995 – Some aspects of embryonic and larval development of tench (*Tinca tinca* (L.)) – Pol. Arch. Hydrobiol. 42(1-2): 87-95.

Gilderhus P.A., Marking L.L. 1987 – Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout – N. Am. J. Aquacult. 7(2): 288-292.

Hamáčková J., Lepičová A., Kozak P., Stupka Z., Kouřil J., Lepič P. 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature – Vet. Med.-Czech 49(12): 467-472.

Horváth L., Szabo T., Burke J. 1997 – Hatchery testing of GnRH analogue-containing pellets on ovulation in four cyprinid species. Pol. Arch. Hydrobiol. 44(1-2): 221-226.

Jamrůz M., Kucharczyk D., Hakuć-Błażowska A., Krejszef S., Kujawa R., Kupren K., Kwiatkowski M., Targońska K., Żarski D., Cejko B.I., Glogowski J. 2008 – Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim, and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L.) – Arch. Pol. Fish. 16(4): 363-370.

Korzelecka-Orkisz A., Bonistawska M., Pawlos D., Szulc J., Winnicki A., Formicki K. 2009 – Morphophysiological aspects of the embryonic development of tench (*Tinca tinca* (L.)) – EJPAA 12(4): #21

Kouřil J., Svoboda M., Hamáčková J., Kaláb P., Kolářová J., Lepičová A., Sedova M., Savina L., Moreno Rendón P., Svobodová Z., Barth T., Vykusová B. 2007 – Repeated administration of different hormonal preparations for artificial propagation and their effects on reproduction, survival and blood biochemistry profiles of female tench (*Tinca tinca* L.) – Czech J. Anim. Sci. 52(6): 183-188.

Krejszef S., Żarski D., Cieśla M. 2018 – ABC kontrolowanego rozrodu jazia – Komun. Ryb. 164(3): 10-18.

Kucharczyk D., Kujawa R., Mamcarz A., Targońska K., Krejszef S., Wyszomirska E. 2007 – Artificial spawning of common tench (*Tinca tinca* L.) collected from wild populations – Pol. J. Nat. Sci. 22(1): 107-115.

Kujawa R., Kucharczyk D., Mamcarz A., Żarski D., Targońska K. 2011 – Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) obtained from wild and domestic stocks – Aquacult. Int. 19(3): 513-521.

Linhart O., Peter R.E., Rothbard S., Zohar Y., Kvasnička P. 1995 – Spermatation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract – Aquaculture 129(1-4): 119-121.

Mamcarz A., Skrzypczak A. 2006 – Changes in commercially exploited populations of tench, *Tinca tinca* (L.), in littoral zones of lakes of north-eastern Poland – Aquacult. Int. 14(1-2): 171-177.

Mamcarz A., Targońska K., Kucharczyk D., Kujawa R., Żarski D. 2011 – Effect of live and dry food on rearing of tench (*Tinca tinca* L.) larvae under controlled conditions – Ital. J. Anim. Sci. 10(1):42-46.

Norma branżowa. BN-83/9147-04. 1983 – Ryby hodowlane. Przewóz materiału zarybieniowego karpia – Wydawnictwa Normalizacyjne, Warszawa.

Nowosad J., Żarski D., Biłas M., Dryl K., Krejszef S., Kucharczyk D. 2013 – Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions – Aquacult. Int. 21(3): 629-637.

Peter R.E., Lin H.R., Van Der Kraak G., Little M. 1993 – Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning – W: Recent Advances in Aquaculture, vol. 4 (Red.) F. Muir, R.J. Roberts. Blackwell, Oxford: 25-30.

Rodríguez R., Celada J.D., Sáez-Royuela M., Carral J.M., Aguilera A., Melendre P.M. 2008 – Egg production of tench (*Tinca tinca* L.) kept in semi-intensive culture conditions – Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.: 388 (04).

Skrzypczak A., Mamcarz A. 2006 – Changes in commercially exploited populations of tench, *Tinca tinca* (L.) in lakes of Northeastern Poland – Aquacult. Int. 14(1-2):179-193.

Steffens W. 1995 – The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species – Pol. Arch. Hydrobiol. 42(1-2): 161-180.

Targońska K., Perkowski T., Żarski D., Krejszef 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 – Ital. J. Anim. Sci. 11(2): 164-168.

Trzebiatowski R., Stepanowska K., Siwicki A.K., Kazuń K. 1996 – The observations of Propiscin efficiency for total anaesthetisation of wels (*Silurus glanis*) – Komun. Ryb. 30(1): 14-18.

Wolnicki J., Korwin-Kossakowski M. 1993 – Survival and growth of larval and juvenile tench, *Tinca tinca* L., fed different diets under controlled conditions – Aquacult. Res. 24(6): 707-713.

Wolnicki J., Myszkowski L., Kaminski R. 2003 – Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) – J. Appl. Ichthyol. 19(3): 157-160.

Wolnicki J., Myszkowski L., Korwin-Kossakowski M., Stawny A. 2006 – Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions – Aquacult. Int. 14(1-2): 89-98.

Wojnarovich E., Horváth L. 1980 – The artificial propagation of warm-water finfishes a manual for extension – FAO Technical Paper No. 201.

Żarski D. 2011 – The effect of application of new spawning agents in artificial reproduction of wild common tench, *Tinca tinca* (L.) – Pol. J. Nat. Sci. 26(1): 65-73.