

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,  
Polska Akademia Nauk

## **Pneumatyczna metoda pozyskiwania ikry - możliwości aplikacyjne w rozrodzie ryb dziko żyjących**

Pod redakcją:

Prof. dr hab. Jana Glogowskiego

8-9 maj 2014 roku

Olsztyn

Unia Europejska  
Europejski  
Fundusz  
Rybacki



Operacja współfinansowana przez Unię Europejską ze środków finansowych Europejskiego Funduszu Rybackiego zapewniającą inwestycję w zrównoważone rybołówstwo

## **Wydawca**

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,

Polska Akademia Nauk

ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Tel: 0 89 523 46 86

Fax: 0 89 524 01 24

<http://www.pan.olsztyn.pl>

Redakcja techniczna: Radosław Kowalski

Projekt okładki: Radosław Kowalski

Wydanie materiałów konferencyjnych współfinansowane ze środków Unii Europejskiej z funduszy Programu Operacyjnego "Zrównoważony rozwój sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich 2007-2013" (akronim PO RYBY; Oś priorytetowa 3.5 - Projekty Pilotażowe) w ramach operacji pt. „Pneumatyczna metoda pozyskiwania ikry ryb - możliwości aplikacyjne oraz wpływ na parametry jakościowe i ilościowe gamet oraz dobrostan tarlaków” (akronim: PNEUFISH).

Umowa o dofinansowanie nr 00002-61724-OR1400001/10.

© Copyright by

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Olsztyn 2014

**ISBN 978-83-939121-6-2**

**Druk:** UpHotel s.c., ul. Długa 13/1, 58-500 Jelenia Góra

## Spis treści

Wprowadzenie .....	4
Jakość oocytów ryb – sposoby ewaluacji i czynniki negatywnie wpływające na ich zdolność do zapłodnienia .....	5
Pneumatyczna metoda pobierania oocytów ryb – innowacyjne narzędzie akwakultury .....	18
Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie siei ( <i>Coregonus lavaretus</i> ) .....	25
Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie szczupaka ( <i>Esox lucius</i> ) .....	34
Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia ( <i>Salmo salar</i> ) i troci ( <i>Salmo trutta m. trutta</i> ) .....	41

## Wprowadzenie

W kontrolowanym rozrodzie, zarówno hodowlanych, jak i dziko żyjących gatunków ryb, ważnym etapem decydującym o sukcesie lub niepowodzeniu reprodukcji jest sposób pozyskiwania gamet, a zwłaszcza oocytów (ikry). Pozyskiwanie produktów płciowych dobrej jakości poprzedzone winno być właściwym żywieniem tarlaków, a w przypadku niektórych gatunków także efektywną stymulacją hormonalną.

Aktualnie stosowanym w praktyce sposobem pozyskiwania ikry było jedynie klasyczne „wycieranie” polegające na mniej lub bardziej intensywnym ucisku powłok brzusznych, powodującym wydostawaniem się oocytów z ciała samicy. Procedura ta mimo szeregu zalet ma jednak i wady. W trakcie, zwłaszcza nieumiejętnego, wycierania dojść bowiem może do uszkodzenia znacznego odsetka ikry, pozbawienia śluzu a tym samym bariery mikrobiologicznej ochrony tarlaków, a nawet uszkodzenia powierzchni skóry, co w następstwie prowadzi do infekcji, zwłaszcza grzybiczych. Często po wytarciu konieczna jest dezynfekcja tarlaków w celu uniknięcia śnięć. Podraża to koszty produkcji materiału obsadowego lub zarybieniowego i tym samym wpływa na ekonomię zakładów uprawiających akwakulturę.

Z dużym uznaniem należy odnieść się zatem do próby opracowania i wdrażania do praktyki rybackiej innowacyjnej, pneumatycznej metody pozyskiwania ikry, podjętej przez Zespół kierowany przez doktora Radosława Kowalskiego. Zaproponowana przez niego i wytworzona aparatura umożliwia nie tylko dobór odpowiedniego ciśnienia i szybkości przepływu gazu, ale także uzyskania powietrza, czystego tlenu lub azotu, co ma istotne znaczenie w aspekcie dostosowania procedury tarła pneumatycznego dla różnych gatunków ryb.

Zespół opracował już, poparte właściwymi metodami badań podstawowych, procedury tarła pneumatycznego dla kilku (pstrąg tęczowy, palia, sieja, szczupak, troć łosoś), zarówno dziko żyjących, jak i hodowlanych gatunków ryb, które z powodzeniem stosowane są w niektórych zakładach hodowlanych i mogą być wdrożone do szerokiej praktyki rybackiej, przynosząc konkretne efekty ekonomiczne.

Mam nadzieję, że Zespół pod kierownictwem doktora Radosława Kowalskiego w niedługim czasie opracuje skuteczne procedury tarła pneumatycznego dla ryb karpioatych, a zwłaszcza jesiotrowatych, co z pewnością spotka się z uznaniem i wdrożeniem tej biotechniki zarówno przez hodowców różnych gatunków jesiotra, jak i producentów kawioru.

Prof. dr hab. Jan Głogowski

## **Jakość oocytów ryb – sposoby ewaluacji i czynniki negatywnie wpływające na ich zdolność do zapłodnienia**

*Daniel Źarski*

*Katedra Rybactwa Jeziorowego i Rzecznego, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn*

### **Wstęp**

Kontrolowany rozród ryb jest pierwszym i tym samym niezwykle ważnym etapem intensywnej produkcji ryb. Pod pojęciem kontrolowanego rozrodu kryje się cały zespół zabiegów mających na celu uzyskanie wysokiej jakości larw od dojrzałych płciowo ryb (Źarski 2014). W efekcie, w ramy kontrolowanego rozrodu można wpisać wszelkie czynności hodowlane od oceny zdolności rozrodczej ryb, aż po wykluwanie larw w warunkach wylęgarnicznych.

Jednym z ważniejszych etapów kontrolowanego rozrodu jest ocena jakości gamet. Aspekt ten jest niezwykle istotny zwłaszcza z hodowlanego punktu widzenia, gdyż to właśnie na tym etapie podejmowana jest decyzja o przeznaczeniu konkretnej partii gamet do dalszych procedur hodowlanych (tj., zapłodnienia i inkubacji) bądź też odrzuceniu ich z dalszych etapów produkcji. Decyzja ta może wpłynąć w bezpośredni sposób na efektywność dalszych etapów hodowlanych, ponieważ w przypadku przeznaczenia do zapłodnienia złej jakości gamet, a następnie inkubacji jaj, podejmowane jest czasem bardzo duże ryzyko. Dotyczy to nie tylko nieuzasadnionego wykorzystania urządzeń wylęgarnicznych (i tym samym możliwości ponoszenia zbędnych kosztów funkcjonowania takich urządzeń) ale również obniżenia stanu sanitarnego tych urządzeń. Zastosowanie niskiej jakości jaj bądź nasienia bardzo często skutkuje bowiem niskim odsetkiem przeżywalności embrionów w trakcie ich inkubacji, a nierozwijające się jaja prawie zawsze są narażone na infekcje (bakteryjne, pierwotniacze oraz grzybicze), które mogą stanowić poważne zagrożenie dla jaj rozwijających się prawidłowo (Ciereszko i in. 2009). To z kolei może wpłynąć negatywnie na ilość możliwego do uzyskania wylęgu, i to nie tylko z partii ikry o niskiej jakości, ale również z partii inkubowanych równolegle (początkowo charakteryzujących się wysoką jakością) w tym samym urządzeniu wylęgarnicznym. Zwłaszcza jeśli do produkcji stosowane są zamknięte systemy hodowlane. Ponadto, inkubacja partii ikry o niskiej przeżywalności embrionów indukuje wyższe koszty pracy związane z obsługą urządzeń wylęgarnicznych spowodowanych

koniecznością przyłożenia znacznie większej uwagi do usuwania nierozwijających się jaj bądź prowadzeniem innych zabiegów profilaktyczno-leczniczych.

W akwakulturze w większości przypadków znacznie większym problemem jest ocena jakości jaj aniżeli nasienia. Ocena jakości nasienia nie stanowi zazwyczaj większych problemów i do wstępnej ewaluacji jego przydatności do dalszych etapów kontrolowanego rozrodu wystarcza określenie odsetka ruchliwych plemników pod mikroskopem świetlnym (Targońska i in. 2011). Natomiast obiektywna ocena jakości jaj stanowi duże wyzwanie nie tylko dla hodowców, lecz również dla naukowców.

Z biologicznego punktu widzenia „jakość jaj” jest terminem określającym zdolność jaja do bycia zapłodnionym, a następnie rozwinięcia się ich w „normalny embrion” (Bobe i Labbe 2010). Jakość jaj wyraża się najczęściej w procentach określając w ten sposób ogólną jakość danej partii ikry. Jednakże, należy sobie zdawać sprawę, że jakość biologiczna jaja rozwijającego się w „normalny embrion”, ale pochodzącego z partii ikry charakteryzującej się „niską jakością” (wytypowanej na podstawie ogólnego odsetka przeżywalności), nierzadko odbiega od właściwości biologicznej jaja reprezentującego partię ikry „wysokiej jakości”. Dlatego też należy dość ostrożnie podchodzić do tematu zarówno samej „jakości jaj” jak również metod ich oceny.

## **Przegląd metod ewaluacji jakości jaj w akwakulturze ryb słodkowodnych**

### *Przeżywalność embrionów*

Jedną z najpowszechniej stosowanych metod oceny jakości jaj jest określanie przeżywalności embrionów. Wskaźnik ten jest ogólnie akceptowalny zarówno w świecie naukowym jak również w branży rybackiej. Jednakże, z uwagi na różne podejście do „przeżywalności embrionów” ta sama partia ikry może zostać różnie oceniona. Obserwowane jest to przede wszystkim w przypadku porównania dwóch metod określania przeżywalności embrionów: w trakcie rozwoju embrionalnego (znajdującego się wciąż w jaju) oraz tuż po wykluciu (w stadium tzw. wolnego embrionu). Różnica ta wynika przede wszystkim z liczby parametrów, które można wziąć pod uwagę określając przeżywalność embrionów. W przypadku oceny jakości jaj w trakcie rozwoju embrionalnego (do momentu wyklucia) możliwe jest wskazanie wyłącznie czy embrion się rozwija czy nie. Dlatego też w literaturze spotyka się prosty wskaźnik, tzw. „przeżywalność embrionów”, który wyrażony jest w prostym układzie procentowym (Krejszeff i in. 2009, Żarski i in. 2012a). Jednakże, o jakości jaj świadczy również ocena jakości uzyskanego wylęgu. W takim przypadku parametrów charakteryzujących „jakość” jest nieco więcej. Przede wszystkim, zdolność embrionu do

spontanicznego wyklucia świadczy o jego wyższej jakości aniżeli embrionu niezdolnego do samodzielnego opuszczenia osłonki jajowej. Ponadto, już po samym wykluciu bardzo często określany parametrem jest odsetek deformacji embrionów, czego nie sposób ocenić przed wykluciem. Dlatego też, coraz częściej w literaturze można spotkać dane dotyczące nie tylko przeżywalności embrionów, ale również odsetka wyklucia czy też deformacji wolnych embrionów (Bobe i Labbe 2010, Żarski i in. 2011a, 2012b).

Określanie przeżywalności embrionów w trakcie inkubacji było jak dotąd prowadzone w różnym stadium rozwoju embrionalnego. Najczęściej, zwłaszcza w przypadku ryb karpiowatych, jakość ikry określano w stadium tzw. „zaoczkowania” (Targońska i in. 2011, 2012). Jednakże, w niektórych przypadkach (np. u ryb okoniowatych) ogólnie akceptowalne jest podawanie przeżywalności embrionów w stadium wcześniejszym (najczęściej w 72 h inkubacji) (Żarski i in. 2012c). Związane jest to z faktem, że nierozwijające się embriony mogą ulec rozpadowi w trakcie inkubacji, jak ma to miejsce przykładowo w przypadku sandacza, (*Sander lucioperca*), (Żarski i in. 2013), wpływając tym samym na zwiększenie się udziału jaj żywych w danej partii ikry. Ponadto, poprzez taki samoistny rozkład może dojść do infekcji grzybiczych i pierwotniaczych, co powoduje obumieranie jaj żywych. Należy jednak podkreślić, że przeżywalność embrionów ryb okoniowatych przeważnie utrzymuje się na podobnym poziomie od 72 h inkubacji do momentu zaoczkowania (Żarski i in. 2011, Alix i in. 2013), co umożliwia relatywnie obiektywną weryfikację odsetka zapłodnienia w tym właśnie stadium rozwoju.

Z gospodarczego punktu widzenia ocena jakości jaj na podstawie przeżywalności embrionów posiada bardzo dużą wadę, a mianowicie nie daje możliwości określania jakości jaj przed zapłodnieniem. To z kolei uniemożliwia odrzucenie lub zaakceptowanie do dalszych procedur kontrolowanego rozrodu konkretnych partii ikry. Istotne więc było opracowanie wskaźników jakości jaj przed ich zapłodnieniem lub w bardzo wczesnych fazach rozwojowych.

#### *Morfologia blastomerów*

Pierwsze doniesienie wskazujące na związek pomiędzy anormalnym wyglądem blastomerów w trakcie pierwszych podziałów komórkowych a jakością jaj pochodzi z początku XX w. Wówczas to Schrader i Schrader (1922) podali, że występowanie morfologicznie anormalnych (charakteryzujących się nieregularnym kształtem i zróżnicowaniem wielkościowym) blastomerów było skorelowane z niską jakością jaj sandacza amerykańskiego, (*Sander vitreus*). Przydatność tego wskaźnika została później

potwierdzona przez innych autorów między innymi dla dorsza, (*Gadus morhua*), (Hansen i Puvanendran, 2010), plamiaka, (*Melanogrammus aeglefinus*), (Rideout i in. 2004) czy też *Zebrasoma scopas* (Cuvier). Pomimo faktu, że wskaźnik ten jest relatywnie łatwy do określenia jak również łatwy do zastosowania w wylęgarni, to wciąż podstawowym problemem pozostaje przedział czasu niezbędny do przeprowadzenia oceny jakości jaj. Generalnie, o ile w przypadku ryb „ciepłolubnych” np. karp (*Cyprinus carpio*) pierwsze podziały następują w czasie kilku pierwszych godzin, to w przypadku ryb „zimnolubnych” np. miętus (*Lota lota*) okres czasu niezbędny do oceny morfologii blastomerów może wynieść nawet dwa dni. Dlatego też, metoda ta charakteryzuje się niską możliwością zastosowania w kontrolowanym rozrodzie wielu gatunków ryb.

#### *Makroskopowe wskaźniki morfologiczne*

W praktyce wylęgarniczej od zawsze stosowano wstępną ocenę jakości jaj na podstawie podstawowych cech morfologicznych całej partii ikry. Dotyczyło to przede wszystkim wielkości jaj, ich koloru, transparentności czy też występowanie białych (nieprzezroczystych) jaj w danej partii ikry. Jednakże, żaden z tych subiektywnych wskaźników nie umożliwił skutecznej kategoryzacji jaj pod względem ich jakości, o czym świadczy fakt, że do dnia dzisiejszego w akwakulturze ryb słodkowodnych praktycznie zawsze do dalszych procedur kontrolowanego rozrodu wykorzystuje się wszystkie pozyskiwane jaja, pomimo występujących wątpliwości opartych na wstępnej ocenie.

Z biologicznego punktu widzenia zarówno wielkość jak i kolor jaj nie świadczy o ich jakości, gdyż zarówno wielkość jak i kolor mogą się różnić nawet w obrębie jednego gatunku oraz tej samej populacji (Brooks i in. 1997, Mamcarz i Targońska 2008). Natomiast występowanie jaj mętnych bądź białych świadczy zdecydowanie o niskiej jakości tych konkretnych jaj i nie zawsze musi wskazywać na niską jakość całej partii ikry. Jaja białe (nieprzezroczyste) nierzadko są jajami uszkodzonymi w trakcie manualnego pozyskiwania ikry.

W przypadku okonia powszechnie uznawano, że pofragmentowanie taśmy jest wskaźnikiem jej niskiej jakości (Dąbrowski i in. 1994). Okazuje się jednak, że pofragmentowanie taśmy (która w przypadku ryb hodowlanych prawie zawsze jest owulowana w postaci pofragmentowanej nawet spontanicznie) nie zawsze świadczy o niskiej jakości jaj. Podobne zjawisko obserwowane było w trakcie rozrodu pozasezonowego okonia, gdzie ryby owulowały spontanicznie pofragmentowaną taśmę wysokiej jakości (Żarski D., dane niepublikowane). O ile pofragmentowanie taśmy nie zawsze świadczy o zupełnej



nieprzydatności danej partii ikry do dalszych etapów hodowli, o tyle pofragmentowane taśmy nierzadko charakteryzują się zdecydowanie obniżoną jakością w stosunku do taśm „zwartych”. Wszystko to sprawia, że możliwość zastosowania „makroskopowych wskaźników morfologicznych” w praktyce wylęgarniczej jest niewielka.

#### *Morfologia kropeł tłuszczu*

W przypadku gatunków ryb, których jaja posiadają widoczne krople tłuszczu (np. ryby łososiowate lub okoniowate) w kilku przypadkach potwierdzono możliwości zastosowania oceny rozmieszczenia, bądź też morfologii kropeł tłuszczu jako przydatnych wskaźników jakości jaj. Przykładowo, u pstrąga potokowego (*Salmo trutta fario*) oraz golca (*Salvelinus alpinus*), Mansour i in. (2007, 2008) raportowali, że charakter rozmieszczenia kropeł tłuszczu na powierzchni owulowanego jaja może być obiektywnym wskaźnikiem jakości jaj dla tej grupy ryb. Jednakże, Ciereszko i in. (2009) nie potwierdzili tej tezy w przypadku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Natomiast, w przypadku okonia Żarski i in. (2011a) udowodnili, że stopień pofragmentowania kropeł tłuszczu w owulowanych jajach jest skutecznym wskaźnikiem złej jakości jaj. Podobne zjawisko obserwowano również w przypadku sandacza (Żarski D., dane niepublikowane), co pozwala z dużym prawdopodobieństwem przypuścić podobną zależność pomiędzy stopniem pofragmentowania kropli tłuszczu a jakością jaj również u tego gatunku. Należy jednak podkreślić, że wskaźniki te pozwalają wskazać z dużym prawdopodobieństwem jedynie jaja złej jakości, natomiast nie zawsze jaja o „prawidłowej” morfologii kropeł tłuszczowych reprezentują najwyższą jakość.

#### *Intensywność reakcji korowej*

Niektórzy autorzy raportowali dotychczas, że stopień napęcznienia jaj ryb karpiowatych (Lahnsteiner i in. 2001) oraz łososiowatych (Lahnsteiner i in. 1999) istotnie pozytywnie korelował z jakością jaj. Świadczy to o tym, że im więcej jaja „wchłonęły” wody podczas pęcznienia tym wyższej jakości była ta konkretna partia ikry. Jednakże, w tym przypadku nie można było jednoznacznie wskazać „wartości” oraz „jednostki” wskaźnika, które powinny charakteryzować odpowiednio jaja niskiej lub wysokiej jakości. Biorąc pod uwagę dane prezentowane przez Lahnsteiner i in. (2001) można przypuścić, że intensywność reakcji korowej (warunkująca intensywność dyfuzji wody do przestrzeni prewitellarnej w trakcie „pęcznienia” jaj) może być dobrym wskaźnikiem jakości jaj u ryb słodkowodnych. W przypadku sandacza okazało się, że intensywność reakcji korowej wpływa na stopień „zniekształcenia jaj” w zaledwie kilka minut po ich aktywacji, co z kolei było pozytywnie skorelowane z ich jakością (Żarski i in. 2012b). O ile sam mechanizm reakcji korowej jest

relatywnie dobrze poznany (wskutek uwalniania zawartości pęcherzyków korowych do przestrzeni prewitellarnej w momencie aktywacji jaja następuje wzrost ciśnienia osmotycznego umożliwiającego dyfuzję wody do „wnętrza” jaja - Kjørsvik i Lønning 1983, Lahnsteiner i in. 2001), o tyle czynniki wpływające na różną intensywność reakcji korowej w przypadku jaj o różnej jakości pozostają jak dotąd niezrozumiałe. Nie mniej jednak, w przypadku sandacza obserwacja intensywności reakcji korowej (pomiędzy 3 a 5 minutą od aktywacji jaj) umożliwia wytypowanie jaj wysokiej jakości z dużym prawdopodobieństwem. Jednakże, poza sandaczem jak dotąd nie udało się z powodzeniem zastosować tej metody u innych gatunków ryb (Żarski D., dane niepublikowane). Dlatego też, wciąż istnieje konieczność poszukiwania innych wskaźników jakości jaj, biorąc pod uwagę fakt, że mogą one być prawdopodobnie specyficzne gatunkowo.

#### *Parametry płynu owaryjnego*

W przypadku ryb łososiowatych w ostatnich latach okazało się, że istnieje istotna zależność pomiędzy jakością jaj a parametrami płynu owaryjnego. Lahnsteiner i in. (1999) udowodnili, że pH, zawartość białek oraz niektórych enzymów (np. aminotransferazy asparaginianowej) mogą stanowić obiektywny wskaźnik jakości jaj w przypadku troci jeziorowej (*Salmo trutta lacustris*). Jednakże, Barnes i in. (2003) nie potwierdzili przydatności pH płynu owaryjnego jako potencjalnego wskaźnika jakości jaj u czawyczy, (*Oncorhynchus tshawytscha*). Z kolei wzrost zawartości białek w płynie owaryjnym jest z dużym prawdopodobieństwem spowodowany wydostaniem się zawartości jaj (wskutek pęknięcia jaj wewnątrz ciała ryby) do płynu owaryjnego. Białka te po kontakcie z czystą wodą powodują jej zmętnienie, co zostało wykorzystane przez Wojtczak i in. (2004) do weryfikacji jakości jaj, wykorzystując fakt, że im więcej białka z pękniętych jaj (im większa mętność wody) tym niższa jakość całej partii ikry pochodzącej od konkretnej samicy. Ten prosty test jest z powodzeniem stosowany w praktyce kontrolowanego rozrodu ryb łososiowatych i umożliwia odrzucenie z dalszych procedur jaj niskiej jakości. Zależność pomiędzy zdolnością płynu owaryjnego do powodowania mętności wody (mierzonej spektrofotometrycznie) a jakością jaj została również potwierdzona w przypadku sandacza amerykańskiego. Wskaźnik ten okazał się być jednak skuteczny dopiero pod koniec sezonu rozrodczego tego gatunku (Dietrich i in. 2012), co sugeruje niską przydatność tej metody oceny jakości jaj u gatunków innych niż łososiowate.

## **Czynniki warunkujące jakość jaj w akwakulturze**

Na jakość jaj ryb ma wpływ cały szereg czynników związanych zarówno z procedurą samego kontrolowanego rozrodu (w przypadku ryb dzikich oraz hodowlanych) jak również z metodami wychowu tarlaków (w przypadku ryb hodowlanych). Z perspektywy kontrolowanego rozrodu należy rozgraniczyć potencjalny wpływ konkretnych czynników, w zależności od tego czy procedurze rozrodczej poddawane są ryby dzikie czy hodowlane. Jednym z takich czynników jest stres, który w przypadku ryb dzikich ma najprawdopodobniej znacznie większy wpływ na jakość jaj aniżeli u ryb hodowlanych. Zwłaszcza, że reakcja organizmu ryby na stresor może zależeć nawet od poziomu udomowienia ryb. Okazuje się, że ryby w pokoleniu F6 znacznie lepiej znosiły różnego rodzaju stresory aniżeli ryby w pokoleniu F1 (Doux fils i in. 2011). Jednakże, należy sobie zdawać sprawę, że stres może wpłynąć również na efektywność rozrodu ryb hodowlanych. Dotyczy to zarówno ekspozycji na stres w okresie bezpośrednio poprzedzającym okres rozrodczy jak również okres wczesnej witellogenezy (Contreras-Sanchez i in. 1998, Schreck i in. 2001). Dlatego też, stres należy wskazać jako jeden z głównych czynników mogących mieć bezpośredni wpływ na jakość jaj w akwakulturze.

Kolejnym czynnikiem mającym bezpośredni wpływ na jakość jaj jest rodzaj pokarmu. O ile w przypadku rozrodu ryb dzikich, złowionych w trakcie sezonu rozrodczego hodowca nie ma dużego wpływu na rodzaj pokarmu tarlaków, o tyle w przypadku ryb hodowlanych sposób żywienia jest bardzo często kluczowym elementem warunkującym uzyskanie wysokiej jakości jaj (Izquierdo i in. 2001). Z czynników żywieniowych wpływających bezpośrednio na jakość oocytów bardzo ważne miejsce zajmują kwasy tłuszczowe. Ich poziom w paszy bezpośrednio wpływa na ich zawartość w jajach, przez co odpowiedni profil kwasów tłuszczowych jest jednym z najważniejszych komponentów pasz tarlakowych (Lavens i in. 1999). Na jakość jaj mają również wpływ inne składniki pasz (tj. witaminy, mikro i makroelementy) (Bobe i Labbe 2010). Bardzo ważne jest natomiast, że wymagania żywieniowe tarlaków są specyficzne gatunkowo i nie jest możliwe opracowanie jednej paszy odpowiedniej dla wszystkich gatunków ryb (Mommens i in. 2013). Dlatego też, odpowiednie żywienie tarlaków jest jednym z podstawowych czynników warunkujących sukces rozrodczy ryb hodowlanych.

Dotychczas udowodniono wielokrotnie, że procedura kontrolowanego rozrodu ma bezpośredni wpływ na jakość pozyskiwanych jaj. Jednym z ważniejszych czynników modulujących jest rodzaj stymulacji hormonalnej (Kucharczyk i in. 1998, 2008). Reakcja

organizmu ryby na rodzaj oraz dawkę preparatu hormonalnego ma bezpośredni wpływ na efektywność rozrodu. Związane jest to, między innymi, ze specyficzną gatunkowo reakcją organizmu ryby na dany preparat hormonalny lub jego dawkę. Przykładowo, dany rodzaj preparatu hormonalnego (np. analog gonadoliberyny w kompleksie z antagonistą dopaminy) pozwala uzyskać wysokiej jakości jaja u ryb karpowatych (Kucharczyk i in. 2008), podczas gdy u ryb okoniowatych prawie zawsze powoduje pozyskiwanie jaj o obniżonej jakości (Żarski i in. 2013). Ponadto, rodzaj preparatu hormonalnego może wpływać bezpośrednio na poziom stresu u ryb wpływając w sposób pośredni na jakość jaj (Falahatkar i Poursaeid 2014). Nie mniej jednak, zśród szeregu procedur kontrolowanego rozrodu, stymulacja hormonalna jest jednym z istotniejszych czynników wpływających na jakość jaj. Stąd też, dobór odpowiedniego preparatu hormonalnego oraz jego dawkowanie jest niezwykle istotnym elementem procedur rozrodczych.

Zśród szeregu elementów składających się na procedurę rozrodu ryb bardzo ważne miejsce zajmuje odpowiednia manipulacja warunkami środowiskowymi. Dotyczy to zarówno ryb dzikich jak i hodowlanych. W przypadku ryb dzikich, poddawanych procedurze rozrodczej w trakcie naturalnego sezonu rozrodczego najważniejszy wpływ ma temperatura, która po przekroczeniu wartości granicznych może wpłynąć na obniżenie jakości jaj. Dotyczy to przede wszystkim przypadków przekroczenia górnej granicy optymalnej, która powodowała obniżenie efektywności rozrodczej (Targońska i in. 2011b). W przypadku natomiast ryb hodowlanych oprócz temperatury istotne jest również odpowiednie dostosowanie długości dnia świetlnego (fotoperiodu) bezpośrednio wpływającego na gospodarkę hormonalną ryby i tym samym na przebieg procesu witellogenezy (Abdulfatah i in. 2011). Przy czym, należy sobie zdawać sprawę, że praktycznie każdy gatunek charakteryzuje się odmiennymi preferencjami dotyczącymi zarówno temperatury oraz długości dnia świetlnego. Zatem, te dwa czynniki zawsze powinny być rozpatrywane jako jedno z ważniejszych modulatorów jakości jaj w przypadku planowania kontrolowanego rozrodu ryb hodowlanych, bądź też pozasezonowego rozrodu ryb dzikich.

W praktyce kontrolowanego rozrodu bardzo często obserwuje się jeszcze jeden bardzo ważny czynnik wpływający na jakość pozyskiwanych jaj, którym jest tzw. „starzenie się jaj”. Pod tym terminem kryje się proces utraty jakości jaj wskutek ich niewydalania przez samice po owulacji (Bobe i Labbe 2010). W przypadku niektórych gatunków, jak przykładowo dzikie (bądź pochodzące z chowu stawowego) ryby okoniowate proces ten nie stanowi problemu gdyż samice „zrzucają” najczęściej ikrę samoistnie po wystąpieniu owulacji (Żarski i in.

2011b, 2012c). Natomiast w przypadku wielu innych gatunków (jak przykładowo pstrąg tęczy lub niektóre karpiozłoty ryby reofilne) „starzenie się jaj” jest istotnym problemem. W praktyce efekt tego procesu jest określany terminem „resorpcji”. W trakcie „starzenia się jaj” obserwuje się rozpad struktury jaj i uwalnianie ich zawartości do płynu owaryjnego co powoduje zmianę niektórych jego parametrów (np. pH, zawartości białek). Proces ten jest ściśle zależny od temperatury oraz gatunku (Bobe i Labbe 2010). W przypadku ryb łososiowatych jaja pozostawione po owulacji w ciele samicy przez 3 tygodnie (w temperaturze 2°C) nie utraciły zdolności do zapłodnienia (Samarin i in. 2008). Natomiast w przypadku *Rutilus kutum* (Kamensky) odnotowano niższą jakość jaj już po 24 lub 12 godzinach od owulacji w temperaturze, odpowiednio, 11 i 14°C (Samarin i in. 2011). Efektem poowulacyjnego „starzenia się jaj” jest nie tylko obniżony odsetek zapłodnienia, ale również obniżona jakość (np. wyrażona wysokim odsetkiem deformacji) (Bobe and Labbe 2010). Zatem, biorąc pod uwagę fakt, że „starzenie się jaj” może w bezpośredni sposób wpłynąć na efektywność całej operacji kontrolowanego rozrodu niezmiernie ważne jest aby w akwakulturze wielu gatunków ryb móc możliwie najprecyzyjniej określić moment owulacji.

## Podsumowanie

Jakość jaj w akwakulturze stanowi bardzo złożony temat. Prawdopodobieństwo wystąpienia wielu negatywnych czynników warunkujących jakość jaj jest bardzo duże. Natomiast czynniki te, następując kolejno po sobie, w efekcie mogą zamaskować negatywny wpływ innych. Dlatego też, do jakichkolwiek analiz efektywności konkretnych protokołów rozrodczych należy podchodzić z relatywnie dużą dozą krytycyzmu. Dotyczy to zarówno rozrodu ryb hodowlanych jak również ryb dzikich. Jednakże, należy szczególnie podkreślić, że o ile czynniki warunkujące jakość jaj w przypadku tych dwóch grup ryb (hodowlanych i dzikich) mogą być odmienne, o tyle konsekwencje są bardzo często zbliżone. Stąd, metody określania jakości jaj, choć w dużej mierze wciąż jeszcze poznane w relatywnie niewielkim stopniu, stanowią niezwykle ważne narzędzie w kontrolowanym rozrodzie ryb.

## Literatura

- Abdulfatah A., Fontaine P., Kestemont P., Gardeur J.N., Marie M. (2011): Effects of photothermal kinetics and amplitude of photoperiod decrease on the induction of the reproduction cycle in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 322:169–176
- Alix M., Schaerlinger B., Ledoré Y., Chardard D., Fontaine P. (2013): Developmental staging and deformities characterization of the eurasian perch *Perca fluviatilis*. *LARVI 2013*, 2-5 September 2013, Ghent, Belgium.

- Barnes M.E., Saylor W.A., Cordes R.J., Hanten R.P. (2003): Potential indicators of egg viability in landlocked fall chinook salmon spawn with or without the presence of overripe eggs. *North American Journal of Aquaculture* 65: 49–55.
- Bobe J., Labbe C. (2010): Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 535–548.
- Brooks S., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1997): Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 387–416.
- Ciereszko A., Wojtczak M., Dietrich G. J., Kuźmiński H., Dobosz S. (2009): A lack of consistent relationship between distribution of lipid droplets and egg quality in hatchery-raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 289: 150–153.
- Dąbrowski K., Ciereszko A., Ramseyer L., Culver D., Kestemont P. (1994): Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 120: 171–180.
- Dietrich M.A., Dabrowski K., Arslan M., Ware K., Van Tassell J. (2012): Quantifying quality attributes of walleye eggs prior to fertilization-Impact of time of 2 ovulation and gametes storage. *Journal of Great Lakes Research* 38: 445–450.
- Douxfils J., Mathieu C., Mandiki S.N.M., Milla S., Henrotte E., Wang N., Vandecan M., Dieu M., Dauchot N., Pigneur L.-M., Li, X., Rougeot C., Mélard C., Silvestre F., van Doninck K., Raes M., Kestemont P. (2011): Physiological and proteomic evidences that domestication process differentially modulates the immune status of juvenile Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) under chronic confinement stress. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 1113–1121.
- Falahatkar B., Poursaeid S. (2014): Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture International* 22:235–244.
- Hansen J.H., Puvanendran V. (2010): Fertilization success and blastomere morphology as predictors of egg and juvenile quality for domesticated Atlantic cod, *Gadus morhua*, broodstock. *Aquaculture Research* 41: 1791–1798.
- Izquierdo M.S., Ferná'ndez-Palacios H., Tacon A.G.J. (2001): Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25–42.
- Kjørsvik E., Lønning S. (1983): Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L.. *Journal of Fish Biology* 23: 1–12.

- Krejszeff S., Targońska K., Żarski D., Kucharczyk D. (2009): Domestication affects spawning of the ide (*Leuciscus idus*)-preliminary study. *Aquaculture* 295: 145–147.
- Kucharczyk D., Kujawa R., Mamcarz A., Skrzypczak A., Wyszomirska E. (1998): Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH + LH with pimozide or metoclopramide. *Aquaculture Research* 29: 131–136.
- Kucharczyk D., Targońska K., Żarski D., Kujawa R., Mamcarz A. (2008a): Review of the reproduction biotechnology for fish from the genus *Leuciscus*. *Archives of Polish Fisheries* 16: 319–340.
- Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner A. (1999): Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 375–388.
- Lahnsteiner F., Urbanyi B., Horvath A., Weismann T. (2001): Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture* 195: 331–352.
- Lavens P., Lebegue E., Jaunet H., Brunel A., Dhert Ph., Sorgeloos P. (1999): Effect of dietary essential fatty acids and vitamins of egg quality in turbot broodstocks. *Aquaculture International* 7: 225–240.
- Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R.A. (2007): Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture* 273: 744–747.
- Mansour N., Lahnsteiner F., McNiven M.A., Richardson G.F. (2008): Morphological characterization of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid postovulatory aging at 7 °C. *Aquaculture* 279: 204–208.
- Mommens M., Lanes C.F.C., Babiak I. (2013): Egg yolk nutritional constituents as indicators of egg quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture Research*, 2013: 1–11.
- Samarin A.M., Ahmadi M.R., Azuma T., Rafiee G.R., Amiri B.M., Naghavi M.R. (2008): Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under cold temperatures. *Aquaculture* 278: 195–198.
- Samarin A.M., Amiri B.M., Soltani M., Nazari R.M., Kamali A., Naghavi M.R. (2011): Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality in kutum *Rutilus frisii* *World Applied Sciences Journal* 15: 14–18.
- Schreck C.B., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M.S. (2001): Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197: 3–24.

- Schreck C.B. (2010): Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165: 549–556.
- Shrader F., Shrader S.P. (1922): Mortality in pike-perch eggs in hatcheries. Appendix V to the Report of the VS Commissioner of Fisheries for 1922. BF Doc No 926, 11 p.
- Mamcarz A., Tarońska K. (2008): Wybrane aspekty rozrodu karpiowatych ryb reofilnych w warunkach kontrolowanych. *Mercurius Kaczmarek Andrzej, Olsztyn*, 120 p.
- Targońska K., Kucharczyk D., Żarski D., Cejko B.I., Krejszeff S., Kupren K., Król R., Dryl K., Kowalski R.K., Glogowski J. (2011): Artificial reproduction of wild and cultured barbel (*Barbus barbus*, Cyprinidae) under controlled conditions. *Acta Veterinaria Hungarica* 59: 363–372.
- Targońska K., Kupren K., Żarski D., Król R., Kucharczyk D. (2011b): Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during the spawning season. *Italian Journal of Animal Science* 10: e209–e212.
- Targońska K., Żarski D., Muller T., Krejszeff S., Kozłowski K., Demeny F., Urbanyi B., Kucharczyk D. (2012): Controlled reproduction of the crucian carp *Carassius carassius* (L.) combining temperature and hormonal treatment in spawners. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 894–899.
- Wojtczak M., Kowalski R.K., Dobosz S., Goryczko S., Kuźmiński H., Glogowski J., Ciereszko A. (2004): Assessment of water turbidity for evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality. *Aquaculture* 242: 617–624.
- Żarski D. (2014): Optymalizacja kontrolowanego rozrodu okonia, *Perca fluviatilis* L. Praca Doktorska, UWM Olsztyn, 124 p.
- Żarski D., Palińska K., Targońska K., Bokor Z., Kotnik L., Kreszeff S., Kupren K., Horvath A., Urbanyi B., Kucharczyk D. (2011a): Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. *Aquaculture* 311: 84–91.
- Żarski D., Targońska K., Kaszubowski R., Kestemont P., Fontaine P., Krejszeff S., Kupren K., Kucharczyk D. (2012a): Effect of different commercial spawning agents and thermal regime on the effectiveness of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), reproduction under controlled conditions. *Aquaculture International* 21: 819–828.
- Żarski D., Krejszeff S., Palińska K., Targońska K., Kupren K., Fontaine P., Kestemont P., Kucharczyk D. (2012b): Cortical reaction as an egg quality indicator in artificial



reproduction of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 843–850.

Żarski D., Kucharczyk D., Targońska K., Palińska K., Kupren K., Fontaine P., Kestemont P. (2012c): A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43: 713–721.

Żarski D., Krejszeff S., Kucharczyk D., Palińska K., Targońska K., Kupren K., Fontaine P., Kestemont P. (2013): The application of tannic acid to the elimination of egg stickiness at varied moments of the egg swelling process in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture Research* (in press).

## **Pneumatyczna metoda pobierania oocytów ryb – innowacyjne narzędzie akwakultury**

***Radosław Kajetan Kowalski***

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,  
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

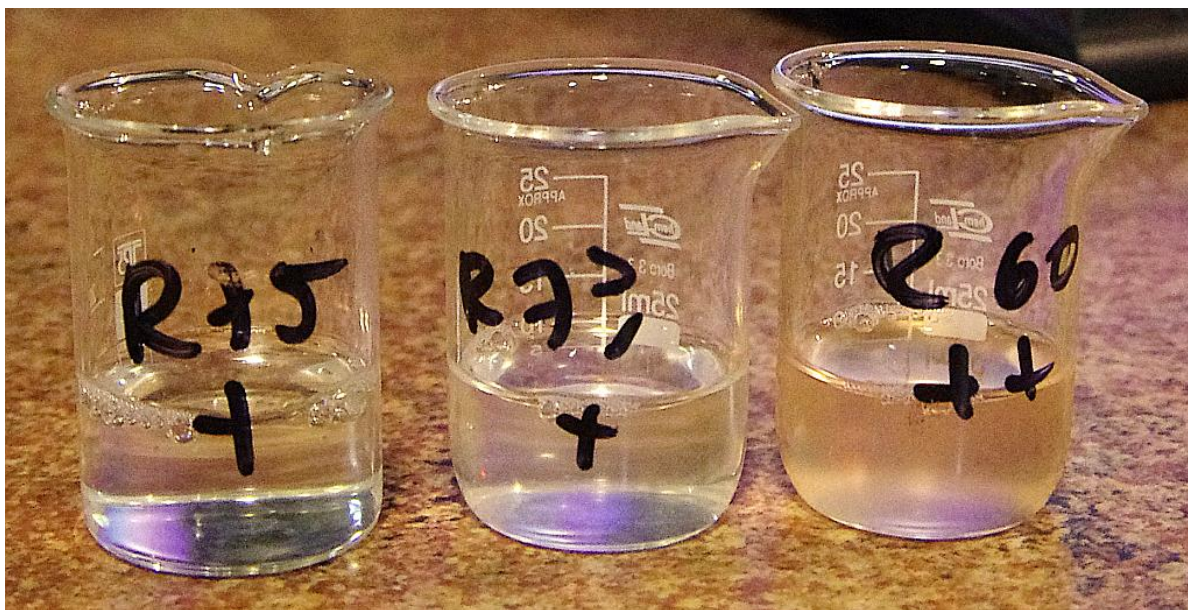
### **Wprowadzenie**

Produkcja rybacka na świecie ma swoją długoletnią tradycję. Największy udział w rozwoju i rozprzestrzenieniu się „mody” na hodowle ryb mają starożytne Chiny. To stąd zakon cystersów czerpał wzorce przy planowaniu swoich stawów rybnych położonych w europejskich opactwach. Najbardziej widoczną pamiątką po tych czasach pozostaje do dziś nazwa „mnich”, którą określa się jaz spustowy stawu. W średniowieczu w hodowli ryb niepodzielnie dominował karp (*Cyprinus carpio*). Wraz z postępem techniki hodowcy ryb opanowywali coraz to nowe umiejętności i nauczyli się tworzyć środowisko życia nie tylko odpowiadające wymaganiom karpi, ale i innych gatunków. W XIX wieku rozpoczyna się w Europie okres rozkwitu hodowli pstrągów. Ryby te cenione były ze względu na walory smakowe zarówno mięsa jak i ikry. Ich rozród w warunkach kontrolowanych nie zapewniał już jednak takiego sukcesu jak w przypadku karpi. Ocenia się, że w czasie naturalnego tarła, jedna samica pstrąga tęczowego (*Onchorynhus mykiss*), pomimo że składa kilka tysięcy ziaren ikry, zapewnia nowe życie jedynie od 3.7 do 6.7 dorosłym rybom (McLean i in. 2003). Gatunek co prawda może dzięki temu przetrwać i utrzymać swoją populację, jednak nie jest to wystarczająca ilość dorosłego potomstwa gdy w grę wchodzi hodowla. Z tego powodu od zarania dziejów człowiek stale udoskonalał techniki rozrodu ryb przez niego hodowanych.

### **Pobieranie ikry – metoda klasyczna i problemy związane z jej stosowaniem.**

Pobieranie ikry ryb to bardzo ważny etap produkcji każdego gatunku ryby. Od jakości pozyskanych jaj w znacznej mierze zależy bowiem sukces rozrodczy ryb. Pobieranie ikry od zdecydowanej większości gatunków ryb przebiega przyżyciowo i najczęściej opiera się o ręczne wywieranie nacisku na powłoki brzuszne ryby tak, aby ikra wydostała się na zewnątrz. W ten sposób pobiera się ikrę wszystkich ryb łososiowatych gdzie swobodne wydostawanie się jaj jest bardzo szybkie, gdyż są one owulowane do jamy ciała i nie napotykają na swej drodze na opór tkanek jajnika. Dodatkowo ich wydostawanie się ułatwia znaczny rozmiar oraz obecność płynu jajnikowego (płyn celomatyczny). Zdecydowanie trudniej wydostają się

oocyty ryb karpiowatych czy szczupaka, ponieważ są znacznie mniejsze, lepkie oraz nieomal brak jest płynu jajnikowego. W trakcie ręcznego wycierania ryb, jak określa się procedurę pobierania oocytów, dochodzić może do uszkodzeń ikry. Niewłaściwe wykonywanie procedury pobierania ikry poprzez zbyt mocne naciskanie na powłoki brzuszne, lub zbyt szybkie pocieranie dłońmi o nie, może prowadzić do uszkodzeń części z pozyskiwanych ziaren ikry. W takich przypadkach stwierdzono znaczne obniżenie odsetka zapłodnionych jaj, a nawet całkowity brak zapłodnienia (Carl 1941). Związane jest to z wydostawaniem się z pękniętych oocytów substancji zapasowych, które mają za zadanie zabezpieczyć potrzeby energetyczne i budulcowe przyszłego zarodka. Gdy jednak wydostaną się na zewnątrz zbyt wcześnie, nie tylko nie zabezpieczają losu kolejnego pokolenia, szkodzą także pozostałym, nietkniętym oocytom. Mieszanka protein, fosfolipidów i cukrów powodować może tworzenie widocznych gołym okiem, białych „skrzepów”, które są w stanie zablokować mikropyla wielu oocytów (Leiritz i Lewis 1976). Mogą także wywołać aglutynację plemników (Billard 1977; Piper i in. 1982). Innym negatywnym wpływem uszkodzonych oocytów na zdolność do zapłodnienia pozostałych nienaruszonych jaj jest obniżenie pH płynu celomatycznego (Dietrich i in. 2007; Tabrizi i in. 2011). Skutkuje to obniżeniem stopnia aktywacji plemników i w konsekwencji, prowadzi do obniżenia sukcesu rozrodczego. W praktyce rybackiej przyjęty został prosty sposób na diagnozowanie takiego zanieczyszczenia. Nazwany został „próbą kieliszkową” i polega na wrzuceniu kilku ziaren ikry do małego (w terenie używano kieliszków 50 ml by nie marnować zbyt wiele ikry, stąd nazwa tego testu), przezroczystego naczynia a następnie zalaniu ich wodą. Jeżeli woda bieleje oznacza to, że próba ikry jest zanieczyszczona zawartością uszkodzonych jaj i może charakteryzować się niższym odsetkiem zapłodnienia (Wojtczak i in. 2004). Próbę można także przeprowadzić poprzez zmieszanie niewielkich ilości płynu celomatycznego z wodą (1 ml płynu plus 9 ml wody, patrz Rys. 1). W przypadku stwierdzenia zmętnienia, albo pozbywano się takich partii ikry, albo też zdecydowano się je zapładniać, jednak nie mieszając z dobrą (nie wywołującą mętnienia) ikłą. Udało się także ustalić, że próby takie można z sukcesem zapłodnić, jednakże do zapłodnienia nie można użyć wody, lecz roztworu soli (Wojtczak i in. 2005). W praktyce najczęściej stosowany jest 1% roztwór sody ( $\text{NaHCO}_3$ ). Sól zawarta w płynie przeciwdziała wytrącaniu się lipidów i białek po jej dodaniu do ikry. Nie hamuje jednak ruchu plemników i pozwala na zapłodnienie ikry.

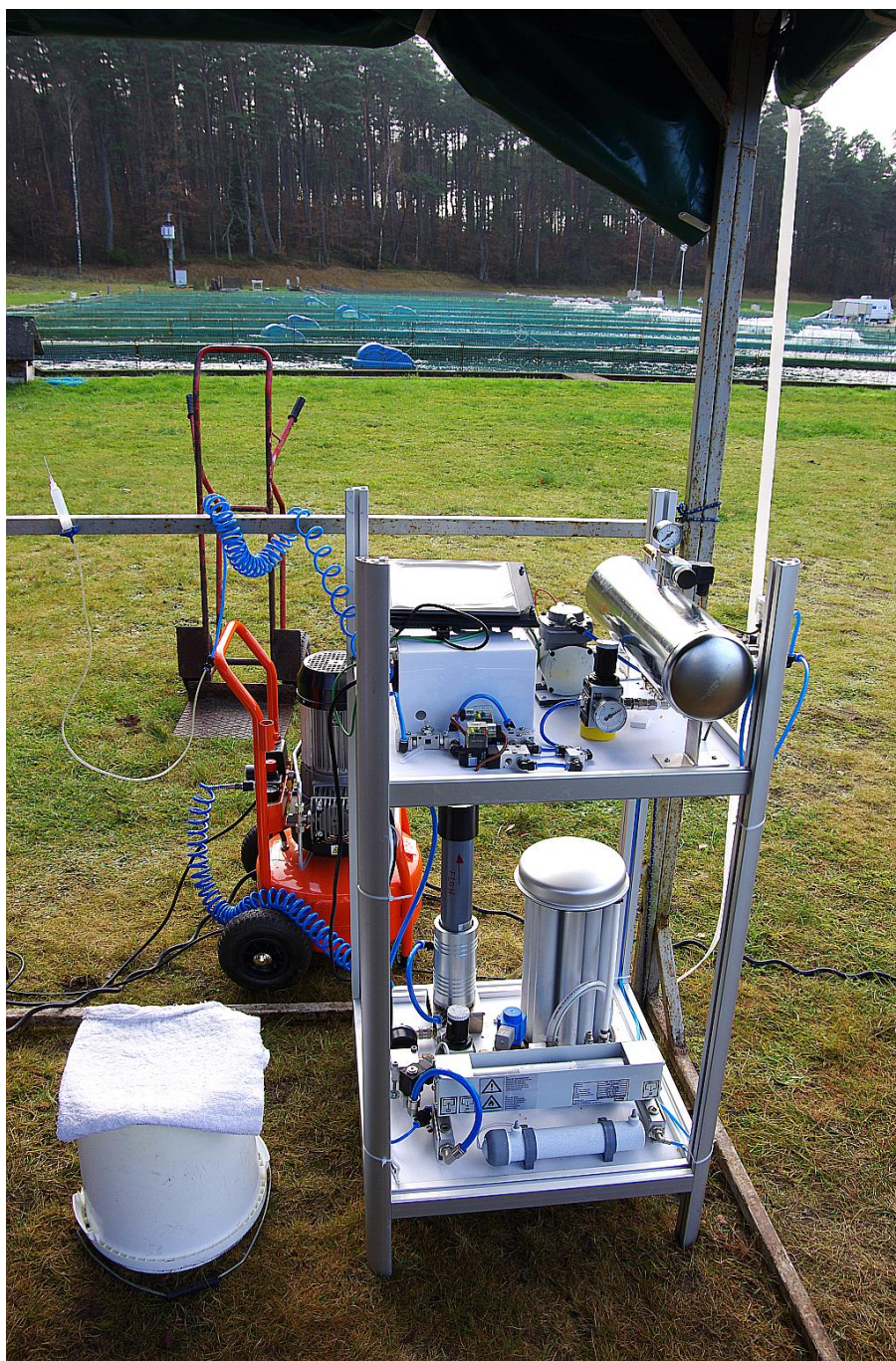


Rys. 1. Przykładowe zmętnienie po zmieszaniu płynu celomatycznego z 3 różnych partii ikry z wodą. Widoczna gradacja zmętnienia, która może posłużyć do oceny jakości pozyskanej ikry.

### **Pobieranie ikry – innowacyjna metoda pneumatyczna.**

W 1957 roku w Australii Wharton po raz pierwszy wykorzystał ciśnienie powietrza do pozyskania oocytów pstrąga tęczowego. Metoda ta nie została jednak rozwinięta i opisana dla pozostałych gatunków ryb. Obecnie pojawiają się pierwsze doniesienia na temat jakości tak pozyskanych oocytów. Wskazują one na wysoką skuteczność metody pneumatycznej. Ustalono już na przykładzie czawyczy (*Oncorhynchus tshawytscha*), że w przypadku tarła pneumatycznego, problem zmętnienia w płynie celomatycznym (wyznacznik ilości pękniętych jaj) jest na tyle znikomy, że próba kieliszkowa nie ma żadnego zastosowania (Nero i in. 2013). Metoda pneumatyczna, polega na usuwaniu oocytów z ciała ryb dzięki wprowadzeniu do jej powłok igły, która wtlacza gaz do jamy ciała tworząc ciśnienie wypychające oocyty na zewnątrz. Jego skuteczność oraz możliwość zaadoptowania do warunków wylęgarniczych w produkcji pstrąga tęczowego była wstępnie badana przez Leitritz i Lewis (1976). Badano także wpływ ciśnienia wprowadzanego tlenu (Shrable i in. 1999) na jakościowe i ilościowe parametry pozyskanych oocytów. Dokonano także prób zastąpienia gazu płynami, jednakże nie uzyskano zadowalających rezultatów (Orr i in. 1999). Prace te jednak nie zostały szeroko upowszechnione i metoda pneumatyczna pobierania oocytów nie została wdrożona w masowej produkcji rybackiej w Europie. Zarówno w Stanach Zjednoczonych (Petit 1977) jak i Japonii (Kowalski i Kowalska 2008) niektóre wylęgarnie ryb łososiowatych stosują własne protokoły pneumatycznego pobierania oocytów

ryb. Metoda pneumatyczna nie została jednak rozwinięta i upowszechniona, brak także możliwości zakupu odpowiedniej aparatury do jego prowadzenia. Nie znane są także jakiegokolwiek standardy zarówno w przypadku ustalenia ciśnienia gazu (ważne z punktu widzenia przeżywalności tarlaków) jak i szybkość przepływu gazów (mierzonego w l/min). Brak również ustalenia, który z dostępnych gazów (powietrze, tlen, azot) jest najmniej szkodliwy (jeżeli w ogóle) dla wycieranych tą metodą tarlaków. Ponieważ dotychczasowe doniesienia dotyczyły zastosowania metody pneumatycznej w tarle pstrąga tęczowego, konieczne jest jej dostosowanie do innych produkowanych w Polsce gatunków.



Rys. 2. Eksperymentalny system do prowadzenia tarła pneumatycznego umożliwiający pozyskiwanie oocytów przy zastosowaniu trzech gazów (powietrza, tlenu i azotu).



Rys. 3. Tarło pneumatyczne ryb z rodzaju *Salvelinus*.

Prace rozwojowe prowadzone w Polsce od 2010 roku opierają się o wykorzystanie innowacyjnego systemu do tarła pneumatycznego umożliwiającego jednoczesne stosowanie 3 różnych gazów (Rys 2). System, wyposażony w stanowisko do poboru oocytów oraz regulację ciśnienia i przepływu gazu, umożliwia prowadzenie prac z zastosowaniem powietrza (sterylizowanego i nie), tlenu oraz azotu do pneumatycznego pozyskiwania oocytów. Dzięki niemu możliwe jest wszechstronne sprawdzenie skuteczności metody oraz jej dostosowanie do specyfiki różnych gatunków ryb. W przyszłości, zoptymalizowane w trakcie prowadzonych badań stanowiska do pobierania ikry metodą pneumatyczną, będą

udostępnione gospodarstwom chcącym wdrożyć tę innowacyjną technologię w swoich wylęgarniach.

## Literatura

- Billard, R. (1977): Utilisation d'un systeme tris-glycocolle pour tamponner le dilueu d'insemination pour truite. Bull. Fr. Piscic. 264:102 - 112.
- Carl, G.C. 1941 - Beware of the broken egg! A possible cause of heavy losses of salmon eggs – Prog. Fish Cultur. 53:30 - 31.
- Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowińska, M., Dobosz, S., Kuźmiński, H., Ciereszko, A. (2007): Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid. Aquaculture, 273, 748–751
- Kowalski R.K., Kowalska A. (2008): Rozród pstrąga tęczowego u podnóża góry Fuji – wybrane aspekty rybactwa śródlądowego w Japonii. XXXIII Krajowej Konferencji . W: Szkolenia dla Hodowców Ryb Łososiowatych, Wyd. Maciej Poczman: 149-158.
- Leitritz E., Lewis R. C. (1976): Fish Bulletin 164. Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods) (May 1, 1976). Scripps Institution of Oceanography Library. Fish Bulletin: 164, pp 47 - 50.
- McLean J.E., Bentzen P., Quinn T.P. (2003): Differential reproductive success of sympatric, naturally spawning hatchery and wild steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the adult stage. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 60: 433–440.
- Nero P.A., Barnes M.E., Wipf M.M. (2013): Turbidity of Landlocked Fall Chinook Salmon Ovarian Fluid in Relation to Egg Survival (2013). The Open Fish Science Journal, 6: 75-77.
- Orr W., Shrable J. B., Abeyta D. J., McFall J., Noble D. (1999): Hydraulic Spawning of Rainbow Trout. Developments in Fish Culture, U.S. Fish and Wildlife Service, Ennis National Fish Hatchery, Investigations in Fish Culture.
- Pettit S. W. (1977): Comparative Reproductive Success of Caught-and-Released and Unplayed Hatchery Female Steelhead Trout (*Salmo gairdneri*) from the Clearwater River, Idaho. Trans. Am. Fish. Soc. – 106(5): 431 - 435.
- Piper, R.G., McElwain I.B., Orme L.E., McCraren J.P., Fowler L.G., Leonard J.R. (1982): Broodstock, spawning, and egg handling. In: *Fish Hatchery Management*. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington D.C: 165 – 167.
- Shrable J. B., Abeyta D. J., McFall J. E., Noble D. G., Orr W. H. (1999): Comparison of eye-up of rainbow trout eggs spawned by injecting oxygen at four, eight, twelve and sixteen

pounds of pressure versus spawning with hand pressure. *Developments in Fish Culture*, U.S. Fish and Wildlife Service, Ennis National Fish Hatchery, *Investigations in Fish Culture*.

Tabrizi E.N., Khara H., Nezami S.A., Lorestani R., Shamspour S. (2011): Broken Eggs Influence on Fertilization Capacity and Viability of Eggs, Turbidity and pH of Ovarian Fluid and Fertilization Water in the Endangered Caspian Brown Trout, *Salmo Trutta Caspius*. *International Journal of Biology* 3(1): 161-166

Wharton, J. C. F. (1957): A preliminary report on new techniques for the artificial fertilization of trout ova. *Victoria Fish. Contrib.* 6. Snob's Creek Fish. Res. Stn., Victoria. pp 17.

Wojtczak M., Kowalski R., Dobosz S., Goryczko K., Kuzminski H., Glogowski J., Ciereszko A (2004): Assessment of water turbidity for evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality. *Aquaculture* 242: 617 - 624.



## **Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie siei (*Coregonus lavaretus*)**

**Beata Sarosiek**

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,  
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

### **Charakterystyka gatunku**

Sieja (*Coregonus lavaretus*) (Fot. 1.) należy do rodziny ryb łososiowatych. Jest jednym z najcenniejszych gatunków, będących przedmiotem rybackiego gospodarowania w jeziorach Polski. Jej wartość jest związana zarówno z walorami biologicznymi, jak i gospodarczymi (Wołos i Mickiewicz 1998). Sieja występuje w Wielkiej Brytanii, w zlewisku Morza Bałtyckiego, północnej Rosji, Alpach. Spotkać ją można w wodach słodkich oraz w strefie przybrzeżnej wysłodzonych części mórz. W Polsce niedawno potwierdzano obecność tej ryby w jeziorach na Pojezierzu Pomorskim, Mazurskim i Suwalskim. Obecnie jednak zasięg występowania siei najprawdopodobniej, mimo zarybiania, już się zmniejszył. W jeziorze Łebsko na Pomorzu sieja tworzy gatunek endemiczny (sieja łebska). Tworzy zarówno formy osiadłe jak i wędrowne. Ryba ta żyje w chłodnych, głębokich jeziorach obfitujących w tlen. Sieja jest bardzo wrażliwa na jakość wody (Brylińska 2000).



Fot. 1. Samica siei.

Ciało siei jest zależnie od lokalnej rasy mniej lub bardziej wysmukłe. Głowa mała, o spiczastym, często nawet wyciągniętym w kształcie nosa pysku. Łuski większe niż u innych łososiowatych, linia boczna pełna. Otwór gębowy jest mały; w zależności od rasy ma on położenie końcowe bądź dolne. Grzbiet niebieskawozielony do ciemnozielonego. Boki i

brzuch białe lub srebrzyście lśniące. W czasie rozrodu na ciele wykształca się szata godowa w postaci perlistych guzków, wyraźniejsza u samców niż samic. W odpowiednich warunkach rośnie szybko, osiągając po kilku latach masę ciała nawet 6 kg. Najczęściej jednak spotyka się sztuki o długości około 50 cm i masie 1 kg (Brylińska 2000).

W jeziorach sieje odżywiają się głównie skorupiakami, przemieszczającymi się ku powierzchni wody larwami owadów i ich poczwarkami. Także wylęgiem ryb i ich ikrą. W płytkich jeziorach i rzekach zjadają również organizmy denne. Jest rybą żyjącą w stadach. Do trzeciego roku życia, czyli do osiągnięcia dojrzałości płciowej, odżywia się wyłącznie planktonem. Później w skład jej pożywienia wchodzi także różnego rodzaju robaki, małże oraz drobne ryby, zwłaszcza stynki.

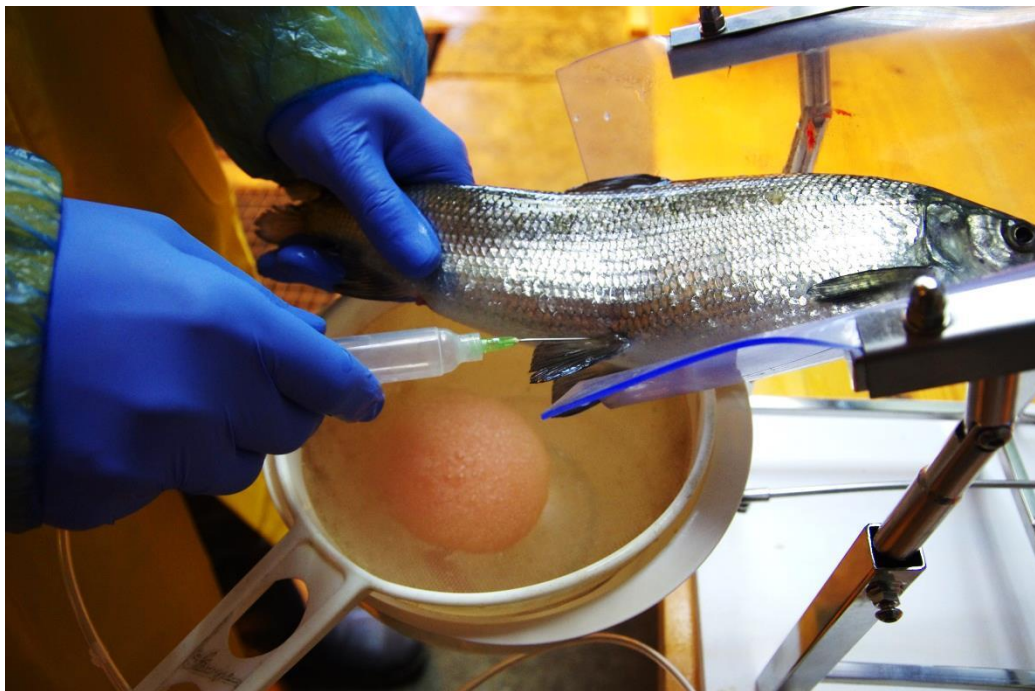
Dla wędkarzy jest to trudna do złowienia ryba. Był czas, gdy szeroko dyskutowano, czy w ogóle można łowić sieję na wędkę. Okazało się, że w pewnych porach dnia (późnym wieczorem) przy zastosowaniu odpowiednich przynęt jest to możliwe. Najlepiej jednak łowi się sieję w okresie zimowym, spod lodu. Nie znaczy to oczywiście, że sprawa jest prosta. Złowienie siei na wędkę to nadal spory wyczyn. Łowienie siei w lecie to ogromnie trudna sprawa. Zdarzają się jednak przypadki złowienia tej ryby, przy zastosowaniu cienkiej żyłki - 0,15 mm, małego haczyka i takich przynęt jak: ochotki, czerwone robaki, małże. Należy jednak pamiętać, że okres ochronny dla tej ryby trwa od 15 października do 31 grudnia. Zimo-połowu można więc rozpoczynać dopiero w styczniu. Łowisk siei trzeba szukać daleko od brzegów, w miejscach o głębokości 10-30 m. W charakterze przynęt stosuje się ciężkie błystki podlodowe, zbliżone wyglądem do stynki. O skuteczności połowów tej ryby świadczą wyniki zawodów, jakie od paru lat organizowane są w północnej części województwa podlaskiego. Przeciętnie branie następuje raz na 10 godzin. Połowa startujących w ogóle nie łowi. Nie jest to więc łatwa ryba. (<http://www.wedkarstwo.klodzko.pl/gatunki-ryb>).

Sieja podchodzi do rozrodu jesienią, od drugiej połowy listopada do końca grudnia, gdy temperatura wody wynosi 6-2°C, najintensywniej przy 4,5°C (Szczerbowski 1970). Samce dojrzewają płciowo w trzecim, a samice w czwartym roku życia na wolności (Szczerbowski 1993), natomiast w warunkach kontrolowanych sieja dojrzewa rok wcześniej (Szczepkowski i in. 2010). W związku z wysokimi wymaganiami dotyczącymi jakości wody obserwuje się stały spadek ilości siei w jeziorach, co spowodowane jest w głównej mierze przez wyeliminowanie jej naturalnego rozrodu. Jednakże prace nad sztucznym rozrodem siei przyczyniły się do zahamowania tego procesu. W Polsce prowadzi się produkcję i sprzedaż materiału zarybieniowego siei. Głównymi odbiorcami są osoby poszukujące materiału do

zarybień jezior, jednakże są już wśród nich i hodowcy pstrąga. Jest to ryba niewątpliwie ceniona przez konsumentów dlatego jej produkcja może stanowić cenny dodatek w ofercie handlowej obiektów pstrągowych (Kowalski 2010). Prace przeprowadzane w projekcie PNEUFISH mają na celu zwiększenie jakości uzyskiwanej ikry, a co za tym idzie zwiększenie efektywności sztucznego rozrodu tego gatunku.

### **Tarło pneumatyczne siei**

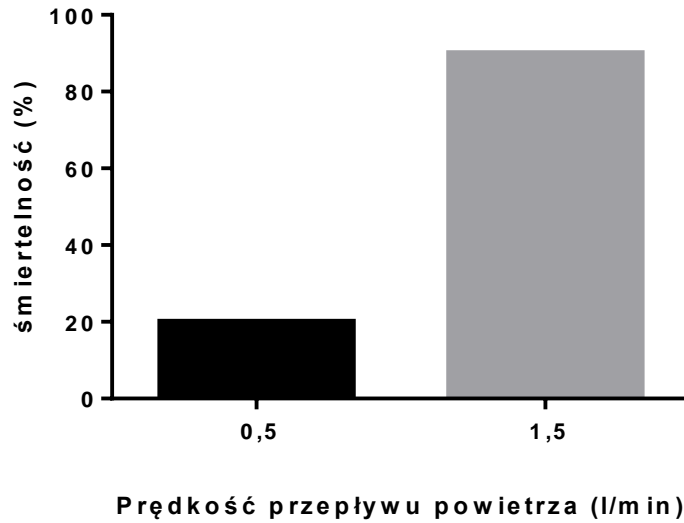
Pneumatyczne pobieranie ikry od siei nastęczało początkowo wiele problemów. Sieja jest bardzo wrażliwą na manipulacje rybą, obserwowaliśmy więc dużą śmiertelność podczas tarła. Spowodowane to było zbyt wysokim ciśnieniem powietrza wtłaczanym do ciała ryb. Dopracowanie techniki poboru ikry spowodowało, że również w przypadku pobierania ikry od tego gatunku lepszym wydaje się przeprowadzenie pneumatycznego (Fot. 2) tarła niż ręcznego (Fot. 3). U siei najlepsze miejsce na wkłucie igły znajduje się pod płetwami piersiowymi. Należy pamiętać o połączeniu igły za pomocą gwintu z urządzeniem dozującym gaz, zabezpieczającym przed wypadnięciem igły. Ciśnienie bazowe pojemnika z gazem podczas tarła siei powinno wynosić ok. 0,5 bara, nie zaleca się przekraczania tej wartości, może to spowodować zwiększone śnięcia po tarle, sięgające nawet 100% (Rys. 1). Przepływ gazu nie powinien przekraczać 0,8 l/min. Optymalna wielkość igły stosowanej u siei powinna wynosić 0,8 mm. W przypadku tarła siei nasze badania USG przed i po tarle wykazały, że istnieje koniczność tzw. docierki po tarle pneumatycznym, ponieważ na razie nie znaleźliśmy sposobu aby pneumatycznie uzyskać całą ikrę z ryb. Docierka ta powodować może nieznaczne wydłużenie czasu trwania uzyskania ikry, nie można jednak zapominać, że wcześniejsze pneumatyczne tarło, czyli wytworzenie tzw. poduszki powietrznej wokół oocytów, zabezpiecza ikrę przed uszkodzeniem.



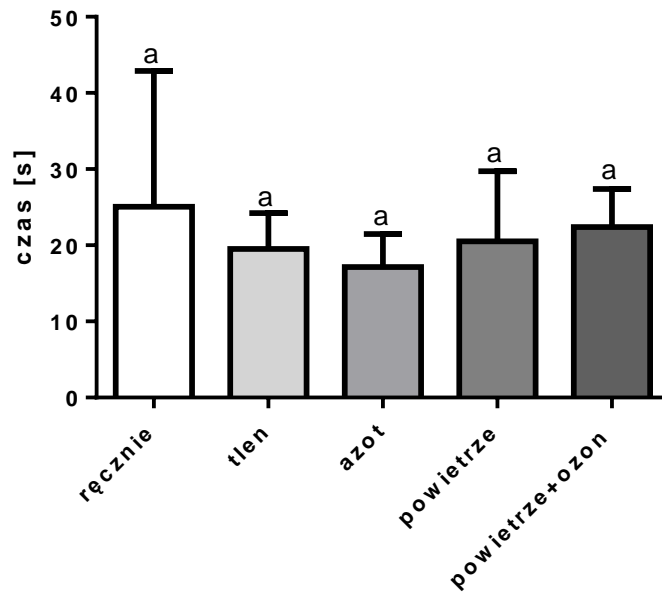
Fot. 2. Pozyskiwanie „pneumatyczne” ikry siei.



Fot. 3. Pozyskiwanie „ręczne” ikry siei.



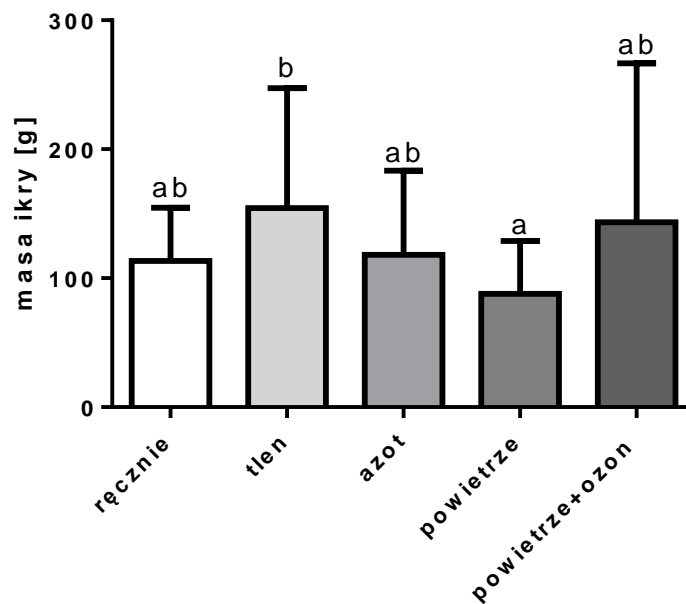
Rys. 1. Odsetek śmiertelności siei w zależności od prędkości przepływu powietrza podczas tarła pneumatycznego.



Rys. 2. Czas pobierania ikry siei podczas wycierania „ręcznego”, oraz podczas pneumatycznego tarła z użyciem tlenu, azotu, powietrza i mieszaniny powietrza z ozonem. Wartości oznaczone różnymi literami różniły się od siebie statystycznie istotnie ( $p \leq 0,01$ ).

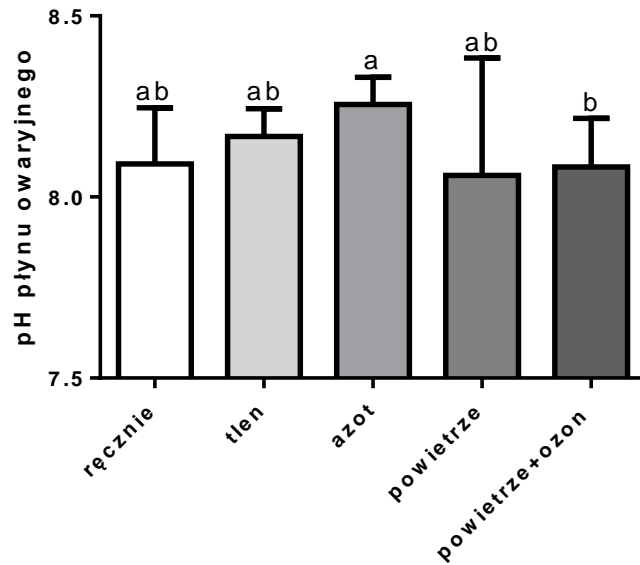
Ikrę od siei pozyskiwano od ryb utrzymywanych w Zakładzie Hodowli Ryb Łososiowatych IRŚ w Rutkach. Przed manipulacjami ryby były uśpione w roztworze Propiscinu. Czas pozyskania oocytów wynosił średnio od 19,3 sekund podczas pneumatycznego pobierania z wykorzystaniem tlenu do prawie 25 s przy wycieraniu ręcznym

(Rys. 2). Nie stwierdzono jednak różnic statystycznie istotnych pomiędzy poszczególnymi sposobami pozyskiwania ikry.



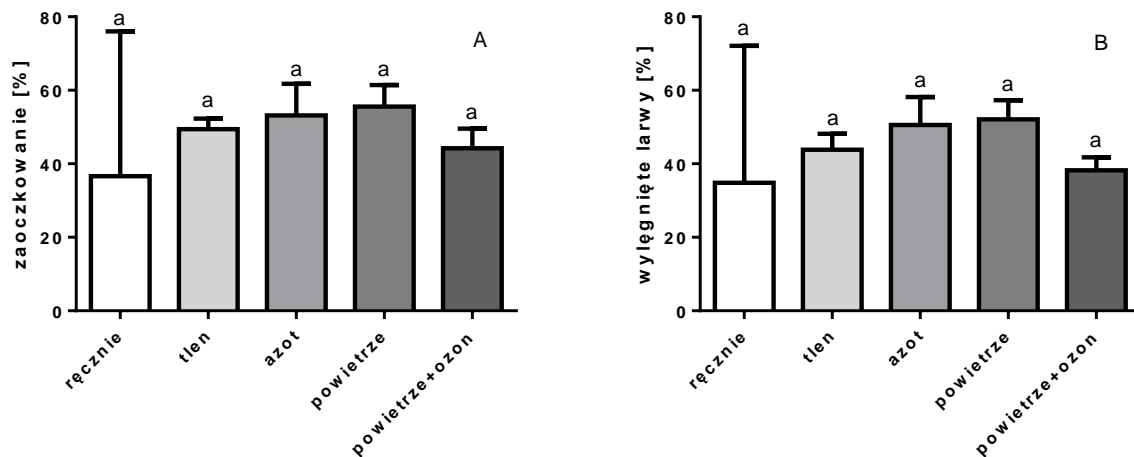
Rys. 3. Masa ikry uzyskana podczas wycierania „ręcznego”, oraz podczas pneumatycznego tarła z użyciem tlenu, azotu, powietrza i mieszaniny powietrza z ozonem. Wartości oznaczone różnymi literami różniły się od siebie statystycznie istotnie ( $p \leq 0,01$ ).

Masa uzyskanej ikry była najwyższa po tarle pneumatycznym z użyciem tlenu (Rys. 3), najniższe wartości zaobserwowano podczas „dmuchania” powietrzem. Wydaje się jednak, że wysoka różnorodność masy ryb wykorzystanych podczas tarła, a co za tym idzie wysokie odchylenie standardowe w każdej z analizowanych grup, nie pozwala na wyciągnięcie z powyższych wyników konstruktywnych wniosków. Wyniki te, to pierwsze tego typu osiągnięcia jeśli chodzi o sieję. Podczas kolejnych badań zbierane będą dalsze dane.



Rys. 4. Wartości pH płynu owaryjnego uzyskanego podczas wycierania „ręcznego”, oraz podczas pneumatycznego tarła z użyciem tlenu, azotu, powietrza i mieszanki powietrza z ozonem. Wartości oznaczone różnymi literami różniły się od siebie statystycznie istotnie ( $p \leq 0,01$ ).

pH płynu owaryjnego jest bardzo dobrym wskaźnikiem jakości ikry, im wyższe tym lepsza jakość (Dietrich i in. 2007, Tabrizi i in. 2011). Pod tym względem najlepsze wyniki uzyskano w grupie ryb, u których przeprowadzono tarło pneumatyczne z użyciem azotu, najniższe wartości obserwowano w grupie z użyciem mieszanki powietrza z ozonem (Rys. 4). O ile u innych gatunków najniższe wartości pH płynu owaryjnego obserwowaliśmy w grupie, gdzie tarło przeprowadzono ręcznie, to w przypadku siei tarło „ręczne” przeprowadzono tak delikatnie, że jakość ikry mierzona wartością pH płynu owaryjnego, nie różniła się statystycznie od jakości ikry uzyskanej podczas tarła pneumatycznego.



Rys. 5. Odsetek zaoczkowanej ikry (A) oraz odsetek wylęgu (B) dla ikry uzyskanej podczas wycierania „ręcznego”, oraz podczas pneumatycznego tarła z użyciem tlenu, azotu, powietrza i mieszaniny powietrza z ozonem.

Ikry siei uzyskaną podczas wycierania „ręcznego”, oraz podczas pneumatycznego tarła z użyciem tlenu, azotu, powietrza i mieszaniny powietrza z ozonem zapłodniono. Do tego celu wykorzystano zmieszane nasienie od 4 samców w ilości 100 000 plemników na ziarno ikry. Wcześniej zmierzono koncentrację plemników na komorze Bürkera. Ilość zaoczkowanej ikry policzono ze stosunku ilości zaoczkowanej ikry do całości ikry użytej w doświadczeniu (Rys. 5A) Tak samo policzono ilość wylęgniętych larw (Rys. 5B). Najwyższe wartości zarówno zaoczkowania jak też ilości wylęgu obserwowano dla ikry, która uzyskana była pneumatycznie z wykorzystaniem azotu oraz powietrza. Najniższe wartości wylęgu uzyskano w przypadku ikry uzyskanej metodą tradycyjną i w tej grupie zauważyć można najwyższe zróżnicowanie (wysokie odchylenie standardowe). Z kolei dość niski odsetek wylęgu ikry uzyskanej z udziałem mieszaniny powietrza z ozonem, mógł być wynikiem tego, że dodatek ozonu do powietrza podnosił jego temperaturę. Zatem sterylizację ozonem zastąpiono w kolejnych doświadczeniach filtrami HEPA. Nasze wstępne wyniki dotyczące tarła pneumatycznego siei nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie lepszej jakości uzyskanych w ten sposób oocytów. Jednakże zauważone tendencje, zwłaszcza dotyczące uzyskanego w poszczególnych grupach wylęgu, pozwalają z optymizmem planować kolejne tarła pneumatyczne.



## Literatura

- Brylińska M. (2000): Ryby słodkowodne Polski. Wyd. Nauk. PWN Wa-wa, 381-386.
- Dietrich G.J., Wojtczak M., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., Ciereszko A. (2007): Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid. *Aquaculture* 273 (4): 748-751.
- Kowalski R. (2010): Dywersyfikacja produkcji ryb łososiowatych - przyszłość siei w gospodarstwach pstrągowych. W: XXXV Krajowa Konferencja Hodowców Ryb Łososiowatych, Jastrzębia Góra 2010 (Red. R. Kowalski), Wyd. Stowarzyszenie Producentów Ryb Łososiowatych: 127-132.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B., Krzywosz T., Wunderlich K., Stabiński R. (2010): Growth rate and reproduction of a brood stock of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) from Lake Gaładuś under controlled rearing conditions. *Arch. Pol. Fish.* 18 (1): 3-11.
- Szczerbowski J. A. (1970): Wybrane element biologii siei i ich aspekt gospodarczy. *Zesz. Nauk. WSR, Olsztyn.* 1: 3-52.
- Szczerbowski J.A. (1993): Rybactwo śródlądowe. Wyd. IRŚ Olsztyn, 241-247.
- Tabrizi E.N., Khara H., Nezami S.A., Lorestani R., Shamspour S. (2011): Broken eggs influence on fertilization capacity and viability of eggs, turbidity and pH of ovarian fluid and fertilization water in the endangered caspian brown trout, *Salmo Trutta Caspius*. *Int. J. Biol.* 3 (1): 161-166.
- Wołos A., Mickiewicz M. (1998): Charakterystyka jezior oraz gospodarki sielawą i sieją. W: *Gospodarka koregonidami uwarunkowania i efektywność* (Red. A. Wołos i M. Bnylińska), Wyd. IRS, Olsztyn: 9-15.
- <http://www.wedkarstwo.klodzko.pl/gatunki-ryb>

## **Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie szczupaka (*Esox lucius*)**

**Beata Irena Cejko**

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,*

*Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

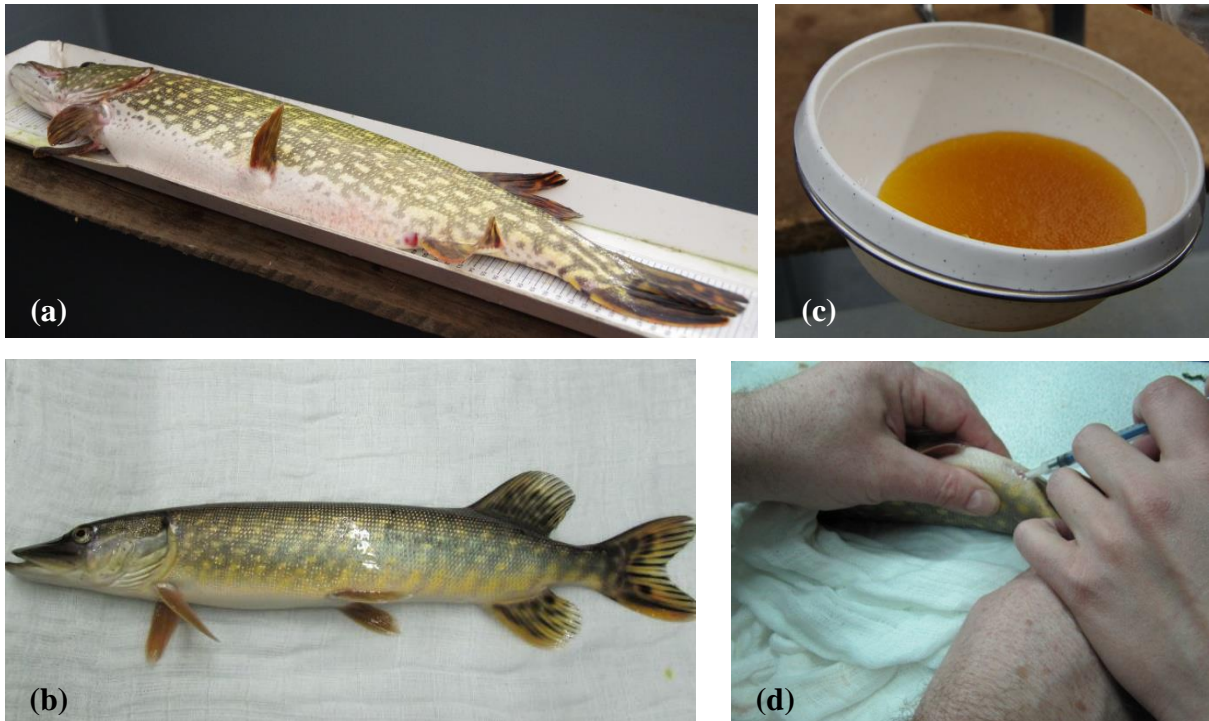
### **Wprowadzenie**

Szczupak (*Esox lucius*) jest drapieżnikiem obligatoryjnym preferującym w swojej diecie jedynie inne ryby. W wodach otwartych odgrywa zatem istotną rolę sanitarną i ekologiczną, eliminując pogłowie gatunków mało cennych, karłowatych lub gatunków, których populacja charakteryzuje się nadmierną liczebnością. Istotne znacznie jakie odgrywa w zachowaniu równowagi biologicznej ekosystemów wodnych sprawia, że produkcja materiału obsadowego tego gatunku jest jak najbardziej uzasadniona i konieczna (zarybienie). Szczupak doskonale czuje się w stawach ziemnych w polikulturze z karpem (*Cyprinus carpio*) lub linem (*Tinca tinca*), wywierając presję na intensywność ich żerowania oraz eliminując słabe i chore osobniki z dalszej hodowli. Gatunek ten jest także cennym obiektem akwakultury (wysokie walory smakowe mięsa), której podstawowym celem i zadaniem jest dostarczenie na rynek produktów mięsnych (ryby) bogatych w wysoko wartościowe białko oraz tłuszcze. O walorach rekreacyjnych (wędkarstwo) tego gatunku nie trzeba przekonywać żadnego znawcy tematu.

### **Pozyskiwanie ikry metodą tradycyjną**

Czas w jakim szczupaki przystępują do tarła w warunkach naturalnych uzależniony jest od warunków pogodowych, dlatego też jakość pozyskiwanych gamet determinowana jest okresem w ich cyklu rozrodczym (Szczepkowski i in. 2006; Cejko i in. 2007). W naszej strefie geograficznej tarło tych ryb odbywa się wczesną wiosną (marzec-kwiecień). Szczupaki nie tolerują dużego zagęszczenia dlatego po ich złowieniu lepiej trzymać je w sadzach aniżeli basenach, a okres ich przetrzymywania w taki sposób nie powinien trwać dłużej niż dwa tygodnie (Szczepkowski i Szczepkowska 2008). Niezwykle istotny jest sam sposób transportu ryb oraz właściwe obchodzenie się z nimi. Szczupaki to ryby dzikie, szczególnie wrażliwe na stres związany z wszelkimi manipulacjami dlatego umiejętne obchodzenie się z nimi rzutuje na efektywność ich rozrodu (Łuczyński i in. 2008). Do tarła przeznaczają się z reguły samice o masie ciała 1-2 kg (Fot. 1a) oraz samce o masie ciała nie przekraczającej 0,5 kg (Fot. 1b). Rybami takimi łatwo manipulować, a koszty związane z zakupem anestetyków oraz

hormonów (w sytuacji stosowania stymulacji hormonalnej) są zminimalizowane. Również ilość ikry (200-500 gramów) i nasienia (0,5-1,0 ml) pozyskana od pojedynczych osobników powinna pokryć zapotrzebowanie hodowców na cenny materiał obsadowy.



Fot. 1. Samica (a) i samiec (b) szczupaka wytypowane do rozrodu, pozyskana ikra (c) oraz tradycyjny sposób pobierania nasienia (d).

Biotechniki rozrodu szczupaka nie opracowano dotychczas w sposób wyczerpujący, aczkolwiek samo pozyskiwanie ikry i nasienia od tarlaków nie nastęrcza większych kłopotów i w różnych regionach Europy przeprowadza się to podobnie (Szczepkowski i in. 2006; Žiliukienė i Žiliukas 2008; Szczepkowski i Szczepkowska 2008). Tarlaki szczupaka można stymulować hormonalnie dzięki czemu doprowadza się do synchronizacji owulacji samic i zwiększa się efektywność rozrodu samców (Billard i Marcel 1980; Szabó 2003). Zadawalające efekty otrzymuje się po stosowaniu homogenatu przysadki mózgowej karpia (CPE) w ilości  $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (Szabó 2003) oraz ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) w ilości  $200 \text{ UI kg}^{-1}$  (Žiliukienė i Žiliukas 2008). Ikrę (Fot. 1c) oraz nasienie (Fot. 1d) pozyskuje się w sposób tradycyjny, za pomocą masażu powłok brzusznych do sterylnych misek oraz strzykawek. Podczas manipulacji z tarlakami należy stosować anestetyki, które minimalizują skutki niekorzystnego stresu oraz ułatwiają hodowcy manipulacje z tarlakami.

Ikry zapładnia się z reguły nasieniem pobranym od kilku samców w ilości nie mniejszej niż 2,0 ml na 1,0 kg ikry. Samce szczupaka oddają niewielkie ilości nasienia, dlatego w niektórych przypadkach zaleca się uśmiercenie ich w celu wykorzystania nasienia pochodzącego z gonad (Szczepkowski i Szczepkowska 2008). Bardziej zasadne wydaje się jednak opracowanie właściwego czasu latencji, rozumianego jako czas od wykonania iniekcji do pozyskania nasienia od samców. Ostatnio prowadzone przez Zakład Biologii Gamet i Zarodka badania wskazują, że największe objętości nasienia szczupaka pozyskuje się po 72 godz. od stymulacji CPE w ilości 2,0 mg kg<sup>-1</sup> (Cejko, dane niepublikowane).

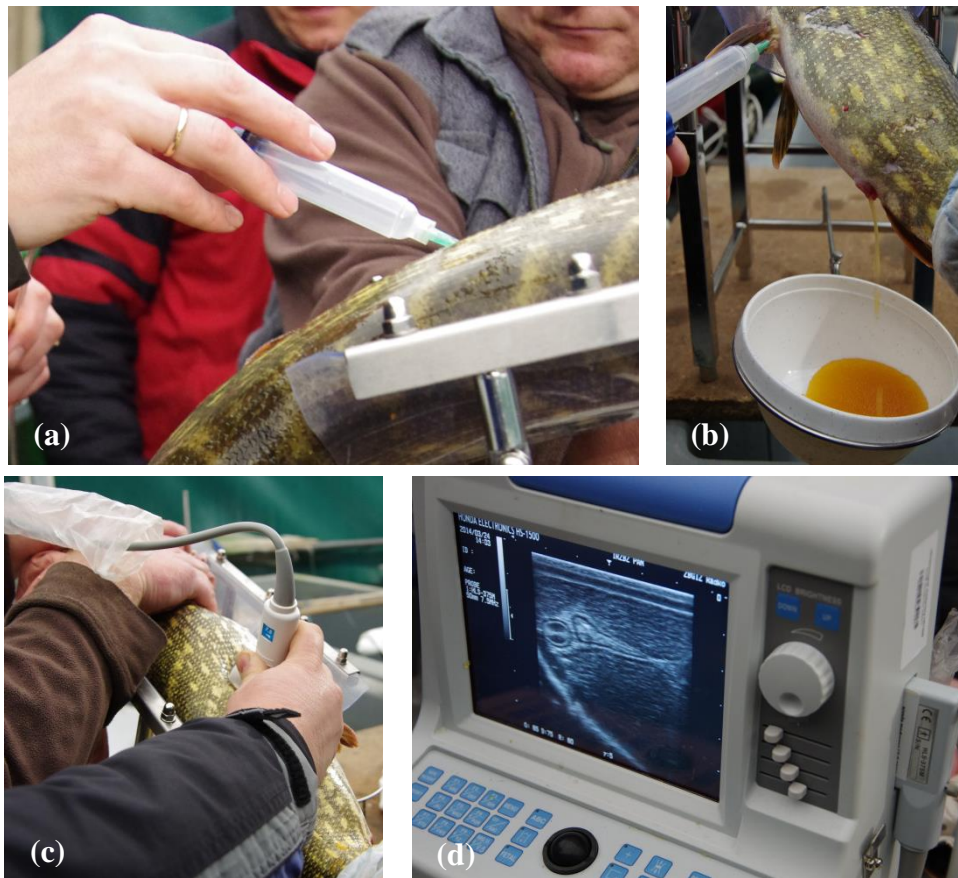
### **Pozyskiwanie ikry metodą pneumatyczną**

Nową metodą pozyskiwania ikry szczupaka, która została opracowaną przez Zakład Biologii Gamet i Zarodka jest metoda pneumatyczna. Polega ona na wprowadzeniu, tuż za płetwami piersiowymi samic szczupaka, igły o średnicy 0,8 mm przez którą włączane są za pomocą pompy membranowej (pod ciśnieniem 0,2 bara) gazy tj. tlen, powietrze lub azot (Fot. 2a). Przepływ gazów (0,5 litra na minutę) powoduje wypychanie ikry z ciała tarlaka, która swobodnie uwalniana jest przez otwór moczowo-płciowy do sterylnych misek (Fot. 2b). Przed wyborem samic do tarła warto skontrolować ich dojrzałość za pomocą aparatu USG co pozwoli ocenić potencjał rozrodczy samic oraz umożliwi właściwe postępowanie podczas ich wycierania (Fot. 2c,d). W niektórych wypadkach, po tarle pneumatycznym, konieczne może być ręczne docieranie tarlaków. Ze względu na niewielkie ilości płynu owaryjnego i niewielkie rozmiary ikry szczupaka nie cała ich masa wypływa jednocześnie z jamy ciała. Również źle dostosowany przepływ gazów (zbyt duży) może wpłynąć na niewłaściwe uwalnianie ikry z jamy ciała. Samo docieranie ryb polega na jednoczesnym uwalnianiu zgromadzonych w jamie ciała gazów oraz pozostałości nie uwolnionych ziaren ikry.

### **Zalety stosowania metody pneumatycznej**

Metoda pneumatyczna jest mniej inwazyjna, niż tradycyjny sposób wycierania ikrzyc ponieważ brak jest ręcznego kontaktu z powłokami brzuszными samic. Dzięki temu ryzyko infekcji oraz nadmiernego stresowania ryb jest zminimalizowane (Kowalski i Kowalska 2008; Kowalski i in. 2009, 2012). Taki sposób pozyskiwania ikry rzutuje także na jakość pozyskiwanych gamet ponieważ nie dochodzi do pęknięcia osłonek jajowych co w konsekwencji doprowadza do wzrostu ich jakości. Tarło pneumatyczne trwa zwykle nieco dłużej niż tarło tradycyjne, jednakże w sytuacji manipulowania cennymi tarlakami warto poświęcić im więcej czasu aby w sposób właściwy pozyskać od nich gamety o jak najlepszej jakości. Również sterylizacja używanych do tarła igieł jest prostsza (zanurzenie w etanolu),

łatwiejsza (wymiana igły na nową) i tańsza (koszt igły to około 10 groszy) aniżeli sterylizacja rąk lub każdorazowa wymiana używanych rękawiczek (zabieg czasochłonny).

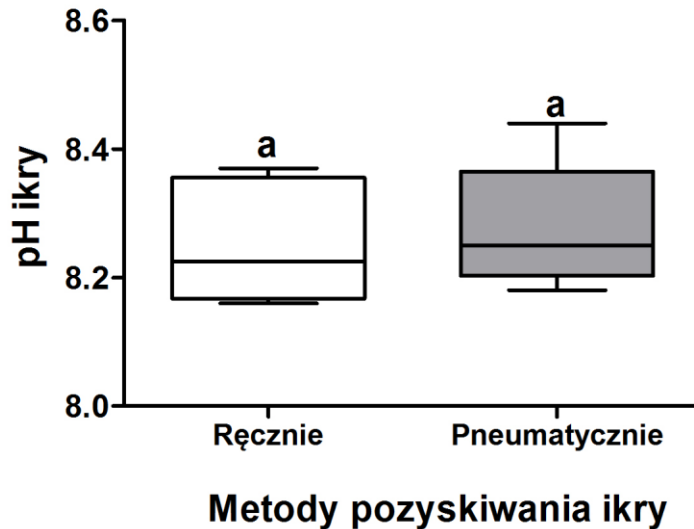


Fot. 2. Miejsce wprowadzenia igły do jamy ciała samicy szczupaka (a), pneumatyczne pozyskiwanie ikry (b) oraz kontrola stanu gonad za pomocą aparatu USG (c, d).

### **Efektywność stosowania metody pneumatycznej**

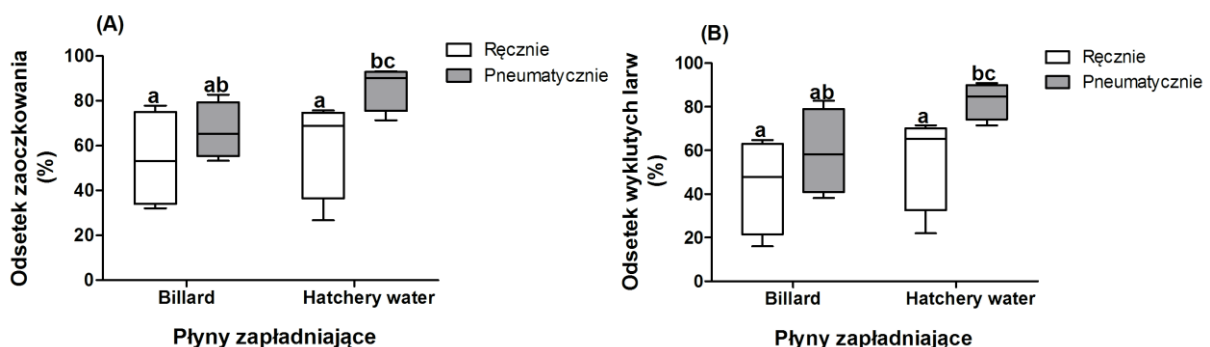
Badania dotyczące zastosowania tarła pneumatycznego w rozrodzie szczupaka przeprowadzono w Zakładzie Hodowli Ryb Jesiotrowatych Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie (Pieczarki, Giżycko). Do tarła wykorzystano kilkanaście samic szczupaka, których część wycierano ręcznie, a część pneumatycznie (przy zastosowaniu powietrza jako gazu). Przed tarłem samice ważono oraz kontrolowano stan ich gonad aparatem USG. Ikrę pozyskiwano następnie do sterylnych misek po czym mierzono jej pH dla prób z tarła ręcznego oraz pneumatycznego. Odczyn płynu owaryjnego (ikry) jest jednym z wyznaczników określających jakość ikry i wpływających pozytywnie na ruchliwość plemników (Wojtczak i in. 2007). Wartości pH poniżej 8,0 mogą wskazywać na uszkodzenie ikry, złą jej jakość, a więc nieprzydatność do zapłodnienia. U samic, od których ikrę pozyskiwano ręcznie, wartości tego parametru kształtowały się na poziomie 8,25 natomiast u

samic wycieranych pneumatycznie, pH było nieznacznie wyższe (8,30). Nie stwierdziliśmy jednak statystycznie istotnych różnic w wartościach pH między ikrą pozyskaną obiema metodami (Rys. 1).



Rys. 1. pH ikry szczupaka pozyskanej metodą tradycyjną (Ręcznie) oraz za pomocą powietrza (Pneumatycznie). Te same indeksy literowe wskazują na brak różnic między obiema metodami ( $P > 0,05$ ).

Ikrę pozyskaną obiema metodami zapładniano dwoma płynami o odmiennych składach tj. wodą wylęgarnianą oraz płynem Billarda (skład na 1 litr: 9,0 g NaCl; 2,4 g Tris; 2,2 g Glicyna; 0,1 g  $CaCl_2$ ; pH 9,0). Odsetek zaoczkowania ikry pozyskanej ręcznie kształtował się na poziomie 60% po zapłodnieniu zarówno wodą wylęgarnianą oraz płynem Billarda. Po tarle pneumatycznym, odsetek zaoczkowania ikry zapłodnionej wodą wylęgarnianą sięgał 90% natomiast Billardem 70% (Rys. 2A).



Rys. 2. Odsetek zaoczkowania ikry (A) oraz odsetek wyklutych larw (B) szczupaka po tarle metodą tradycyjną (Ręcznie) oraz pneumatyczną (Pneumatycznie) w różnych płynach zapładniających. Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów ( $P < 0,05$ ).

Podobną zależność stwierdzono w odsetku wykłutych larw. Większe straty odnośnie wylęgowości stwierdzono po ręcznym pobraniu ikry, aczkolwiek po zastosowaniu wody wylęgarnianej (w porównaniu do płynu Billarda) odsetek wykłutych larw był wyższy o około 10%. Najwięcej wylęgu stwierdzono zapładniając wodą wylęgarnianą ikrę po tarle pneumatycznym. Wartości tego parametru odbiegały istotnie od odsetka wykłutych larw pozyskanych po ręcznym wycieraniu tarlaków (Rys. 2B)

Śmiertelność po tarle nie jest zjawiskiem nieprzewidywalnym i obserwowana jest zawsze w stadzie tarłowym. Jeśli chodzi o śmiertelność szczupaków po tarle pneumatycznym, to u ryb przetrzymywanych do czterech dni po jego przeprowadzeniu śmiertelności nie zanotowano. Dlatego jeśli istnieje ryzyko transmisji chorób oraz ekspozycji stresu na tarlaki po tarle pneumatycznym, to nie jest ono wyższe aniżeli u ryb wycieranych ręcznie. Z pewnością ryby dzikie takie jak szczupak, reagują gorzej na stres aniżeli ryby hodowlane, u których także stosuje się metodę pneumatyczną (pstrąg tęczowy, palia alpejska). Właściwe i racjonalne obchodzenie się z tarlakami, przy zapewnieniu właściwego ciśnienia i przepływu gazów nie powinno jednak wpływać na śmiertelność ryb oraz (co potwierdzają prezentowane przez nas wyniki) wpłynąć na poprawę jakości ikry oraz wylęgu.

## Literatura

- Billard R., Marcel J. (1980): Stimulation of spermatation and induction of ovulation in pike (*Esox lucius*). *Aquaculture* 21: 181-195.
- Cejko B.I., Piszczek M., Glogowski J. (2007): Wyznaczniki jakościowe i biochemiczne nasienia szczupaka (*Esox lucius*) i leszcza (*Abramis brama*). W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb jeziorowych i innych gatunków (Red. Wolnicki J., Zakęś Z., Kamiński R.), Wyd. IRS, Olsztyn: 45-53.
- Kowalski R.K., Kowalaka A. (2008): Rozród pstrąga tęczowego u podnóża góry Fuji – wybrane aspekty rybactwa śródlądowego w Japonii. W: XXXIII Krajowa Konferencja Szkolenie dla Hodowców Ryb Łososiowatych, Wyd. SPRŁ, Lębork: 149-153.
- Kowalski R.K., Kolman R., Pirtań Z., Cieśliski B., Glogowski J. (2009): Pobieranie ikry metoda pneumatyczną – innowacyjna technika wylęgarnicza. W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków (Red. Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A., Ulikowski D.) Wyd. IRS, Olsztyn: 59-64.
- Kowalski R.K., Glogowski J., Cejko B.I., Sarosiek B., Kowalska A., Pirtań Z. (2012): Efekty stosowania metody pneumatycznej w rozrodzie ryb łososiowatych – wnioski z trzech lat

- doświadczeń w ośrodku hodowlanym. W: Wylęgarnictwo organizmów wodnych – osiągnięcia, wyzwania i perspektywy (Red. Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A.), Wyd. IRS, Olsztyn: 65-70.
- Łuczyński M.J., Szczerbowski A., Gomułka P., Szkudlarek M., Kucharczyk D. (2008): Wybrane możliwości doskonalenia rozrodu szczupaka. W: Elementy nowoczesnej akwakultury ryb – rozród, inkubacja ikry i profilaktyka (Red. Łuczyński M.J., Szczerbowski A., Szkudlarek M.), Wyd. IRS, Olsztyn: 155-163.
- Szabó T. (2003): Ovulation induction in northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. *Aquaculture Research* 34: 479-486.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B. (2008): Rozród i przetrzymywanie wylęgu szczupaka (*Esox lucius*). W: Elementy nowoczesnej akwakultury ryb – rozród, inkubacja ikry i profilaktyka (Red. Łuczyński M.J., Szczerbowski A., Szkudlarek M.), Wyd. IRS, Olsztyn: 135-153.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B., Saczek W. (2006): Wybrane wskaźniki sztucznego rozrodu szczupaka (*Esox lucius*) prowadzonego w wylęgarni Doświadczalnego Ośrodka Zarybieniowego Dgał w Pieczarkach. W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb karpiowatych i innych gatunków (Red. Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Wolnicki J.), Wyd. IRS, Olsztyn: 293-299.
- Wojtczak M., Dietrich G.J., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., Ciereszko A. (2007): Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270: 259-264.
- Žiliukienė V., Žiliukas V. (2008): Sztuczne tarło szczupaka (*Esox lucius*) – rozwiązania litewskie. W: Biotechnologia w akwakulturze (Red. Zakęś Z., Wolnicki J., Demska-Zakęś K., Kamiński R., Ulikowski D.), Wyd. IRS, Olsztyn: 143-152.



Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).

## **Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*)**

*Sylwia Judycka*

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,  
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

### **Wprowadzenie**

Ryby łososiowate w sposób naturalny rozsiedlone są głównie w zlewiskach rzek Europy, północnej Afryki, północnej Azji i Ameryki. Wsiedlono je również do wód południowej Ameryki, Indii, Australii i Nowej Zelandii. Wszystkie mają płetwę tłuszczową i ciało pokryte łuskami cykloidalnymi. Są to ryby słodkowodne i dwuśrodowiskowe. Rozradzają się w wodzie słodkiej, zwykle płynącej. Ich występowanie ogranicza się do wody chłodnej. Rozród przypada zwykle na miesiące zimowe, podczas którego samice przygotowują gniazda na podłożu kamienisto-żwirowym i tam składają ikrę. Po zapłodnieniu jest ona najczęściej przysypywana kamieniami, wśród których przebiega dalszy jej rozwój (Szczerbowski 1993). Do łososiowatych zalicza się osiem rodzajów, z których w Polsce występuje rodzaj *Salmo*, natomiast *Oncorhynchus*, *Salvelinus* oraz *Hucho* zostały wprowadzone do wód wskutek zarybień.



Fot 1. Tarlak troci oznakowany znaczkami elastomerowymi.

Zarówno łosoś (*Salmo salar*) jak i troć (*Salmo trutta m. trutta*) są typowymi rybami dwuśrodowiskowymi. Pierwszy okres życia spędzają w wodzie słodkiej- rzekach i potokach-

Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).

o dnie żwirowatym i wartkim prądzie. Drugi- w morzu, żerując na ławicach śledzi. Powracają jednak po osiągnięciu dojrzałości płciowej na miejsca rozrodu do macierzystych rzek (Brylińska 2000). W odróżnieniu od łososi pacyficznego nie giną po tarle, lecz ponownie przemieszczają się na żerowiska w morzu. W związku z tym ich sukces rozrodczy uzależniony jest od drożności rzek oraz odpowiedniej jakości wody na tarliskach.

Zabudowa rzek i stały wzrost ich zanieczyszczenia doprowadziły do dużego spadku liczebności łososia i troci, wskutek problemów z dotarciem dojrzałych płciowo osobników do miejsca rozrodu i zaniku naturalnego tarła. Podejmuje się próby przeciwdziałania temu niekorzystnemu zjawisku przez odławianie tarlaków na przepławkach i sztuczne pozyskiwanie jaj, z których w gospodarstwach zarybieniowych hoduje się smolty. Smoltami tymi zarybiane są rzeki. Akcja taka od wielu lat prowadzona jest w Szwecji oraz w wielu innych krajach, w tym i w Polsce. Na podstawie wyników uzyskanych ze znakowań okazało się, że dzięki takim zabiegom gospodarczym możliwe jest nie tylko uchronienie łososia i troci od wyginięcia, lecz także zwiększenie ich połowów. Troć jest ceniona na równi z łososiem i w obrocie handlowym jest z nim utożsamiana (Brylińska 2000). Gospodarka łososiowa to nie tylko odłowy i związane z tym dochody. To również pozyskanie tarlaków do tarła, sztuczne tarło, hodowla narybku, zarybienia, ochrona tarlisk i okresy ochronne w czasie naturalnego rozrodu troci (Nyk 1997).

Oocyty można uzyskać techniką „standardową”- ręczną lub inowacyjną- przy zastosowaniu metody pneumatycznej. Metoda tarła ręcznego umożliwia pozyskanie ikry zdolnej do zapłodnienia na poziomie 80-90% (Kowalski i in. 2009). Jednak podczas masażu powłok brzusznych ryba zostaje pozbawiona śluzu, który stanowi naturalną barierę przeciwko drobnoustrojom. Także nieumiejętność czy zbyt duża siła włożona podczas nacisku powłok brzusznych może spowodować pozyskanie ikry niezdolnej do zapłodnienia (Carl 1941). Z tego względu technika klasyczna zależna jest w dużym stopniu od czynnika ludzkiego, wprowadzając element ryzyka do hodowli ryb łososiowatych. Najczęstszym sposobem obniżania ryzyka związanego ze złą jakością ikry, (nie tylko spowodowaną nieumiejętnym pobieraniem oocytów) jest utrzymywanie nadmiaru tarlaków w ośrodku hodowlanym. Takie zabezpieczenie wiąże się jednak z dodatkowymi kosztami i każda oszczędność wprowadzona w tym zakresie, może przynieść duże korzyści dla hodowcy.



Fot. 2. Tarło pneumatyczne troci wędrownej.

Technika tarła pneumatycznego po raz pierwszy została zastosowana przez Whartona (1957) dla pstrąga tęczowego. Dojrzałą ikrę uzyskuje się poprzez wpompowanie za pomocą igły pod określonym ciśnieniem oraz przy odpowiednim przepływie gazu (tlenu, azotu lub powietrza). Stosując tą metodę eliminuje się mechaniczny kontakt z tarlakami, mogący spowodować pęknięcie ziaren ikry. Udoskonalenie tej nowatorskiej metody może skutkować stosowaniem jej na szerszą skalę, uzyskując ikrę od wielu gatunków ryb, nie tylko łososiowatych.

Celem pracy było porównanie efektywności metody manualnej oraz pneumatycznej w pozyskiwaniu ikry troci oraz łososia. Określono szereg wskaźników jakościowych i ilościowych, począwszy od przydatności ikry do zapłodnienia, pH płynu owaryjnego, objętości uzyskanej ikry, czasu potrzebnego na przeprowadzenie tarła oraz przeżywalności tarlaków.

## **Materiały i metody**

Doświadczenia przeprowadzono na 100 tarlakach dla każdego gatunku z dwóch ośrodków rybackich (A oraz B). Ryby przed tarłem poddano anestezji z zastosowaniem Propiscinu lub 2-fenoksyetanolu. Pojedyncze osobniki umieszczano na brzuchu, na specjalnym łożu, następnie przy użyciu igły podłączonej do wężyka wtłoczono gaz poprzez przekłucie powłok skórnych do jamy ciała. Igły wykorzystywane do manipulacji mogą być z łatwością sterylizowane przy użyciu etanolu lub wymieniane dla każdego tarlaka. Miejsce wkłucia powinno znajdować się jak najbliżej części głowowej gonady. U troci oraz łososia znajduje się ono pod płetwami piersiowymi, u większych tarlaków w połowie odległości pomiędzy płetwami piersiowymi a pokrywami skrzelowymi.

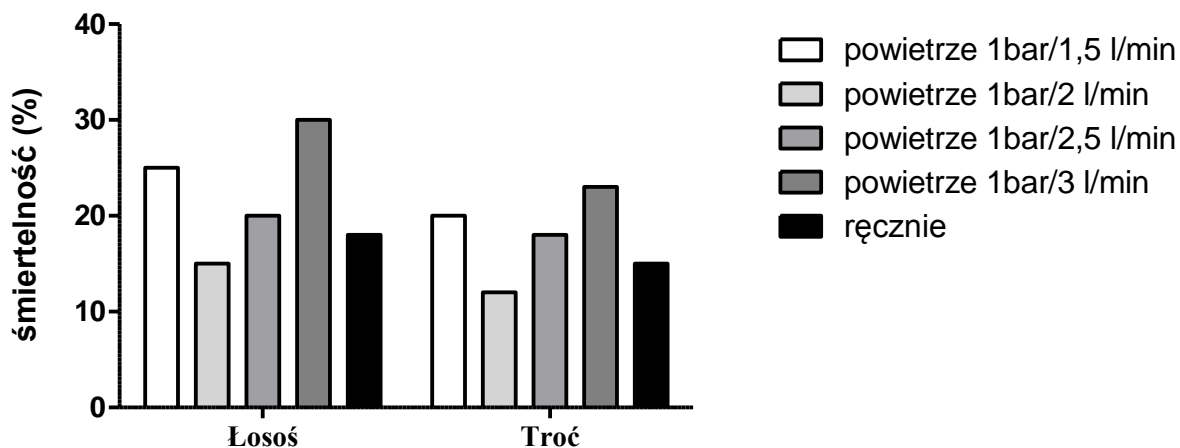
W uzyskanym materiale określono szereg parametrów ilościowych oraz jakościowych. Bezpośrednio przed oraz po wytarciu samice zostały poddane badaniu USG. Podczas poboru ikry mierzono czas, określano objętość uzyskanej ikry oraz płynu owaryjnego, w którym następnie zostało zmierzone pH. Zapłodnienia dokonano na próbach doświadczalnych od każdej z samic. W tym celu do 100 ziaren ikry dodano mlecz w ilości 200 000 plemników na ziarno ikry, zalano płynem aktywującym i pozostawiono na 5 min. Po tym czasie próby przepłukano wodą w celu usunięcia plemników i obsadzono w aparatach wylęgowych.

## **Wyniki i dyskusja**

Jednym z dotychczasowych utrudnień podczas tarła pneumatycznego było dobranie odpowiedniego ciśnienia oraz przepływu gazu, dla łososia i troci jest to kolejno 1 bar oraz 1,5-2,5 l/min. Stosowane ciśnienie zależy od wytrzymałości powłok brzusznych ryby oraz oporu stawianego przez ikrę (ikra gatunków z dużą ilością płynu owaryjnego daje się łatwiej i szybciej pozyskać od tej z małą ilością płynu owaryjnego). Także przepływ gazu jest ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność pozyskania oocytów z jamy ciała. Przy wolnym tempie wydalania jaj, przepływ powinien być niski, aby uniknąć kumulacji ciśnienia w powłokach ciała ryby. Zbyt duży przepływ może także spowodować zatrzymanie części oocytów w jamie ciała poprzez ich utknięcie w głowowej części jajników. Kolejnym istotnym punktem jest średnica igły, która zależy od wrażliwości ryb oraz stosowanego przepływu powietrza, optymalna grubość igły dla troci i łososia to 1,2 mm.

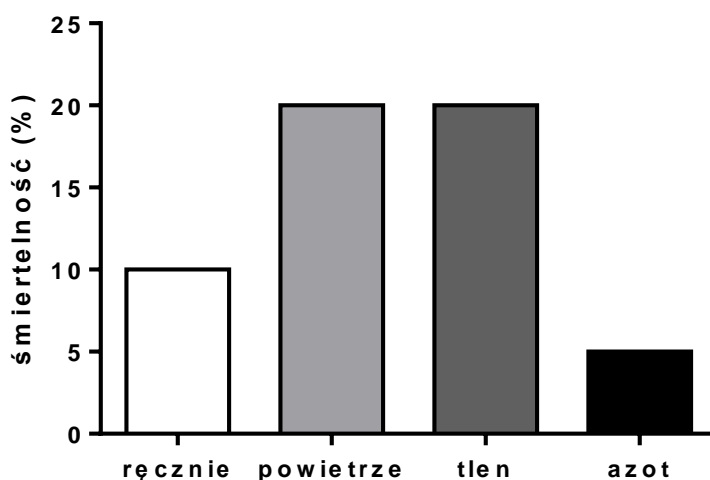
Doświadczenia nad optymalizacją ciśnienia oraz przepływu powietrza potwierdzone wynikami śmiertelności pozwoliły na dobór odpowiednich parametrów podczas stosowania metody pneumatycznej. U obu gatunków największą przeżywalność stwierdzono przy wartości ciśnienia 1 bar oraz przepływie 2 l/min (Rys. 1).

Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).



Rys. 1. Wpływ ciśnienia oraz przepływu powietrza stosowanych w technice pneumatycznej na śmiertelność łososia i troci w porównaniu do metody ręcznej.

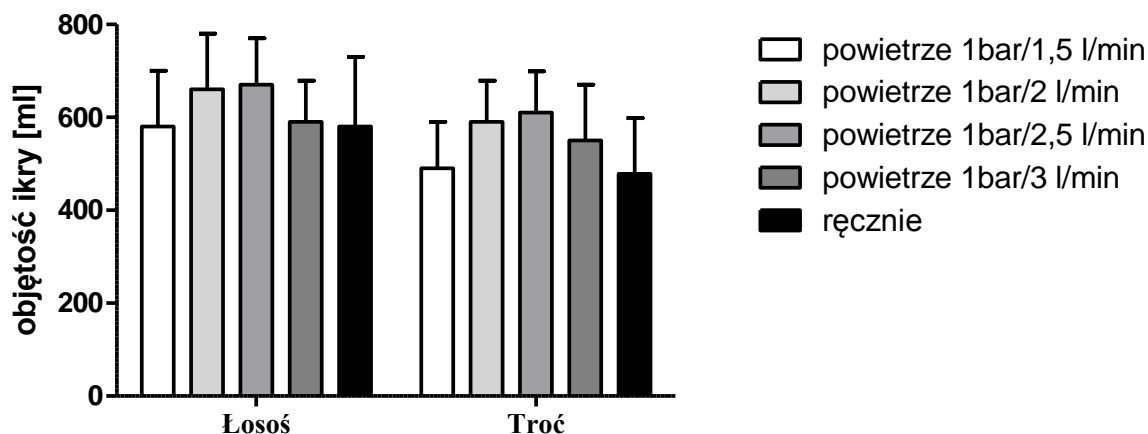
Analizując wyniki śmiertelności przy zastosowaniu różnych gazów stwierdzono, iż powietrze i tlen powodują największą liczbę śnięć troci, lecz nie jest ona znacząco różna od metody ręcznej. Uzyskanie oocytów techniką pneumatyczną z użyciem azotu pozwoliło na uzyskanie jedynie 5% śmiertelności samic (Rys. 2).



Rys. 2. Wpływ technik poboru ikry na śmiertelność troci wędrowniej.

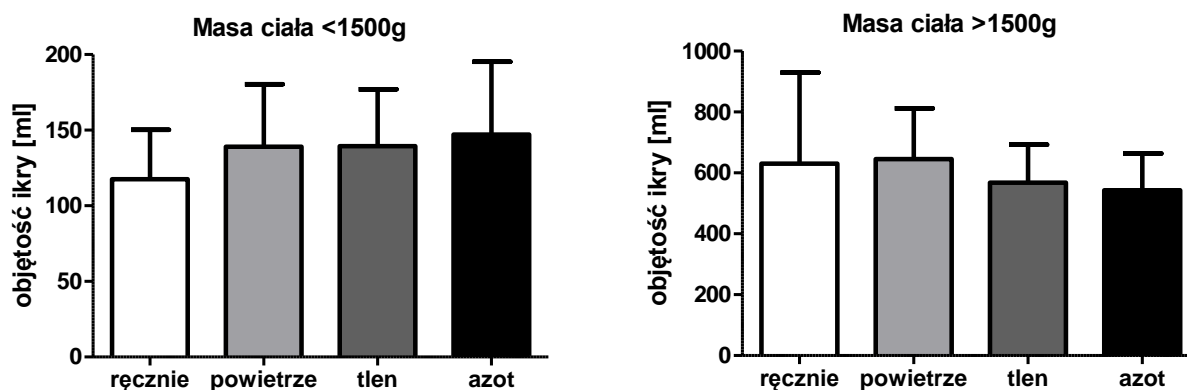
Dobór odpowiednich parametrów podczas tarła pneumatycznego dokonany został także pod względem objętości uzyskanej ikry (Rys.3). Potwierdzono wybór optymalnego ciśnienia oraz przepływu uzyskany na podstawie śmiertelności tarlaków.

Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).



Rys. 3. Wpływ ciśnienia oraz przepływu powietrza stosowanych w technice pneumatycznej na objętość uzyskanej ikry łososia i troci w porównaniu do metody ręcznej (średnia±SD).

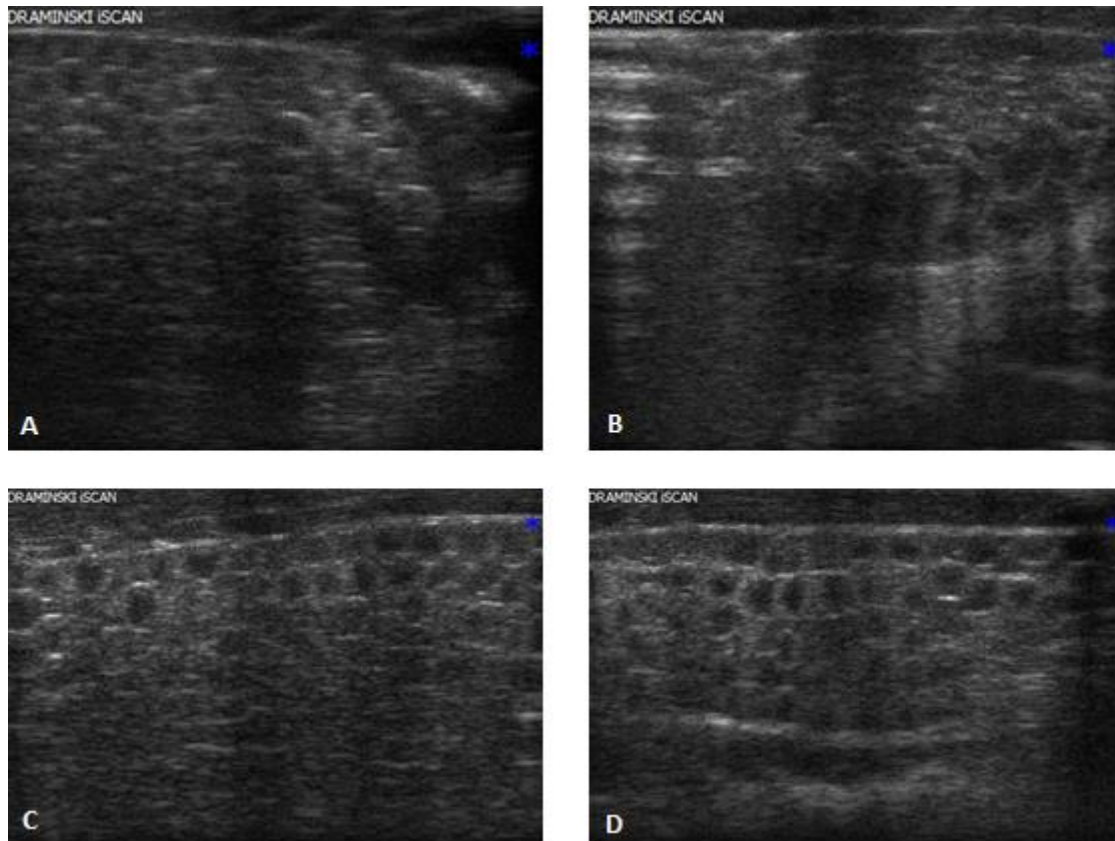
Objętość pozyskanej ikry troci wędrowniej była uzależniona od masy ciała samic. W przypadku ryb o masie ciała poniżej 1500 g uzysk ikry był ok. 4-krotnie niższy w porównaniu do większych tarlaków (Rys.4).



Rys. 4. Wpływ zastosowanej techniki poboru ikry na objętość uzyskanej ikry (średnia±SD).

Skuteczność pozyskania oocytów została potwierdzona przy zastosowaniu ultrasonografii. Samice wykorzystywane do tarła poddano badaniu USG przed i po uzyskaniu ikry. Otrzymane zdjęcia pozwoliły na ocenę ilości pozostałych po tarle ziaren ikry w ciele ryby. Nie stwierdzono różnic w ilości pozostałej w jamie brzusznej ikry oraz w czasie jej pozyskiwania przy zastosowaniu poszczególnych gazów użytych w metodzie pneumatycznej. Stosując metodę pneumatyczną obserwowano znacząco mniej niewytartych jaj w porównaniu do metody ręcznej (Rys.5).

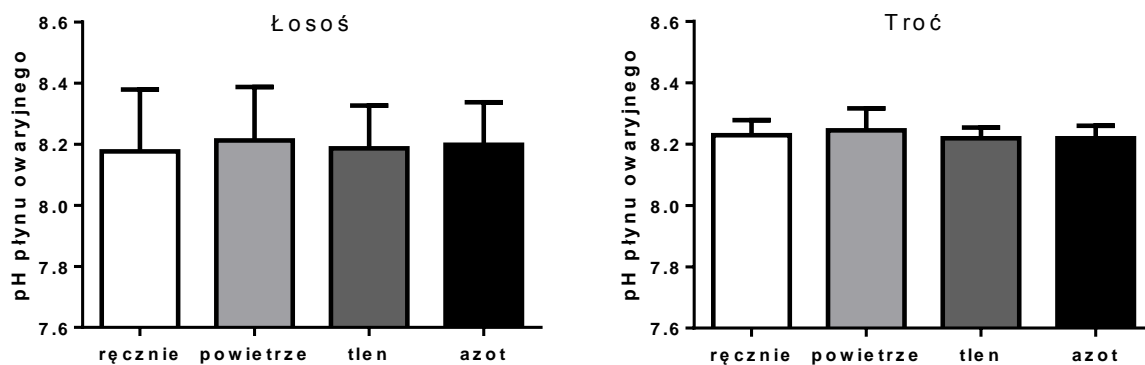
Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).



Rys.5. Obrazy ultrasonograficzne samic troci przed i po pozyskaniu ikry metodą pneumatyczną (A,B) oraz metodą manualną (C,D).

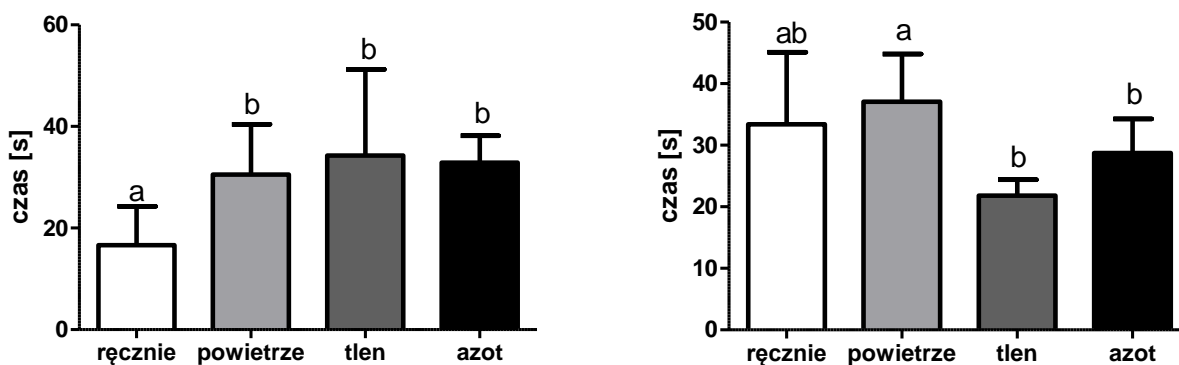
Wartości pH płynu owaryjnego zarówno dla troci jak i dla łososia nie różniły się znacząco w zależności od zastosowanej metody. Dla obu badanych gatunków pH mieściło się w zakresie 8.2-8.3 (Rys. 6). Zgniecenie ziaren ikry podczas ich pozyskiwania powoduje utrudnienia w procesie zapłodnienia lub całkowite jego zahamowanie. Zniszczone jaja podczas tarła uwidaczniają się jako osłonki z białą kremową substancją przypominającą mlecz (Leitritz i Lewis 1976). Dodatek zawartości zniszczonych jaj do płynu owaryjnego powoduje obniżenie jego pH oraz spadek zdolności płynu owaryjnego do aktywacji ruchliwości plemników (Dietrich i in. 2007). W takiej sytuacji można poprawić zapłodnienie partii ikry z uszkodzonymi osłonkami, stosując proste roztwory soli (Wojtczak i in. 2004). W praktyce stosowany jest 1% roztwór sody oczyszczonej. W roztworze tym można przepłukiwać jaja do kilkunastu minut bez ryzyka przedwczesnej ich aktywacji. Można także prowadzić w nich zapłodnienie z efektem lepszym niż w przypadku wody, gdyż w roztworze sody, plemniki ryb łososiowatych poruszają się szybciej i dłużej. Szybkość plemników ryb łososiowatych ma bezpośredni wpływ na ich zdolność zapładniającą, co udowodnił na przykładzie łososia Gage i in. (2004).

Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).



Rys. 6. Wpływ zastosowanej techniki pozyskania ikry na pH płynu owaryjnego łososia oraz troci (średnia±SD).

Szybkość pozyskania ikry była uzależniona od ośrodka, w którym hodowano tarlaki. W ośrodku A, metodą ręczną uzyskano oocyty w najkrótszym czasie, znacząco różniącym się od techniki pneumatycznej (Rys. 7). Natomiast w ośrodku B tlen oraz azot okazały się być gazami, dzięki którym znacznie skrócono czas poboru ikry w porównaniu do metody manualnej.

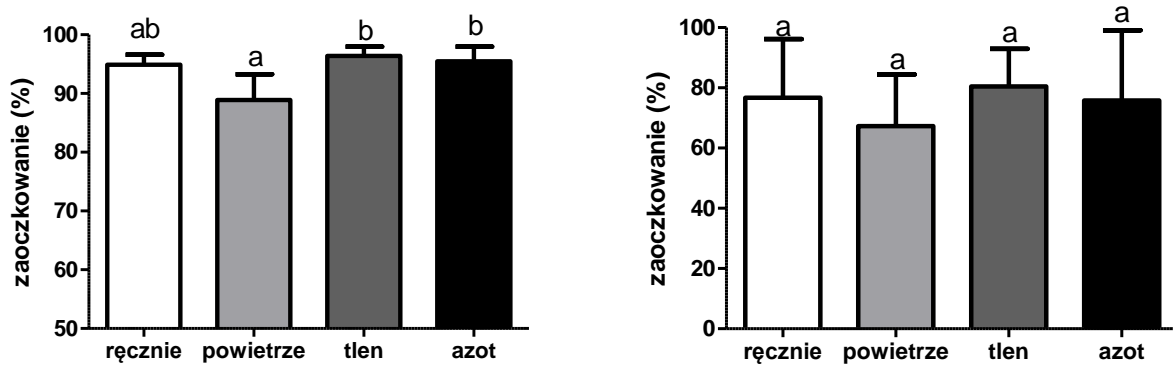


Rys. 7. Wpływ technik manualnej oraz pneumatycznej na szybkość pozyskania ikry troci w ośrodku A (lewa strona) i B (prawa strona). Dane przedstawione jako średnia±SD, oznaczenia literowe wskazują na różnice istotne statystycznie  $p < 0.05$ .

Wyniki zaoczkowania ikry troci wędrowniej pozwoliły stwierdzić, iż najbardziej użytecznymi gazami stosowanymi w pneumatycznej metodzie pozyskiwania oocytów są tlen oraz azot (Rys.8). Wartości uzyskane w ośrodku B nie różniły się znacząco pod względem zastosowanej techniki. W przypadku pobierania oocytów metodą ręczną i pneumatyczną widać wyraźnie jak wiele zależy od operatora w przypadku ręcznego tarła. Czas tarła pneumatycznego w obu ośrodkach mieścił się w zakresie 30 s. W przypadku tarła ręcznego w ośrodku A było to poniżej 20 s, natomiast w ośrodku B powyżej 30 s.

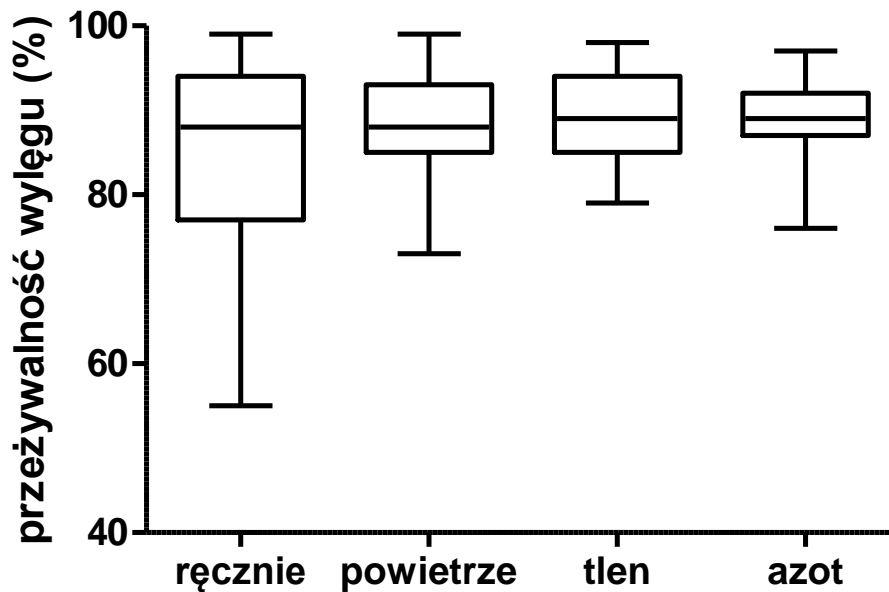


Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).



Rys. 8. Wpływ zastosowanej techniki poboru ikry na zaoczkowanie uzyskanej ikry troci w ośrodku A (lewa strona) i B (prawa strona) (średnia±SD).

Zdolność uzyskanej ikry łososia do zapłodnienia określona na etapie przeżywalności wylęgu nie wykazywała różnic statystycznych (Rys.9). Ważnym spostrzeżeniem jest jednorodność wyników uzyskanych przy użyciu metody pneumatycznej. Stosując metodę manualną uzyskano bardziej zróżnicowane wyniki (w zakresie od 55 do 99%, podczas gdy dla metody pneumatycznej zakres ten wynosi 73-98%).

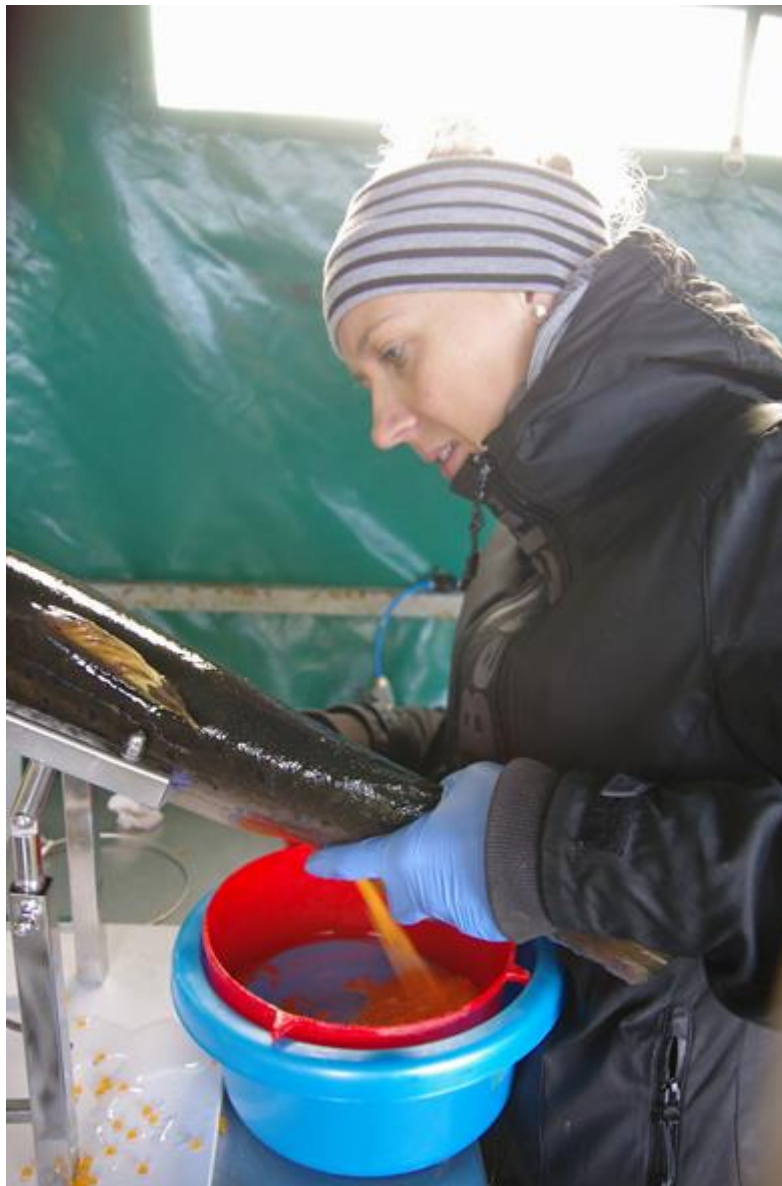


Rys.9. Wpływ zastosowanej techniki poboru ikry na przeżywalność wylęgu łososia (średnia±SD).

Zastosowanie pneumatycznej metody pobierania oocytów w rozrodzie łososia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta m. trutta*).

### **Wnioski:**

1. Pneumatyczna metoda pozyskania ikry okazała się techniką nieinwazyjną, z wartościami śmiertelności porównywalnymi do metody manualnej.
2. Pozwala na uzyskanie materiału porównywalnej ilości w stosunku do techniki ręcznej.
3. Technika pneumatyczna pozwala uzyskać ikrę charakteryzującą się dobrą jakością i mniejszym zróżnicowaniem.
4. Jako innowacyjna technika, nie jest skomplikowana oraz nie wymaga użycia siły fizycznej, co ma znaczenie przy masowych tarłakach (patrz Fot. 3).



Fot. 3. Tarło pneumatyczne łososia.

## Literatura

- Brylińska M. (2000): Ryby słodkowodne Polski. PWN, Warszawa: 408-420.
- Carl G.C. (1941): Beware of the broken egg! A possible cause of heavy losses of salmon eggs. *Prog. Fish Cultur.* 53:30 - 31.
- Dietrich G.J., Wojtczak M., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., Ciereszko A. (2007): Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid. *Aquaculture*, 273: 748–751.
- Gage M.J.G., Macfarlane C.P., Yeates S., Ward R.G., Searle J.B., Parker G.A. (2004): Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14, 44-47.
- Kowalski R.K., Kolman R., Pirtań Z., Cieśliski B., Glogowski J. (2009): Pobieranie ikry metodą pneumatyczną- innowacyjna technika wylęgarnicza. W: *Rozród, podchów, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków* (Red. Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A. Kowalska, D. Ulikowski.), Wyd. IRS, Olsztyn:59-65.
- Leitritz E., Lewis R. C. (1976): *Fish Bulletin* 164. Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods) (May 1, 1976). Scripps Institution of Oceanography Library. *Fish Bulletin*: 164: 47 - 50.
- Nyk J. (1997): *Troć wędrowna*. Multico Oficyna Wydawnicza Warszawa.
- Szczerbowski J. R. (red.) (1993). *Rybactwo Śródlądowe*. Instytut Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn: 208-214.
- Wharton J. C. F. (1957): A preliminary report on new techniques for the artificial fertilization of trout ova. *Victoria Fish. Contrib.* 6. Snob's Creek Fish. Res. Stn., Victoria. s. 17.
- Wojtczak M., Kowalski R., Dobosz S., Goryczko K., Kuzminski H., Glogowski J., Ciereszko A (2004): Assessment of water turbidity for evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality - *Aquaculture* 242: 617 - 624.