

UNIwersytet WarMińsko-Mazurski w OLSZTYNIE  
WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT



**mgr inż. Joanna Nowosad**

nr albumu: 1141

**Optymalizacja biotechniki rozrodu i wybrane aspekty wczesnej  
ontogenezy brzany (*Barbus barbus* L.)  
w warunkach kontrolowanych**

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Ichtiologii i Akwakultury  
pod kierunkiem  
dr hab. inż. Krzysztofa Kuprena, prof. UWM

## STRESZCZENIE

### Optimalizacja biotechniki rozrodu i wybrane aspekty wczesnej ontogenezy brzany (*Barbus barbus* L.) w warunkach kontrolowanych

mgr inż. Joanna Nowosad

Brzana *Barbus barbus* (L.) należy do ryb karpiowatych reofilnych i jest cennym składnikiem ekosystemów rzecznych, jednakże od wielu lat obserwuje się redukcję liczebności tego gatunku, zarówno w Polsce jak i innych krajach europejskich. Aby zapobiec dalszemu obniżaniu liczebności brzany, podejmowane są działania obejmujące zarówno czynną jak i bierną ochronę tego gatunku. Dlatego też w ostatnich latach brzana, stała się obiektem badań nad opracowaniem procedur związanych z rozrodem i wychowem materiału zarybieniowego w warunkach kontrolowanych. Akwakultura brzany związana jest głównie z akwakulturą zachowawczą, polegającą na produkcji materiału zarybieniowego w warunkach kontrolowanych i zarybianiu wód otwartych. Dotychczas prowadzone badania nad rozrodem tego gatunku, nie pozwoliły na stworzenie powtarzalnego protokołu rozrodu oraz produkcji materiału zarybieniowego brzany. Związane jest to między innymi z trudnością w wywołaniu owulacji u dzikich i słabo udomowionych samic brzany, stosunkowo niską płodnością czy też brakiem procedur zapładniania ikry.

W związku z powyższym, głównym celem niniejszych badań była optymalizacja biotechniki rozrodu oraz podchowu larw brzany *Barbus barbus* w warunkach kontrolowanych. W pracy skupiono się na takich aspektach jak optymalizacja rozrodu, doskonalenie metod zapłodnienia oraz analiza przebiegu wczesnego rozwoju larwalnego brzany z wykorzystaniem metod umożliwiających analizę dynamiki zmian morfologicznych i anatomicznych. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano tarlaki brzany hodowlanej (generacja F<sub>4</sub> i F<sub>5</sub>), które pochodziły z Ośrodka Zarybieniowego w Czarcim Jarze koło Olsztynka (Północno-Wschodnia Polska) lub zostały wyhodowane w Katedrze Ichtiologii i Akwakultury, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Stado hodowlane (generacja F<sub>4</sub>) zostało wyprowadzone z ryb pochodzących z dorzecza Wisły (rzeka Świder). Przeprowadzane badania obejmowały trzy uzupełniające się etapy. Podczas pierwszego z nich, podjęto próbę optymalizacji rozrodu brzany w warunkach kontrolowanych przy wykorzystaniu różnych wariantów stymulacji termicznej, a następnie połączeniu wybranego (najbardziej

efektywnego) wariantu stymulacji termicznej z zastosowaniem różnych środków hormonalnych (Ovopel, Ovaprim, hCG, CPH). Celem tych badań było otrzymanie wysokiego odsetka owulujących samic oraz przeżywalności embrionów. W drugim etapie badań skoncentrowano się na optymalizacji procesu zapłodnienia, gdzie szczególną uwagę zwrócono na skład płynu owaryjnego oraz jego wpływu na ruchliwość plemników. W ramach trzeciego etapu badań przeanalizowano przebieg rozwoju larwalnego brzany od momentu wyklucia, aż do zaniknięcia fałdu skórniego (0 – 22 DPH, dni po wykluciu). Skupiono się tu na takich aspektach jak behavior, zmiana allometrycznych wzorców wzrostu oraz morfogeneza układu pokarmowego larw brzany.

Otrzymane wyniki wykazały, iż przy jednoczesnym zastosowaniu właściwej stymulacji termicznej i hormonalnej można uzyskać wysoką efektywność rozrodu brzany w warunkach kontrolowanych. Spośród testowanych preparatów hormonalnych jako najbardziej skuteczne uznano CPH i Ovaprim. Po zastosowaniu tych preparatów odsetek owulacji wyniósł 90 – 100%, a przeżywalność embrionów w stadium wyklucia uzyskano na poziomie 90%. Zaobserwowano, że w czasie tarła wraz z ikrą brzany pozyskiwane były znaczne ilości płynu owaryjnego (14 – 68% masy ikry), który wpływał negatywnie na ruch plemników, hamując ich aktywność. Stwierdzono także istotną zależność między pH płynu owaryjnego a skutecznością zapłodnienia. Najwyższą przeżywalność (powyżej 60%) stwierdzono w zakresie pH od 7,9 do 8,4. Przy wyższych lub niższych wartościach pH odnotowano znaczące obniżenie przeżywalności zarodków. Plemniki brzany po aktywacji wodą stosunkowo krótko zachowywały zdolność do zapłodnienia. Czas ten można było jednak wydłużyć poprzez zastosowanie podczas procesu zapłodnienia płynu Woynarovich'a, który dodatkowo wpływał na zwiększenie odsetka przeżywalności zarodków, a tym samym ilość wyklutych larw. Zaobserwowano, że larwy brzany pomimo stosunkowo dużych rozmiarów ciała (w porównaniu do innych ryb karpiowatych), w momencie wyklucia były słabiej zaawansowane rozwojowo. Analizując przebieg kolejnych etapów wczesnej ontogenezy tego gatunku stwierdzono, że najbardziej dynamiczny okres zmian przypadał na pierwsze 11 dni po wykluciu. Miało to między innymi odzwierciedlenie w częstotliwości występowania poszczególnych punktów przegięcia tzw. flexion points, wskazujących na zmiany dynamiki wzrostu badanych partii ciała lub narządów, a w rezultacie zmian proporcji ciała. Larwy brzany pomimo mało zaawansowanego stopnia rozwojowego w momencie wyklucia tj.: braku pigmentu w oku, braku wyróżnionej wątroby i trzustki, niedroźnego przewodu pokarmowego, wyjątkowo szybko przechodziły przez okres larwalny i wchodziły w okres juwenilny (22 dni) posiadając wiele cech obserwowanych u osobników dorosłych.

Wyniki zawarte w niniejszej rozprawie stanowią nie tylko wartość naukową poszerzając wiedzę zarówno na temat czynników wpływających na rozród oraz przebieg wczesnych etapów ontogenezy, ale również wnoszą istotne praktyczne wskazówki, które mogą zostać wykorzystane przez hodowców, w celu uzyskania wymiernych efektów podczas rozrodu oraz podchowu brzany w warunkach kontrolowanych. Mogą one znacząco wpłynąć na zwiększenie odsetka owulujących samic, zapłodnionej ikry oraz przeżywalności embryonów. Określone w niniejszej pracy wzorce wzrostu, w tym przebieg rozwoju larwalnego ze szczególnym nastawieniem na rozwój morfologiczny, anatomiczny oraz behavior larw, mogą być podstawą do opracowania procedur prowadzących do skrócenia czasu wychowu materiału zarybieniowego brzany, także w wyniku opracowania odpowiedniego protokołu żywienia larw i narybku. Hodowcy ryb wykorzystując cenne wskazówki zawarte w niniejszej pracy, mogą osiągnąć wyższą efektywność rozrodu i produkcji materiału zarybieniowego brzany, co pośrednio może wpłynąć na poprawę liczebności brzany w wodach otwartych poprzez zarybienia wód wysokiej jakości materiałem zarybieniowym. Wszystkie powyższe aspekty mogą stanowić istotny wkład wiedzy w aktywną ochronę gatunku jakim jest brzana.

*Słowa kluczowe: jakość ikry; morfogeneza; owulacja; płyn owaryjny; rozmnażanie; rozwój larwalny; zapłodnienie*

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN FACULTY  
OF ANIMAL BIOENGINEERING



**MSc Eng. Joanna Nowosad**

Student no.: 1141

**Optimisation of biotechnology reproduction and selected aspects  
of early ontogenesis of common barbel (*Barbus barbus* L.)  
under controlled conditions**

Dissertation thesis performed in the Department  
of Ichthyology and Aquaculture  
under the guidance of  
DSc. Eng. Krzysztof Kupren, prof. UWM

## SUMMARY

### **Optimisation of biotechnology reproduction and selected aspects of early ontogenesis of common barbel (*Barbus barbus* L.) under controlled conditions**

**MSc Eng. Joanna Nowosad**

The common barbel *Barbus barbus* (L.) is a rheophilic cyprinid fish, and is a valuable component of river ecosystems. However, for many years, a reduction in the number of fish of this species has been noted both in Poland and in other European countries. In order to prevent further decline in the common barbel population size, different activities are being taken to protect this species, both actively and passively. Therefore, in recent years, the common barbel has become the focus of research aimed at developing procedures for the artificial reproduction and rearing of stocking material under controlled conditions. The common barbel aquaculture is primarily associated with conservative aquaculture, which involves the production of stocking material under controlled conditions, and the stocking of open waters. The research carried out so far into the reproduction of this species has not enabled the establishment of a repeatable protocol for the breeding and production of the common barbel stocking material. This is due, *inter alia*, to a difficulty in inducing ovulation in wild and poorly domesticated common barbel females, the relatively low fecundity, or the absence of eggs fertilisation procedures.

Therefore, the main objective of this study was to optimise the common barbel artificial reproduction and larval rearing biotechnics under controlled conditions. The study focused on such aspects as the optimisation of reproduction, improving the fertilisation methods, and an analysis of the course of the early common barbel larval development using methods that enable an analysis of the morphological and anatomical change dynamics. The conducted experiments used the reproduction common barbel spawners (F<sub>4</sub> and F<sub>5</sub> generations) originating from the Hatchery in Czarci Jar near Olsztyn (north-eastern Poland) or bred at the Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. The spawning stock (F<sub>4</sub> generation) was derived from fish originating from the Vistula River basin (the Świder River). The conducted study comprised

three complementary stages. During the first stage, an attempt was made to optimise the common barbel's spawning under controlled conditions using different variants of thermal stimulation, followed by combining a selected (the most effective) thermal stimulation variant with the use of various hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, hCG, CPH). The aim of the study was to obtain a high percentage of ovulating females and a high embryo survival rate. The second stage of the study focused on optimising the fertilisation process, with particular attention paid to the ovarian fluid composition and its effect on sperm motility. The third stage of the study analysed the common barbel larvae development from hatching until the skin fold disappearance (0 – 22 days post hatch (DPH)). The focus was on such aspects as the behaviour, a change in allometric growth patterns and the morphogenesis of the common barbel larvae digestive system.

The results demonstrated that the simultaneous application of thermal and hormonal stimulation can result in a high common barbel *Barbus barbus* reproduction effectiveness under controlled conditions. Of all the hormonal preparations tested, CPH and Ovaprim were found to be the most effective. After the application of these preparations, the ovulation percentage was 90 – 100%, and the 90% embryo survival rate at the hatching stage was achieved. It was observed that during the reproduction, along with the common barbel eggs, considerable amounts of ovarian fluid were obtained (14 – 68 % of the weight of the eggs), which had an adverse effect on sperm motility, thus inhibiting their activity. Moreover, a significant relationship was found between the pH of the ovarian fluid and the fertilisation efficiency. The highest survival rate (exceeding 60%) was found in the pH range of 7.9 – 8.4. At higher or lower pH values, a significant reduction in the embryonic survival rate was noted. After being activated with water, the common barbel spermatozoa retained the ability to fertilise for a relatively short time. This duration, however, could be elongated by using Woynarovich's solution during the fertilisation process, which additionally contributed to an increase in the embryonic survival rate, and thus in the number of hatched larvae. It was observed that the common barbel larvae, despite their relatively large body size (as compared to other cyprinids), were developmentally less advanced at the time of hatching. An analysis of the course of the successive early ontogenetic stages for this species found that the most dynamic period of changes occurred during the first 11 days after hatching. This was reflected, *inter alia*, in the occurrence of a number of individual flexion points that indicated changes in the dynamics of the growth of the tested body parts or organs and, consequently, changes in the body proportions. Despite a poorly advanced developmental stage at the time of hatching, i.e. the absence of pigment in the eye, the absence of a distinct liver and pancreas and

an obstructed gastrointestinal tract, the common barbel larvae passed through the larval period exceptionally quickly and entered the juvenile period (22 days) already possessing many characteristics observed in adult individuals.

Not only do the results presented in this paper provide scientific value by improving knowledge on both the spawning-affecting factors and the course of the early ontogenetic stages, but they also offer important practical guidance that can be used by breeders to achieve measurable results during the breeding and rearing of the common barbel under controlled conditions. They can significantly contribute to: an increase in the percentage of ovulating females, an increase in the percentage of fertilised eggs and the embryonic survival rate. The growth patterns and the course of larval development, with particular focus on the morphological and anatomical development as well as the larvae behaviour, as specified in this study, provide a basis for the development of procedures for reducing the duration of the common barbel stock material rearing, including by selecting an appropriate larva and fry feeding protocol. Fish farmers using the valuable guidance provided in this study can achieve higher effectiveness of breeding and production of common barbel stocking material, which may indirectly contribute to an improvement in the common barbel population size in open waters through the stocking of waters with high quality stocking material. All of the above aspects provide an important contribution to the active protection of the common barbel.

*Keywords: fertilisation; eggs quality; larval development; ovary fluid; ovulation; morphogenesis; reproduction*