

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Optimalizace chovu druhu *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Milan Gottwald**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Optimalizace chovu druhu *Danio rerio* (Hamilton, 1822)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 08.04.2016

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce Lukášovi Kalousovi za pomoc a především za velkou trpělivost, kterou mi věnoval, dále Petrovi Bartůňkovi za možnost provedení tohoto experimentu v chovném zařízení v rámci ÚMG, rybímu týmu laboratoře buněčné diferenciaci, svým zaměstnancům a také bych zde velice rád poděkoval Nikol Pavlů za výpomoc v péči o jikry, embrya a vířníkovou kulturu, Christianu Lawrencovi a jeho týmu za možnost navštívit jejich chovné zařízení a za možnost praxe s vířníkovou kulturou.

# Optimalizace chovu druhu Dánio pruhované *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

## Souhrn

Tato diplomová práce shrnuje experimentální metodu odchovu potěru dánia pruhovaného *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Práce zjišťuje, která z metod odchovu potěru v přechodném období ontogenetického vývoje je nejlepší pro míru přežití a růst standardní délky zkoumaných jedinců.

Test byl proveden na dvou základních liniích dánia pruhovaného a to divoké formy této ryby a linie Casper. Na začátku testu byly vytvořeny čtyři skupiny rozdělené podle krmeného režimu. Kontrolní skupina byla krmena jednou denně peletovým krmivem GEMMA Micro 75 a jednou denně od desátého dne po oplození příkrmována naupliovými stádii žábřonožky solné *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). Druhá skupina byla krmena pouze jednou denně peletovým krmivem GEMMA Micro 75. Poslední dvě skupiny byly krmeny pětkrát denně slanovodními vířníky druhu *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786), při čemž jedna pouze jimi a druhá byla ještě třikrát denně příkrmována naupliovými stádii žábřonožky solné. Pro každou skupinu byly vytvořeny čtyři reprezentativní nádrže o počátečním stavu třiceti ryb ve věku pěti dní po oplození.

Výsledky této metody ukázaly, že metody, které využívaly ke krmení vířníky, neměly statisticky významný dopad na míru přežití jedinců. V růstu se tato metoda projevila se statisticky významným výsledkem ve skupině, kde se krmilo v kombinaci se žábřonožkou solnou, kde se dosáhlo průměrné standardní velikosti juvenilních ryb  $16,02 \pm 0,80$  mm pro divokou formu a  $17,39 \pm 0,81$  mm pro linii Casper, oproti kontrolní skupině, která dosáhla hodnot standardní délky  $11,63 \pm 0,64$  mm pro divokou formu a  $9,54 \pm 0,56$  mm pro linii Casper.

Tato metoda odchovu má veliký potenciál a je tedy nutné dále tuto metodu rozvíjet a přizpůsobovat ji jednotlivým chovným zařízením.

**Klíčová slova:** *Danio rerio*, dánio pruhované, výživa, potěr, přežití

# Optimization of the rearing of the species Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

## Summary

The diploma thesis summarizes the experimental method for the rearing of zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) reared. The work of figuring out which of the methods of rearing fry in the transitional period of the ontogenetic development is best for the survival rate and growth of the standard length of the surveyed individuals.

The test was carried out on two basic lines of zebrafish Wild Type and Casper. At the beginning of the test were created four groups divided by feeding mode. The control group was fed once a day with pellet feed GEMMA Micro 75 and one day from the 10th day after fertilization the fed with nauplii stages of brine shrimps *Artemia salina* (Linnaeus, 1758).

The second group was fed only once a day with pellet feed GEMMA Micro 75. The last two groups were fed five times a day saltwater rotifer species *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786), and only one of them and the other was still three times daily nourished with nauplii stages of brine shrimps. For each group of four representative have been created initially, thirty tanks of fish at the age of five days after fertilization.

The results of this method have shown that the methods they use to feed the rotifers, did not have a statistically significant impact on the survival rate of individuals. In the growth of this method has proven to be statistically significant result in the group where the fed in combination with brine shrimps, where to achieve the average standard size of juvenile fish  $16.02 \pm 0.80$  mm for the Wild type and  $17.39 \pm 0.81$  mm for Casper, compared to the control group, that has been the standard length  $11.63 \pm 0.64$  mm for the Wild Type and  $9.54 \pm 0.56$  mm for Casper.

This method has great potential and breeding is therefore necessary to further develop this method and to adapt it to individual zebrafish facilities.

**Keywords:** *Danio rerio*, Zebrafish, Nutrition, Larvae, Survival

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Úvod</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>2 Cíl práce</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>2.1 Formulované hypotézy</b> .....                                | <b>9</b>  |
| <b>3 Literární rešerše</b> .....                                     | <b>10</b> |
| <b>3.1 Dáňio pruhované <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)</b> ..... | <b>10</b> |
| 3.1.1 Divoká forma (Wild type).....                                  | 13        |
| 3.1.2 Linie Casper .....   | 13        |
| <b>3.2 Potrava</b> .....   | <b>14</b> |
| 3.2.1 Fyziologie trávení .....                                       | 14        |
| <b>3.3 Odchov potěru</b> .....                                       | <b>14</b> |
| 3.3.1 Standardní odchov .....  | 15        |
| 3.3.2 Polykultura s vířníky druhu <i>Brachionus plicatilis</i> ..... | 16        |
| <b>4 Materiály a metoda</b> .....                                    | <b>17</b> |
| <b>4.1 Rodičovská populace ryb</b> .....                             | <b>17</b> |
| 4.1.1 Divoká forma .....   | 17        |
| 4.1.2 Linie Casper .....   | 18        |
| 4.1.3 Péče o jikry a embrya.....                                     | 18        |
| <b>4.2 Testovaná krmiva</b> .....                                    | <b>19</b> |
| 4.2.1 Pelety o velikosti 50 – 100 µm .....                           | 20        |
| 4.2.2 Vířníci druhu <i>Brachionus plicatilis</i> .....               | 20        |
| 4.2.3 Nauplie <i>Artemia salina</i> .....                            | 21        |
| <b>4.3 Chovný systém</b> .....                                       | <b>21</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>4.4</b> | <b>Jednotlivé skupiny experimentu .....</b> | <b>22</b> |
| 4.4.1      | Kontrolní skupina .....                     | 22        |
| 4.4.2      | Skupina GEMMA Micro .....                   | 22        |
| 4.4.3      | Skupina vířníci .....                       | 23        |
| 4.4.4      | Skupina vířníci a <i>Artemia</i> .....      | 23        |
| <b>4.5</b> | <b>Měření .....</b>                         | <b>24</b> |
| 4.5.1      | Míra přežívání .....                        | 24        |
| 4.5.2      | Standardní délka .....                      | 24        |
| <b>4.6</b> | <b>Statistické vyhodnocení .....</b>        | <b>24</b> |
| <b>5</b>   | <b>Výsledky .....</b>                       | <b>25</b> |
| 5.1        | Míra přežití .....                          | 25        |
| 5.2        | Standardní délka .....                      | 27        |
| 5.3        | Ověřování formulovaných hypotéz .....       | 28        |
| <b>6</b>   | <b>Diskuze .....</b>                        | <b>33</b> |
| <b>7</b>   | <b>Závěr.....</b>                           | <b>36</b> |
| <b>8</b>   | <b>Seznam použité literatury.....</b>       | <b>37</b> |
| <b>9</b>   | <b>Seznam použitých zkratk.....</b>         | <b>39</b> |

# 1 Úvod

Dáňo pruhované *Danio rerio* (Hamilton, 1822) je snovým modelovým organismem na poli nové vlny genomového průzkumu. Tato fotogenická zvířata jsou prvními obratlovci, kteří se ukázali ve velkém měřítku jako tvárný typ genetického screeningu a úspěšně se používají stejně jako octomilky nebo červy. Mutace vyvolané chemickými látkami, zářením nebo vložením za pomoci virů způsobují viditelné změny (fenotypy), které mohou být snadno pozorovány i u obratlovců. Embrya těchto ryb díky své transparentnosti usnadňují analýzu mutací, protože změny v jejich fenotypech mohou být sledovány na úrovni jednotlivých buněk v živém organismu. Podobnost vývojových programů mezi všemi obratlovci znamená, že je tato ryba skvělým modelovým organismem pro zkoumání lidského vývoje (Fishman, 2001).

Vzestup dáňo pruhovaného jako pokusného organismu byl skutečně dramatický. V relativně krátké době, během pouhých několika desítek let, se z koníčku akvaristiky stal hlavní proud zvířecího modelu využívaného vědci pro studium všeho od kmenových buněk po změny v chování vyvolané drogovou závislostí. Tento rychlý vývoj byl zaznamenán a popoháněn převážně četnými působivými pokroky v technologii spolu s podrobnou charakteristikou zvířete na genetické a molekulární úrovni (Harper and Lawrence, 2011).

Metody chovu u těchto ryb však i přes jeho rostoucí prevalenci ve výzkumných programech po celém světě, zdaleka nedosahují hodnot, kterých dosahují tyto vědecké programy. Tento trend můžeme přičíst opožděnému tempu technologických inovací, jakož i vlastní toleranci těchto ryb na různé podmínky prostředí. Skutečnost, že se dáňo pruhovaná snadno chovat a množit v laboratoři je hlavní, ale často přehlížený přispívající faktor, který pomalu vystupuje do popředí (Lawrence, 2011), některé z nejzákladnějších otázek však zůstávají nezodpovězené. Mezi nejvýznamnější z nich patří vhodný způsob výživy, biologie trávení a chování ryb při krmení (Lawrence et al., 2012).



## 2 Cíl práce

Cílem práce je optimalizace akvarijního chovu druhu dánia pruhovaného *Danio rerio* (Wild type, Casper), především s ohledem na míru přežívání raných stádií.

### 2.1 Formulované hypotézy

Pro účely této práce byly formulovány tyto vědecké hypotézy:

Ryby rozkrmované vířníky druhu *Brachionus plicatilis* lépe snášejí přechodnou fázi ontogenetického vývoje než ryby krmené běžnými metodami.

Ryby rozkrmované vířníky druhu *Brachionus plicatilis* lépe rostou než ryby krmené běžnými metodami.

Umělé krmivo dokáže plně nahradit živou potravu v přechodné fázi ontogenetického vývoje.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Dánio pruhované *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

#### Taxonomie

Dánio pruhované *Danio rerio* (Hamilton, 1822) patří do řádu ryb *Cypriniformes*, druhově nejbohatší rodiny obratlovců, do čeledi *Cyprinidae* a podčeledi *Rasborinae*, která se vyskytuje v oblastech Afriky a Jižní Eurasie včetně Indonesie, složení a monofylie této skupiny je však nejisté (Nelson, 2006). V současné době existuje 44 druhů rodu *Danio*, které jsou rozšířeny po celé jižní a jihovýchodní Asii (Spence et al., 2007a).

#### Výskyt

Přirozený výskyt dánia pruhovaného *Danio rerio* (Hamilton, 1822) je soustředěn kolem povodí řek Gangy a Brahmaputry v severovýchodní Indii, Bangladeši a Nepálu. Podle posledních průzkumů se výskyt potvrdil také v povodí řek Indus, Cauvery, Pennar, Godavari a Mahanadi (Spence et al., 2007a). Tato geografická oblast se vyznačuje monzunovým klimatem s výraznějším obdobím dešťů a obdobím sucha. Sezónnost dešťových srážek má hluboké a někdy až drastické účinky na stanoviště ryb a to jak z hlediska fyzikálních a chemických vlastností, tak i v množství zdrojů (Harper and Lawrence, 2011). V oblastech přirozených stanovišť se vyskytuje široký rozsah teplot od nízkých 6°C v zimě až po více než 38°C v letních měsících (Spence et al., 2007a), ovšem nejnižší zaznamenaná teplota vody byla 16,5°C a nejvyšší 34°C (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011).

#### Chov

Schopnost chovat dánio pruhované od jikry až k dospělému jedinci má mimořádný význam pro jakýkoliv výzkumný program, který využívá ryby jako experimentální model (Best et al., 2010). Elementárním provozním cílem každého chovného zařízení je poskytnout stabilní a příznivé prostředí pro ryby v něm umístěné. Toto zařízení je pro ryby synonymem kvality životního prostředí a zahrnuje fyzikální, chemické a biologické vlastnosti vody. Nejdůležitějšími parametry jsou teplota, hodnota pH, obsah solí, alkalita, tvrdost a dusíkaté odpadní látky (Lawrence and Mason, 2012).

#### Teplota

Teplota je jedním z nejdůležitějších fyzikálních parametrů v akvakulturních provozech a to především z důvodu velkých účinků, který působí na biologické a chemické procesy v živých systémech. Ryby bývají často poikiloternními zvířaty, což dokazují různé stupně

tolerance na změny teplot, jakož i užší optimální rozsah pro vývoj. Dánio pruhované může být v tomto ohledu klasifikováno jako eurytermní, neboť vykazuje toleranci k širokému rozsahu teplot (Lawrence, 2007). V laboratorních chovech se teplota v akváriích udržuje kolem 28,5°C, nad 31°C a nebo pod 25°C se ryby nebudou pravděpodobně množit a jejich vývoj bude abnormální (Westerfield, 2000). Důvody pro tuto teplotu jsou dvojí, za prvé, mnoho studií týkající se klasických embryologických vývojových fází, bylo provedeno při této teplotě. Za druhé, tato teplota je zřejmě v blízkosti tepelného optima pro nejvyšší rychlost růstu (Harper and Lawrence, 2011).

### Kvalita vody

Kvalita vody je nejdůležitějším faktorem pro zdraví a pohodu ryb. Špatná kvalita vody může vést ke stresu a nemoci, nebo může mít vliv na rozmnožování. I když existují určité obecně užitečné principy, ideální parametry nejsou široce odsouhlaseny ani definovány (Reed and Jennings, 2010).

### pH

Tak jako teplota má i hodnota pH vody, což je relativní koncentrace kyselin (vodíkového iontu  $H^+$ ) a báze (zejména uhličitan  $CO_3^{2-}$  a hydrogenuhličitan  $HCO_3^-$ ) v roztoku (Harper and Lawrence, 2011), hluboký vliv na biologické procesy, například podporující funkce mikrobiálních kultur (Lawrence, 2007). Polní studie zjistily, že dánia pruhovaná byla přítomna ve vodách s pH mezi 5,9 a 8,1 (Reed and Jennings, 2010). V uzavřených systémech recirkulační akvakultury se optimální rozmezí pH pohybuje mezi 7 a 8 (Lawrence, 2007), respektive se doporučuje jí směřovat k hodnotám minimálně k hodnotě 6,8 a maximálně 7,5 (Reed and Jennings, 2010), což je vhodné pro bakteriální flóru biofilmu filtru, který metabolizuje dusíkaté látky vylučované rybami (Lawrence, 2007). Hodnota pH by nikdy neměla být nižší než 6, nebo vyšší než 8 (Reed and Jennings, 2010).

### Tvrdost

Tvrdost vody je míra množství dvojmocných iontů, především vápníku a hořčíku, v menší míře železa a selenu, ve vodě (Harper and Lawrence, 2011). Ryby tyto ionty vyžadují pro udržení dobrých zdravotních funkcí a mohou být získány prostřednictvím stravy, nebo samotným životním prostředím (Reed and Jennings, 2010). Nejdůležitější z těchto iontů je vápník, který je vyžadován pro osifikaci, srážlivost krve a řadu dalších biologických a fyziologických procesů. Stupeň tvrdosti vody může ovlivnit osmoregulaci a je často v souvislosti s pufrovací kapacitou vody. Tvrdost vody může mít též vliv na patologii některých chorob (Harper and Lawrence, 2011). Obecně se doporučuje pro vodní živočichy rozsah hodnot tvrdosti v rozmezí 75 - 200 mg/l  $CaCO_3$ , dánio pruhované bylo klasifikováno

jako druh „tvrdých vod“ a má raději hodnoty tvrdosti vyšší než 100 mg/l CaCO<sub>3</sub> (Lawrence, 2007).

### Salinita

Slanost je celková koncentrace všech rozpuštěných iontů ve vodě. Sladkovodní ryby jsou hyperosmotické vůči jejich prostředí a tudíž mají tendenci získávat vodu a ztrácet sole difuzí přes žábry a kůži. V důsledku toho musí udržovat vnitřní rovnováhu vody a soli pomocí vylučování velkého množství zředěné moči a aktivního transportu iontů zpět do krve přes chloridové buňky žaberního epitelu (Harper and Lawrence, 2011). Dánio pruhované je sladkovodní ryba, přesto však má tato ryba velkou toleranci k širokému rozsahu salinity, které jí technicky rozšiřují až do brakických podmínek. Embrya chovaná v salinitě 2 ppt ukazují podobnou míru přežití jako kontrolní embrya chovaná při salinitě 0,3 ppt. Krátkodobě (1 až 2 hodinové pulzy) dokáží embrya, která prošla gastrulací, přežít i salinitu o hodnotě 14 ppt. Tato pozorování odrážejí přizpůsobení těchto ryb k velké variabilitě jejich původního prostředí, které se velice liší a to jak v geologickém podloží, tak i sezonních výkyvech v množství srážek (Lawrence, 2007).

### Dusíkaté látky

Odpadním produktem primárního metabolismu ryb je amoniak. U sladkovodních ryb se vylučuje přes žaberní epitel pomocí pasivní difúze a v menší míře ve výkalech. Amoniak také vzniká při rozkladu tlejících zbytků organické hmoty (mrtvé ryby, nesnědená potrava) (Lawrence, 2007). Ve vodních systémech se vyskytují dvě formy, amoniak (NH<sub>3</sub>) a amonný iont (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), jejichž součet se označuje jako celkový amonný dusík (TAN). Poměr vysoce toxického NH<sub>3</sub> a netoxického NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se zvyšuje s pH a teplotou a v menší míře ho snižuje zvyšující se míra salinity (Harper and Lawrence, 2011). Hladina NH<sub>3</sub> přesahující 0,02 ppm je obvykle toxická pro vodní živočichy a proto v uzavřených recirkulačních systémech musí dojít k jejímu odstranění, to se provádí pomocí nitrifikačních bakterií, které oxidují amoniak a amonný iont na dusičnany. Meziproduktem této přeměny je dusitan, který je taktéž toxický pro ryby a ve vyšších koncentracích (více než 1 ppm) může být ve sladkovodních systémech problematický (Harper and Lawrence, 2011).

Pokud je zjištěn velký nárůst amoniaku nebo dusitanu musí být provedena rozsáhlá výměna vody, protože vysoké hladiny obou těchto látek může poškozovat ryby. Velké množství dusitanu může být absorbováno přes žábry a tím dochází k narušení schopnosti absorbovat kyslík, což má za následek úhyn ryb (Reed and Jennings, 2010). Ryby menšího vzrůstu těla se zdají být obecně méně citlivé na dusitanovou toxicitu než větší ryby. Dusičnany nejsou pro ryby obecně příliš toxické (Harper and Lawrence, 2011).

### 3.1.1 Divoká forma (Wild type)

V současné době existuje tisíce transgenních a mutantních linií dánia pruhovaného a mnoho dalších vzniká, převážná většina z nich jsou odvozeny od malého počtu „standardních“ outbreedních divokých kmenů, které se užívali v letech 1980 – 1990. Mezi nejčastější kmene těchto divokých populací patří kmen AB (také známý jako \*AB), TU (Tübingen), WIK a TL (tupfel Longfin). Vzhledem k tomu, že využití dánia jako modelu pokračuje v expanzi na nová pole vědy, roste i potřeba lépe definovat genetickou povahu těchto kmenů (Lawrence, 2011). Divoká forma dánia pruhovaného je někdy označován jako „standardní linie“ a je technicky definována jako uzavřená chovná populace ryb, které nejsou nastaveny žádné fenotypové mutace. Ryby divoké formy dánia pruhovaného jsou reprezentativní příklad „typické“ ryby pokud jde o jejich anatomii, fyziologii a chování (Harper and Lawrence, 2011).

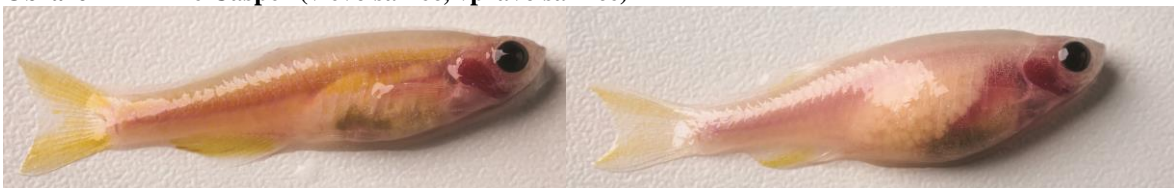
**Obrázek 1 - Divoká forma (vlevo samec, vpravo samice)**



### 3.1.2 Linie Casper

Kmen dánia pruhovaného Casper byl vytvořen pářením dvou pigmentových mutantů jménem „Nacre“ a „Roy“. Nacre je homozygotní mutant v genu mitfa, jehož exprese je přísně omezena na melanocytovou buněčnou linii. Kmen „Roy“ je homozygotní mutant v necharakterizovaném genu, jehož exprese je především omezena na pigmentové melanocyty a reflexní iridofory. Ztráta obou typů těchto buněk způsobuje, že životaschopní dospělí jsou relativně transparentní; melanocyty absorbují dopadající světlo a iridofory odrážejí světlo pryč. Kmen je přiměřeně plodný a zdravý, jakmile se dostane za přechodné období (věk mezi druhým a čtvrtým týdnem po oplození) (Detrich et al., 2011).

**Obrázek 2 - Linie Casper (vlevo samec, vpravo samice)**



## 3.2 Potrava

Dánio pruhované je všežravec, jeho přirozená potrava se skládá především ze zooplanktonu a hmyzu, přestože se v obsahu jeho střev často vyskytují fytoplankton, vláknité řasy a jiný rostlinný materiál, spory a vejce bezobratlých, rybí šupiny, pavoukovci, detrit, písek a bláto. Většina hmyzích druhů byly vodní druhy nebo vodní larvy suchozemských forem, zejména řád dvoukřídlý, taktéž bylo naznačeno, že by dánio pruhované mělo přímý vliv na kontrolu populací komárů. Vysoký podíl planktonních položek dokazuje, že dánia pruhovaná se živí především ve vodním sloupci (Spence et al., 2007b).

### 3.2.1 Fyziologie trávení

Genetika a tvorba trávicího systému jsou podobné jako u jiných obratlovců, existují zde však rozdíly. U dánia pruhovaného se nevyvíjí žaludek a slepé střevo (Farrell, 2011). Zaživací trakt dospělého dánia pruhovaného zahrnuje ústa, hltan, jícen, střevní trakt a anální otvor, označovaný někdy jako proctoderm nebo urogenitální póry. Podobně jako jiné ryby z řádu *Cypriniformes* mají i dánia jeden pár zubů, které jsou omezeny na jeden pár hltanových kostí. Dánia mají chuťové pohárky, chemosenzorové orgány z modifikovaných buněk epitelu. Tyto buňky pomáhají rybě při rozhodování o tom, zda jsou látky jedlé a jsou tyto buňky umístěny na rtech, v ústech, orofaryngeální dutině, na vouscích a hlavě a v některých případech i na povrchu těla. Zajímavé je, že chuťové pohárky dánií se začínají prvně vyvíjet na rtech a žaberních obloucích ve čtvrtém a pátém dni po oplození, což je shodné s okamžikem, kdy potěr začne přijímat potravu (Harper and Lawrence, 2010). V tu dobu je již trávicí systém zcela funkční a obsahuje plnou sadu typů tkání a buněk stejných jako u jiných obratlovců. Také stejně jako u jiných obratlovců se zaživací ústrojí ryby tvoří ze všech tří zárodečných vrstev. K dalším změnám dochází u juvenilních ryb, než se dosáhne úplné dospělé formy (Farrell, 2011).

Klíčovou funkcí trávicího ústrojí jsou enzymatické a mechanické procesy, které umožňují absorpci a dostupnost živin (Hama et al., 2009).

## 3.3 Odchov potěru

Důležitým a kritickým aspektem chovu dánia pruhovaného je chov od embryonálních stádií až po dospělost. I když platí poměrně jednoduché tvrzení, že je jednoduché chovat dánia v laboratoři, je zde značné rozpětí v tom, jak efektivně toho lze dosáhnout. Variace růstu a přežití může mít dalekosáhlé dopady na výzkumné programy a tím mají přímý dopad

na tempo, kvalitu a cenu experimentů. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby protokoly chovu embryonálních fází vývoje měli rovnoměrně vysokou míru přežití a růstu (Lawrence, 2011).

Za normálních laboratorních podmínek se potěru dánia pruhovaného naplní jejich plovací měchýř pátý den po oplození a od této doby je schopen se pohybovat v celém vodním sloupci. Od této doby se také předpokládá, že se musí ryby krmit téměř neustále, aby bylo dosaženo plných požadavků jejich metabolismů, tento předpoklad byl podpořen publikací odchovného pokusu, které jasně prokázali, že nepřetržitá dostupnost potravy měla pozitivní vliv na růst a přežití těchto ryb. Hlavním úkolem se tedy stává splnění tohoto požadavku při zachování vhodných nutričních potřeb a také vhodnou kvalitu vody v životním prostředí juvenilních jedinců (Best et al., 2010).

### 3.3.1 Standardní odchov

Existuje celá řada různých přístupů odchovu, které se v současné době v této oblasti používají. Většinou se využívá zooplanktonu nebo umělých krmiv upravených pro první krmení larválního stádia ryb, dokud není potěr dostatečně připravený na začátek přijímání nauplií *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) nebo přijímání krmení pro dospělé jedince (Best et al., 2010). Obecný přístup chovných protokolů popsanych v knize Zebrafish Book (Westerfield, 2000) zahrnuje postupně přemísťovat ryby v období od 2 – 4 týdnů po oplodnění ze statické vody v miskách nebo kádinkách do nádrží, které mají kontinuální recirkulační tok. (Lawrence, 2011). Jako prvotní krmivo se nejčastěji používá aplikace nálevníků *Paramecium* sp. Müller, 1773, kteří jsou sice obecně velice účinní, ale jsou také velmi nároční na pracovní sílu, co se týče údržby jejich chovné kultury a nezdá se, že by podporovali rychlý růst (Best et al., 2010).

Prachová peletová krmiva mohou rovněž substituovat nálevníky nebo se mohou využít v kombinaci s živým krmením, i když to ve většině případů vede ke snížení růstu nebo přežití ve srovnání s živým krmením (Lawrence, 2011). Evolučně jsou však larvy většiny ryb upevněny na schématu pohyblivých organismů, a proto může docházet k problémům akceptace inertní suché stravy. I kdyby tato krmiva přijímaly, jejich nízká enzymatická aktivita jim příliš nebude umožňovat trávit stávající krmiva (Dhert et al., 2001). Hlavním důvodem také je, že živá kořist je typicky více nutričně vyvážená, vizuálně i chemicky atraktivnější, stravitelnější a ve vodním sloupci daleko stabilnější než krmiva umělá. Peletová krmiva musí mít dostatečné kvality ve všech těchto oblastech a musí prokázat dobrou stabilitu ve vodě (živiny nesmí rychle unikát do okolního prostředí). Důležité je též, aby mikročástice měli schopnost zůstat v suspenzi po delší dobu tak, aby byly stále k dispozici pro ryby

(Harper and Lawrence, 2011). Několik publikovaných studií, které využívaly umělá krmiva pro odchov dánií pruhovaných ukazují, že tato krmiva nejsou schopna podporovat vysokou míru růstu a přežití, spíše se jedná o úspěch v jednom parametru na úkor druhého, nebo kompromis obou. Lze předpokládat, že snížená výkonnost těchto parametrů je způsobena kombinací několika faktorů, včetně nedostatečných, nebo nevhodných nutričních profilů, špatné atraktivitě a stravitelnosti a v neposlední řadě také problémy s kvalitou vody vyplývající z rozkládajících se nespotebovaných živin a krmných částic (Best et al., 2010).

Naupliová stádia zábronožky solné mají na podporu rychlého růstu a přežití velký vliv, využití v praxi je ale obtížné, neboť nauplie jsou často příliš velké a rychlé a tím se stávají nevhodné, protože je potěr dánií nemůže účinně ulovit (Best et al., 2010).

### **3.3.2 Polykultura s vířníky druhu *Brachionus plicatilis***

Mořští vířníci *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) jsou jedni s důležitých prvotních krmiv používaných v odchovu potěru ryb (Dhert et al., 2001). Patří tak mezi nejdůležitější živé krmivo pro velmi mnoho uměle odchovávaných druhů ryb v průběhu rozkrmovací fáze a to vzhledem ke své malé velikosti, pomalému plavání a snadnému poskytování živin nezbytných pro růst potěru ryb. Tyto faktory by měly být vhodné i pro dánií pruhované a to zejména jako krmení sloužící k přemostění období, kdy není možno krmít artemií, u které je známo, že podporuje růst u starších ryb (Best et al., 2010).

Jejich malá velikost a zvýšená nutriční hodnota ve srovnání s nálevníkovou kulturou trepek, činí vířníky obzvláště atraktivní pro krmení embryí dánií pruhovaného (Harper and Lawrence, 2011), další věcí je, že kultura s nálevníky vyžaduje opakovanou subkultivaci, pracnou filtraci a sterilizaci. Vířníci mají poměrně nízké nároky na údržbu v kontinuální kultuře, která může být krmena automatickými peristaltickými čerpadly (Best et al., 2010). K optimální reprodukci vířníků *Brachionus* sp. dochází při teplotě 25°C a v prostředí s obsahem solí v rozsahu od 4 ppt do 35 ppt, nicméně vířníci jsou obvykle chováni v salinitě mezi 10 ppt až 20 ppt. Vířníci se často využívají v polykulturách s rybím potěrem obvykle při jiných teplotách a salinitě, než mají jejich původní kultury (Fiedler et al., 2000), což zvyšuje možnost přežití v nádržích s embryi dánií pruhovaného delší dobu a tak lépe vyhovět požadavkům potěru na neustálý příjem krmiva (Best et al., 2010).



## 4 Materiály a metoda

Tato kapitola uvádí materiály a postupy experimentu nezbytné pro správné provedení, základní ingrediencí nutnou pro provedení experimentu je tzv. E3 vodní medium, jehož recept se nachází v knize *The Zebrafish Book* (Westerfield, 2000), toto vodní medium se používá při nasazování a tření ryb, při míchání roztoků pro skladování jiker a embryí, v době chovu přechodného období embryonálního vývoje ryb (2 – 4 týden po oplození) a také při kultivaci kultury vířníku. Experiment byl zahájen ve věku ryb 5 DPF a ukončen ve věku ryb 33 DPF.

Recept 60 x E3 vodního media:

1 l demineralizované H<sub>2</sub>O

17,2 g NaCl

0,76 g KCl

2,9 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O

4,9 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

50 µl 1M NaOH

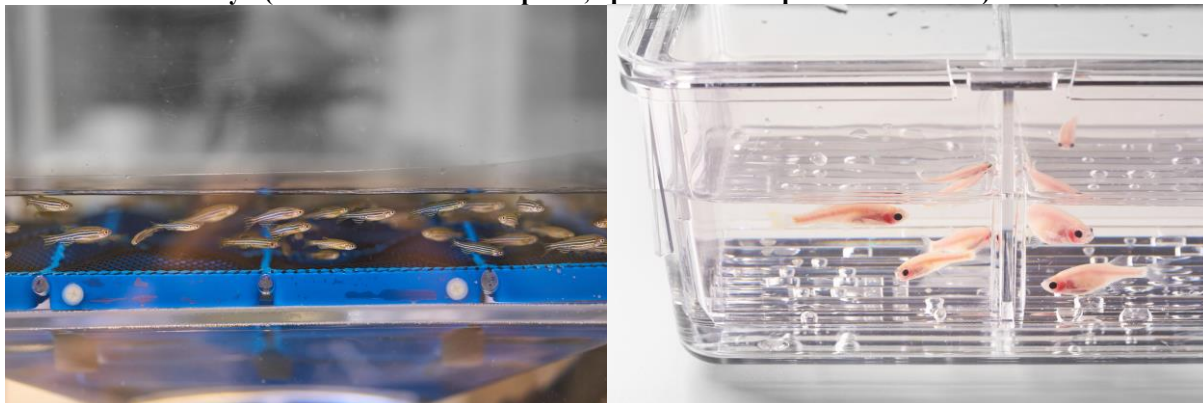
### 4.1 Rodičovská populace ryb

Pro experiment bylo využito dvou základních linií dáňia pruhovaného. První linií je takzvaná divoká forma, která má reprezentovat příklad klasické ryby, bez jakékoliv modifikace a jiného fenotypového projevu, druhou linií je inbreední kmen Casper, jenž je homozygotní mutant v genech *mitfa* a *roy*, jejichž fenotypy dopadají na tvorbu pigmentu a tak se tato linie stává transparentní.

#### 4.1.1 Divoká forma

Rodičovská populace se skládá ze smíšených jedinců potomků kmenů \*AB a TU, tak aby došlo k minimalizaci inbreedního křížení. Generační ryby měly datum narození 19.08.2015 a ke tření bylo využito všech 300 jedinců této generace. Vzhledem k velkému množství jedinců bylo pro výtěr využito zařízení iSpawn, které umožňuje tření většího počtu jedinců naráz. Odebráno bylo přes 2000 oplozených jiker, které se po dobu 2 minut promývaly pod tekoucí vodovodní vodou. Vybráno 800 nejzdravějších embryí a rozděleno do 90 mm plastových petriho misek po 50.

**Obrázek 3 - Tření ryb (vlevo divoká forma iSpawn, vpravo linie Casper chovná nádrž)**



#### **4.1.2 Linie Casper**

Generační ryby pocházejí z páté inbreední generace nesoucí homozygotní sestavu obou genů. Rodičovské ryby měly datum narození 08.09.2015. Tato generace již jevila známky inbreední deprese, mezi rybami se vyskytovali jedinci, kteří nedorostli do plné velikosti, a míra přežití přechodné fáze vývoje byla oproti běžným rybám nižší. Výběr těchto generačních ryb byl záměrný a to z důvodů sledování dopadů inbreedního křížení na přechodnou fázi a pokud možno zlepšení chovných metod tak, aby se daly i takto inbreední populace i nadále využít v chovu. Jedinci této rodičovské populace byli rozděleni podle pohlaví do dvou velkých nádrží, dále byli postupně přeneseni do chovných akvárií rozdělených přepážkou vždy tak, že v jedné části byli 3 samice a v druhé části 3 samci. Takto bylo připraveno 20 chovných akvárií o celkovém počtu 120 ryb. Odebráno bylo kolem 3000 oplozených jiker, které se promývali pod tekoucí vodovodní vodou po dobu 2 minut. Následně bylo vybráno 800 nejzdravějších a rozděleno do 90 mm plastových petriho misek po 50.

#### **4.1.3 Péče o jikry a embrya**

Jikry byly uloženy v petriho miskách s roztokem 0,0001% methylenové modři a E3 vodního media. Methylenová modř umožňuje lépe odstranit zaplísňená embrya a taktéž zabraňuje rozšíření plísní na ostatní zdravá embrya. Takto ošetřené jikry byly uloženy do inkubátoru, který udržuje stálou teplotu 28,5°C, embrya se dále nechala v klidu odpočívat 24 hodin.

Ve věku 24 HPF byla embrya vytríděna, odstraněna byla zaplísňená a napadená embrya. Všechna embrya se slila do jedné misky a z ní se za pomoci plastového kapátka jemně přenesly do připravených košíčků určených k desinfekci jiker (Bleech). Tato procedura především odstraňuje případnou kontaminaci nežádoucími organismy.

Postup desinfekce jiker (Bleech) (Westerfield, 2000):

1. Příprava roztoku, do 100 ml vodovodní vody bylo přidáno 40 µl chlornanu sodného.
2. Do makrotitračních destiček se naleje do třech jamek roztok chlornanu sodného a do zbylých třech vodovodní voda.
3. Košíčky s embryi postupně prochází přes jednotlivé jamky v rozmezí 2 minut.
4. Embrya se slijí pomocí stříčky s E3 vodním médiem do čisté petriho misky.

Tato procedura mohla způsobit zatvrdnutí chorionu jednotlivých embryí, proto se doporučuje, aby po této desinfekci následovala procedura odstranění chorionu, tzv. dechorionace za pomoci enzymu pronazy.

Postup dechorionace embryí (Westerfield, 2000):

1. Z petriho misky byla šetrně odlita přebytečná voda.
2. Petriho miska se uložila do nakloněné roviny tak, aby všechna embrya spadala na jednu stranu.
3. K embryím se do petriho misek a zbylé vody přidal roztoku enzymu pronazy (1 mg práškové pronazy na 1 ml E3 vodního média).
4. Misky se nechaly společně s roztokem enzymu pronazy 10 minut odstát.
5. Embrya se třikrát za sebou propláchla E3 vodním médiem, odstranily se prázdné choriony a vyplavil se použitý enzym pronáza.
6. Embrya se přenesla do petriho misky s roztokem 0,00002% methylenové modři a E3 vodního media.

Takto ošetřená rybí embrya se rozdělila do dvakrát (jedna skupina divoký typ, druhá skupina Casper) šestnácti 90 mm petriho misek vždy po 30 jedincích na misku, vybírání byli nejživotaschopnější jedinci bez viditelných deformit. Zbylá embrya se rozdělila po 50 embryích na misku a sloužila jako rezervní skupina v případě, že by došlo v předchozích skupinách k úhynu ještě před započítáním testu. Embrya byla uložena do inkubátoru, který udržuje stálou teplotu 28,5°C, dále se nechala v klidu odpočívat až do pátého dne po oplození.

## **4.2 Testovaná krmiva**

Standardním krmivem užívaným v chovném zařízení pro odchov potěru byla GEMMA Micro 75. Dalším krmivem doporučeným pro juvenilní fázi vývoje dáňia pruhovaného byly hojně využívané nauplie žábřonožky. Posledním testovaným krmivem se stali vířníci rodu *Brachionus plicatilis*, kteří se měli podle výsledků experimentů stát inovací v chovu potěru dáňia pruhovaného.

#### 4.2.1 Pelety o velikosti 50 – 100 µm

Testovaným umělým krmivem byly mikrogranule GEMMA Micro 75 ve velikostech od 50 do 100 µm, dodávané americkou společností Skretting určené výhradně pro dánío pruhované a jeho nejranější stádia vývoje. Složení tohoto produktu obsahovalo rybí maso, lecitin, pšeničný lepek, sušené mořské řasy, rybí olej, kukuřičný škrob, vitamíny a minerály. Analýza výrobce uváděla minimálně 59% bílkovin, 14% tuku, maximálně 14% popelovin a 0,9% vlákniny. Dalšími uvedenými složkami byly fosfor 1,3%, vápník 1,1%, sodík 0,5%, vitamíny A, D3, E a C.

#### 4.2.2 Vířníci druhu *Brachionus plicatilis*

##### Chovné zařízení

Chovné zařízení pro chov kultury slanovodních vířníků se skládá ze dvou 20 l širokohrdlých konví. Obě konve byly vybaveny vzduchovacími motorky a kameny a topením s termostatem, konev určená pro kontinuální kulturu obsahovala ještě klasický akvarijní molitanový filtr. Teplota v chovných nádržích se udržovala na 28°C. Konev určená pro kontinuální kulturu byla napuštěna roztokem E3 vodního media společně s mořskou solí Instant Ocean tak, aby výsledný vodný roztok měl salinitu 20 ppt, optimální pro chov vířníků tohoto druhu.

**Obrázek 4 – Chovné zařízení pro chov vířníků (vpravo pohled ze předu, vlevo pohled z boku)**



##### Krmivo

Zvoleným krmivem pro kulturu vířníků bylo RGcomplete od americké společnosti Reed Mariculture, Inc., sloužící ke krmení filtrujících bezobratlých. Základem tohoto krmiva jsou mikroskopické řasy, mořská voda, amonné neutralizery a stabilizátory, hydrogenuhličitan sodný, kyseliny askorbová a citronová, Maltol a alginát sodný. Minimální biomasa mikroskopických řas jsou 4,4% a roztok obsahuje 2,7% proteinu, 0,9% tuku, 0,2% vlákniny a maximálně 89% vody, nebo vodného roztoku.

## Kultura

Původní kultura byla zakoupena u americké společnosti Reed Mariculture, Inc. a jednalo se o 2x 5 000 000 ks jedinců vířníku druhu *Brachionus plicatilis*. Jedna kultura byla uložena v lednici při teplotě 4°C a sloužila jako záložní kultura v případě kolapsu hlavní kultury. Druhá kultura byla uložena do 20 l konve určené pro kontinuální kulturu se salinitou 20 ppt, pro měření salinity se využívalo optického refraktometru. Kultura se denně krmila 10 ml RGcomplete a 5 dní se nechala odpočívat.

## Sklízení kultury

Ke sklízení kultury docházelo maximálně jednou denně, minimálně jednou týdně, vždy se odebíralo 30 – 50% kultury z konve se salinitou 20 ppt. Odebraná část kultury se přelila do druhé 20 l konve a posléze se do této konve přililo i E3 vodní medium tak, aby výsledná salinita roztoku měla salinitu 10 ppt. Této salinity se dalo dosáhnout jednoduše tak, že se do sklizené kultury přililo stejné množství E3 vodního média. Tato kultura byla vždy pro kontrolu přeměřena optickým refraktometrem. Vířníci se v této kultuře nechali 24 hodin odpočinout a přivyknout nižší salinitě. V období sklízení docházelo ke kompletnímu vyčištění obou chovných nádob. Po 24 hodinách bylo z kultury s 10 ppt salinitou odebráno 2,5 l záložní kultury, která byla uložena v lednici při teplotě 4°C, tato rezerva se odebírala každý týden.

### **4.2.3 Nauplie *Artemia salina***

Zařízení k líhnutí žábřonožky solné se skládalo ze tří tubusů, které mají na spodní části trychtýř s ventilem pro přívod vzduchu. Do tubusů byla nalita voda o salinitě 30 ppt, do takto připraveného prostředí se vložily cysty žábřonožky a spustilo se vzduchování. Líhnutí naupliového stádia žábřonožky trvalo 24 hodin, při teplotě prostředí 26°C. Cysty žábřonožky dodávala společnost EasyFish. Toto krmivo obsahovalo minimálně 54% bílkovin, 15% sacharidů, 20% tuků a maximálně 12% popelovin.

## **4.3 Chovný systém**

Pro testování byl využit samostojný automatický chovný systém ZebTec Active Blue pro chov dáňka pruhovaného od italské společnosti Tecniplast. V systému může být uloženo až 50 akvárií o objemu 3,5 l a jedná se o systém bezúdržbový, který si sám vyrábí vodu vhodnou pro chov z vody demineralizované, dále je součástí systému filtrační nádrž obsahující filtr hrubých nečistot (tzv. drumfiltr), biologický a uhlíkový filtr. Nastavené hodnoty pro chov byly konduktivita 1000  $\mu\text{s}/\text{m}$  a pH 7,5, salinita tohoto systému byla

změřena optickým refraktometrem a hodnota byla blízká 0 ppt. Teplota vody protékající tímto systémem byla nastavena na 28,5°C.

Chovný systém byl umístěn v laboratoři určené pro chov ryb, kde se dodržoval denní režim 14 hodin světla (od 08:30 ráno do 22:30 večer) a 10 hodin tmy. Teplota vzduchu v místnosti byla udržována na 26°C.

**Obrázek 5 – Chovný systém Active Blue (vlevo experimentální nádrže, vpravo technologický prostor)**



#### **4.4 Jednotlivé skupiny experimentu**

V rámci experimentu byly vytvořeny dvě velké hlavní skupiny rozdělené podle jednotlivých linií na nadskupinu obsahující divoký typ dánia pruhovaného a skupinu s linií Casper. V každé této nadskupině byla vytvořena skupina s jednotlivými krmnými režimy: kontrolní skupina, skupina GEMMA Micro, skupina s vířníky, skupina s vířníky a artémiemi. Každá skupina se dělila na čtyři akvária, ve kterých bylo umístěno 30 rybích embryí.

##### **4.4.1 Kontrolní skupina**

Kontrolní skupina vycházela z běžného krmného režimu užívaného v chovném zařízení. Krmný režim byl tvořen výhradně krmivem GEMMA Micro 75 a od 10. DPF příkrmováním jedenkrát jednodenními naupliemi žábřonožky. Na začátek experimentu bylo všech 30 embryí ve věku 5 DPF uloženo do 1 l E3 vodního média o teplotě 28°C a poprvé ad libidně nakrmena peletami GEMMA Micro 75. Takto byly vytvořeny všechny 4 testované nádrže. Ke krmení docházelo dle krmného režimu vždy jednou denně, k čištění těchto nádrží docházelo vždy 2x týdně při počítání živých jedinců výměnou celého 1 l E3 vody. Průtok nádrží byl spuštěn ve věku ryb 26 DPF.

##### **4.4.2 Skupina GEMMA Micro**

Skupina GEMMA Micro byla krmena pouze peletovým krmivem o velikosti pelet od 50 do 100 µm. Na začátku experimentu bylo 30 embryí ve věku 5 DPF z této skupiny

uloženo do 1 l E3 vodního média o teplotě 28°C a poprvé ad libidně nakrmena peletami GEMMA Micro 75. Takto byly vytvořeny všechny 4 testované nádrže. Tato skupina po celou dobu experimentu nebyla krmena žádnou živou potravou. Ke krmení této skupiny docházelo vždy jednou denně, k čištění těchto nádrží docházelo vždy 2x týdně při počítání živých jedinců výměnou celého 1 l E3 vody. Průtok nádrží byl spuštěn ve věku ryb 26 DPF.

#### **4.4.3 Skupina vířníci**

Skupina živý vířníci vycházela z protokolu uvedeného v A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*) (Best et al., 2010), ze kterého se odstranilo příkrmování pomocí žábřonožky. Na začátku experimentu se vytvořil základ pro polykulturu smícháním 0,5 l mořské vody s vířníky z chovné nádoby o salinitě 10 ppt a 0,5 l E3 vody. Výsledná salinita byla 5 ppt a byla ověřena měřením optickým refraktometrem. Do tohoto základu byly vloženy embrya ve věku 5 DPF, takto se nechala emrya v klidu až do 8. DPF, kdy se do polykultury přililo opět 0,5 l 10 ppt vody s vířníky a 0,5 l E3 vodního media. Průtok u této skupiny byl spuštěn ve věku ryb 12 DPF, přesně podle protokolu. Od 12. DPF byla skupina krmena vířníky vždy 5x denně podle doporučení z knihy The Laboratory Zebrafish (Harper and Lawrence, 2010) pro chov potěru dánia pruhovaného. K čištění této skupiny docházelo vždy 1x týdně při měření a počítání živých jedinců.

#### **4.4.4 Skupina vířníci a *Artemia***

Skupina živí vířníci a *Artemia salina* vycházela zcela z protokolu uvedeného v A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*) (Best et al., 2010). Základ pro polykulturu byl vytvořen stejně jako v předchozí skupině smícháním 0,5 l 10 ppt vody s vířníky a 0,5 l E3 vody a opět byla výsledná salinita ověřena optickým refraktometrem tak, aby výsledná voda měla salinitu 5 ppt. Do této vodní směsi se vložily embrya ve věku 5 DPF a ponechaly v klidu až do 8. DPF, kdy se do polykultury stejně jako v předchozím případě přililo 1 l směsi E3 vody a vířníků o salinitě 5 ppt. Od 10. DPF byly ryby příkrmovány 3x denně naupliovými stádii žábřonožky. Průtok u této skupiny byl spuštěn ve věku ryb 12 DPF, přesně podle protokolu. Od 12. DPF byla skupina krmena vířníky vždy 5x denně podle doporučení z knihy The Laboratory Zebrafish (Harper and Lawrence, 2010) pro chov potěru dánia pruhovaného. K čištění této skupiny docházelo vždy 1x týdně při měření a počítání živých jedinců.

## **4.5 Měření**

Měřeny byly dva základní údaje, prvním z nich byl počet přeživších embryí od počátečních 30 až po výsledný počet. Druhým měřeným údajem byla standardní délka a její růst. Standardní délkou se rozumí délka od konce hlavy po základnu ocasní ploutve (Froese and Pauly, 2016).

### **4.5.1 Míra přežívání**

Míra přežívání potěru se měřila vždy dvakrát týdně při čištění akvárií se statickou vodou bez průtoku krmených peletami GEMMA Micro. Měření probíhalo vždy ve středu a v neděli. Ve středu bylo k měření použito plastové kapátko pro přenos jednotlivých juvenilních ryb ze špinavé nádrže do čisté. Počítání ryb v průtočných akváriích krmených vířníky a naupliemi sloužil fotoaparát a následné vyhodnocení na počítači. Při nedělním počítání přeživších se využívalo 12 jamkové multititrační destičky, protože zároveň ryby byly v těchto jamkách i měřeny na standardní délku.

### **4.5.2 Standardní délka**

Standardní délka byla měřena vždy v neděli u všech skupin stejně. Ryby byly opatrně přeneseny z nádrží do jamek na mikrotitrační destičce vždy po 12 jedincích, vyfotografovány stereomikroskopem SMZ1270i při zvětšení 0,63x s objektivem 0,5x pomocí vestavěné kamery Nikon DS-Qi2, změřeny a vyhodnoceny pomocí programu NIS Elements BR verze 4.30.02.

## **4.6 Statistické vyhodnocení**

Naměřené hodnoty a formulované hypotézy byly zpracovány a ověřovány prostřednictvím statistického programu Statistica CZ 12 (StatSoft, Inc. 2013). Použit byl dvouvýběrový nepárový T-Test kontrolní skupiny proti skupině řešené.



## 5 Výsledky

Výsledné údaje této práce byly rozděleny do podkapitol. První z nich je Míra přežívání (v počtech jedinců) a úspěšnost chovu (v procentech), druhou je Standardní délka (mm) v průběhu experimentů a konečný stav ve 33 DPF společně i s přírůstkem (mm) od 5.DPF do 30.DPF a poslední podkapitola řeší formulované hypotézy a jejich statistické ověřování.

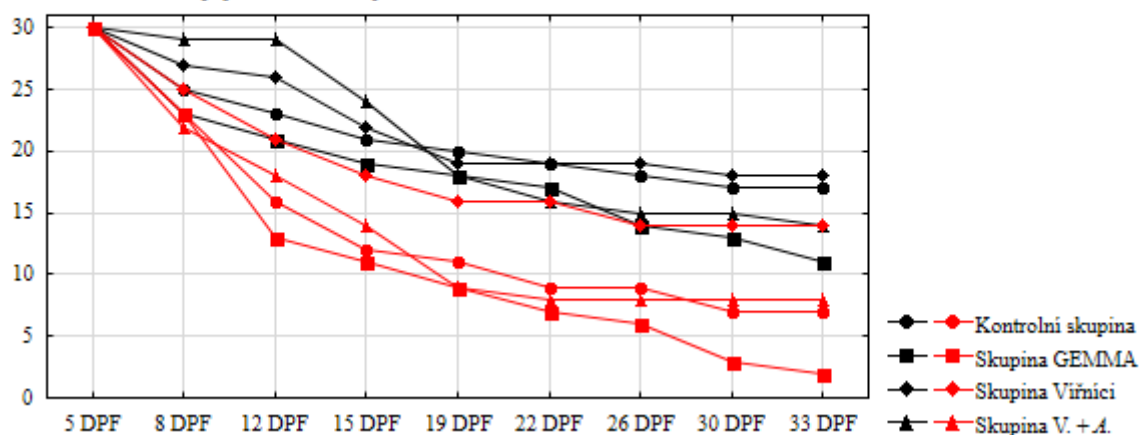
### 5.1 Míra přežití

Míra přežití udává procentuální počet živých jedinců v posledním dnu testu ve věku 33 DPF. Graf 01 ukazuje průměrnou míru přežívání v absolutních číslech během celého testu v závislosti na experimentální skupině a linii dání pruhovaného. Z grafu lze vyčíst, že jedinci divokého typu jsou odolnější během přechodného období oproti inbrední linii Casper. Skupina Vířníci se v tomto parametru dokázala vyrovnat Kontrolní skupině, Skupina Vířníci a Artemia se zdá být poněkud horší a nejhůře si vedla skupina GEMMA krmená pouze peletovým krmivem.

Kontrolní skupina měla tedy míru přežití v chovu  $56,67\% \pm 7,07\%$ , skupina GEMMA  $36,67\% \pm 10,27\%$ , skupina Vířníci  $60\% \pm 9,53\%$  a skupina Vířníci a Artemia  $49,1\% \pm 6,44\%$  pro divokou formu dání pruhovaného. Pro linii Casper měla kontrolní skupina míru přežití  $25,83\% \pm 7,14\%$ , skupina GEMMA  $9,17\% \pm 1,19\%$ , skupina Vířníci  $46,67\% \pm 6,39\%$  a skupina Vířníci a Artemia  $27,5\% \pm 1,6\%$ .

**Graf 01 Míra přežití**

Graf znázorňuje průměrné přežívání jedinců podle experimentální skupiny v absolutních číslech. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.

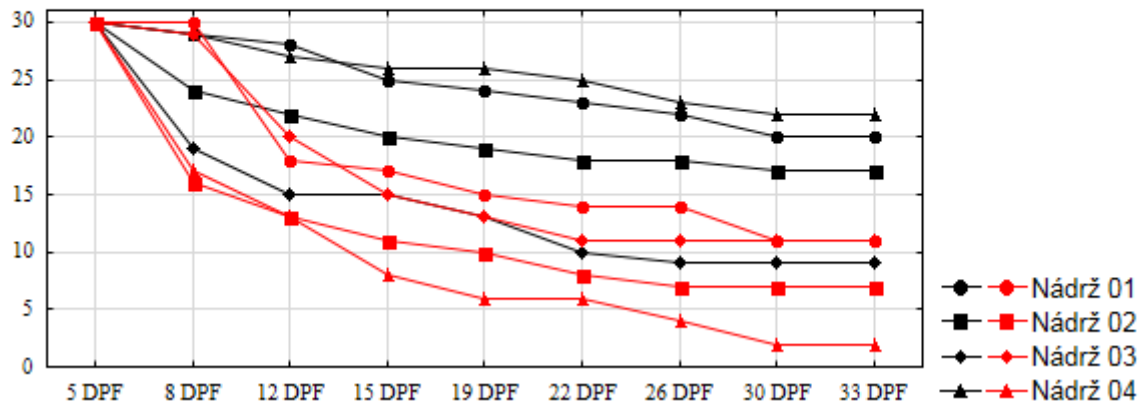


Dalšími grafickými výstupy pro míru přežití v absolutních číslech jsou Grafy 02 až 05, které ukazují průběh experimentů v jednotlivých nádržích v závislosti na skupině a linii.

Graf 02 ukazuje výsledky měření kontrolní skupiny. Míra přežití jednotlivých nádrží nám ukazuje, že maximální dosažená úspěšnost byla 73,33% a nejnižší 30% u divoké formy a maximální úspěšnost 36,67% a nejnižší 6,67% u linie Casper.

### Graf 02 Míra přežití - Kontrolní skupina

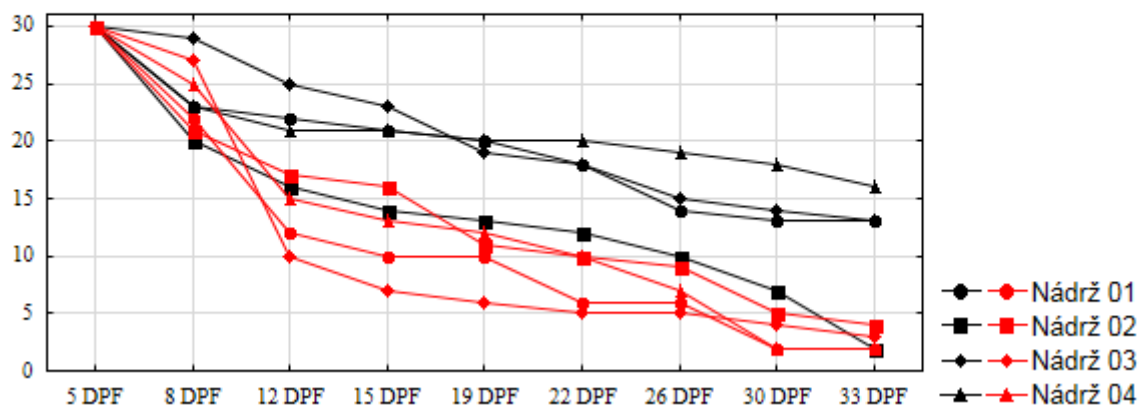
Graf znázorňuje přežívání jedinců v kontrolní skupině v absolutních číslech podle jednotlivých experimentálních nádrží. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.



Ve skupině GEMMA (Graf 03) byla pro divokou formu dání pruhovaného maximální hodnota míry přežití 43,33% a minimální 6,67%. Pro linii Casper byla zjištěna maximální hodnota úspěšnosti v chovu 13,33% a minimální 6,67%.

### Graf 03 Míra přežití - Skupina GEMMA

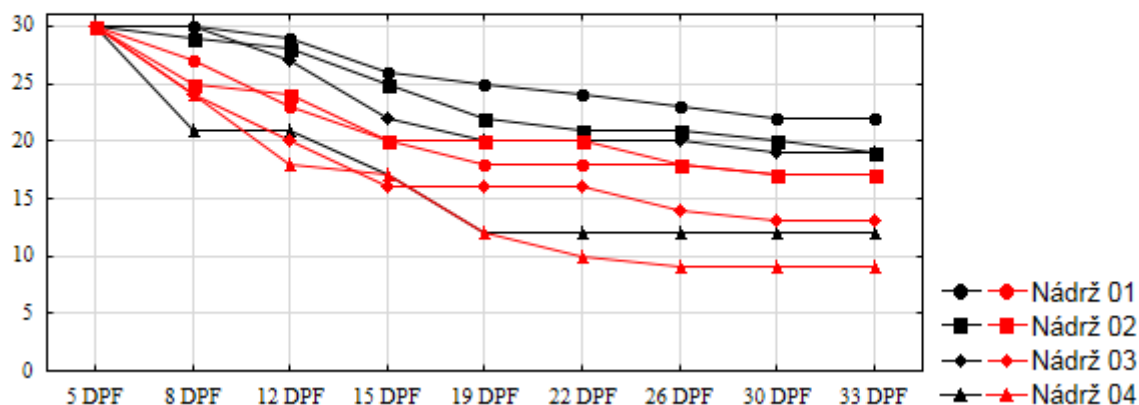
Graf znázorňuje přežívání jedinců ve skupině GEMMA v absolutních číslech podle jednotlivých experimentálních nádrží. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.



Ve skupině Vířníci se míra přežití (Graf 04) pohybovala od maximální hodnoty 73,33% po nejnižší hodnotu 40% u divoké formy dání pruhovaného a pro linii Casper byla maximální úspěšnost v chovu 56,67% u dvou nádrží a nejnižší 30%.

#### Graf 04 Míra přežití - Skupina vířníci

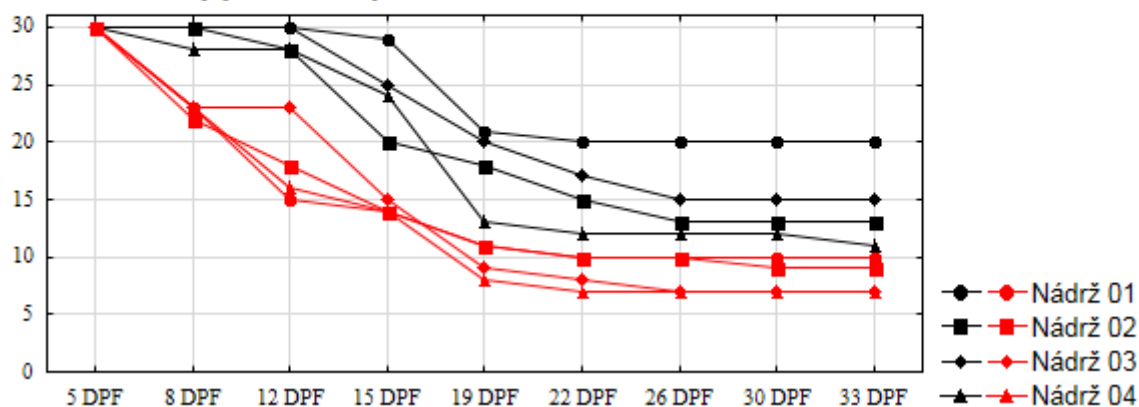
Graf znázorňuje přežívání jedinců ve skupině Vířníci v absolutních číslech podle jednotlivých experimentálních nádrží. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.



Skupina Vířníci a *Artemia* (Graf 05) vykazovala maximální hodnoty míry přežití 66,67% u divoké formy dánia pruhovaného a minimální 36,67%. Pro linii Casper v této skupině byla zjištěna maximální hodnota 33,33% a minimální 23,33%.

#### Graf 05 Míra přežití - Skupina vířníci a *Artemia*

Graf znázorňuje přežívání jedinců ve skupině vířníci a *Artemia* v absolutních číslech podle jednotlivých experimentálních nádrží. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.



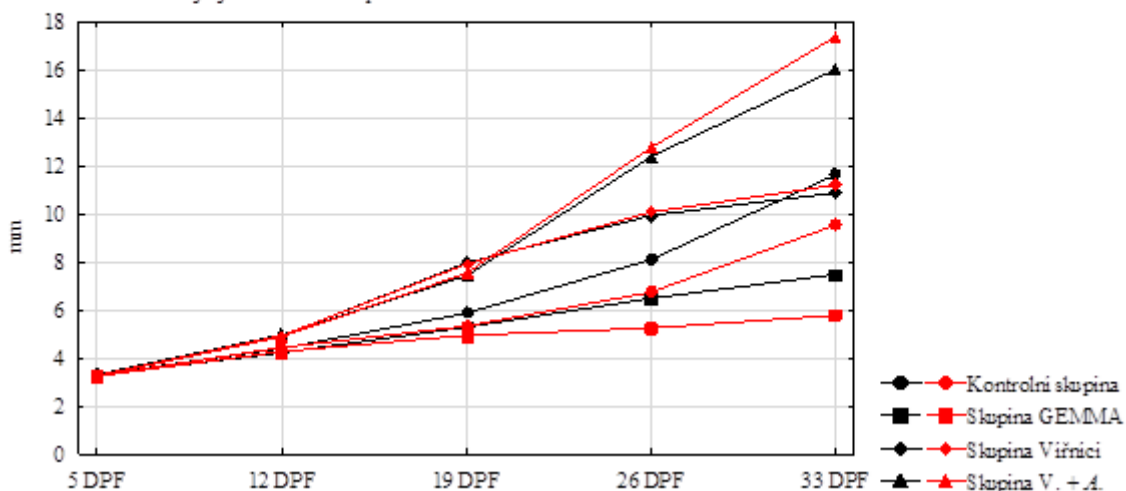
## 5.2 Standardní délka

Standardní délku ryb a jejich růst v průběhu testovaného období byl shrnut do Grafu 6, kde se ukázalo, že skupina krmená vířníky a od 10.DPF i žábřonozkami dosáhla největší standardní délky ve 33 DPF a to jak pro divokou formu dánia pruhovaného (průměrná standardní délka všech nádrží 16,02 mm) tak i pro linii Casper (průměrná standardní délka všech nádrží 17,39 mm). Tato skupina vykazovala největší růst v průběhu celého experimentu. Celkový přírůstek k 33 DPF činil 12,73 mm průměrné délky u divoké formy a 14,15 mm u linie Casper.

Kontrolní skupina vykazovala zvyšující se intenzitu růstu ke konci experimentu a její hodnoty standardní délky ve 33 DPF vykazovaly 11,63 mm s přírůstkem 8,34 mm pro divokou formu a 9,54 mm s přírůstkem 6,29 mm pro linii Casper. Skupina krmená pouze vířníky vykazovala největší intenzitu růstu hlavně v počátcích testu (mezi 5 DPF a 19 DPF), posléze ale intenzita začala klesat. Konečné hodnoty standardní délky ke konci testu (33.DPF) byly 10,88 mm s přírůstkem 7,59 mm pro divokou formu a 11,21 mm s přírůstkem 7,96 mm pro linii Casper. Skupina GEMMA, která byla krmena pouze peletovým krmivem dopadla v hodnocení růstu nejhůře, její konečné hodnoty standardní délky v den konce experimentu (33 DPF) byly 7,48 mm s přírůstkem 4,19 mm pro divokou formu a pouhých 5,77 mm s přírůstkem 2,53 mm pro linii Casper.

**Graf 06 Standardní délka juvenilních ryb**

Graf znázorňuje průměrnou standardní délku v milimetrech jedinců podle testované skupiny v čase experimentu. Černá barva označuje jedince divoké formy. Červená barva označuje jedince linie Casper.



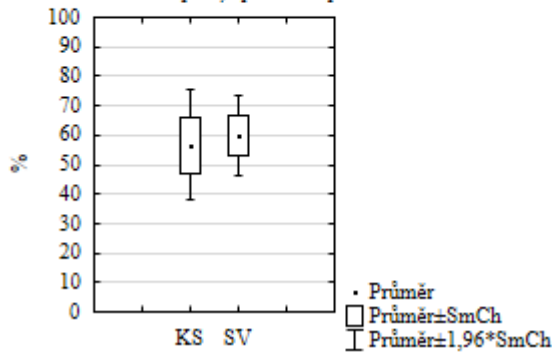
### 5.3 Ověřování formulovaných hypotéz

První ověřovanou hypotézou je, že ryby rozkrmované vířníky druhu *Brachionus plicatilis* lépe snášejí přechodnou fázi ontogenetického vývoje než ryby krmené běžnými metodami. První ověřovanou skupinou byla skupina Vířníci. Ověřením této hypotézy bylo statistickými metodami zjištěno, že hodnota  $p = 0,7884 > p = 0,05$  pro divokou formu dánia pruhovaného, proto může být tato hypotéza vyvrácena. Pro linii Casper byla zjištěna hodnota  $p = 0,07221 > p = 0,05$  a to znamená, že i v tomto případě může být hypotéza vyvrácena, ačkoliv je v tomto případě patrné, že k nějaké změně již došlo. Obě vyhodnocení byly vytvořeny i v grafické podobě (Graf 07 a 08), kde bylo ukázáno, že krmení vířníky má takřka

shodné hodnoty, jako standardní krmný protokol, u linie Casper se jistá odchylka od kontrolní skupiny objevuje.

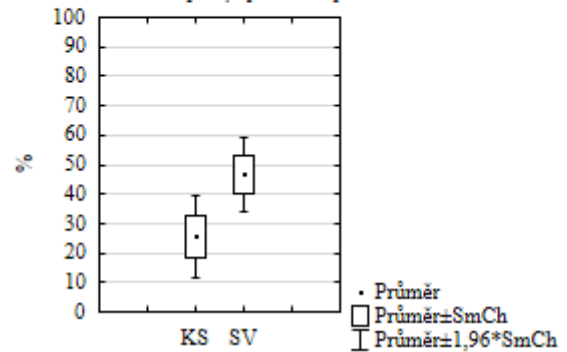
**Graf 07 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u divokého formy.**

Graf ukazuje míru přežití v procentech u divoké formy dánia pruhovaného.  
vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Vířníci



**Graf 08 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u linie Casper.**

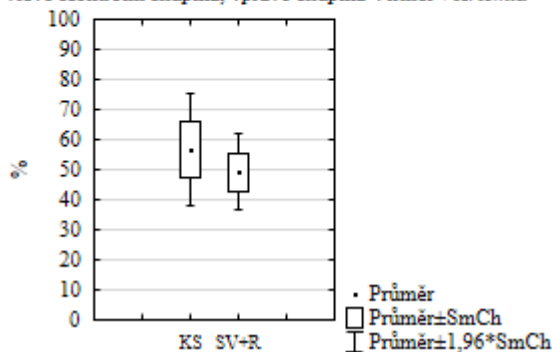
Graf ukazuje míru přežití v procentech u dánia pruhovaného linie Casper.  
vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Vířníci



Druhou ověřovanou skupinou byla skupina krmena vířníky a žábřonozkami a ověřením statistickým metodami bylo zjištěno, že hodnota  $p=0,53 > 0,05$ , pro divokou formu, což i v tomto případě vyvrací formulovanou hypotézu. U linie Casper byla zjištěna hodnota  $p=0,83 > 0,05$  a tak i zde došlo k vyvrácení hypotézy. Grafické vyjádření je znázorněno na grafech 09 a 10 a u obou dvou je patrné, že ke změně vůči kontrolní skupině nedošlo.

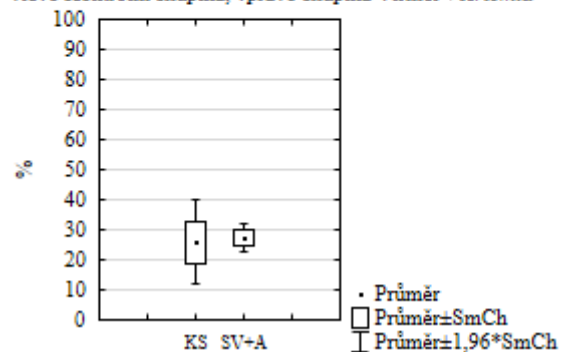
**Graf 09 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u divokého formy.**

Graf ukazuje míru přežití v procentech u divoké formy dánia pruhovaného.  
vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Vířníci + Artemia



**Graf 10 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u linie Casper.**

Graf ukazuje míru přežití v procentech u dánia pruhovaného linie Casper.  
vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Vířníci + Artemia

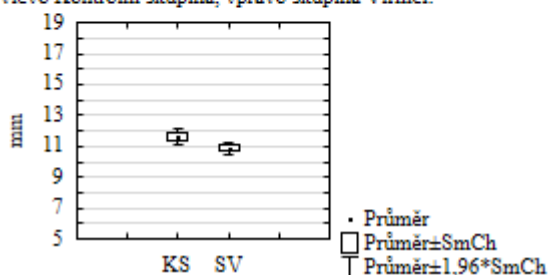


Druhou formulovanou hypotézou bylo, že ryby rozkrmované vířníky druhu *Brachionus plicatilis* lépe rostou než ryby krmené běžnými metodami. První ověřovanou skupinou i v tomto případě byla skupina Vířníci, kde hodnota  $p=0,0336 < p=0,05$ , pro divokou formu, což nám potvrzuje, že ke statisticky významné změně došlo, ale podle grafického vyjádření (Graf 11) a naměřených hodnot došlo ke změně k horšímu a proto byla

i tato hypotéza zamítnuta. U linie Casper byla vypočtena hodnota  $p=0,02 < p=0,05$ , a proto může být tvrzeno, že se hypotéza potvrdila, ke staticky významnému zlepšení došlo. Grafické znázornění tohoto případu je uvedeno v grafu 12.

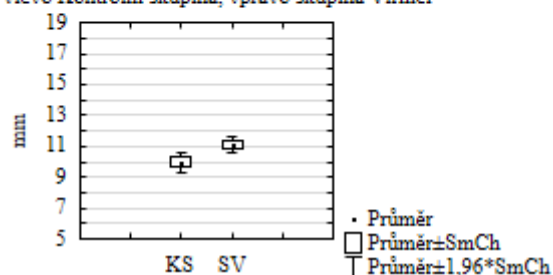
**Graf 11 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného divoké formy.**

Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného divoké formy na konci experimentu ve věku 33 DPF. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Viřníci.



**Graf 12 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného linie Casper.**

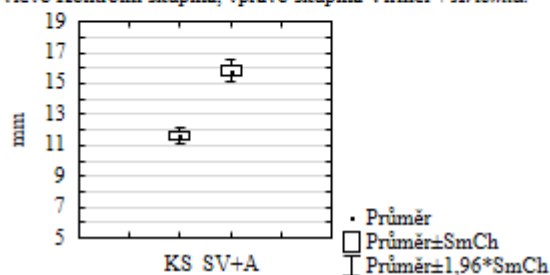
Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného linie Casper na konci experimentu ve věku 33 DPF. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Viřníci



Druhou ověřovanou skupinou byla opět skupina krmena viřníky a žábřonozkami a ověřením statistickým metodami bylo zjištěno, že hodnota  $p=0,000001 < p=0,05 < p=0,01$  pro divokou formu a na základě této hodnoty může být tato hypotéza potvrzena a ke zlepšení růstu standardní délky došlo se statisticky velmi významnými výsledky. U linie Casper byla zjištěna hodnota  $p=0,000001 < p=0,05 < p=0,01$  a tak i v tomto případě byla hypotéza potvrzena se staticky velmi významnými výsledky. Grafické znázornění je uvedeno v grafech 13 a 14 a z těchto grafů je patrné, že rozdíl průměrných velikostí standardní délky je 4,1765 mm u divoké formy a 7,2674 mm u linie Casper.

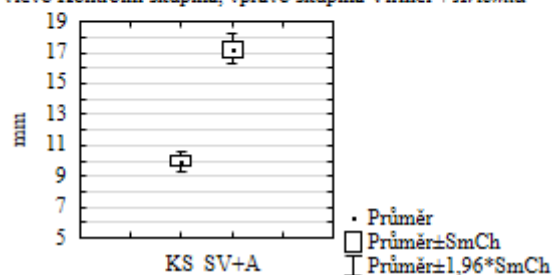
**Graf 13 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného divoké formy.**

Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného divoké formy na konci experimentu ve věku 33 DPF. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Viřníci + *Artemia*.



**Graf 14 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného linie Casper.**

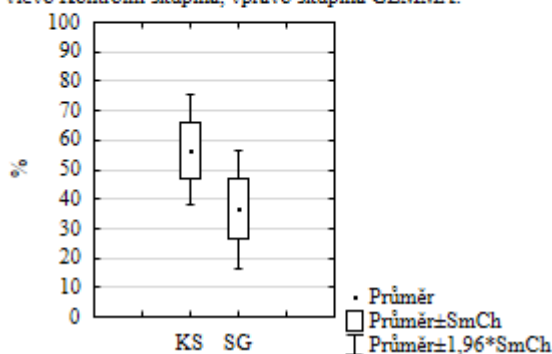
Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného linie Casper na konci experimentu ve věku 33 DPF. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina Viřníci + *Artemia*



Poslední formulovanou hypotézou bylo, že umělé krmivo dokáže plně nahradit živou potravu v přechodné fázi ontogenetického vývoje. Sledovány v tomto případě byly jak míra přežití, tak i standardní délka měřená poslední den testu ve věku ryb 33 DPF. První ověřovanou skupinou byly ryby divoké formy a pro ně byla zjištěna hodnota  $p=0,2033 > p=0,05$  a tak můžeme tvrdit, že ke statisticky významné změně nedošlo a tak můžeme tuto hypotézu potvrdit. Pro tuto hypotézu byl vytvořen graf 15 a ten ukazuje, že ke snížení míry přežití došlo, ačkoliv je toto snížení statisticky nevýznamné. U linie Casper byla naměřena hodnota  $p=0,0624 > p=0,05$  tak i zde lze tvrdit, že ke statisticky významné změně nedošlo, i když je toto tvrzení na hraničních hodnotách, což dokazuje i graf 16.

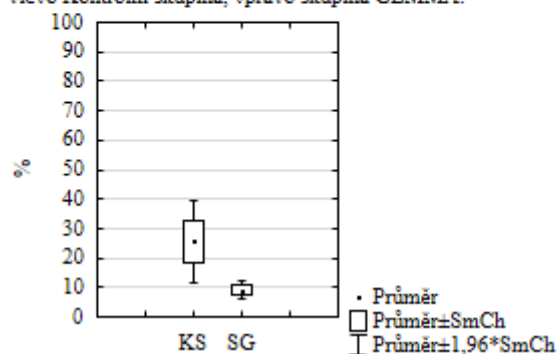
**Graf 15 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u divokého formy.**

Graf ukazuje míra přežití v procentech u divoké formy dánía pruhovaného. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina GEMMA.



**Graf 16 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u linie Casper.**

Graf ukazuje míra přežití v procentech u dánía pruhovaného linie Casper. vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina GEMMA.

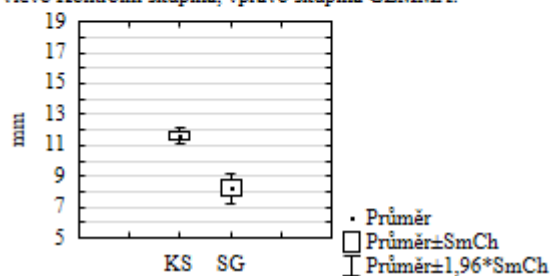


Pro standardní délku ve věku ryb 33 DPF u divoké formy byla zjištěna hodnota  $p=0,000012 < p=0,05 < p=0,01$  a na základě této hodnoty může být hypotéza zamítnuta, protože v případě standardní délky došlo ke statisticky velmi významné změně, a jak je uvedeno v grafu 17, je tato změna negativní. U linie Casper byla zjištěna hodnota  $p=0,0336 < p=0,05$  a tak i v tomto případě může být hypotéza zamítnuta díky statisticky významné změně, která je podle grafu 18 negativní.

**Graf 17** Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného divoké formy.

Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného divoké formy na konci experimentu ve věku 33 DPF.

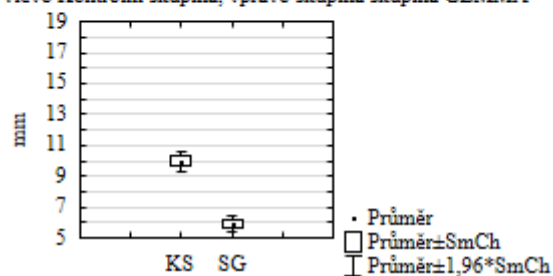
vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina GEMMA.



**Graf 18** Statistické vyhodnocení naměřených hodnot u dání pruhovaného linie Casper.

Graf ukazuje rozdíl ve velikostech standardní délky v milimetrech u dání pruhovaného linie Casper na konci experimentu ve věku 33 DPF.

vlevo Kontrolní skupina, vpravo skupina skupina GEMMA





## 6 Diskuze

Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami ukazují zásadní vliv volby prvotního krmení na hodnotu standardní délky jednotlivých jedinců. Míra přežití již tak přesvědčivé výsledky nemá, přesto se mezi jednotlivými metodami krmení rozdíly objevit dají. Lawrence (2011) doporučují krmit potěr v přechodném období 3x až 5x denně, což lze realizovat u nádrží s embryi, které jsou dostatečně velké na to, aby vydrželi průtočný způsob chovu. V případě tohoto testu se krmilo 5x denně pomocí vířníků ve skupině Vířníci a skupině Vířníci a *Artemia* u obou skupin došlo ke zpuštění průtočného systému 12 DPF, kdy většina jedinců byla schopna tuto změnu překonat, přesto v některých akváriích s linií Casper došlo po spuštění průtočného systému k úhynu. Největší propad zaznamenala skupina Vířníci a *Artemia* pro linii Casper. Ve skupinách krměným peletovým krmivem (kontrolní skupina, skupina GEMMA) docházelo ke krmení pouze 1x denně a to především z toho důvodu, že se jednalo o chov statickým způsobem a množství nesnědené potravy by způsobovalo rychlé kažení vody a s tím případný zvýšený úhyn anebo by muselo docházet k vyčištění nádrže po každém krmení, čímž by se enormně zvýšila doba údržby jedné nádrže. Spuštění průtoku u těchto dvou skupin došlo až ve věku 26 DPF, kdy se běžně v tomto zařízení pro chov umísťují ryby do průtočného systému, přesto v některých nádržích skupiny GEMMA došlo po tomto zásahu k úhynům.

Výsledky Besta a kolektivu (2010) ukázovaly, že způsob odchovu potěru dánia pruhovaného na bázi vířníků dosahují velmi vysoké míry přežití  $93,60\% \pm 2,04\%$  u divoké formy kmene AB, výsledky tohoto testu však dosahovaly pouze dvou třetin těchto výsledku, přesto je tato metoda srovnatelná s metodou chovu kontrolní skupiny. Je potřeba se zamyslet, proč se v našem zařízení nedosáhlo takovýchto výsledku, v čem byla případná chyba v chovu a jak tento způsob upravit, aby se mohlo dosáhnout podobných výsledků. V případě linie Casper k jistému zlepšení ve skupině Vířníci došlo, je nutno ale dodat, že i tak tato skupina dosahovala pouze polovičních hodnot, což lze předpokládat, že zde není na vině pouze samotný odchov v polykultuře s vířníky, ale i projev fenotypu této inbreední linie. Zajímavým poznatkem z této práce je, že u skupin krměných vířníky a žábřončkou došlo v rámci období experimentu k větším úhynům a přitom bylo potěru předkládáno více druhů krmiva a efekt by tedy měl být tedy spíše opačný.

Zajímavý byl vývoj skupiny GEMMA krměná pouze peletovým krmivem, protože výsledky ukazují, že míra přežití u divoké formy byla pouhých  $36,66\% \pm 10,28\%$ , oproti

tomu výsledky Geffroye a Simona (2012) uvádějí, že potěr, který byl v experimentu krměn umělým krmivem SERA Spirulina, měl míru přežití 69% u divoké formy. Tyto výsledky jsou tedy poloviční oproti výsledkům uvedeným v práci Geffroye a Simona (2012), kteří použili méně kvalitní krmivo, než je GEMMA. Běžné zkušenosti v chovném zařízení s krmivem GEMMA Micro, dokládají, že toto krmivo má lepší vlastnosti a vyšší míru přežití než se projevilo v tomto experimentu.

Best a kolektiv (2010) dále uvádějí, že jejich výsledná standardní délka ryby po třicetidenním testu byla  $17,58 \pm 0,43$  mm pro divokou formu kmene AB, v našem experimentu bylo dosaženo ve skupině Vířníci a *Artemia* standardní délky  $16,02 \pm 0,8$  mm pro divokou formu a  $17,39 \pm 0,81$  mm pro linii Casper. Největší hodnota standardní délky byla naměřena ve skupině Vířníci a *Artemia* pro linii Casper a tato hodnota činila 22,79 mm a z morfologie této ryby se dá soudit, že se jedná o subadultní samičku. V úvodu této práce bylo uvedeno tvrzení Fishmana (2001), že je dánío pruhované vhodný organismus na genetický screening, aby se dal genetický screening dobře provádět, je potřeba urychlit vývoj jedinců tak, aby se geneticky modifikovaní jedinci dali brzy ověřit metodou genotypování. Pro tuto metodu je potřeba mít vzrostlé ryby, kterým se dá odstranit kousek ploutve, a při standardních protokolech založených na umělém krmení jsou ryby schopné dorůst do potřebné velikosti minimálně po 2 měsících. Tato metoda umožňuje zkrátit tuto dobu na jeden měsíc.

Podle průběžných výsledků tohoto experimentu se dá usuzovat, že potěr dánía pruhovaného, který doroste do velikosti standardní délky alespoň 5 mm, dokáže přežít přechod na průtočný systém. Tento přechod by měl být postupný, začít by se mělo s hodinovými cykly a postupně by se mělo přejít na úplný průtočný systém s pomalým prouděním. Rybí potěr krměný vířníky je schopen na tento systém přejít již 12. DPF, což u potěru krměného umělým krmivem není možné dříve než 26. DPF. Tak jak uvádí Harper a Lawrence (2011) slouží krmení pomocí vířníků k přemostění období, kdy je potěr ještě příliš malý, než aby mohl lovit nauplie žábřonožky. Podle Besta a kolektivu (2010) je možno krmit naupliemi od 10. DPF, z toho vyplývá, že by se mělo začít v polykultuře s vířníky a postupně od 10. DPF přikrmovat naupliemi žábřonožky. Podle výsledků skupiny krměné pouze vířníky lze usuzovat, že polykulturu vířníků, stejně jako jejich následný příkrm vířníky je prospěšný do 19. DPF a po tomto období dochází ke zpomalení růstu a juvenilní ryby by měli přejít na jinou formu potravy. Ryby ve velikosti větší než 10 mm by si měli postupně přivykat na umělá krmiva, aby nedošlo při nárazové změně krmení k omezení růstu.

Na základě těchto informací se dá usuzovat, že by chovný protokol měl obsahovat polykulturu vířníků druhu *Brachionus plicatilis* od 5. DPF do 12. DPF, kdy dojde

k postupnému spouštění průtokového systému. Od 10. DPF by se měl potěr třikrát denně přikrmovat naupliovými stádii *Artemia salina*. Od 12. DPF do 19. DPF by se měl potěr pětkrát denně přikrmovat zahuštěnou kulturou s vířníky a od velikosti 10 mm, k čemuž by mělo podle výsledků této práce dojít mezi 19. DPF a 26. DPF, by se měli třikrát denně krmit peletovými krmivy společně s naupliemi. Nauplie žábřonožky doporučuji používat do úplné dospělosti ryb, po vytvoření pohlavních znaků ryb.

## 7 Závěr

Přechodné období dánía pruhovaného *Danio rerio* (Hamilton, 1822) se, i podle výsledků této práce, ukazuje jako nejkritičtější období jeho ontogenetického vývoje. Volba a skladba potravy v tomto hraje zásadní roli, protože, jak bylo u tohoto experimentu ověřeno, nelze z krmných protokolů zcela odstranit živou potravu tak, aby se neprojevila v negativním důsledku v růstu ryb, nebo v počtu jedinců, které toto období přežijí. Samozřejmě je důležité si uvědomit, že zásadní roli hrají zásahy rušení potěru údržbou nádrží, kvalita vody, nebo i samotný fenotypový projev genotypu jedince, inbreední populace budou toto období snášet hůře a jejich růst se nemusí projevit naplno.

Tato metoda odchovu potěru se podle práce Besta a kolektivu (2010) zdá velice účinná, ale její provedení se musí přizpůsobovat každému chovnému prostředí a proto je nutné i nadále tuto metodu rozvíjet a upravovat podle potřeb zařízení i samotného výzkumu, který se na těchto rybách provádí.

## 8 Seznam použité literatury

Reed, B. and Jennings, M. 2010. Guidance on the housing and care of zebrafish, *Danio rerio*. Research Animals Department Science Group RSPCA, Wilberforce Way, Southwater, Horsham, West Sussex, RH13 9RS. p. 62.

Best, J., Adatto, I., Cockington, J., James, A. and Lawrence C. 2010. A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Zebrafish*. Volume 7. Number 3 (2010). p. 289 – 295.

Detrich III., W. H., Westerfield, M., Zon, L. I. 2011. *The Zebrafish: Disease Models and Chemical Screens*. Third Edition. Academic press in an imprint of Elsevier. 225 Wyman street, Waltham, MA 02451, USA. p. 568. ISBN: 978-0-12-381320-6.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika G. and Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*. 200 (2001). p. 129–146.

Farrel, A. P. 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. First Edition. Academic press in an imprint of Elsevier. 225 Wyman street, Waltham, MA 02451, USA. p. 2272. ISBN:978-0-12-374545-3

Fiedler, D. S., Purser, G. J. and Battaglione, S. C. 2000. Effect of rapid changes in temperature and salinity on availability of the rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 189 (2000). p. 85 – 99.

Fishman, M. C. 2001. Zebrafish-the Canonical Vertebrate. *Science*. 294 (2001). p. 1290 – 1291.

Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (04/2016). Available at <<http://www.fishbase.org>>

Geffroy, B. and Simon, O. 2012. Effects of a *Spirulina platensis*-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. *Cybium* (2013), 37(1-2) p. 31-38.

Harper, C. and Lawrence, C. 2011. The Laboratory Zebrafish. CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway, NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742. p. 274. ISBN-13: 978-1-4398-0744-6 (Ebook-PDF)

Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 269 (2007). p. 1–20.

Lawrence, C. 2011. Advances in Zebrafish Husbandry and Management. *Methods In Cell Biology*, Volume 104 (2011). p. 431 – 451.

Lawrence, C. and Mason, T. 2012 Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality. *ILAR Journal*. Volume 53. Number 2 (2012). p. 179 – 191.

Lawrence, C., Best, J., James, A. and Maloney, K. 2012. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*. 368–369 (2012). p. 103 – 108.

López-Olmeda, J. F. and Sánchez-Vázquez, F. J. 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Thermal Biology*. 36 (2011). p. 91 – 104.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*, Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA. p. 601. ISBN-13: 978-0-471-25031-9.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C. 2007 (a). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83 (2007). p. 1–22.

Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed Z. F. and Smith, C. 2007 (b). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. 71 (2007). p. 304 – 309.

StatSoft, Inc. (2013). STATISTICA (data analysis software system), version 12. Available at <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>

Westerfield, M. 2000. The Zebrafish Book A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th Edition. University of Oregon, Eugene, OR, 97403-1254. p. 252.

## **9 Seznam použitých zkratek**

DPF – Day Per Fertilization – dnů po oplození

E3 voda – E3 vodní medium podle receptu z knihy The Zebrafish Book (Westerfield, 2000)

HPF – Hour Per Fertilization – hodin po oplození

ppm. - promile