

ΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΩΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ –ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ

«Οδηγός για την εμπορική εκτροφή του είδους
Danio rerio (ζέβρα) σε ενυδρεία»

Αθανάσιος Καββαδάς

ΕΠΟΠΤΕΥΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΒΙΔΑΛΗΣ ΚΟΣΜΑΣ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2014

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Μέσα από την παρούσα εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους κάτωθι:

- Το Δρ Κοσμά Βιδάλη, για τις χρήσιμες πληροφορίες και παρατηρήσεις του, κατά τη συγγραφή της εργασίας.
- Το Δρ Νικόλαο Βλάχο, MSc, Ε.ΤΕ.Π, συνεπιβλέπων της εργασίας, για την αμέριστη και διαρκεί συμπαράστασή του, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.
- Στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Δρ Γρηγόρη Κανλή και Δρ Κωνσταντίνο Πούλο, για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους.
- Τέλος, εκφράζω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την υλική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η ζέβρα (*Danio rerio*) αναδείχθηκε πρόσφατα ως ένα είδος ψαριού που χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο κυρίως στη βιοϊατρική. Οι παράμετροι που λήφθηκαν υπόψη ώστε το είδος να χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο σε μελέτες συμπεριφοράς, φυσιολογίας και τοξικολογίας είναι η υψηλή γονιμότητα, το μικρό του μέγεθος, ο μικρός κύκλος ζωής του και η διαφάνεια που παρουσιάζει κατά την πρώιμη εμβρυογένεση.

Η ελλιπής βιβλιογραφία που υπάρχει σχετικά με την εκτροφή της ζέβρας σε ελεγχόμενες συνθήκες αποτελεί κίνητρο για εντατική μελέτη του είδους χρησιμοποιώντας διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα. Η προσπάθεια ενσωμάτωσης των διαθέσιμων επιστημονικών πληροφοριών με τη βιολογία και την εκτροφή στο πεδίο μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα του ζώου ως πειραματόζωο. Οι τομείς που απαιτούν περαιτέρω μελέτη για το είδος είναι οι διατροφικές απαιτήσεις του είδους σε ελεγχόμενες συνθήκες

Λέξεις κλειδιά: Ζέβρα; *Danio rerio*; εκτροφή; Υδατοκαλλιέργεια; Διαχείριση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Κεφάλαιο 1.....	7
Εισαγωγή	7
1.1. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	7
1.2. Σκοπός εργασίας	8
Κεφάλαιο 2.....	9
Ταξινόμικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της ζέβρας (<i>Danio rerio</i>, Hamilton 1822)	9
Κεφάλαιο 3.....	12
Εκτροφή ζέβρας	12
3.1. Ποιότητα νερού.....	12
3.1.1. Θερμοκρασία	12
3.1.2. pH.....	14
3.1.3. Σκληρότητα νερού	15
3.1.4. Αλατότητα.....	16
3.1.5. Διαλυμένο οξυγόνο	17
3.1.6. Αζωτούχα απόβλητα	18
Κεφάλαιο 4.....	19
Διατροφή, δίαιτες και πρακτικές χορήγησης των τροφών	19
4.1. Απαιτήσεις σε θρεπτικά	19
4.2. Δίαιτες.....	20
4.3. Τεχνικές τάϊσματος	24
Κεφάλαιο 5.....	26
Αναπαραγωγική διαδικασία και τεχνικές αναπαραγωγής.....	26
5.1. Αναπαραγωγική διαδικασία.....	26
5.2. Τεχνικές αναπαραγωγής	30
5.3. Ωοτοκία.....	32
Κεφάλαιο 6.....	34
Εκτροφή νυμφών ζέβρας	34
6.1. Συνθήκες εκτροφής.....	34
6.2. Τύποι τροφών και διατροφή ζέβρας	34
6.3. Ποιότητα νερού.....	36
6.4. Ανάπτυξη και επιβίωση	37
Κεφάλαιο 7.....	39
Διατήρηση ενήλικων ατόμων.....	39
7.1. Πυκνότητες εκτροφής.....	39
7.2. Προγράμματα γενετικής	42

7.2.1. Διαγωνιδίωση ζέβρας	43
Κεφάλαιο 8.....	47
Συμπεράσματα.....	47
Abstract.....	48
Κεφάλαιο 9.....	49
Βιβλιογραφία	49

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων είκοσι ετών, η ζέβρα (*Danio rerio*) έχει αναδειχθεί ως ένα κατ'εξοχήν μοντέλο σπονδυλωτού για τη μελέτη της γενετικής και της ανάπτυξης του (Fishman, 2001) και πιο πρόσφατα, για τις ανθρώπινες ασθένειες και τον έλεγχο των θεραπευτικών φαρμάκων (Penberthy *et al.*, 2002; Sumanasa & Lin, 2004). Ένας αριθμός από ευνοϊκές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων του μικρού μεγέθους, τη ταχεία ανάπτυξη και το χρόνο παραγωγή τους, τη διαφάνεια τους κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης, την ανιχνευσιμότητα του γενετικού υλικού και τη γενετική ομοιότητα που παρουσιάζει με τον άνθρωπο (π.χ. Lamason *et al.*, 2005), έχουν τροφοδοτήσει την άνοδο της δημοτικότητας του σε βιοϊατρικές μελέτες και κατά πάσα πιθανότητα θα συνεχίσει να αυξάνεται η χρήση του και σε άλλους τομείς της έρευνας, ιδίως όσον αφορά τα σχέδια της ακολουθίας του γονιδιώματος που είναι περισσότερο εκλεπτυσμένα και την ήδη εντυπωσιακή σειρά από τα διαθέσιμα εργαλεία και τις μεθόδους με τις οποίες μελετάμε την εξάπλωση του (Dahm & Geisler, 2004; Jekosch, 2004).

Δεδομένης της μεγάλης σημασίας της ζέβρας ως πειραματικό μοντέλο, μαζί με το σημαντικό του οικονομικό κόστος συνδέονται με τη χρήση του σε ευρεία κλίμακα και την εγκατάσταση και συντήρηση των εγκαταστάσεων καλλιέργειας, είναι σε κάποιο βαθμό εκπληκτικό το γεγονός ότι η εκτροφής τους είναι ανεπαρκώς αναπτυγμένη. Όταν συγκρίνονται με άλλα καλλιεργήσιμα είδη ψαριών, όπως τη τιλápια (π.χ. Lim & Webster, 2006) το γατόψαρο (π.χ. Tucker & Robinson, 1990) και το κυπρίνο (π.χ. Billard, 1995), τα πρότυπα εκτροφής που δημοσιεύθηκαν είναι εντελώς ανεπαρκείς. Η ανταλλαγή πληροφοριών, σχετικά με τις τεχνικές εκτροφής, μεταξύ των πολυάριθμων ερευνητικών εγκαταστάσεων που εκτρέφουν ζέβρα ήταν ανύπαρκτη και οι τυχόν πρόοδοι που έχουν γίνει συχνά μεμονωμένες και χωρίς το όφελος της αξιολόγησης από ειδικούς. Ένα ατυχές αποτέλεσμα αυτής της κατάστασης είναι ότι πολλές εγκαταστάσεις εκτροφής ζέβρας πιθανό να λειτουργούν σε μη-βέλτιστα επίπεδα, μια κατάσταση που επιδεινώνεται περαιτέρω όταν οι ερευνητές που ξέρουν το μοντέλο αδυνατούν να συμβουλευτούν τους αυστηρά

επιστημονικούς τομείς κατά το σχεδιασμό πρότυπων διαδικασιών λειτουργίας για τις νεοσύστατες εγκαταστάσεις καλλιέργειας του.

Ενώ τα πρότυπα εκτροφής που δημοσιεύονται είναι ελλείπει, η ζέβρα είναι κατά τα άλλα από τα ζώα που έχουν μελετηθεί αρκετά. Πολύ πριν από την εμφάνιση του ως μοντέλο ανάπτυξης, η ζέβρα χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των ποικίλων πτυχών της βιολογίας των ψαριών (Laale, 1977). Με τα χρόνια, οι ερευνητές το έχουν κατηγοριοποίηση με τα ίδια πρακτικά πλεονεκτήματα που τώρα κάνουν η ζέβρα δημοφιλή στην βιοϊατρική ερευνητική κοινότητα για την μελέτη της αναπαραγωγής των ψαριών (Hisoaka & Firlit, 1962a, b; Eaton & Farley, 1974; Niimi & Laham, 1974) των κοπαδιών (McCann *et al.*, 1971; Engeszer & Ryan, 2004), της υδρόβιας τοξικολογίας (Hill *et al.*, 2005), τη ρύθμιση της όσμωσης (Boisen *et al.*, 2003) και της όσφρησης (Bloom & Perlmutter, 1974; Van den Hurk & Resink, 1992). Πρόσφατα, ερευνητές δημοσίευσαν μελέτες για τα ζέβρα και την φυσική τους ιστορία (McClure *et al.*, 2006), τη διατροφή (Carvalho *et al.*, 2006), και την αναπαραγωγική τους συμπεριφορά (Spence & Smith, 2005).

1.2. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να προσκομίσει στους ενδιαφερόμενους (ερασιτέχνες ή επαγγελματίες) τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη βιολογία της ζέβρας και μπορεί να εφαρμοστεί στην εκτροφή της άμεσα ή έμμεσα. Ωστόσο, ενώ οι πληροφορίες αυτές είναι δημοσιευμένες, είναι διαφορετικές και βρίσκονται κυρίως σε περιοδικά που δεν λαμβάνονται υπόψη από τα περισσότερα μέλη των ερευνητικών κοινοτήτων που ασχολούνται με τη ζέβρα.

Κεφάλαιο 2

Ταξινόμικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της ζέβρας (*Danio rerio*, Hamilton 1822)

Η ζέβρα (*Danio rerio* ή *Brachydanio rerio*, Hamilton 1822) είναι ένα μικρό τροπικό ψάρι του γλυκού νερού ενδημικό σε ποταμούς, χείμαρρους, κανάλια, τάφρους και λίμνες της Βόρειας Ινδίας, του Βορείου Πακιστάν, του Νεπάλ, του Μυανμάρ και του Μπουτάν (Γεωγραφικά μήκη 33° N – 8° N και πλάτη 66° E -98° E). Σε αυτές τις περιοχές μπορεί εκάστοτε να βρεθεί και σε στάσιμα νερά, ιδίως σε ορυζώνες. Το μικρό του μέγεθος δεν το καθιστά ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας για βρώση, όμως το βρίσκουμε και σε πολλές περιοχές του κόσμου ως αλλόχθονο είδος, καθώς διαβεί σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (εύρος pH :6,5-8, σκληρότητας περιβάλλοντος νερού : 5-19 dGH και θερμοκρασίας : 18-28 °C). Πρόσφατα βρέθηκε και στα ποτάμια της Κολομβίας καθώς δραπέτευσε ένας μεγάλος αριθμός ατόμων από εγκαταστάσεις εκτροφής τους (Πιν. 1), ενώ μπορεί να ζήσει άνετα σε ενυδρεία που περιέχουν και άλλα είδη ψαριών.

Πίνακας 1. Η γεωγραφική εξάπλωση του είδους. Ενδεικτικά αναφέρονται οι χώρες με τους μεγαλύτερους πληθυσμούς.

Χώρα	Τοπ. Ονομασία	Κατάσταση
<u>Bangladesh</u>	<u>Anju</u>	Ενδημικό
<u>Bhutan</u>		Ενδημικό
<u>Colombia</u>		Αλλόχθονο
<u>India</u>	<u>Anju</u> , <u>Lauputi</u> , <u>Patte-meenu</u> , <u>Pidtuli</u>	Ενδημικό
<u>Japan</u>		Αλλόχθονο
<u>Martinique</u>	<u>Poisson zèbre</u>	Αλλόχθονο
<u>Myanmar</u>		Ενδημικό
<u>Nepal</u>	<u>Zebra macha</u>	Ενδημικό
<u>Pakistan</u>		Αμφισβητήσιμο
<u>Sri Lanka</u>		Αλλόχθονο
<u>USA</u>	<u>Ζέβρα</u> , <u>Zebra Danio</u>	Αλλόχθονο

Η ζέβρα ανήκει στην οικογένεια των κυπρινοειδών, την μεγαλύτερη οικογένεια ψαριών, που αριθμεί 2000 είδη και στο είδος *Danio*, αριθμεί 50 είδη. Είναι ενδημικό είδος της Νότιο-Νοτιοανατολικής Ασίας και της Ινδικής χερσόνησου. Τα περισσότερα κυπρινοειδή της Αφρικής ανήκουν σε γένη που απαντώνται και στην Ασία, από τα οποία μάλλον προήλθαν. Η συστηματική κατάταξη του είδους παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Η συστηματική κατάταξη της ζέβρας (*Danio rerio*)

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Ζώα
ΦΥΛΟ	Χορδωτά
ΥΠΟΦΥΛΟ	Σπονδυλωτά
ΥΠΕΡΟΜΟΤΑΞΙΑ	Γναθοστόματα
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Ακτινοπτερύγιοι
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	Τελεόστεοι
ΤΑΞΗ	Κυπρινόμορφοι
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Κυπρινοειδή
ΓΕΝΟΣ	<i>Danio</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>rerio</i>

Συνήθως, στο φυσικό τους περιβάλλον αρέσκονται να κολυμπούν κοντά στην επιφάνεια, αλλά και στο βένθος και τρέφονται με μικρούς σκώληκες, καρκινοειδή, καθώς και νύμφες η αυγά εντόμων. Η τελευταία αυτή ιδιότητά τους τα έχει καταστήσει χρήσιμα είδη στην καταπολέμηση των κουνουπιών και κατ' επέκταση της ελονοσίας, η οποία αποτελεί μόνιμο πρόβλημα στις χώρες που ενδημεί.

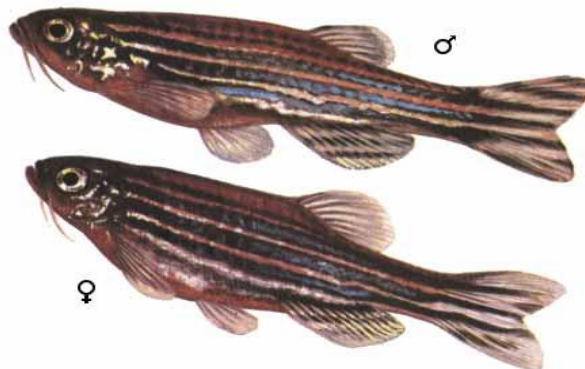
Αν όχι τόσο εντυπωσιακό στην όψη, εντούτοις είναι όμορφο με τον δικό του τρόπο, καθώς διαθέτει ένα τυπικό σώμα ψαριού με χαρακτηριστικές παράλληλες προς τον διαμήκη άξονα σκούρες μπλε ζωνώσεις οι οποίες διατρέχουν ολόκληρο το σώμα του, ακόμη και το εδρικό και το ουραίο πτερύγιο. Ανάμεσα από τις ζωνώσεις διακρίνουμε χρυσαφί (♂) ή ασημένια (♀) απόχρωση, η οποία είναι πιο σκούρα στο ραχιαίο τμήμα και από ανοιχτή στο κοιλιακό και στα βράγχια (Εικ. 1). Χαρακτηριστική είναι και η απουσία της πλευρικής γραμμής. Το στόμα του είναι τελικό. Η ονομασία της προέρχεται από την εντύπωση που δίνει η αντίθεση των παράλληλων ζωνώσεων με τη χρυσαφί ή ασημένια απόχρωση (με τις μαύρες και

λευκές ρίγες του μοιάζει με το τρίχωμα της ζέβρας). Στις ΗΠΑ το συναντάμε και με τις κοινές ονομασίες Leopard Danio και Zebra Danio.



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικό αρσενικό άτομο του είδους *Danio rerio* (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Τα ενήλικα φτάνουν έως τα 5 cm σε μήκος και 5 gr σε βάρος, ενώ είναι αρκετά δραστήρια, καθώς και στα ενυδρεία διακρίνονται για την κινητικότητά τους. Τα αρσενικά είναι πιο λεπτά με ατρακτοειδές σώμα, ενώ τα θηλυκά είναι περισσότερο διογκωμένα ιδίως όταν φέρουν αυγά στο εσωτερικό της κοιλιάς τους (Εικ. 2).



Εικόνα 2. Ωριμα άτομα ζέβρα (♂ και ♀) (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Κεφάλαιο 3

Εκτροφή ζέβρας

3.1.Ποιότητα νερού

Ένας κύριος παράγοντας που συμβάλει στη διατήρηση του *Danio rerio* ως πρότυπο μοντέλο ψαριού είναι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει στις περιβαλλοντικές συνθήκες σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Η προσαρμοστικότητά του σε ελεγχόμενες συνθήκες οφείλεται στις διακυμάνσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού στο φυσικό περιβάλλον εξαιτίας των βροχοπτώσεων αλλά και στη φυσιολογία της περιοχής (Talwar & Jhingran, 1991). Εντούτοις είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι υπάρχει ένα κόστος ενέργειας για τη διατήρηση των ψαριών εκτός του εύρους των βέλτιστων τιμών των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Τα ζώα που ζουν σε βέλτιστες συνθήκες ξοδεύουν μια αυξημένη ποσότητα ενέργειας στη διατήρηση της ομοιόστασης τους, αντί για ανάπτυξη, παραγωγή γαμετών και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Wootton, 1998).

Είναι άξιοι απορίας μιας και οι βέλτιστες συνθήκες διαβίωσης μπορεί να επιφέρει μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, στον αριθμό και την ποιότητα των απογόνων και μειωμένη επιβίωση (Haywood, 1983). Ο προσδιορισμός του εύρους των βέλτιστων τιμών της ποιότητας του νερού του ζέβρα σε συνθήκες αιχμαλωσίας αποσκοπεί στη μείωση της θνησιμότητας καθώς επίσης και στη γρηγορότερα ανάπτυξη παράγοντας ένα μεγάλο αριθμό εμβρύων υψηλής ποιότητας, κατόπιν σεξουαλικής ωρίμανσης του ψαριού.

3.1.1. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι από τις σημαντικότερες παραμέτρους που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στις μονάδες εκτροφής των ψαριών, μιας και επιδρά στη βιολογική και χημική διεργασία των συστημάτων εκτροφής (Boyd, 1979). Στα ποικιλόθερμα ζώα, όπως τα ψάρια, η ανθεκτικότητα στις μεταβολές της θερμοκρασίας ποικίλει και εκφράζεται ως ένα εύρος όπου ευνοείται η καλύτερη ανάπτυξη (Kelsch & Neill, 1990).

Η ζέμπρα, ταξινομείται ως ποικιλόθερμος οργανισμός μιας και παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος τιμών της θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες αιχμαλωσίας το εύρος θερμικής ανθεκτικότητας κυμαίνεται από 6,7 έως 41,7 °C, κατατάσσοντας το ένα από τα ποικιλόθερα είδη ψαριών όπως το είδος *Cyprinodon variegatus* (Cortemeglia & Beitinger, 2005; Schaefer & Ryan, 2006)

Το εύρος ανθεκτικότητας επηρεάζεται από τον εγκλιματισμό των ψαριών στην κατάλληλη θερμοκρασία. Δηλαδή τα ψάρια που εγκλιματίστηκαν για μια περίοδο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αυξάνεται η θερμική ανθεκτικότητα σε σχέση με τα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στις υψηλότερες θερμοκρασίες (Cortemeglia & Beitinger, 2005; Schaefer & Ryan, 2006). Στους φυσικούς πληθυσμούς του *Danio rerio* στο Bangladesh η θερμοκρασία κυμαίνονταν από 16,5 έως 33 °C (Spence *et al.*, 2006). Τα δεδομένα αυτά παρέχουν ισχυρές ενδείξεις της ευρείας ανεκτικότητας που επιδεικνύει η ζέβρα εργαστηριακά και είναι αντιπροσωπευτικές με εκείνες που παρουσιάζει το είδος στο φυσικό περιβάλλον.

Η βέλτιστη θερμοκρασία που προτιμά το είδος δεν έχει καθοριστεί ακόμη. Η θερμοκρασία συντήρησης σύμφωνα με τον Westerfield (1995) είναι 28,5 °C και αφορά την εκτροφή του είδους. Η βέλτιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται στους 28 ± 0 °C, σε αντίθεση με χαμηλότερη ή / τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, εξαιτίας της ανθεκτικότητας που παρουσιάζει το είδος στο φυσικό του περιβάλλον (Schaefer & Ryan, 2006). Οι Matthews *et al.*, (2002) προτείνουν ότι το θερμοκρασιακό εύρος ανθεκτικότητας στη φύση κυμαίνεται από 24-30 °C.

Κατά την εκτροφή της ζέβρας *Danio rerio* σε ελεγχόμενες συνθήκες θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία και θα πρέπει να κυμαίνεται ανάμεσα στα όρια που υποδεικνύουν στις μελέτες διάφοροι ερευνητές. Οι αυξημένες θερμοκρασίες εκτροφής διαταράσσουν την παραγωγή ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της σεξουαλικής διαφοροποίησης στα ψάρια (Uchida *et al.*, 2004).

Η διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών διαμέσω των πρωτεϊνών είναι λιγότερο αποτελεσματική όταν η θερμοκρασία εκτροφής μεταβάλλεται, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξη ορισμένων ειδών ψαριών, κυρίως όταν το θερμοκρασιακό εύρος κυμαίνεται εκτός των ορίων της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης των ειδών (Place & Hofmann, 2001). Οι πληροφορίες αυτές

λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό πειραμάτων κυρίως όταν η εκτροφή λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες εκτός των ορίων της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης.

3.1.2. pH

Όπως η θερμοκρασία, το pH του νερού επηρεάζει τις βιολογικές διεργασίες του ψαριού και τη λειτουργία της μικροβιακής πανίδας. Στα κλειστά συστήματα εκτροφής ψαριών, η βέλτιστη τιμή pH για τη βακτηριακή χλωρίδα κυμαίνεται από 7 έως 8 (Masser *et al.*, 1999). Το εύρος ανοχής του pH για τα ψάρια του γλυκού νερού κυμαίνεται από 6.0 έως 9.5. Το pH συμβάλει στη διατήρηση της ποιότητας του νερού καθώς και στην άριστη λειτουργία του φίλτρου εκτροφής εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος (Timmons *et al.*, 2002).

Ωστόσο, όλα τα ψάρια παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο εύρος προτίμησης, όπου η ανάπτυξη, η μετατρεψιμότητα της τροφής και η αναπαραγωγή είναι σε βέλτιστα επίπεδα, μιας ως εκ τούτου, ο στόχος διαχείριση του pH στην εκτροφή είναι να εξισορροπήσει τις ανάγκες που δημιουργούνται στα βακτήρια που αναπτύσσονται στο υπόστρωμα του φίλτρου (βιοφίλμ).

Περιορισμένα δεδομένα από μελέτες έδειξαν ότι το ζέβρα απαντάται σε ελαφρώς αλκαλικά νερά. Οι Spence *et al.*, (2006) αναφέρουν ότι κατά μέσο όρο το pH κυμαίνεται από 8,0 έως 9,0 στο Μπαγκλαντές, ενώ οι McClure *et al.*, (2006) βρήκαν μια παρόμοια μέση τιμή του pH 8,0 που ανιχνεύθηκε σε τρεις διαφορετικές τοποθεσίες στην Ινδία. Επίσης στον ποταμό Gangers βρέθηκε ότι η μέση τιμή του pH είναι 8,0 (Payne *et al.*, 2003). Μελέτες που έγιναν την περίοδο της ξηρασίας αλλά και την περίοδο των βροχοπτώσεων δηλώνουν την πραγματική αποτίμηση της οικολογικής συμπεριφοράς του ψαριού στα φυσικά του ενδιαίτηματα.

Η βέλτιστη τιμή του pH για τους είδους *Danio rerio* σε συνθήκες αιχμαλωσίας κυμαίνεται από 7,0 έως 8,0, το οποίο ανήκει εντός των ορίων του εύρους βέλτιστης ανάπτυξης των ψαριών του γλυκού νερού (Alabaster & Lloyd, 1980; Brand *et al.*, 2002).

Ωστόσο, δεν έχουν διεξαχθεί λεπτομερές μελέτες που να σχετίζονται με την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα της ζέβρας σε διαφορετικά επίπεδα pH. Διάφορες πληροφορίες αντλούνται από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε άλλα είδη ψαριών της οικογένειας Cyprinidae, όπως για παράδειγμα τα είδη *Catla catla* και

Labeo rohita, στα οποία μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής της ποιότητας του νερού συμπεριλαμβανομένου και του pH στην αναπαραγωγική τους ικανότητα (Sinha, 1985).

3.1.3. Σκληρότητα νερού

Η σκληρότητα του νερού είναι ένα μέτρο της ποσότητας των δισθενών ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, και σε μία μικρότερο βαθμό του σιδήρου και του σεληνίου στο νερό (Wurts, 2002). Τα ψάρια χρειάζονται αυτά τα ιόντα προκειμένου να καλύψουν τις βιολογικές τους ανάγκες κατά την εκτροφή τους. Παρέχονται είτε μέσω της διατροφής τους είτε απευθείας από το νερό εκτροφής. Το σημαντικότερο από τα ιόντα αυτά είναι τα ιόντα ασβεστίου, όπου απαιτείται από τα ψάρια για τα οστά, την πήξη του αίματος, και σε ένα αριθμό άλλων βιολογικών και φυσιολογικών διεργασιών (Wurts, 1993). Ο βαθμός σκληρότητας επηρεάζει την οσμω-ρύθμιση και συχνά σχετίζεται με την ρυθμιστική ικανότητα που διαθέτει το νερό. Τέλος, η σκληρότητα επηρεάζει την παθολογία ορισμένων ασθενειών.

Η ρύθμιση της σκληρότητας στις εγκαταστάσεις εκτροφής της ζέβρας (*Danio rerio*) επιτυγχάνεται με παρόμοια διαδικασία που γίνεται η ρύθμιση του pH στα κλειστά συστήματα εκτροφής ψαριών. Η ρύθμιση της αλκαλικότητας μέσω της άμεσης προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου, χωρίς ταυτόχρονη προσθήκη αλάτων ασβεστίου ή μαγνησίου, οδηγεί σε χαμηλές τιμές σκληρότητας (Buttner *et al.*, 1993; Wurts, 1993).

Οι κρυσταλλικές μορφές του ανθρακικού ασβεστίου περιλαμβάνουν κυρίως τριμμένο κοράλλι ή αραγωνίτη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η σκληρότητα. Η προέλευση του νερού επηρεάζει επίσης την σκληρότητα. Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί αποσταγμένο νερό ή νερό αντίστροφης όσμωσης απαιτείται η προσθήκη αλάτων ασβεστίου και μαγνησίου στο νερό εκτροφής, ώστε η σκληρότητα του νερού κυμαίνεται από 75 έως 200 mg/L CaCO₃, σύμφωνα με τα όρια που προβλέπονται για του οργανισμούς του γλυκού νερού (Wurts, 2002).

Έχει χαρακτηριστεί ως είδος που διαβιεί σε σκληρά νερά με την σκληρότητα να μην υπερβαίνει τα 100 mg / L CaCO₃ (Brand *et al.*, 2002) και παρουσιάζει ελάχιστη ανθεκτικότητα στα μαλακά νερά, όπως έχει αναφερθεί σε μελέτες σε

σύγκριση με τα είδη *Carrasius auratus* και *Plecoglossus altivelis*, ενώ σύμφωνα με τους Chen et al.,(2003),δεν μπορεί να διατηρηθεί σε περιβάλλον με μικρές συγκεντρώσεις ασβεστίου στο νερό.

Οι έρευνες αναφέρουν ότι το εν λόγω είδος ψαριού δεν διατηρείται σε σκληρό νερό ενώ υπάρχουν ελάχιστες έρευνες όπου καταδεικνύουν ότι η ζέβρα προτιμά να ζει σε αλκαλικό pH (Payne et al., 2003; McClure et al., 2006; Spence et al., 2006).

Διάφορες έρευνες μελετούν την επίδραση της μεταβολής της σκληρότητας στην αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και ανθεκτικότητα του ψαριού στις ασθένειες και οι οποίες αποτελούν χρήσιμο οδηγό για την εκτροφή της ζέβρας σε συνθήκες αιχμαλωσίας (Chen et al., 2003).

3.1.4. Αλατότητα

Η αλατότητα εκφράζει την ολική συγκέντρωση των διαλυμένων ιόντων στο νερό (Buttner et al., 1993). Τα ψάρια του γλυκού νερού ψάρια είναι υπερ-οσμωτικά στο περιβάλλον που ζουν με αποτέλεσμα να έχουν την τάση να κερδίζουν νερό και να χάνουν τα άλατα λόγω διάχυσης από τα βράγχια και το δέρμα. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να διατηρεί την ισορροπία νερού και αλάτων εκκρίνοντας άφθονες ποσότητες ούρων, μεταφέροντας ιόντα στο αίμα διαμέσου των κυττάρων στο επιθήλιο των βραγχίων. Το κόστος αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από την αλατότητα και το είδος του ψαριού ανάλογα με την προτίμησή του στην αλατότητα, όπου το κόστος ελαχιστοποιείται. Η διατήρησή τους εξαρτάται από το εύρος της αλατότητας που διατηρείται το είδος του ψαριού, καθώς και την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το κάθε είδος, μιας και τα ψάρια δαπανούν περισσότερη ενέργεια, θέτοντας σε κίνδυνο την ανάπτυξη, την επιβίωση και την αναπαραγωγή του ψαριού.

Η ζέβρα είναι ένα ψάρι του γλυκού νερού, που παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας (έως υφάλμυρα νερά). Οι Sawant et al., (2001) αναφέρουν ότι τα έμβρυα που εκτρέφονται σε αλατότητες έως 2 ppt εμφανίζουν παρόμοια ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με εκείνα που εκτρέφονται σε χαμηλές αλατότητες έως 0,3 ppt. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι τα έμβρυα που βρίσκονται στο στάδιο του ύστερου γαστριδίου είναι περισσότερο ανθεκτικά στις μεταβολές της αλατότητας σε σχέση με τα νεαρά έμβρυα που βρίσκονται σε αλατότητα 14 ppt.

Η ζέβρα παρουσιάζει ανθεκτικότητα ακόμη και σε χαμηλές αλατότητες. Boisen *et al.*, (2003) βρήκαν ότι η ζέβρα είναι σε θέση να διατηρεί τις συγκεντρώσεις των ιόντων στο πλάσμα και σε ολόκληρο το σώμα σε χαμηλές αλατότητες (35 μM χλωριούχο νάτριο), το οποίο αυτό έχει αρνητικό αντίκτυπο στην παραγωγή αυγών και στην επιβίωση.

Η αλατότητα διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό μεταξύ των ψαριών της ζέβρας που εκτρέφονται. Η αλατότητα σύμφωνα με τους Brand *et al.*, (2002) είναι 0,25 ppt αλλά στην πράξη έχει παρατηρηθεί ότι επιβιώνει σε αλατότητες μεγαλύτερες από 1,0 ppt. Η αλατότητα επηρεάζει την επιβίωση, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του είδους. Διάφορες μελέτες οριοθετούν το βέλτιστο εύρος αλατότητας (0,25-0,75 ppt) που χρειάζεται για τη βέλτιστη ανάπτυξη του ψαριού.

3.1.5. Διαλυμένο οξυγόνο

Το διαλυμένο οξυγόνο είναι μια σημαντική παράμετρος και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την εκτροφή του είδους σε ελεγχόμενες συνθήκες (Boyd, 1979). Χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου ευθύνονται για την αύξηση της θνησιμότητας των ψαριών κατά την εκτροφή σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη παράμετρο (Timmons *et al.*, 2002). Τα ψάρια χρειάζονται οξυγόνο για την αναπνοή, που εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του σώματος, το ρυθμό διατροφής, τα επίπεδα δραστηριότητας και τη θερμοκρασία του νερού. Η διαθεσιμότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό προσδιορίζεται μέσω της θερμοκρασίας, της αλατότητας και εν γένει της ποιότητας του νερού (Boyd, 1979).

Οι απαιτήσεις της ζέβρας σε διαλυμένο οξυγόνο δεν έχουν καθοριστεί ακόμη. Σε γενικές γραμμές τα μικρόσωμα τροπικά ψάρια, όπως για παράδειγμα η ζέβρα έχουν συνήθως υψηλό μεταβολικό ρυθμό και, ως εκ τούτου, καταναλώνουν περισσότερο οξυγόνο ανά μονάδα βάρους σε σχέση με τα μεγαλύτερα ψάρια (Helfman *et al.*, 1997). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις σχετικά υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης του είδους, την πυκνότητα εκτροφής, αλλά και τη συχνότητα εισαγωγής των ζωοτροφών δείχνει ότι τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου διατηρείται μέχρι κορεσμού 7,8 mg / L στους 28 °C προκειμένου να για να εξασφαλίσει η υγεία των ψαριών. Θερμόφιλα είδη όπως η τιλάπια (Porma & Masser, 1999) εμφανίζει

μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε μειωμένα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει η ζέβρα δεδομένου ότι στη φύση το οξυγόνο είναι σε χαμηλά σχετικά επίπεδα.

3.1.6. Αζωτούχα απόβλητα

Στα ψάρια του γλυκού νερού η αμμωνία εκλύεται διαμέσου των βραγχίων (80%) και σε ένα μικρότερο βαθμό οφείλεται στα κόπρανα (Wilkie, 2002). Παράγεται επίσης κατά τη διάρκεια της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης (νεκρά ψάρια, υπολείμματα τροφής). Δύο μορφές της αμμωνίας υπάρχουν σε ισορροπία στα υδατικά συστήματα, ενώ η τοξικότητά της αυξάνεται σε σχέση με το pH και τη θερμοκρασία του νερού του συστήματος εκτροφής.

Επίπεδα NH_3 μεγαλύτερα από 0.02 ppm χαρακτηρίζονται τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς και ως εκ τούτου θα πρέπει να μην ανιχνεύονται στο κλειστό συστήματα εκτροφής. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διεργασία της νιτροποίησης όπου τα βακτήρια (nitrosomonas) οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη ιόντα και αυτά με τη σειρά τους οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα με τη βοήθεια των βακτηρίων nitrobacter (Buttner *et al.*, 1993).

Η συγκέντρωση των νιτρώδων ιόντων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ppm εξαιτίας της τοξικότητας που παρουσιάζουν τα νιτρώδη ιόντα (Buttner *et al.*, 1993). Τα μικρόσωμα ψάρια φαίνεται να είναι γενικά λιγότερο ευαίσθητα στην τοξικότητα στα νιτρώδη σε σχέση με τα μεγαλύτερα ψάρια (Lewis & Moriss, 1986). Έρευνες έδειξαν ότι στις προνύμφες της ζέβρας η ανθεκτικότητα αυξάνεται όταν τα επίπεδα των νιτρώδων είναι 2.0 ppm, (Bromage *et al.*, 1988). Η παρατεταμένη έκθεση των ψαριών σε επίπεδα που υπερβαίνουν τα 200 ppm είναι προβληματική (Camargo *et al.*, 2005).

Σε ότι αφορά το επίπεδο ανθεκτικότητας της ζέβρας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 100 ppm, παρόλο που η μακροχρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα είναι μια πηγή χρόνιου στρες και παραμένει αδιερεύνητη. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας της ζέβρας όταν εκτρέφεται σε ελεγχόμενες συνθήκες οριοθετούν το επίπεδο ανθεκτικότητας του ψαριού στην αμμωνία, τα νιτρώδη και νιτρικά ιόντα κατά την εκτροφή του σε ελεγχόμενες συνθήκες.

Κεφάλαιο 4

Διατροφή, δίαιτες και πρακτικές χορήγησης των τροφών

4.1. Απαιτήσεις σε θρεπτικά

Οι απαιτήσεις σε θρεπτικά (πρωτεΐνη, αμινοξέα, ολικές λιπαρές ουσίες, απαιτήσεις σε υδατάνθρακες, ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες) στην ζέβρα δεν έχουν ερευνηθεί εκτενώς. Οι πληροφορίες που αντλούνται σχετίζονται με ισορροπημένα σιτηρέσια που χορηγούνται καθώς και τις τεχνικές χορήγησης της τροφής και προέρχονται από τα εδώδιμα είδη ψαριών που εκτρέφονται. Οι απαιτήσεις αυτές θα πρέπει να καθορίζονται για κάθε στάδιο ανάπτυξης του ψαριού από την ηλικία της νεαρής νύμφης, του νεαρού ιχθυδίου καθώς και του ενήλικου ατόμου. Η διερεύνησή τους γίνεται μέσω πειραμάτων που μελετούν την επίδραση των σιτηρεσίων στην επιβίωση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγική ικανότητα του είδους καθώς και την ανθεκτικότητά του στις ασθένειες και το στρες. Αναμφίβολα το γεγονός αυτό οφείλεται στη διατήρηση του είδους με στόχο την αύξηση της αναπαραγωγικής του ικανότητας όταν χορηγούνται διάφοροι τύποι σιτηρεσίων τα οποία θα οδηγούν στη βέλτιστη ανάπτυξη.

Ελάχιστα δεδομένα είναι διαθέσιμα σχετικά με τις διατροφικές απαιτήσεις του *Danio rerio* σε απαραίτητα λιπαρά οξέα. Η ζέβρα εμφανίζει παρόμοιες απαιτήσεις σε λιπαρά οξέα με εκείνα των υπολοίπων ψαριών του γλυκού νερού που εκτρέφονται για κατανάλωση και έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) όπως για παράδειγμα το λινελαϊκό (18: 2ω-6) και το λινολενικό οξύ (18:3ω-3) στα σημαντικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (HUFAs) όπως το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (20: 5ω-3 EPA), το δοκοσαεξανοϊκό νο οξύ (22: 6ω-3, DHA) και το αραχιδονικό οξύ (20: 4ω-6, AA) (Tocher *et al*, 2001.).

Οι απαιτήσεις των ψαριών σε απαραίτητα λιπαρά οξέα ποικίλουν από είδος σε είδος, ενώ ταξινομούνται ανάλογα με τις ανάγκες των ψαριών σε ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων στις δίαιτες. Δηλαδή μερικά είδη ψαριών απαιτούν υψηλότερη αναλογία σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ΠΛΟ), ενώ άλλα απαιτούν ίση ποσότητα ω-3 και ω-6 ΠΛΟ και άλλα είδη ψαριών απαιτούν υψηλότερες αναλογίες σε ω-6 ΠΛΟ (Watanabe, 1982). Η ζέβρα, όπως και πολλά θερμόφιλα είδη ψαριών ανήκουν στην τελευταία κατηγορία ψαριών. Μελέτες έδειξαν ότι η ζέβρα όταν

σιτίζεται με τυποποιημένες τροφές που περιέχουν διάφορες αναλογίες ω -3 και ω -6 ΠΛΟ παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης και αύξηση της αναπαραγωγικής ικανότητας η οποία οφείλεται στα επίπεδα των ω -6 ΠΛΟ που περιέχονται στη διαίτα (Meinelt *et al.*, 2000).

Λόγω της περιορισμένου αριθμού των μελετών αυτών, γίνονται περαιτέρω πειράματα στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του ψαριού, με μεγαλύτερο αριθμό ψαριών και διαιτών που περιέχουν διαφορετικά επίπεδα ω -6 και ω -3 ΠΛΟ. Τα συμπεράσματα που θα προκύψουν από τις μελέτες αυτές θα έχουν σημαντική εφαρμογή στην κατάρτιση και Παρασκευή διαφόρων τύπων σιτηρεσιών κατάλληλες για το εν λόγω είδος ψαριού.

Ακόμη και οι βασικές διατροφικές μελέτες δεν έχουν εφαρμοστεί στη ζέβρα. Οι απαιτήσεις σε πρωτεΐνες και σε αμινοξέα, σε λιπίδια, και σε μικρότερο βαθμό σε υδατάνθρακες, βιταμίνες, και ανόργανα στοιχεία θα πρέπει να έχουν διερευνηθεί στις περισσότερες διατροφικές μελέτες που διεξάγονται με διάφορα είδη ψαριού τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.

Μέχρι τα εν λόγω δεδομένα να είναι διαθέσιμα, η καλύτερη προσέγγιση των θρεπτικών απαιτήσεων της ζέβρας προέρχονται κυρίως από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε διάφορα είδη της οικογένειας Cyprinidae όπως για παράδειγμα του *Notemigonus crysoleucas* και του *Pimephales promelas* (Lochman & Phillips, 1996). Οι Sales & Janssens, (2003) αναφέρουν τις απαιτήσεις των διακοσμητικών ψαριών σε θρεπτικά συστατικά και μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία στο υπό μελέτη είδος. Παρόλα αυτά, υπάρχει περίπτωση οι απαιτήσεις της ζέβρας σε θρεπτικά συστατικά να είναι ιδιαίτερες και πιθανότατα να μην ταυτίζονται με εκείνα που παρουσιάζουν άλλα είδη ψαριών.

4.2. Δίαιτες

Οι τροφές που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή της ζέβρας θα πρέπει να πληρούν όλες τις προϋποθέσεις μιας ισορροπημένης τροφής καλύπτοντας τις ανάγκες του ψαριού. Η επιλογή τροφών είναι μεγάλης σημασίας για την υγεία των ψαριών και την αύξηση της παραγωγικότητας. Τα ψάρια που ζουν σε συνθήκες αιχμαλωσίας δύναται να σιτιστούν με ζωντανές τροφές, τεχνητά σιτηρέσια, ή μίγμα και των δύο. Είναι εφικτό στη ζέβρα να χορηγείται μια διαίτα που αποτελείται από ζωντανή τροφή

καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της. Δίαιτες όπως η *Artemia* και τα τροχόζωα (*Brachionus sp.*) συγκαταλέγονται στα ισορροπημένα σιτηρέσια εξαιτίας της κάλυψης των θρεπτικών απαιτήσεων της ζέβρας (Watanabe *et al.*, 1983).

Τα σκουλήκια όπως για παράδειγμα οι προνύμφες χειρονομίδων αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό της διατροφής των αγρίων ατόμων της ζέβρας, εύκολα διατίθενται από τοπικούς προμηθευτές ενώ μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ενήλικων ατόμων. Οι ζωντανές τροφές είναι περισσότερο ορατές ελκυστικές και εύπεπτες (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Οι διατροφικές απαιτήσεις της ζέβρας δεν έχουν προσδιορισθεί εκτενώς με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διαφοροποίηση από τις απαιτήσεις των συγγενικών ειδών. Υπάρχουν δυο τρόποι όπου οι τεχνητές τροφές θα επικαιροποιηθούν και θα χρησιμοποιηθούν με επιστημονικό τρόπο στην εκτροφή της ζέβρας.

Ο πρώτος τρόπος είναι να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματική τροφή στις ζωντανές τροφές. Οι τεχνητή τροφές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παροχή συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών που μπορεί να είναι παρόντες σε επαρκή επίπεδα σε ζωντανά είδη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η *Artemia* η οποία ενδέχεται να παρουσιάζει ανεπάρκεια σε ορισμένα λιπαρά οξέα ή σε βιταμίνη C (Lavens & Sorgeloos, 1996). Σε αυτές τις περιπτώσεις, μία εμπορική τροφή μπορεί να προστεθεί στη δίαιτα προκειμένου να διασφαλιστεί το γεγονός ότι οι διατροφικές απαιτήσεις με την εν λόγω τροφή δεν πληρούνται επαρκώς.

Μελέτες δείχνουν επίσης ότι η τεχνητή δίαιτα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτροφή νυμφών ζέβρας είτε ως μοναδική πηγή τροφής ή ως συμπλήρωμα τροφής (Πίν.3). Οι Goolish *et al.*, (1999) αναφέρουν ότι η ζέβρα εκτρέφεται επιτυχώς όταν χρησιμοποιούνται επεξεργασμένοι τύποι σιτηρεσίων. Τα ποσοστά επιβίωσης και ανάπτυξης του ψάρια που σιτίζονται με τυποποιημένες δίαιτες μειώνονται σημαντικά σε σύγκριση με εκείνα που τρέφονται μόνο με *Paramecium* και *Artemia*.

Οι Onal & Langdon (2000) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα ενός ζυμομύκητα (μικροσωματιδιακή δίαιτα είτε σε πρωτεΐνη ή ζελατίνη κάψουλας) όπου χρησιμοποιήθηκε για πρώτη στη διατροφή προνυμφών ζέβρας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εν λόγω συστατικό μπορεί να υποκαταστήσει έως 40% την *Artemia* στη διατροφή με κάψουλες πρωτεΐνης, χωρίς να μειώνεται σημαντικά η ανάπτυξη και η επιβίωση. Ωστόσο, η αύξηση πέραν του ποσοστού αυτού οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη και επιβίωση.

Επίσης οι Carvalho *et al.*, (2006) έδειξαν ότι, η ζέβρα όταν τρέφεται αποκλειστικά με τεχνητά σιτηρέσια εκδηλώνει παρόμοια, αν και ελαφρώς μειωμένη, ανάπτυξη και επιβίωση σε σχέση με τα άτομα που διατράφηκαν με Artemia από την έναρξη του σταδίου κολύμβησης. Τα αποτελέσματα αυτά επιτεύχθηκαν όταν οι δίαιτες χορηγούνταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ένα σημαντικό θέμα που αναδείχθηκε στις μελέτες είναι ότι τα ψάρια που εκτρέφονται με ζωντανές δίαιτες παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη και επιβίωση σε σχέση με τα τεχνητά σιτηρέσια.

Πίνακας 3. Στοιχεία εκτροφής της ζέβρας

Δίαιτα	μέγεθος (um)	προφίλ (%)					περίοδο	πυκνότητα	μεθοδος	Ημερήσια κατανάλωση (dry mg)	Συχνότητα	Αλλαγή νερού	Μήκος (m)	Ανάπτυξη (mm/day)	Επιβίωση (%)	Αναφορά
		P	L	F	C	A										
Microfeast L-10	5–10 250,	44	12	2	2	10	4–21 dpf	94/L	Manual,	100 mg	3× daily	Recirc	6.0	0.15	72.8	Goolish et al.
Kyowa Fry Feed	400 100	54	10	3	2	.8	4–21 dpf	94/L	suspensio	100 mg	3× daily	Recirc	6.4	0.17	60.4	(1999) Goolish et
OSI Microfood	50–150	37	30	12		7	4–21 dpf	94/L	n Manual,	100 mg	3× daily	Recirc	5.8	0.13	50.1	al. (1999)
Argent Hatchfry	300–500	50	12	3	2	7.	4–21 dpf	94/L	suspensio	100 mg	3× daily	Recirc	6.4	0.17	64.6	Goolish et al.
Encapsulon Grade 1	b10 250 50	48	18	0.	6	2	4–21 dpf	94/L	n Manual,	100 mg	3× daily	Recirc	6.3	0.16	80.0	(1999) Goolish et
Particle assisted	5–10 20–	5	18	2		7.	4–21 dpf	94/L	suspensio	100 mg	3× daily	Recirc	4.2	0.04	10.0	al. (1999)
rotational	1000 20–	17	31	2		2	4–21 dpf	94/L	n Manual,	100 mg	3× daily	Recirc	5.3	0.10	84.3	Goolish et al.
agglomeration	1000 200–	45	6	2			4–21 dpf	94/L	suspensio	100 mg 50	3× daily	Recirc	6.2	0.16	51.1	(1999) Goolish et
Liquify for egg	400 100–	44	12	2			14–22	80/L	n Manual,	mg 50 mg	10× daily	Recirc	5.3	0.02	72.6	al. (1999)
layers Dried egg	400 100–	44	12	2			dpf 14–	80/L	suspensio	50 mg	10× daily	Recirc	5.3	0.02	43.0	Goolish et al.
yolk Tetramin Baby	400 100–	44	12	2			22 dpf	80/L	n Manual,	100–120	10× daily	Recirc	5.9	0.08	92.3	(1999) Goolish et
Fish Food “E”	400	60.	22				14–22	18/L	suspensio	mg 100–	continuou	Recirc	10.6	0.33	56.0	al. (1999) Önal
Microfeast		4	4.				dpf 6–27	18/L	n Manual,	120 mg	s	Recirc	6.9	0.16	55.0	and Langdon
Microfeast		60.	5				dpf 6–27	18/L	suspensio	100–120	Continuo	Recirc	10.3	0.32	73.0	(2000) Önal and
encapsulated in		2	6.				dpf 6–27	18/L	n Manual,	mg 100–	us	Recirc	7.9	0.20	84.0	Langdon (2000)
cross-linked protein-		51.	1				dpf 6–27		suspensio	120 mg	Continuo				Önal and	
walled capsules		1	6.				dpf		n Manual,		us 3×				Langdon (2000)	
Microfeast		51.	1						suspensio		daily				Carvalho et al.	
encapsulated in		1							n Manual,						(2006) Carvalho	
gelatin–alginate									suspensio						et al. (2006)	
beads Commercial									n Manual,						Carvalho et al.	
Experimental									suspensio						(2006) Carvalho	
purified									n						et al. (2006)	
Experimental									Automatic							
practical									feeder							
Experimental									Automatic							
practical									feeder							
									Automatic							
									feeder							
									Manual,							
									dry							

Diet manufacturer: Microfeast L-10, Microfeast Feeds, Bartlesville OK; Kyowa Fry Feed, Biokyowa, Inc., Cape Girardeau, MO.; OCI Microfood, Ocean Star Marine Lab, Inc., Hayward, CA.; Hatchfry Encapsulon, Argent Chemical Laboratories, Redmond, WA.; particle assisted rotational agglomeration, Rick Barrows, US Fish and Wildlife Service, Bozeman, MT; Liquify, Interpret Ltd. UK; egg yolk, prepared in lab; Tetramin Baby Food, Tetra Werke, Germany; Commercial = AglosNorse, Ewos, Norway. Nutrient profile: P = crude protein, L = crude lipid, F = crude fiber, C = carbohydrate, A = ash.

4.3. Τεχνικές ταΐσματος

Οι τεχνικές χορήγησης της τροφής είναι παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εκτροφή της ζέβρας. Η ποσότητα της τροφής που χορηγείται σε κάθε γεύμα καθώς και η συχνότητα της είναι από τα βασικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνονται σ' ένα πρωτόκολλο σίτισης. Οι παράμετροι αυτοί, επηρεάζουν την απόδοση της τροφής, το ποσοστό ανάπτυξης και την παραγωγή γαμετών και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς για την ζέβρα (Lee *et al.*, 2000).

Η ποσότητα του σιτηρεσίου που χορηγείται στα ψάρια μπορεί να γίνει είτε μέχρι κορεσμού, είτε ως ποσοστό του σωματικού βάρους του ψαριού. Σε ότι αφορά την πρώτη μέθοδο χορήγησης της τροφής, χαρακτηρίζεται ως «κανόνας των πέντε λεπτών», χρησιμοποιείται κατά κόρον κατά την εκτροφή της ζέβρας σε ελεγχόμενες συνθήκες.

Η πρώτη τεχνική προϋποθέτει την χορήγηση της ποσότητας εκείνης (ούτε λιγότερο ή περισσότερο) που χρειάζεται το ψάρι να την καταναλώσει πλήρως το ψάρι σε διάστημα πέντε λεπτών. Η κατανάλωση εξαρτάται από τον τύπο της τροφής, το χρόνο καταβύθισής της, τη διαλυτοποίηση της τροφής καθώς και τον αριθμό των ψαριών που υπάρχουν στη δεξαμενή εκτροφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ψάρια να υπερσιτίζονται ή να υποσιτίζονται επηρεάζοντας τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της εκτροφής, όπως για παράδειγμα μεταβολή της ποιότητας του νερού, μεταβολή της ανάπτυξης του ψαριού, περιορισμό της αναπαραγωγικής διαδικασίας του ψαριού και στην εκδήλωση ασθενειών μιας και δεν θα υπάρχει άμεση ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ψαριού.

Η δεύτερη τεχνική ταΐσματος προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση ενός σταθερού ποσοστού ημερησίως σε σχέση με το σωματικό βάρος του ψαριού. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής των νυμφών των ψαριών, η ημερήσια ποσότητα της τροφής που χορηγείται κυμαίνεται από 50 έως 300% του ζώντος βάρους της νύμφης και είναι συγκριτικά μεγαλύτερη από την ποσότητα που χορηγείται στα ενήλικα άτομα και είναι της τάξης του 1-10% (Bryant & Matty, 1981). Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει την ακριβή διαχείριση του συστήματος εκτροφής εφόσον γνωρίζουμε τον αριθμό των ψαριών που υπάρχουν στο σύστημα εκτροφής ώστε να έχουμε ακριβή αποτελέσματα και να κατανοήσουμε τη διατροφική συμπεριφορά της ζέβρας.

Για τον υπολογισμό της μέσης χορηγούμενης ποσότητας τροφής απαιτείται μια σειρά από μέσα βάρη προκειμένου να αποτελέσουν ένα πρότυπο μοντέλο για τον υπολογισμό του ποσοστού χορήγησης της τροφής στις νύμφες, στα νεαρά και ενήλικα άτομα της ζέβρας. Τα δεδομένα αυτά θα σχετίζονται με την ηλικία, το μήκος της νύμφης και τον αριθμό των ψαριών στη δεξαμενή. Δεν υπάρχουν εκτενείς αναφορές για τη ζέβρα, με αποτέλεσμα τα στοιχεία που προκύπτουν (αριθμός γευμάτων, ημερήσια ποσότητα τροφής κλπ) προέρχονται από άλλα είδη ψαριών (Pullin & Lowe-McConnell, 1982).

Ο αριθμός των γευμάτων καθώς και η ποσότητα της τροφής διαφοροποιούνται στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ψαριού και εξαρτώνται από τη θερμοκρασία εκτροφής. Ο ρυθμός και η συχνότητα χορήγησης μπορεί να προσδιορισθεί με ευκολία μέσω διατροφικών πειραμάτων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μελέτες αξιοποιούνται αναδεικνύοντας την κατάλληλη διατροφική αγωγή για τη ζέβρα.

Κεφάλαιο 5

Αναπαραγωγική διαδικασία και τεχνικές αναπαραγωγής

5.1. Αναπαραγωγική διαδικασία

Η έρευνα για τις ζέβρες στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στη σταθερή παραγωγή και το μεγάλο αριθμό εμβρύων, ενώ, οι πληροφορίες σχετικά με την αναπαραγωγική βιολογία και τη συμπεριφορά των ψαριών αυτών στο φυσικό τους περιβάλλον, σε άγρια κατάσταση, είναι σαφώς ενδιαφέρουσες για την εκτροφή τους. Είναι αξιοσημείωτο το πόσο λίγα ξέρουμε για αυτά τα είδη, κατ' αυτή την άποψη. Πολλά από τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα σε μεγάλο βαθμό προέρχονται από παρατηρήσεις που έγιναν από τους συλλέκτες κατά τη διάρκεια ζωολογικών ερευνών (Barman, 1991), αν και ορισμένες πιο λεπτομερείς περιγραφές έχουν αναφερθεί πρόσφατα (McClure *et al.*, 2006; Spence *et al.*, 2006).

Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η ζέβρα απαντάται σε μικρά κοπάδια (5-20 ατόμων) σε νερό με αργή κίνηση ή στάσιμο σε πλημμυρικές περιοχές (Pritchard *et al.*, 2001). Οι ζέβρες είναι ασύγχρονα ψάρια, παρτίδες από φωτόκα ψάρια που αναπαράγονται σε μικρές ομάδες, με τα θηλυκά να διασκορπίζουν τα εκκολαπτόμενα αυγά πάνω από το υπόστρωμα χωρίς καμία γονική μέριμνα (Breder & Rosen, 1966). Όπως και με άλλα ψάρια που έχουν προσαρμοστεί στο κλίμα των μουσώνων, η αναπαραγωγή τους γίνεται την περίοδο των βροχοπτώσεων (Munro, 1990; Talwar & Jhingran, 1991), αν και μελέτες σε θηλυκά, με ώριμα ψάρια κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου ώθησαν τους Spence *et al.* (2006) να υποθέσουν ότι η αναπαραγωγή είναι πιο πιθανό να εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των τροφίμων, που το επίπεδο τους συσχετίζεται άμεσα με τις αυξημένες βροχοπτώσεις (Spence *et al.*, 2006). Τα αυγά είναι βενθοπελαγικά και ανάλογα με τις συνθήκες (θερμοκρασία, χημεία του νερού, κλπ), εκκολάπτονται σε διάστημα από 4-7 ημέρες. Οι αρσενικές ζέμπρες οριοθετούν την πιθανή περιοχή εναπόθεσης των αυγών τους (Spence & Smith, 2005) και επίσης υιοθετούν μια εναλλακτική τακτική ζευγαρώματος στο κυνήγι των θηλυκών (Goolish *et al.*, 1998). Οι θηλυκές κάνουν την επιλογή του συντρόφου (Spence & Smith, 2006a) που μπορεί να συνδέεται με οσφρητικά ερεθίσματα (Gerlach, 2006).

Εργαστηριακά πειράματα απέδειξαν ότι οι προνύμφες της ζέβρας προτιμούν να συναναστρέφονται με συγγενείς τους χρησιμοποιώντας την όσφρηση (Mann *et al.*,

2003; Gerlach & Lysiak, 2006) και οπτικά ερεθίσματα (Engeszer & Ryan, 2004). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα κοπάδια των προνυμφών, σε άγρια κατάσταση, είναι πιθανό να είναι στενοί συγγενείς, αν και αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί. Ο βαθμός της γενετικής συγγένειας των ατόμων στα κοπάδια των ενηλίκων είναι επίσης άγνωστος, αν και η πειραματική απόδειξη δείχνει ότι ένα άτομο προτιμά να συνδέεται με τα αδέρφια του για αλλαγή για να αποφύγει μετά τη σεξουαλική ωριμότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάποιο σημείο προνύμφες ή νεαρά ιχθύδια φεύγουν μακριά από το κοπάδι τους (Gerlach & Lysiak, 2006). Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από μελέτες πληθυσμιακής γενετικής που έχουν δείξει υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας και μια ασθενής γενετική δομή μεταξύ των ψαριών που συλλέγονται από τέσσερις διαφορετικές τοποθεσίες στην Ινδία, τουλάχιστον με βάση τα δεδομένα του μικροδορυφόρου δείκτες (Gratton *et al.*, 2004).

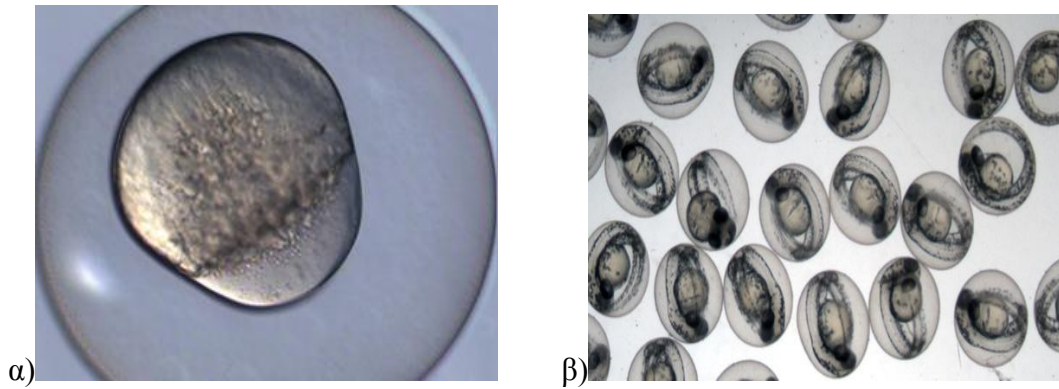
Η γονιμοποίηση των αυγών είναι εξωτερική και λαμβάνει χώρα στο υδάτινο περιβάλλον. Η ζέμπρα είναι ωοτόκα και τα θηλυκά μπορούν να γεννούν καθόλη τη διάρκεια του χρόνου έως και 400 αυγά κάθε φορά. Η ανάπτυξη του εμβρύου είναι ραγδαία και η εκκόλαψη μπορεί να συμβεί την 2^η ή 3^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση. Στους 3 με 4 μήνες (χρόνος γενιάς) τα νεαρά ιχθύδια φτάνουν στην αναπαραγωγική τους ωριμότητα και τα ενήλικα έχουν όριο ζωής τα 5 με 7 χρόνια. Σε άριστες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να διπλασιάσουν τον πληθυσμό τους μέσα σε 15 μήνες. Αρκετοί είναι οι λόγοι που συνηγορούν στην καταλληλότητα της ζέβρας ως πειραματόζωο, καθώς συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους οργανισμούς μοντέλα που ανήκουν στα σπονδυλωτά.

Η ζέβρα και το αμφίβιο *Xenopus* αποτελούν τα απλούστερα σπονδυλωτά πειραματόζωα αυτή την στιγμή. Είναι επίσης από τα δημοφιλή πειραματόζωα για τους γενετιστές και τους αναπτυξιακούς βιολόγους. Η μικρή διάρκεια γενιάς και η ικανότητα να δίνει σε τακτά χρονικά διαστήματα πολλούς απογόνους, δίνει το πλεονέκτημα στους ερευνητές να έχουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Ίσως το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του είναι η διαφάνεια των αυγών και των εμβρύων (Εικ. 3). Οι ζέβρες είναι εντελώς διάφανες μέχρι την 5^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, οπότε και αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα χρωμοφόρα κύτταρα, που αργότερα θα δώσουν τις μαύρες παράλληλες ζωνώσεις. Ο Πίνακας 4 συνοψίζει τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του είδους:

Πίνακας 4. Γενικά χαρακτηριστικά της ζέβρας

Βιολογικά χαρακτηριστικά	<i>Danio rerio</i>
Οικογένεια	Κυπρινοειδή
Χρόνος γενιάς (αυγό έως παραγωγική ωρίμανση)	4 μήνες
Αναπαραγωγικός κύκλος	Συνεχής
Διάρκεια αναπαραγωγικού κύκλου	2-5 ημέρες
Μήκος στην πρώτη γονιμότητα	♂:24.9mm, ♀:23.1mm (74-75 ημέρες)
Αριθμός αυγών ανά θηλυκό ανά φορά γέννησης	150-400
Ποσοστό γονιμοποίησης	70-80%
Ποσοστό εκκόλαψης	80-90%
Διάρκεια εμβρυακού σταδίου	3-5 ημέρες
Διάρκεια sac-fry σταδίου	8-10 ημέρες
Χαρακτηριστική εμβρυακή ανάπτυξη	Ναι
Χαρακτηριστικά αυγών	Διαφανή
Αναλογία φύλου ♀:♂	40:60, 50:50
Φυλετική διαφοροποίηση	Οι νύμφες περνούν από το στάδιο του νεανικού ερμαφροδιτισμού
Συμπεριφορά αναπαραγωγής	Συγκεκριμένη συμπεριφορά ♂ και ♀ επάγει την απελευθέρωση αυγών μετά την πρώτη ώρα της ημέρας της φωτοπεριόδου και μπορεί να επηρεαστεί από φερομόνες.
Δευτερεύοντα φυλετικά χαρακτηριστικά	Δεν διακρίνονται εύκολα στα ψάρια. Τα ♂ ενήλικα είναι λεπτά με μεγαλύτερα εδρικά πτερύγια ενώ στα ♀ είναι διακριτά τα γεννητικά
Εξωγενής χορήγηση τροφής	Από την 3 ^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση
Απαιτήσεις χώρου	Χαμηλές
Συνιστώμενο διαιτολόγιο	Εμπορικά διαθέσιμες νιφάδες για διακοσμητικά ψάρια, Artemia, νύμφες κουνουπιών

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ζωντανά κύτταρα και κυτταρικά οργανίδια χωρίς την χρήση ειδικής βαφής και χωρίς μεγάλη προετοιμασία του πειραματόζωου. Το γεγονός αυτό συνδυαζόμενο με την ex utero ανάπτυξη επιτρέπει την επί τόπου παρακολούθηση της αναπτυξιακής τύχης μεμονωμένων ή ομάδων κυττάρων.



Εικόνα 3. α) Γονιμοποιημένο αυγό λίγο μετά την έναρξη της πρώτης αυλάκωσης β) Αναπτυσσόμενα έμβρυα πριν το στάδιο της εκκόλαψης.

Μέχρι και την 3^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση μπορούμε να εφαρμόσουμε whole mount in situ υβριδοποίηση, ενώ και στα μεταγενέστερα στάδια η γονιδιακή έκφραση φαίνεται σε πιο επιφανειακές δομές, οι οποίες παραμένουν διαφανείς. Η κατανόηση της δυναμικής των κυττάρων σε αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι σημαντική για όλες τις αναπτυξιακές διαδικασίες κι ως εκ τούτου η παραπάνω προσέγγιση μας παρέχει σημαντικά δεδομένα που δε θα μπορούσαμε να έχουμε πρωτότερα. Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα της ζέβρας εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τα θηλαστικά, οπότε μπορούμε να μελετήσουμε κατά κάποιο τρόπο αντίστοιχα αναπτυξιακά φαινόμενα με αυτά των ανώτερων θηλαστικών και κατ' επέκταση του ανθρώπου.

Τα μεγάλα και διάφανα αυγά διευκολύνουν και τις μικροενέσεις για παραγωγή διαγονιδιακών ζώων. Η επισκόπηση μοτίβων έκφρασης της φθορίζουσας χρωστικής GFP, υπό τον έλεγχο ιστοειδικών, αλλά και κυτταροειδικών υποκινητών, μας επιτρέπει να παρακολουθούμε το γονιδιακό προϊόν και να ταυτοποιούμε ή να απομονώνουμε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες εξετάστηκε η χωροχρονική έκφραση γονιδίων αναφοράς (reporter genes), τα οποία τοποθετήθηκαν καθοδικά των ρυθμιστικών περιοχών μιας ευρείας ποικιλίας διαφορετικών γονιδίων της ζέβρας. Η πλειονότητα αυτών των μελετών στόχευε στην εξέταση υποκινητών που ήταν υπεύθυνοι για την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων σημαντικών για την εμβρυακή ανάπτυξη (Πιν. 5). Συνήθως μελετούνται δοκιμές παροδικής έκφρασης (transient expression assays), όπου γίνεται ένεση στα έμβρυα λίγο μετά την γονιμοποίηση και κατόπιν παρατηρούνται.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά παραδείγματα συνδυασμών υποκινητών/γονιδίων αναφοράς που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη ζέμπρα

Promoter	Reporter gene	Transient or stable transgenic
Cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer	β -galactosidase luciferase	transient
Mouse <i>HOX-1.1</i> Human <i>HOX-3.3</i>	β -galactosidase	transient
<i>Xenopus</i> elongation factor 1 α	β -galactosidase	stable
<i>Xenopus</i> elongation factor 1 α	green fluorescent protein (GFP)	Transient and stable
rous sarcoma virus LTR and SV40 early promoter	Chloramphenical acetyltransferase (CAT)	stable
rat GAP-43	β -galactosidase	transient
truncated mouse hsp68	β -galactosidase	stable, enhancer-trap like expression

5.2. Τεχνικές αναπαραγωγής

Η τεχνική που εφαρμόζεται για την αναπαραγωγή της ζέβρας περιγράφεται από τους Brand *et al.*, (2002), η οποία αναφέρει ότι στο κάτω μέρος της δεξαμενής ενυδρείου προτείνεται αφενός μεν η προσθήκη ενός διάτρητου πλαισίου και αφετέρου δε η προσθήκη πλαστικών ή υάλινων σφαιριδίων στο κάτω μέρος του ενυδρείου (Εικ. 3). Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζονται η προστασία των αυγών, η αποφυγή κανιβαλισμού και η αύξηση της απόδοσης της αναπαραγωγής (Westerfield, 1995).



Εικόνα 3. Ενυδρείο αναπαραγωγής ζέβρας (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Η συγκεκριμένη τεχνική είναι αποτελεσματική ως προς ένα βαθμό, μιας και είναι μια μέθοδος η οποία δεν εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα για μαζική παραγωγή

ζέβρας σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Επίσης η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε μικρή κλίμακα από τους περισσότερους ερευνητές.

Στις εγκαταστάσεις εκτροφής της ζέβρας σήμερα χρησιμοποιείται μια δεξαμενή όγκου ενός L, η οποία γεμίζεται με νερό. Στο εσωτερικό της δεξαμενής τοποθετείται ένα πλαστικό πλέγμα ή μια πλαστική διάτρητη σχάρα (Εικ. 4) η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα ελαφρώς μεγαλύτερο δοχείο το οποίο είναι γεμάτο με νερό. Τα ψάρια τοποθετούνται σε ζεύγη ή σε μικρές ομάδες κυρίως το βράδυ. Όταν τα ψάρια γεννούν το επόμενο πρωί τα γονιμοποιημένα αυγά πέφτουν διαμέσου του πλέγματος στον πυθμένα του εσωτερικού δοχείου, όπου και προστατεύονται από κανιβαλισμό από τα ενήλικα άτομα (Mulling *et al.*, 1994).



Εικόνα 4. Ενυδρείο αναπαραγωγής ζέβρας (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα και μπορεί να διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το βάθος και το συνολικό όγκο του συστήματος εκτροφής. Τα αποτελέσματα της επίδρασης των παραμέτρων αυτών στην αναπαραγωγική επιτυχία του είδους δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη. Η μοναδική μελέτη που δημοσιεύτηκε αναφέρεται στην αναπαραγωγική ικανότητα του είδους και στο περιβάλλον εκτροφής (Goolish *et al.*, 1998).

Ο συνολικός όγκος του νερού είναι μια παράμετρος που θα πρέπει να ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, δεδομένου ότι τα αζωτούχα απόβλητα (λόγω των περιττωμάτων) πιθανόν να υποβαθμίζουν την ποιότητα του νερού και εν γένει την αναπαραγωγική ικανότητα του είδους όταν γίνεται σε μικρούς όγκους.

Μια άλλη παράμετρος που απαιτεί ενδελεχή έρευνα είναι η προέλευση του νερού που χρησιμοποιείται κατά πόσο επιδρά στην αναπαραγωγική διαδικασία του είδους (επιλογή ζευγαριού, παραγωγή αυγών, συχνότητα ωοτοκίας).

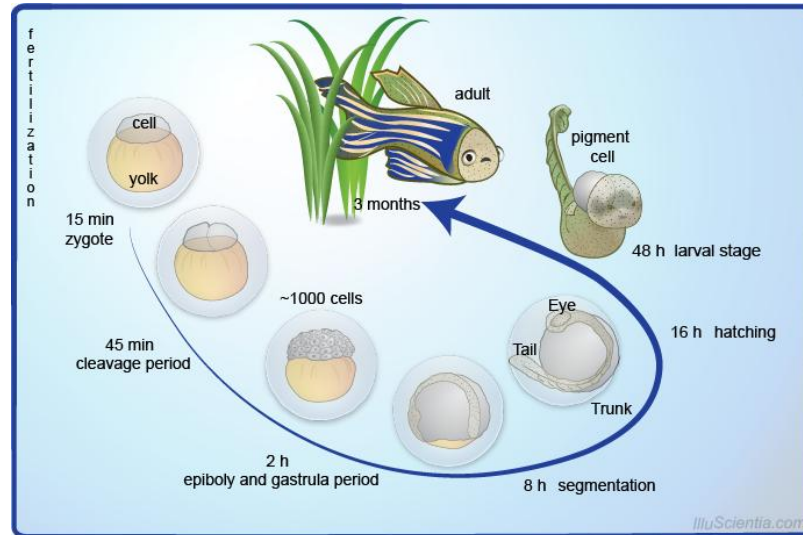
Τα ενυδρεία εκτροφής και αναπαραγωγής της ζέβρας σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το νερό που χρησιμοποιείται να προέρχεται απευθείας από το βιολογικό φίλτρο (τύπου sump) που βρίσκεται κάτω από το ενυδρείο. Το αποτελεσματικό βιολογικό φιλτράρισμα μειώνει την παραγόμενη ποσότητα της αμμωνίας και των νιτρικών ιόντων σε νιτρικά ιόντα, χωρίς όμως να απομακρύνει τα στεροειδή ή τα στεροειδή βακτήρια (προσωρινά συζευγμένα έως ότου ανταλλάξουν γενετικό υλικό).

Οι φερομόνες, κυρίως που προέρχονται από διάφορα στεροειδή, αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται αφενός μεν για την ενίσχυση της αναπαραγωγής, αλλά πολλές φορές παρατηρείται ότι καταστέλλουν την αναπαραγωγή του είδους. (van den Hurk *et al.*, 1987; Gerlach, 2006). Ως εκ τούτου, οι ενώσεις αυτές, εκτός από τα αζωτούχα απόβλητα και τα φωσφορικά άλατα, μπορεί να επηρεάζουν την ωοτοκία. Τα προβλήματα αυτά αποφεύγονται όταν χρησιμοποιείται νερό από τις δεξαμενές αποθέματος. Η σύγκριση των συνθηκών των ιδεών και των σχεδίων είναι εφικτή και παράλληλα απλοϊκή χωρίς να δαπανώνται ιδιαίτερα αυξημένα κονδύλια.

5.3. Ωοτοκία

Η ζέβρα *Danio rerio* χρησιμοποιείται ως πειραματικό μοντέλο υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητα διαχείρισης της αναπαραγωγικής διαδικασίας του ψαριού με την ελεγχόμενη παραγωγή αυγών κατά την εκτροφή της σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Η ζέβρα αναπαράγεται σε ελεγχόμενες συνθήκες αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τη συνολική παραγωγή των αυγών αποσκοπώντας με τον τρόπο αυτό τη βελτίωση των συνθηκών εκτροφής. Τα δεδομένα που σχετίζονται με τις παραμέτρους αναπαραγωγής όπως για παράδειγμα η επιλογή γεννητόρων, η

ωοτοκία, η γονιμότητα, η ποσότητα αυγών, η διάρκεια της αναπαραγωγής και θα πρέπει να συλλέγονται από ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων ζέβρας ώστε να συμβάλουν στην καθιέρωση προτύπων για την παραγωγή γεννητόρων και έλεγχο της ποιότητας αναπαραγωγής της ζέβρας (Εικ.5).



Εικόνα 5.Ωοτοκία και αναπτυξιακά γεγονότα ζέβρας (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Κεφάλαιο 6

Εκτροφή νυμφών ζέβρας

6.1. Συνθήκες εκτροφής

Σε εργαστηριακές συνθήκες σε θερμοκρασία 28,5 °C τα αυγά της ζέβρας *Danio rerio* εκκολάπτονται σε διάστημα 2,5-3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (dpf) (Westerfield, 1995). Μετά την εκκόλαψη, παραμένουν προσκολλημένες στο υπόστρωμα με τη βοήθεια αδένων που βρίσκονται στην περιοχή του κεφαλιού (Laale, 1977) και συνεχίζουν να παραμένουν δραστήριες μέχρι την 5 ημέρα (dpf) μετά την γονιμοποίηση, έως ότου η νυκτική κύστη πληρωθεί με αέρα από την επιφάνεια του νερού (Goolish & Okutake, 1999). Οι προνύμφες επιβιώνουν και αναπτύσσονται αφού τρέφονται με τα αποθέματα του λεκιθικού σάκου έως το διάστημα έναρξης της εξωγενούς θρέψης, η οποία σηματοδοτείται με την ολοκλήρωση ενός αριθμού φυσιολογικών σταδίων, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης ενός πεπτικού συστήματος (Pack *et al.*, 1996; Holmberg *et al.*, 2004) και λειτουργίας της νηκτικής κύστης (πλήρωση με αέρα) (Goolish & Okutake, 1999).

Η λήξη του σταδίου λαμβάνει χώρα μεταξύ 5-6 dpf και εξαρτάται από τις συνθήκες διαβίωσης (Kimmel *et al.*, 1995). Τα λεκιθικά αποθέματα εξαντλούνται πλήρως την 7 ημέρα (dpf) μετά την γονιμοποίηση (Jardine & Litvak, 2003). Στη συνέχεια οι νέο-εκκολαπτόμενες νύμφες της ζέβρας αρχίζουν να τρέφονται με τροφές προκειμένου να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες. Η επιβίωση και η ανάπτυξη κατά το στάδιο αυτό παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκτροφή της ζέβρας (Dabrowski, 1986; NRC, 1993).

6.2. Τύποι τροφών και διατροφή ζέβρας

Η επιλογή του κατάλληλου τύπου τροφής είναι απαραίτητη για την επιβίωση των νυμφών της ζέβρας. Ζωντανές τροφές όπως το *Paramecium*, τα τροχόζωα, και η *Artemia* προτιμούνται, εξαιτίας της περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά (ισορροπημένες τροφές) και παράλληλα είναι περισσότερο ελκυστικές, εύπεπτες, και κατανέμονται ομοιόμορφα στην υδάτινη στήλη σε σχέση με τα τεχνητά σιτηρέσια (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Τα τεχνητά σιτηρέσια μπορούν να

χρησιμοποιηθούν, αλλά σε γενικές γραμμές η επιβίωση και η ανάπτυξη είναι βέλτιστες όταν τα ψάρια τρέφονται με ζωντανές τροφές (Goolish *et al.*, 1999; Onal & Langdon, 2000; Carvalho *et al.*, 2006).

Η ζέβρα είναι αρκετά αρπακτικό είδος ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου. Η ζέβρα τρέφεται με τροφές διαμέτρου 100 μm και ειδικά όταν τρέφεται με *Paramecium* η διάμετρος ποικίλει από 150 έως 200 μm , με τροχόζωα (έως 250 μm) και με ναύπλιους *Artemia* διαμέτρου $500 \times 100\text{-}150 \mu\text{m}$ (L \times W) (Carvalho *et al.*, 2006). Οι νύμφες τρέφονται με ναύπλιους εξαιτίας του αυξημένου μεγέθους που παρουσιάζουν, μέχρι την ημέρα όπου το μέγεθός τους αυξηθεί σημαντικά και να τρέφονται με ζωντανές τροφές. Αρχικά τρέφονται με *Paramecium* ή τροχόζωα μέχρι να είναι σε θέση να τρέφονται αποκλειστικά με *Artemia*.

Οι προνύμφες των ψαριών αξιοποιούν όλα τα χαρακτηριστικά (χημικά και οπτικά ερεθίσματα) προκειμένου να καταναλώσουν την τροφή τους (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Η οπτική συμπεριφορά εξαρτάται από την κίνηση και το χρώμα της λείας (D' Abramo, 2002), ενώ η οσφρητική ανίχνευση γίνεται μέσω ειδικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων αμινοξέων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να την επιτυχή λήψη των σωματιδίων της τροφής (Kolkovski *et al.*, 1997; McElligott & O'Malley, 2005). Η συμπεριφορά της λείας πριν την κατάποσή της από τη νύμφη οφείλεται σε οπτικά ερεθίσματα μιας και τα ενήλικα άτομα διατηρούνται σε σκοτεινές συνθήκες τρέφονται ανεπαρκώς ή καθόλου (McElligott & O'Malley, 2005).

Ο ρόλος της όσφρησης στη διατροφή της ζέβρας δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, αλλά οι προνύμφες της ζέβρας παρουσιάζουν μια ανταπόκριση στα ελεύθερα αμινοξέα από την 4 ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, δηλαδή πριν την έναρξη της εξωγενής τροφής (Lindsay & Vogt, 2004). Οι νύμφες ζέβρας που τρέφονται με ζωντανές τροφές παρουσιάζουν καλύτερη ανάπτυξη σε αντίθεση με τις προνύμφες που τρέφονται με τεχνητά σιτηρέσια (Goolish *et al.*, 1999; Onal & Langdon, 2000; Carvalho *et al.*, 2006). Η καλύτερη απόδοση των τροφών πιθανόν να οφείλεται στην καλύτερη γευστικότητα που παρουσιάζουν οι ζωντανές τροφές έναντι των τεχνητών σιτηρεσίων (Cahu & Zambonino Infante, 2001).

Το προφίλ της τροφής που χρησιμοποιείται θα πρέπει να καλύπτει τις απαιτήσεις των ψαριών. Οι διατροφικές απαιτήσεις της ζέβρας δεν έχουν διερευνηθεί

ακόμη πλήρως, ενώ οι πρακτικές που εφαρμόζονται στηρίζονται σε υποθέσεις. Για παράδειγμα, οι προνύμφες της ζέβρας τρέφονται με *Paramecium* επειδή το διατροφικό προφίλ των πρωτόζωων, δεν επαρκεί για να υποστηρίξει τις διατροφικές απαιτήσεις κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης που λαμβάνει χώρα περίπου τρεις εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (Brown, 1997). Η θρεπτική σύσταση του *Paramecium* δεν έχει διερευνηθεί, μιας και όταν χορηγείται αποκλειστικά ως τροφή στις ζέβρες δεν αξιοποιείται θρεπτικά από το ψάρι παρατηρώντας χαμηλό ρυθμό αξιοποίησης.

Τα βλεφαριδωτά έχουν μειωμένα επίπεδα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και σε ορισμένα αμινοξέα (Boëchat & Adrian, 2006), οπότε είναι πιθανόν ότι τα βακτήρια που τρέφονται με *Paramecium* στερούνται βασικά στοιχεία όπως για παράδειγμα το ιώδιο το οποίο θεωρείται ένα πρόδρομο στοιχείο της θυρεοειδούς ορμόνης η οποία είναι σημαντική για την έναρξη της μεταμόρφωσης στα ψάρια (Brown, 1997; Moren *et al.*, 2006).

Οι ναύπλιοι της *Artemia* χρησιμοποιούνται ως τροφές κατά την περίοδο των αρχικών αναπτυξιακών σταδίων της ζέβρας με μεγάλο βαθμό επιτυχίας (Carvalho *et al.*, 2006) μιας και όπως αναφέρεται από έρευνες οι τροφές αυτές είναι κατάλληλες για τις νύμφες της ζέβρας αφού τα θρεπτικά τους συστατικά αξιοποιούνται καλύτερα επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό καλύτερη ανάπτυξη και μεγαλύτερη επιβίωση στο στάδιο του νεαρού και αναπτυσσόμενου ιχθυδίου.

6.3. Ποιότητα νερού

Οι διατροφικές απαιτήσεις των νυμφών της ζέβρας θα πρέπει να έρχονται σε ισορροπία με την ανάγκη διατήρησης της ποιότητας του νερού. Προτιμώνται τροφές οι οποίες θα καλύπτουν τις ανάγκες του ψαριού και αφετέρου δεν θα μεταβάλλουν την ποιότητα του νερού. Αυξημένες ποσότητες τροφής έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού εκτροφής της ζέβρα (χαμηλό διαλυμένο οξυγόνο, αυξημένα επίπεδα αμμωνίας, κ.λπ.) και θα επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη και επιβίωση των προνυμφών. Ως εκ τούτου, τα προϊόντα απέκκρισης των ψαριών και τα υπολείμματα τροφής θα πρέπει να απομακρύνονται από το ενυδρείο με σιφωνισμό και συχνές αλλαγές νερού.

Οι προνύμφες ηλικίας 21 dpf που εκτρέφονται σε ενυδρεία με σταθερή ροή, προϋποθέτει συχνές αλλαγές νερού και σιφωνισμό των αποβλήτων του ψαριού (περιττώματα) σε ημερήσια βάση χωρίς αυτοματοποιημένο σύστημα. Η τεχνική αυτή δεν βρίσκει εφαρμογή σε ενυδρεία μεγάλου όγκου στα οποία το νερό επανακυκλοφορεί ενώ η εκτροφή είναι σε μεγάλη κλίμακα (Westerfield, 1995).

Καλύτερη εκτροφή επιτυγχάνεται με κλειστά κυκλώματα εκτροφής. Τα συστήματα επανακυκλοφορίας με χαμηλά ποσοστά ροής περιλαμβάνουν δεξαμενές με χαμηλή παροχή νερού, ώστε να μην ανανεώνεται το νερό σε μεγάλο βαθμό. Εξαρτάται από το ρυθμό αλλαγής του νερού, τις αναλογίες αζωτούχων αποβλήτων και στερεών τα οποία απομακρύνονται απευθείας από τις δεξαμενές ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό την ημερήσια αλλαγή νερού.

Σε περίπτωση που η παροχή του συστήματος εκτροφής είναι μεγάλη όταν οι νύμφες είναι σε ηλικία 5 ημερών μετά τη γονιμοποίηση παρεμποδίζεται η πλήρωση της νηκτικής κύστης με αέρα, επηρεάζοντας αρνητικά την επιβίωση, επειδή οι νύμφες αναγκάζονται να δαπανήσουν ενέργεια προκειμένου να διατηρήσουν τη θέση τους στην στήλη του νερού (Bagatto *et al.*, 2001). Επίσης όταν η ροή του νερού αυξάνεται μειώνεται η προσπάθεια αλίευσης των νυμφών με περιορισμένη δυνατότητα κολύμβησης.

Εναλλακτικά, τα ποσοστά ανακύκλωσης του νερού θα πρέπει να είναι σε υψηλά ποσοστά ώστε να διατηρείται η ποιότητα του νερού σε ικανοποιητικά επίπεδα. Η ποιότητα του νερού και το εύρος των παραμέτρων του νερού στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της ζέβρας δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς, κάτι τέτοιο θα ήταν χρήσιμο προκειμένου να προσδιοριστεί ο ιδανικός ρυθμός παροχής του νερού στα ενυδρεία εκτροφής και κυρίως στα ενυδρεία καραντίνας της ζέβρας.

6.4. Ανάπτυξη και επιβίωση

Η αποτελεσματικότητα της εκτροφής τυπικά μετράται ως προς το ρυθμό ανάπτυξης και την επιβίωση των προνυμφών. Τα αποτελέσματα των δημοσιευμένων μελετών για την ανάπτυξη των προνυμφών ποικίλλουν. Για παράδειγμα, οι Biga & Goetz (2006), ανέφεραν ότι κατά μέσο όρο το συνολικό μήκος (TL) του νεαρού ιχθυδίου είναι 4,7 mm 28 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με εκείνα των Carvalho *et al.*, (2006), οι οποίοι αναφέρουν ότι τα νεαρά

άτομα της ζέβρας έχουν μήκος 14,3 mm την ίδια χρονική περίοδο που έγινε η εκτροφή.

Οι διαφορές είναι ορατές υποδεικνύοντας μάλλον το ρόλο κάποιας ενδεικτική διαίτας. Παρά το γεγονός ότι ένας αριθμός παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της πυκνότητας εκτροφής και τις γενετικές διαφορές μεταξύ των μελετών, είναι πιθανό εμπλέκονται, διαφορές στα πρωτόκολλα διατροφής μεταξύ των δύο μελετών: όταν τρέφονται με *Paramecium*, ενώ τα ψάρια σε προηγούμενη μελέτη εκτράφηκαν αποκλειστικά με ναύπλιους *Artemia*.

Οι Goolish *et al.*, (1999), αναφέρουν ότι η επιβίωση της ζέβρας ηλικίας 28 ημερών μετά τη γονιμοποίηση αυξάνεται από 15 έως 80% και εξαρτάται από τον τύπο παροχής της τροφής που χορηγείται. Η μέση επιβίωση μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων κυμαινόταν από 40- 98% για παρόμοιο χρονικό διάστημα παρουσιάζοντας τις καλύτερες επιδόσεις, όταν η ζέβρα τρέφεται με σιτηρέσια που περιέχουν 40% (εμπορικές προνύμφες ενθυλακωμένες σε μία ζελατίνη από αλγινικό σφαιρίδιο) και 60% ναύπλιοι *Artemia* (Onal & Langdon 2000).

Οι Carvalho *et al.*, (2006) ανέφεραν ότι η μέση επιβίωση κυμαίνεται από 55 έως 86% σε νεαρά άτομα ηλικίας 27 dpf. Η επιβίωση αυτή εξαρτάται από τη διατροφή και τη συχνότητα γευμάτων. Πρακτικά η επιβίωση θα πρέπει να ήταν πολύ υψηλότερη, με μηδενική θνησιμότητα δεν είναι ασυνήθιστη (Diekmann & Nagel, 2005).

Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι βέλτιστες πρακτικές που εφαρμόζονται για την εκτροφή των ατόμων ζέβρας σε όλα τα στάδια ανάπτυξης είναι εκείνες που αφορούν κατά παράδοση μεγάλες ποσότητες ζωοπλαγκτόν και εξαρτάται από την ποιότητα του νερού. Τα τεχνητά σιτηρέσια είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τις ζωντανές τροφές που χορηγούνται επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση των ψαριών.

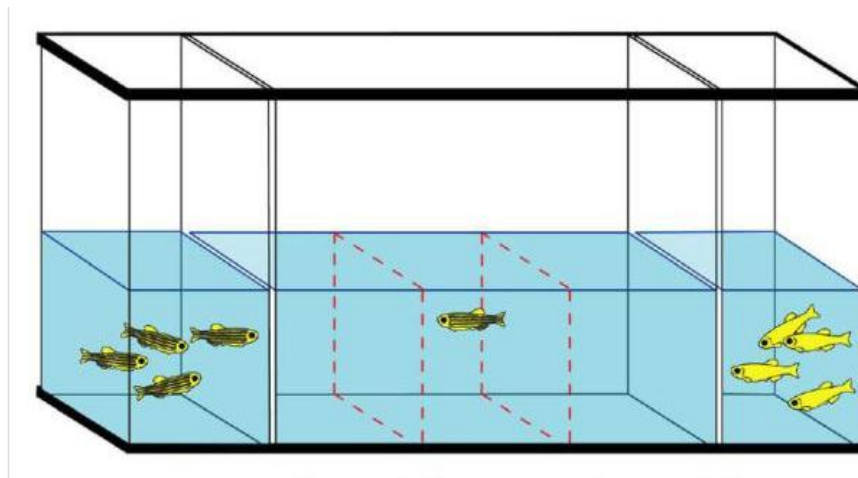
Η προσθήκη τεχνητών διαιτών είναι λιγότερο αποτελεσματικές σε σχέση με τις ζωντανές τροφές, ακόμη και στην περίπτωση που συγκρίνονται με ζωντανές τροφές. Πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του νερού και τις θρεπτικές απαιτήσεις των νυμφών της ζέβρας συνεισφέρουν στην περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών εκτροφής.

Κεφάλαιο 7

Διατήρηση ενήλικων ατόμων

7.1. Πυκνότητες εκτροφής

Η πυκνότητα εκτροφής αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης για πολλά είδη ψαριών μιας και επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την υγεία, την παραγωγικότητα και την ευζωία της ζέβρας (Ellis *et al.*, 2002). Στις δεξαμενές εκτροφής (ενυδρεία) ο υπερπληθυσμός μειώνει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό ανάπτυξης (Procarione *et al.*, 1999) και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του ψαριού (Wedemeyer, 1996; Suomalainen *et al.*, 2005) (Εικ. 6). Το stress αυξάνει τα επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα με αποτέλεσμα να επηρεάζονται ο ρυθμός ανάπτυξης και η υγεία του ψαριού (Vijayan & Leatherland, 1990; Barton & Iwama, 1991). Σε αυξημένες πυκνότητες εκτροφής το ψάρι οδηγείται σε stress με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιθετική συμπεριφορά του (Ellis *et al.*, 2002).



Εικόνα 6. Σύστημα εκτροφής ζέβρας (Προέλευση: www.zebrafishtank.com)

Την περίοδο της ανταγωνιστικότητας εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις στη συμπεριφορά μεταξύ των ατόμων που οριοθετούν την περιοχή ωοτοκίας και του κυρίαρχου είδους συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην εκδήλωση stress σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Έρευνες έδειξαν ότι, τα επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα της ζέβρας είναι υψηλότερα στα άτομα που επιχειρούν να οριοθετήσουν την περιοχή

ωοτοκίας σε σχέση με τα κυρίαρχα άτομα (Pottinger & Pickering, 1992; Fox *et al.*, 1997).

Οι συμπεριφορές αυτές είναι περισσότερο εμφανείς όταν η πυκνότητα του πληθυσμού στη δεξαμενή εκτροφής είναι ελεγχόμενη (Pickering, 1992) και δεν ξεπερνά κατά πολύ τον αριθμό των ψαριών στο ενυδρείο (McCarthy *et al.*, 1992). Το φίλτρο του ενυδρείου συμβάλει σημαντικά στη διατήρηση ενός υγιούς περιβάλλοντος ικανού να διατηρήσει τον αριθμό των ψαριών που έχουν τοποθετηθεί στο ενυδρείο εκτροφής.

Η ζέβρα όταν εκτρέφεται σε ελεγχόμενες συνθήκες εκδηλώνει ανταγωνιστική συμπεριφορά μιας και ανήκει στα είδη ψαριών που δημιουργεί σχέσεις κυριαρχίας ανάμεσα στα μέλη του πληθυσμού (Larson *et al.*, 2006). Οι σχέσεις που δημιουργούνται μεταξύ της κυρίαρχης και της υποδεέστερης ζέβρας χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση.

Πολλά είδη ψαριών αυξάνουν την επιθετική τους συμπεριφορά όταν ο αριθμός των ατόμων στη δεξαμενή εκτροφής δεν είναι απόλυτα ελεγχόμενος, όπως για παράδειγμα η τσιπούρα (*Sparus aurata*) ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus caprio*) και η ιριδίσουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Pickering & Pottinger, 1987; Tort *et al.*, 1996; Ruane *et al.*, 2002).

Η ζέβρα εμφανίζει μια ευαισθησία στον υπερπληθυσμό. Τα ενήλικα άτομα ζέβρας παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο αίμα όταν εκτρέφονται σε μεγάλες πυκνότητες (40 άτομα/L) (Ramsay *et al.*, 2006) σε σχέση με μεγαλύτερες πυκνότητες (60 άτομα/L) (Goolish *et al.*, 1998), όπου παρουσιάζουν χαμηλή αναπαραγωγική ικανότητα. Και στις δυο περιπτώσεις η ποιότητα του νερού παίζει καθοριστικό ρόλο μιας και δεν θα πρέπει να μεταβάλλεται ώστε να δημιουργεί αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και επιβίωση του ψαριού.

Επίσης ο υπερπληθυσμός δημιουργεί ανταγωνισμό με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η υγεία των ψαριών και να οδηγούνται σε μειωμένες αποδόσεις και μεταβολή της ποιότητας του νερού (Ellis *et al.*, 2002). Η ζέβρα σε συνθήκες αιχμαλωσίας τρέφεται κατά βούληση με αποτέλεσμα η επιθετική συμπεριφορά της να οφείλεται κυρίως στην τροφή (μιας και δεν μπορεί να καλύψει τις διατροφικές της απαιτήσεις) και όχι στην μεταβολή της ποιότητας του νερού.

Τα προβλήματα θα πρέπει να ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει εκείνα που σχετίζονται με την πυκνότητα και την ποιότητα

του νερού, σε σχέση με τη δεύτερη κατηγορία που περιλαμβάνει τα προβλήματα που προκαλούνται από το κοινωνικό περιβάλλον και τη συμπεριφορά των ψαριών λαμβάνοντας υπόψη και στις δυο περιπτώσεις το μέγεθος του ψαριού και το ρυθμό ανάπτυξης (Jobling, 1995).

Στην ίδια μελέτη αναφέρεται για την πέστροφα, πληθυσμοί με υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και μεγάλη διακύμανση μεγέθους δείχνουν καλή ποιότητα νερού και κοινωνικό περιβάλλον. Πληθυσμοί με χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και με μικρή διακύμανση μεγέθους δείχνουν ένα περιβάλλον με ακατάλληλη ποιότητα νερού. Πληθυσμοί με ενδιάμεσο ρυθμό ανάπτυξης και μεγάλη διακύμανση μεγέθους υποδηλώνουν ένα φτωχό κοινωνικό περιβάλλον.

Ένα σημαντικό θέμα που προκύπτει από τον υπερπληθυσμό ψαριών στο ενυδρείο είναι η αναλογία των φύλων από τα ζευγάρια που θα δημιουργηθούν.

Η θερμοκρασία, το pH, η αλληλεπίδραση της συμπεριφοράς και η πυκνότητα εκτροφής επηρεάζουν την πρωτογενή σεξουαλική διαφοροποίηση σε ορισμένες ψάρια (Godwin *et al.*, 2003). Η επίδραση της πυκνότητας των ατόμων στην αναλογία φύλου περιγράφηκε σε αρκετά είδη ψαριών, όπως για παράδειγμα το χέλι (*Anguilla rostrata*) (Krueger & Oliveira, 1999) και το είδος *Macropodus opercularis* (Francis, 1984).

Όταν η πυκνότητα εκτροφής της ζέβρας είναι μικρή τότε εμφανίζεται ένας αριθμός θηλυκών ατόμων ανάμεσα στα άτομα του πληθυσμού (Brand *et al.*, 2002). Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι στην πραγματικότητα η ανάπτυξη που προκαλείται από τις διακυμάνσεις στην κατανάλωση τροφής επηρεάζει φαινοτυπικά την πυκνότητα εκτροφής, το ρυθμό κατανάλωσης της τροφής, την ανάπτυξη και τη σεξουαλική ανάπτυξη της ζέβρας.

Η πυκνότητα εκφράζεται ως τον συνολικό αριθμό ψαριών για κάθε λίτρο νερού (ψάρι/L). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ταξινόμηση της ζέβρας με βάση την πυκνότητα εκτροφής διαφοροποιείται σημαντικά και εξαρτάται από την εκάστοτε πειραματική διάταξη. Οι Spence & Smith (2006b) αναφέρουν ότι στα πειράματά τους χρησιμοποίησαν πυκνότητες της τάξης των 0,25 ψάρια / L, δηλαδή 200 φορές μικρότερη πυκνότητα από τη μέγιστη πυκνότητα (40 ψάρια / L) που χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους οι Ramsay *et al.*, (2006).

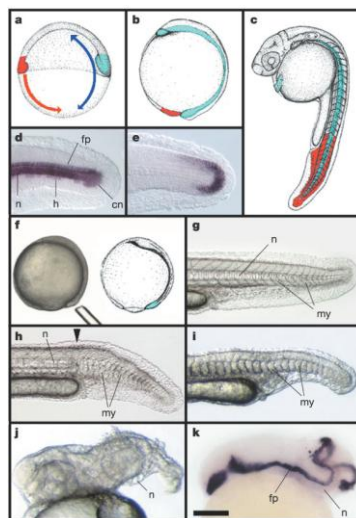
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα πειράματα διατροφής θα πρέπει να αξιοποιούνται ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός πρότυπου μοντέλου

ανάπτυξης του είδους σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Λαμβάνοντας υπόψη τις πιθανές επιπτώσεις της πυκνότητας στην υγεία και την παραγωγικότητα της ζέβρας στα διάφορα στάδια ανάπτυξης σε συνθήκες αιχμαλωσίας, θα πρέπει να οριοθετηθεί ένα πρότυπο εύρος για την πυκνότητα εκτροφής του είδους. Η οριοθέτηση του εύρους τιμών θα επιφέρει ελαχιστοποίηση του stress, αυξημένη επιβίωση και καλύτερη ανάπτυξη του ψαριού.

7.2. Προγράμματα γενετικής

Η ζέβρα έχει αναγνωρισθεί ως το είδος εκείνο με πλούσιο ερευνητικό ενδιαφέρον, μιας και χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές ως πρότυπο πειραματικό μοντέλο ψαριού σε μελέτες αναπαραγωγής (οντογένεση, πειράματα γενετικής μηχανικής) και διατροφής (Hawkins *et al.*, 2001). Για το σκοπό αυτό το 1998 δημιουργήθηκε ένα πρότυπο διεθνές κέντρο ζέβρας, προκειμένου να συμβάλλει στη διατήρηση στελεχών άγριου πληθυσμού ζέβρας που θα χρησιμοποιούνταν στη γενετική μηχανική (Stohler *et al.*, 2004).

Ο ανεπαρκής συντονισμός της αναπαραγωγής και της κατανομής αποθεμάτων για τη ζέβρα στην κατασκευή ενός βασικού άγριου τύπου που θα χρησιμοποιηθεί κατά προτεραιότητα σε μεταλλάξεις και στη μελέτη της διαγονιδίωσης. Για τη διατήρηση των αποθεμάτων θα πρέπει να εφαρμοστούν κοινά πρωτόκολλα τα οποία θα κρατούν γενετικά ακέραια τα στελέχη της ζέβρας που προέρχονται από τα διάφορα πειράματα ή εκείνα που προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς και θα εφαρμοστούν απ' όλη την ερευνητική κοινότητα (Εικ.7).



Εικόνα 7. Στάδια ανάπτυξης ζέβρας (Προέλευση: www.plosgenetics.org)

Τα πειράματα διαγονιδίου στα διακοσμητικά ψάρια επικεντρώθηκαν, εκτός από την αύξηση του ρυθμού βελτίωσης, αντίσταση στις ασθένειες και την περιβαλλοντική ανθεκτικότητα, στην παραγωγή προϊόντων που θα λειτουργούν ως βιοδείκτες. Συνεπώς με την εισαγωγή κατάλληλων γονιδίων τα ψάρια έχουν την δυνατότητα να εκπέμπουν φθορίζων χρώματα (πράσινο, κόκκινο, κίτρινο) όταν ανιχνεύονται στο νερό ρύποι, τοξίνες, βαρέα μέταλλα και διάφορα άλλα στοιχεία που μολύνουν την ποιότητα του νερού. Επίσης φωσφορίζουν όταν εκτίθενται κάτω από υπέρυθρο φως. Στο πρώτο ψάρι που εφαρμόστηκε το παρών ήταν η ζέβρα *Danio rerio* και αργότερα στο ψάρι medaca (*Oryzias latipes*).

7.2.1. Διαγονιδίου ζέβρας

Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαγονιδίου στον τομέα των διακοσμητικών ψαριών αποτελεί η ζέβρα, *Danio rerio* της οικογένειας Cyprinidae.

Χρονικά δεν είναι το πρώτο διακοσμητικό ψάρι που εισάγεται ξένο γονίδιο (χρυσόψαρο *carassius carassius*) είναι όμως ο πρώτος διαγονιδιακός οργανισμός που διατίθεται στην αγορά ως κατοικίδιο (Chavis, 2009). Είναι επίσης χαρακτηριστικές οι αντιδράσεις τόσο από το εμπορικό κοινό όσο και από διάφορες οργανώσεις κυβερνητικές ή μη για την χρήση αυτών των οργανισμών.

Κάνοντας μια αναδρομή παρατηρούμε ότι στα τέλη της δεκαετίας του '90 ο Gong και οι συνεργάτες του στο πανεπιστήμιο της Σιγκαπούρης εκτέλεσαν πειράματα στη ζέβρα *Danio rerio* (Blake *et al*, 2001) με απώτερο σκοπό την:

- Παραγωγή νέων ποικιλιών διακοσμητικών ψαριών
- Εξαγωγή συμπερασμάτων για την διαγονιδιακή τεχνολογία
- Παραγωγή ψαριών που θα χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες

Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή του συγκεκριμένου ψαριού είναι:

- η διαθεσιμότητα των αυγών και των εμβρύων
- η διαύγεια του ιστού
- η εμβρυογένεση καθ' όλο το διάστημα
- η εξωτερική ανάπτυξη

- το μικρό χρόνο παραγωγής
- η εύκολη συντήρηση και νέων και ενήλικων ατόμων

Για την παραγωγή των διαγονιδιακών ζεβρών (Εικ. 8) χρησιμοποιήθηκαν τρεις αλληλουχίες DNA με ενσωματωμένο το γονίδιο της φθορίζων πρωτεΐνης (Pray, 2008). Στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν οι νέες διαγονιδιακές ζέβρες να εκδηλώνουν έντονα φθορίζων χρώματα, ορατά σε γυμνά μάτια κάτω από το φως της ημέρας, σε υπεριώδες φως στο σκοτάδι, και όταν ρυπαίνεται το νερό. Ο εκινητής που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αυτών των οργανισμών είναι ο εκινητής ειδικού μν *pmulz2*. Οι τρεις φθορίζων πρωτεΐνες που εισάγονται είναι:

- Green fluorescent protein (gfp)
- Red fluorescent protein (rfp)
- Yellow fluorescent protein (yfp)

Συνεπώς οι τρεις αυτές αλληλουχίες DNA με τις παραπάνω πρωτεΐνες εισήχθηκαν στο είδος *Danio rerio* με μικροένεση στα πλασμίδια του DNA κατά το πρώτο και δεύτερο κυτταρικό στάδιο (Gong *et al.*, 2000).

Η αρχή έγινε με την *gfp* σειρά. Το γονίδιο απομονώνεται από την μέδουσα (*Aequorea victoria*) και επιπλέον τα ψάρια αυτής της σειράς εκπέμπουν πράσινη φθορίζων πρωτεΐνη και κάτω από μπλε φωτισμό. Για την *yfp* και την *rfp* σειρά το γονίδιο απομονώθηκε από κοραλλιογενής υφάλους και θαλάσσιες ανεμώνες.



Εικόνα 8. Διαγονιδιακές φθορίζουσες ζέβρες *Danio rerio* (Πηγή: www.glofish.com)

Το επίπεδο της εξωτερικής πρωτεΐνης που εκφράζεται είναι πολύ υψηλό. Υπολογίστηκε από 3% έως 17% στην τελική μυϊκή πρωτεΐνη και 4,8-27,2 mg στον υγρό μυϊκό ιστό. Παρά το υψηλό επίπεδο έκφρασης της εξωτερικής πρωτεΐνης η έκφραση της ενδογενούς mulz-2-Mrna δεν είχε αρνητικά αποτελέσματα. Έτσι ο μυς των ψαριών μπορεί να διερευνηθεί ως ένα σύστημα βιοαντίδρασης για αναπαραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Αυτός ήταν και ο αρχικός σκοπός των πειραμάτων, να παραχθούν δηλαδή ψάρια που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση ρύπων και τοξινών στο νερό. Έτσι οι διαγονιδιακοί αυτοί οργανισμοί θα εκπέμπουν διαφορετικό χρωματισμό όταν αλλάζει το pH η όταν ανιχνεύονται στο νερό βαριά μέταλλα κ.α.

Στην αρχή οι έρευνες που έγιναν στο πανεπιστήμιο ήταν καθαρά για πειραματικούς σκοπούς, αλλά αργότερα επεκτάθηκαν και στο εμπόριο (Dunham, 2008).

Τα διαγονιδιακά αυτά ψάρια πήραν το όνομα Glofish, από δύο επιχειρηματίες που αγόρασαν τα δικαιώματα για την εταιρία New York Technologies στα τέλη του 2002, εφόσον πρώτα αναγκάστηκαν να ολοκληρώσουν μια σειρά από εκθέσεις αξιολόγησης των κινδύνων για την ασφάλεια των τροπικών ψαριών (Blake, 2001).

Η οριστική απόφαση των περιβαλλοντικών κινδύνων έγινε από την Αμερικάνικη υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) που ήταν αρμόδια για όλα τα τροποποιημένα ζώα αναφέροντας το εξής:

«Τα τροπικά ψάρια ενυδρείων δεν χρησιμοποιούνται για σκοπούς διατροφής, οπότε δεν συνιστούν απειλή για την προμήθεια τροφίμων. Δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι τα γενετικά μεταλλαγμένα *Danio rerio* αποτελούν απειλή για το περιβάλλον από ό, τι χωρίς τροποποίηση. Ελλείψει σαφούς κινδύνου για τη δημόσια υγεία, η FDA δεν βρίσκει κανένα λόγο να ρυθμίσει τα συγκεκριμένα ψάρια»

Οι διαγονιδιακές ζέβρες συνέχισαν να πωλούνται κανονικά στις Η.Π.Α εκτός από την πολιτεία της Καλιφόρνιας και στον Καναδά όπου υπήρχε ρύθμιση απαγόρευσης όλων των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Hallerman, 2004) Στην Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύεται η πώληση αυτών των διαγονιδιακών ζεβρών (Chavis, 2009).

Σ' αυτές τις μελέτες η ζέβρα, *Danio rerio* διερευνήθηκε ως μοντέλο για να αποδείξει από την χρήση της διαγονιδιακής τεχνολογίας την πιθανότητα να παραχθούν νέες ποικιλίες ψαριών (Gong *et al.*, 2003). Είναι φανερό επίσης ότι αυτή η

τεχνολογία μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα είδη διακοσμητικών ψαριών, όπως το χρυσόψαρο και τα κόι. Μάλιστα χρησιμοποιώντας τον ίδιο προαγωγέα (pmylz2) παρήχθησαν μια σειρά διαγονιδιακών medaca, τα οποία έδειξαν το ίδιο πράσινο φθορίζον χρώμα σαν τη ζέβρα (Tsai *et al.*, 2004).

Στα διακοσμητικά ψάρια το ενδιαφέρον για το χρώμα είναι μια σημαντική παράμετρος. Σημαντικό ρόλο για την παραγωγή επιτυχημένων σειρών διαγονιδιακής ζέβρας διαδραματίζει ο προαγωγέας (Gong *et al.*, 2000). Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς προαγωγείς ειδικών ιστών όπως Gata-3, Gata-1, zebra a και b actin κτλ., η πρωτεΐνη χρώματος μπορεί να στοχευθεί μέσα σε διαφορετικούς ιστούς η σημεία του σώματος.

Στα συγκεκριμένα πειράματα ο προαγωγέας που χρησιμοποιήθηκε έδωσε πετυχημένα αποτελέσματα, αντίθετα σε άλλες προσπάθειες με διαφορετικούς προαγωγείς δεν επιτεύχθηκαν θετικά αποτελέσματα. Διαφορετικές ποικιλίες από πρότυπους χρωματισμούς, μπορεί να επιτευχθούν από διαφορετικούς συνδυασμούς των προαγωγέων ειδικών ιστών και της πρωτεΐνης (Blake *et al.*, 2001). Επιπλέον η φθορίζον πρωτεΐνη είναι πιο εύκολο να μεταφερθεί σε άλλα χρήσιμα στελέχη μαζί με τα ίδια είδη, με στάνταρ γενετική αναπαραγωγή για περισσότερες ποικιλίες από φθορίζον διαγονιδιακά ψάρια.

Άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η επιλογή των ιστών. Ο μυς συνίσταται κυρίως απ το σώμα και έτσι συνθέτεται περισσότερο και είναι ορατή η πρωτεΐνη χρώματος. Οι ιχθυοκαλλιέργειες διακοσμητικών ψαριών πραγματοποιούνται σε μικρό και ιδανικό περιβάλλον και τα περισσότερα από αυτά τα ψάρια δεν μπορούν να επιβιώσουν στην φύση μετά από μεγάλη περίοδο εσωτερικής επιλογής και αναπαραγωγής (Melamed, 2002). Οι μελέτες αυτές αναγνωρίζουν ότι οι διαγονιδιακές ζέβρες δεν έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε ότι αφορά την επιβίωση και την αναπαραγωγή. Συνεπώς μπορούν να είναι λιγότερο επιβλαβής σε σχέση με οικολογικά και περιβαλλοντικά θέματα.

Κεφάλαιο 8

Συμπεράσματα

Η αυξανόμενη σημασία που παρουσιάζει η ζέβρα ως πρότυπο μοντέλο ψαριού λόγω της χρησιμοποίησής της σε βασικά πειράματα έρευνας σχετικά με την ανάπτυξη της εκτροφή της σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

Έρευνες δεκαετιών εστίασαν και συνεχίζουν να εστιάζουν σε μεγάλο ποσοστό σχετικά με τη βιολογία του είδους, την εκτροφή (συνθήκες εκτροφής), τη διατροφή, την αναπαραγωγική δραστηριότητα, τη συμπεριφορά και τις απαιτήσεις του είδους σε ότι αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού.

Η ολοκληρωμένη κατανόηση του είδους στο σύνολό του, χρησιμεύει στη βελτίωση διαχείρισης της δυνατότητας της αναπαραγωγής, αυξάνοντας την απόδοση και την ικανοποιητική διαβίωση του είδους σε μια μελλοντική έρευνα που θα σχετίζεται με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος εκτροφής του είδους.

Abstract

The zebra (*Danio rerio*) has recently emerged as a pre-eminent vertebrate biomedical research model. The same favorable characteristics that have contributed to its popularity as a model of human disease and development; i.e. high fecundity, small size, rapid generation time, optical transparency during early embryogenesis, have also long endeared it to investigators in numerous other disciplines, including animal behavior, fish physiology, and aquatic toxicology. Despite this, the scientific rigour of zebra husbandry techniques is poorly developed. While there is a considerable body of literature on zebra that has both direct and indirect relevance to their husbandry, this information is from disparate sources, and little of it has been applied to developing standard protocols. This study is an attempt to integrate the available scientific information related to zebra biology and culture into an overview of the field that can be used to improve the efficiency with which this important model animal is used in research. The review also highlights those areas in which further studies are needed.

Keywords: Ζέβρα; *Danio rerio*; Husbandry; Aquaculture; Management

Κεφάλαιο 9

Βιβλιογραφία

A. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Alabaster, J.S., Lloyd, R., 1980. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworth. 297 pp. Apanius, V., Penn, D., Slev, P.R., Ruff, L.R., Potts, W.K., 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex. Crit. Rev. Immunol. 17, 179–224.
- Arnold, K.F., 2000. Kin recognition in rainbowfish (*Melanotaenia eachamensis*): sex, sibs and shoaling. Behav. Ecol. Sociobiol. 48,385–391.
- Bagatto, B., Pelster, B., Burggren, W.W., 2001. Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. J. Exp. Biol. 204, 4335–4343.
- Barman, R.P., 1991. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap. 137, 1–91.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis. 1, 3–26.
- Bennett, W.A., Beitenger, T.L., 1997. Temperature tolerance of the sheepshead minnow *Cyprinodon variegates*. Copeia 1997, 77–87.
- Bhat, A., 2003. Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. Environ. Biol. Fishes 68, 25–38.
- Biga, P.R., Goetz, F.W., 2006. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate versus indeterminate growth as determined by morphometric analysis. Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol. 291, R1327–R1337.
- Billard, R., 1995. Carp: Biology and Culture. Springer-Praxis, Chichester, U.K. 342 pp.
- Bloom, H.D., Perlmutter, A., 1974. A sexual aggregating pheromone system in the zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Exp. Zool. 199, 215–226.
- Boëchat, I.G., Adrian, R., 2006. Evidence for biochemical limitation of population growth and reproduction of the rotifer *Keratella quadrata* fed with freshwater protists. J. Plankton Res. 28, 1027–1038.

- Boisen, A.M.Z., Amstrup, J., Novak, I., Grosell, M., 2003. Sodium and chloride transport in soft and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 207–218.
- Boyd, C.E., 1979. *Water Quality in Warmwater Fish Ponds*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama. 359 pp.
- Brand, M., Granato, M., Nüsslein-Volhard, C., 2002. Keeping and raising zebrafish. In: Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R. (Eds.), *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 7–37.
- Breder, C.M., Rosen, D.E., 1966. *Modes of Reproduction in Fishes*. The Natural History Press, New York. 941 pp.
- Bromage, N.R., Shepherd, C.J., Roberts, J., 1988. Farming systems and husbandry practice. In: Shepherd, C.J., Bromage, N.R. (Eds.), *Intensive Fish Farming*. BSP Professional, Oxford, pp. 94–95.
- Brown, D.D., 1997. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13011–13016.
- Bryant, P.L., Matty, A.J., 1980. Optimisation of *Artemia* feeding rate for carp (*Cyprinus carpio L.*) larvae. *Aquaculture* 21, 203–212.
- Bryant, P.L., Matty, A.J., 1981. Adaptation of carp (*Cyprinus carpio L.*) larvae to artificial diets. Optimum feeding rate and adaptation age for commercial diet. *Aquaculture* 23, 275–286.
- Buttner, J.K., Soderberg, R.W., Terlizzi, D.E., 1993. An introduction to water chemistry in freshwater aquaculture. *Northeastern Regional Aquaculture Center Fact Sheet*, vol. 70.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161–180.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267.
- Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canadian Council on Animal Care (CCAC) Vol. 2. 1984, 208 pp. Ottawa. Ontario: Canadian Council on Animal Care (Available from CCAC, 1105-151 Slater Street, Ottawa, Ontario K1P 5H3, Canada).

- Carvalho, A.P., Araujo, L., Santos, M.M., 2006. Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical, and a purified starter diet on larval performance. *Aquac. Res.* 37, 1107–1111.
- Chen, L., Nartnich, R.L., 1975. Pheromonal stimulation and metabolite inhibition of ovulation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Fish.*, B 73, 889–893.
- Chen, Y.-Y., Lu, F.-I., Hwang, P.-P., 2003. Comparisons of calcium regulation in fish larvae. *J. Exp. Zool.* 295A, 127–135.
- Cortemeglia, C., Beitinger, T.L., 2005. Temperature tolerances of wildtype and red transgenic zebra danios. *Trans. Am. Fish. Soc.* 134, 1431–1437.
- D'Abramo, L.R., 2002. Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México, pp. 143–151.
- Dabrowski, K.R., 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 639–655.
- Dahm, R., Geisler, G., 2004. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar. Biotechnol.* 8, 329–345.
- Daniels, R.J.R., 2002. *Freshwater Fishes of Peninsula India*. Universities Press, Hyderabad.
- Darrow, K.O., Harris, W.A., 2004. Characterization and development of courtship in zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish* 1, 40–45.
- Diekmann, M., Nagel, R., 2005. Different survival rates in zebrafish (*Danio rerio*) from different origins. *J. Appl. Ichthyol.* 21, 451–454.
- Dutta, S.P.S., 1993. Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu. *J. Freshw. Biol.* 5, 165–168.
- Eaton, R., Farley, R.D., 1974. Spawning cycle and egg production in zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in the laboratory. *Copeia* 1, 195–204.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531.

- Engeszer, R., Ryan, M.J., 2004. Learned social preference in zebrafish. *Curr. Biol.* 14, 881–884.
- Fishman, M.C., 2001. Genomics. Zebrafish—the canonical vertebrate. *Science* 294, 1290–1291.
- Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social fish. *J. Neurosci.* 17, 6463–6469.
- Francis, R.C., 1984. Experimental effects on agonistic behavior in the paradise fish, *Macropodus operculatus*. *Behaviour* 85, 292–313.
- Gerhard, G.S., Kauffman, E.J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J.L., Kasales, C.J., Demidenko, E., Cheng, K.C., 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 37, 1055–1068.
- Gerlach, G., 2006. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Anim. Behav.* 72, 1119–1124.
- Gerlach, G., Lysiak, N., 2006. Kin recognition in zebrafish based on phenotype matching. *Anim. Behav.* 71, 1371–1377.
- Godwin, J., Luckenbach, J.A., Borski, R.J., 2003. Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evol. Dev.* 5, 40–49.
- Goolish, E.M., Okutake, K., 1999. Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air–water interface. *J. Fish Biol.* 55, 1054–1063.
- Goolish, E.M., Evans, R., Max, R., 1998. Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*. *Prog. Fish-Cult.* 60, 127–132.
- Goolish, E.M., Okutake, K., Lesure, S., 1999. Growth and Survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets. *N. Am. J. Aquac.* 61, 189–198.
- Gratton, P., Allegrucci, M., Fortunato, C., Ferreri, F., Sbordoni, V., 2004. Allozyme and microsatellite genetic variation in natural samples of zebrafish, *Danio rerio*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42, 54–62.
- Hawkins, W.E., Clark, M.S., Shima, A., Walter, R.B., Winn, R.N., Westerfield, M., 2001. Four resource centers for fishes: species, stocks, and services. *Mar. Biotechnol.* 3, S239–S248.
- Haywood, G.P., 1983. Ammonia toxicity in teleost fish: a review. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1177, 1–35.
- Helfman, G., Collette, B., Facey, D., 1997. *The Diversity of Fishes*. Blackwell Science, Malden, MA. 528 pp.

- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86, 6–19.
- Hisoaka, K.K., Firlit, A.F., 1962a. Ovarian cycle and egg production in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Copeia* 4, 788–792.
- Hisoaka, K.K., Firlit, C.F., 1962b. Ovarian cycle and egg production in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia* 4, 788–792.
- Holmberg, A., Schwerte, T., Pelster, B., Holmgren, S., 2004. Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J. Exp. Biol.* 207, 4085–4094.
- Hughes, K.A., Du, L., Rodd, F.H., Reznick, D.N., 1999. Familiarity leads to female mate preference for novel males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Anim. Behav.* 58, 907–916.
- Jardine, D., Litvak, M.K., 2003. Direct yolk sac volume manipulation of zebrafish embryos and the relationship between offspring size and yolk sac volume. *J. Fish Biol.* 63, 388–397.
- Jekosch, K., 2004. The zebrafish genome project: sequence analysis and annotation, *The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics*, 2nd ed. *Methods Cell Biol.*, vol. 77, pp. 225–239.
- Jobling, M., 1995. Simple indices for the assessment of the influences of social environment on growth performance, exemplified by studies on Arctic charr. *Aquac. Int.* 3, 60–65.
- Kelsch, S.W., Neill, W.H., 1990. Temperature preference versus acclimation in fishes: selection for changing metabolic optima. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119, 601–610.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A., 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquac. Int.* 5, 527–536.
- Krueger, W.H., Oliveira, K., 1999. Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environ. Biol. Fishes* 55, 381–389.
- Laale, H., 1977. The biology and use of zebrafish *Brachydanio rerio* in fisheries research: a literature review. *J. Fish Biol.* 10, 121–173.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Juryneć, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore,

- J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M., O'donnell, D., Kittles, R., Parra,E.J., Mangini, N.J., Grunwald, D.J., Shriver, M.D., Canfield, V.A.,Cheng, K.C., 2005. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310, 1782–1786.
- Larson, E.T., O'Malley, D.M., Melloni, R.H., 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.
- Lawrence, C., Ebersole, J.E., Kesseli, R.V., in press. Rapid growth and outcrossing promotes female development in zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Biol. Fishes* (Electronic publication ahead of print, [doi:10.1007/s10641-007-9195-8](https://doi.org/10.1007/s10641-007-9195-8)).
- Lavens, L., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 361. FAO, Rome, 295 pp.
- Lee, S.M., Cho, S.H., Kim, D.J., 2000. Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquac. Res.* 31, 917–921.
- Lewis, W.M., Moriss, D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fish Soc.* 115, 183–195.
- Lim, C.E., Webster, C.D. (Eds.), 2006. *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition. Complete Book*. Haworth Press, Binghamton, NY. 703 pp
- Lindsay, S.M., Vogt, R.G., 2004. Behavioral responses of newly hatched zebrafish (*Danio rerio*) to amino acid chemostimulants. *Chem. Senses* 29, 93–100.
- Lochman, R., Phillips, H., 1996. Nutrition and feeding of baitfish. *Aquac. Mag.* 4, 87–89.
- Mann, K.D., Turnell, E.R., Atema, J., Gerlach, G., 2003. Kin recognition in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) based on olfactory cues. *Biol. Bull.* 205, 224–225.
- Masser, M.P., Rakocy, J., Losordo, T., 1999. Recirculating aquaculture tank production systems: management of recirculating systems. Southern Regional Aquaculture Publication, vol. 452.
- Matthews, M., Trevarrow, B., Matthews, J., 2002. A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Anim.* 31, 34–40.

- McCann, L.I., Koen, D.J., Kline, N.J., 1971. The effects of body size and body markings on non-polarized schooling behavior in zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Psychol.* 79, 71–75.
- McCarthy, I.D., Carter, C.G., Houlihan, D.F., 1992. The effect of feeding hierarchy on individual variability in daily feeding of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 41, 257–263.
- McClure, M.M., McIntyre, P.B., McCune, A.R., 2006. Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 69, 553–570.
- McElligott, M.B., O'Malley, D.M., 2005. Prey tracking by larval zebrafish: axial kinematics and visual control. *Brain Behav. Evol.* 66, 177–196.
- Meinelt, T., Schultz, C., Worth, M., Kurzinger, H., Steinberg, C., 1999. Dietary fatty acid composition influences the fertilization rate of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanon). *J. Appl. Ichthyol.* 15, 19–23.
- Meinelt, T., Schultz, C., Worth, M., Kurzinger, H., Steinberg, C., 2000. Correlation of diets high in n6-polyunsaturated fatty acids with high growth rate in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Med.* 50, 43–45.
- Menon, A.G.K., 1999. Check list — fresh water fishes of India. *Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap.* 175 (366), 234–259.
- Miklosi, A., Andrew, R.J., 2006. The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish* 3, 227–234.
- Moren, M., Opstad, I., van Der Meeren, T., Hamre, K., 2006. Iodine enrichment of *Artemia* and enhanced levels of iodine in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed the enriched *Artemia*. *Aquac. Nutr.* 12, 97–102.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., Nüsslein-Volhard, C., 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* 4, 189–202.
- Munro, A.D., 1990. Tropical freshwater fishes. In: Munro, A.D., Scott, P., Lam, T.J. (Eds.), *Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145–239.
- National Research Council, 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC. 128 pp.

- Niimi, A.J., LaHam, Q.M., 1974. Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 52, 515–517.
- Önal, U., Langdon, C.J., 2000. Characterization of twomicroparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquac. Nutr.* 6, 159–170.
- Pack, M., Solnica-Krezel, L., Malicki, J., Neuhauss, S.C., Schier, A.-F., Stemple, D.L., Driever, W., Fishman, M.C., 1996. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development* 123, 321–328.
- Payne, A.I., Sinha, R., Singh, H.R., Huq, S., 2003. A review of the Ganges Basin: its fish and fisheries. In: Welcome, R.L., Petr, L. (Eds.), *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries*. FAO Volume 1. RAP Publication 2004/16. FAO, Rome.
- Penberthy, W.T., Shafizadeh, E., Lin, S., 2002. The zebrafish as a model for human disease. *Front. Biosci.* 7, 9–1453.
- Pickering, A.D., 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125–139.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.* 32, 701–712.
- Place, S.P., Hofmann, G.E., 2001. Temperature interactions of the molecular chaperone Hsc70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 204, 2675–2682.
- Popma, T., Masser, M., 1999. *Tilapia: life history and biology*. Southern Regional Aquaculture Center Publication, vol. 283. Stoneville, MS, 4 pp.
- Pottinger, T.G., Pickering, A.D., 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.* 41, 435–447.
- Pritchard, V.L., Lawrence, J., Butlin, R.K., Krause, J., 2001. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Anim. Behav.* 62, 1085–1088.
- Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *N. Am. J. Aquac.* 61, 91–96.

- Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H., 1982. The biology and culture of tilapias. The International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM) Conference Proceedings, vol. 7. ICLARM, Manila, Philippines.
- Rahman, A.K.A., 1989. Freshwater fishes of Bangladesh. Zoological Society of Bangladesh, Department of Zoology, University of Dhaka, 364 pp.
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Matthews, J.L., Westerfield, M., Varga, Z.M., Kent, M.L., Schreck, C.B., 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 258, 565–574.
- Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J., 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquac. Res.* 33, 777–784.
- Sales, J., Janssens, G.P.G., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquat. Living Resour.* 533–540.
- Sawant, M.S., Zhang, S., Li, L., 2001. Effect of salinity on the development of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Curr. Sci. India* 81, 1347–1350.
- Schaefer, J., Ryan, A., 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 69, 722–734.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* 218, 203–224.
- Shrestha, T.K., 1990. Resource ecology of the Himalayan waters. Curriculum Development Centre, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal. 645 p.
- Sinha, V.R.P., 1985. Spawning of cultivated finfish in Asia and Far East. In: Dhauli, Kausalyagang, P.O. (Eds.), *Lecture Notes on Composite Fish Culture and its Extension in India*. Freshwater Aquaculture Research and Training Centre, FAO Project Report Document AC229/E.
- Spence, R., Smith, C., 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 69, 1317–1323.
- Spence, R., Smith, C., 2006a. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behav. Ecol.* 17, 779–783.
- Spence, R., Smith, C., 2006b. Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front. Zool.* 3, 5.

- Spence, R., Runa, K.F., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, Z.F., Smith, C., 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *J. Fish Biol.* 69, 1435–1448.
- Spence, R., Runa, K.F., Ellis, S., Ahmed, Z.F., Smith, C., in press. The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *J. Fish Biol.*
- Spence, R., Ashton, R., Smith, C., accepted for publication. Adaptive oviposition choice in the zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour*.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., in review. The behaviour and ecology of the zebrafish (*Danio rerio*).
- Stohler, R.A., Curtis, J., Minchella, D.J., 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 34, 595–601.
- Sumanasa, S., Lin, S., 2004. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discov. Today Targets* 3, 89–96.
- Suomalainen, L.-R., Tiirola, M.A., Valtonen, E.T., 2005. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 28, 271–277.
- Talwar, P.K., Jhingran, A.G., 1991. *Inland Fishes of India and Adjacent Countries*. A.A. Balkema, Rotterdam. 1158 pp.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., Wheaton, J.M., Summerelt, S.T., Vinci, B.J. (Eds.), 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*, 2nd ed. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, N.Y. 757 pp.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J.G., Dick, J.R., Teale, A.J., 2001. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 309–320.
- Tort, L., Sunyer, J.O., Gomez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 178–188.
- Tucker, C.S., Robinson, E.H., 1990. *Channel Catfish Farming Handbook*. Van Nostrand Reinhold, New York. 454 pp.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450

- aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 11–20.
- Van den Hurk, R., Lambert, J.G.D., 1983. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 61, 2381–2387.
- Van den Hurk, R., Resink, J.W., 1992. Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 261, 204–213.
- Van den Hurk, R., Schoonen, W.G., van Zoelen, G.A., Lambert, J.G., 1987. The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 179–188.
- Vijayan, M.M., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.* 124, 311–318.
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 3–15.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34, 115–145.
- Wedemeyer, G.A., 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman & Hall, New York. 232 pp.
- Westerfield, M., 1995. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3rd edition. University of Oregon Press, Eugene, OR. 385 pp.
- Wilkie, M.P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fishgills: present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 293, 284–301.
- Wootton, R.J., 1998. *The Ecology of Teleost Fishes*, 2nd edition. Chapman and Hall, London. 404 pp.
- Wurts, W.A., 1993. Understanding water hardness. *World Aquac.* 24, 1–18.
- Wurts, W.A., 2002. Alkalinity and hardness in production ponds. *World Aquac.* 33, 16–17.

B. Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

www.glofish.com

www.zebrafishtank.com

www.plosgenetics.org