

Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra

A. Rocha, S. Ruiz, J.M. Coll *

Dpto. Biotecnología, SGIT-INIA, Crta. Coruña, km 7, Madrid, España
coll@inia.es

RESUMEN

En este trabajo se describe un método sencillo para la obtención de unos 200 huevos embrionados con una supervivencia mayor del 70 % por cada 20 peces cebra, 2 veces por semana, con una mínima dedicación de 1 hora por día por persona. El método consiste en utilizar 3 acuarios diferentes, uno más pequeño para los peces con una malla en el fondo, uno para alimentación y otro para la puesta. Cada noche los peces se pasan del acuario de alimentación al acuario de puesta, permitiendo así una mayor limpieza para evitar la contaminación de los huevos. Por la mañana se recogen los huevos mediante contenedores de vidrio en el fondo de los acuarios de puesta y después de su inmediata desinfección se distribuyen individualmente en placas de 96 pocillos durante los primeros 5 días para reducir mortalidades. Este método permite la experimentación de transferencia de genes simultánea en masa y un análisis individualizado de los posibles peces transgénicos con una mínima dedicación.

Palabras clave: reproducción, huevos embrionados, peces cebra.

INTRODUCCIÓN

Los peces ofrecen la ventaja de su enorme capacidad de producción de huevos por hembra comparado con los mamíferos para la obtención de animales transgénicos. Si a esta producción se añadieran métodos en masa para la transfección-transformación que sustituyeran la actual inyección de huevos uno a uno, podríamos acercarnos a la tecnología de plantas que permite obtener miles de transgénicos para seleccionar aquellos mejor adaptados a la necesidad que se busca. Para desarrollar métodos paralelos en peces, se necesita investigar en especies modelo cuya producción de huevos sea lo más simplificada posible.

* Autor para correspondencia

Recibido: 8-5-02

Aceptado para su publicación: 24-7-02

Hasta ahora, uno de los peces modelo más estudiados y en los que se ha desarrollado gran parte de la investigación básica en biología-genética molecular de vertebrados, es el pez tropical de agua dulce *Danio rerio* o pez cebra de la familia Cyprinidae (Detrich *et al.*, 1999; Westerfield, 1995). Por ejemplo, es uno de los modelos en los que se avanza en las aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Coll, 2001; Ivics *et al.*, 1997; Izsvak *et al.*, 1997) y es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio).

Además de ser uno de los peces más estudiados, entre las ventajas del pez cebra están su potencial reproductivo de entre 100 y 200 huevos por hembra (500-600 μ de diámetro por huevo), su fecundación y desarrollo externos que en 2 días da lugar a un nuevo pez, sus embriones transparentes, su pequeño tamaño (4-5 cm) que permite mantener 25 peces en unos 45 l de agua y su corto tiempo de madurez sexual (unos 5-6 meses).

Sin embargo, es trabajoso conseguir niveles reproducibles de producción de huevos cuando se utilizan pequeñas poblaciones (~ 20 peces cebra) de reproductores (Oberemm, 2000a) comparado con instalaciones de miles de peces (Brand *et al.*, 1998). Ello es debido al nivel de estrés que les suponen a los peces los métodos más utilizados para su reproducción a pequeña escala: mantener machos y hembras separados, capturarlos cada vez, mantenerlos por las noches en pequeñas parideras (un macho y 2-3 hembras), volver a separarlos y volver a comenzar el ciclo (Bilotta *et al.*, 1999; Gestl y Cheng, 1998; Westerfield, 1995). La cantidad de contaminación (heces, partículas, etc.) que se acumula tanto en las parideras como en los acuarios en los que estas se colocan hacen difícil la descontaminación de los embriones, lo que provoca altas mortalidades mayormente debidas a hongos (McGowan, 2001). Por otra parte, una vez desinfectados, la manipulación de los embriones y el seguimiento de su evolución, es difícil de cuantificar cuando estos se mantienen juntos (Oberemm, 2000a). Todo ello lleva aparejado una considerable inversión en tiempo y personal.

Para paliar estos problemas y después de varios años de experimentación tratando de simplificar al máximo el método para obtener huevos embrionados de pez cebra, se describe aquí un procedimiento sencillo basado en la utilización de 2 acuarios, uno para la alimentación diaria y otro para la puesta y recogida de huevos embrionados. La producción de huevos y su supervivencia son óptimas para una dedicación mínima, por lo que ya se está utilizando para la investigación de métodos de transfección en masa y aplicación de selección de embriones transgénicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mantenimiento de peces cebra adultos. Se utilizaron 2 acuarios de vidrio (Fig. 1). Uno para la alimentación diaria (acuario 2) y otro para la puesta-recogida de huevos embrionados (acuario 1), en el que se colocó en el fondo 4 contenedores de vidrio (23,7 $\times$ 5,8 $\times$ 7 cm) para recoger los huevos. El nivel del agua del acuario 1 se mantiene unos 10 cm por encima de los contenedores de vidrio para disminuir la predación de los huevos por los adultos durante la puesta y mientras caen al fondo de los contenedores. El nivel del agua del acuario 2 se deja a unos 10 cm del borde del acuario para evitar que los peces salten fuera y mantener un acceso sencillo a los acuarios sin necesidad de taparlos.

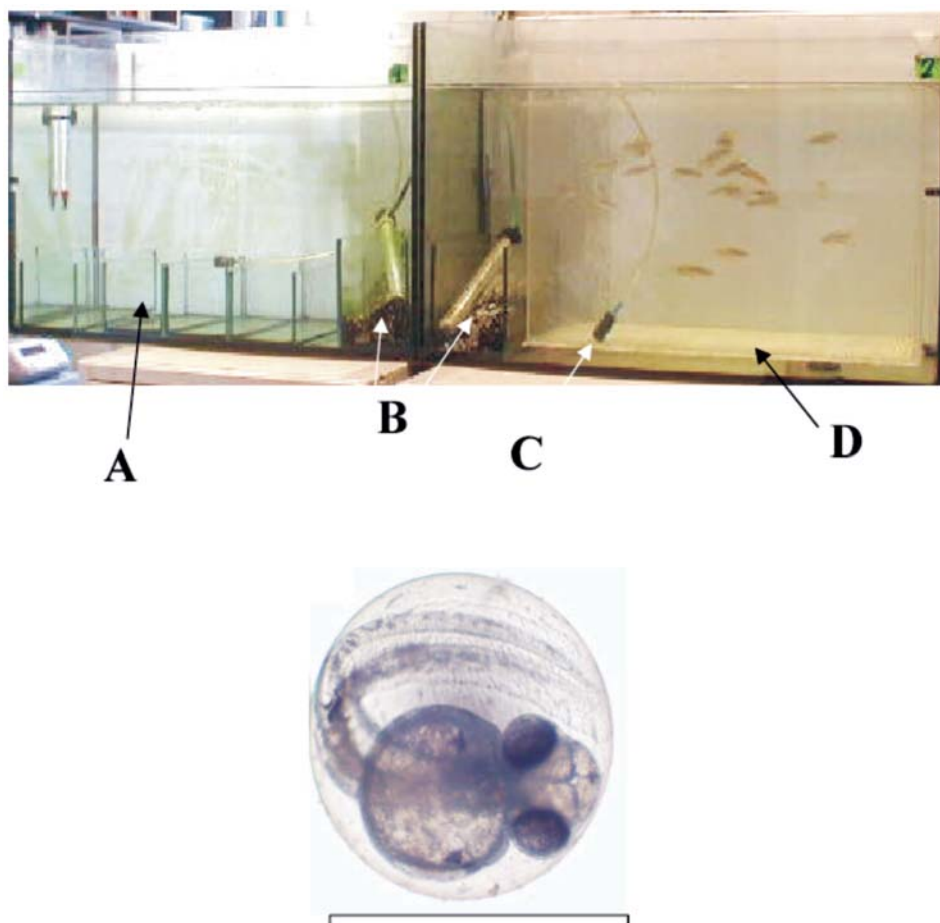


Fig. 1.—Fotografía de los 2 acuarios y un embrión de pez cebra de 2 días

El acuario número 1 (izquierda) se emplea para la puesta y el acuario número 2 (derecha) para la alimentación. A, contenedores de vidrio para recoger los huevos. B, filtros con termostatos. C, difusores para aire comprimido. D, malla de 4 × 4 mm para separar los huevos. La fotografía de abajo muestra un pez cebra de 2 días, tomada antes de romper el corión. El rectángulo horizontal señala 1 mm.

Los acuarios de vidrio se llenaron con agua de grifo de Madrid (decolorada con tiosulfato sódico) con $\sim 100\text{--}200\ \mu\text{S}$ de conductividad, pH 7,4–7,6 y a una temperatura de $28 \pm 1\ ^\circ\text{C}$ (mantenida con termostatos). Un cuarto del agua del acuario se cambia por agua del grifo semanalmente, añadiendo 50 μl de 250 g/l de tiosulfato sódico para eliminar el cloro. Los 2 acuarios de vidrio de 30 litros (30 × 25 × 50 cm) estaban provistos de filtros internos con arena especial para acuarios de 90 % sílice, 10 % feldespato, pH 7,0 (Carlos

Carretero, Ugena, Toledo) y carbón activo colocados en contenedores de vidrio ($23,7 \times 7,8 \times 7$ cm) sumergidos y provistos de un tubo para el flujo de aire (*airlift*) con un compresor comercial Jena (Fig. 1). Para las pruebas con arena caliza en los filtros se utilizaron arenas especiales para acuarios marinos (Carlos Cantero, Ugena, Toledo). Un difusor conectado al compresor comercial para acuarios se utiliza para aireación suplementaria.

Se obtuvieron lotes de 20 adultos de 3-4 cm (Acuario Zoo Casa, Madrid). Los adultos se mantuvieron en acuarios de metacrilato de $22 \times 25 \times 37$ cm con fondo de malla de plástico de 4×4 mm introducidos en los acuarios de vidrio y separados del fondo por los contenedores de vidrio. Se les alimentó 3 veces al día excepto 2 días a la semana, mañana y tarde con comida seca de escamas para peces de acuario (Nutrafin tropical, ICA) y al mediodía con larvas de mosquito rojo (*Chironomido*) congeladas (VanGerven, Netherlands). También se utilizó *artemia salina* adulta congelada (Van Gerven, The Netherlands). Los desechos de comida se retiraron diariamente y los cristales de los acuarios se limpiaron todos los días.

Puesta y desinfección de los huevos embrionados. Para inducir la puesta, la iluminación se mantuvo por encima de los acuarios con ciclos de 14 h de iluminación, 10 horas de oscuridad con 2 lámparas de 11 vatios FLC. Las lámparas se situaron a 35,8 cm del fondo de los acuarios con una intensidad en el fondo/superficie del agua del acuario 2 de alimentación de 700/1.000 ó 3.000/8.000 luxes (Light meter, Extech Instruments, Huco-Erloss, Madrid, España). El comienzo de la iluminación se mantuvo simultáneo con el amanecer natural.

Todas las tardes, excepto 3 días por semana, el acuario interior de metacrilato que contenía los adultos, se pasó del acuario de alimentación 2 al 1. Al amanecer, el acuario de metacrilato con los peces adultos se pasó a los acuarios de alimentación 2 y los contenedores se sacaron del acuario para lavarlos y desinfectar los huevos. Para los experimentos con parideras se utilizaron parideras flotantes de $15 \times 10 \times 10$ cm para ovíparos (ICA: 2×1 con tapa, Acuario Zoo Casa, Madrid).

Los huevos se recogieron con una pipeta de vidrio cortada y pulida de un diámetro de ~ 2 mm. Se desinfectaron por lavado 3 veces en MBS (88 mM ClNa, 1 mM ClK, 1 mM MgSO_4 , 2,5 mM CO_3HNa , 7 mM Cl_2Ca , 5 mM HEPES, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina y 2 $\mu\text{g/ml}$ fungizona, pH 7,4) con 0,2 $\mu\text{g/100 ml}$ de azul de metileno por decantación en tubos de vidrio de 10 ml y después 2 veces con MBS. Una vez desinfectados, se repartieron en placas de 96 pocillos (Costar, Madrid), 1 embrión por pocillo en 200 μl de MBS, se sellaron con papel transparente y se incubaron a 28 °C durante los primeros 5-6 días.

Alimentación de los alevines. Se realizó en acuarios 3 con filtros internos en los que se colocaron algas acuáticas. Para ello se mantuvieron varios acuarios provistos con filtro interno en los que se crecieron algas pluricelulares (*Cladophora sp*, *Microsorium sp*) y caracoles acuáticos (*Lymnaea sp*, *Helisoma sp*). También se utilizó una malla de plástico PVC de 1 mm colocada dentro del acuario para aumentar la superficie donde puedan crecer los protozoos.

Una vez por semana se añadieron 100 mg de comida seca de acuario. Una vez al mes se añadió 1 ml de yema de huevo batida como fuente de vitaminas. A los 2-3 meses en estos acuarios se desarrollaron abundantes protozoos y rotíferos que pueden observarse tomando muestras al microscopio y que sirvieron después de alimento a los alevines. En la malla de plástico crecieron abundantes protozoos sésiles como *Vorticela* y *Stentor*. La malla de plástico puede secarse y añadirse a los acuarios cuando se crea oportuno. Después de depositar los embriones de más de 5 días en el acuario, durante el primer mes y 2

veces al día se añadieron unos 50 mg de micro alimento seco especial para pez cebra (2M-000-2M-100, Zebrafish Management, Hampshire, England), suplementado con migas secas para primeros alevines de trucha (Trown, Burgos, España).

RESULTADOS

Experimentos con parideras comerciales. Los primeros experimentos se hicieron con parideras comerciales, utilizando un macho y 3 hembras y manteniendo machos y hembras separados en distintos acuarios. Entre las dificultades encontradas se pueden citar: lo trabajoso de capturar unos peces tan vivaces, la dificultad de distinguir con seguridad machos de hembras y el irreproducible porcentaje de puesta estimado en un 7,5 % del total de intentos (tabla 1).

Tabla 1

Comparación de la frecuencia de puesta, número de huevos por puesta y supervivencia embrionaria entre parideras y acuarios de metacrilato

Parámetro	Parideras	Acuarios metacrilato	
		700 luxes	3.000 luxes
Frecuencia de puesta, %	7,5 (80)	5,4 (129)	27,4 (51)
Número de huevos/puesta	125,7 ± 24 (10)	98,7 ± 9,4 (7)	132 ± 18,6 (14)
Supervivencia embrionaria, %	5-20	50-60	50-60

El porcentaje de frecuencia de puesta se calculó según la formula: número de puestas/número de intentos × 100, siendo n el número de intentos entre paréntesis. Después de recoger los huevos, el número de huevos totales por puesta se contó siendo n el número de puestas contadas. Los resultados son la media y desviaciones standard. La supervivencia embrionaria se da en rangos expresados en porcentajes según la formula: número de embriones supervivientes a los 6 días después de la puesta/número de embriones el día de la puesta × 100.

Después se utilizaron varios métodos en los que machos y hembras se mantenían juntos en un acuario y se separaban cada atardecer en parideras 6-8 animales al azar. Seguía siendo trabajoso el capturarlos cada día y el porcentaje de puesta seguía siendo bajo.

Utilización de 2 acuarios independientes para alimentación y puesta. Se utilizó para la puesta un método modificado del descrito por McGowan (McGowan, 2001) que separa los acuarios de alimentación de los de puesta y los peces se mantienen en un acuario de metacrilato con malla en el fondo (Fig. 1). El utilizar un acuario para comida diurna y otro acuario para la puesta nocturna, facilita la limpieza y descontaminación de los embriones. Además al estar todos los peces adultos en un acuario de metacrilato con fondo perforado no hay que capturarlos. De esta manera se minimiza el estrés de los peces y al estar en un mayor volumen de agua que en las parideras, están más activos.

Después de varias experiencias preliminares, modificamos el método McGowan, añadiendo 5 contenedores de vidrio al fondo del acuario de puesta, con lo que la limpieza y la

recuperación de los huevos embrionados es más sencilla. Asimismo hubo que rebajar el nivel del agua del acuario de puesta a unos 10 cm por encima de los contenedores de vidrio, para que al disponer de menor espacio hasta el fondo de malla, los adultos tuvieran menos oportunidades de devorar los huevos recién puestos. Además el nivel del agua del acuario de alimentación se mantuvo a unos 10 cm del borde superior para evitar que los adultos saltaran fuera del acuario y para mantener la parte superior del acuario abierta y facilitar las manipulaciones.

Fue importante además, no introducir las tradicionales piedras calizas en los filtros, puesto que aumentaron a 800-1.000 μS la conductividad del agua e inhibieron las puestas. Por otra parte, se utilizó un régimen de alimentación que evitara la necesidad de la comida viva, debido al trabajo adicional que representa. La alimentación con comida seca en escamas y gusanos *Chironomido* congelados, dieron buen resultado. La alimentación con *artemia salina* adulta congelada tuvo que descartarse debido a que provocaban una gran acumulación de desechos y contaminación por hongos, lo que exigía un mayor trabajo de limpieza de los acuarios.

En los primeros ensayos, los peces ponían raras veces a pesar de que las hembras aparecían repletas de huevos tal y como se podía demostrar por disección. Aunque la luz se reconoce como un factor decisivo para la reproducción del pez cebra, sin embargo, no se menciona la intensidad lumínica necesaria para que su reproducción alcance un nivel reproducible. La figura 2 muestra el aumento de la frecuencia de puesta del 5,4 al 27,4 % (tabla 1) con el aumento de radiación lumínica desde 700 a 3000 luxes en los mismos peces, en los mismos acuarios y con las mismas condiciones de calidad de agua, filtración, alimentación, etc.

Supervivencia de los embriones. Para poder efectuar las pruebas de transfección en trabajos posteriores, no sólo la puesta debe ser reproducible sino que también la super-

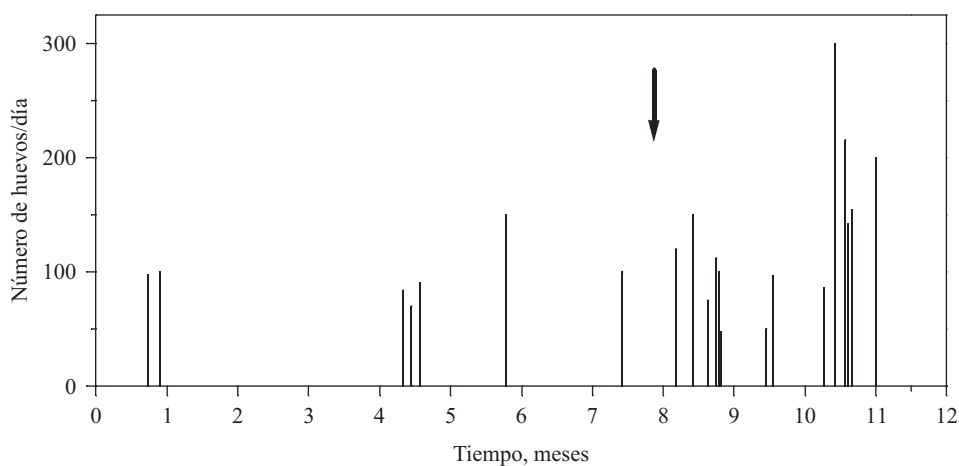


Fig. 2.—Frecuencia y volumen de puesta en función del tiempo y de la radiación lumínica

La radiación lumínica en el fondo del acuario, varió de 700 (antes de la flecha vertical) a 3.000 (después de la flecha vertical) luxes.

vivencia de los embriones debería ser máxima, al menos durante los primeros días después de la fecundación hasta que el embrión sea capaz de alimentarse (después de los 5-6 primeros días).

En los primeros experimentos, utilizando incubación de los embriones en pocillos de placas de 24 pocillos, no se conseguían porcentajes de supervivencia embrionaria a los 5-6 días mayores del 20 % debido al rápido aumento de la mortalidad después de unos días de incubación. Debido a que la mortalidad embrionaria correlacionaba con la proliferación tanto de bacterias como de hongos, se incluyeron antibióticos y antimicóticos en los medios salinos utilizados para el mantenimiento de embriones. Además se incluyó HEPES en la formulación salina para mejorar el control del pH. La figura 3 muestra los resultados de distintos tratamientos con azul de metileno para desinfectar los huevos y de antibióticos y antimicóticos durante los primeros días de desarrollo del embrión. Los embriones se lavaron, y desinfectaron con una viabilidad máxima a los 5-6 días del 60 % con una concentración óptima de 0,2 μg de azul de metileno por ml. La viabilidad pudo aumentarse si los embriones en vez de conservarse en grupos de 10-12 embriones por pocillo

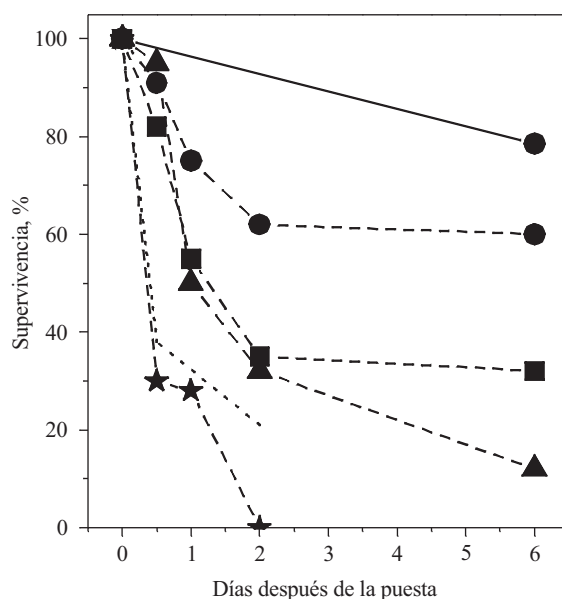


Fig. 3.—Supervivencia de los embriones de pez cebra en placas de 24 y 96 pocillos en distintas condiciones de desinfección

La puesta se desinfectó en presencia de varias concentraciones de azul de metileno (AzM) en MBS (88 mM ClNa , 1 mM ClK , 1 mM MgSO_4 , 2,5 mM CO_3HNA , 7 mM Cl_2Ca) modificado por la adición de 5 mM HEPES, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina y 2 $\mu\text{g/ml}$ fungizona. Después se lavaron en MBS modificado y se dispensaron 6 embriones por pocillo de placas de 24 pocillos por ml de MBS modificado, 6 pocillos por cada concentración de AzM, excepto los experimentos de 1 embrión por pocillo de placas de 96 pocillos por 200 μl de MBS modificado., no desinfectados. ★, desinfectados con 2 $\mu\text{g/ml}$ de AzM. ▲, desinfectados con 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de AzM. ■, desinfectados con 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de AzM. ●, desinfectados con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de AzM. ●—●, desinfectados con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de AzM y dispensados 1 embrión por pocillo en placas de 96 pocillos.

llo de placas de 24 pocillos se separaban uno a uno en pocillos de placas de 96 pocillos. La individualización precoz de los embriones evita que la mortalidad se extienda de unos a otros y hace que la viabilidad de los embriones aumente a casi un 80 %.

Crecimiento de los alevines. Su alimentación con alimento vivo, microalgas, paramecios y rotíferos es uno de los mayores problemas, debido a las posibilidades de contaminación bacteriana y al trabajo adicional que exige su cultivo y control. Después de varias pruebas de crecimiento de microalgas y paramecios, se diseñó un método más automático utilizando un acuario donde se criaron algas y caracoles acuáticos que evitaban la contaminación bacteriana.

Una vez que los alevines de más de 5 días se incorporaron al acuario, se añadieron no más de 50 mg de alimento seco, 2 veces por día por acuario evitando excesos y adecuando el tamaño y la cantidad a su consumo. A los 3 meses se obtuvo un 30-50 % de supervivencia de los alevines y los peces se cambiaron a un acuario nuevo para continuar su crecimiento otros 3-4 meses hasta la madurez sexual. La cantidad de alimento se ajustó a la demanda, retirando el alimento no consumido ya que afecta a la limpieza y salud de los peces.

La utilización de utensilios metálicos produjo alteraciones morfológicas en los embriones, por lo que hubieron de utilizarse tan sólo utensilios de plástico. No en vano el pez cebra se usa como un bioensayo de toxicidad acuática debido a su sensibilidad a estos cambios (Oberemm, 2000b).

DISCUSIÓN

Se han descrito métodos para reproducción del pez cebra que van desde las grandes escalas con capacidad para 7.000 acuarios de 0,2 a 1,5 litros (Brand *et al.*, 1998), pasando por sistemas de 160 acuarios de 1 l (Gestl y Cheng, 1998), hasta las más pequeñas escalas de 6 acuarios de 100 litros (Oberemm, 2000a) o de un par de acuarios de 30 litros (McGowan, 2001). Además varias casas comerciales venden sistemas compactos de acuarios para unos 1000 peces, tales como Aquatic Habitants (<http://www.aquatic.habitants.com/zebra/zebra.html>) y Aquatic Research Holding Systems (<http://www.marinebiotech.com/zebrafish.html>).

Sin embargo, todos estos métodos con excepción del descrito por McGowan requieren mano de obra intensiva para su mantenimiento. Para minimizar la dedicación manual y obtener puestas óptimas tanto en frecuencia como en cantidad y calidad de huevos, se ha adaptado el sistema de McGowan con variaciones en el diseño y recogida de los huevos, en el nivel de agua, en la iluminación y en la alimentación. Además se ha diseñado un método «extensivo» para alimentar a los alevines resultantes basado en la proliferación de protozoos en acuarios antes de añadir a ellos los alevines. Todo ello permite a una persona con una dedicación mínima diaria de 1 hora, producir 2 veces por semana suficientes huevos para realizar experimentos de transfección en masa.

La separación de machos y hembras, si bien es muy eficaz en cuanto a la inducción de la puesta y al control que se ejerce sobre los padres de la puesta y por lo tanto sobre la genética de sus descendientes, requiere un trabajo intensivo para capturar los peces y además les produce un fuerte estrés y a menudo heridas y contusiones. Para trabajos en los que no es necesario conocer exactamente la pareja de progenitores, es más sencillo mantener un número suficientemente alto de peces juntos de tal manera que haya una distribu-

ción aproximada de machos y hembras del 50 %. En este trabajo se ha utilizado unos 20 adultos por acuario de 30 l pero puede aumentarse su número a unos 60 por acuario de 30 l y mantener varias unidades de alimentación. De esta manera se reduce su manipulación al mínimo, lo que es mejor para los peces y además evita trabajo. Con estas modificaciones se podría obtener una puesta casi todos los días. Una sola persona y con una mínima dedicación diaria total de ~ 1 h puede encargarse de la limpieza de los acuarios, de la alimentación y del funcionamiento de la puesta. Manteniendo los peces en el acuario de alimentación toda la noche en oscuridad y transvasándolos al acuario de puesta por la mañana antes de amanecer o de encender la luz, podría inducirse la puesta en unos pocos minutos permitiendo obtener embriones de 1 célula (más útiles para transfección) y con una mayor limpieza, pues los peces no generan apenas desechos en esos minutos.

Tanto la iluminación, como el mantenimiento de una calidad de agua óptimas, han sido variables de importancia para mantener al máximo el nivel de puesta. Se demostró que en las mismas condiciones, un aumento de 5-8 veces en la intensidad de la iluminación hasta 3.000-8.000 luxes, contribuía eficazmente a la regularización de la puesta. De la misma manera cuando se utilizaron filtros con piedras de carbonato cálcico se inhibieron las puestas y se comprobó que la conductividad del agua había aumentado de 200 μ S a 800-1.000 μ S. Al sustituir las piedras calizas por silíceas, la conductividad se mantuvo en valores normales y las puestas comenzaron a ser más frecuentes.

Con el método descrito, se ha conseguido mantener baja la mortalidad embrionaria cuidando la buena alimentación de los adultos, una limpieza diaria de los acuarios, una separación de los acuarios de alimentación y puesta, una desinfección de los huevos, una utilización de antibióticos-antimicóticos en el medio de cultivo de los alevines durante los primeros días y sobre todo, manteniendo los embriones aislados unos de otros durante los primeros 5 días. Esto es así, debido a que se evita que al morir un embrión, genere proliferación bacteriana y contamine a los demás. Además, el análisis de la incorporación de un determinado transgén a un pez individual podrá hacerse así individual y rápidamente.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a J. Coll P. su mecanografía. Este trabajo fue financiado por los proyectos europeos FAIR CT98-4003 y CT98-4398, por los proyectos INIA, SC00046 y CPE03016C4 y por el proyecto ACUO1003 de la CICYT.

SUMMARY

Zebrafish simple reproduction

We describe here a simple method to obtain about 200 embrionated eggs per 20 fish, with more than 70 % survival, twice a week with a dedication of 1 hour per day per person. The method consists in 3 aquaria, the smallest for the fish with a mesh in the bottom, one for the feeding and the other for the spawning. Every night, the fish are changed from the feeding to the spawning aquarium thus allowing a greater cleaningless to avoid egg contamination. In the morning, the eggs are harvested in the bottom of the aquarium by glass containers, disinfected and individually distributed in wells of 96-well plates during the first 5 days to reduce mortalities. This method allows the research on simultaneous mass gene transfer and an individualized analysis of the possible transgenic fish with a minimal effort.

Key words: reproduction, embrionated eggs, zebrafish.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILOTTA J., SASZIK S., DELORENZO A.S., HARDESTY H.R., 1999. Establishing and maintaining a low cost zebrafish breeding and behavioral research facility. *Behaviour Research Methods, Instruments, Computers*. 31, 178-184.
- BRAND M., BEUCHLE D., ENDRES F., HAFFTER P., HAMMERSCHMIDT M., MULLINS M., SCHULTE-MERKER C., NUSSLEIN-VOLHARD R., LUCK R., JURGEN K., SCHWARZ S., 1998. Keeping and raising zebra fish (*Danio rerio*) in Tübingen. *Zebrafish Science Monitor*. 3, http://zfin.org/zf_info/monitor/vol3.5/4.html.
- COLL J.M., 2001. El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 16 (2), 237-244.
- DETRICH H.W., WESTERFIELD M., ZON L.I., 1999. The zebrafish: Biology, Genetics and Genomics. *Methods in Cell Biology*. Academic Press, N.Y. 59, 60.
- GESTL E.G., CHENG K.C., 1998. An economical zebrafish genetics facility. *Zebrafish Science Monitor*. 3, http://zfin.org/zf_info/monitor/vol3.6/2.html.
- IVICS Z., IZSVAK Z., HACKETT P.B., 1997. Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell*. 91, 501-510.
- IZSVAK Z., IVICS Z., HACKETT P.B., 1997. Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology*. 75, 507-523.
- MCGOWAN R.A., 2001. A low stress, high yield breeding trap for use with zebrafish *Danio rerio*. <http://www.neuro.uoregon.edu/k12/small%20operations.html>.
- OBEREMM A., 2000a. Keeping and breeding zebrafish (*Danio rerio*) on small scale. *The zebrafish science monitor*. 6, http://zfin.org/zf_info/monitor/vol16.11.html.
- OBEREMM A., 2000b. The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicology. *Laboratory animal*. 29, 32-40.
- WESTERFIELD M., 1995. The zebrafish book. Guide for laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 3rd.ed. In Univ.Oregon Press, Eugene, USA. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.