

Avel och upprätthållande av zebrafisk / Breeding and maintenance of zebrafish

Rekommendation Nr 11 / Guideline No. 11

Djurskyddsorganet vid Karolinska Institutet /
The Animal Welfare Body at Karolinska Institutet

Dnr 1-211/2023

Gäller fr.o.m. 2023-03-29



**Karolinska
Institutet**



Avel och upprätthållande av zebrafisk / Breeding and maintenance of zebrafish

Innehåll

Inledning.....	4
Introduction.....	4
Allmänna rekommendationer.....	5
Regeneration av zebrafisklinjer.....	6
Parning av zebrafisk.....	7
Kryopreservation av zebrafisklinjer.....	8
General considerations.....	9
Regeneration of zebrafish lines.....	10
Mating zebrafish.....	11
Cryopreservation of zebrafish lines.....	12

Diarienummer	Dnr föreg. version:	Beslutsdatum:	Giltighetstid:
Dnr 1-211/2023	Dnr föreg. version	2023-03-29	Tills vidare
Beslut:		Dokumenttyp:	
Beslut		Dokumenttyp	
Handläggs av avdelning/enhet:		Remiss till:	
Djurskyddsorganet vid Karolinska Institutet		Chiara Zullian, veterinär vid KM och specialist I försöksdjursvetenskap (Dipl ECLAM); Försöksdjursteknisk personal som arbetar med zebrafisk; Elisabet Andersson, NACWO vid KM	
Revidering med avseende på:			
Revidering med avseende på			

Inledning

Denna rekommendation från Djurskyddsorganet kan användas som en riktlinje för avel av zebrafiskar. Riktlinjerna är baserade på publicerade studier samt praktisk och teoretisk kunskap från Karolinska institutets Zebrafish core facility. Fokuset ligger på att främja djurväl-färden vid avel, för att bibehålla en bra avelsmiljö och för att minska risken för genetisk drift samt inavelsdepression.

Introduction

This document from the Animal welfare body can be used as a guideline for breeding of zebrafish. The guideline has been developed based on published evidence as well as in-house experience from the zebrafish core facility at Karolinska Institutet. The focus of this guideline is to promote animal welfare during breeding, to keep the animals in excellent breeding condition, and to minimize genetic drift and inbreeding depression.

Allmänna rekommendationer

Stycket innehåller allmänna rekommendationer för att främja djurvälferden under avel samt på sikt bibehålla fisken i god form för avel.

1) Maxålder på zebrafisk

Zebrafiskens förmåga för produktiv och aktiv lek avtar med stigande ålder. Även kvaliteten på äggen minskar ju äldre föräldrarna är. Dessutom försämras immunförsvaret med tiden och äldre zebrafiskar riskerar att agera som smittobärare för patogena smittor. Detta i sin tur kan leda till okontrollerbara smittoutbrott som hotar hela kolonin. Därför rekommenderas en maxålder på 2 år för zebrafisk.

2) Hållning av zebrafiskhanar och honor tillsammans

Zebrafisken är en stimfisk, detta innebär att djuret lever i grupp med artfränder. I dess naturliga miljö består stimmet av både hanar och honor, därav bör zebrafisk alltid hållas i grupp med jämn könsfördelning även i fångenskap. Utöver denna faktor har honorna en tendens att drabbas av äggstockning om dem inte regelbundet får möjlighet till att leka – vilket de gör om det finns hanar. Äggstockningen innebär att dåliga ägg fastnar och blockerar äggstocken vilket gör det omöjligt för honan att lägga ägg, i värsta fall behövs honan avlivas på grund av tillståndet.

3) Lämplig grupp storlek

Antalet zebrafiskar som hålls per linje baseras på hur frekvent linjen kommer användas för äggproduktion. Fiskar som används varje vecka kommer troligen med tiden visa märkbart minskad produktivitet och aktivitet vid lek inom en 6 månaders period. Minsta antal fisk per linje bör därav vara 40 individer, jämnt fördelat mellan hanar och honor, antalet bör ökas om linjen frekvent kommer användas för avel.

Regeneration av zebrafisklinjer

Zebrafisklinjer ska med jämna mellanrum bli regenererade, vilket betyder att en ny generation ska växas upp för att ersätta den äldre. Regenerationen måste planeras och genomföras varsamt för att undvika genetisk drift och inavelsdepression. Zebrafisklinjer som ej regenereras korrekt kommer bland annat uppvisa en påtaglig ojämnheter i könsfördelning, minskad lek, aktivitet och fertilisering, samt sämre äggkvalité. Vi rekommenderar ett regenerationsprotokoll baserat på "round-robin" metoden som har publicerats av ZIRC:

- Sätt upp så många parkorsningar som möjligt av din zebrafisklinje.
- Samla alla äggkluster från varje separat par.
- Samla in ett jämt antal ägg från alla äggkluster av bra kvalité. Dessa kombineras till en grupp för uppväxt.

En detaljerad SOP för regeneration av zebrafisklinjer finns tillgänglig hos Zebrafisk core facility på KI.

Parning av zebrafisk

Det finns många aspekter att ta i akt när man parar/korsar zebrafisk, både för att förebygga djurets välfärd och för att försäkra parningens framgång;

- Alla fiskar som ingår i parningen skall vara av liknande kroppsstorlek. Parning av fiskar av olika storlekar kan leda till aggressivt beteende och skadade eller döda fiskar.
- Miljöberikning i form av plast växter eller liknande berikning ska alltid finnas vid parning.
- Grupparning ska aldrig innehålla mer hanar än honor.
- Fiskarna ska inte hållas i parningstankarna för mer än 24 timmar. På grund av den låga vatten sjunker vattenkvaliteten i tanken snabbt.
- Om fisk med olika genotyper paras, ska dessa klart kunna skiljas från varandra. Passande metoder som kan användas för att ge en säker identifiering av en eller en mindre grupp fiskar inkluderar fen-klippning och tatuering.

Kryopreservation av zebrafisklinjer

Zebrafisksperma kan enkelt kryopreserveras, detaljerade protokoll finns tillgängliga hos ZIRC och Zebrafisk core facility på Karolinska institutet. Vi rekommenderar att alla zebrafisklinjer är kryopreserverade lokalt av två anledningar:

- Vid ett sjukdomsutbrott är den kryopreserverade sperman en säker backup för att snabbt kunna rederivera linjen.
- Om inga experiment eller användning av en zebrafisklinje planeras under en period, kan linjen kryopreserveras och rederiveras om behov uppstår. Genom att kryopreservera linjen behövs inga djur hållas vid liv när det inte behövs vilket är en viktig del av 3R.

General considerations

Here you will find general recommendations to promote animal welfare during breeding and to keep zebrafish in good breeding condition over time.

1) Maximum life span of zebrafish

The older zebrafish become, the less productive they are spawning. Furthermore, the quality of the eggs will deteriorate with increasing age of the parents. Additionally, the activity of the immune system decreases with age, and old zebrafish can act as a reservoir for pathogens. This can potentially lead to uncontrollable disease outbreaks and threaten the whole breeding colony. Therefore, the recommended maximum life span of zebrafish is two years.

2) Housing zebrafish males and females together

Zebrafish is a schooling species which means that the animal lives with conspecifics in groups. Importantly, zebrafish schools are comprised of both males and females which should, for animal welfare reasons, also be the case for zebrafish kept in captivity. Moreover, females tend to become egg-bound if they cannot regularly spawn – which they do if they are kept together with males. Egg-bound females are suffering from deteriorating eggs blocking the ovary which makes spawning impossible, and in worst case those females will need to be euthanized.

3) Suitable group size

The number of zebrafish to be kept for a specific line depends on how heavily the line will be used for spawning. Fish which are bred weekly will likely show a substantial decrease of spawning activity within 6 months. The minimum number of fish should therefore be 40 individuals with equal number of males and females, but the number should be considerably increased if lines will be used frequently for breeding.

Regeneration of zebrafish lines

Zebrafish lines should with regular intervals be regenerated, which means that a new generation should be raised to replace ageing individuals. The regeneration must be planned and executed carefully to avoid genetic drift and inbreeding depression. Zebrafish lines which are not regenerated properly will show amongst others skew sex distribution, decreasing spawning activity and fertilization, as well as inferior egg quality. We recommend using a regeneration protocol based on the round-robin method which has been published by ZIRC:

- Set up as many single matings as possible from your zebrafish line.
- Collect all clutches of eggs separately.
- Collect from all high-quality clutches an equal number of eggs which are then recombined and raised to adulthood.

A detailed SOP for regeneration of zebrafish lines is available from the zebrafish core facility at KI.

Mating zebrafish

Many aspects need to be taken into consideration when mating zebrafish, both for improving animal welfare but also to ensure breeding success:

- All fish participating in a mating should be of similar size. Breeding fish of different size may lead to aggressive behaviour and injured or dead fish.
- Environmental enrichment in form of plastic plants or similar should always be provided for matings.
- Group matings should never be set up with more males than females.
- Fish should not be kept in breeding tanks for more than 24 hours. Due to the small volume, the quality of the water in the breeding tank will deteriorate quickly.
- Different genotypes should be clearly distinguishable if mated. Suitable methods to safely identify individual fish or small groups of fish are fin-clipping or tattooing.

Cryopreservation of zebrafish lines

Zebrafish sperm can easily be cryopreserved, and detailed protocols are available from ZIRC and the zebrafish core facility at Karolinska Institutet. We recommend that all zebrafish lines are cryopreserved locally for two reasons:

- In case of a disease outbreak, the cryopreserved sperm provides a secure backup for rederivation.
- In case that no experiments are planned with a certain zebrafish strain for a period of time, the strain can be cryopreserved and rederived when needed. With that, no animals need to be kept alive which is an important part of 3R.