

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Teja Petra MUHA

**VPLIV PODHRANJENOSTI NA PLAVALNE
SPOSOBNOSTI MLADIC SENEGALSKEGA LISTA
(*SOLEA SENEGALENSIS*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF STARVATION ON THE CRITICAL
SWIMMING BEHAVIOUR OF THE SENEGALENSE
SOLE (*SOLEA SENEGALENSIS*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Portugalskem na Univerzi Algarve, Fakulteti za znanost in tehnologijo, Oddelku za znanosti morja in okolja, Katedre za morsko ekologijo (University of Algarve, Faculty of Science and Technology; Department of Marine Science and Ambient). Zaključeno delo je bilo opravljeno v okviru Univerze v Ljubljani, Biotehniške fakultete, Oddelka za biologijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Mihaela J. Tomana.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris Bulog

Član: prof. dr. Ivan Kos

Član: prof. dr. Mihael J. Toman

Datum zagovora: 16.5.2011

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo izdala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Teja Petra Muha

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK 591.5:591.1:597(043.2)=163.6

KG Senegalski list/*Solea senegalensis*/ prehranjevalni vzorci/ stradanje/ RNA/DNA/ plavalne sposobnosti/ ontogenija

AV MUHA Teja Petra

SA TOMAN Mihael Jožef (mentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2011

IN VPLIV PODHRANJENOSTI NA PLAVALNE SPOSOBNOSTI MLADIC
SENEGALSKEGA LISTA (*SOLEA SENEGALENSIS*)

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP XI, 74 str., 8 preglednic, 37 slik, 6 pril., 54 vir.

IJ sl.

JI sl/en

AI Dostopnost hrane je lahko vpliven faktor pri preživetju mladice, tako v procesu stradanja kot tudi na telesno rast, plavalne sposobnosti in ranljivost pred predatorji. Raziskovali smo vpliv pomanjkanja hrane, na razvoj mladice. Zanimal nas je vpliv podhranjenosti na plavalne sposobnosti senegalskega lista (*Solea senegalensis*) v času ontogenetskega razvoja vse od 8 pa do 14 dneva starosti. Opravili smo biokemične analize (RNA/ DNA razmerje) ter analizirali vzorce obnašanja (kritična plavalna lastnost, Ukrit.) na mladice rib, katere so bile predpostavljene trem različnim prehranjevalnim vzorcem: hranjene mladice (*ad libitum*), kratkotrajno stradanje (stradane do 72 ur) in dolgotrajno stradanje (stradane do 144 ur). Vpliv stradanja na rast in razvoj je imelo znatne posledice, a le znaten učinek na spremembo RNA:DNA razmerja. Plavalne sposobnosti smo povezali z prehranskimi pogoji in spremembami v ontogenetskem razvoju. Mladice rib, katere so bile v pozni stopnji ontogenetskega razvoja vseh treh prehranjevalnih vzorcev so dosegale nižje kritične hitrosti med plavanjem proti toku v primerjavi s tistimi v nižji stopnji razvoja, stanju pre-fleksije in fleksije. To nakazuje na povezavo z bentičnim načinom življenja odraslih osebkov, pri čemer pa se že opazne spremembe pri koncu razvoja mladice. Ti vzorci obnašanja in fiziološke spremembe so že predhodno dokazane in sicer, da bočno sploščene vrste rib postanejo manj aktivne v poznejših fazah razvoja in so veliko bolj odporne na pogoje stradanja v primerjavi s pelagičnimi predstavnicami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 591.5:591.1:597(043.2)=163.6

CX..Senegalese sole/ *Solea senegalensis*/ ADLIBITUM

treatment/starvation/RNA/DNA/swimming performance/ontogeny

AU MUHA Teja Petra

AA TOMAN Mihael Jožef (mentor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biology Department

PY 2011

TI INFLUENCE OF STARVATION ON THE CRITICAL SWIMMING BEHAVIOUR
OF THE SENEGALENSE SOLE (*SOLEA SENEGALENSIS*)

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 74 p., 8 tab., 37 fig., 6 ann., 54 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Food availability can affect larval survival directly through starvation and indirectly through the effects on larval growth rate, swimming performance and vulnerability to predators. In the present study we evaluate the effects of starvation on growth, nutritional condition and swimming behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) through out ontogeny (8 to 14 days after hatching). Biochemical analysis (RNA/DNA ratios) and behavioural experiments (critical swimming speed, Ukrit.) were conducted on larvae reared under 3 AD LIBITUM treatments: fed (*ad libitum*), short term starvation (starved for 72 h) and long term starvation (starved for 144 h). Growth was significantly affected by AD LIBITUM treatment, while only slight decreases on RNA:DNA ratio and swimming performance were registered. Late stage larvae of the three AD LIBITUM treatments had slower critical speeds when compared to pre flexion and flexion stages, which is probably related to the benthic life style acquired by the species in the end of the larval period. These behavioural and physiological changes are in accordance with previous results which show that flatfish larvae become less active later in development and are more resistant to starvation when compared to pelagic species.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO TABEL.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLADICE RIB- PLANKTON ALI NEKTON	3
2.2 NARAVNI POGOJI – NARAVNO ŽIVLJENJSKO OKOLJE, ULOV, PRIMERJAVA GOJENIH IN DIVJIH MLADIC	3
2.3 PRIMERJAVA MED GOJENIMI MLADICAMI IN MLADICAMI IZ NARAVNEGA OKOLJA	5
2.4 PLAVALNE SPOSOBNOSTI	5
2.5 RAZLIČNI PREŽIVETVENI POGOJI	6
2.6 SKUPINA PLEURONEKTIFORMNIH, BOKOPLUTIH RIB IN OPIS VRSTE <i>SOLEA SENEGALENSIS</i>	7
2.7 PREOBRAZBA V SPLOŠČENO PRIDNENO OBLIKO TELESA.....	7
2.8 UPORABNOST VRSTE V PREHRAMBENE NAMENE NA AKVAKULTURNIH POSTAJAH	8
2.9 NUKLEINSKE KISLINE IN RNA/DNA RAZMERJE	8
3 MATERIALI IN METODE.....	9
3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI	9
3.2 OPIS OBMOČJA VZORČENJA V NARAVNEM OKOLJU	10
3.2.1 ULOV MLADIC.....	12
3.3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	14
3.3.1 SKRB ZA MLADICE.....	14
3.3.2 PREHRANA RIBJIH MLADIC	15
3.3.3 IZVALITEV VRSTE SOLINSKEGA RAKCA (<i>ARTEMIA SALINA</i>)	15
3.3.4 ROTIFERA.....	16
3.3.5 RAZLIČNA LEGLA MLADIC IN NJIHOVA STAROST	16
3.3.6 PLAVALNA KOMORA	16

3.3.7 KALIBRACIJA	18
3.3.8 PROTOKOL MERJENJA PLAVALNIH SPOSOBNOSTI RIBJIH MLADIC	19
3.3.9 KRITIČNA PLAVALNA HITROST.....	20
4 LABORATORIJSKE ANALIZE	20
4.1 MERITVE ZUNANJIH TELESNIH ZNAČILNOSTI	20
4.2 ZUNANJE METAMORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI MLADIC VRSTE <i>SOLEA SENEGALENSIS</i>	21
4.3 STOPNJE FLEKSIJE	22
4.4 RNA/DNA ANALIZE- ANALIZE NUKLEINSKIH KISLIN.....	22
4.4.1 POSTOPEK ZA SPEKTROFLUOROMETRIJO	23
4.4.2 TEHNIČNI POSTOPEK	23
4.4.3 REAGENTI	23
4.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	23
4.5.1 FULTONOV INDEKS.....	24
4.5.2 INDEKS SUHE TELESNE TEŽE- TELESNE DOLŽINE- R- KONDICIJSKI INDEKS.....	24
5 REZULTATI	26
5.1 KRITIČNE PLAVALNE HITROSTI	26
5.2 MORFOLŠKA PRIMERJAVA ONTOGENETSKEGA RAZVOJA.....	27
5.2.1 LEGLO 2.....	29
5.3 PLAVALNE SPOSOBNOSTI	32
5.4 UČINEK STRADANJA NA RAZMERJE RNA/DNA	44
6 DISKUSIJA	48
6.1 DISPERZIJA	48
6.2 RAZLOG ZA IZBIRO DRUGEGA LEGLA.....	48
6.3 PLAVALNE SPOSOBNOSTI	50
6.4 FLEKSIJA	53
6.5 RNA/DNA	54
7 SKLEPI.....	56
8 POVZETEK	57
9 VIRI.....	58

KAZALO TABEL

Tabela 1- 1 leglo, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n= 100)	26
Tabela 2- Leglo 2, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n=300)	26
Tabela 3- Leglo 3, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n=300)	27
Tabela 4- Mladice <i>Solea senegalensis</i> , drugega legla in njihove morfološke spremembe posledično zaradi različnih prehranskih pogojev, dolžine stradanja in različnih starosti. ..	30
Tabela 5- Srednja vrednost Ukrit. s standardno deviacijo in razponom od srednje vrednosti plavalnih sposobnosti, vključno z mladimi starimi 13 in 14 pri katerih niso vključene tudi mladice, ki so ostale na dnu zaradi metamorfoze. (n=700).....	33
Tabela 6- Srednje vrednosti kritične hitrosti mladice posameznih prehranskih skupin v ločenih leglih. (n=403).	36
Tabela 7- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s), dosežene pri mladicih glede na različne stopnje v morfološkem razvoju.....	42
Tabela 8- Srednje vrednosti RNA, DNA in njunega razmerja glede na posamezen osebek na 1mg telesne teže.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1- Razširjenost vrste <i>Solea senegalensis</i>	7
Slika 2- Zahodni del območja Ria Formosa na JZ točki Iberskega polotoka na Portugalskem. Lokacija pod oznako E je bilo področje vzorčenja ribjih mladice s svetlobno pastjo v času najvišje plime.....	11
Slika 3-Satelitska slika lagune Ria Formosa. Križec ob obali označuje ulovno območje...	11
Slika 4-Bližnji posnetek satelitske slike območja Praia de Faro, označena so ulovna območja, pri čemer je prvi lev križec območje nad mostom, srednji in desni križec pa pomola na notranji strani lagune. Na vseh območjih je uolv potekal ponoči ob najvišji plimi.....	12
Slika 5- Lovilna past za mladice rib. Prilagojena za ulov mladice s stranskimi majhnimi odprtini in neonsko lučjo na sredini. Ob koncu se napravo izvleče ven iz morja in mladice se zadržijo na dnu lovilne naprave.....	13
Slika 6- Prikaz uporabe mladice iz drugega legla v plavalni komori glede na prehranske režime.....	15
Slika 7- Plavalna komora s privzdignjenim pokrovom.....	17
Slika 8-Plavalna komora. Prikaz smeri vodnega toka. Iz zgornje strani pritok vode v komoro in odtok na spodnji strani.....	18
Slika 9- Prikaz posameznih umeritvenih točk določene stopnje hitrosti, glede na kot.....	19
Slika 10- Prikaz kavdalne plavuti mladice (<i>Solea sp.</i>) dolžine 60mm, pri čemer so že popolnoma vidne skeletne strukture repne plavuti.....	21
Slika 11- Kalibracijska krivulja za Fulton kondicijski indeks.....	25
Slika 12- Leglo 3, 12 dni, hranjena ad libitum: pigmentacija ni razvita, telo je še vedno v poziciji vertikalne smeri plavanja, pelagična oblika, žarki dorzalne plavuti se niso razvidni, stanje pre-fleksije.....	28
Slika 13- Leglo 2, 12 dni, hranjena ad libitum: pigmentacija dobro razvita, telo pridobiva bočno sploščeno obliko, naprednejša razvitost telesa, vidni žarki plavuti, stanje post-fleksije.....	28
Slika 14- Leglo 3, 5 dni, ad libitum, jajčna vrečka: slabo razvita pigmentacija, se vedno prisotna jajčna vrečka, popolna nerazvitost repne plavuti, stanje pre- fleksije.....	29
Slika 15- 14 dni, 24h brez hrane, 2 leglo: premik levega očesa na drugo stran dorzo mediane linije, zaključena pigmentiranost, bočna sploščenost, stanje post- fleksije, zaključno stanje metamorfoze, oziroma zadnje stanje, ko smo se izvajali poskuse v plavalni komori za kritično hitrost.....	29
Slika 16-mladica <i>Solea senegalensis</i> , 8 dni, hranjena.....	30
Slika 17- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 9 dni, hranjena ad libitum.....	30
Slika 18- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 10 dni, hranjena ad libitum.....	30
Slika 19- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 10 dni, 48h stradanja.....	31
Slika 20- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 11 dni, hranjena.....	31
Slika 21- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 11 dni, 72h stradanja.....	31
Slika 22- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 12 dni, hranjena ad libitum.....	31
Slika 23- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 13 dni, hranjena.....	32
Slika 24- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 14 dni, hranjena ad libitum.....	32
Slika 25- mladica <i>Solea senegalensis</i> , 14 dni, 72 ur z deprivacijo hrane.....	32
Slika 26- Dosežene srednje vrednosti Ukrit. mladice <i>Solea senegalensis</i> , ločene glede na starost in leglo.....	34

Slika 27- Prikaz doseženih kritičnih hitrosti mladice vseh legel skupaj, glede na njihovo starost, pri čemer mladice, ki zaradi preobrazbe v sploščeno obliko odraslega osebka niso plavale, niso vključene poleg. Dph nam predstavlja starost šteto v dnevih, Ucrit pa je kratica za kritično plavalno hitrost.	35
Slika 28- Primerjava srednjih vrednosti Ukrit. (cm/s) med različnimi starostmi mladice in različnimi prehranjevalnimi režimi drugega legala.	37
Slika 29- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s) v odvisnosti od starosti mladice vseh legel skupaj. (n= 403)	38
Slika 30- Leglo 2: srednja kritična hitrost Ukrit. (cm/s) v odvisnosti od različne dolžine časa podhranjenosti.....	39
Slika 31- Srednje vrednosti Ukrit. (cm-1s) v odvisnosti od stopnje fleksije hrbtenice (1- prefleksija, 2-fleksija, 3-postfleksija) z 0,95 intervalom zaupanja z izločenimi mladimi, ki zaradi preobrazbe v sploščeno obliko odraslega osebka niso plavale (Ukrit.= 0cm/s).	40
Slika 32- Srednje vrednosti Ukrit. (cm-1s) v odvisnosti od pogojev stradanja/hranjenja ločene glede na posamezne stopnje v fleksiji hrbtenice.	41
Slika 33- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s) pri vseh treh leglih, primerjane glede na morfološko stopnjo razvitosti in glede na posamezne prehranske režime oziroma dolžino stradanja.....	42
Slika 34- Mladice rib in njihova telesna rast glede na starost. Prazni trikotniki so mladice z dolgotrajnim stradanjem, sivi polni trikotniki so mladice s kratkotrajnim stradanjem in črni trikotniki predstavljajo hranjene mladice.	43
Slika 35-Primerjava med telesno dolžino in suho maso za R-kondicijski indeks, pri čemer so v izračun vzete vse mladice vseh legel. Iz trendovske krivulje je razvidno, da ta indeks v tem primeru ni učinkovit pokazatelj variabilnosti.	44
Slika 36- Povprečje doseženih maksimalnih plavalnih hitrosti pri podhranjenih (levo)in hranjenih (desno) mladicih.	46
Slika 37- Povprečje doseženih maksimalnih plavalnih hitrosti pri hranjenih in podhranjenih mladicih, pri čemer so slednje ločene na skupino s kratkotrajnim stradanjem in dolgotrajnim stradanjem.	46

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Prikaz mladice glede na ločena legla in prehranjevalni vzorci stradanj glede na dolžino dni deprivacije hrane.

Priloga 2: Meritve vseh mladice vključenih v raziskavo

Priloga 3: Razpredelnica umeritve toka

Priloga 4: Srednje vrednosti kritičnih hitrosti (cm/s) mladice, ločenih glede na prehranski režim in starost, pri čemer so skupno vzeta vsa tri legla. (n=700)

Priloga 5: meritve mladice drugega legla (n=300)

Priloga 6: Razpredelnica, kjer je prikazan razpored mladice, glede na prehranske režime. Kjer so dopisane še kontrolne mladice, to število mladice, katere niso bile testirane v plavalni komori, a so vseeno bile kasneje vključene v analizo RNA/DNA.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ukrit.- kritična plavalna hitrost (cm/s)

IPIMAR- Instituto nacional de recursos biológicos, nacionalni inštitut za biologijo

PVC- Polivinilklorid

Ø- premer

μ- mikro

W- watt

L- liter

°C- stopinje Celzija

K- Fultonov kondicijski indeks

W¹- telesna teža

R- R kondicijski indeks

Wc- izračunana telesna masa

Npr.-na primer

MFA- modifikacija sekventne fluometrične analize

1 UVOD

V zgodnjih stopnjah razvoja morskih rib je prisotna visoka stopnja smrtnosti, kar se odraža v kritičnem zmanjšanem številu preživetih osebkov novih populacij. Dva bistvena razloga za smrtnost med morskimi mladimi ribami sta predacija in stradanje (Bailey in Houde, 1989). Ti faktorji niso povsem neodvisni, saj vodi pomanjkanje hrane do zmanjšanja rasti osebkov (Ehrlich in sod. 1976; Yin and Blaxter, 1986) počasnejšega razvoja (Kamler in sod., 1990; Høie in sod., 2000), in sprememb v obnašanju (Blaxter and Ehrlich, 1974; Munk, 1995; Ross in sod., 1996; Sogard in Olla, 1996; Chick in Van den Avyle, 2000).

Mladice rib katere živijo v slabših prehranskih pogojih bodo manjše, šibkejša in manj razvite glede na stopnjo v ontogenetskem razvoju, kot pa dobro hranjene mladice iste starosti. Raziskave izdelane na vrstah kot so oslič, trska, sardon, so pokazale da so podhranjene mladice veliko bolj izpostavljene plenilcem, kot pa dobro hranjene mladice (Bailey, 1984; Neilson in sod., 1986; Yin in Blaxter, 1987; Booman in sod., 1991).

V kar nekaj raziskavah so dokazali, da boljši kot so pogoji za življenje mladice, povečana je stopnja rasti in mnogo višja je stopnja preživetja v naravnem okolju (Searcy in Sponaugle, 2001; Vigliola in Meekan, 2002; Jenkins in King, 2006; Sponaugle in sod., 2006; Voss in sod., 2006), a le nekaj je bilo poskusov, ki bi povezali med seboj stopnjo razvitosti mladice z vzorci obnašanja, kot je na primer plavanje (Laurence, 1972; Yin in Blaxter, 1987; Chick in Van den Avyle, 2000).

Plavalne sposobnosti mladice so eden izmed ključnih sposobnosti za preživetje. Mladice, katere so bolj fizično razvite, so sposobne doseči večje plavalne sposobnosti in odzivnost proti predatorjem, kot tiste, ki so v zelo slabem stanju (Chick in Van den Avyle, 2000; Grorud-Colvert and Sponaugle, 2006).

Analiza nukleinskih kislin je praktično merilno orodje, ki pripomore k študiji splošnega prehranskega stanja in rasti mladice kot tudi mladih rib, poleg tega pa tudi kot učinkovito merilo na odzivnost različnim okoljskim dejavnikom (Clemmesen in sod., 1997; Chicharo, 1997; Buckley in sod., 1999; Caldarone in sod., 2003).

Razmerje RNA/DNA se odraža v količinskih spremembah in stopnji proteinske sinteze: vsebina DNA v živalskih somatičnih celicah predvidevajo, da je normalno stabilna, količina RNA pa naj bi bila variabilna spremenljivka, primarno povezana z ribosomi, kateri pa so odgovorni za proteinsko sintezo. Dokazano je bilo, da se razmerje RNA/ DNA spreminja glede na razlike v prehranjevanju in posledično v rasti osebkov v minimalnem intervalu 1 do 3 dni pri različnih vrstah rib in je tako zanesljiv faktor opredelitve rasti (Rooker and Holt, 1996; Buckley in sod., 1999; Gwak in Tanaka, 2001).

Izvedli smo laboratorijsko raziskavo, kjer smo izmerili kritične plavalne hitrosti pod tremi različnimi režimi (ad libitum, 2 dni brez hrane in vsaj 4 dni brez hrane). Ugotavljali smo

medsebojen vpliv posameznih faktorjev drug na drugega: opredelili smo stopnjo rasti, prehransko vrednost in razmerja RNA/DNA individualnih osebkov.

1.1 NAMEN

Raziskava je bila izvedena z namenom, da bi ugotovili ali so bokoplute predstavnice rib vrste (*Solea senegalensis*) zmožne doseči visoke plavalne hitrosti in s tem kljubovati morskim tokovom v naravnem okolju, tako v primeru pomanjkanja hrane v različnih časovnih intervalih stradanja. Pregledali smo, kako pomanjkanje hrane vpliva na ontogenetski razvoj osebkov, če prihaja do sprememb v razmerju RNA/DNA, in kako vse to skupaj vpliva na obnašanje mladice in njihove plavalne sposobnosti vse do stopnje, ko se preobrazijo v odrasle osebkove.

1.2 HIPOTEZE

- Mladice senegalskega lista so dobre plavalke proti toku, dosegajo med plavanjem povprečno nad 5 cm/s vrednosti kritične hitrosti, saj so to vrednosti, ki jih dosežejo mladice pelagičnih predstavnic rib na katerih so že naredili mnogo raziskav
- Mladice hranjene ad libitum bodo najboljše plavalke, mladice z najdalgotrajnejšim stradanjem pa najšibkejše in ravno tako najslabše plavalke.
- Večje mladice katere so ravno tako že bolj morfološko napredne v razvoju, z razvojem fleksije hrbtenice, bodo dosegale višje hitrosti. Ravno tako bodo te predstavnice imele večjo količino RNA kot pa podhranjene, manjše, telesno slabo razvite mladice, katere so še v stanju pre-fleksije in z nižjo stopnjo morfološkega razvoja.
- Pri tistih mladica, kjer bo razmerje RNA: DNA večje, bodo dosegale višje plavalne hitrosti.
- RNA:DNA razmerje se bo močno spremenilo pri mladica, katere bodo dalj časa podhranjene, torej bo tu prišlo do pomanjkanja izgradnje ribonukleinskih kislin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLADICE RIB- PLANKTON ALI NEKTON

Mladice rib upoštevamo kot del planktonskih organizmov in to vse dokler ne preidejo pomembne stopnje v razvojnem procesu, katera je ključen del preobrazbe v odrasli osebek. To dejstvo ima lahko izreden pomen na razširjenost mladice rib v morskih sistemih.

Planktonski organizem opišemo z dvema ključnima hipotezama:

- Majhen vodni organizem ponavadi z manj kot 1 cm dolžine, lahko tudi do nekaj centimetrov.
- Organizem, pri kateremu sta plavanje in orientacijske sposobnosti močno odvisni od okoliškega toka in ne od plavalnih sposobnosti samega organizma (vse živali in rastline, katerih razširjenost je odvisna od okoliškega toka (Johnson, 1957; Leis, 2006).

Glede na zgoraj upoštevani definiciji so mladice rib uvrščali med planktonske organizme, saj se izvalijo iz majhnih jajčec (ponavadi le nekaj mm v premeru ali manj), v majhne mladice z relativno slabo razvitostjo tako v fiziološkem kot morfološkem razvoju. Upoštevanje druge hipoteze je dejansko temeljilo na pomanjkanju informacij o vzorcih obnašanja ali pa le upoštevanje splošnih ključnih predpostavk. V raziskavi smo se osredotočili na pleuronektiformne predstavnice mladice rib ali z drugo besedo bokoplutarice, na vrsto senegalskega lista. V prejšnjih raziskavah na pleuronektiformnih vrstah mladice rib so prišli do zaključkov, da so pripadnice rib v tej skupini bolj planktonski kot pa nektonski organizmi v času pred metamorfozo v odrasli osebek (Bailey in sod., 2005; Leis, 2006).

2.2 NARAVNI POGOJI – NARAVNO ŽIVLJENJSKO OKOLJE, ULOV, PRIMERJAVA GOJENIH IN DIVJIH MLADIC

Po spoznanju, da so tudi mladice rib učinkoviti plavalci, se je razvil pojem 'učinkovitega plavanja'- 'effective swimming', kateri se nanaša na sposobnost premagovanja hitrosti lokalnih morskih tokov (Leis in Stobutzki, 1999; Leis, 2006). To spoznanje se navezuje tako na pelagične vrste, kot tudi na predstavnice vrst mladice pridnenih rib, ki se po večini zadržujejo na dnu. Kljub temu je področje plavalnih sposobnosti mladice rib še močno neraziskano. Učinkovito plavanje mladice proti toku je seveda mnogo lažje tam, kjer so srednje hitrosti toka do 10 cm/s (npr. priobalna področja), v primerjavi z močnimi tokovi, ki imajo povprečne hitrosti okoli 100 cm/s (npr. Zalivski tok) (Leis in McCormick, 2002; Fisher, 2005; Leis, 2006).

Mladice rib bolj učinkovito plavajo v mirnejših okoljih, kot pa v hidrodinamično hitrem okolju (Webb in Weihs, 1986; Leis, 2006). Večja in hitrejša kot je mladica, večje ima

možnosti, da se lahko zadržuje v mirnih vodah, v katerih je tudi več dostopne hrane in ima ravno tako večje možnosti za preživetje.

Ravno to je tudi razlog, da po večini najdemo mladice rib v plitvejših priobalnih morskih ekosistemih, kot so estuariji, lagune, nasadi mangrov, kateri zagotavljajo primeren habitat za primeren telesni razvoj mladice, visoko zalogo hrane, zatočišče pred plenilci in višje bolj ugodne temperature vode. Ta okolja so najprimernejša za drstitev rib, ter posledičnega razvoja mladice mnogih morskih vrst rib, tudi tistih z visoko komercialno vrednostjo (Beck in sod., 2001; Chicharo, 1998). Ravno ti ekosistemi pa so eni izmed najbolj ogroženih področij. So pod močnim negativnim vplivom zaradi človeškega poseganja v okolje, za kar bi bila nujna zaščita vseh teh ekosistemov.

Ribe, predstavnic, ki so skoraj pri vrhu prehranjevalnih verig v morskih sistemih, so zaradi tega ene izmed indikatorskih vrst, katere odražajo stanje v okolju. Kot del morske estuarijske favne, so sposobne posrednega odražanja tako naravnih kot tudi antropogenih dejavnikov v okolju (Karr, 1981; Elliott in sod., 1988; Warwick, 1993; Whitfield, 1996; Whitfield in Elliott, 2002, Ribeiro in sod., 2008).

V njihovo naravno okolje smo posredovali z namenom, k boljšemu razumevanju interakcij med ribjimi mladimi in biotskimi ter abiotskimi dejavniki v naravnega okolja. Ravno tako smo želeli pridobiti podatke o plavalnih sposobnostih mladice glede na dosežene kritične plavalne hitrosti, katerih poskuse bi izvedli v zaprtem okolju. Uporabili smo svetlobno past za ulov mladice, s katero smo v nočnem času, glede na ritem plimovanja, na meji med koncem plime in pričetkom oseke, lovili mladice. Lovilno tehniko smo uporabljali v zaščitenem območju, Narodnem parku Ria Formosa na jugu Portugalske. V tem okolju prevladujejo med drugim različne vrste ribjih mladice, ki se tu nahajajo zaradi primerne življenjskega okolja. V laguni, kjer so morski tokovi počasni- prevladuje plimovalni tok. Ugodno na njihov razvoj na tem območju pa vpliva tudi izjemna produktivnost teh plitkih vodnih sistemov in s tem donos velikih količin hrane. Ria Formosa je zaradi svojevrstnega območja naravnega mokrišča in njene ekonomske vrednosti pridobila leta 1987 naziv narodnega parka in bila sprejeta kot del Ramsarske konvencije o zaščitenih območjih, ter kot zavarovano območje Natura 2000 (Ribeiro in sod., 2008).

Maksimalne hitrosti tokov na tem območju so med 4 m/s, srednje vrednosti pa se nahajajo med 0,4- 0,7 m/s. To so po večini tokovi plime in oseke. Ravno te hitrosti tokov plimovanja pa morajo ribje mladice preseči, saj jim le to lahko zagotovi preživetje, tako posameznih osebkov kot tudi celotnih populacij v lagunah in estuarijih. Če ravno je nadaljnja raziskava vezana izključno na vrsto *Solea senegalensis*, smo pri terenskem delu lovljenja mladice v zakup vzeli vse vrste, še posebej pa smo bili pozorni na vrsto sardin (*Sardina pilchardus*), zaradi njene pomembnosti v ribištvi in ekonomske vrednosti ob atlantski obali vse okoli Iberijskega polotoka (Pestana 1989; Chicharo in sod., 1998). Že manjše spremembe v spremembah velikosti standardnega ulova imajo lahko ogromne posledice na ribištvo in pomanjkanja zaloga rib v morju. Študij dejavnikov lahko pozitivno vpliva na boljše

razumevanje vseh pokazateljev, kateri vplivajo na preživetje zgodnjih razvojnih oblik življenja organizmov, ter vplivajo na spremembe v zalogah rib (Chicharo in sod., 1998).

2.3 PRIMERJAVA MED GOJENIMI MLADICAMI IN MLADICAMI IZ NARAVNEGA OKOLJA

Raziskavo na živih mladich rib bi lahko izvedli tako na gojenih kot tudi na ujetih osebkih v naravnem okolju. V obeh primerih bi raziskava potekla na enak način. Ponavadi so mladice, ki se ujamejo v svetlobno past, že starejše in že blizu preobrazbe v odrasli osebek, tako da je veliko bolje vzeti za študij gojene mladice. S tem pridobimo večjo količino podatkov, in zabeležimo večje spremembe med posameznimi stopnjami, saj pri mlajših mladich prihaja do večjih sprememb v fiziološkem in morfološkem razvoju.

Očitno vprašanje obstaja: ali imajo gojene mladice drugačne vzorce obnašanja v primerjavi z mladich iz naravnega okolja, še posebej pri plavalnih sposobnostih ali pa se to nerazlikuje. Odgovori so na to so različni. V splošnem je priznано, da naj bi bili vzorci obnašanja del naučene komponente. Tako se na primer izogibanje predatorjem razlikuje med gojenimi in divjimi mladich, saj imajo te mladice med seboj različne izkušnje iz področja nevarnosti (Olla in sod., 1998; Kellison in sod., 2000; Brown in Laland, 2001; Leis, 2006). Ostali vzorci obnašanja pa bi se lahko razlikovali, ali pa tudi ne (Leis, 2006).

2.4 PLAVALNE SPOSOBNOSTI

Mladice mnogih rib so sposobne doseči in vzdrževati hitrosti višje od lokalnih tokov skozi daljše časovne periode. Prepotujejo lahko tudi več deset kilometrov. Njihova vertikalna distribucija je pod močnim vplivom njihovega obnašanja. Mladice se močno zavedajo naravnih potencialnih sovražnikov v okolju, ravno tako pa si tudi same izberejo kraj za preobrazbo (Leis, 2006). Vzorci obnašanja se med seboj zelo razlikujejo in so močno odvisni od razmer v okolju. V povezavi s tem pa se tudi plavalne sposobnosti močno razlikujejo, rezultat tega pa so različne lokacije in različna izbira plavalnih smeri. Pleuronektiformne (bokoplute) ribe bi lahko bile manj sposobne v skladu z različnimi vzorci obnašanj glede na pelagične vrste, a to zaenkrat obstaja še nerazrešeno vprašanje (Leis, 2006). Ravno iz tega razloga pa je zelo pomembno merjenje plavalnih lastnosti mladich, pri čemer se osredotočimo na kritično plavalno hitrost (Ukrit.) izmerjeno po (Brett, 1964; Leis, 2006), s čimer pridobimo pomembne informacije o disperziji osebkov in populacij. Čeprav gre tu za plavalno hitrost, katero le redko dosežejo in uporabljajo v naravnem okolju, je vseeno ta meritev zelo dober pokazatelj za primerjavo posameznih taksonov med seboj in primerjava njihove razvojne stopnje (Plaut 2001; Leis, 2006). Merjenje kritične plavalne hitrosti pri ribjih mladich je bilo do sedaj izvedeno izključno na mladich, katere so v pozni stopnji razvoja, mladich rib koralnih grebenov, katere so že blizu stopnji metamorfoze (Stobutzki in Bellwood 1997; Fisher in Bellwood 2002; Fisher in Wilson 2004; Fisher in sod., 2005; Leis, 2006). Kljub temu pa je determiniranje plavalnih sposobnosti ključno, iz razloga, da se lahko

ovrednoti napredka v ontogenetskem razvoju. Relativno malo podatkov je na voljo v povezavi z mladimi, katere so v nižjih razvojnih stopnjah, a nekaj je povezanih tudi s tem področjem (Fisher in sod., 2000; Clark in sod., 2005; Leis in sod., 2007).

Kritično plavalno hitrost se meri v tekmovalnih stezah, kjer so mladice rib primorane plavati proti vedno močnejšem toku, vse dokler ne morejo več plavati na poziciji in jih nato odnese v mrežico v smeri toka vode (Leis, 2006). Najvišja hitrost, pri kateri jim je še uspelo vzdržati in plavati proti toku je poimenovana kot kritična hitrost (Ukrit.). Ukrit. je najbolj relevantna pri primerjavah relativnih nastopov odraščanja mladice in je najverjetneje hitrejša od hitrosti, pri kateri mladice plavajo v naravnem okolju. Eden izmed izredno pomembnih faktorjev je ovrednotenje različnih okoljskih učinkov, tako pozitivnih kot negativnih dejavnikov na fitnes ribjih vrst, kot tudi na preživetje v ekološkem sistemu. V skladu s tem je merjenje plavalnih sposobnosti mladice pomemben dejavnik (Plaut, 2001). Poleg tega je dokazano, da so majhne mladice sposobne velikih in pogostih frekvenc zamahov z repno plavutjo v zelo kratkih časovnih intervalih v primerjavi z odraslimi ribami (Blaxter, 1986).

Raziskave plavalnih sposobnosti mladice so ponavadi izvedli na pelagičnih vrstah v tropskih vodah, kjer so temperature vode mnogo višje kot pa v zmernih vodah. Temperatura vode vpliva na plavalne sposobnosti ribjih mladice (Hunt von Herbing, 2002; Leis, 2006). Prvič, ribje mladice so ektotermne živali in mišične celice delujejo veliko bolj učinkovito ob višjih temperaturah (Hunt von Herbing, 2002; Leis, 2006). Drugič, viskoznost morske vode naraste, s tem ko temperatura vode pade, kar pomeni, ali višje plavalne hitrosti ali večje velikosti osebkov so zahtevane ob hladnejših temperaturah vode. Ta učinek viskoznosti zaradi različne temperature veliko bolj vpliva na manjše mladice, posebej ob nižjih temperaturah vode. V takem okolju so zahtevane večje plavalne hitrosti, da lahko dosežejo mirnejša inercialna okolja, ki zagotavljajo povečano plavalno učinkovitost, kot pa v hitrem hidrodinamičnem okolju (Fuiman in Batty, 1997; Leis, 2006).

2.5 RAZLIČNI PREŽIVETVENI POGOJI

Plavalne sposobnosti ribjih mladice neposredno determinirajo količino vode med iskanjem plena. Kadar je hrane v primanjkljaju, so slabši plavalci v zaostanku zaradi zmanjšane frekvence soočanja s potencialnim plenom. V tem primeru pride do učinka stradanja, kar povzroči slabše plavalne sposobnosti, poleg tega pa tudi zmanjšano časovno obdobje, ko je mladica v stanju aktivnosti (Laurence, 1972). Raziskava vključuje tako ovrednotenje plavalne hitrosti kot tudi vzorce obnašanja tako hranjenih, kot tudi podhranjenih mladice *Solea senegalensis* glede na različne dolžine dni brez hrane. Za primerjavo in ugotavljanje razlik plavalnih sposobnosti smo uporabili različne morfometrične in ontogenetske parametre v času poskusov.

2.6 SKUPINA PLEURONEKTIFORMNIH, BOKOPLUTIH RIB IN OPIS VRSTE *SOLEA SENEGALENSIS*

Bokoplutarice spadajo v red Pleuronectiformes (staro poimenovanje Heterostomata). Skupaj s predstavnicami redov Clupeiformes in Gadiformes so ločena skupina od pelagičnih predstavnic že 50- 60 milijonov let. Torej bi bilo primerjanje z drugimi predstavnicami rib, ekvivalentno primerjanju glodavcev z netopirji. Ravno iz tega razloga so raziskave na teh predstavnicah zelo pomembne, saj bi se s tem razjasnili nerazsodne primerjave s pelagičnimi vrstami. Med bokoplutaricami je več kot 500 predstavnic vrst. Vse imajo sploščeno telo, zelo dobro prilagojeno življenju na dnu morja. Na novo izvaljene mladice so bilateralno sploščene, vendar se kmalu razvijejo karakteristike bočno sploščenega telesa, poleg tega pa eno oko migrira na drugo stran glave. Na katero stran je odvisno od vrste.

Solea senegalensis je predstavnica bočnosploščenih rib. Njeno nahajališče se razteza vse od Mediterana pa do južne atlantske obale. Je največkrat najdena v litoralnem pasu na peščeni, blatni in muljasti podlagi obalnih območij, vse do 100m globine. Ravno tako jo je moč najti v brakičnih vodah. Drstijo se v obdobju nekje od marca pa do junija. Je ena izmed primarnih potencialnih kandidatov za gojenje v akvakulturnih postajah, zaradi dobre cene na trgu (15–17 euro na 1 kg, komercialna velikost 200 g) (Blaxter, 1986).



Slika 1- Razširjenost vrste *Solea senegalensis*.

2.7 PREOBRAZBA V SPLOŠČENO PRIDNENO OBLIKO TELESA

Preobrazba je proces pri katerem pride do migracije očes, asimetrične pigmentacije in rotacije pozicije telesa v horizontalno smer za 90° stopinj. Te razvojne spremembe so značilne za bočno sploščene vrste rib in okarakterizirajo prehod iz pelagičnega načina življenja v bertoški način. Preobrazba pomeni za osebek prilagoditev na popolnoma novo življenjsko okolje, kar

pomeni, da se mora spremeniti vzorce obnašanja z namenom k uspešnejši borbi za obstanek v novem sloju vodnega stolpca (Fuiman, 1997). Mladice rib predstavljajo prehodno, a zelo natančno opredeljeno fazo v razvoju, kjer pride do veliko sprememb tako v ontogenetskem kot ravnem razvoju. Vse to skupaj pa se odraža v celoviti spremembi v razvoju osebkov (Fuiman in Magurran, 1994; Fuiman 1997), kar povzroči znatne spremembe v strukturi telesa, fiziologiji, velikosti in obliki telesa. Predvidevajo, da ko se mladica transformira v odrasli osebek, najde prvi primeren talni prostor, od koder pa jo nato morski tokovi pasivno prenašajo.

2.8 UPORABNOST VRSTE V PREHRAMBENE NAMENE NA AKVAKULTURNIH POSTAJAH

Zaradi visokega potenciala na trgu (izredno zaželena vrsta v akvakulturni industriji Španije in Portugalske) (Imšland in sod., 2004; García-López in sod., 2006)), ter zaradi nezahtevne tehnološke zahtevnosti vzdrževanja, je senegalski list trenutno med vrstami, katere najintenzivneje gojijo v zaprtih rečnih sistemih, pa čeprav zaenkrat produkcija še ni dosegla zaželenih in pričakovanih stopenj. Iz tega razloga je boljše poznavanje same vrste in vedenjskih vzorcev pomemben faktor pri vzreji vrste (Rubio in sod., 2009). Celovito znanje o reprodukciji vrste ter fiziologiji je potrebno, da bi dosegli optimalno število potrebnih drstitev. Trenutna produkcija je v veliki meri odvisna od velikosti in številčnosti drstenj spomladi in jeseni ujetih divjih plemenskih osebkov (Anguis in Cañavate, 2005) v naravi (Rodríguez, 1984; Arias in Drake, 1990; García-López in sod., 2006).

2.9 NUKLEINSKE KISLINE IN RNA/DNA RAZMERJE

Bulow (1970; Richard, 1991) je bil prvi, ki je odkril občutljivost in natančnost RNA: DNA (ribonukleinskih kislin/ dezoksiribonukleinskih kislin) razmerja, ki deluje v prid DNA ob pomanjkanjih hrane. Ribonukleinska kislina je vpletena v proteinsko sintezo in povezana z rastjo (Sutcliffe, 1965; Richard, 1991). Nivo RNA naj bi bilo višje v tkivih in organizmih, ki kažejo znake hitrejše rasti in proteinske sinteze. Dezoksiribonukleinska kislina DNA pa je povezana z gensko informacijo, katere je konstantna v celicah in somatskem tkivu za določeno vrsto (Regnault & Luquet 1974). Dokazano je, da tudi v zelo variabilnih težjih pogojih za življenje ostaja nivo konstantno. Buckley (1979, 1980, 1981) je pokazal da je njuno razmerje dober indikator razvitosti in rasti organizma in se ga uporablja pri nutracijskih indeksih za diagnozo stopnje stanja podhranjenosti (Richard, 1991). Ti nutracijski faktorji so dobri pokazatelji stanja mladice, katere še nimajo razvite hrbtnne strune v stanju fleksije. Predvidevajo, da višje razmerje RNA:DNA vpliva na zmanjšano smrtnost osebkov in večjo preživetveno rast, je to še dokaj neraziskano območje.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI

Mladice senegalskega lista, smo pridobili iz raziskovalne akvakulturne postaje nacionalnega inštituta za biološke raziskave (INRB- IPIMAR- Fisheries Institute in Aquaculture station)- ribiški inštitut in ribogojna postaja, v mesecu maju leta 2009. Vsa raziskovalna dejavnost je potekala na teh mladica, katere so bile vzgojene po normalnih gojitvenih postopkih. Mladice smo pridobili iz treh različnih drstitev, meseca maja 2009 na postaji IPIMAR. Legla so si različna glede na starost (šteto v dnevih), stopnjah v onotogenskem razvoju in v morfološki razvitosti. Mladice smo pridobili v starosti 4,8 in 10 dni. Te mladice smo nato testirali in izmerili: faktorje sprememb, kateri so posledica različnih prehranskih režimov, izmerili pa smo tudi s kolikšno konstantno hitrostjo so zmožne plavati proti toku- kritična plavalna hitrost, Ukrit.. Razumevanje tega ključno vpliva na razširitev mladice in predstavlja enega od ključnih problemov s katerim se srečujejo morski biologi (Warner in Cowen, 2002; Cowen, 2002; Sale, 2004; Leis, 2009).

Ribe uporabljajo zaščitena območja z nizkimi hitrosti tokov kot nahajališča za leglo iker. Takšne vrste območij nudijo zaščito mladim občutljivim mladim pred predatorji, močnimi tokovi in so ravno tako veliko bolj primerne za lažji ulov hrane v primerjavi z odprtim morjem. Takšno okolje je laguna, regulirana s tokovi bibavice, kar se odraža v višjem številu preživetih mladice v teh območjih. Čeprav so bile za raziskavo uporabljene le mladice *Solea senegalensis* iz postaje IPIMAR, pa je bilo mnogo truda vloženega ravno tako v ulov mladice iz njihovega naravnega okolja. Velik del k sami raziskavi bi pripomogel uspešen ulov, saj bi tako lahko uvideli razliko med mladimi iz umetnega in naravnega okolja, njihovega prehranskega stanja, razlik v Ukrit., razmerju RNA/DNA in povezanosti med temi faktorji.

Območje izlova se nahaja v naravnem rezervatu območja lagune Ria Formosa, ki je poznano kot odlično odlagališče za ikre, drstitveno področje mnogih vrst rib. Ena izmed njih je ravno tako *Solea senegalensis*. Metoda izlova in svetlobna past pa je bila ravno tako namenjena ulovu vrst sardin (*Sardina pilchardus*).

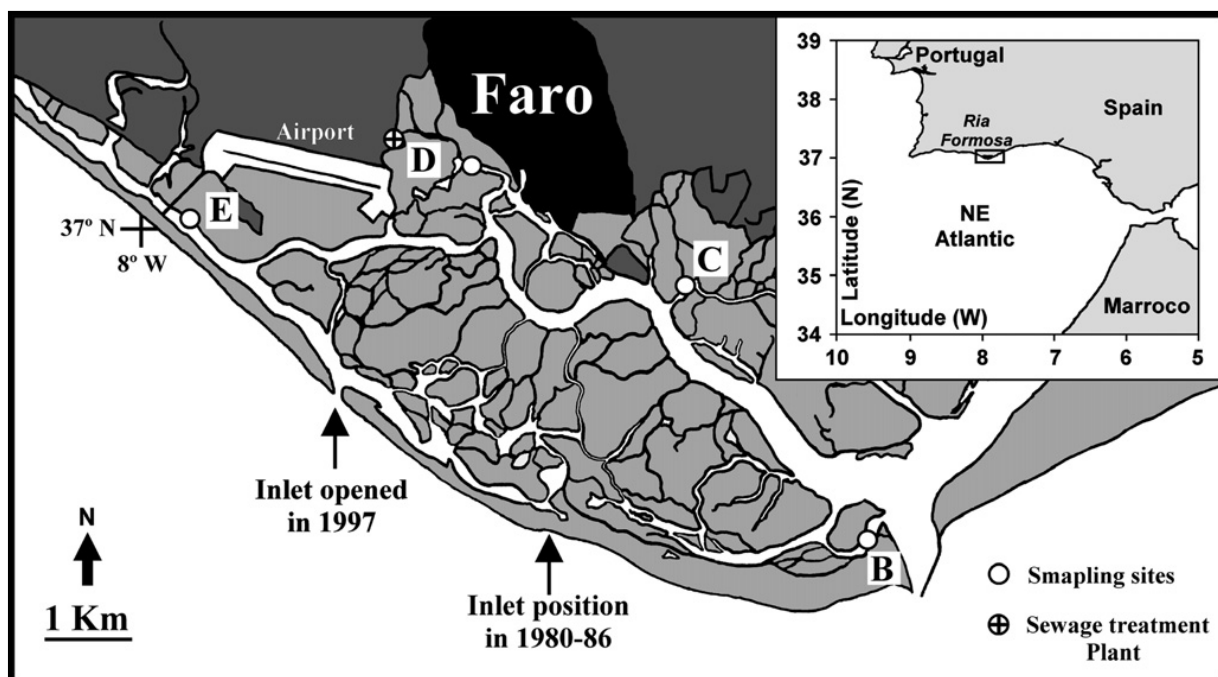
V raziskavo smo ravno tako želeli vključiti primerjavo z drugimi vrstami. Tako smo s postaje IPIMAR pridobili tudi vrsto kavala (*Argyrosomus regius*), predstavnik družine Sparidae, redu perciformnih rib. Ta vrsta je izredno cenjena na trgu, tako da so podatki o odpornosti mladice na stradanje pomemben faktor v gojitveni industriji. Zaradi velike smrtnosti mladice pa raziskava na tej vrsti ni uspela, saj je bila količina pridobljenih podatkov premajhna. Obe vrsti sta imeli v akvarijih enake življenjske pogoje, tako da pripisujemo visoko smrtnost te vrste mnogo zahtevnejšim pogojem, potrebnih za preživetje v nenaravnem okolju. Poznana je kot ena od težje gojitvenih vrst.

Obe vrsti tako *Solea senegalensis* kot *Argyrosomus Regius*, sta bile prenesene na akvakulturno postajo Ramalhate, ki se nahaja na sredi naravnega rezervata Ria Formosa. Na tej postaji so potekale vse raziskave, katere vključujejo še žive osebkke. Nadalje pa je delo potekalo na Univerzi Algarve, Oddelku za morsko biologijo. Ob prenosu mladice iz ene postaje na drugo je bila v zakup vzeta velika previdnost in skrb, tako da ne bi prišlo do nepotrebnih posledic stresa povezanih s spremembami v temperaturi, kakovosti vode in ostalih vzrokov, ki bi na njih lahko vplivali stresno.

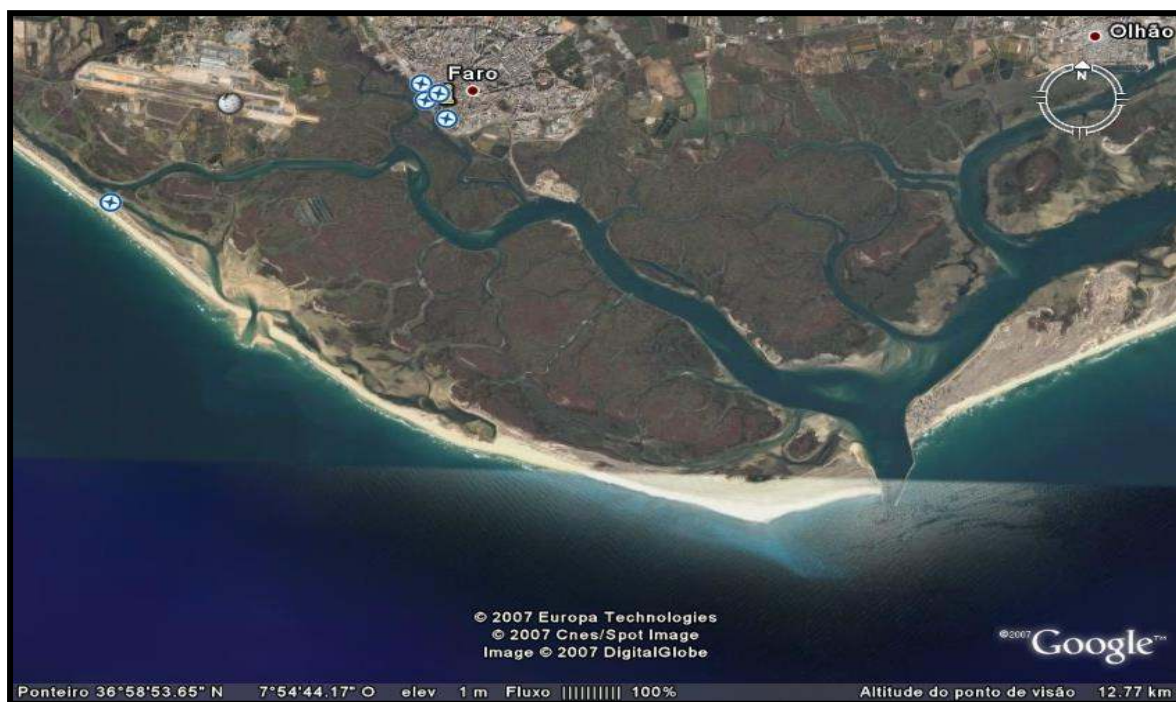
3.2 OPIS OBMOČJA VZORČENJA V NARAVNEM OKOLJU

Ulov v naravnem območju je potekal na jugu Portugalske, delu predela Ria Formosa, katero je veliko območje lagun, ki se razteza čez območje 55 km po dolžini na južnem delu obale Portugalske (36_580N, 8_020W to 37_030N, 7_320W), z največ 6 km širine (Slika 2 in 3). Območje pasu je razdeljeno na dva dela in vsebuje dve tipični karakteristiki: pas obrnjen proti morju je odprt del izpostavljen oceanu, zaščiten z dunami, velikimi skladi peska, notranji pas pa je zaščiten del pred vplivi odprtega morja, sistem slanih močvirij, povezovalnih kanalov, in nanosov naplavin s skupno površino okoli 170 km². Maksimalna sprememba v globini morja je razlika med najnižjo oseko in najvišjo stopnjo plime, katera znaša med 1.30 in 2.80 metra. Minimalna in maksimalna površina pokrita z vodo pa znaša 14.1 in 63.1 km² (Aguas, 1986; Ribeiro in sod., 2008).

Močno razvejan sistem je prepleten s potoki in kanali in povezan z morjem preko 6 odtočnih kanalov. Povprečna globina kanalov, katere poplavlja ritem plime in oseke, je manj kot 3 m, s 14% lagune stalno potopljene. Območje potopljeno v času plime pa obsega 1/3 totalnega območja lagune. Voda je tu načeloma dobro vertikalno premešana, čeprav prihaja v notranjih delih do vertikalne stratifikacije, kjer prihaja do eutrofikacije (Newton in Mudge, 2003; Ribeiro in sod., 2008). Maksimalne obrežne hitrosti tokov so do 4 m/s, česar mladice senegalskega lista ne morejo doseči. Povprečne srednje hitrosti pa se nahajajo med 0.4 in 0.7 m/s. Te hitrosti tokov so posledice bibavice. Sistem je visoko produktiven in zagotavlja idealne pogoje za razvoj iker v mladice in nadaljnji razvoj v odrasle osebkke (Chícharo in sod., 2006; Ribeiro in sod., 2008; Chicharo in sod., 2009). Ta sistem je ravno tako poznan po visoki motnosti območja Ria Formosa 15–26 mg/l raztopljenih organskih snovi (Chícharo in sod., 2001; Chicharo in sod., 2009).



Slika 2- Zahodni del območja Ria Formosa na JZ točki Iberskega polotoka na Portugalskem. Lokacija pod oznako E je bilo področje vzorčenja ribjih mladice s svetlobno pastjo v času najvišje plime.



Slika 3-Satelitska slika lagune Ria Formosa. Križec ob obali označuje ulovno območje.



Slika 4-Bližnji posnetek satelitske slike območja Praia de Faro, označena so ulovna območja, pri čemer je prvi lev križec območje nad mostom, srednji in desni križec pa pomola na notranji strani lagune. Na vseh območjih je ulov potekal ponoči ob najvišji plimi.

3.2.1 ULOV MLADIC

Vzorčenje mladic je potekalo v nočnem času s svetlobnimi pastmi. Najprimernejši čas za ulov se je izkazal ob maksimalnih vrednostih plime glede na lunin cikel. Ob ostalih vmesnih časih pa vzorčenja niso bila izvedena, saj so hitrosti tokov takrat mnogo previsoke, da bi mladice rib lahko zaplavale v past, tudi v primeru ko bi zaznale svetlobo iz pasti. Svetlobna past je bila nameščena z mostu v vodo na dveh različnih mestih vzorčenja na približno 3-4 m globine. Svetlobna past iz akrila ima obliko 25 cm po širini in 50 cm po višini v obliki valja. Pri dnu pasti se baza zoži v mrežo, ki vsebuje valjasto obliko tulca s 30 cm² PVC prostornine s 4 majhnimi (3 cm Ø) odprtinami pokritimi z 500 µm mrežo. S tolikšno prostornino imajo mladice zadostno količino prostora in vode, tudi ko se past potegne iz vode tako da ne pride do stresnih dejavnikov (slika 4). Intenziteta svetlobe je bila predhodno testirana: 8 W in 50 W (obe proizvedene z belo fluorescentno svetilno lučjo postavljeno na sredini pasti). In situ meritve 8 W svetlobne pasti so bile testirane: 10 cm vzdolž pasti in 1.5 m v radiu so bile povprečne intenzitete 618.75 (± 64.70) in 39 (± 64.70) z najbližjim približkom. In situ meritve 50 W žarnice z 10 cm vzdolž pasti in 1.5 m v obsega pa so približne vrednosti 3867.19 (± 404.38) svetlobe in 243 (± 66.70) (Villalta in sod., 2005).



Slika 5- Lovilna past za mladice rib. Prilagojena za ulov mladice s stranskimi majhnimi odprtinami in neonsko lučjo na sredini. Ob koncu se napravo izvleče ven iz morja in mladice se zadržijo na dnu lovilne naprave.

3.3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.3.1 SKRB ZA MLADICE

Skozi onotogenetski razvoj mladice smo opazovali in testirali vzorce obnašanja, z željo po spoznanju kako se v različnih razvojnih fazah razvijajo njihove sposobnosti odzivanja na okolje.

Mladice senegalskega lista smo namestili v akvarije s prostornino 20 L in gostoto osebkov med 100 in 150 na posamezen akvarij. Zagotovljena je bila stalna slanost. Med seboj smo jih ločili glede na različna legla, starost (šteta v dnevih) in glede na različne prehranske pogoje.

Ti prehranski pogoji so bili sledeči:

- hranjene ad libitum- 2 do 3 ure pred testiranjem mladice niso bile hranjene
- 24 ur stradanja
- 48 ur stradanja
- 72 ur stradanja
- 96 ur stradanja
- 120 ur stradanja
- 144 ur stradanja

Mladice brez hrane smo po testiranjih razdelili v dve glavni kategoriji pri čemer so bile bistvene spremembe v doseganju kritične plavalne lastnosti: kratkotrajno stradanje (od 24h do 72h) in dolgotrajno pomanjkanje hrane (96h do 144h). V skladu s potekom raziskave smo stradane mladice vzeli vsak dan iz akvarija, kjer so bile hranjene ali pa smo iz akvarija odvzeli določeno število mladice (daljši kot je bil čas stradanja, več mladice je bilo odvzetih, tako da se je na koncu število enakomerno razporedilo in ostalo zadostno število mladice do konca testiranja) pred hranjenjem, tako da smo zagotovili 24h stradanje za naslednji dan testiranja. Enako je bilo narejeno v akvarijih, kjer mladice niso bile hranjene, vsak dan, tako da smo zagotovili en dan več stradanja za naslednji dan. Z namenom, da jih nismo pretirano izpostavili stresnim pogojem smo jih prenašali z večjo količino vode v petrijevkah. Nikoli nismo testirali vseh mladice, saj so bile nekatere izmed njih kontrolne mladice, namenjene primerjanju različnih vrednosti RNA/DNA. Testirane mladice smo naključno izbrali v različnih akvarijih z različnimi prehranjevalnimi režimi. Tabela v prilogi opisuje razpored. Konstantna temperatura 20- 21 °C je bila zagotovljena, s čimer smo se izognili dodatnim stresnim dejavnikom in zagotovili ustrezne pogoje za morfološki in fiziološki razvoj.

Akvariji so bili povezani s prezračevalnim sistemom in dotokom zraka. Vsaka enota je dovajala v akvarij konstantno zalogo kisika z zračno črpalko in zračnim kamnom, s katerim smo regulirali količino dotoka, z manjšim za mlajše mladice in večjim za starejše, ter ravno tako upoštevali gostoto mladice. Poleg tega je bil povezan tudi filtracijski sistem čistilne naprave s cevjo prekrito z mrežo velikosti 55 µm. Gostota mladice je bila primerna

in ne pretirana, da ne bi prišlo do nepotrebnih smrtnosti. Akvariji so bili pod 12/12 urno fotoperiodo, regulacijo dnevne količine svetlobe. Akvariji, kjer je potekalo hranjenje so bil očiščeni dnevno, akvariji brez hranjenja pa vsak drugi dan. 10% vode je bilo dnevno zamenjane s svežo vodo.

	Starost šteta v dnevih						
	8	9	10	11	12	13	14
A1							
A2							
A3							
A4							
A5							

Slika 6- Prikaz uporab mladice iz drugega legla v plavalni komori glede na prehranske režime.

Črne ribice so hranjene ad libitum, sive predstavljajo mladice s kratkotrajnim stradanjem in prazne so mladice z dolgotrajnim stradanjem.

3.3.2 PREHRANA RIBJIH MLADIC

Mladice stare od 4 do 9 dni so bile hranjene s kotačniki (Rotifera) 3x dnevno in z navpliji vrste solinskega rakca (*Artemia salina*), mladice stare od 6 do 14 dni ravno tako 3x na dan a le s solinskim rakcem. Med hranjenjem je bila vodna črpalka izključena, tak da mladice niso izgubljale nepotrebne energije pri lovljenju plena. Hranjenje je potekalo vsaj 2 uri pred testiranjem kritične plavalne hitrosti, ker bi drugače lahko upočasnili odzive mladice zaradi metabolične dejavnosti. Za hranjenje z navpliji solinskega rakca smo se odločili, ker je to najbližja dieta, katero imajo v naravnih pogojih. Torej smo mladice rib hranili po ad libitum.

3.3.3 IZVALITEV VRSTE SOLINSKEGA RAKCA (*ARTEMIA SALINA*)

Živi plen, kot so slani rakci *Artemia sp.*, so mišljeni kot bistvena prehranska komponenta v valilnicah morskih mladice rib. Za izvalitev se uporabljajo standardne metode. Ker do sedaj še ni na zalogo popolnega umetnega prehranskega nadomestka, ki bi nadomestila *Artemia sp.*, je hranjenje z živimi osebki še vedno esencialen in komercialen del valilnic in ribogojnih postaj (Lavens in Sorgeloos, 1996; Sorgeloos in sod., 2001).

Pred inkubacijo cist so jajčeca dana v svežo vodo za eno uro, brez dodatne zaloge kisika. Inkubacija je bila izvedena pod optimalnimi pogoji s konstantno temperaturo

25- 28 °C in konstantno zalogo kisika. Po izvalitvi in pred hranjenjem mladice smo navplije solinskega rakca ločili od nerazvitih cist z mrežico 55 µm. Po izključitvi aeracije v akvariju za izvalitev, se ovojci cist nabirajo pri vrhu, navpliji pa se zbirajo na sredini oziroma bolj pri dnu.

3.3.4 ROTIFERA

Predstavniki rotifer, *Brachionus sp.*, so bili tudi del prehrane in so bili dodani kot živi osebkki mladim starim od 4 do 9 dni. Rotifere smo dnevno prinesli iz gojilnice, akvakulturne postaje na Univerzi Algarve, kjer uporabljajo standardne postopke za njihov razvoj. Rotifere dodajo v akvarij z 10 L in gostoto 500 osebkov/ml. Vse skupaj za 12 ur postavijo na 20 °C in uporabijo 0.1 g/L emulsije. Po 12h urah jih nežno sperejo pod UV filtracijsko morsko vodo, nato za 1 min še v sveži sladki vodi, za preventivno odstranitev bakterij in nato so pripravljene kot del prehrane (Villalta, 2005).

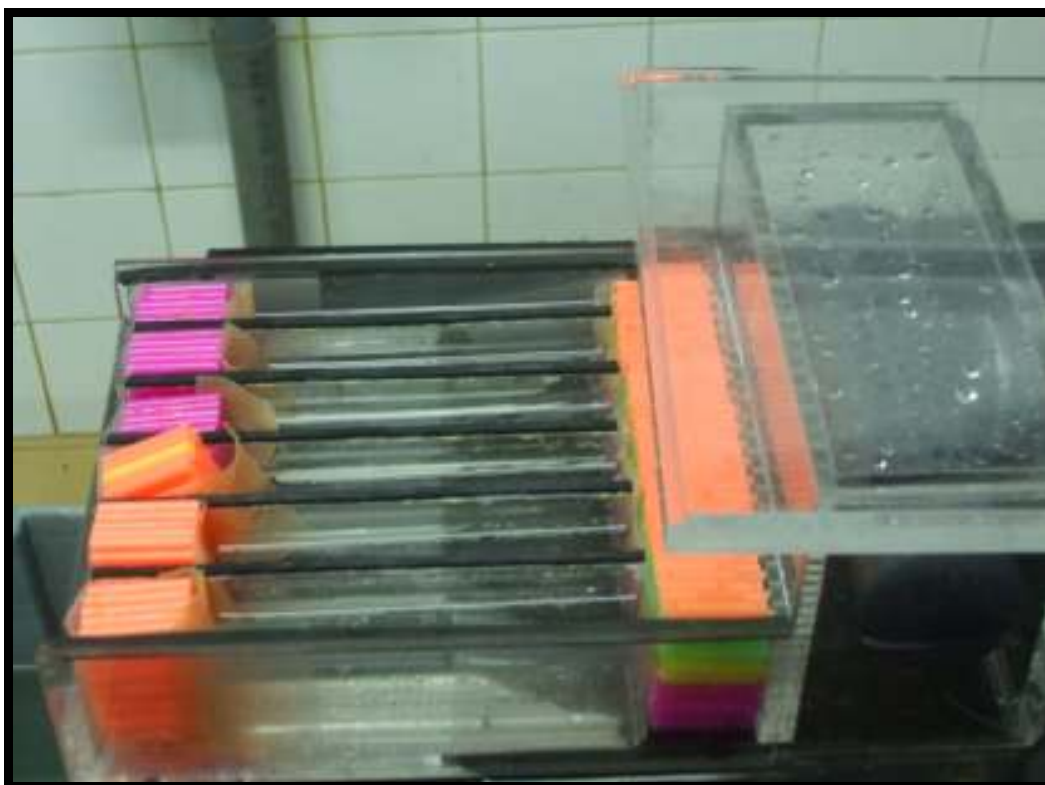
3.3.5 RAZLIČNA LEGLA MLADIC IN NJIHOVA STAROST

V starosti 10 dni se mladice pričnejo pomikati proti dnu akvarija in pričnejo se prve spremembe v telesni zgradbi in morfologiji v sploščeno obliko telesa. Popolno preobrazbo dosežejo v starosti 20- 25 dni, ko poteče še zadnja sprememba- popolna migracija oči na eno stran telesa. Skozi to periodo razvoja, se rast in poraba hrane ter kisika močno zmanjša (Parra, 1998; Villalta, 2005). Po metamorfozi v sploščeno obliko porabijo večino energije za plavanje, iskanje hrane, hranjenje in izogibanje potencialnim predatorjem z zakopavanjem in skrivanjem v pesku. (Miyazaki in sod., 2000; Villalta, 2005). Zaradi tega razloga smo merjenje Ukrit. prenehali, ko so mladice starejše od 14 dni, saj jih ob tej starosti in pravih pogojih za razvoj že večina ostane pri dnu in ne vlagajo več energije v plavanje. Ravno tako se pri poskusih z ribjimi mladimi meri tudi dolgotrajno konstantno hitrost. Sposobnosti dolgotrajne konstantne hitrosti plavanja pri enakomerni hitrosti v času 24 ur bi lahko podale informacije tega parametra v odvisnosti od RNA/DNA spremembe razmerij. Mladice *Solea senegalensis* se preobrazijo v sploščene osebkke in ne vzdržujejo konstante hitrosti plavanja, saj se zadržujejo pri dnu, te meritve niso bile izvedene.

3.3.6 PLAVALNA KOMORA

Plavalna komora je bila uporabljena po sledeči metodi Stobutzki in Bellwood(1994, 1997; Faria in sod., 2009). Zgrajena je iz čistega poliakrilnega materiala s 6 paralelnimi plavalnimi linijami, vsaka z 30 mm širine, 50 mm višine in 180 mm dolžine. Prenosljiv pokrov je bil nameščen na vrhu, skozi katerega je bilo moč opazovati premikanje osebkov, ter dodajanje in odstranjevanje osebkov v linijah. Na začetku in koncu plavalne steze so bile nameščene mreže, tako da ko mladica ni več zmogla plavati je ni odneslo iz komore, ampak se je ujela v mrežico. Skupek slamic, dolžine 40 mm, je bil ravno tako nameščen na začetek in konec linij,

tako da so bili efekti turbulence minimalni. Predhodnja dela so dokazala, da tipična Ukrit. vodnega toka, ni prihajalo do razlik med centrom linije in 5 mm od sten (Stobutzki in Bellwood 1997, Stobutzki 1998; Fisher in sod., 2000; Faria in sod., 2009). Prav tako so dokazali s poskusi, da ne prihaja do sprememb, glede na kateri globini se mladica nahaja. Del plavalne komore je tudi natančno dodelan sistem, ki nadzoruje vodni tok. Podvodna črpalka je črpala vodo iz zbirnega akvarija, ki se je nahajal pod plavalno komoro (Faria in sod., 2009). Voda je tekla čez komoro in se izlila na drugi strani v zbirni prostor s hitrostjo med 100- 300 L/min, odvisno od odprtosti regulacijske ročke. Ta se je nahajala na zgornjem delu pred vhodom v komoro. Kot ročke, katera je nakazoval specifično hitrost toka, je bil preračunan in kalibriran.



Slika 7- Plavalna komora s privzdignjenim pokrovom.



Slika 8-Plavalna komora. Prikaz smeri vodnega toka. Iz zgornje strani pritok vode v komoro in odtok na spodnji strani.

3.3.7 KALIBRACIJA

Kalibracija hitrosti vodnega toka iz vodne črpalke je bila izmerjena z merjenjem časa, iztopne vode do zapolnitve 5 L velike posode. To število je bilo nato deljeno z zmnožkom števila linij ter njihovim presekom. V izračun je bilo zavzeto povprečje treh kalibracij za določeno hitrost nakazano s premikom ročke za določen kot. Kalibracijska krivulja je bila narejena od pričetka merjenja z določenim kotom ročke, ki nakazuje hitrost toka vode. Krivulja nam je omogočila determiniranje hitrosti skozi poskuse (Faria in sod., 2009). Poskusne hitrosti so bile vse od začetne 0.0842 cm/s pa do 8 cm/s. Tabela z vrednostimi hitrosti toka posameznih stopenj se nahaja v prilogah.



Slika 9- Prikaz posameznih umeritvenih točk določene stopnje hitrosti, glede na kot premika ročke.

3.3.8 PROTOKOL MERJENJA PLAVALNIH SPOSOBNOSTI RIBJIH MLADIC

Poskusi na gojenih mladich so potekali skozi obdobje starostnega razvoja mladice od 5 pa do 14 dni starosti (tabela v prilogah). Mladice iz treh različnih drstitev so bile uporabljene z razlogom, da ne bi prišlo, do nezanesljivih rezultatov zaradi preference le enega legla. Iz akvarijev smo jih prenašali s petrijevkami vsako posebej v linije plavalne komore, tako da ni prihajalo do pretiranega stresa. Mladice smo nato aklimatizirali na nov prostor v času dveh minut. Za tem smo jih še nadalje pripravili na novo okolje in pustili pod enakomerno hitrostjo toka 1 cm/s še nadaljne tri minute. Mladice, ki so v tem času pričele kazati simptomatske znake podleganja stresu, kot so na primer ležanje na dnu, iskanje zavetja v kotih, so bile zamenjane z novimi, katere so bile sposobne plavati proti enakomernemu toku. V komori se nahaja 6 linij, a v vsakem poskusu so bile uporabljene le srednje 4 za boljši nadzor nad dogajanjem in ravno tako nekoliko nižje hitrosti toka v stranskih dveh linijah. Ko se se mladice aklimatizirale na novo okolje, smo začeli povečevati po stopnjah hitrosti toka, vsakič za eno stopnjo, na vsaki dve minuti. Ko smo merili Ukrit. pri mladich starih od 5 do 8 dni, smo to naredili brez pokrova komore, zaradi majhnosti osebkov in boljše preglednosti. Te mladice ravno tako niso dosegale visokih vrednosti Ukrit. tako, da odstranjen pokrov ni vplival na spremembo hitrosti toka. Po testiranju vsakega individualnega osebk, smo jih s čim manj morske vode premestili s pipeto v epruveto in dali v posodo s tekočim dušikom za takojšnjo zamrznitev osebk pri temperaturi -196 °C in nato shranili v skrinji pri temperaturi -80 °C. Shranili smo jih v ependorfskih epruvetah z ustrezno označbo. Ravno tako smo pred zamrznitvijo približno izmerili njihovo telesno dolžino z milimetrskim papirjem. Temperatura vode v plavalni

komori se je ves čas nahajala med 21 °C in 23 °C. Za vsako testirano epizodo (različna starost mladice, različno leglo in različen prehranski režim) smo naključno izbrali 3 kontrolne mladice iz akvarija, katerih nismo testirali v plavalni komori in s tem naknadno pridobili rezultate vpliva utrujenosti na spremembo v razmerju RNA/DNA.

3.3.9 KRITIČNA PLAVALNA HITROST

Kritična plavalna hitrost (U_{krit.}) nam zagotavlja uporabno oceno maksimalne plavalne hitrosti, ki jo lahko doseže mladica (Plaut, 2001; Fisher, 2005; Leis, 2006). Merili smo jo glede na izračun po Brett(1964 ; Leis, 2009).

3.3.9.1 ENAČBA ZA IZRAČUN KRIČNE PLAVALNE HITROSTI- Ukrit.

Kritična plavalna hitrost je izračunana po Brett (1964 ; Leis, 2009) (1):

$$U_{krit.} = U + (t/t_i \times U_i) \quad \dots(1)$$

Pri čemer je U najvišja hitrosti pri kateri je mladica še uspela plavat proti toku, U_i je pojačanje hitrosti (2 cms–1 v študiji), *t* je koliko časa je plavala pri tej zadnji hitrosti in *t_i* je čas intervala med povečanjem hitrosti za eno stopnjo (vedno 2 min v našem primeru) (Leis in sod., 2009).

4 LABORATORIJSKE ANALIZE

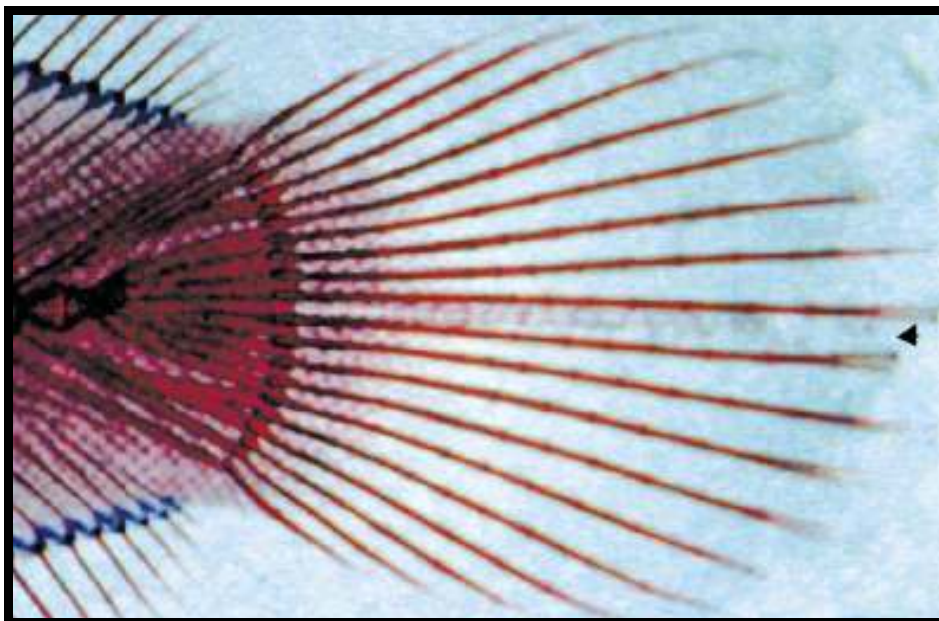
4.1 MERITVE ZUNANJIH TELESNIH ZNAČILNOSTI

Za merjenje telesne dolžine mladice rib smo v laboratoriju uporabili mikroskop (ZEISS DISCOVERY V8), povezan s kamero (Canon power shot A640) in lučjo (ZEISS –stereo CL 1500 ECO). Vsak osebek posebej smo fotografirali, pred tem vzeli iz epruvete in za tem hitro zamrznili nazaj z razlogom, da ne izgubimo pomembnih informacij z nadaljnjo analizo RNA/DNA. Mladice smo identificirali in natančno izmerili telesno dolžino do 0.1 mm natančno z J image software (Version 1.40 g). Po tem smo mladice rib z odprtimi epruvetami postavili v sušilec, liofilizator, kjer smo jih posušili do suhe teže v vakuumu pri 4 °C za 24h. Za tem smo jih stekali in določili suho težo posameznega osebka z mikro balansirano tehtnico (Precisa 92SM-202A) do ± 0,0001g natančno.

4.2 ZUNANJE METAMORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI MLADIC VRSTE *SOLEA SENEGALENSIS*

Metamorficzne značilnosti posamezne stopnje razvoja smo ocenili z ocenami od 1 do 5 glede na zunanje prepoznavne značilnosti:

- 1- pelagične, bilateralna simetrična oblika telesa, vertikalna smer plavanja, usta malo odprta, ni pigmentacije kože. Telesna dolžina približno 3 mm.
- 2- Pelagične, bilateralna simetrična oblika telesa, ni več vidne jajčne vrečke, usta na široko odprta, pojavijo se prvi znaki pigmentacije kože. Telesna dolžina približno 3.5-4 mm.
- 3- Podobne oblike kot mladice rib z velikostjo 4 mm. Večja pigmentacija kože, vertikalna smer plavanja.
- 4- Pelagična, asimetrična oblika telesa, prvi pojavni znaki migracije levega očesa, levo oko še vedno na ventralni strani dorzalno- mediane linije. Prvo pojavljanje absorpcije žarkov dorzalne plavuti, prvi znaki lateralne sploščenosti telesa in spremembe v smeri plavanja.
- 5- Levo oko preide na drugo stran dorzo-mediane linije, asimetrična mladica, bentična. Lateralna sploščena oblika telesa, vidni žarki plavuti (Klaren in sod., 2008).



Slika 10- Prikaz kavdalne plavuti mladice (*Solea sp.*) dolžine 60mm, pri čemer so že popolnoma vidne skeletne strukture repne plavuti.

4.3 STOPNJE FLEKSIJE

Poznane so tri osnovne stopnje po katerih se determinira razvitost mladice glede na razvojno stopnjo razvitosti hrbtenice.

1. prefleksija: stopnja razvoja od izvalitve pa do začetka fleksije hrbtne strune navzgor v horizontalno smer, od predhodnjega podvihanega repa.
2. fleksija: fleksija hrbtne strune in razvitost kavdalnih kosti, že popolna vertikalna pozicija.
3. post-fleksija: formacija kavdalnih plavuti, hipuralni elementi so vertikalno, popoln razvoj žarkastih plavuti.

4.4 RNA/DNA ANALIZE- ANALIZE NUKLEINSKIH KISLIN

Merjenje RNA in DNA je poteklo na mikroploščah, kjer smo determinirali vrednosti s pomočjo fluorescentne vsebnosti (MFA) po Wagner in sod. (1998). MFA vsebnost je modifikacija sekventne fluometrične metode po Bentle in sod. (1981), pri kateri sta RNA in DNA v enkratnem vzorcu determinirani s sekvencioniranjem s pomočjo dodane DNAaze in RNAaze, uporabo etidijum bromida- EB in fluorescentnega barvila (Caldarone in sod. 2001). MFA je modificirana sekvenčna metoda s 96. mikrotiter prostori na podstavku za vzorce, z dodatkom sarkozyl ekstrakcijske tehnike in eliminacijo z DNAazo. Celotni osebki so bili homogenizirani s sonifikacijo (3 pulzi 50 A v času 1 min) z dodatkom mrzlega sarkozyl ekstrakcijskega pufra. Volumen pufra je bil predhodno preračunan na velikost vzorca in znaša 500 μ l (0.5 %). Vzorci so bili nato pretreseni na sobni temperaturi na vorteksu prirejenemu s stojalom za multiple vzorce epruвет. Mešali smo 1 uro. Nato je potekala centrifugacija (12000 xg) za 15 min, toliko da je prišlo do ločitve netopnih ostankov osebka. Vzorce smo nato razredčili z 1:10 Tris pufrom, in s tem zmanjšali koncentracijo sarkozyla do 0.05%. Nato je potrebno postopek ponoviti. Vsakič smo dodali 50 μ l supernatanta vzorca in 0, 0.6, 1.1, 1.7 ali 2.3 μ g ml⁻¹ DNA za standardno solucijo, iz katere je nato razvidno standardna umeritvena krivulja. 16s–23s *E. coli* RNA (4 μ g μ l⁻¹), 0, 3.6, 7.3, 10.9 ali 14.6 μ g ml⁻¹ RNA standard solucije (16s–23s *E. coli* 4 μ g μ l⁻¹ iz Roche) smo prenesli na podstavek s 96 prostorčki za vzorčenje s tipičnim ovalnim črnim dnom vsakega od njih. Povprečno razmerje DNA in RNA krivulje je bilo 3.9 ± 0.45 , kar je bilo nato uporabljeno za primerjavo RNA/DNA razmerij rezultatov determiniranih po protokolu Caldarone in sod. (2006).

Solucija EB (30 μ l) je bila dodana v vsak prostorček, nato smo nežno pretresli podstavke z mešanimi vzorci pri sobni temperaturi za 15 min. EB fluorescenca je bila skenirana z bralcem mikropodstavek (Biotek synergy HT model SIAFRTD) pri valovnih dolžinah 360 nm (ekscitacije) in 590 nm (emisije). Prvo branje je bilo totalna fluorescenca RNA in DNA hkrati. Po prvem branju, je dodana raztopina z RNAazo (30 μ l 0.12 μ g ml⁻¹) v vsako vzorec na podstavku in koncentracija DNA je bila nato preračunana direktno preko standardne krivulje. Koncentracija RNA je bila determinirana direktno iz odstavka konc. DNA fluorescence (drugo branje) od totalne koncentracije (prvo branje).

Ponavadi se za postopek analize razmerja uporabi mladice z odstranjenim delom črevesja in glave, a zaradi majhnosti osebkov, smo uporabili celotni osebek.

4.4.1 POSTOPEK ZA SPEKTROFLUOROMETRIJO

- Mikroplate z 96 prostorčki smo pripravili za uporabo.
- Na računalniku se izbere kateri genetski program ter stopnjo ekscitacije in emisije.

4.4.2 TEHNIČNI POSTOPEK

Vsak individualni organizem analiziramo za vsebnost nukleinskih kislin in razmerja RNA/DNA: predhodnje preverimo velikost osebkov.

1. homogenizacija organizma z 150 μ l Sarcosine-Tris (STB) (0,5%) in sonikatorjem 3 pulzi 50 A v 1 min.
2. vortex- 30 min
3. raztapljanje v 200 μ l Tris pufra (TB)
4. Centrifugiranje 15 min. pri 12 000 r.p.m. (0-4°C);
5. OdpiPETiranje od supernatanta v epruveto in dodamo Tris buffer raztopino:
mladice rib < 5 mm- 50 μ l 120
a. mladice rib 5-10 mm- 25 μ l 145
6. Dodamo 30 μ l EB in merimo rdečo fluorescenco pri 365 nm ekscitacije in 590 nm emisije ter ravno tako poiskujemo 270 nm em. in 650 nm ek.
7. Pripravimo raztopino z RNAazo (WS 0,12 μ g/ml) :
8. 300 μ l zmrznjenega pripravka RNAaze (0,4 μ g/ml) + 700 μ l Tris-pufra ali 100 μ l zamrznjenega pripravka RNAaze (1,2 μ g/ml) + 900 μ l Tris-pufra
9. Dodamo 30 μ l RNAaze in inkubiramo 30 min. pri 37°C
10. Zopet beremo fluorescenco

4.4.3 REAGENTI

Vsi reagenti, katere smo uporabljali so podrobno vpisani v preglednici dodani v prilogi.

4.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

V raziskavo smo zavzeli vsega skupaj 670 mladice *Solea senegalensis* iz treh različnih legel (leglo 1- 100 osebkov, leglo 2- 300 osebkov, leglo 3- 270 osebkov). Vse osebkove (razen kontrolnih) smo testirali za plavalne sposobnosti, skupaj s kontrolnimi pa smo izmerili telesno dolžino, suho maso telesa, RNA/DNA vrednosti. Na koncu smo zavzeli mnogo manjše število mladice v končno analizo. Prvi razlog je zanesljivost podatkov le iz 2 legla, drugi pa pomankljivosti določenih parametrov pri posameznih osebkih. Varianca podatkov smo podali kot standardno napako S.D. srednje vrednosti posameznih merjenih parametrov. Te podatke

smo ločili med sabo in izmerili varianco s S.D. glede na posamezne kategorije: fleksija, morfolška stopnja razvoja, starost v dnevih in prehranski režimi. To smo izračunali za vsa legla skupaj ter tudi ločeno.

Te variabilne parametre smo nato primerjali z formulami za izračun rezistentnosti na podhranjenost:

- Fulton indeks
- R prehranski indeks
- telesna dolžina (mm)
- suha telesna masa (mg)

Izmerili smo vse opisane parametre za vsako individualno mladico.

Opis posameznega indeksa se nahaja spodaj.

Za izračun statističnih analiz smo uporabili program SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) z inkorporiranimi standardnimi napakami in standardnimi deviacijami.

Linearna regresijska analiza je bila uporabljena za določanje zveze povezane s telesno velikostjo (standardna velikost, starost, Ukrit. in RNA/DNA razmerja za vsak prehranjevalni sistem posebej (ad libitum, kratkotrajno in dolgotrajno stradanje).

Variabilne vrednosti standardne telesne dolžine, Ukrit. in RNA/DNA smo logaritmirali za normalnejšo razporeditev podatkov. Pri vseh vzorcih je bila meja zaupanja $\geq 95.50\%$.

4.5.1 FULTONOV INDEKS

Fultonov kondicijski indeks je na široko uporabljen pri statističnih analizah povezanih s splošno biologijo rib in pri ribištvu. Faktor je izračunan iz razmerja odvisnosti suhe mase osebkov s telesno dolžino, z namenom opisati prehrambeno stanje, rezistentnost posameznika na pomanjkanje hrane.

Formula za izračun (2):

$$K = W^1/L^3 \quad \dots(2)$$

Pri čemer je K= Fultonov kondicijski faktor, W^1 = telesna teža v mg in L= celotna telesna dolžina izražena v mm. Lestvica je ponavadi dodana za lažjo karakterizacijo posameznih vrednosti katere se približujejo 1 (Nash, 2006).

4.5.2 INDEKS SUHE TELESNE TEŽE- TELESNE DOLŽINE- R- KONDICIJSKI INDEKS

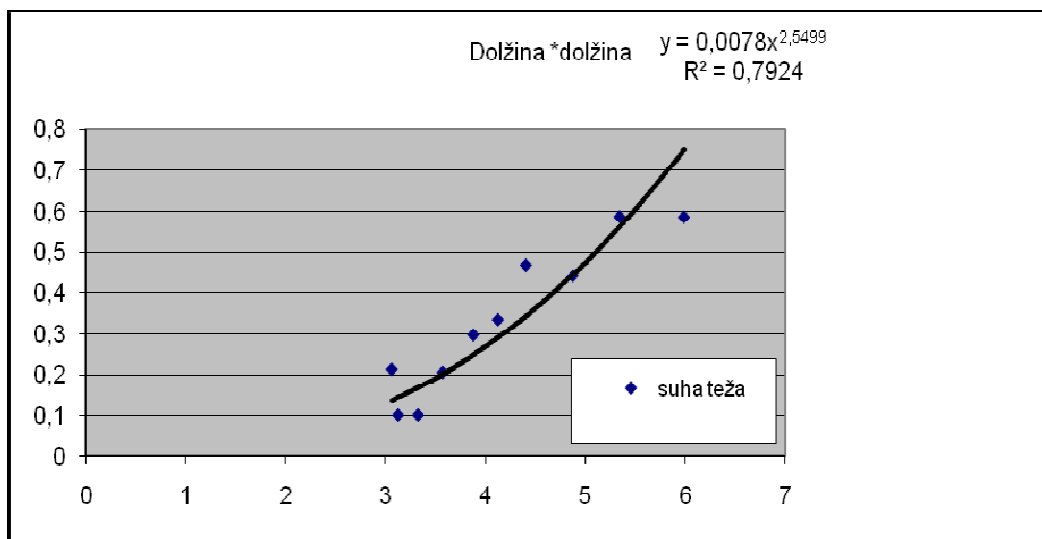
Fultonov K kondicijski indeks, kateri je kritiziran, da se preveč nagiba na izometrično rast (i.e., $b = 3$ in $W = a \cdot L^b$), ter da je preveč odvisen od telesne dolžine (Suthers 1998), smo v našem primeru opustili in tako izračunali še R-kondicijski indeks. Morfometrični R-indeks ,

smo tako lahko primerjali z indeksom K. R je relativen indeks, ki bazira na rezidualnosti direktno iz logaritmiranega razmerja mase in velikosti osebka (deviacija predvidevane mase je ocenjena iz povprečja logaritmiranega razmerja dolžine- mase v normalnih meritvah pri ribah (Fechhelm in sod., 1995, 1996).

Izračun za kondicijski indeks (3):

$$R = \log W - \log W_c \quad \dots(3)$$

Pri čemer je W izmerjena telesna masa in W_c izračunana telesna masa (glede na log. dolžina-masa razmerja izpostavljenega za vsako vrsto posebej od vseh ujetih osebkov skupaj). R nam poda relativno kondicijsko vrednost stanja posameznega osebka v primerjavi s srednjo vrednostjo vseh. Stanje osebka v proporcionalni odvisnosti od rezidualne vrednosti.



Slika 11- Kalibracijska krivulja za Fulton kondicijski indeks.

5 REZULTATI

5.1 KRITIČNE PLAVALNE HITROSTI

Pridobili smo kritične hitrosti Ukrit. Mladic in izračunali srednje vrednosti, ločene glede na posamezna legala in znotraj tega ločene glede na starost šteto v dnevih. V tabelah je izpisana tudi standardna deviacija in standardna napaka srednje vrednosti. Razvidno je, da se Ukrit. hitrosti med legli močno razlikujejo, posebej odstopa 3 leglo. V nadaljevanju smo se osredotočili na drugo leglo zaradi zanesljivosti podatkov.

Tabela 1- 1 leglo, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n= 100)

Starost v dnevih	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka srednje vrednosti
11	1.33	0.67	0.19
12	1.82	1.14	0.26
13	1.26	0.72	0.21
14	4.04	1.38	0.62

Tabela 2- Leglo 2, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n=300)

Starost v dnevih	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka srednje vrednosti
8	2.02	1.48	0.47
9	1.91	1.26	0.29
10	1.05	0.65	0.11
11	1.56	1.00	0.19
12	2.17	1.02	0.16
13	1.00	0.75	0.16
14	1.05	0.45	0.12

Tabela 3- Leglo 3, srednje vrednosti kritične hitrosti s standardno deviacijo in standardno napako srednje vrednosti. (n=300)

Starost v dnevih	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka srednje vrednosti
5	0.57	0.28	0.08
6	0.61	0.34	0.07
7	0.57	0.32	0.06
8	0.52	0.36	0.05
9	0.69	0.53	0.09
10	0.50	0.42	0.07
11	0.41	0.37	0.07
12	0.44	0.48	0.10

Ocenjene hitrosti vseh mladice tako hranjene ad libitum kot tiste podvržene kratkotrajnemu stradanju nam dokazujejo, da dosegajo iste Ukrit., katere se gibajo med povprečnimi vrednostmi 1.15 cm/s in 2 cm/s. Opazna je nenadna porast pri mladiceh z dolgotrajnim stradanjem in sicer kar od povprečnih hitrosti 2.21 cm/s do 4 cm/s. Mladice tretjega legla dosegajo nizke Ukrit. ne glede na to koliko so stare ali kakšen je njihov prehranski režim. Mladice drugega legla, ki so hranjene ad libitum pa dosegajo vedno nižje hitrosti glede na njihovo povečano starost. Ostale mladice podležene kratkotrajnemu ali dolgotrajnemu stradanju pa dosegajo podobne Ukrit. srednje vrednosti med 1 cm/s in 3 cm/s, pri čemer se izkaže, da so najhitrejšie plavalke stare 11 in 12 dni, tik pred metamorfozo ne glede na način prehrane, pod pogojem, da so že v stanju fleksije. Opazen je tudi rahel upad kritičnih hitrosti pri mladiceh z daljšo dobo stradanja.

5.2 MORFOLŠKA PRIMERJAVA ONTOGENETSKEGA RAZVOJA

Morfolška primerjava ontogenetskega razvoja mladice, ter razlaga za izbor drugega legla za nadaljnjo obdelavo podatkov. Vsako mladico posebej smo slikali pod lupo 40x povečave in opredelili bistvene razlike v morfolškem razvoju ali zaostanku zaradi pomanjkanja hrane.

Iz rezultatov kritičnih plavalnih hitrosti je razvidna velika razlika med vsemi tremi legli, predvsem je opazen zaostanek tretjega legla. Tudi v samem morfolškem razvoju so opazne velike razlike med enako starimi mladice različnih legel (slika 12 in 13). Mladica iz tretjega legla (slika 12) je stara 12 dni, hranjena ad libitum, a kljub temu pigmentacija ni razvita, telo je še vedno v poziciji vertikalne smeri plavanja, ima pelagična oblika telesa, žarki dorzalne plavuti še niso razvidni, hrbtna struna pa je v stanju pre-fleksije. Medtem ko je mladica iz drugega legla (slika 13) iste starosti in enako hranjena že pigmentirana, telo pridobiva bočno sploščeno obliko, ima naprednejšo razvitost telesa, vidni so žarki plavuti, hrbtenica pa je v stanju post-fleksije.



Slika 12- Leglo 3, 12 dni, hranjena ad libitum: pigmentacija ni razvita, telo je še vedno v poziciji vertikalne smeri plavanja, pelagična oblika, žarki dorsalne plavuti se niso razvidni, stanje pre-fleksije.



Slika 13- Leglo 2, 12 dni, hranjena ad libitum: pigmentacija dobro razvita, telo pridobiva bočno sploščeno obliko, naprednejša razvitost telesa, vidni žarki plavuti, stanje post-fleksije.

Mladice iz tretjega legla smo pridobili v zelo zgodnjem razvoju stadija mladice pri 5 dnevih starosti, medtem ko smo drugo leglo pridobili pri 8 dneh starosti z dobro telesno razvitostjo. Mladica 3 legla, na prvi dan poskusov (slika 14) je imela še prisotno jajčno vrečko, slabo razvito pigmentacijo, popolnoma nerazvito repno plavut in stanje pre-fleksije. V primerjavi z najšibkejšimi mladimi pa so mladice iz drugega legla konstantno hranjene z ad libitum, dosegle popolno razvitost do stopnje v preobrazbo v odrasli osebek, pri čemer so ključni znaki (slika 15): premik levega očesa na drugo stran dorzo mediane linije, zaključena pigmentiranost, bočna sploščenost, stanje post-fleksije. Pri tej stopnji razvitosti smo prenehali meriti kritično hitrost, saj se mladice zadržujejo izključno pri dnu.



Slika 14- Leglo 3, 5 dni, ad libitum, jajčna vrečka: slabo razvita pigmetacija, se vedno prisotna jajčna vrečka, popolna nerazvitost repne plavuti, stanje pre- fleksije.



Slika 15- 14 dni, 24h brez hrane, 2 leglo: premik levega očesa na drugo stran dorzo mediane linije, zaključena pigmentiranost, bočna sploščenost, stanje post- fleksije, zaključno stanje metamorfoze, oziroma zadnje stanje, ko smo se izvajali poskuse v plavalni komori za kritično hitrost.

5.2.1 LEGLO 2

Osredotočili smo se na drugo leglo iz večjih razlogov. V razpredelnici so navedene vse bistvene spremembe v ontogenetskem razvoju mladice od prvega dne testiranja plavalnih sposobnosti (8 dni) pa do zadnjega dne (14 dni), ko zaradi procesa metamorfoze ni bilo mogoče več meriti plavalnih sposobnosti, saj so se mladice zadrževale pri dnu.

Tabela 4- Mladice *Solea senegalensis*, drugega legla in njihove morfološke spremembe posledično zaradi različnih prehranskih pogojev, dolžine stradanja in različnih starosti.

Opis prehranskih pogojev, morfološke značilnosti in starost mladice	Slika
8 dni, hranjena: stanje fleksije, pigmentacija le na določenih delih telesa, simetrija telesa se prisotna, usta z majhno odprtino.	 Slika 16-mladica <i>Solea senegalensis</i>, 8 dni, hranjena
9 dni, hranjena ad libitum: močnejše da trebušna in repna pigmentacija, večja odprtina ust, stanje fleksije, se vedno simetrija telesa.	 Slika 17- mladica <i>Solea senegalensis</i>, 9 dni, hranjena ad libitum
10 dni, hranjena ad libitum: rahla bočna sploščenost repa in telesa, popolnejša pigmentacija trupa, stanje med fleksijo in post-fleksijo.	 Slika 18- mladica <i>Solea senegalensis</i>, 10 dni, hranjena ad libitum

10 dni, 48h stradanja: stanje med pre-fleksijo in fleksijo, telo še vedno simetrične oblike, usta z manjšo odprtino.		
11 dni, hranjena: bočno sploščena oblika telesa, stanje post fleksije, žarkasta razvita repna plavut, viden tudi poln želodec od hranjena z artemijami.		
11 dni, 72h stradanja: stanje fleksije, vidno slabše razvita morfologija telesa, simetrično telo.		
12 dni, hranjena ad libitum: vidna prsna in hrbtna razvitost sploščenih oblik plavuti, ravno tako repna, stanje post-fleksije, razvito telo, asimetrična oblika, popolna črna pigmentacija oči.		

Slika 19- mladica *Solea senegalensis*, 10 dni, 48h stradanja

Slika 20- mladica *Solea senegalensis*, 11 dni, hranjena

Slika 21- mladica *Solea senegalensis*, 11 dni, 72h stradanja

Slika 22- mladica *Solea senegalensis*, 12 dni, hranjena ad libitum

13 dni, hranjena: migracija očesa na drugo stran, asimetrična bočno sploščena oblika telesa, razvitost vseh plavuti v horizontalni smeri, post-fleksija.		Slika 23- mladica <i>Solea senegalensis</i>, 13 dni, hranjena
14 dni, hranjena ad libitum: oko že migriralo na drugo stran, popolna sploščenost, stanje post-fleksije, popolna pigmentacija.		Slika 24- mladica <i>Solea senegalensis</i>, 14 dni, hranjena ad libitum
14 dni, 72 ur z deprivacijo hrane: telo se simetrično, post-fleksija, vidna nerazvitost telesa v primerjavi z enako starim osebkom hranjenim ad libitum, še nerazvite bočno sploščene plavuti.		Slika 25- mladica <i>Solea senegalensis</i>, 14 dni, 72 ur z deprivacijo hrane

5.3 PLAVALNE SPOSOBNOSTI

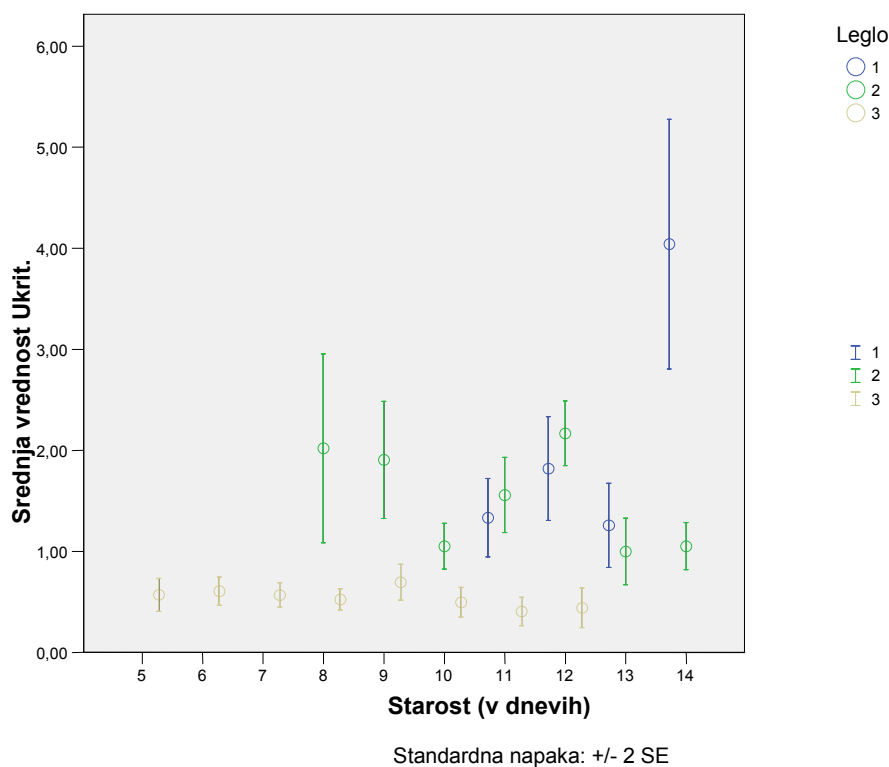
Skupno 700 mladice vrste *Solea senegalensis* smo vzeli v poskus iz treh različnih legel. 100 mladice iz prvega, 300 iz drugega in 300 iz tretjega legla. Ocenjene srednje vrednosti Ukrit. mladice iz različnih legel, ločene po starosti, brez ločitve hranjenih ali podhranjenih mladice se med seboj močno razlikujejo glede na posamezna legla (slika 26). Izražene so v cm/s: za boljše razumevanje: 28 cm/s = 1 km/h. Najbolj razvidna razlika je pri tretjem leglu, kjer so komaj opazni znaki plavanja proti toku.

Mladice stare od 4- 6 dni so časovno vzdržale plavati proti toku pri zadnji najvišji hitrosti 30 ± 3 s, mladice stare od 6-9 dni približno 60 ± 5 s in mladice stare od 10-13 dni so vzdržale plavati proti toku 120 ± 7 s. Mladice iz prvega in drugega legla so izboljšale plavalne

sposobnosti za več kot 100% v primerjavi z leglom 3 tekom ontogenetskega razvoja. Srednja vrednost kritične hitrosti mladice prvega legla je 1.79 ± 1.24 cm s⁻¹, kar je velika razlika v primerjavi s 3 leglom z 0.54 ± 0.41 cm s⁻¹. Statistični rezultati izračunanih srednjih vrednosti Ukrit. (cm/s), standardne deviacije in $\pm$ razpon od srednje vrednosti pri mladnicah ločenih legel in starosti nam prikazujejo trende naraščanja kritičnih plavalnih hitrosti v skladu z povečano starostjo (tabela 5). V izračun smo vključili mladice stare 13 in 14 dni pri katerih pa nismo upoštevali mladice, ki so ostale na dnu zaradi pričetka procesa metamorfoze. Vključno z vsemi mladnicami tako hranjenimi kot podhranjenimi skupaj. Najvišjo vrednost Ukrit. so dosegle mladice prvega legla pri 14 dneh starosti s srednjo vrednostjo 4.04 cm/s. Mladice drugega legla se po starosti med seboj ne razlikujejo mnogo, sprememba vseh je za ± 1 cm/s za vrednost 1.5 cm/s. Mladice tretjega legla pa so izredno slabo plavale proti toku, v primerjavi z ostalimi dvema in sicer s povprečnimi vrednostmi manj kot 0.70 cm/s (in še ta vrednost pripada hranjenim mladnicam).

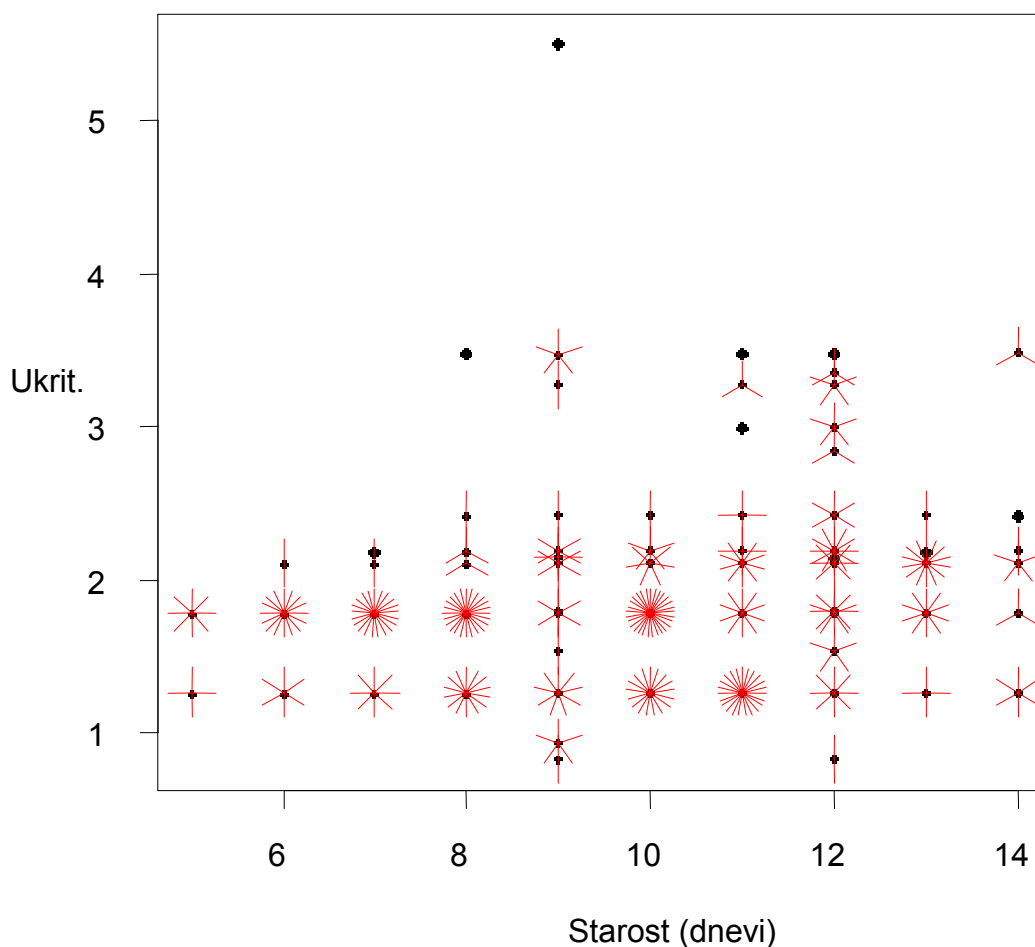
Tabela 5- Srednja vrednost Ukrit. s standardno deviacijo in razponom od srednje vrednosti plavalnih sposobnosti, vključno z mladnicami starimi 13 in 14 pri katerih niso vključene tudi mladice, ki so ostale na dnu zaradi metamorfoze. (n=700)

	1 leglo			2 leglo			3 leglo		
	Srednja Ukrit. (cms-1)	Standardna deviacija	razpon	Srednja Ukrit. (cms-1)	Standardna deviacija	razpon	Srednja Ukrit. (cms-1)	Standardna deviacija	razpon
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.57	0.28	0.57
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.61	0.34	1.00
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.57	0.32	1.00
8	0.0	0.0	0.0	2.02	1.48	4.92	0.52	0.36	1.30
9	0.0	0.0	0.0	1.91	1.26	5.05	0.69	0.53	1.92
10	0.0	0.0	0.0	1.05	0.65	2.82	0.50	0.42	1.92
11	1.33	0.67	2.25	1.56	1.00	4.62	0.41	0.37	0.87
12	1.82	1.14	4.92	2.17	1.02	4.05	0.44	0.48	1.30
13	1.26	0.72	2.82	1.00	0.75	3.12	0.0	0.0	0.0
14	4.04	1.38	3.00	1.05	0.45	1.62	0.0	0.0	0.0



Slika 26- Dosežene srednje vrednosti Ukrit. mladice *Solea senegalensis*, ločene glede na starost in leglo.

Od mladice iz tretjega legla nobena so le redke dosegle večje hitrosti od 1 cm/s. Mladice drugega legla, so ne glede na starost dosegale enakomerne hitrosti, pri čemer je pri mlajših mladice opazen velik razpon pri starejših pa so vse mladice določene starosti dosegale približno enako hitrost. Pri tretjem leglu je opazno znatno povečanje Ukrit. pri najstarejših mladice. Mladice prvega legla pri starosti 14 dni z najvišjimi povprečnimi vrednostmi 4 ± 1.38 cm/s (slika 26).



Slika 27- Prikaz doseženih kritičnih hitrosti mladice vseh legel skupaj, glede na njihovo starost, pri čemer mladice, ki zaradi preobrazbe v sploščeno obliko odraslega osebkca niso plavale, niso vključene poleg. Dph nam predstavlja starost šteto v dnevih, Ucrit pa je kratica za kritično plavalno hitrost.

V medsebojni primerjavi mladice pri doseganju najvišjih kritičnih hitrosti, katerih nismo ločili na posamezna legala, z namenom ovrednotenja različnih prehranskih in podhranjenih režimov, ni prišlo do opaznih razlik med hranjenimi in podhranjenimi mladimi pri doseženih vrednostih kritične hitrosti (slika 27).

Mladice smo združili v tri skupine: hranjene mladice ad libitum, kratkotrajno stradanje (24h, 48, in 72h) in dolgotrajno stradanje (96h, 120h in 144h). Presenetljivo je prišlo do rahlo povišane kritične hitrosti pri mladikah z dolgotrajnim stradanjem (tabela 6). Ti rezultati so bili pridobljeni pri mladikah, ki niso kazale nikakršnih znakov plavanja proti toku pri nižjih hitrostih toka, a ko smo povečali tok za večje vrednosti hitrosti, so nenadoma vložile vso energijo v plavalne sposobnosti in dosegle visoke Ucrit. Ocenjene vrednosti nam kažejo nizke plavalne hitrosti mladice tretjega legla. Tako v prvem kot v drugem leglu pa nam primerjava

med različnimi dolžinami podhranjenosti ter hranjenih mladice poda enakomerne vrednosti Ukrit. (tabela 6).

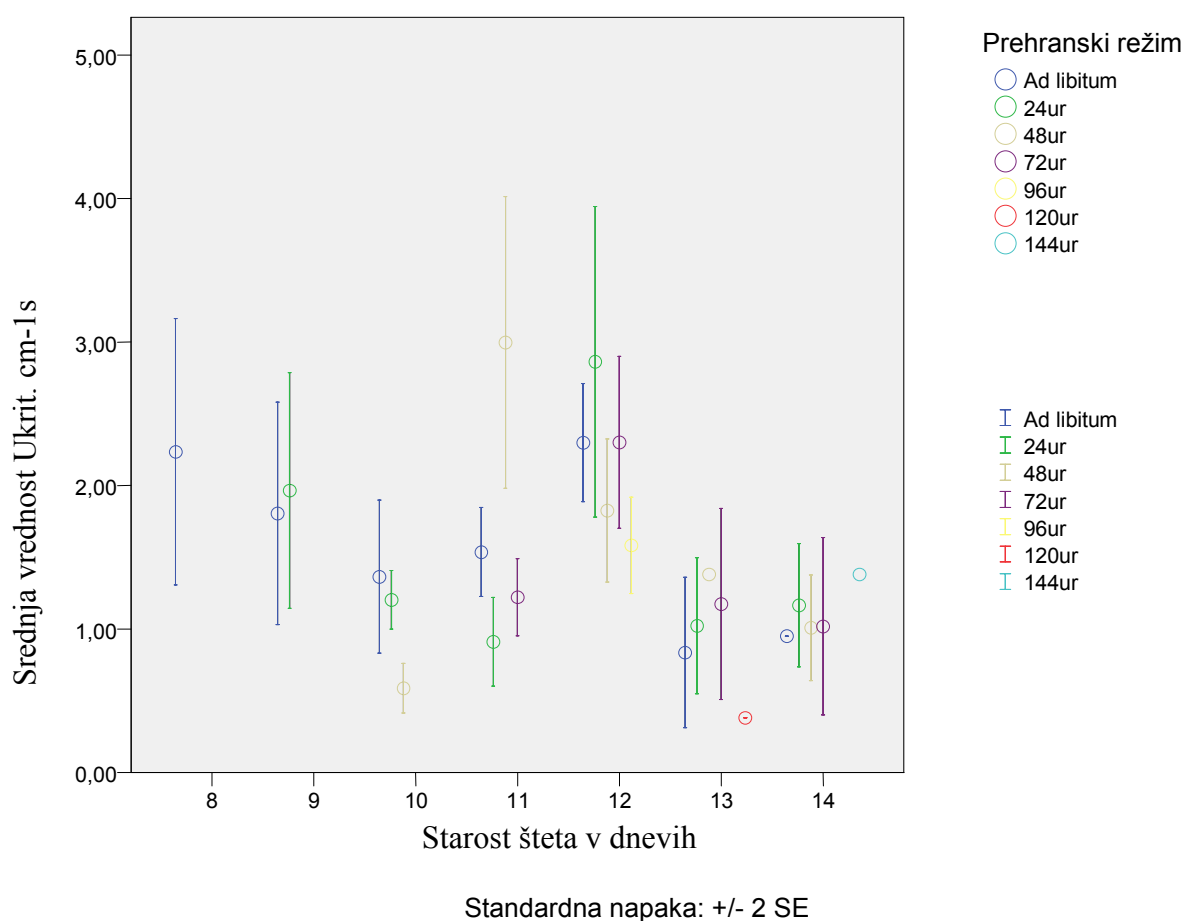
Tabela 6- Srednje vrednosti kritične hitrosti mladice posameznih prehranskih skupin v ločenih leglih. (n=403).

leglo	Prehranski režim	Št.osebkov	Srednja Ukrit. (cms-1)	Std. deviacija	Minimum	Maximum
1	Ad libitum	24	1.89	0.427	1.26	2.42
	Kratkotrajno stradanje	14	1.91	0.406	1.26	2.42
	Dolgotrajno stradanje	10	2.47	0.9074	1.26	3.48
	Skupno	48	2.02	0.610	1.26	3.48
2	Ad libitum	49	2.09	0.562	1.26	3.48
	Kratkotrajno stradanje	80	2.05	0.751	1.26	5.50
	Dolgotrajno stradanje	37	1.89	0.543	0.82	2.99
	Skupno	166	2.03	0.657	0.82	5.50
3	Ad libitum	76	0.66	0.263	1.26	2.11
	Kratkotrajno stradanje	93	0.58	0.326	0.82	2.19
	Dolgotrajno stradanje	20	0.36	0.838	1.26	3.46
	Skupno	189	0.54	0.452	0.82	3.46

Skupno število mladice, kater smo vzeli v primerjavo je 403 in je manjše od vsega števila mladice vzeti v raziskavo. Glavni del teh mladice, katere so izvzete so kontrolne mladice, katerih nismo testirali, ter tudi tiste ki so bile prešibke, ali so kazale znake stresa in tiste, ki so že kazale znake prička procesa metamorfoze in so tako dosegle vrednosti Ukrit. = 0 cm/s. Vse mladice ne glede na leglo in prehranski režim so dosegle nizke povprečne hitrosti in sicer med 1.5 in 2.5 cm/s.

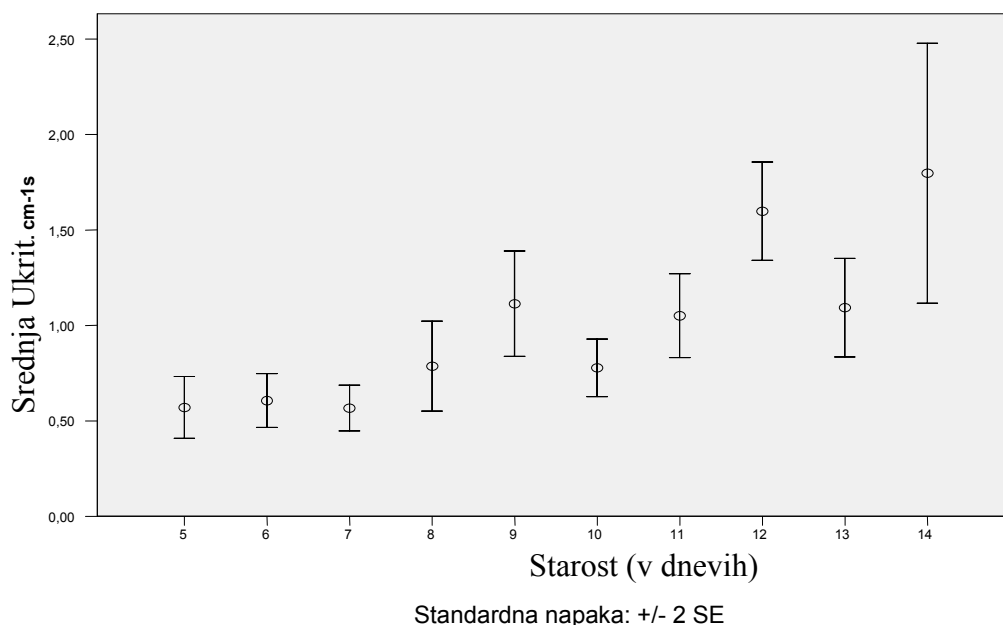
Z osredotočenostjo na najbolj zanesljive podatke mladice iz drugega legla (slika 28), so razlike med hranjenimi in stradanimi mladici skoraj neprepoznave. Mladice stare 11 in 12 dni so dosegle najvišje hitrosti Ukrit. s srednjo vrednostjo 3.0 ± 0.7 cm-1s. Mladice s kratkotrajno periodo stradanja so lahko plavale z večjo hitrostjo proti toku v primerjavi z mladici z dolgotrajnim stradanjem in hranjenimi. Le 5 mladice z 120 urno dobo stradanja je bilo testiranih za plavalne sposobnosti, z dobljenimi nizkim vrednostmi hitrosti 0.38 cm/-1s se

izkažejo za zelo slabe plavalke, kar pa ni najbolj zanesljiv podatek glede na to, da smo v drugih primerih vedno testirali za vsako kategorijo posebej vsaj 12 mladice. Mladice starejše kot 13 in 14 dni so dosegale zelo nizke povprečne vrednosti kritične hitrosti. A razlog za to so vzete vse mladice, te starosti v izračun povprečnih vrednosti, torej tudi tistih katere se niso premaknile od dna zaradi posledic pričetka procesa metamorfoze. Njihova plavalna hitrost je bila 0 cm/s. Zaradi teh privzetih mladice v statistični obdelavi so dosegle povprečne Ukrit. 1.0 ± 0.7 cm-1s. Če v izračun srednje vrednosti ne zavzamemo tudi mladice z že začeto stopnjo metamorfoze, potem se vrednosti povečajo za 100% in sicer 2.1 ± 0.7 cm-1s, saj so bile zmožne visokih frekvenc in hitrih zamahov z repno plavutjo.



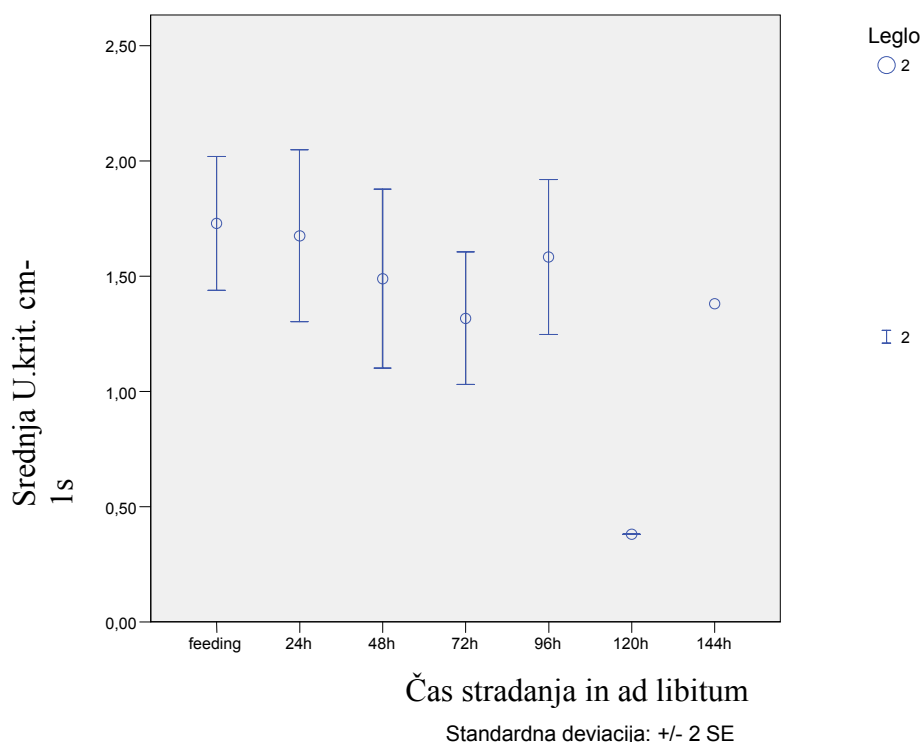
Slika 28- Primerjava srednjih vrednosti Ukrit. (cm/s) med različnimi starostmi mladice in različnimi prehranjevalnimi režimi drugega legala.

V primerjavi srednjih vrednosti kritične plavalne hitrosti glede na posamezne starosti pri vseh treh leglih, se je le ta sorazmerno z višanjem starosti povečevala, pa če ravno prihaja do izrazitih odstopanj med posameznimi dnevi, kar nam nakazuje na to, da ločitev glede na posamezne dni ni najbolj ugodna in zanesljiva razlaga podatkov. Linija nam nakazuje trend, kjer je skoraj linearno povečanje Ukrit. s starostjo mladice (slika 29).



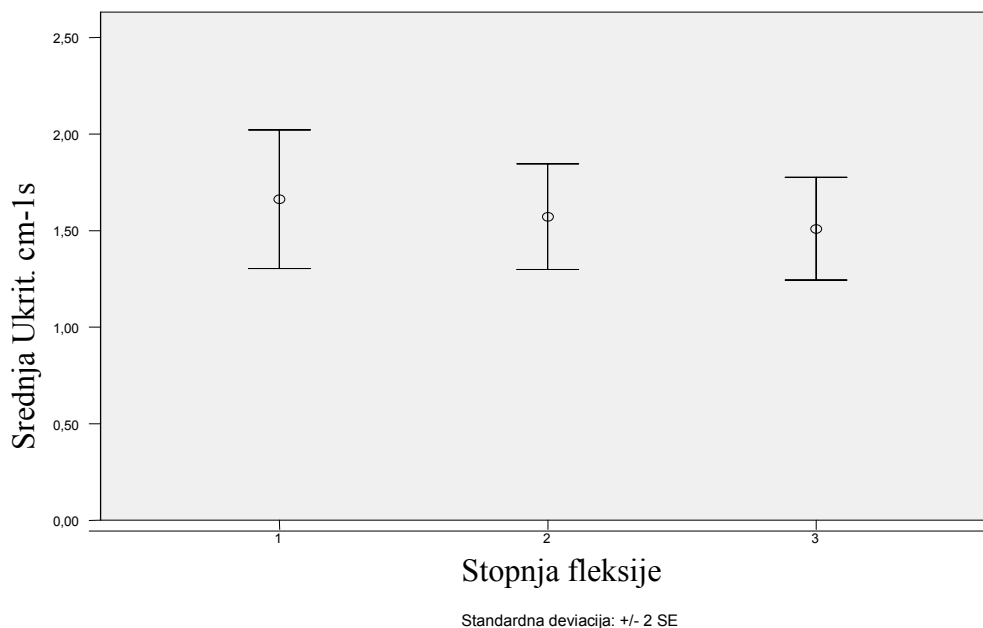
Slika 29- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s) v odvisnosti od starosti mladic vseh legel skupaj. (n= 403)

Glede na nezanesljive podatke legel 1 in 3, smo se v nadaljnjem procesu rezultatov posvetili le drugemu leglu za analizo različnih prehranskih izračunov za ugotavljanje rezistentnosti na podhranjenost. V leglu 2, je bilo vsega skupaj 300 mladic, starih od 8 do 14 dni, z minimalno dolžino $3.5 \text{ mm} \pm 0.1$ pa vse do $7.5 \pm 0.1 \text{ mm}$. Suha telesna teža mladic je znašala vse od $0.1 \text{ mg} \pm 0.02$ pa do $1.5 \text{ mg} \pm 0.02$. Srednje vrednosti Ukrit. v odvisnosti od različnih dolžin podhranjenosti ali pa hranjenih mladic so pri hranjenih in tistih z kratkotrajnim stradanjem v primerjavi podobne (Slika 30). Pri mladicah z dolgotrajno podhranjenostjo pa plavalna hitrost upade pri čemer so podatki za mladice podhranjenih za več kot 120 ur nezanesljivi zaradi majhnosti vzorca testiranih mladic (5 osebkov). Splošno opažen trend rezultatov prikazuje nekoliko šibkejšo predstavbo podhranjenih mladic, s sorazmerno stagnacijo glede na daljšo periodo stradanja, a ni opazne pretirane razlike.



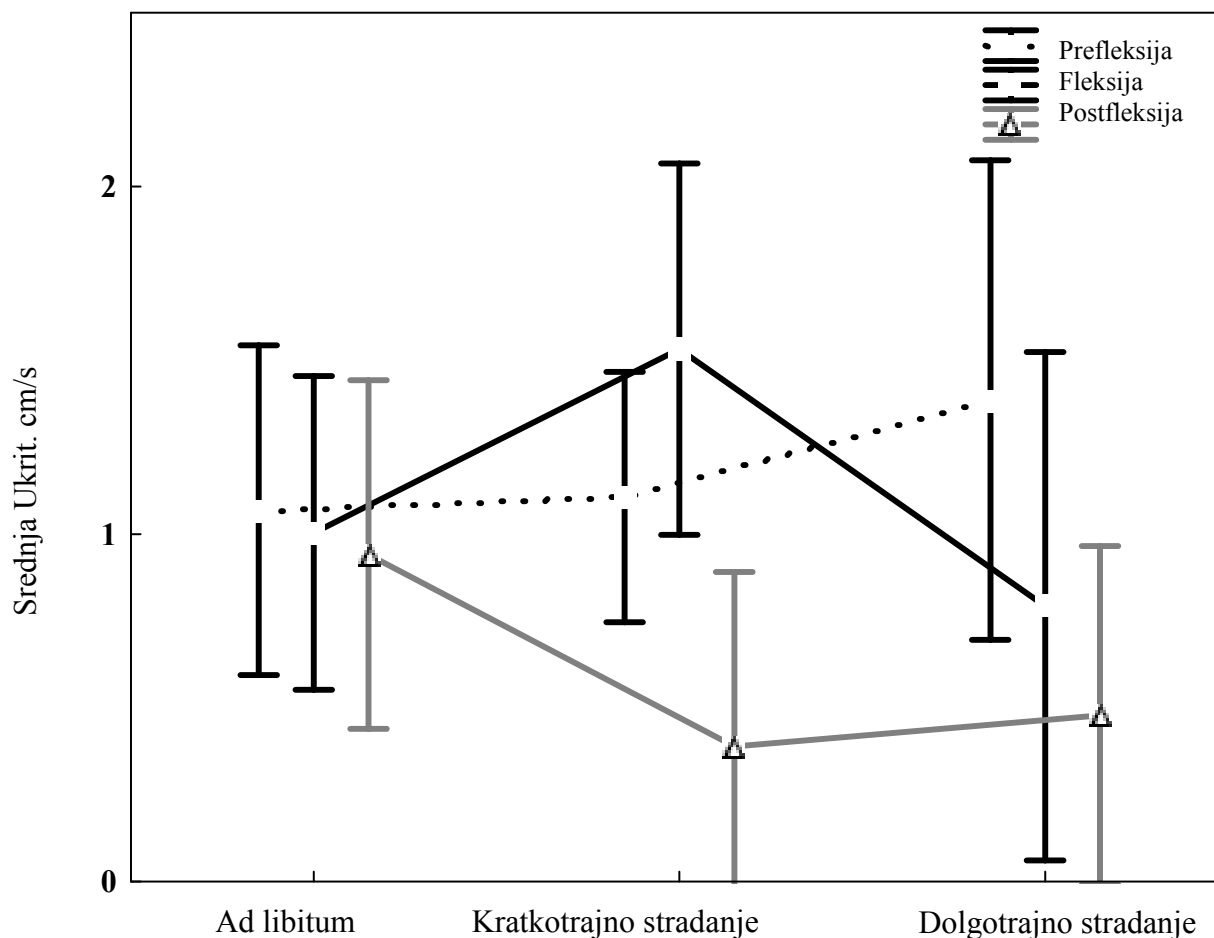
Slika 30- Leglo 2: srednja kritična hitrost Ukrit. (cm/s) v odvisnosti od različne dolžine časa podhranjenosti.

Čeprav različni prehranjevalni vplivi ne vplivajo bistveno na kritične hitrosti, pa so glede na stopnjo v ontogenetskem razvoju in v stopnjah fleksije opazne velike spremembe. Glede na morfološki razvoj smo posamezne stopnje v razvoju označili s številkami od 1 do 5. Do povečanja Ukrit je prišlo pri mladiceh tik pred pričetkom metamorfoze v sploščeno obliko telesa, katere so v stopnji fleksije, še vedno imajo vertikalno smer plavanja in pridobivajo temno močnejšo pigmentacijo po telesu. Najvišje dosežene hitrosti dosegajo mladice z povpr. Ukrit. = 1.8 cm/s, z največjo zastopanostjo mladice 3 stopnje morfološke razvitosti s telesno dolžino 4 ± 0.3 mm, hrbtne strune v stopnji fleksije, starost mladice pa je vse od 9 pa do 14 dni starosti. Regresija Ukrit. se prične, ko mladice preidejo iz 3. v 4. stopnjo razvoja, pri čemer je jasno vidno pomanjkanje plavalnih sposobnosti oziroma zadrževanje pri dnu. V 5. stopnji razvoja pa le redko katera še plava proti toku. V 3. in 4. razvojni fazi večina mladice doseže hitrosti višje od 1 cm/s, v primerjavi z ostalimi stopnjami kjer se ta trend ne pojavlja. V 5. stopnji razvoja mladice, ki so pričele z metamorfozo (asimetrična oblika telesa bentičnih odraslih osebkov), so ravno tako vključene. 5. stopnjo v razvoju so pričele dosegati s starostjo 11 dni pa vse do 14 dni starosti, z največjim številom predstavnic med 13 in 14 dni starosti. Telesna dolžina mladice, ki so v prvi fazi razvoja je od 3.5 mm do 4.7 ± 0.1 mm in suha telesna teža je od 0.1 mg pa do 0.7 mg. V peti stopnji razvoja so telesne velikosti od 4.00 mm do 7.4 ± 0.1 mm in 0.3 mg do 1.5 mg. V kolikor so občutno opazne razlike pri mladiceh različnih morfoloških stopenj, pa glede na bolj enostavno ločitev stopnje razvoja fleksije temu ni tako (slika 31). Opazne so majhne razlike v tretji stopnji fleksije- post-fleksije in sicer rahel upad povprečne kritične hitrosti. Razlika je minimalna zaradi izključitve mladice, ki se ne trudijo več plavati proti toku in dosežejo Ukrit. = 0 cm/s zaradi viskoe stopnje v razvoju.



Slika 31- Srednje vrednosti Ukrit. (cm·1s) v odvisnosti od stopnje fleksije hrbtenice (1- prefleksija, 2-fleksija, 3-postfleksija) z 0,95 intervalom zaupanja z izločenimi mladimi, ki zaradi preobrazbe v sploščeno obliko odraslega osebk niso plavale (Ukrit.= 0cm/s).

Vse mladice, katere so se že razvile do stopnje post-fleksije, so dosegale najnižje plavalne hitrosti, ne glede na dolžino stradanja, hranjenja. V kolikor so dosegle končno stopnjo v razvoju, ne vlagajo več energije v plavanje, iskanje hrane. Za boljše plavalke so se izkazale mladice, katere imajo notohordo še v stanju prefleksije ali fleksije, posebej presenetljivo pa je, da najšibkeje razvite mladice prefleksijske stopnje ter z dolgotrajnim pomanjkanjem hrane dosežejo najvišje Ukrit. hitrosti (slika 32).



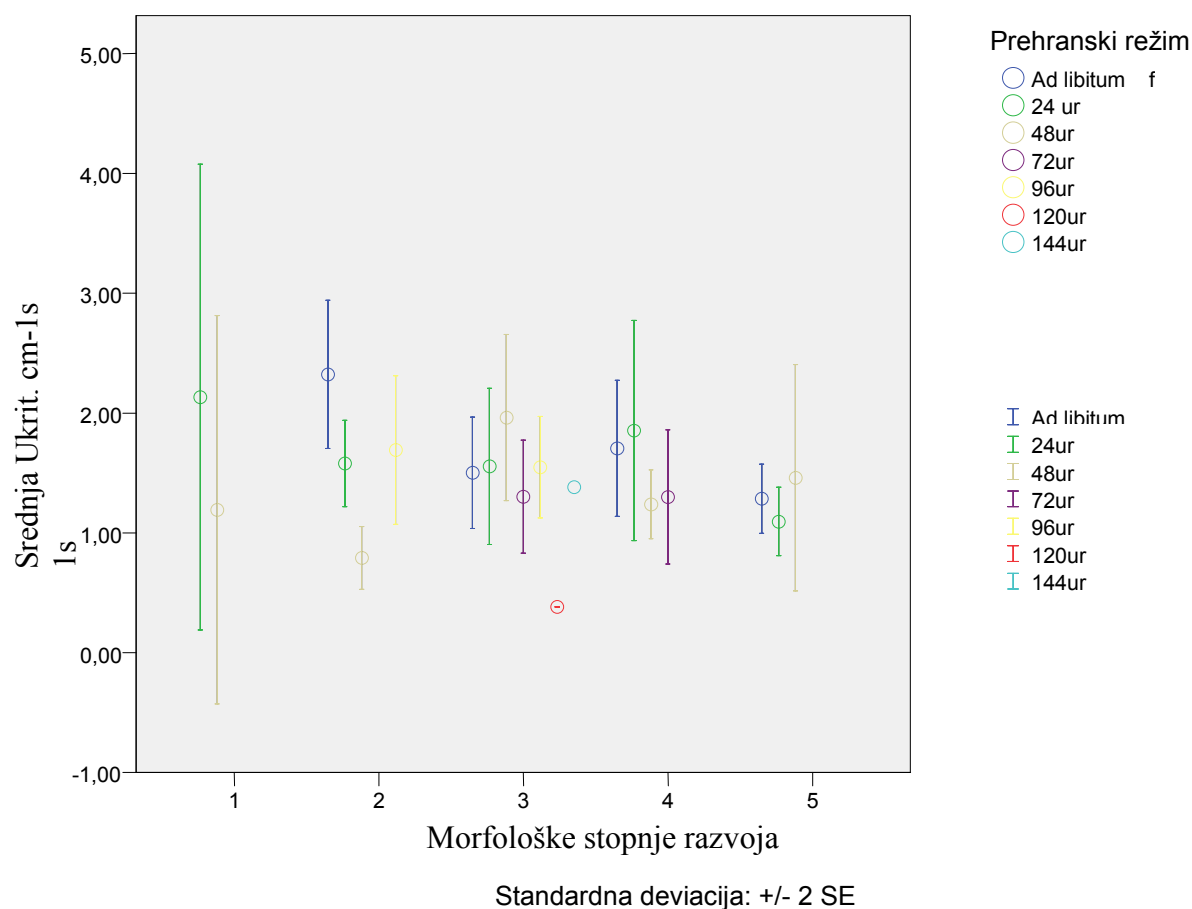
Slika 32- Srednje vrednosti Ukrit. (cm-1s) v odvisnosti od pogojev stradanja/hranjenja ločene glede na posamezne stopnje v fleksiji hrbtnice.

Pri mladica v različnih morfoloških stadijih med seboj primerjanih v različnih prehranskih režimih pa je razvidno, da nobena od hranjenih mladice z ad libitum, starosti od 8 do 14 dni, ni ostala na prvi stopnji morfološkega razvoja. Razlika med 24h in 48 urnim trajanjem deprivacije hrane pri mladica s prvo stopnjo razvoja prihaja do velikih razlik in sicer za 0.9 cm/s srednje vrednosti Ukrit. med nižjo vrednostjo mladice z 48h stradanjem z 1.2 cm/s in mladice z 24h stradanjem z vrednostjo srednje Ukrit. 2.1 cm/s.

Ravno tako drugi razvojni stopnji dosegajo nižje kritične plavalne hitrosti glede na daljše obdobje stradanja s srednjo vrednostjo 2.3 ± 1.1 cm-1s hranjenih mladice vse do 0.79 ± 0.3 cm-1s pri mladica z 48h stradanjem.

Vse mladice podvržene dolgotrajni deprivaciji hrane (od 72ih ur brez hrane) niso dosegle 4. in 5. stopnje razvoja, čeprav so bile mladice s 140 urno dobo stradanja vse stare 14 dni, in mladice z 96 ur in 120 ur dobo vse starosti 12 in 13 dni. Opazna je regresija v celotni dolžini telesa pri mladica z daljšo periodo stradanja z doseženo celotno telesno dolžino med 3.6 in 4.8 ± 0.1 mm, v primerjavi z mladica enake starosti z dolžinami teles od 5.3 pa do 7.2 ± 0.1 mm. Mladice, katere so že pričele s procesom preobrazbe (konec 4. in 5. stopnje) so dosegle

podobne vrednosti Ukrit., kljub različnim prehranskim pogojem- hranjene, 24 ur, 48 ur in 72 ur stradanja (slika 33).

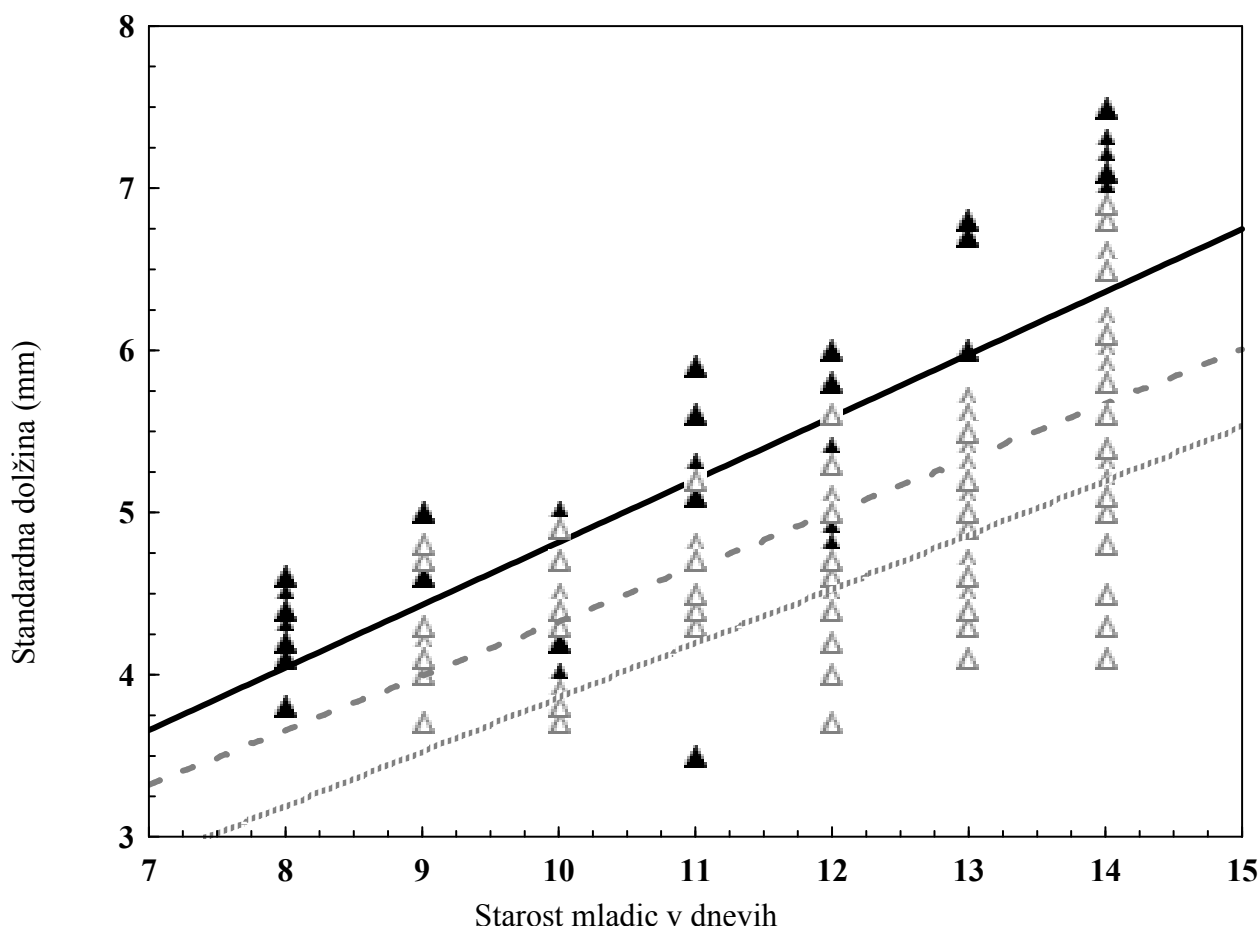


Slika 33- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s) pri vseh treh leglih, primerjane glede na morfološko stopnjo razvitosti in glede na posamezne prehranske režime oziroma dolžino stradanja.

Tabela 7- Srednje vrednosti Ukrit. (cm/s), dosežene pri mladiceh glede na različne stopnje v morfološkem razvoju.

Morfološka stopnja razvoja	Srednja Ukrit. (cm-1s)	Standardna deviacija
1	1.64	1.86
	4.289	0.411
2	1.70	1.00
	4.350	0.380
3	1.53	1.05
	4.664	0.501
4	1.63	1.14
	5.164	0.494
5	1.30	0.64
	6.148	0.935

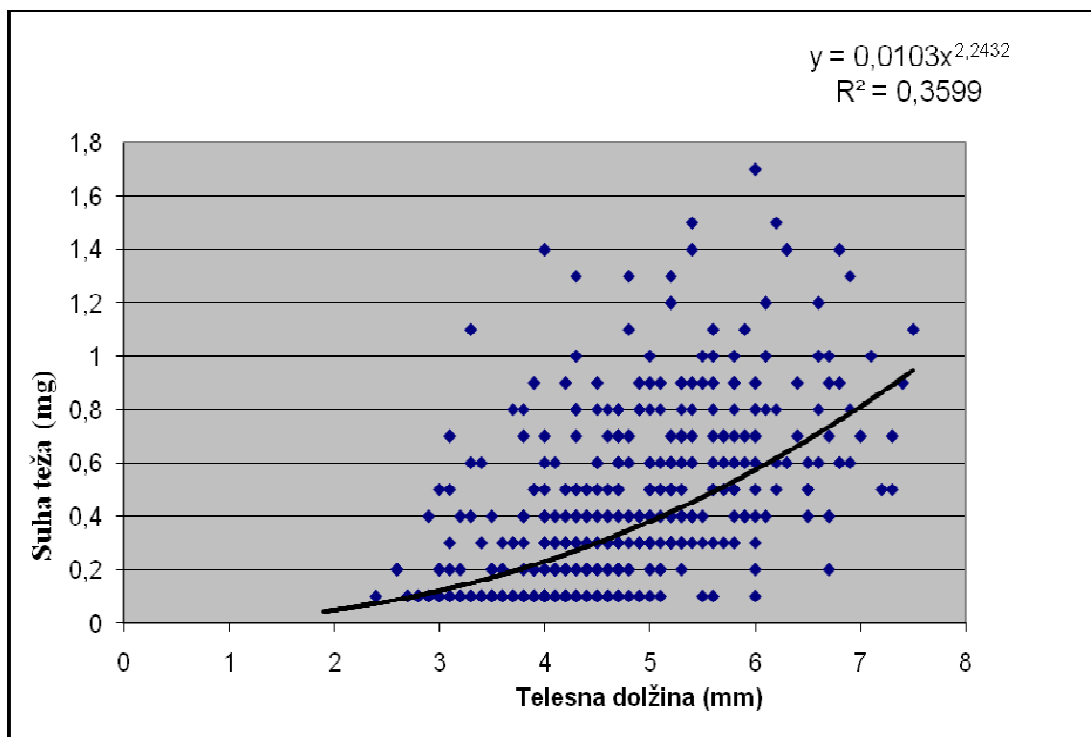
Mladice ločene glede na celotno telesno dolžino, niso pokazale presenetljivih razlik pri srednjih vrednostih Ukrit. hitrosti. Mladice v stanju pre-fleksije s telesno dolžino ≤ 5 mm plavajo hitreje kot nekatere manjše z višjo stopnjo v razvoju, a enako hitro kot mladice v stanju post- fleksije oziroma 5. stopnji morfološkega razvoja pri katerih je večina ≥ 5 mm. Opazna je regresija pri mladica ≥ 6 mm, pri katerih pa se že kažejo znaki spreminjanja v sploščeno obliko telesa.



Slika 34- Mladice rib in njihova telesna rast glede na starost. Prazni trikotniki so mladice z dolgotrajnim stradanjem, sivi polni trikotniki so mladice s kratkotrajnim stradanjem in črni trikotniki predstavljajo hranjene mladice.

Velikost mladic in s tem v povezavi njihova rast sta bile pod močnim vplivom deprivacije hrane. Mladice rib z dolgotrajno dobo deprivacije hrane so bile mnogo manjše od mladic pod drugimi dvema režimi. Hranjene mladice so v primerjavi z nehranjenimi veliko bolj zrasle. Regresijske krivulje nam kažejo porast telesnih dolžin pri vseh mladica, a glede na pričakovano rast v posameznem obdobju temu primerno dosežejo le hranjene mladice (slika 34). Močna povezava je v razmerju z velikostjo mladic in doseganju višjih Ukrit. hitrosti, posebej močno opazno pri hranjenih mladica in teh s kratkotrajnim stradanjem. V nasprotju s tem pa te povezave ni moč opaziti pri mladica izpostavljenih dolgotrajnemu stradanju.

R-kondicijski indeks se je izkazal za neuporabnega, pri čemer je ključni problem majhne spremembe v suhi teži mladice in k temu nerazporejenost podatkov, ter neprepoznaven trend (slika 35)..



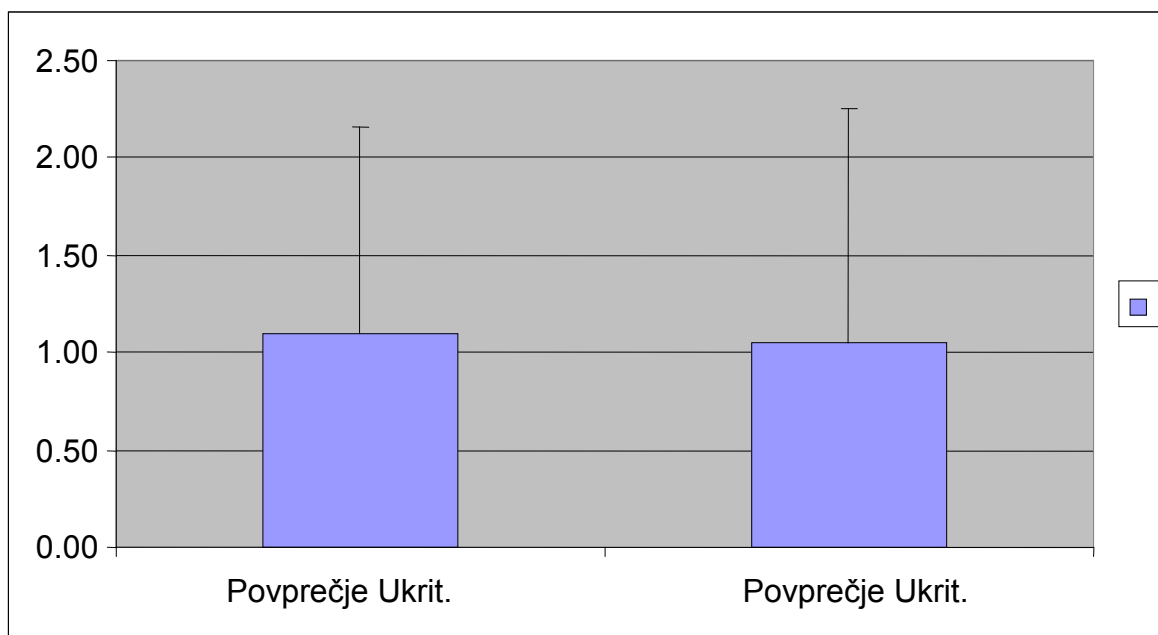
Slika 35-Primerjava med telesno dolžino in suho maso za R-kondicijski indeks, pri čemer so v izračun vzete vse mladice vseh legel. Iz trendovske krivulje ja razvidno, da ta indeks v tem primeru ni učinkovit pokazatelj variabilnosti.

5.4 UČINEK STRADANJA NA RAZMERJE RNA/DNA

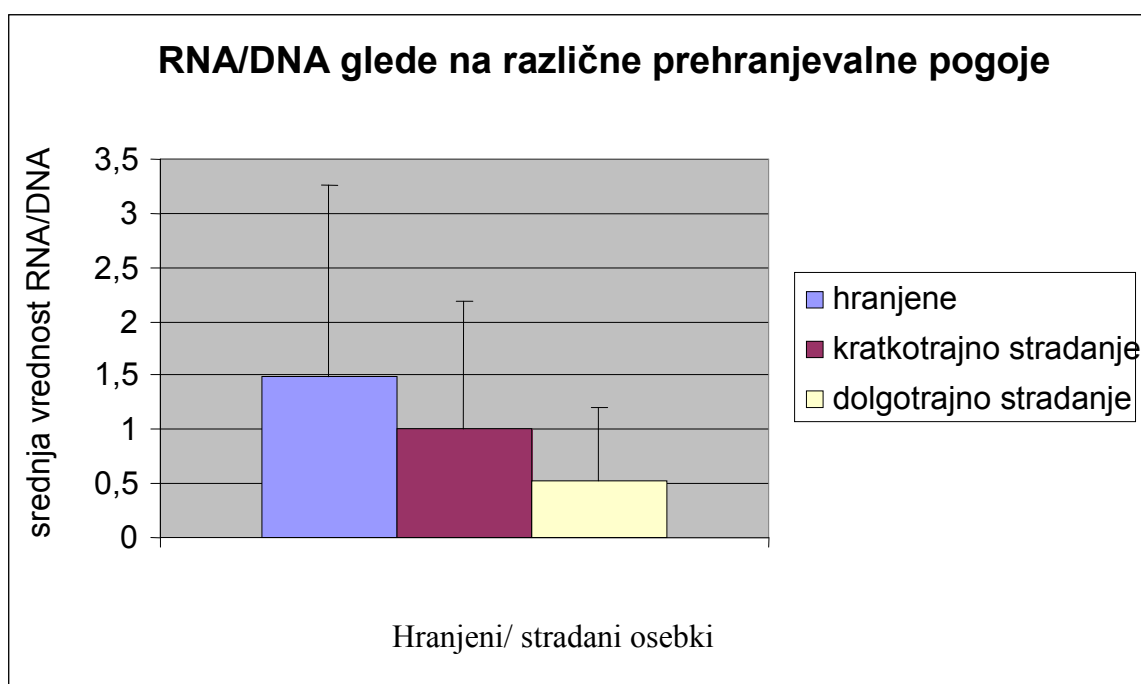
RNA/DNA razmerje se skozi ontogenetski razvoj ni spreminjalo. Dolgotrajno obdobje stradanja ni bilo zadosti, da bi se poznalo učinkovito pomanjkanje RNA oziroma povečano razmerje RNA/DNA. Razmerje Ukrit. v odvisnosti od RNA/DNA razmerja se ni spreminjalo skozi ontogenetski razvoj, in v splošnem ne predstavlja razlik med hranjenimi: $1,053 \text{ cm/s}$, z $1.49 \pm 1,77$ povprečjem razmerja RNA/DNA, kratkotrajnim stradanjem: $1,48 \pm 0,45 \text{ cm/s}$ in povprečjem razmerja RNA/DNA $0,996 \pm 1,20$, in dolgotrajnim stradanjem: $1,29 \pm 0,45 \text{ cm/s}$ in RNA/DNA: 0.536 ± 0.66 . Zato pa je opazna stagnacija izgradnje RNA v sorazmerju s povečano dobo stradanja. Hranjeni osebki imajo tako višje vsebnost RNA ter ravno tako DNA na osebek, a na 1 mg suhe telesne teže se DNA skoraj da ne spremeni. Vseeno zaradi višje vsebnosti RNA hranjene mladice ne dosegajo višjih plavalnih hitrosti. (slika 36 in 37).

Tabela 8- Srednje vrednosti RNA, DNA in njunega razmerja glede na posamezen osebek na 1mg telesne teže.

srednja vrednost	standardna deviacija
RNA/DNA	
podhranjene mladice	
RNA/osebek	
11,32	25,69
hranjene mladice	
RNA/osebek	
14,40	20,47
podhranjene mladice	
RNA/mg	
10,45	10,08
hranjene mladice	
RNA/mg	
34,74	44,19
podhranjene mladice	
DNA/osebek	
10,45	10,08
hranjene mladice	
DNA/osebek	
11,34	11,00
podhranjene mladice	
DNA/mg	
35,47	35,84
hranjene mladice	
DNA/mg	
25,54	23,88
podhranjene mladice	
RNA/DNA	
0,95	1,16
hranjene mladice	
RNA/DNA	
1,49	1,77
podhranjene mladice	
Ukrit.	
1,09	1,05
podhranjene mladice	
Ukrit.	
1,07	1,20



Slika 36- Povprečje doseženih maksimalnih plavalnih hitrosti pri podhranjenih (levo)in hranjenih (desno) mladiceh.



Slika 37- Povprečje doseženih maksimalnih plavalnih hitrosti pri hranjenih in podhranjenih mladiceh, pri čemer so slednje ločene na skupino s kratkotrajnim stradanjem in dolgotrajnim stradanjem.

Količina DNA je skoraj enaka pri podhranjenih (10.45 ± 10.08), kot tudi pri hranjenih (11.34 ± 10.08), saj se načeloma ta količina ne spreminja. V primeru, da bi tu prihajalo do velikih razlik, bi bili rezultati nezanesljivi. Razvidna je razlika v vsebnosti RNA in razmerja RNA/DNA v primerjavi med hranjenimi in podhranjenimi a tudi tu ne prihaja do velikih razlik. Pri podhranjenih se količina RNA, torej vsebnosti sintetiziranih ribonukleinskih kislin zmanjša za 4 ± 1.2 RNA/osebki, glede na to da imajo podhranjene mladice 11.32 ± 25.69

RNA/osebek in hranjene 14.40 ± 20.47 RNA/osebek. Ravno tako razlika v RNA/DNA je prisotna, a ravno tako majhna: hranjene 1.49 ± 1.77 in podhranjene 0.95 ± 1.16 , z bolj natančno razdelitvijo: kratkotrajno ($0,996 \pm 1,20$) in dolgotrajno stradanje ($0,536 \pm 0,66$), pri čemer pa se že opazi vpad v količini RNA v celicah.

Primerjava Ukrit. v odvisnosti od RNA/DNA razmerja je poslednja in najpomembnejša razdelitev celotne raziskave, pri čemer vidimo da pomanjkanje hrane vpliva na nižje koncentracije RNA pri mladica z dolgotrajnim stradanjem in s tem v povezavi na vrednosti Ukrit, ki pa ne nakazujejo bistvenih nižjih vrednosti v primerjavi z hranjenimi mladimi. Pri hranjenih mladica in tistih s kratkotrajnim stradanjem ne opazimo tolikšne razlike oziroma povezanosti med tema dvema faktorjema. Pojavljajo se v obeh primerih (hranjenje in stradanje) mladice, ki so dosegale visoke hitrosti okoli 5 cm/s in večina predstavnic med $1 \leq 3 \pm 0.5$ cm/s.

6 DISKUSIJA

6.1 DISPERZIJA

Razumevanje veličine disperzije pelagičnih osebkov v njihovem larvalnem obdobju je eden od glavnih izzivov, s katerim se danes ukvarjajo morski biologi (Warner in Cowen, 2002; Cowen, 2002; Sale, 2004; Leis, 2006). Merjenje plavalnih sposobnosti ribjih mladice nam lahko doprinese mnogo k disperzijskim modelom in spoznanju populacijske dinamike pelagičnih osebkov.

Mladice mnogih vrst rib so zmožne plavati hitreje od povprečnih hitrosti morskih tokov skozi daljša obdobja in daljše razdalje, tudi po več kilometrov. je pod Močnan vpliv na vertikalno distribucijo imajo plavalne sposobnosti in načina obnašanja mladice. Mladice se močno zavedajo življenjskega okolja in potencialnih plenilcev, tudi v primerih ko gre za izbiro ustreznega prostora za preobrazbo v sploščeno obliko (Leis, 2006). Vzorci obnašanj so lahko zelo fleksibilni in v primeru plavalnih sposobnosti lahko variirajo glede na pozicijo in smer plavanja. Pridnene pleuronektiformne ribe so lahko manj sposobne glede prilagajanja z različnimi vzorci obnašanja kot pa pelagične, a to zaenkrat ostaja še odprto vprašanje (Leis, 2006).

Iz tega razloga smo se odločili primerjati med seboj predstavnice bokoplutnih pridnenih vrst in pelagičnih vrst, ter ravno tako naredili primerjavo med gojenimi in tistimi iz naravnega okolja. Ulov, ki je potekal v laguni Ria Formosa, bi nam v primeru uspešnega ulova, doprinesel pomembne vir znanja. Namreč variabilnost v vsakoletni zalogi rib ima lahko usodne posledice tako za lokalne populacije, kot posledično za ribištvo. V splošnem je znano, da če želimo razumeti parametre, ki vplivajo na zaloge rib v morju, je nujno razumevanje in določitev faktorjev, ki vplivajo na preživetje planktonskih oblik oziroma zgodnjih oblik razvoja rib (Chicharo, 1998). Žal se poskusi ulova niso izkazali za uspešne, tako da smo nadaljnje eksperimente izvedli le na gojenih mladiceh, pri čemer ostaja odprto vprašanje ali se nadaljna razprava lahko popolnoma ujema z odzivi, katere bi mladice sprožile v naravnem okolju.

6.2 RAZLOG ZA IZBIRO DRUGEGA LEGLA

V nadaljnji raziskavi smo se osredotočili le na drugo leglo zaradi naslednjih razlogov: velike razlike v doseganju kritičnih plavalnih hitrosti osebkov prvega in tretjega legla. Za te nenavadne razlike je možno najti naslednje faktorje, ki so vplivali na njihovo slabo predstavnost v plavalni komori. Mladice, katere smo pridobili iz akvakulturne postaje (IPIMAR), so bile različnih starosti; prvo leglo 10 dni, drugo 7 dni in tretje 4 dni. S temi razlikami v onotogenetskem razvoju in vedenju o občutljivosti mladice, bi za slabe plavalne sposobnosti lahko bili krivi slabi prehranjevalni pogoji, katerim so bile izpostavljene v času

poskusov. Morda je ravno v tem razlog, da mladice tretjega legla, ki so bile najmlajše ob prihodu, se niso morale razviti tako v morfološkem kot fiziološkem razvoju zaradi različnih posledic podhranjenosti. Zabeleženo je bilo, da se je v času intenzivnega ontogenetskega razvoja pojavila široka heterogeneza, kar je verjetno posledica virov hrane, kemijske sestave vode, kalorične vrednosti hrane in načina kontrole določene diete (Rubio in sod., 2009).

Glede na prejšnje raziskave je velika verjetnost, da so bili krivi neugodni abiotski življenjski pogoji (Faustino in Power, 1999), a tudi različni prehranski režimi (Dedi in sod., 1998), okoljski faktorji (Haaparanta in sod., 1997), imajo ravno tako lahko pomembno vlogo v neuravnovesenju sistema, kateri pa negativno vpliva na morfološki razvoj mladice. Glede na to, da imajo mladice *Solea senegalensis* zanemarljive zahteve kar se tiče maščobnih kislin v prehrani, bi lahko bili za nerazvitost krivi abiotski faktorji. Ti rezultati so bili podprti v raziskavi Morais in sod. (2003; Villalta in sod., 2005), kjer so odkrili v več ponovitvah z mladnicami *Solea senegalensis* vse do 38 dneva starosti, da so le te enako dobro napredovale v ontogenetskem razvoju ne glede na koncentracijo Artemij DHA (Villalta, 2005) in ne glede na razlike med mladnicami hranjenimi s kotačniki in solinskim rakcem ali le s kotačniki.

Glede na to, da so bile naše mladice v času raziskave hranjene tako s kotačniki kot s solinskim rakcem, gostota mladice je bila manjša od 300 osebkov/ 10 L akvarij, bi lahko bili glavni vzrok ostali abiotski faktorji. Ostali razlogi za velike razlike v zgodnjih stopnjah razvoja mladice pa so lahko tudi: mladice, ko se izvalijo so povprečne velikosti 2.4 ± 0.1 mm telesne dolžine, pri čemer tudi prihaja do širše variabilnosti med posameznimi legli. Velikost jajca ima velik pomen na velikost mladice, kar je bilo opaženo v raziskavi (Dinis, 1986; Bedoui, 1997; Dinis, 1999).

Ravno tako je bila opažena specifična aktivnost določenih prebavnih encimov, kot so tripsin, amilaza, alkalni fosfatasa in leucin- aminopeptidaza, pri čemer so opazili enake vzorce v času razvoja *Solea sp.*, in sicer velika variabilnost znotraj prvih 10 dni, pri čemer se koncentracije teh encimov uravnajo šele v kasnejših fazah razvoja. (Ribeiro in sod., 1999; Conceição, 2007). V prejšnjih raziskavah so predlagali da se malformacije, vedno pojavljajo v zgodnjih razvojnih fazah v času embrija in larvalnega obdobja, pa čeprav vzroki in mehanizmi še niso dobro raziskani (Daoulas in sod., 1991; Koumoundouros in sod., 1997; Gavaia in sod., 2002).

Ravno tako bi bil lahko to razlog za mladice iz prvega legla, katere imajo izredno povečano Ukrit. pri starosti 14 dni. Mladice so bile zelo dobro hranjene na postaji IPIMAR, skozi celotno njihovo najbolj občutljivo obdobje, ter so iz tega razloga dosegale mnogo višje vrednosti pri plavanju proti toku z 4 ± 1.5 cm/s pri starosti 14 dni.

Ravno tako vrsta kavala (*Argyrosomus regius*), ni uspela preživeti, v takem številu, da bi pridobili zadostno količino podatkov. Obe vrsti sta imeli v akvarijih enake življenjske pogoje, tako da pripisujemo visoko smrtnost te vrste mnogo zahtevnejšim pogojem, potrebnih za preživetje v nenaravnem okolju. Poznana je kot ena od težje gojitvenih vrst.

6.3 PLAVALNE SPOSOBNOSTI

Plavalne sposobnosti mnogih ribjih mladice so izrednega pomena za njihov obstoj, saj ključno vplivajo na iskanje hrane, pobeg pred predatorji in kontrolo disperzije (Stobutzki in Bellwood, 1994, 1997; Fisher, 2004). K lažjemu ovrednotenju plavalnih sposobnosti, je izredno pomembno, da sledimo razlikam v skladju z onotogenskim razvojem, kar je bilo testirano v že kar nekaj študijah (Fisher s sod., 2000; Clark s sod., 2005; Leis s sod., 2006, 2007, 2009a,b; Guan s sod., 2008; Faria s sod., 2009). Faktorja zmožnosti plavanja proti toku v povezavi s telesno razvitostjo pogojeno z načinom prehrane, sta bila izmed najpomembnejših pri ugotovitvah vrst *Solea sp.* predstavnic bokoplutnic, katere so del uspešne gojitvene dejavnosti in višjega ekonomskega zaslužka akvakulturnih postaj. Še bolj pa je to pomembno za razumevanje načina njihovega preživetja v naravnem okolju. Spremembe v obnašanju so v močni navezanosti z morfološkimi spremembami (Bergeron, 1982) in vodijo do sprememb v metabolizmu in energetskih zalogah skozi proces preobrazbe v sploščeno telo do stanja, pri katerem so že bočno preoblikovane mladice veliko manj aktivne (Blaxter in Staines, 1971). Zanimivo je to, da v nasprotju z močno navezanostjo kritičnega plavanja in telesne velikosti v prejšnjih študijah (Clark in sod., 2005; Leis in sod., 2006a,b, 2007, 2009a,b; Faria in sod., 2009), pri nas ni te povezanosti. To bi bilo lahko povezano z majhno velikostjo mladice, v primerjavi z ostalimi, na katerih so bile narejene študije ali pa enostavno povezano s slabo razvitimi plavalnimi sposobnostmi predstavnic *Solea sp.*, kater morda niso ključni faktor glavnih preživetvenih strategij.

Mladice v prvi stopnji morfolškega razvoja s telesno dolžino < 5 mm plavajo enako hitro kot mladice, ki so se že razvile in so v 5. stopnji razvojne faze, pri čemer tudi večina preraste 5 mm. Opazna je regresija v Ukrit. pri mladiceh ki zrastejo več kot 6 mm v dolžino, kar je tudi povezano z njihovo preobrazbo. Kritične plavalne hitrosti mladice so bile za hranjene mladice in tiste s kratkotrajno deprivacijo hrane 0.4 do 5.0 cm/s, kar je enako 0.2 do 11.9 telesne dolžine/s. Mladice z dolgotrajnim stradanjem pa so dosegale nižje vrednosti in sicer od 0.4 cm/s do 3.2 cm/s, kar je enako 0.6 do 7.3 telesne dolžine/s. Žal za primerjavo naših podatkov s katerimikoli drugimi predstavnicami iz rodu pleuronektiiformes ni podatkov. Pa vendar je bilo v nekaterih študijah testirano vzdržljivostno plavanje, ki se močno razlikuje od kritičnega, z glavno razliko v tem, da se pri prvi meri vzdržljivost pri drugi pa maksimalno hitrost plavanja proti toku. Tako so pri vzdržljivostnem plavanju nekatere predstavnice iz družine Solenidae ravno tako dosegle hitrosti do 3 cm/s, kar pomeni da če bi testirali njihovo kritično hitrost bi lahko dosegle tudi nekoliko višje, pa vseeno se rezultati gibljejo v istem razponu lestivce. Te vrednosti so v skladu s predpostavko, da ribe, ki živijo v morjih zmerne pasu, so veliko slabši plavalci od tropskih predstavnic. Na to delno vpliva nižja temperatura vode, saj je splošno znano, da nižja temperatura vpliva na fiziologijo ribjih mladice in na fizikalne viskozne lastnosti hidrodinamičnega okolja v katerem se mladice nahajajo (Fuiman in Batty, 1997). Razlike v plavalnih sposobnostih pa lahko pripisujemo po večini taksonomskim in morfološkim razlikam. Veliko raziskav je narejenih na predstavnicah bokoplutnic iz tropskih okolij, zato primerjava naše raziskave s temi ne bi bila smiselna. Iz tega razloga je za nižje vrednosti pri doseganju Ukrit. pri *Solea senegalensis*, lahko krivo

mnogo faktorjev, kot so taksonomske razlike, filogenija, metodologija in stopnja ontogenetskega razvoja.

V raziskavi drugega legla *Solea senegalensis* smo odkrili rahlo povečanje Ukrit. pri mladich, ki so bile izpostavljene dolgotrajnemu stradanju, kar nam lahko nakazuje na to, da podhranjene mladice vložijo mnogo več energije in truda v preživetvene sposobnosti, ko so izpostavljene stresnim pogojem, s poslednimi viri energije in poslednjih možnostih za preživetje. Po 4 dneh stradanja ni bilo zabeleženih nobenih vzporednic več med pomanjkanjem hrane ter pa zmanjšanju Ukrit. Za to je krivo, hitro plavanje in doseganje visokih hitrosti, kar je bilo ravno tako že zabeleženo v prejšnjih raziskavah, namreč to je tako imenovan učinek pobega (Skajaa in Browman, 2007). Dalj ko je osebek brez hrane, večjo ima željo oziroma potrebo po hrani, preživetju, zato vso energijo vложи v plavalne sposobnosti. Ravno tako ima učinek pobega negativno korelacijo z nenadnim povečanjem dodatkom hrane (Booman in sod., 1991), kar smo odkrili tudi pri nas, saj mladica po hranjenju ne vlaga več toliko energije v plavanje. Ravno tako smo opazili manjše povečanje pri mladich s kratkotrajnim stradanjem pri primerjavi vseh treh legel, kar nakazuje na to, da so ob pomanjkanju hrane pripravljene oziroma primorane vložiti več energije v plavalne sposobnosti in s tem ujeti več hrane. Te mladice, ki so bile dolgo časa brez hrane, so kazale znake pomanjkanja energije, potrebne da bi enakomerno plavale proti toku pri nižjih hitrostih, a ko je bila hitrost toka mnogo večja, so uporabile vse moči in uspešno plavale proti toku. Ravno tako hranjene mladice, pa čeprav testirane vsaj 2.5 ure po hranjenju, niso vlagale energije v plavalne sposobnosti pri nižjih hitrostih, vendar so bile osredotočene na prebavljanje in se niso izpostavljale drugim stresnim pogojem. Vseeno to ne pomeni, da niso bile sposobne vzdrževati hitrosti, saj so pri večjih jakostih toka ravno tako uspešno plavale.

Za izredno potraten energetski proces plavanja potrebujejo mladice veliko energije. Pri nekaterih vrstah so ugotovili, da so mladice lahko med konstantnim dolgotrajnim plavanjem izgubile tudi do 75% lipidov, do 66% ogljikovih hidratov in do 40% proteinov energijskih zalog. Rasti in fiziološkemu razvoju ribjih mladice, je bilo namenjeno že mnogo pozornosti, z večino avtorjev, kateri so prišli do zaključkov, da je slab razvoj v ontogenetskem razvoju posledica pomanjkanja dobrih prehranskih pogojev (Suthers, 1998), pri čemer pa bi ravno za predstavnice *Solea sp.* lahko podali drugačne informacije drugih raziskav, kjer potrjujejo njeno rezistentnost (Ribeiro in sod., 1999b, Conceição, 2007) in (Morais in sod., 2004b; Villalta, 2005).

Opažen trend naših rezultatov nam kaže rahel upad kritične hitrosti pri plavalnih sposobnostih glede na povečano deprivacijo hrane. Kar potrjuje hipotezo, da so predstavnice družine Solenidae zelo rezistentne na stradanje (Richards in sod., 2001). Kot že prej (Richards in sod., 2001), je opazna rezistentnost na pomanjkanje hrane.

Že v prejšnjih raziskavah (Leis, 2009), so prišli do zaključkov, da so pleuronektiformne oziroma bokoplute predstavnice družine Solenidae v primerjavi s perciformni ribami slabe plavalke, ki le redko lahko presežejo hitrosti lokalnega toka ali vzdržujejo plavalno hitrost v naravnih razmerah. Z manj kot $2.0 \pm 0.8 \text{ cm}/-1\text{s}$, mladice ne bi bile sposobne plavati proti toku v naravnih pogojih, razen v izredno zaščitnih območjih pred močnimi tokovi, kot so določene lagune, na primer laguna Ria Formosa. Pri čemer lahko pridemo do zaključka, da je

razširjenost teh osebkov majhna, oziroma se določena populacija nahaja na določenem mestu in ni prenešena daleč naokoli v odprto morje kot pelagični osebek, niti ni sama zmožna vzdrževati plavalne hitrosti. V kolikor mladice zanese v glavni tok v odprta morja, pa ima verjetno tam malo možnosti za preživetje, saj predstavlja lahek plen.

Maksimalne obrežne hitrosti tokov, katere so večinoma pod vplivom plimovalnih tokov, so v naravnem rezervatu Ria Formosa do 4 m/s, tako da so že to velike hitrosti v primerjavi z našimi doseženimi, a so vseeno to idealne razmere za preživetje mladice rib družine Solenidae, saj se mladice nahajajo v bolj oddaljenih mestih od glavnega toka plimovanja. Torej, če te predstavnice v odprtih morjih ne morejo vzdrževati plavalne hitrosti, niti je ne preseči, pomeni da so v času razvojnega obdobja mladice pasivni osebki, pelagični in s tem spadajo pod kategorizacijo planktonskih organizmov, za razliko od velike večine pelagičnih mladice rib.

Tisti, ki se že dalj časa ukvarjajo z raziskavami mladice bokoplutnic so prišli ravno tako do enakih zaključkov in sicer, da so bočno sploščene mladice veliko bližje planktonskim organizmom, kot pa nektonskim skozi njihovo razvojno obdobje. (Bailey in sod., 2005; Leis, 2006). Čeprav primerjanje perciformnih rib z pelagičnimi ni ravno ekvivalentno, glede na to da lahko to primerjavo enačimo s primerjanjem sorodnosti med netopirji in glodalci glede na enako časovno oddaljenost med temi osebki. Saj so predstavniki rodu Clupeiformes, Gadiformes in Pleuronectiformes ločene že 50- 60 milijonov let od predstavnikov perciformnih vrst. Upoštevanje dejstva, da so clupeiformne, gadiformne in pleuronectiformne mladice veliko slabši plavalci od reda perciformnih predstavnic je ključno a vseeno še ni znano ali lahko to predpisujemo filogenetskimi razlikami (Billman in Pyron, 2005) ali razlikami v temperaturi vode, drugim vplivom ali kombinaciji vseh faktorjev.

Efekti stradanja se temeljito poznajo na mladiceh z več kot 4 dni dolžino stradanja, kar se kaže v izredno počasnejši rasti, v primerjavi s hranjenimi in tistimi s kratkotrajnim stradanjem. Mladice so bile slabše morfološko razvite, ter ravno tako z veliko krajšo telesno dolžino kot pa predstavnice iste starosti hranjene ad libitum. Vse to je posledično pripeljalo v podaljšano dobo izredno občutljive stopnje v ontogenetskem razvoju, kar bi v naravnem okolju povzročilo povečano nevarnost za preživetje. S tem posledično bi se lahko pojavilo stanje, pri katerem pride do povečane smrtnosti v populaciji ribjih mladice (Cushing, 1975; Shepherd in Cushing, 1980). Ravno tako so v tej navezanosti rezultati RNA/DNA razmerja, kateri kažejo na nižje razmerje po 4 dneh deprivacije hrane. Latenca je bila dokazana, pri nekaterih vrstah tudi že z enim do tremi dneh deprivacije hrane. Clemmensen (1994), je opazil pri mladiceh baltskih sledu (*Clupea harengus*) (≥ 10 dni), da so postali očitni znaki stradanja šele po 3 do 4 dneh. V skladu s tem je bilo dokazano da so bočno sploščene ribe veliko bolj rezistentne na stradanje. To bi bil lahko razlog povezan z dostopnostjo hrane, namreč tiste mladice, ki so sposobne velikih plavalnih hitrosti, so se sposobne hraniti same in priti do hrane v mnogo bolj uspešnejših ulovih. Tiste, ki larvalno obdobje preživijo kot planktonski organizmi se nahajajo v močnejših tokovih, kjer pa je tudi večja akumulacija njihove hrane, katere predstavniki so ravno tako planktonski organizmi. Te bočno sploščene predstavnice, ki pa živijo na dnu, so bolj izpostavljene doprinosu hrane, katere pade na dno, a je to velikokrat manj kakovostna vrsta hrane, v veliki meri že odmrlih organizmov. Na ta način bi lahko predvidevali, da so s tem razvile večjo rezistenco prot pomanjkanju hrane, poleg tega pa tudi

nezahtevnost določenih beljakovin, nukleinskih kislin, saj se v naravnih pogojih gibljejo v okolju, kjer je kakovost hrane nižja. Rezistentnost pridnenih rib so tako ugotovili tudi (Clemmesen, 1987; Yin in Blaxter, 1987) pri mladica rib vrst (*Engraulis mordax*) (Lasker in sod., 1970), (*Paralichthys californicus*) in *Hypsopsetta guttulata* (Gadomski in Petersen, 1988).

Ravno tako bi morali izmeriti vzdržljivostno plavanje, ko so osebk v morfološkem stanju post- fleksije. Poskusi, kjer se meri dolgotrajno sposobnost plavanja proti toku se izkažejo za izredno dobro metodo pridobivanja podatkov, ki se neposredno vezana na disperzijo mladice in so predstavljena kot vrednosti konstantne hitrosti plavanja do pretirane utrujenosti (Stobutzki in Bellwood, 1997; Dudley in sod., 2000; Fisher, 2004). Zaradu preobrazbe v sploščene osebk ne vzdržujejo konstante hitrosti plavanja, tako da meritve vzdržljivostnega plavanja niso bile izvedene.

6.4 FLEKSIJA

V grafih je razvidno, da niti ena mladica od hranjenih ad libitum starosti od 8 do 14 dni ni ostala na prvi stopnji razvoja. Razlika med mladica s 24 ur in 48 urnim stradanjem v prvi stopnji morfološkega razvoja ni velika, razlikuje se le za 0.9 cm/s in sicer med vrednostmi Ukrit. 1.2 cm/s za 24h in 2.1 cm/s za 48h deprivacije hrane.

V študiji se je izkazalo, da so mladice s post- fleksijo močno zmanjšale Ukrit., kar nakazuje na to, da so ti rezultati močno povezani z razvojem v ontogeniji. Kar pomeni da vse, ki so v post- fleksiji ali v 4. in 5. stopnji morfološkega razvoja, vložijo veliko manj energije v plavalne sposobnosti. Pri primerjavi mladice glede na fleksijo in morfološko stopnjo razvoja, so mladice v stanju post- fleksije in tiste v 4. in 5. fazi stopnje morfološkega razvoja, ko mladice počasi začnejo s procesom preobrazbe v odrasli osebek, ostale na dnu. Več kot polovica predstavnic, ni več plavala proti toku, in so ostale pri dnu. V skladu s preobrazbo telesa v sploščeno obliko in boljšimi morfološkimi prilagoditvami za življenje pri dnu.

Telesna dolžina, razvoj fleksije in morfološki razvoj so se izkazali kot dobri pokazatelji ontogenetskega razvoja. Veliko bolj uporabni kot starost, šteta v dnevih. Razlog za to je popolnoma enostaven: 'Določena stopnja ontogenetskega razvoja je ponavadi dosežena ob določeni uniformni velikosti za vrsto, ne glede na to koliko časa porabi osebek, da to velikost doseže' (Fuiman in Higgs, 1997; Fuiman 1997).

Regresija v telesni dolžini pri mladica z daljšo dobo deprivacije hrane je bila opažena pri mladica s telesno dolžino med 3.6 in 4.8 mm, v primerjavi z enako starimi hranjenimi osebk pri katerih je bila telesna dolžina med 5.3 in 7.2 mm. Ko so mladice dosegle velikosti ≥ 5.8 cm so pričele s preobrazbo. Zaradi zanimanja ali so vseeno pod prisilo oziroma pod veliko večjo hitrostjo toka, pripravljene plavati, smo povečali jakost toka na 5 do 6 cm/s, pri čemer se je izkazalo, da so te predstavnice, ki so se predhodno zadrževale pri dnu, sedaj uspešno plavale proti toku. A takoj, ko so odkrile kot ob pričetku plavalne komore ali pozicijo pri dnu

komore, kjer je hitrost enaka 0 cm/s, so ostale na tem mestu in prenehale plavati v katerokoli smer. Preprosta predpostavka bi lahko bila, da enkrat, ko mladice pričnejo s preobrazbo, najdejo prvi primeren prostor, ki jim nudi zaščito in zavetje in kjer so tokovi zelo šibki. Do tega ustreznega prostora, pa so prinešene pasivno kot pelagični osebek. Ko pričnejo z metamorfozo zmanjšajo vlaganje energije v plavalne sposobnosti, a če pride do pomanjkanja hrane ali nelagodnih razmer v določenem okolju, se lahko to dejstvo močno spremeni in so na kratke razdalje ravno tako sposobne vložiti veliko energije v plavanje. Znanstveniki, ki se ukvarjajo z disperzijskimi modeli predvidevajo, da so mladice najdene v vodnem stolpcu rezultat smeri tokov in faktorjev, ki vplivajo na njihov nastanek, ter ravno tako predvidevanja številčnih hidrodinamičnih modelov. Ob dnu, pa se pojavlja mejna plast, kjer je v tem delu vodnega stolpca hitrost tokov enaka 0 cm/s. Tiste mladice predstavnice družine Solenidae, ki okupirajo to mejno plast so tako izpostavljene veliko manjšim hitrostim vodnega toka, v primerjavi s tistimi mladnicami, ki se nahajajo nad tem delom v gornjem delu vodnega stolpca (Black in sod., 1991; Black in Moran, 1991), in s tem izmerjeni modeli številčnih hidrodinamičnih meritev, tu ne pridejo v upoštevanje in ne bodo vplivali na disperzijo (Leis, 2006). V tem primeru bi lahko bokoplute predstavnice izkoristile te prednosti abiotskih pogojev in s tem nabrale energetske rezerve, katere so izredno pomembne v času preobrazbe ali za druge preživetvene faktorje.

6.5 RNA/DNA

Kljub nekaterim poskusnim študijam o tem, kako kondicijsko stanje mladice vpliva na njihovo obnašanje in predvsem na plavalne sposobnosti (Laurence, 1972; Yin in Blaxter, 1987; Chick in Van den Avyle, 2000; Grorud-Colvert in Sponaugle, 2006), je razumevanje povezanosti plavalnih sposobnosti s prehranskimi režimi ovrednoteno preko razmerja RNA/DNA, še popolnoma nerazjasnjeno, saj teh primerjanih študij še ni bilo izvedenih.

Richard in sod. (1991) so izvajali študijo, kjer so ugotavljali efekte stradanja na razmerje RNA/DNA pri vrsti morskega lista (*Solea solea*) mladice in prišli do zaključkov, da mladice, ki so bile izpostavljene podhranjenosti, so že v začetku (24h deprivacije) kazale visok upad v razmerju RNA/DNA predvsem pri mladnicah starih 2 do 3 dni. A pri mladnicah starejših, starih od 5 do 10 dni, je potreben interval bil že mnogo daljši. Pri mladnicah starih 14 dni, tik pred štadijem metamorfoze, pa do prepoznavnih razlik v razmerju ni več prišlo (Richard in sod., 1991).

V naših rezultatih je bilo povprečje RNA/DNA pri hranjenih mladnicah 1.3. Ta vrednost je nekoliko nižja v primerjavi z ostalimi rezultati pleuronektiformnih predstavnic: *Solea solea* = 2 (Richard in sod., 1991) *Scophthalmus maximus* = 2.4 (Clemmesen, 1987). Vseeno vrednosti RNA/DNA našega standardnega postopka, protokla ni enakovredno poenostavitvi z drugimi protokoli. (Calderone in sod., 2006). Poleg tega je dokazano, da je razmerje pri gojenih mladnicah veliko nižje kot pri tistih iz naravnega okolja. (Buckley, 1980, 1984; Clemmesen, 1989). Plen v naravnih pogojih bi lahko vseboval veliko višjo nutricijsko vrednost, saj je tudi sama prehranjevalna veriga plena v naravnem okolju mnogo bolj raznolika, kot pa točno

predpisana prehrana v gojitvenih sistemih. Tako, da je pri tem resnično potrebno biti previden ob primerjavi gojenih in mladice iz naravnega okolja. Poleg tega bi bil lahko razlog za nižje razmerje tudi dokaj visoka temperatura (21 °C), zaradi povečane aktivnosti ribosomov in reducirane koncentracije RNA (Clemmesen, 1994).

Razmerje RNA/DNA se je spreminjalo v skladu s spreminjanjem hranjenja oziroma stradanja. Manj kot je bilo hrane, nižje je bilo razmerje. Spremembe so se poznale pri mladiceh brez hrane že od enega do treh dni deprivacije. Torej je to razmerje učinkovit in zanesljiv pokazatelj rasti in nasploh ontogenetskega razvoja mladice. To razmerje je bilo uporabljeno že v več študijah s predstavnicami morskih mladice (Rooker in Holt, 1996; Buckley in sod., 1999; Gwak in Tanaka, 2001; Chícharo in sod., 2003), a do sedaj še nikoli povezano s plavalnimi sposobnostmi mladice pa naj bo to povezano z obnašanjem ali fizičnimi sposobnostmi. V naši raziskavi se RNA/DNA razmerje ne navezuje tako močno na kritično plavalno hitrost, kar bi bil lahko velik pokazatelj povezanosti rezistence na stradanje.

Splošno opažen trend nam kaže zmanjšanje oziroma znižanje vseh parametrov podhranjenih mladice, a ne velikih odstopanj v primerjavi s hranjenimi. Redukcija variabilnosti parametrov hranjenih v primerjavi s podhranjenimi mladice nam kaže, rezistentnost mladice predstavnic *Solea senegalensis*. Zakaj prihaja tudi do odstopanj pri posameznih mladiceh med posameznimi legli, je to lahko tudi posledica tega, da pred tem, ko so bile še hranjene (vključno z IPIMAR) se je njihova prehrana lahko razlikovala od posameznika do posameznika, pri čemer so bile nekatere že bolj sposobne razviti rezistenco na pomanjkanje hrane kot druge. Kot že povedano so predstavnice družine Solenidae (Richards in sod., 1991) rezistentne in bi morda daljše časovno obdobje brez hrane (več kot 4 dni), pokazalo boljšo regresijo RNA. A le s tem bi, ne pridobili drugih ključnih informacij, kot je povezanost razmerja RNA/DNA z Ukrit.. Predvidevam, da mladice s 5 dnevi podhranjenosti pri tako nizki starosti in razvitosti, ne bi več morale učinkovito plavati, morda niti več živeti.

Primerjava Ukrit. z RNA/DNA razmerjem kaže pozitivno povezavo, kar je bilo po pričakovanjih saj je indeks RNA/DNA baziran na mišični aktivnosti in je s tem indikator povečane plavalne aktivnosti. Drugi indeksi kot so Fultonov indeks in R- kondicijski indeks pa so pokazali negativno korelacijo. Namreč ta dva indeksa sta bazirana na povezavi dveh parametrov telesne mase in telesne velikosti, pri čemer je pričakovano, da bo težja mladica glede na telesno dolžino v dobri formi, kar je dokazano za veliko predstavnic rib a pri vrsti *Solea senegalensis* se to ni izkazalo za pravilno. Razlog za to je, da takoj ko pričnejo z metamorfozo v sploščeno obliko (pričetek nekje s 3 stopnjo morfolškega razvoja), zmanjšajo plavalne sposobnosti, a njihova forma se vseeno izboljšuje, če so izpostavljene dobrim prehranjevalnim pogojem. Za to je veliko bolj zanesljiv indeks RNA/DNA, kot pa R. kondicijski ali Fultonov indeks.

7 SKLEPI

Ugotovili smo, da so mladice vrste *Solea senegalensis* slabe plavalke, kar pomeni da jih lahko determiniramo kot pelagične osebkke. V času ko preidejo v odraslo razvojno obliko in pričnejo s procesom preobrazbe v sploščeno obliko telesa, ponavadi prenehajo intenzivneje plavati. Povprečna hitrost hranjenih mladice je mnogo manjša od pelagičnih predstavnic vrst rib. Sposobne bi bile plavati le proti nizkim hitrostim toka, kot na primer v zaščitnih območjih pred močnimi tokovi, kot so lagune, esturiji, slana mokrišča.

Ravno tako lahko ovržemo našo drugo hipotezo, pri kateri smo predvidevali, da bodo mladice z daljšo telesno dolžino in večjo telesno maso ter višjo stopnjo onotogenskega razvoja, bolj razvito fleksijo hrbtne strune, dosegale višje hitrosti. Namreč izkazalo se je, da bolj ko so razvite, bolj se prilagajajo življenju na dnu in vedno manj energije uporabljajo za plavanje.

Pri naši trditvi, da bodo hranjene mladice najboljše plavalke in stradane najslabše, je tu ovrednotenje podatkov dvolično. Namreč hranjene ad libitum se hitreje razvijajo in starejše kot so, bolj so razvite in hitreje se preobrazijo v odrasli osebek. Kar pa ne pomeni, da so slabe plavalke, saj so hranjene dosegale najvišje maksimalne hitrosti. Pri mladiceh z deprivacijo hrane pa se izkaže, da bolj ko živijo v pomanjkanju, bolj se bodo trudile nadomestiti kar jim manjka, torej vlagajo energijo v plavanje. Tudi mladice, ki so 4 dni brez hrane se močno potrudijo pri plavanju, kar pomeni, da so zmožne a le za kratek čas.

Sinteza RNA se je znižala, ravno tako RNA/DNA razmerje glede na pomanjkanje hrane, a ne tako zelo očitno. Tiste z višjim razmerjem RNA/DNA so bile ravno tako slabe plavalke kot tiste z več sintetizirane RNA, a ravno tako, se to ni izkazalo kot splošna trditev za vse.

8 POVZETEK

V splošnem naši rezultati kažejo na to, da je bila rast pod vplivom prehranskih pogojev, a pri razmerju med RNA/DNA je prišlo le do rahlega znižanja in ravno tako pri mladica z najmanj 4 dnevi stradanja je prišlo do znižanja v plavalnih sposobnostih. Te vedenjske in fiziološke spremembe so glede na prejšnje rezultate drugih raziskav v skladu z našimi pri čimer lahko trdimo, da so bočno sploščene predstavnice manj aktivne v poznem larvalnem obdobju in veliko bolj rezistentne na stradanje v primerjavi s pelagičnimi vrstami. V prihodnosti bi bilo zanimivo imeti več podatkov o navezanosti razmerja RNA/DNA in pa vedenjskih lastnosti ribjih mladice, predvsem pri divjih mladica, predstavnicah pleuronektiformnih mladice, ki se nahajajo v morjih zmerno toplega pasu. V skladu z večjim razumevanjem predstavnic bokoplutih rib so nujno potrebne še nadaljne raziskave, saj je potrebno še veliko več podatkov v skladu s tem, da se doseže zaščito predstavnic, ohrani populacije in razume njihov življenjski cikel, ter ravno tako k večjemu prizadevanju k boljšim gojitvenim strategijam v gojilnicah. Mladice rib, katere so bile v pozni stopnji ontogenetskega razvoja vseh treh prehranjevanih vzorcev so dosegale nižje kritične hitrosti med plavanjem proti toku v primerjavi s tistimi v nižji stopnji razvoja, stanju pre-fleksije in fleksije. To nakazuje na povezavo z bentičnim načinom življenja odraslih osebkov, pri čemer pa se že opazne spremembe pri koncu razvoja mladice. Ti vzorci obnašanja in fiziološke spremembe so že predhodno dokazane in sicer, da bočno sploščene vrste rib postanejo manj aktivne v poznejših fazah razvoja in so veliko bolj odporne na pogoje stradanja v primerjavi s pelagičnimi predstavnicami.

9 VIRI

Bailey, K.M. in E.D. Houde. 1989. Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Advances in Marine. Biology*, 25: 1-83.

Bentle, L.A., S. Dutta in J. Metcoff. 1981. The sequential enzymatic determination of DNA and RNA. *Anal Biochemistry*, 116: 5–16.

Bergeron, J.-P. 1982. L'aspartate transcarbamylase, indice de croissance des organismes marins: perspectives et Limites. *Publs. Cent. natn. Exploit. Oceans (CNEXO) (Ser Act. Colloques)*, 14: 177-19.

Billman J. E., Pyron M. 2004. Evolution of form and function: Morphology and Swimming performance in North American Minnows. *Journal of Freshwater Ecology*, 20: 221-232.

Blaxter, J.H.S. in M.E. Staines. 1971. Food searching potential in marine fish larvae. Crisp, D.J. (Ed.), *Proceedings 4th European Marine Biology Symposium* 4: 467-481.

Blaxter J. H. S. 1986. Development of sense organs in behaviour of teleost larvae with special reference to AD LIBITUM in predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 98-114.

Booman, C.I., A. Folkvord in J.R. Hunter. 1991. Responsiveness of starved northern anchovy *Engraulis mordax* larvae to predatory attacks by adult anchovy. *Fish. Bull. (U.S.)*, 89: 707–711.

Buckley, L.J, Caldarone E. in Ong. T.L. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, 401: 265–277.

Caldarone E.M., Wagner M., Onge-Burnes J.S. in Buckley L.J. 2001. Protocol in guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. Ref Doc 01-11, Northeast Fisheries Science Center, Woods Hole, MA.

Caldarone, E.M., St. Onge-Burns J.M. in Buckley L.J. 2003. Relationship of RNA/DNA ratio and temperature to growth in larvae of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Mar. Ecol. Prog.*, 262: 229-240.

Caldarone E.M., Clemmesen C.M., Berdalet E., Miller T., Folkvord A., Holt G.J., Olivar M.P. in Suthers I.M.. – 2006. Inter-calibration of four spectro-fluorometric protocols for measuring RNA/DNA ratios in larval in juvenile fish. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 4: 153–163.

Chicharo in sod. 1998. Estimation of starvation and diel variation of the RNA/DNA ratios in field-caught *Sardina pilchardus* larvae off the north of Spain. *Marine ecology progress series*, 164: 273-283.

Chicharo M.A., Esteves E., Santos A.M.P., Santos A., Peliz A. in Ré P. 2003. Are sardine larvae caught off northern Portugal in winter starving? An approach examining nutritional conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser., 257: 303–309.

Chícharo M. A., Faria A., Morais P., Amaral A., Mendes C. in Chícharo L. 2009. Can you use only standard ichthyoplanktonic nets to catch fish larvae? The importance of light traps in shallower temperate coastal ecosystems. V tisku.

Chick J.H. in Van den Avyle M.J. 2000. Effects of AD LIBITUM ration on larval swimming speed and responsiveness to predator attacks: implications for cohort survival. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 57: 106–115.

Clemmesen, C.M. 1987. Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. J. Cons. int. Explor. Mer., 43: 122–12.

Clemmesen, C.M. 1989. RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. J. Fish Biol., 35: 331–333.

Clemmesen, C.M. 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. Mar. Biol., 118: 377–382.

Conceição L. E. C. in sod. 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 268: 64–81.

Cushing, D.H. 1975. The natural mortality of the plaice. J. Cons. Int. Explor. Mer., 36: 150–157.

Dinis M. T. in sod. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture, 176: 27–38.

Faria A., Ojanguren A. F., Fuiman L. A. in Gonçalves E. J. 2009. Ontogeny of critical swimming speed of wild-caught and laboratory-reared red drum *Sciaenops ocellatus* larvae. Marine ecology progress series, 384: 221–230.

Fechhelm R. G., Griffiths W. B., Martin L. B. in Gallaway B. J. 1996. Intra- in Interannual Variation in the Relative Condition in Proximate Body Composition of Arctic Ciscoes from the Prudhoe Bay Region of Alaska Transactions of the American Fisheries Society. American Fisheries Society, 125: 600–612.

Fisher R. in Wilson S. K. 2004. Maximum sustainable swimming speeds of late-stage larvae of nine species of reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312: 171–186.

Fuiman L. A. 1997. What can flatfish ontogenies tell us about pelagic and benthic lifestyles? *Journal of Sea Research*, 37: 257-267.

Fuiman, L.A. in R.S. Batty. 1997. What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *J. Exp. Biol.*, 200: 1745-1755.

Gadomski, D.M. in J.H. Petersen. 1988. Effects of food deprivation on the larvae of two flatfishes. *Mar. Ecol. Prog.*, 44: 103-111.

García-López A., Anguis V., Couto E., Canario A. V. M., Cañavate J. P., Sarasquete C. in Martínez-Rodríguez G. 2006. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 254: 583–593.

Gavaia P. J., Dinis M. T. in Cancela M. L. 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 211: 305–323.

Grorud-Colvert, K. in S. Sponaugle. 2006. Influence of condition on behaviour and survival potential of a newly settled coral reef fish, the bluehead wrasse *Thalassoma bifasciatum*. *Mar. Ecol. Prog.*, 327: 279-288.

Gwak, W.S. in Tanaka M. 2001. Developmental changes in RNA/DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. *J. Fish Biol.*, 59: 902–915.

Gwak W. S., Tsusaki T. in Tanaka M. 2002. Nutritional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared Japanese flounder from hatch to release. *Aquaculture*, 219: 503–514.

Kamler E., Szلاميńska M., Przybyl A., Barska B., Jakubas M., Kuczyński M. in Raciborsku K. 1990. Developmental response of carp, *Cyprinus carpio*, larvae fed different foods or starved. *Environ. Biol. Fishes*, 29: 303–313.

Klaren P. H. M., Wunderink Y. S., Yufera M., Mancera J. M. in Flik G. 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 155: 686–694.

Lasker, R., Feder H.M., Theilacker G.H. in May R.C. 1970. AD LIBITUM, growth, and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.*, 5: 345-353.

Laurence G. C. 1972. Comparative swimming abilities of fed in starved larval largemouth bass (*Micropterus salmoides*). J. Fish Biology, 4: 73-78.

Leis J. M. 2006. Are larvae of demersal fishes plankton or nekton. Advances in Marine Biology, 51: 59-141.

Leis J. M., Piol R. F., Hay A. C. in Wenp C. 2009. Ontogeny of behaviour relevant to dispersal and connectivity in the larvae of two non-reef demersal, tropical fish species. Marine and Freshwater Research, 60: 211-223.

Leis J. M., Hay A. C., Howarth G. J. 2009. Ontogeny of *in situ* behaviours relevant to dispersal and population connectivity in larvae of coral-reef fishes, 379: 163-179.

Nash R. D. M., Valencia A. H. in Geffen J. A. 2006. The Origin of Fulton's Condition Factor— Setting the Record Straight. Fisheries 31, 5: 236-238.

Plaut I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 13: 41-50.

Ribeiro J., Monteiro C. C., Monteiro P., Bentes L., Coelho R., Gonçalves J. M. C., Lino P. G. L. in Erzini K. 2008. Long-term changes in fish communities of the Ria Formosa coastal lagoon (southern Portugal) based on two studies made 20 years apart. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 76: 57-68.

Richard P. in sod. 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. Marine ecology progress series, 72: 69-77.

Rooker, J.R. in Holt. G.J. 1996. Application of RNA/DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). Mar. Fresh. Res., 47: 283-290.

Rubio V. C., Boluda Navarro D., Madrid J. A. in Sánchez-Vázquez F. J. 2009. Macronutrient self-selection in *Solea senegalensis* fed macronutrient diets and challenged with dietary protein dilutions. Aquaculture, 291: 95-100.

Skajaa K. in Browman H.I. 2007. The escape response of food-deprived cod larvae (*Gadus morhua* L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 353: 135-144.

Stobutzki I.C. in Bellwood. D.R. 1997. Sustained swimming abilities of the late pelagic stages of coral reef fishes. Mar. Ecol. Prog., 149: 35-41.

Sorgeloos P., Dhert P. in Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture, 200: 147-159.

Suthers I.M. 1998. Bigger or fatter - or is faster growth better? Considerations on condition in larval in pelagic juvenile coral reef fish. Australian Journal of Ecology, 23: 265-273.

Yin M.C. in Blaxter J.H.S. 1986. Morphological changes during growth and starvation of larval cod (*Gadus morhua* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 104(1-3): 215- 228.

Villalta M., Este V., Bransden M. in Gordon Bell J. 2005. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia AD LIBITUM period. Aquaculture 249: 353- 365.

Voss, R.C., Clemmesen C., Baumann H. in Hinrichsen H.H. 2006. Baltic sprat larvae: coupling food availability, larval condition and survival. Mar. Ecol. Prog. Ser., 308: 243-254.

Wagner, M.M., Durbin E.G. in Buckley L.J. 1998. RNA/DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 162: 173- 181.

Wagner M.M., Campbell R.G., Boudreau C.A., Durbin E.G. 2001. Nucleic acids in growth of *Calanus finmarchicus* in the laboratory under different food in temperature conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser., 221:185-197.

INTERNETNE POVEZAVE

FAO-Fisheries and aquaculture, 2009:

http://193.43.36.103/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Argyrosomus_regius.xml

Encyclopedia, 2009: <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Pleuronectiform>

Fishbase, 2009: <http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=8852>

Larval fish ID,2009:

http://www.unepscs.org/Larval_Fish_Training/Identification_of_Larval_and_Juvenile_Fish.pdf

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem svoji mami za vztrajnost, potrpežljivost in vso pomoč tako doma kot po svetu. Verjamem, da ni najbolj enostavno biti moja mama. Ravno tako verjamem, da se verjetno brez vzgoje, katero sem prejela, ne bi nikoli odločila za študij biologije in bi tako zamudila prelepo življenje katerega imam do sedaj in verjamem, da bo tako še vnaprej.

Ravno tako se iskreno zahvaljujem za pomoč in razumevanje mentorju prof. Tomanu ter članoma komisije prof. Kosu in prof. Bulogu za možnost zaključka pomembne stopnje v mojem življenju. Ravno tako se vam zahvaljujem za priložnost k novim zmagam naproti.

Ravno tako najlepša hvala vsem mojim prijateljem tako v Sloveniji kot po svetu, da so prispevali en velik del k temu kar sem.

I would very much like to thank to my working mentor in Faro, University of Algarve Alexandra Chicharo for giving me this wonderful opportunity to do my thesis within marine biology, for all the support and kindness. As well I would very much like to than to Elvira Morote, to show me the road I want to take in the future within the research work. It is extremely rare to find such a good friend while cooperating strictly connected to work. Many thanks to all the people in the laboratory Renata Goncalves, Joana Cruz, David Pilo where I spend great time and I'm very much looking forward to do more research work!

I would like to send greetings and thankful thoughts to all my friends around the globe. It is soo nice to see so many happy faces everywhere on this planet I've been until now. Wish you all the best in the future!

PRILOGE

Priloga 1: Prikaz mladice glede na ločena legla in prehranjevalni vzorci stradanj glede na dolžino dni deprivacije hrane.

Starost v dnevih			Srednja vrednost	Standardna deviacija	Obseg
1	Ad libitum	11	1.37	0.73	2.25
		12	1.60	0.94	3.12
		13	1.31	0.18	0.43
		12	1.82	0.79	2.25
	24h	13	0.77	0.49	1.00
	48h	11	1.17	0.30	0.43
		13	2.08	1.59	2.25
	72h	12	2.21	1.84	4.05
		14	4.04	1.38	3.00
2	Ad libitum	8	2.23	1.39	4.62
		9	1.80	1.03	2.25
		10	1.36	0.89	2.82
		11	1.54	0.31	0.62
		12	2.30	0.65	1.82
		13	0.84	0.59	1.30
		14	0.95	0.00	0.00
	24h	9	1.96	1.42	5.05
		10	1.20	0.34	1.05
		11	0.91	0.41	1.00
		12	2.86	1.62	3.62
	48h	13	1.02	0.47	1.00
		14	1.17	0.30	0.43
		10	0.59	0.29	0.57
		11	3.00	1.24	3.62
	72h	12	1.83	0.79	2.25
		13	1.38	0.	0.00
		14	1.01	0.41	1.00
		11	1.22	0.47	1.62
	96h	12	2.30	0.60	1.20
		13	1.17	1.00	3.12
		14	1.02	0.69	1.62
		12	1.58	0.47	1.05
	120h	13	.38	0.00	0.00
	144h	14	1.38	0.	0.00
3	Ad libitum	5	0.57	0.28	0.57

	6	0.61	0.35	1.00
	7	0.59	0.40	1.00
	8	0.54	0.38	0.87
	9	0.48	0.40	1.30
	10	0.35	0.23	0.87
	11	0.41	0.36	0.87
	12	0.59	0.50	1.30
24h	6	0.61	0.35	1.00
	7	0.61	0.29	0.57
	8	0.46	0.42	1.30
	9	0.89	0.67	1.92
	10	0.56	0.34	0.87
	11	0.34	0.39	0.87
48h	7	0.46	0.22	0.57
	8	0.52	0.26	0.57
	10	0.60	0.57	1.92
	11	0.45	0.39	0.87
	12	0.29	0.43	1.30
72h	8	0.57	0.42	1.30
	9	0.71	0.43	1.30
	12	0.	0.	0.

Priloga 2: Meritve vseh mladice vključenih v raziskavo

DNI STAROSTI	POGOJI	Telesna teža (mg)	Telesna dolžina (mm)	Ukrit.(cm/s)	fleksija	Morfološke značilnosti
<u>8</u>	<u>kontrola</u>	<u>0,2</u>	<u>5</u>			
<u>8</u>	<u>kontrola</u>	<u>0,2</u>	<u>4,7</u>		3	4
8	AD LIBITUM	0,1	4,5	0,95	1	2
8	AD LIBITUM		3,8	0	1	2
8	AD LIBITUM	0,4	4,6	2	<u>2</u>	<u>3</u>
8	AD LIBITUM	0,1	4,3	3,2	2	2
8	AD LIBITUM	0,8	4,6	3,2	1	2
8	AD LIBITUM	0,4	4,1	2	1	2
8	AD LIBITUM		4,3	2	1	2

8	AD LIBITUM		4,3	0	2	2
8	AD LIBITUM	0,1	4,2	5	3	5
8	AD LIBITUM	0,2	4,4	0,38	1	2
9	24h Starv	0,8	3,7	0,95	1	1
9	24h Starv	0,2	4,7	1,38	1	2
9	24h Starv	0,3	4,2	1,38	1	2
9	24h Starv	0,2	4,1		<u>1</u>	<u>2</u>
9	24h Starv	0,1	4,7	1,38	1	1
9	24h Starv	0,3	4,3	0,95		
9	24h Starv	0,7	4,8	2	1	1
9	24h Starv	0,4	4	1,38	1	2
9	24h Starv	0,3	4,1	0,95	1	1
9	24h Starv		4,3	2	1	2
<u>9</u>	<u>kontrola</u>	<u>0,2</u>	<u>4,7</u>		1	1
9	kontrola	0,4	4,5		1	1
9	AD LIBITUM	0,2	4,7		1	3
9	AD LIBITUM	0,6	5,1	2	1	2
9	AD LIBITUM	0,3	4,8	0,95	1	1
9	AD LIBITUM	0,3	4,6	0	2	3
9	AD LIBITUM	0,4	5	3,2	1	3
9	AD LIBITUM	0,6	4,7	0	1	2
9	AD LIBITUM	0,2	5		1	1
9	AD LIBITUM	0,5	5	3,2	1	2
10	24h Starv	0,1	3,7	0,95	2	3
10	24h Starv	0,9	3,9	1,38	2	3
10	24h Starv	0,1	4,5	0,95	2	3
10	24h Starv	0,3	4,3	1,38	2	3
10	24h Starv	0,2	3,9	0,95	2	3
10	24h Starv	0,1	4,9	1,38	1	2
10	24h Starv	0,1	4,3	0,95	1	2
10	24h Starv		3,9	0,95	2	2
10	24h Starv		4,5		1	2

10	24h Starv	0,5	4,4	1,38	2	3
10	48h Starv	0,2	4,3	0,38	1	2
10	48h Starv	0,1	3,7	0,38	1	2
10	48h Starv	0,1	3,9	0,38	2	3
10	48h Starv	0,5	4,4	0,38	1	2
10	48h Starv	0,6	4,8		1	1
10	48h Starv	0,6	4,7	0,948	2	3
10	48h Starv	0,1	4,3	0,38	1	2
10	48h Starv	0,5	4,3	0,948	1	2
10	48h Starv	0,2	4,4	0,948	1	1
10	48h Starv	0,3	3,8	0,95	2	2
10	kontrola	0,2	4		1	1
10	kontrola	0,3	4		1	1
10	kontrola	0,3	3,9		1	1
10	AD LIBITUM	0,6	5	0,95	1	1
10	AD LIBITUM	0,8	4,3	0,38	1	2
10	AD LIBITUM	0,1	4	1,38	1	1
10	AD LIBITUM	0,5	4,7	0,38	1	1
10	AD LIBITUM	1	4,3	0,38	1	2
10	AD LIBITUM	0,7	3,8	3,2	2	3
10	AD LIBITUM	0,4	4,4	0,95	2	3
10	AD LIBITUM	0,4	4	2	1	3
10	AD LIBITUM	0,1	4	2	2	3
10	AD LIBITUM	0,6	4	1,38	2	2
10	AD LIBITUM	0,4	4,5	0	2	3
10	AD LIBITUM	0,2	4,2	2	2	3
11	24h Starv	0,8	4,7	0,38	1	1
11	24h Starv	0,3	5,4	1,38	1	1
11	24h Starv	0,2	4,6	0,38	1	1
11	24h Starv	0,3	5,2	1,38	2	3
11	24h Starv	1	5,2	0,95	1	1

11	24h Starv	0,7	4,8	0,95	1	1
11	24h Starv	0,7	4,3	0,95	1	1
11	48h Starv	0,2	4,8	5		
11	48h Starv	0,8	4,9	2	1	3
11	48h Starv	0,8	4,3	0		
11	48h Starv	0,8	4,9	0	2	3
11	48h Starv	0,3	4,9	3,2		
11	48h Starv	0,7	5,3	3,2		
11	48h Starv	0,1	4,9		2	3
11	48h Starv	0,2	4,4	1,38		
11	72h Starv	0,5		0,38	1	1
11	72h Starv	0,2		1,38	2	3
11	72h Starv	0,3	4,3	0,95	1	1
11	72h Starv	0,2		0,95		
11	72h Starv	0,5		2	1	1
11	72h Starv	0,1	4,5	1,38	1	1
11	72h Starv	0,6	4,7	1,38	1	1
11	72h Starv	0,5		0,95	2	2
11	72h Starv	0,8	4,3	2	1	1
11	kontrola	0,3	4,5		1	3
11	kontrola	0,7	5,2		1	1
11	kontrola	0,7	5,2		1	1
11	kontrola	0,3	4,5		1	3
11	kontrola	0,3	4,9		1	1
11	AD LIBITUM	0,2	3,5	0	3	3
11	AD LIBITUM	0,6	5,2	0	3	3
11	AD LIBITUM	0,8	5,3	0	3	4
11	AD LIBITUM	0,6	5,2	0	3	4
11	AD LIBITUM	0,8	4,9		2	3
11	AD LIBITUM	0,4	5,9	1,38	2	3
11	AD LIBITUM	1	5,6	0	1	1
11	AD LIBITUM	0,4	5,1	0	1	1
11	AD LIBITUM	0,2	5,1	0	3	4
11	AD	1	5,2	1,38	2	3

	LIBITUM					
12	24h Starv	0,2	5,1	2	1	3
12	24h Starv	0,5	4,7	5	2	3
12	24h Starv	1,4	4,9		2	3
12	24h Starv	0,5	5,1	1,38	1	2
12	24h Starv	0,3	4,9	5	3	4
12	24h Starv	0,6	4,5	2	1	2
12	24h Starv	0,2	4,5	1,38	2	3
12	24h Starv	0,3	5		3	3
12	24h Starv	0,3	4,5	2	3	3
12	24h Starv	0,1	4,6	5	2	3
12	24h Starv	0,2	4,7		2	3
12	48h Starv	0,4	5,3	0	1	1
12	48h Starv	0,8	5,6		1	1
12	48h Starv	0,3	4	1,38	1	1
12	48h Starv	0,4	4,6	3,2	1	1
12	48h Starv	0,2	4,7	1,38	1	1
12	48h Starv	0,1	4	2	2	3
12	48h Starv	0,1	4,6	2	3	3
12	48h Starv	0,2	4	1,38	3	4
12	48h Starv	0,1	3,8	0,95	3	4
12	48h Starv	0,2	4,4	1,38	1	1
12	48h Starv	0,4	4,7	3,2	1	1
12	72h Starv	0,3	4,4	2	1	1
12	72h Starv	0,3	5	2	1	1
12	72h Starv	0,1	4,7	2	1	1
12	72h Starv	0,3	4,4	3,2		
12	92h Starv	0,5	4,2	0,95	1	2
12	92h Starv	0,3	3,7	1,38	1	2
12	92h Starv	1,4	4	1,38	1	1
12	92h Starv	0,2	4	2	1	1
12	92h Starv	0,1	4,6	2	1	2
12	92h Starv	0,3	4,2	2	1	2
12	92h Starv	0,3	4	0,95	1	1
12	kontrola	0,2	4,5		1	2
12	kontrola	0,4	5,1	0,38	1	2
12	kontrola	0,4	5,1	0,38	1	2
12	kontrola	0,4	5,1	0,38	1	2
12	kontrola	0,3	4,9		1	1
12	AD LIBITUM	0,4	4,9	0	2	3
12	AD	1,1	4,8	3,2	3	4

	LIBITUM					
12	AD LIBITUM	0,7	5,3	3,2	2	3
12	AD LIBITUM	1,5	5,4	2	3	4
12	AD LIBITUM	0,3	5,1	2	2	3
12	AD LIBITUM	0,3	5,8	1,38	3	3
12	AD LIBITUM	0,8	6	2	3	3
12	AD LIBITUM	0,3	6		2	3
12	AD LIBITUM	0,6	5,8	2	3	3
13	116h Starv	0,5	4,4	0,38	3	4
13	116h Starv	1	5,5	0	2	4
13	116h Starv	0,7	4,6	0,38	3	5
13	116h Starv	0,3	5	0	3	4
13	24h Starv	0,3	5,3	0	1	2
13	24h Starv	0,3	4,6	0,38	1	1
13	24h Starv	0,5	5,7	0	1	1
13	24h Starv	0,8	5,4	0	1	2
13	24h Starv	0,5	4,5	1,38	1	1
13	24h Starv	0,5	5,1	0	1	1
13	24h Starv	0,5	5,2	1,38	1	2
13	24h Starv	0,5	5	0,95	1	2
13	48h Starv	0,3	5,3	0	2	3
13	48h Starv	0,3	5,3	1,38	3	4
13	48h Starv	0,6	5	0	3	5
13	48h Starv	0,1	5,6	0	3	3
13	48h Starv	0,1	4,4	0	3	3
13	48h Starv	0,8	5,1	0	3	4
13	72h Starv	0,1	5	0,38	3	4
13	72h Starv	0,5	5	0,38	2	3
13	72h Starv	0,1	4,3	1,38	2	3
13	72h Starv	0,3	4,7		3	3
13	72h Starv	0,4	5,5	2	3	4
13	72h Starv	0,6	4,7	0	3	3
13	72h Starv	0,9	5,3	1,38	3	3
13	72h Starv	0,3	5,2	1,38	2	3
13	72h Starv	0,9	4,9	0,38	3	3

13	72h Starv	0,1	4,1	0	3	4
13	72h Starv	0,3	5	3,2	2	4
13	<u>kontrola</u>	1,5	5		2	3
13	kontrola	1,5	5		2	3
13	<u>kontrola</u>	1,5	5		2	3
13	<u>kontrola</u>	0,5	6		1	1
13	<u>kontrola</u>	0,5	6		2	1
13	kontrola	0,5	6		1	1
13	kontrola	0,8	5,3		2	4
13	AD LIBITUM	0,6	5,3	0	2	4
13	AD LIBITUM	0,4	6,7	1,38	3	4
13	AD LIBITUM	0,3	5,6	0,38	2	4
13	AD LIBITUM	1	5,6	0	3	4
13	AD LIBITUM	1,4	6,8	0	3	5
13	AD LIBITUM	0,8	5	0,085	3	5
13	AD LIBITUM	0,8	6	0	3	5
13	AD LIBITUM	0,9	6,8	0,95	3	4
14	140h Starv	0,1	4,6	1,38	2	3
14	140h Starv	0,1	4,6	1,38	2	3
14	140h Starv	0,5	5,8	0	1	2
14	140h Starv	0,9	4,5	0	2	2
14	140h Starv	0,4	5,8	0	2	2
14	140h Starv	0,4	6,1	0	2	2
14	24h Starv	0,8	6,9	0	3	5
14	24h Starv	0,1	6	0	3	4
14	24h Starv	1	6,6	0	3	4
14	24h Starv	0,6	6,8	0,95	3	4
14	24h Starv	0,6	6,9	0	3	4
14	24h Starv	0,7	6,7	1,38	3	5
14	48h Starv	0,6	5,3	0	3	5
14	48h Starv	0,8	6,6	0	3	5
14	48h Starv	0,3	5,5	0	3	5
14	48h Starv	0,4	5,9	0,95	3	5
14	48h Starv	0,5	6,2	0,38	3	5

14	48h Starv	1,5	6,2	1,38	3	5
14	48h Starv	0,3	4,8	0	3	5
14	48h Starv	0,2	5,3	0,95	3	5
14	48h Starv	0,3	5,2	0	3	5
14	48h Starv	0,5	6,5	0	3	5
14	72h Starv	0,1	4,2	1,38	3	5
14	72h Starv	0,5	5,2	0	3	4
14	72h Starv	0,3	4,1	0,38	3	4
14	72h Starv	0,4	4,3	0	3	5
14	72h Starv	0,5	5,6	0	3	5
14	72h Starv	0,3	5	0	3	5
14	72h Starv	0,4	5,4	0,95	3	5
14	72h Starv	0,3	5,8	0,38	3	5
14	72h Starv	0,6	5,2	0	3	5
14	72h Starv	0,9	5,1	2	3	4
14	kontrola	0,7	6		1	1
14	kontrola	0,2	4,7		2	2
14	kontrola	0,7	6		1	1
14	kontrola	0,2	5		3	5
14	kontrola	0,2	5		3	5
14	kontrola	0,7	6,8		3	5
14	kontrola	0,7	6,8		3	5
14	kontrola	0,5	5		3	5
14	AD LIBITUM	0,5	7,3	0	2	3
14	AD LIBITUM	0,6	6	0	2	3
14	AD LIBITUM	0,9	7,4	0	2	2
14	AD LIBITUM	0,7	7,3	0,95	2	3
14	AD LIBITUM	0,7	7	0	2	2
14	AD LIBITUM	0,9	5,8	0	2	2
14	AD LIBITUM	0,5	7,2	0	2	2
14	AD LIBITUM	0,7	5,9	0,95	1	2
14	AD LIBITUM	1,1	7,5	0	3	5
14	AD LIBITUM	1	7,1	0	1	2

Dni starosti	Prehranski režim	Ukrit.	RNA/mladica	RNA/mg	DNA/mladica	DNA/mg	RNA:DNA Končna
8	kontrola	0,38	6,18	12,36	6,71	13,42148026	0,921
8	kontrola	0	0,79	0,79	5,33	5,327583373	0,149
8	AD LIBITUM	0,38	1,10	1,57	11,47	16,38994025	0,096
8	AD LIBITUM	0	8,20	27,34	12,54	41,79973438	0,654
8	AD LIBITUM	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
8	AD LIBITUM	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
8	AD LIBITUM	0	1,44	2,88	14,48	28,95311496	0,100
8	AD LIBITUM	0	20,11	22,34	14,03	15,58689908	1,434
8	AD LIBITUM	0	1,51	3,76	10,88	27,19785409	0,138
8	AD LIBITUM	0	27,22	68,05	13,31	33,27685866	2,045
8	AD LIBITUM	2	14,15	70,74	10,35	51,76625354	1,366
8	AD LIBITUM	5	7,57	15,13	4,92	9,830014164	1,540
9	24h Starv		4,06	2,90	7,30	5,215292392	0,556
9	24h Starv	1,38	7,53	15,06	12,25	24,50026912	0,615
9	24h Starv	5	0,00	0,00	0,00	0	
9	24h Starv	2	1,29	2,15	2,99	4,991583446	0,430
9	24h Starv	1,38	5,29	26,47	3,82	19,08773786	1,387
9	24h Starv		0,00	0,00	3,62	12,06862535	0,000
9	24h Starv	0,38	0,00	0,00	1,81	2,266487841	0,000
9	24h Starv	2	0,00	0,00	5,72	19,05877316	0,000
9	24h Starv	1,38	0,00	0,00	1,57	5,232955953	0,000
9	24h Starv	5	5,96	59,59	1,96	19,6259915	3,036
9	kontrola		29,02	145,11	20,36	101,8031193	1,425
9	kontrola	0,38	0,00	0,00	0,00	0	
9	AD LIBITUM	1,38	2,80	9,33	11,53	38,44225429	0,243
9	AD LIBITUM	0	2,23	7,43	13,57	45,22698431	0,164
9	AD	0	2,13	2,66	18,68	23,35279006	0,114

	LIBITUM						
9	AD LIBITUM	0,38	5,94	19,80	9,46	31,5275486	0,628
9	AD LIBITUM	0	2,35	4,71	1,15	2,294004307	2,053
9	AD LIBITUM	0,95	0,70	0,70	3,91	3,910234614	0,179
9	AD LIBITUM	0	0,90	8,98	15,03	150,3267974	0,060
9	AD LIBITUM	0	80,47	80,47	26,08	26,07695386	3,086
10	24h Starv	0,95	11,41	14,27	4,55	5,691228453	2,507
10	24h Starv	0,95	88,17	146,95	21,45	35,75403248	4,110
10	24h Starv	0	79,93	133,21	31,05	51,75403756	2,574
10	24h Starv	0	1,05	1,31	11,66	14,5764857	0,090
10	24h Starv	1,38	8,96	44,80	6,13	30,64143946	1,462
10	24h Starv	1,38	10,67	35,58	7,87	26,22471671	1,357
10	24h Starv		9,72	48,62	18,24	91,19543201	0,533
10	24h Starv	1,38	9,76	97,61	14,25	142,4645184	0,685
10	24h Starv	0,95	6,00	19,98	12,45	41,49667139	0,482
10	24h Starv	2	16,78	23,97	14,72	21,02953258	1,140
10	48h Starv	1,38	0,75	1,87	2,73	6,833074735	0,274
10	48h Starv	0,95	1,50	14,96	4,42	44,22924091	0,338
10	48h Starv	0,95	2,97	9,90	4,71	15,69010655	0,631
10	48h Starv	2	2,51		5,59		0,449
10	48h Starv	1,38	8,49	16,98	7,97	15,94854503	1,065
10	48h Starv	1,38	3,32	3,69	6,15	6,829180713	0,540
10	48h Starv	0,95	4,00	40,03	5,29	52,90200758	0,757
10	48h Starv	1,38	6,20	20,68	9,08	30,25686552	0,683
10	48h Starv	0	0,79	1,58	3,61	7,215966169	0,219
10	48h Starv	0,95	9,66	48,28	12,46	62,30093156	0,775
10	kontrola	1,38	0,09	0,88	2,30	22,9959156	0,038
10	kontrola	0,95	12,05	120,54	11,74	117,3870184	1,027
10	kontrola	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
10	AD LIBITUM	0,95	12,32		8,96		1,375
10	AD LIBITUM	0,95	0,10	0,20	23,61	47,21891554	0,004
10	AD LIBITUM	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
10	AD LIBITUM		233,67		55,81		4,187
10	AD	1,38	23,55	47,11	18,88	37,75877754	1,248

	LIBITUM						
10	AD LIBITUM	0,95	46,74	66,78	32,14	45,91775577	1,454
10	AD LIBITUM	0,95	37,62	53,75	19,22	27,46008963	1,957
10	AD LIBITUM	0	2,38	5,94	4,47	11,17845255	0,531
10	AD LIBITUM		7,53	9,41	9,60	11,99503364	0,785
10	AD LIBITUM	1,38	4,09	13,65	1,16	3,864943343	3,531
10	AD LIBITUM	3,2	19,30	48,25	3,11	7,77476983	6,207
10	AD LIBITUM	1,38					
11	24h Starv	5	0,00	0,00	5,27	26,32891307	0,000
11	24h Starv	2	0,00	0,00	0,00	0	
11	24h Starv	0	0,00	0,00	0,00	0	
11	24h Starv	0	0,00	0,00	0,00	0	
11	24h Starv	3,2	0,00	0,00	5,40	18,01604393	0,000
11	24h Starv	3,2	0,00	0,00	2,50	3,566796018	0,000
11	24h Starv	2					
11	48h Starv	2	4,42	44,23	1,18	11,82429178	3,741
11	48h Starv	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
11	48h Starv	0,95	0,00	0,00	0,00	0	
11	48h Starv		9,20	91,98	8,47	84,67849968	1,086
11	48h Starv	1,38	0,57	2,86	5,05	25,26044669	0,113
11	48h Starv	0	0,46	0,76	14,41	24,0172294	0,032
11	48h Starv	0,38	0,00	0,00	0,00	0	
11	48h Starv	1,38	1,09	5,43	10,81	54,03706022	0,100
11	72h Starv	0	0,00	0,00	2,90	3,620587606	0,000
11	72h Starv	0,38	0,00	0,00	16,02	160,2327251	0,000
11	72h Starv	0	0,00	0,00	0,00	0	
11	72h Starv	0,95	3,21	8,03	11,35	28,37092448	0,283
11	72h Starv	0,38	0,83	1,66	7,59	15,18908912	0,109
11	72h Starv	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
11	72h Starv	0,38	0,24	2,42	12,63	126,3440251	0,019
11	72h Starv	0	1,50	5,00	16,16	53,87434357	0,093
11	72h Starv	3,2	1,15	2,88	14,13	35,32245268	0,082
11	kontrola	0,38	0,21	0,41	14,60	29,19641845	0,014
11	kontrola	0,95	14,51	72,57	11,12	55,59676827	1,305
11	kontrola		1,52	2,54	7,59	12,65757427	0,200

11	kontrola	0	44,15	147,18	19,75	65,84112571	2,235
11	kontrola	1,38	40,58	135,25	20,94	69,7923861	1,938
11	AD LIBITUM	0,948	29,27	48,78	13,83	23,05540944	2,116
11	AD LIBITUM	0	27,94	46,56	14,70	24,49813938	1,901
11	AD LIBITUM	0	15,77	157,71	11,00	109,9852607	1,434
11	AD LIBITUM	0	3,98	39,81	7,62	76,1539941	0,523
11	AD LIBITUM	0,38	2,90	29,04	10,99	109,9104954	0,264
11	AD LIBITUM	0,948	13,95	27,89	16,01	32,02306947	0,871
11	AD LIBITUM	0,948	29,59	147,93	12,27	61,36636618	2,411
11	AD LIBITUM	0,95	17,75	59,17	11,65	38,82994522	1,524
11	AD LIBITUM	0	0,00	0,00	0,00	0	
11	AD LIBITUM	0	57,97	193,23	19,67	65,57923113	2,947
12	24h Starv	0	10,08	20,16	63,48	126,9684942	0,159
12	24h Starv	0,38	0,00	0,00	0,70	1,390305641	0,000
12	24h Starv	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
12	24h Starv	2	26,22	87,41	15,43	51,43982138	1,699
12	24h Starv	2	3,54	11,81	7,43	24,76881372	0,477
12	24h Starv	2	2,29	22,85	13,37	133,7313179	0,171
12	24h Starv	1,38	0,00	0,00	0,00	0	
12	24h Starv	0	2,23	4,46	13,63	27,26096723	0,163
12	24h Starv	0,38	0,16	0,55	17,21	57,35010767	0,010
12	24h Starv	3,2	0,07	0,24	13,96	46,51730956	0,005
12	24h Starv	0,95	0,00	0,00	6,26	20,86954359	
12	48h Starv	0	121,97	304,93	19,42	48,56199755	6,279
12	48h Starv	0,95	9,95	49,74	9,65	48,22714773	1,031
12	48h Starv	0	3,44	6,88	13,15	26,30954532	0,262
12	48h Starv	0	22,52	75,06	15,35	51,17987003	1,467
12	48h Starv	0,95	25,82	64,56	15,10	37,76101931	1,710
12	48h Starv	2	0,02	0,04	8,83	17,65688164	0,002
12	48h Starv	0,38	1,03	3,44	16,72	55,72808443	0,062
12	48h Starv	0	3,28	5,47	2,17	3,620587606	1,510
12	48h Starv	1,38	12,84	128,44	10,22	102,2252152	1,256
12	48h Starv	0,38	19,42	194,19	20,15	201,5006326	0,964

12	48h Starv	0,38	14,45	28,89	15,14	30,28680085	0,954
12	72h Starv	1,38	13,27	132,70	13,60	135,963102	0,976
12	72h Starv		3,66	12,19	15,24	50,8026204	0,240
12	72h Starv	2	3,69	9,23	20,10	50,24431657	0,184
12	72h Starv	0	0,04	0,07	7,72	12,86678455	0,006
12	92h Starv	1,38	5,81	6,45	10,10	11,21956116	0,575
12	92h Starv	1,38	6,97	23,24	6,31	21,03582049	1,105
12	92h Starv	0,38	33,54	37,27	15,25	16,9474085	2,199
12	92h Starv	0	3,34	33,43	7,08	70,84566277	0,472
12	92h Starv	1,38	24,79	41,32	17,80	29,67439765	1,392
12	92h Starv	2	11,91	13,24	19,11	21,23670013	0,623
12	92h Starv	3,2	4,54	15,12	15,69	52,31359484	0,289
12	kontrola	0,95	4,12	8,25	63,48	126,9684942	0,065
12	kontrola	2	0,00	0,00	0,00	0	
12	kontrola	0,95	0,73	1,46	5,73	11,45154391	0,128
12	kontrola	1,38	4,50	14,99	3,33	11,10573654	1,350
12	kontrola	1,38	8,66	6,19	8,49	6,067578915	1,020
12	AD LIBITUM	2	0,00	0,00	2,72	13,6134094	0,000
12	AD LIBITUM	2	0,00	0,00	3,09	30,9343005	0,000
12	AD LIBITUM	2	0,00	0,00	3,37	11,23830393	0,000
12	AD LIBITUM	0,95	0,00	0,00	4,03	13,43962119	0,000
12	AD LIBITUM		0,00	0,00	0,00	0	
12	AD LIBITUM		7,78	11,11	11,82	16,88228278	0,658
12	AD LIBITUM		1,25	6,24	9,42	47,09660357	0,132
12	AD LIBITUM		24,90	124,52	16,51	82,54072484	1,509
12	AD LIBITUM		16,97	84,84	12,42	62,10854938	1,366
13	116h Starv	0,38	41,76	104,40	19,25	48,13307784	2,169
13	116h Starv	0,38	61,64	154,11	23,86	59,65542106	2,583
13	116h Starv	0,38	2,97	7,43	15,97	39,92511423	0,186
13	116h Starv		0,23	0,76	10,20	33,99708635	0,022
13	24h Starv		82,09	117,28	30,38	43,40249725	2,702
13	24h Starv		1,60	8,01	7,70	38,49408742	0,208
13	24h Starv		1,71	8,57	10,51	52,55533757	0,163
13	24h Starv		2,06	2,94	13,07	18,6698186	0,158

13	24h Starv		108,26	154,66	31,78	45,3966954	3,407
13	24h Starv		35,70	71,41	28,28	56,55228441	1,263
13	24h Starv		47,56	237,80	15,73	78,64145471	3,024
13	24h Starv		20,95	104,76	5,75	28,7697898	3,641
13	48h Starv		34,17	170,85	12,64	63,20034501	2,703
13	48h Starv		42,01	28,00	24,62	16,41241789	1,706
13	48h Starv		2,90	1,94	10,99	7,327366362	0,264
13	48h Starv		19,59	13,06	11,81	7,875615824	1,658
13	48h Starv		77,74	155,49	21,30	42,59289736	3,651
13	48h Starv		54,68	109,36	16,00	32,0024797	3,417
13	72h Starv		28,40	56,79	12,25	24,50916386	2,317
13	72h Starv		54,31	77,58	17,25	24,64143756	3,148
13	72h Starv		31,48	44,97	19,41	27,72710831	1,62
13	72h Starv		7,42	18,56	17,73	44,31689535	0,42
13	72h Starv		233,67	292,08	55,81	69,76287144	4,19
13	72h Starv		6,40	21,33	11,59	38,62422023	0,552
13	72h Starv		0,17	0,57	9,23	30,77368971	0,019
13	72h Starv		0,17	0,57	6,96	23,20910567	0,025
13	72h Starv		6,34	21,14	8,41	28,04420062	0,754
13	72h Starv	0	6,69	16,72	9,73	24,3151381	0,688
13	72h Starv	3,2	13,34	12,13	6,22	5,657217358	2,144
13	<u>kontrola</u>	3,2	35,57	50,81	23,07	32,96154391	1,542
13	kontrola	0,95	15,90	26,50	11,06	18,44097025	1,437
13	<u>kontrola</u>	2	2,97	1,98	4,54	3,027776728	0,655
13	<u>kontrola</u>	2	0,00	0,00	2,14	7,125316408	0,000
13	<u>kontrola</u>	1,38	1,55	5,15	3,70	12,33896256	0,418
13	kontrola	2	9,39	11,74	2,22	2,773370106	4,233
13	kontrola		24,90	82,99	2,02	6,719810596	12,350
13	AD LIBITUM	0,38	7,99	9,98	6,55	8,189769164	1,219
13	AD LIBITUM	1,38	9,95	99,54	6,80	68,00911758	1,464
13	AD LIBITUM	0,38	10,14	20,28	4,47	8,932713741	2,271
13	AD LIBITUM	0,38	0,00	0,00	5,71	5,706046066	0,000
13	AD LIBITUM	3,2	5,46	7,80	5,65	8,068738093	0,966
13	AD LIBITUM	0,95	3,12	7,79	5,12	12,80239777	0,608
13	AD LIBITUM	2	0,00	0,00	0,00	0	

13	AD LIBITUM	2	0,00	0,00	0,00	0	
14	140h Starv	2	0,00	0,00	0,00	0	
14	140h Starv	1,38	0,63	1,05	5,87	9,780413985	0,108
14	140h Starv	0	6,18	15,46	3,81	9,529386578	1,622
14	140h Starv	2	8,88	44,42	6,80	34,02121105	1,306
14	140h Starv	0	5,29	10,58	16,53	33,0545166	0,320
14	140h Starv	0	0,13	0,22	13,26	22,10006674	0,010
14	24h Starv	0					
14	24h Starv	0,95					
14	24h Starv	0	21,42	107,12	10,66	53,29619889	2,010
14	24h Starv	0	18,47	30,78	8,76	14,60699083	2,107
14	24h Starv	0	82,00	117,15	26,16	37,37533971	3,134
14	24h Starv	0	0,18	0,20	6,38	7,086696807	0,028
14	48h Starv	0	0,57	1,15	15,64	31,28187691	0,037
14	48h Starv	0,95	4,48	6,39	1,69	2,408207985	2,655
14	48h Starv	0	0,03	0,03	0,42	0,521364615	0,066
14	48h Starv	0	1,16	1,93	3,28	5,47432846	0,353
14	48h Starv	0	0,99	0,90	25,69	23,35081519	0,039
14	48h Starv	0	4,04	4,04	17,60	17,60474517	0,229
14	48h Starv		4,12	5,15	2,66	3,323699422	1,550
14	48h Starv	1,38	0,22	0,56	19,48	48,70414447	0,011
14	48h Starv	0	45,28	45,28	17,71	17,70912017	2,557
14	48h Starv	0,95	10,87	108,68	5,79	57,85152122	1,879
14	72h Starv		20,03	100,16	12,13	60,66581943	1,651
14	72h Starv	0	69,74	116,23	18,67	31,11390103	3,736
14	72h Starv	1,38	77,74	194,36	22,97	57,43283709	3,384
14	72h Starv	0	11,59		9,47		1,223
14	72h Starv	2	14,29	35,73	9,14	22,86188031	1,563
14	72h Starv	3,2	9,29	92,85	2,40	23,98576487	3,871
14	72h Starv	3,2	20,51	25,64	14,07	17,58816395	1,458
14	72h Starv	2	18,64	46,61	9,37	23,4355347	1,989
14	72h Starv	2	0,00	0,00	0,00	0	
14	72h Starv	2	10,31		9,41		1,095
14	kontrola	0	20,03		10,53		1,903
14	kontrola	0,95	26,32	87,74	18,83	62,76012748	1,398
14	kontrola	5	7,85	78,53	5,50	54,99543402	1,428
14	kontrola	0	4,95	16,50	4,42	14,7430803	1,119
14	kontrola	3,2	18,41	46,03	12,91	32,28128988	1,426
14	kontrola	0	2,90	4,84	5,17	8,611396882	0,562
14	kontrola	0,38	3,96	13,20	5,01	16,68697628	0,791
14	kontrola	0	31,19	31,19	14,49	14,49380057	2,152

14	AD LIBITUM	0	2,44	1,74	6,52	4,657206279	0,374
14	AD LIBITUM	0,085	10,67	13,34	34,53	43,15892992	0,309
14	AD LIBITUM		1,14	5,72	3,50	17,4791762	0,327
14	AD LIBITUM	0,38	7,42	37,12	17,73	88,63379071	0,419
14	AD LIBITUM	0	2,75	3,44	53,86	67,32521342	0,051
14	AD LIBITUM	3,2	12,37	24,75	51,76	103,5147973	0,239
14	AD LIBITUM	0	21,49	53,73	20,25	50,62521163	1,061
14	AD LIBITUM	0	30,20	151,00	13,58	67,87865135	2,225
14	AD LIBITUM	1,38	102,88	102,88	36,72	36,72179938	2,880
14	AD LIBITUM	0,95	14,70	16,34	7,13	7,927502709	2,061

Priloga 3: Razpredelnica umeritve toka

kot	Sekunde= 5L	Sredni čas	Hitrost toka
1	10.40.52	659.49	0.0842
1	11.18.46		
2	2.33.20	145.553	0.38
2	2.18.36		
2	2.25.10		
3	1.00.15	58.57	0.948
3	0.59.60		
3	0.55.97		
4	0.40.44	40.183	1.38
4	0.39.93		
4	0.40.18		
5	0.27.95	27.43	2
5	.26.42		
5	.27.91		
6	.17.63	17.27	3.2
6	0.16.55		
6	0.17.64		
7	0.11.60	11.3	5
7	.11.04		
7	0.11.39		
8	0.9.28	9.1	6
8	.8.90		
8	.9.10		
9	.7.01	6.82	8
9	.6.52		
9	.6.94		

Priloga 4: Srednje vrednosti kritičnih hitrosti (cm/s) mladic, ločenih glede na prehranski režim in starost, pri čemer so skupno vzeta vsa tri legla. (n=700)

Režim	Dni starosti	Srednja vrednost	Standardna deviacija	razpon
Ad libitum	5	0.57	0.28	0.57
	6	0.61	0.35	1.00
	7	0.59	0.40	1.00
	8	1.27	1.26	4.92
	9	0.97	0.94	3.12
	10	0.84	0.81	3.12
	11	1.05	0.73	3.12
	12	1.44	1.00	3.12
	13	1.09	0.46	1.30
	14	0.95	0.00	0.00
24h (n=	6	0.61	0.35	1.00
	7	0.61	0.29	0.57
	8	0.46	0.42	1.30
	9	1.43	1.22	5.92
	10	0.93	0.46	1.92
	11	0.61	0.49	1.30
	12	2.44	1.42	4.05
	13	0.90	0.46	1.00
	14	1.17	0.30	0.43
48h	7	0.46	0.22	0.57
	8	0.52	0.26	0.57
	10	0.59	0.45	1.92
	11	1.28	1.37	4.92
	12	0.99	0.99	3.12
	13	1.84	1.19	2.25
	14	1.01	0.41	1.00
72h	8	0.57	0.42	1.30
	9	0.71	0.43	1.30
	11	1.22	0.47	1.62
	12	2.25	1.35	4.05
	13	1.17	1.00	3.12
	14	2.53	1.90	4.62
96h	12	1.58	0.47	1.05
120h	13	0.38	0.00	0.00
144h	14	1.38	0.	0.00

Priloga 5: meritve mladice drugega legla (n=300)

	DNI STAROST I	DOLŽINA (mm)	SUHA MASA (mg)	µg RNA/larva	µg RNA/mg DW	µg DNA/larva	µg DNA/mg DW	RNA/DNA
<i>Ad libitum</i>	8-14	5.18±0.13	0.59±0.05	15.54±2.83	36.30 ±6.08	12.58±1.47	27.69±3.23	1.32±0.14
Kratkotrajno stradanje	9-14	4.86±0.09	0.40±0.03	13.44±2.40	39.45±5.88	11.91±1.15	40.91±4.38	1.56±0.15
Dolgotrajno stradanje	11-14	4.89±0.10	0.47±0.05	12.43±3.51	39.25±10.54	12.43±0.80	42.53±6.70	0.91±0.19

Priloga 6: Razpredelnica, kjer je prikazan razpored mladice, glede na prehranske režime. Kjer so dopisane še kontrolne mladice, to število mladice, katere niso bile testirane v plavalni komori, a so vseeno bile kasneje vključene v analizo RNA/DNA.

			Prehranski pogoji						
Leglo	Datum	Dni starosti osebkov	ad libitum	24h stradanja	48h	72h	96h	120h	144h
1	13.5.2009	11	Ukrit. 12+3 kontrola						
1	13.5.2009	11			Ukrit. 8+ 3 kontrola				
3	13.5.2009	5	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	13.5.2009	8	Ukrit. 12+3 kontrola						
1	14.5.2009	12				Ukrit. 6 + 3 kontrola			

se nadaljuje...

1	14.5.2009	12	Ukrit. 12+3 kontrola						
1	14.5.2009	12		Ukrit. 8+ 3 kontrola					
2	14.5.2009	9	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	14.5.2009	9		Ukrit. 12+ 3 kontrola					
3	14.5.2009	6	Ukrit. 12+3 kontrola						
3	14.5.2009	6		Ukrit. 12+ 3 kontrola					
1	15.5.2009	13		Ukrit. 6+ 3 kontrola					

se nadaljuje...

1	15.5.2009	13			Ukrit. 8+ 3 kontrola				
2	15.5.2009	10		Ukrit. 12 + 3 kontrola					
2	15.5.2009	10			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
3	15.5.2009	7		Ukrit. 12+ 3 kontrola					
3	15.5.2009	7			Ukrit. 8+ 3 kontrola				
1	15.5.2009	13	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	15.5.2009	10	Ukrit. 12+3 kontrola						

se nadaljuje...

3	15.5.2009	7	Ukrit. 12+3 kontrola						
3	16.05.09	8		Ukrit. 12 + 3 kontrola					
3	16.05.09	8			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
1	16.05.09	14			Ukrit. 8+ 3 kontrola				
2	16.05.09	11		Ukrit. 8 + 3 kontrola					
2	16.05.09	11			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
3	16.05.09	8		Ukrit. 12 + 3 kontrola					

se nadaljuje...

2	16.05.09	11		Ukrit. 8 + 3 kontrola					
3	16.05.09	8	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	16.05.09	11	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	17.05.09	12	12			Ukrit. 6+ 3 kontrola			
3	17.05.09	9				Ukrit. 12 + 3 kontrola			
2	17.05.09	12			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
3	17.05.09	9		Ukrit. 12 + 3 kontrola					

Se nadaljuje...

2	17.05.09	12		Ukrit. 12 + 3 kontrola					
2	17.05.09	12					Ukrit. 8 + 3 kontrola		
3	17.05.09	9	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	17.05.09	12	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	18.05.09	13				Ukrit. 12 + 3 kontrola			
2	18.05.09	13			U crit 8 + 3 kontrola				
2	18.05.09	13						Ukrit. 4 + 3 kontrola	

Se nadaljuje...

2	18.05.09	13	Ukrit. 12+3 kontrola						
2	18.05.09	13		Ukrit. 8 + 3 kontrola					
3	18.05.09	10		Ukrit. 8 + 3 kontrola					
3	18.05.09	10	Ukrit. 12+3 kontrola						
3	18.05.09	10			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
2	19.05.09	14				Ukrit. 12 + 3 kontrola			
2	19.05.09	14		Ukrit. 8 + 3 kontrola					

Se nadaljuje...

2	19.05.09	14			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
2	19.05.09	14	Ukrit. 12+3 kontrola						
3	19.05.09	11	Ukrit. 8 + 3 kontrola						
3	19.05.09	11			Ukrit. 12+ 3 kontrola				
2	19.05.09	14							Ukrit. 6 + 3 kontrola
3	19.05.09	11		Ukrit. 8 + 3 kontrola					
3	20.5.2009	12			Ukrit. 12+ 3 kontrola				

Se nadaljuje...

3	20.5.2009	12				U crit 4+ 3 kontrola			
3	20.5.2009	12	Ukrit. 12+3 kontrola						