

09/2020
Metodika

METODIKA MĚŘENÍ CHARAKTERU HLENOVÉ VRSTVY U RYB

Ing. Karel Halačka, CSc.



Certifikovaná metodika 09/2020

METODIKA MĚŘENÍ CHARAKTERU HLENOVÉ VRSTVY U RYB

Ing. Karel Halačka, CSc.

Brno, 2020

Metodika vznikla za finanční podpory projektu TAČR TG03010048 Komerzializace výsledků zoologického výzkumu - aplikace využitelné v praktické ochraně přírody, dílčího projektu 100109 Metodika měření UV spektra in situ

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc. 100 %

Adresa autora:

Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.,
Květná 8, Brno 603 65

Oponenti:

Ing. Jan Grmela, Ph.D. (odborný oponent)
Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Ing. Lukáš Mareš (oponent za státní správu)
Ministerstvo zemědělství ČR, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uznání certifikované metodiky 25124/2020-MZE-16232:

Certifikovaná metodika ze dne 21. 5. 2020

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství,
Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Úvod	4
2.1. Struktura integumentu ryb	4
2.2. Tvorba hlenu	5
2.3. Důvody zjišťování vlastností hlenu a zastoupení melanoforů	6
3. Počet sekrečních buněk a absorpce záření	7
3.1. Metoda stanovení počtu pohárkových sekrečních buněk a melanoforů	7
3.2. Metoda stanovení absorpce UV záření	7
3.3. Způsoby měření	8
3.3.1. Kvantifikace sekrečních buněk a melanoforů	9
3.3.2. Měření absorpce UV záření	10
4. Interpretace výsledků a metodická doporučení	10
4.1. Kvantifikace povrchových sekrečních buněk a melanoforů	10
4.2. Schopnost absorpce UV záření	12
5. Novost postupů a ekonomické aspekty	13
6. Popis uplatnění certifikované metodiky	14
7. Poděkování	14
8. Literatura	15
8.1. Seznam použité související literatury	15
8.2. Seznam publikací předcházející metodice	15

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je umožnit snadnou kvantifikaci vybraných charakteristik rybího integumentu, konkrétně množství sekrečních buněk v povrchové vrstvě pokožky, množství epidermálních melanoforů a schopnost hlenové vrstvy absorbovat UV záření. Cílovou skupinou metodiky jsou zejména osoby z veterinární praxe a ichthyologové zabývající se problematikou integumentu ryb, a to ve vztahu k jejich zdravotnímu stavu nebo vývojově-morfologickým studiím. Uplatnění může dále nalézt i v rámci chovu či ochrany ryb. Při výběru druhů ryb k ověření byly preferovány zástupci různých taxonomických skupin.

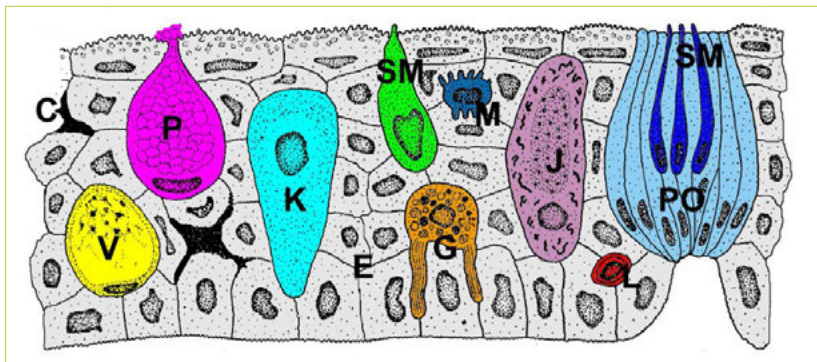
2. Úvod

2.1. Struktura integumentu ryb

Hlavní a původní funkcí kůže je izolace a ochrana organismu před vlivy vnějšího prostředí. Během evoluce však převzala mnoho dalších významných funkcí, což se projevilo i změnami v její morfologii. U ryb, jako vodních organismů, je stavba kůže a zejména pokožky složitější než u suchozemských obratlovců. Z mnoha jejích funkcí lze jmenovat od obecně se vyskytujících, jako je mechanická ochrana těla, také například výměnu plynů, vyrovnávání osmolarity, zbarvení (často s možností rychlých změn), sekreci poplachových a jinak „informujících“ látek, produkci hlenu, ochranu proti patogenům, umožnění orientace v prostředí pomocí v ní umístěných smyslových buněk, až po funkce poměrně raritní jako je bioluminiscence batypelagických druhů ryb či výživa potomstva kožním slizem.

Kůže ryb je tvořena na vnější straně těla pokožkou (epidermis), pod ní ležící škárou (dermis), v níž jsou uloženy šupiny a podkožím (subdermis). Na hranici mezi pokožkou a škárou, u některých druhů ryb i ve vlastní pokožce, jsou lokalizovány pigmentové buňky – melanofory.

Struktura pokožky, tj. jak tloušťka, tak i zastoupení jednotlivých typů buněk, případně kvantita či složení hlenu, je u různých skupin či druhů ryb rozdílná. Současně je však třeba konstatovat, že pokožka je morfologicky dynamická tkáň a na její aktuální strukturu se odráží fyziologický stav jedince. Ke změnám dochází jak v závislosti na dospívání, pohlaví, v průběhu třecího období tak i například při stresu způsobeného nemocí či znečištěním vodního prostředí. Z toho důvodu může struktura pokožky, resp. její změna přinášet užitečné informace o daném organismu. Typickým příkladem jsou výrazné změny v období tření u kaprovitých ryb označované jako třecí vyrážka. Vznik třecích pupenů je současně spojen s výrazným zesílením pokožky a zejména absencí sekrečních buněk, čímž je výrazně omezena tvorba ochranné vrstvy hlenu.



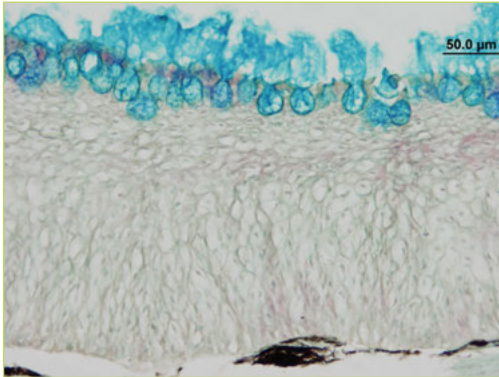
Obr. 1.: Schematické znázornění pokožky vodních obratlovců s hlavními typy buněk: E – obecné epidermální buňky; C – pigmentová buňka – melanoфор; P – pohárková sekreční buňka; V – váčkovitá sekreční buňka; K - kyjovitá sekreční buňka; SM – smyslové buňky; PO – podpůrné buňky; M – Merkelova buňka; G – granulární buňka; L – lymfocyt; J – jedová buňka.

2.2. Tvorba hlenu

Zdrojem hlenového pokryvu ryb jsou buňky pokožky. Pokožka je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, který ale na rozdíl od suchozemských obratlovců při povrchu nerohovatí. Jednotlivé buněčné elementy permanentně vznikají v dolní části tvořené pásem cylindrických zárodečných buněk. Během svého vývoje postupují směrem k povrchu, kde postupně nahrazují buňky odumírající.

Hlenová vrstva na povrchu rybí pokožky je produkována zejména tzv. pohárkovými buňkami (viz. Obr. 1 – P). Vyskytují obvykle v horní části pokožky, kde se svými apikálními konci otevírají na povrch pokožky a tímto otvorem uvolňují obsah centrální vakuoly. Pohárkové sekreční buňky jsou přítomny prakticky u všech druhů ryb. U skupiny ryb zahrnující například ryby lososovité (Salmoniformes), ostnoploutvé (Perciformes) či hrdloploutvé (Gadiformes) je dále v menším množství přítomen morfologicky (pravděpodobně ne však funkčně) podobný typ sekrečních buněk označovaný jako váčkovité (viz. Obr. 1 – V). Pro další skupinu ryb, zahrnující například maloostné (Cypriniformes) a holobřiché (Anguilliformes), je charakteristický výskyt speciálních sekrečních buněk, tzv. buňky kyjovité (viz. Obr. 1 – K). Ty jsou umístěny ve střední části pokožky a nekomunikují tak za normálních okolností s povrchem. Pokud však dojde,

například při útoku predátora, k poranění ryby, uvolňují do vodního prostředí svůj sekret obsahující „poplachové látky“, sloužící ostatním organismům v okolí jako informace o nebezpečí. Dále obsahují i látky napomáhající léčbě poranění. Kromě těchto speciálních sekrečních buněk se na tvorbě hlenu v menší míře podílí i nesespecializované epidermální buňky (viz. Obr. 1 – E) při svém rozpadu na povrchu pokožky.



Obr. 2.:
Pohárkové sekreční buňky (pstruh obecný, dorzální část hlavy) lokalizované při povrchu pokožky uvolňující svůj obsah, který tvoří dominantní část hlenové vrstvy, Alcian blue.

2.3. Důvody zjišťování vlastností hlenu a zastoupení melanoforů

Množství a chemické složení hlenu na povrchu těla ryby má nepochybně značný význam pro daný organismus. Produkce hlenu a jeho složení obecně odpovídá druhové příslušnosti, případně pohlaví či stavu (třecí období). Informace o hlenu daného jedince tak mohou poskytovat řadu informací jak například o taxonomických či etologických vztazích a či v neposlední řadě o fyziologickém stavu organismu.

Tato metodika se zaměřuje na dva samostatné okruhy: možnost jednoduchým způsobem kvantifikovat množství povrchových, tj. aktivních sekrečních pohárkových buněk jako hlavního zdroje hlenu a dále posouzení možnosti hlenové vrstvy chránit jedince před UV zářením.

UV záření, jakožto oblast elektromagnetického spektra, se dělí na blízké ultrafialové záření o vlnové délce 200–400 nm) a daleké ultrafialové záření (10–200 nm). Z hlediska biologických účinků UV záření se dělí na UVA, UVB a UVC. Asi 99 % UV záření, které dopadne na zemský povrch, je UVA (315–400 nm). Způsobuje úbytek kolagenu a elastinu v dermis, snižuje pružnost a pevnost kůže.

UVB (280–315 nm) je z převážné většiny absorbováno ozónem ve stratosféře, resp. ozónové vrstvě. UVB je zhoubné pro živé organismy, narušuje bílkoviny a může vést ke vzniku rakoviny. Proniká i vodou, ale jen do hloubky několika metrů.

UVC (200–280 nm) je zhoubné (karcinogenní) pro živé organismy, dokáže však proniknout jen několika vrstvami buněk. Vzhledem k současným klimatickým změnám, ovlivňujícím i řadu faktorů vodního prostředí, může být ochrana organismu vůči UV záření významným činitelem pro vodní organismy.

Jako bariéra vůči UV záření slouží i pigmentové buňky – melanofory. Kvantifikace jejich množství v integumentu byla proto logicky přičleněna ke sledovaným znakům.

3. Počet sekrečních buněk a absorpce záření

3.1. Metoda stanovení počtu pohárkových sekrečních buněk a melanoforů

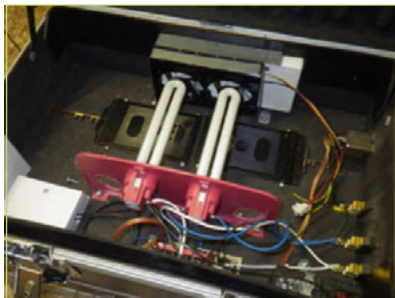
Ke kvantifikaci aktivních sekrečních buněk bylo využito jednak jejich lokalizace těsně při povrchu pokožky a dále obvykle dobré barvitelnosti jejich sekretu Alcianovou modří (AB), vážíci se na mukózní složky dominující v hleny ryb. Aplikace roztoku AB na vzorek pokožky způsobí selektivní obarvení pohárkových buněk lokalizovaných při povrchu pokožky, které je následně možné pomocí mikroskopu zachytit při odpovídajícím zvětšení digitálním fotoaparátem. U takto vzniklých snímků lze stanovit hustotu povrchových sekrečních buněk na jednotku plochy pokožky, případně i jejich velikost. Současně lze ze snímků obdobným způsobem vyhodnotit počet, resp. rozložení pigmentových buněk (melanoforů), nacházejících se na přechodu pokožky a škáry.

3.2 Metoda stanovení absorpce UV záření

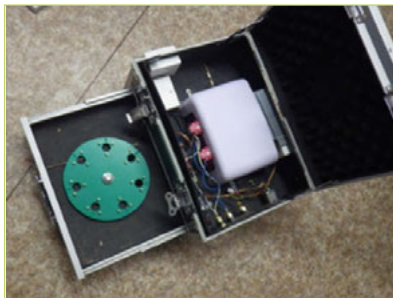
K měření schopnosti absorpce hlenu zachycovat UV záření bylo využito pro tyto účely zkonstruované zařízení sestávající ze zdroje UV záření a měřiče UV (Halačka a Mareš, 2019).

V daném případě bylo použito dvou různých zářivek (UV – maximální intenzita záření o vlnové délce 365 nm, 9W a UVC - 254 nm, 9W) jako zdroje UV záření a dvou měřících zařízení. V daném případě byl využit měřič UV-A/B záření typ YK-34UV Lutron (rozsah 290–390 nm; citlivost 0,001–19,99 mW/cm²), a měřič UV-C záření, typ UVC-254 Lutron (rozsah cca 254 nm; citlivost 0,001–19,99 mW/cm²). Mezi zdrojem a sondou měřícího přístroje je umístěn držák na posuzované vzorky.

Obr. 3.: Zařízení pro měření UV záření



zdroje UV světla



revolverový držák měřených vzorků

Měřený vzorek je umístěn do misky z křemičitého skla propouštějícího UV záření s okrají o předem definované výšce a překryt víčkem (Obr. 4), což umožňuje vymezení vrstvy měřeného materiálu. V daném případě bylo použito kulaté křemičité sklo o průměru 30 mm s prstencem o vnitřním průměru 26 mm a výšce 1,5 mm (tj. minimální potřebný objem měřené kapaliny cca 2,6 ml).



Obr. 4.:
Miska a víčko z křemičitého skla.

3.3. Způsoby měření

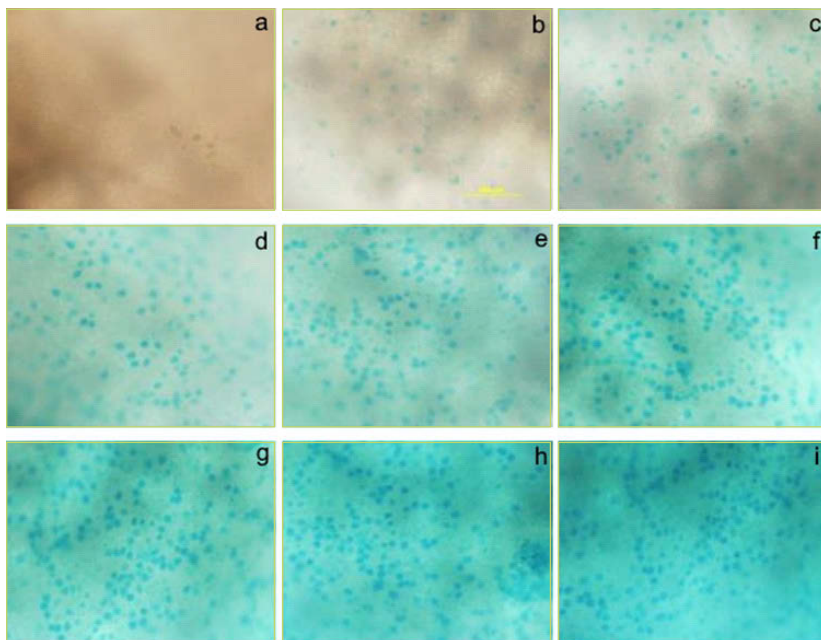
K testování jednotlivých okruhů byli použiti jedinci následujících druhů ryb: bolen dravý, hlaváč černoústý, hrouzek obecný, karas stříbřitý, jelec tloušť, mřenka mramorovaná, ouklejka, sekavec sp., plotice obecná a pstruh duhový.

3.3.1. Kvantifikace sekrečních buněk a melanoforů

U vzorku kůže sledovaného jedince o velikosti cca 5*5 mm byla pomocí skalpelu odstraněna co největší vrstva škáry. Poté byl vzorek ponořen do roztoku Alcianové modři. Složení roztoku odpovídalo standardu používaného v histochemických preparátech (0,1 g Alcianové modři, 3 ml kyseliny octové, 97 ml vody) pro selektivní barvení kyselých mukopolysacharidů – dominantní složky hlenu. Optimální čas barvení byl experimentálně ověřen ve variantách 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 a 80 minut (Obr. 5).

Na základě takto získaných výsledků lze doporučit barvení po dobu cca 40–50 minut, kdy jsou sekreční buňky, resp. jejich sekreční obsah dostatečně zřetelné ale nedochází k pronikání a usazování barviva v epidermální tkáni.

Obr. 5: Intenzita navázání Alcianové modři na obsah povrchových epidermálních buněk pstruha duhového v závislosti na době aplikace (a – kontrola, b – 5; c – 10; d – 20; e – 30; f – 40; g – 50; h – 60; i – 80 minut, pstruh duhový, 10×).



3.3.2. Měření absorpce UV záření

K odběru hlenu byla vzhledem k potřebě získat vzorek o určitém minimálním objemu zvoleno v daném případě smývání. Sledovaný jedinec byl na dobu 30 minut vložen do plastového sáčku s 5 ml vody, čímž došlo k vyluhování povrchové vrstvy hlenu (Obr. 6).



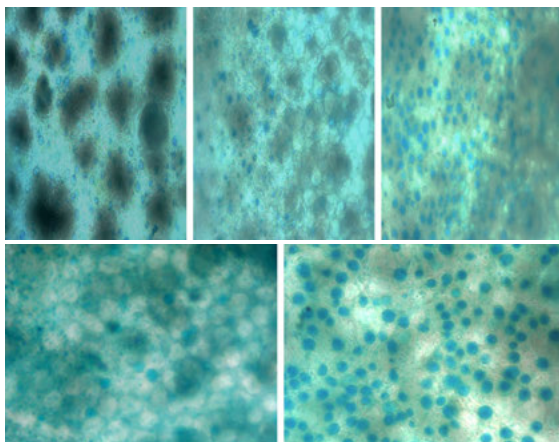
Obr. 6:
Odběr hlenu ryby
pomocí roztoku
v plastovém sáčku

Takto získaná suspenze byla nakápnuta do měřicí podložky a měřeno bylo snížení průniku UV záření (A-B a C) oproti kontrolnímu vzorku vody.

4. Interpretace výsledků a metodická doporučení

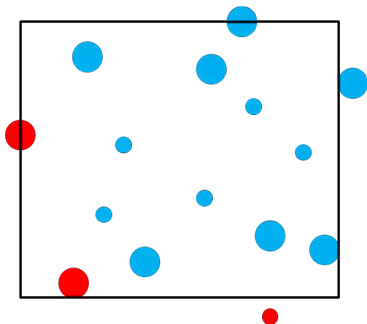
4.1. Kvantifikace povrchových sekrečních buněk a melanoforů

Použitá metoda barvení se ukázala jako vyhovující pro kvantifikaci povrchových sekrečních buněk s mukózním obsahem. Ke zhotovení snímků vhodných k dalšímu vyhodnocování se jako optimální jeví použití objektivu s 10-ti násobným zvětšením.



Obr. 7:
Pokožka
hrouzka obecného,
plotice obecné,
mřenky mramorované,
ouklejky pruhované
a jelce tlouště
s povrchovými
sekrečními buňkami
(resp. jejich mukózním
sekretem) obarvenými
Alciánovou modří (10×).

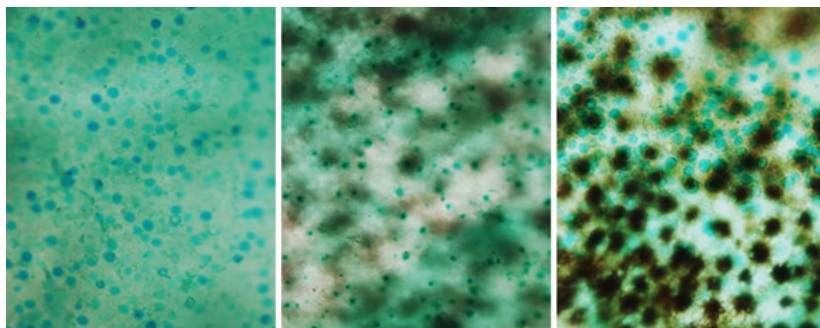
Počet pohárkových buněk na určité vymezené ploše lze nejobektivněji určit analogicky s například počítáním krevních elementů. Započítají se všechny obarvené buňky ve vymezeném poli a ty, které se dotýkají dvou sousedících linií vymežujících dané pole. Nezapočítávají se nejen buňky mimo pole ale i ty, které se dotýkají druhého páru vymežujících linií.



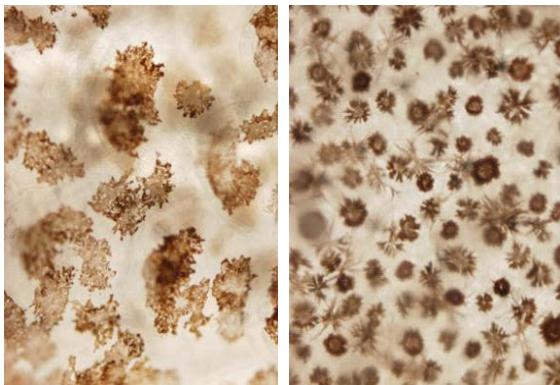
Obr. 8: Princip počítání elementů v pravoúhlém poli – započítají se všechny modré prvky, červené prvky dotýkající se dvou sousedících linií či mimo vymezené pole nikoliv.

Množství melanoforů lze sledovat obdobným způsobem jako sekreční buňky. Ne ve všech případech však lze získat snímek zachycující s dostatečnou ostroťtí jak povrch pokožky, tak i její bazální vrstvu (Obr. 9).

Obr. 9: Povrchové sekreční buňky obsahující mukózní, Alcianovou modří barvitelný sekret; pstruh potoční, bolen dravý, hlaváč černoústý (10×); v případě hlaváče s poměrně tenkou pokožkou a výskytem melanoforů nejen na rozhraní epidermis/dermis ale i ve vlastní pokožce jsou i současně poměrně zřetelné i melanofovy.



Vzhledem k tomu, že se melanofory nacházejí zejména na spodní části pokožky je proto vhodnější zhotovit k jejich kvantifikaci samostatný, na rovinu jejich výskytu zaostřený snímek, nejlépe ještě před barvením (Obr. 10).



Obr. 10:
*Melanofory v kůži
hlavy sekavce sp.
a bolena dravého (10×)
bez aplikace barvení
při zaostření na bázi
pokožky.*

4.2. Schopnost absorpce UV záření

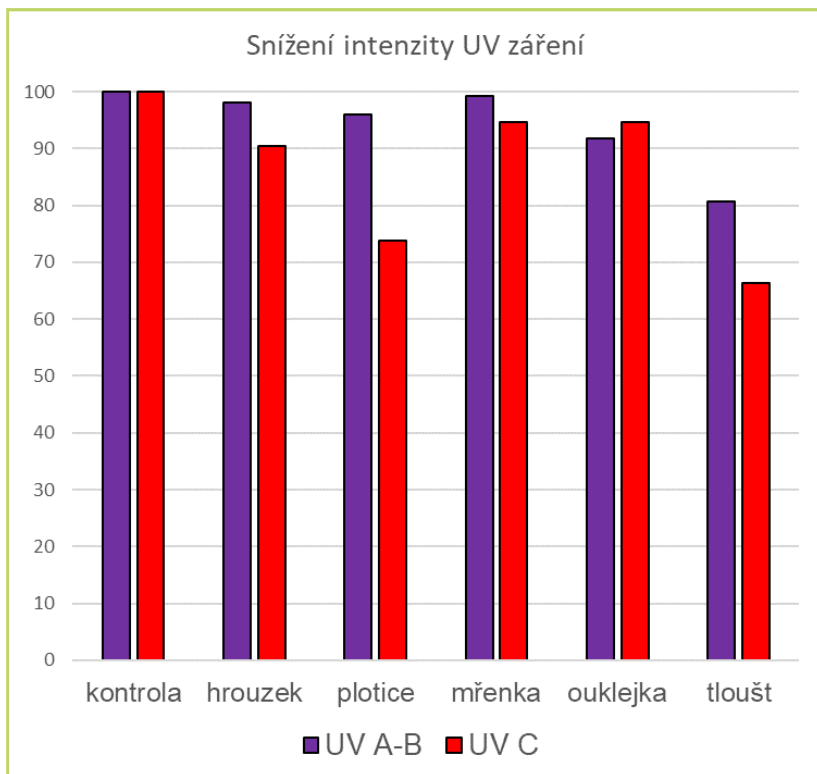
Odběr hleny „smýváním“ či „vyluhováním“ do vody se jeví jako vhodný způsob pro měření absorpce UV záření na přístroji zde použitého typu. Jednak lze získat vzorek o dostatečném objemu, se kterým lze poměrně dobře manipulovat (na rozdíl třeba od velice viskózního vzorku hleny získaného „setřením“). Současně nedochází k mechanickému poškození pokožky či vytlačení obsahu epidermálních buněk a není tak kontaminována hlenová vrstva na povrchu jedince.

Při měření je třeba zachovat stejnou dobu umístění ryby do vody a také upravit množství vody podle délky či hmotnosti jedince, aby byl výsledek co nejméně ovlivněn velikostí ryby. I tak budou výsledkem relativní hodnoty a je potřeba výsledky interpretovat nejen ke kontrole (voda) ale v rámci skupiny ryb sledovaných v rámci jednoho měření.

K proměnlivým faktorům bude patřit i typ (měřené spektrum záření) a citlivost použitého přístroje. Vzhledem k tomu, že existují přístroje měřící i jiná než zde testová spektra UV záření, lze tak charakteristiku adsorbčních vlastností hleny dále rozšířit.

V rámci daného testování bylo pozorováno snížení prostupu UV záření v řádech procent až desítek procent oproti kontrole (Obr. 11), což lze považovat za dostatečný rozdíl pro následné vyhodnocování. Pokud by byl rozdíl příliš malý, lze doporučit buď prodloužení doby „vyluhování“ nebo zvýšení sloupce měřené kapaliny.

Obr. 11: Absorpce dvou spekter UV záření hlenem sledovaných druhů ryb.



5. Novost postupů a ekonomické aspekty

Struktura pokožky včetně zastoupení sekrečních buněk se standardně určována pomocí histologických metod. Zhotovení histologických řezů však trvá minimálně několik dní a vyžaduje speciální vybavení (zejména mikrotom). Předložená metoda minimalizuje postup pro kvantifikaci epidermálních sekrečních buněk a melanoforů. Výsledky je možné získat v řádu několika hodin a jako vybavení postačí příslušné barvivo (Alciánová modř /cena za 1g je cca 200–300 Kč; toto množství vystačí na tisíce vzorků/) a běžné optické zařízení (binokulární lupa či standardní mikroskop).



Měření intenzity jednotlivých typů UV záření se provádí pomocí speciálních širokopásmových detektorů (radiometrů) či spektrometrů. Těmito přístroji se následně měří i schopnost jednotlivých látek snížit průnik UV záření, v případě tekutin pak spektrofotometry za použití příslušných kyvet. Jedná se o přístroje určené pro práci v interiéru/laboratoři, vzorek měřeného materiálu musí být dostatečně objemný (řádově ml). Navrhované měřicí zařízení je oproti laboratorním přístrojům finančně přístupné, nejvyšší položkou jsou běžné radiometry v ceně řádově tisíců korun. Měření může probíhat i v terénu za předpokladu zdroje elektrického napětí 220V – lze získat vhodným měničem například z 12V baterie osobního automobilu.

6. Popis uplatnění certifikované metodiky

Předložená metodika je určena pro praktické využití v rámci analýz či studia integumentu ryb, konkrétně hlenové ochranné vrstvy, a to jak z v rámci chovu ryb, tak i v rámci výzkumu a výuky. Metodika bude uplatněna „Smlouvou o uplatnění certifikované metodiky“ uzavřenou mezi Ústavem biologie obratlovců AV ČR, v. v. i. a Mendelovou univerzitou v Brně.

7. Poděkování

Metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky Programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací GAMA – Komerzializace výsledků zoologického výzkumu – aplikace využitelné v praktické ochraně přírody TG03010048.

8. Literatura

8.1. Seznam použité související literatury

Kiernan J.A., 1981: Histological and histochemical methods: theory and practice. Pergamon Press, Oxford

Pickering A.D., 1974: The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout (*Salmo trutta* L.) and the char (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Fish Biology*, 6: 111–118.

Pickering A.D., Macey D.J., 1977: Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the char *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.* 10: 505–512.

Whitear M., 1986: Epidermis. Dermis. In: Bereiter-Hahn J., Matoltsy A.G. & Richards K.S. (eds.), *Biology of the integument*, vol. 2, Vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 8–64.

8.2. Seznam publikací předcházející metodice

Halačka K., 1995: Structure and histochemistry of the epidermis of nase (*Chondrostoma nasus*). *Folia Zool.* 44: 99–104.

Halačka K., Brabec H., Vyhnaříková D., 1991: Morphometry of the epidermis of the grayling (*Thymallus thymallus*) in the spawning season. *Folia Zool.* 40: 187–192.

Halačka K., Kopp R., Klíma O., Mareš J., 2015: Epidermis structure in the Brook char (*Salvelinus fontinalis*) and its Arctic char (*Salvelinus alpinus*) hybrid *Acta Veterinaria Brno*, 84: 159–166.

Halačka K., Mareš J., 2018: Odběr hlenu u ryb. *Metodika*. Brno: 16 pp.

Halačka K., Mareš J., 2019: Měřič absorpce UV záření. Užité vzor: CZ 33009 U1: 6 pp.

Halačka K., Papoušek I., Mendel J., Vetešník L., 2007: Structure of the epidermis of salmonids. In: *Book of Abstract XII European Congress of Ichthyology*, Zagreb, 76 p.

Halačka K., Vetešník L., Papoušek I., Mendel J., Šimková A., 2010: The epidermal structure of *Carassius gibelio*: a link with ploidy status in spawning and postspawning periods. *J Fish Biol* 77: 2171–2179.



Halačka K., Vítek T., Vetešník L., Spurný P., 2012: Epidermis structure and blood parameter differences between sculpin *Cottus gobio* and Siberian sculpin *Cottus poecilopus* from the Morava watershed. *Folia Zool* 61: 9–16.

Knoz J., Halačka K., Brabec H., 1990: Morphometry of the epidermis of brown trout (*Salmo trutta* m. *fario*). *Folia Zool* 39: 269–278.

Knoz J., Halačka K., 1991: Structure and histochemistry of the epidermis of some freshwater fishes. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno*, 25(8): 1–42.

Sivka U., Halačka K., Sušník B. S., 2012: Morphological differences in the skin of marble trout *Salmo marmoratus* and of brown trout *Salmo trutta*. *Folia Histochem Cytobiol* 50: 255–262.

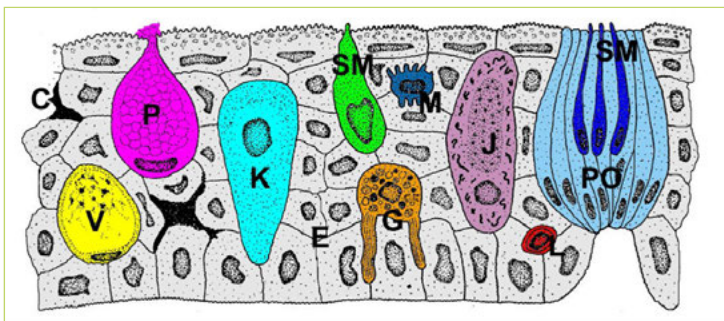
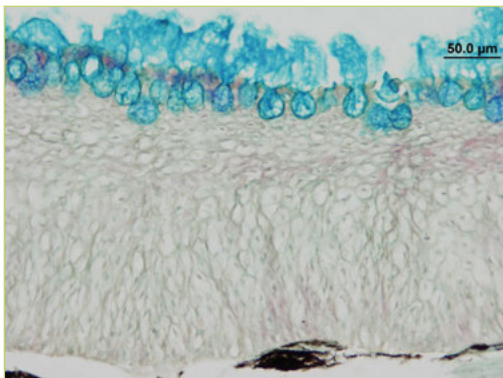
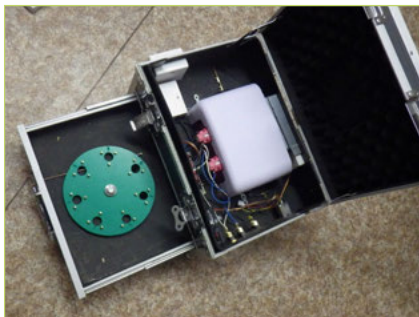
Šimková A., Hyršl P., Halačka K., Vetešník L., 2015: Physiological and condition-related traits in the gynogenetic-sexual *Carassius auratus* complex: different investments promoting the coexistence of two reproductive forms? *BMC Evolutionary Biology* 15: 154.

Šimková A., Vojtek L., Halačka K., Hyršl P., Vetešník L., 2015: The effect of hybridization on fish physiology, immunity and blood biochemistry: A case study in hybridizing *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio* (Cyprinidae) *Aquaculture* 435: 381–389.

Metodika měření charakteru hlenové vrstvy u ryb
Certifikovaná metodika 09/2020

Ing. Karel Halačka, CSc.

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 65 Brno
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.
Vydání: první, 2020
Počet stran: 18
ISBN 978-80-87189-30-6



Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.
Květná 8, Brno 603 65
Tel.: +420 543 422 540
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz