Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta Rybářství a ochrany vod
Ústav akvakultury a ochrany vod

Diplomová práce

Vliv personality proaktivní vs. reaktivní u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) na náchylnost k infekci *Aeromonas* sp.

Autor: Bc. Jan Černý
Vedoucí diplomové práce: MsC. Tatyana Gebauer, PhD.
Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Vlastimil Stejskal, PhD.
Studijní program a obor: Zemědělská specializace, Rybářství a Ochrana vod
Forma studia: Prezenční
Ročník: 2.

České Budějovice, 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Bc. Jan Černý

Datum: 2.5. 2023

Podpis:

Poděkování:

V první řadě bych rád vyjádřil poděkování své vedoucí diplomové práce MSc. Tatyaně Gebauer, PhD. za cílevědomé a odborné vedení během projektu společně se seznámení s probíranou problematikou. Dále bych jí chtěl poděkovat za všechen čas a rady, které mi během projektu poskytla, za její impuls nikdy nepřestat čelit překážkám a výzvám a také za její nesmírnou trpělivost. Také bych rád poděkoval panu Ing. Petru Císařovi, PhD. za jeho pomoc s analýzou dat a navržení programů pro práci. Dále mé díky patří panu doc. Ing. Vlastimilu Stejskalovi, PhD. za odborné konzultování problematiky spolu s korekcemi textu a přidání zajímavých nápadů a poznatků. Tímto děkuji i pánům Ing. Pavlovi Šablaturovi a Ing. Janu Matouškovi za technickou pomoc a podporu při provádění experimentu a praktické zkušenosti, které jsem díky nim získal. Mé díky patří i panu Dr. rer. nat. Alexandrovi Reblovi za pomoc při molekulárních analýzách během experimentu a na závěr bych chtěl velmi rád poděkovat mé rodině, která mě po celou dobu studia podporuje a především děkuji své přítelkyni Terezce za její nehynoucí pochopení, podporu a trpělivost během náročných chvil při realizaci projektu a psaní této práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Jan ČERNÝ**
Osobní číslo:	**V21N005P**
Studijní program:	**N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor:	**Rybářství a ochrana vod**
Téma práce:	**Vliv personality proaktivní vs. reaktivní u okouna říčního na náchylnost k infekci *Aeromonas* sp.**
Zadávající katedra:	**Ústav akvakultury a ochrany vod**

Zásady pro vypracování

Okoun říční , *Perca fluviatilis*, je považován za jednoho z nejvhodnějších kandidátů pro diverzifikaci sladkovodní akvakultury v Evropě. Chuťově i nutričně splňuje svalovina okouna náročné požadavky konzumentů na evropském trhu. Současná produkce okounovitých ryb v akvakultuře se zaměřuje především na potřeby domácích trhů, zatímco rozšiřování produkce je omezené. Jedním z významných omezení expanze akvakultury je výskyt chorob v intenzivních chovech. Hlavními patogeny, které ovlivňují evropskou akvakulturu okounovitých, jsou bakterie, z nichž nejproblematičtější je *Aeromonas* spp., která způsobuje vysoké mortality v chovech. Pro zlepšení efektivity produkce včetně zvýšené odolnosti vůči chorobám a robustnosti intenzivně chovaných druhů byly u několika druhů úspěšně aplikovány selektivní šlechtitelské programy (např. pstruh duhový, kapr obecný). Šlechtění je však dlouhodobý proces a v současnosti je méně než 10 % produkce akvakultury založeno na geneticky vylepšených druzích ryb. Před zahájením komplexního selektivního šlechtitelského programu jsou totiž požadovány podrobné informace o vnitrodruhových individuálních rozdílech imunitního systému u okouna říčního.

Několik publikovaných studií prokázalo, že existují významné vnitrodruhové rozdíly ve funkci imunitního systémů u zvířat, což úzce souvisí s jejich životními strategiemi. K popisu těchto strategií se často používají behaviorální a fyzické charakteristiky. Nejběžnější charakteristikou je tzv. kontinuum „plachý-odvážný", kde odvážnější jedinci vykazují vyšší produktivitu (např. rychlejší růst, lepší příjem potravy, lepší plavání, nízká úmrtnost) ve srovnání s plachými jedinci. Ačkoliv stále více studií uvádí rozdíl mezi plachými a odvážnými jedinci i v akvakultuře, v současnosti neexistují žádné relevantní zprávy o rozdílech v imunitních odpovědích proti *Aeromonas* spp. Cílem práce je charakterizovat imunnitní odpověď u okouna říčního v závislosti na individualitě (kontinuum plachý-odvážný).

Ryby pro experment budou zakoupeny z komerční farmy. Po aklimatizaci budou ryby rozděleny do dvou skupin: „odvážní" a „plaší" pomocí standardizovaného testu. Po rozdělení budou izolovány leukocyty z hlavové tkáně ledvin u obou skupin a stimulovány in vitro pomocí Aeromonas spp. Stimulované buňky budou následně podrobeny analýzám genové exprese. Práce by měla přinést nové relevantní údaje s dopadem pro akvakulturu okouna říčního.

Rozsah pracovní zprávy:	**40-50 stran**
Rozsah grafických prací:	**dle potřeby (do 20 stran)**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Seznam odborné literatury: Adriaenssens, B., Johnsson, J.I., 2013. Natural selection, plasticity and the emergence of a behavioural syndrome in the wild. Ecol Lett. 16, 47-55. https://doi.org/10.1111/ele.12011.
Armstrong, J.D., Braithwaite, V.A., Huntingford, F.A., 1997. Spatial strategies of wild Atlantic salmon parr: exploration and settlement in unfamiliar areas. J Anim Ecol. 66:203-211. https://doi.org/10.2307/6022.

Castanheira, M.F., Conceiçao, L.E., Millot, S., Rey, S., Bégout, M.L., Damsgard, B., Kristiansen, T., Höglund, E., Overli, O., Martins, C.I., 2017. Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. Rev Aquac. 9, 23-41. https://doi.org/10.1111/raq.12100.
Fontaine, P., Teletchea, F., 2019. Domestication of the Eurasian Perch (Perca fluviatilis), Animal Domestication. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.85132.
Gjedrem, T., 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: a personal opinion review. Aquaculture. 344, 12-22. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.003.
Jones, K.A., Godin, J.-G.J., 2010. Are fast explorers slow reactors? Linking personality type and anti-predator behaviour. Proc Royal Soc. B. 277, 625-632. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1607.
Koolhaas, J., Korte, S., De Boer, S., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., De Jong, I., Ruis, M., Blokhuis, H., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. Neurosci Biobehav Rev. 23, 925-935. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3.
Mandiki, S., Blanchard, G., Mélard, C., Koskela, J., Kucharczyk, D., Fontaine, P., Kestemont, P., 2004. Effects of geographic origin on growth and food intake in Eurasian perch (Perca fluviatilis L.) juveniles under intensive culture conditions. Aquaculture. 229, 117-128. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00359-4.
Policar, T., Samarin, A.M., Mélard, C., 2015. Culture methods of Eurasian perch during ongrowing. In: P. Kestemont, Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds.), Biology and Culture of Percid Fishes. Springer, Netherlands, pp. 417-435.
Pottinger, T., Carrick, T., 2001. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. Horm Behav. 40, 419-427. https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1707.
Sneddon, L., 2003. The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. J Fish Biol. 62, 971-975. https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00084.x
Sundström, L.F., Petersson, E., Höjesjö, J., Johnsson, J.I., Järvi, T., 2004. Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (Salmo trutta): implications for dominance. Behav Ecol. 15, 192-198. https://doi.org/10.1093/beheco/arg089.
Thomson, J.S., Watts, P.C., Pottinger, T.G., Sneddon, L.U., 2011. Physiological and genetic correlates of boldness: characterising the mechanisms of behavioural variation in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Horm Behav. 59, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.010.
Wilson, D.S., Coleman, K., Clark, A.B., Biederman, L., 1993. The shy-bold continuum in pumpkinseed sunfish (Lepomis gibbosus): An ecological study of a psychological trait. J Comp Psychol. 107, 250-260. https://psycnet.apa.org/doi/10.1037/0735-7036.107.3.250.
Závorka, L., Koeck, B., Cucherousset, J., Brijs, J., Näslund, J., Aldvén, D., Höjesjö, J., Fleming, I.A., Johnsson, J.I., 2017. Co-existence with non-native brook trout breaks down the integration of phenotypic traits in brown trout parr. Funct Ecol. 31, 1582-1591. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12862.

Vedoucí diplomové práce:	**MSc. Tatyana Gebauer, Ph.D.** Ústav akvakultury a ochrany vod
Konzultant diplomové práce:	**Ing. Vlastimil Stejskal, Ph.D.** Ústav akvakultury a ochrany vod
Datum zadání diplomové práce:	**21. ledna 2022**
Termín odevzdání diplomové práce:	**2. května 2023**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
Vodňany

L.S.

Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

Ing. Jan Kašpar
ředitel

V Českých Budějovicích dne 25. února 2022

OBSAH

1. ÚVOD 4

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE 5

2.1. Okoun říční 5

2.1.1. Taxonomické zařazení 5

2.1.2 Popis druhu 6

2.1.3. Areál rozšíření 7

2.1.7. Produkce a hospodářský význam 7

2.1.4. Metody chovu 10

2.1.4.1 Extenzivní chov 10

2.1.4.2 Polo-intenzivní chov 11

2.1.4.3 Intenzivní chov v RAS 11

2.2. Faktory limitující chov okouna říčního v RAS 12

2.2.1. Bakterie *Aeromonas* sp. 12

2.2.1.1. Ekologie a rozdělení 12

2.2.1.2. Patogenita 13

2.2.1.3. Vliv na chov okouna říčního 14

2.2.1.4. Identifikace, prevence, léčba 14

2.2.2 Stres 15

2.2.2.1. Definice a rozdělení stresu 15

2.2.2.2 Stresory ryb 16

2.2.2.3. Stresové reakce ryb 17

2.2.4. Syndrom nenaplňování plynového měchýře a kanibalismus 18

2.3. Možná efektivní dlouhodobá řešení 19

2.3.1. Šlechtitelský program 19
2.3.1.1. Domestikace 19
2.3.1.2. Umělá selekce 20
2.3.1.3. Teoretický výběr kandidátů okouna říčního 22
2.3.2. Personalita u ryb a kontinuum plachý – odvážný 23
2.3.2.1. Aktivita 24
2.3.2.2. Průzkumnické a potravní chování 24
2.3.2.3. Zkoumání nových objektů 25
2.3.2.4. Ostatní typy testů 26
2.3.2.5. Význam personality u ryb 27
3. MATERIÁL A METODIKA 29
3.1. Cíl experimentu 29
3.2. Design experimentu 29
3.2.1. Ryby a RAS systém 29
3.2.2. Vybavení experimentální místnosti 32
3.2.3. Behaviorální testy 35
3.2.4. Obsluha experimentální místnosti 37
3.3. Vyhodnocení behaviorálních testů 40
3.3.1. Diferenciace a kódování videa 41
3.3.2. Střihání videa 43
3.3.3. Analýza testů 44
3.3.3.1. Definování arén 44
3.3.3.2. Zpracování dat 46
3.4. Testování stresové tolerance 48
3.5. Testování imunologické rezistence 49

4. VÝSLEDKY 57
4.1. Behaviorální testování 57
4.2. Stresové ukazatele 58
4.3. Imunologická rezistence 59
4.3.1. Přirozená imunita 59
4.3.2. Adaptivní imunita 60
4.4. Somatické indexy 64
4.5. Statistická analýza 64
5. Diskuse 65
5.1 Behaviorální testování 65
5.2. Stresové ukazatele 68
5.3. Imunologická rezistence 69
6. Závěr 71
7. Seznam použité literatury 73
8. Abstrakt 90
9. Abstract 92

1. ÚVOD

Mnoho studií poukazuje na okouna říčního (*Perca fluviatilis*) jako na slibného kandidáta pro diverzifikace sladkovodní akvakultury v EU. Tento druh disponuje nadějným kulinářským potenciálem vůči evropskému potravinářskému trhu, jehož požadavky jsou na kvalitní senzorické vlastnosti a vysoké nutriční hodnoty (Fontaine a Teletchea, 2019). Současná produkce okouna převážně pokrývá potřeby domácích trhů ve většině Evropských zemích s výjimkou Švýcarska a části Francie, zatímco možnosti rozšiřování chovů jsou limitovány. Významným faktorem limitujícím další rozvoj intenzivního chovu okouna je negativní působení patogenů. Mezi nejzávažnější nákazy v chovech okouna říčního patří onemocnění způsobená bakterií *Aeromonas* sp. zapříčiňující vysokou mortalitu v různých částech produkčního cyklu (Rupp a kol., 2019). V intenzivních chovech ryb patří rezistence vůči patogenům spolu s celkovým fitness mezi požadované užitkové vlastnosti, které lze vylepšit umělou selekcí. Selekční programy byly v našich podmínkách úspěšně aplikovány u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (Teletchea, 2021; Prchal a kol., 2022) nebo v zahraničí u pstruha duhového (*Onchhorhyncus mykkis*) (Pulcini a kol., 2013), lososa atlantského (*Salmo salar*) (Thodesen a Gjedrem, 2006) nebo tilapie nilské (*Oreochormis niloticus*) (Teletchea, 2019). Nicméně umělá selekce je dlouhodobý proces, přičemž méně než 10 % produktů akvakultury pochází z geneticky vylepšených chovů. Před zahájením obsáhlého šlechtitelského programu u okounovitých ryb je nutné zjistit detailní informace o intra-specifických individuálních rozdílech ve zdraví a imunitním systému.

Mnohé studie naznačují souvislost mezi vnitrodruhovou rozdílností individuálních jedinců zvířat a jejich instinktivními strategiemi přežití. Pro porozumění těmto strategiím je často užíváno behaviorálních a fyziologických charakteristik. Jedna z nejuniverzálnějších charakteristik je tzv. kontinuum „plachý-odvážný“ (Wilson a kol., 1993; Sneddon, 2003), které reflektuje proaktivní (odvážný/bold individual/BI) a reaktivní (plachý/shy individual/SI) styl chování, podle kterého jsou BI jedinci reprezentováni vyšší produktivitou (vyšší aktivitou, rychlejším růstem, lepším příjmem potravy, lepšími pohybovými schopnostmi a nižší mortalitou) oproti SI jedincům. Ačkoliv se již podařilo popsat vyšší hmotnostní přírůstek u BI jedinců koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) oproti SI jedincům (Ward a kol., 2004), tak průkazné informace o vlivu na rezistenci vůči aeromonádám prozatím chybí. Z toho důvodu bylo získáno 1000 jedinců okouna říčního ze

švýcarského chovu, kteří byli podrobeni behaviorálním testům personality a dle výsledků rozděleni na BI a SI jedince a jejich leukocyty izolované z hlavové části ledvin byly *in vivo* stimulovány nákazou *Aeromonnas* sp. Stimulované buňky byly následně podrobeny analýze na genovou expresi. Práce přináší nové relevantní údaje s dopadem pro intenzivní akvakulturu okouna říčního.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1. Okoun říční

2.1.1. Taxonomické zařazení

Superříše: Ophistokonta
Říše: Animalia (Živočichové)
Podříše: Bilateria (Dvoustraně souměrní)
Infraříše: Deuterostomia (Druhoústí)
Kmen: Chordata (Strunatci)
Podkmen: Vertebrata (Obratlovci)
Infrakmen: Gnathostomata (Čelistnatci)
Nadtřída: Actinopterygii (Paprskoploutví)
Třída: Teleostei (Kostnatí)
Nadřád: Acanthopterygii
Řád: Perciformes (Ostnoploutví)
Podřád: Percoidei
Čeleď: Percidae (Okounovití)
Rod: *Perca* (Okoun)
Druh: *Perca fluviatilis* (Okoun říční)

Počátek zájmu o nomenklaturu okouna říčního lze datovat do roku 1730, kdy se především tématikou morfologie tohoto druhu zabýval průkopník ichtyologie Peter Artedi v oblasti švédských jezer. Na jeho práci navázal zakladatel systematické kategorizace

živočichů a rostlin Carl Linné, který následně v roce 1758 pojmenoval tento druh tak jak jej známe dnes. Do konce 20.stol bylo mylně popsáno několik jiných druhů jako *Perca italis* nebo *Perca vulgaris*, načež bylo posléze zjištěno, že se jedná pouze o rozdílné formy jednoho druhu *Perca fluviatilis*, které vznikly díky rozsáhlé distribuci druhu a obývání rozmanitého spektra habitatů. (Pimahkin a kol., 2015). V nejmodernějším kladistickém pojetí obsahuje rod *Perca* 3 druhy, a to krom již zmíněného *P. fluviatilis* ještě *P. flavescens* (Mitchill, 1814) a *P. schrenkii* (Kessler, 1874) (Stepien a kol., 2015).

2.1.2 Popis druhu

Tvar těla u juvenilních jedinců lze popsat jako válcovitý, přičemž u odrostlejších exemplářů dochází k výraznému zploštění těla v laterální rovině, doprovázené vzrůstem výšky těla a celkové mohutnosti, načež nabývá dospělý okoun finálního kuželovitého tvaru s nápadným hrbem mezi hlavou a anteriorní (první) dorzální ploutví (Frič, 1859; Dubský a kol., 2003; Dvořák a kol., 2014). Variance zbarvení boků nabízí tmavě i světle zelenou v možné kombinaci s méně výraznou žlutou s nápaditým tmavými pruhy v transverzální rovině, jejichž počet se běžně pohybuje mezi 5 a 9. Zabarvení hřbetu je tmavé a břišní partie světlejší. Intenzita a jasnost barev v kůži okouna může souviset s preferovaným typem prostředí. Oranžový až červený pigment lze pozorovat u ploutví análních, pektorálních a ventrálních. Kůži pokrývají drobné šupiny ktenoidního typu, které působí na dotyk ostře. Těmito šupinami je pokryto i celé operkulum, které je opatřeno trnem. (Dyk, 1956; Švátora, 1986; Baruš a Oliva, 1995; Dvořák a kol., 2014; Craig, 2008; Rouegot a kol., 2008; Pimakhin, 2012).

Dubský (2003) i Hanel (1992) ve svých publikacích uvádějí, že typickým znakem pro okouna je tmavá skvrna, která se nachází v kaudální části anteriorní dorzální ploutve (mezi posledními 2-3 ostny). Podle Dubského (2003) tato ploutev obsahuje 12-16 tvrdých paprsků. Poněkud rozdílně je vystavena dorzální ploutev posteriorní (druhá), která se skládá z 1-3 tvrdých a 12-16 měkkých paprsků. Anální ploutev obsahuje 2 tvrdé a 8-9 měkkých paprsků, ploutev pektorální sestává z 14 měkkých paprsků a v ploutvi ventrální lze pozorovat jeden tvrdý a 15 měkkých paprsků. V ploutvi kaudální se nachází 17 měkkých paprsků. (Baruš a Oliva,1995) popisují 54-77 šupin v postranní čáře, přičemž jiné zdroje jako (Dubský a kol., 2003) publikují jiný počet a to 46-79. Horní i spodní čelist disponují drobným ozubením a

celkový tvar úst definujeme jako terminální (koncový), který je pro dravce typický. (Švátora, 1986; Dvořák a kol., 2014).

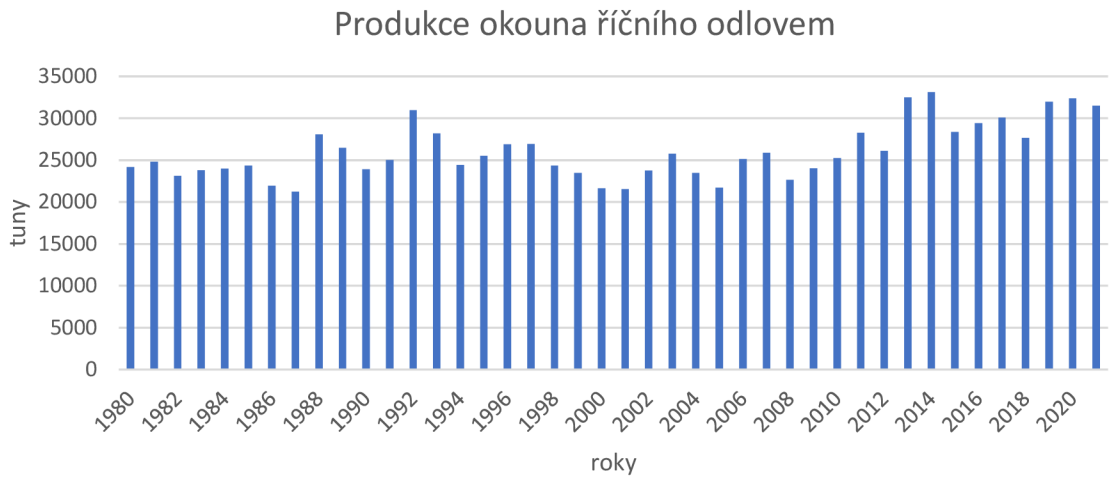
2.1.3. Areál rozšíření

Z geologického hlediska stáří naší planety se posledních několik tisíc let nacházíme v období klimatického klidu, zvané holocén, v němž panují velmi stabilní globální teplotní podmínky (Attenborough, 2020). Dnešní distribuce populací živočichů na planetě Zemi je silně determinována předcházejícím obdobím, tedy střídáním dob glaciálů a interglaciálů. Na konci poslední velké doby ledové došlo k masovým migracím živočichů za účelem nalézt nová útočiště (Hewitt, 1996; Gugger a Sugita, 2010). Okoun říční patří mezi autochtonní euroasijské druhy, jehož výskyt lze zaznamenat téměř na celém evropském kontinentu a také v severní Asii (Craig, 2000). Odborné poznatky naznačují, že ke kolonizaci severní poloviny evropského území, došlo přibližně před 10-15 000 lety v rámci postglaciální migrací ze třech hlavních refugií v severovýchodní, jihovýchodní a západní Evropě. Tento proces umožnil vznik několika hlavních skupin, jenž se skládají z jednotlivých populací jako je sibiřská, norská nebo populace Baltského moře, u které byla prokázána migrace ze všech tří hlavních refugií. V jižní části Evropy se nynější populace vyvinuly z předků, jenž pravděpodobně migrovali z povodí Dunaje a Rýna. (Nesbø a kol., 1999; Behrmann-Godel, 2004; Vanina a kol., 2019). Na území Evropy se s okounem nesetkáme na Pyrenejském a Apeninském poloostrově spolu se severní Anglií a několika lokalitami v Norsku. Jeho artificiální introdukce proběhla i na jiných kontinentech jako je Afrika, Austrálie nebo země jako např. Nový Zéland (Thorpe, 1977).

2.1.7. Produkce a hospodářský význam

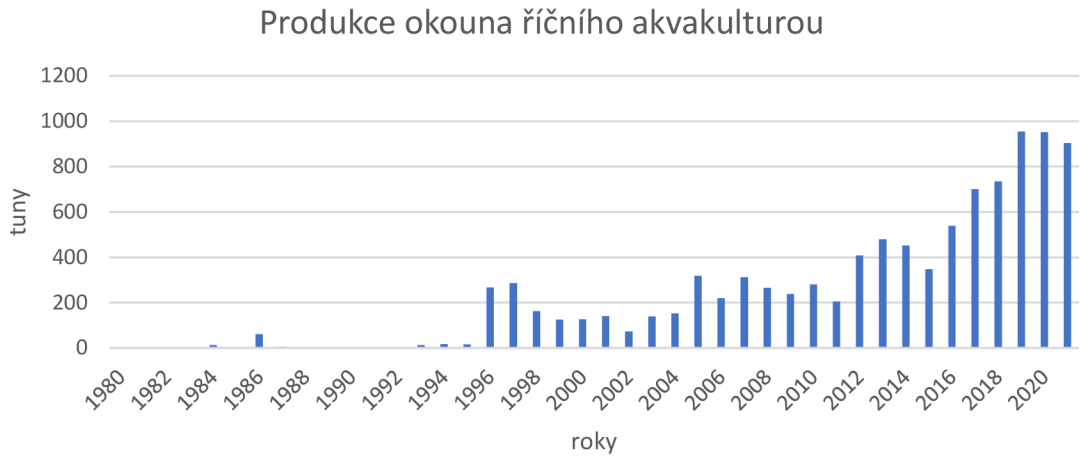
Podle Policara a kol. (2009) dosahovala globální produkce okouna říčního odlovem z volných vod na konci první dekády 21. stol. hodnot 25 600 $t.rok^{-1}$, přičemž data z FAO poukazují na navýšení produkce až na 33 000 $t.rok^{-1}$ v roce 2014 s následnou stabilizací produkce, kdy v roce 2020 bylo celosvětově z volných vod odloveno 32 393 t okouna říčního (FAO, 2023). Nejvýznamnějšími globálními producenty k roku 2016 jsou Rusko (13 196 t), Finsko (9 382 t), Švédsko (3 318 t), Estonsko (2 407 t) a Polsko (1 114 t). V případě Finska

dosahovala produkce v roce 2005 hodnot 13 000 t.rok^{-1} a lze tedy pozorovat trend snižování produkce odlovem z volných vod v některých zemích (Tribiloustova, 2005; Öberg, 2008; Watson, 2008; Toner, 2015; FAO, 2016).



Obr. 1 Celosvětová produkce okouna říčního odlovem z volných vod, FAO 2023

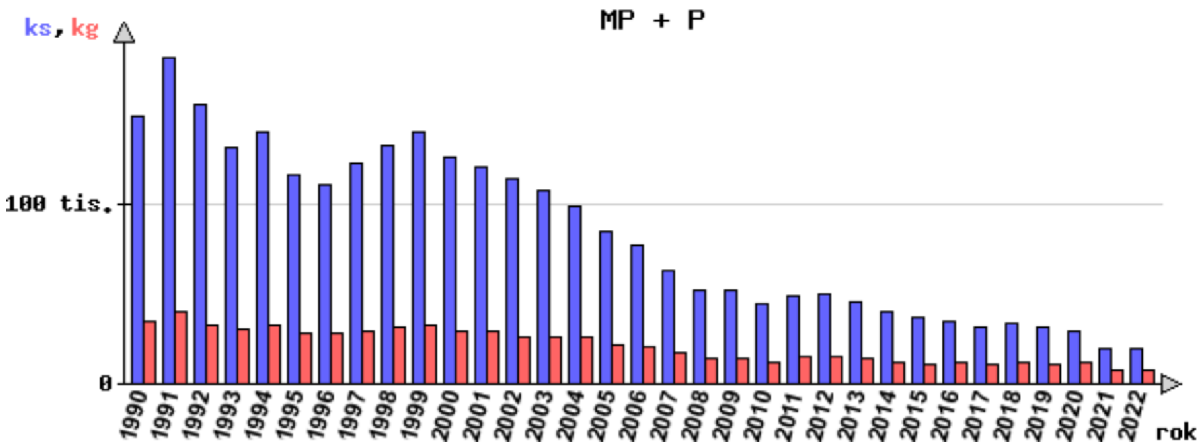
Na druhou stranu produkce intenzivní akvakulturou v Evropě vykazuje stoupající tendenci v posledních třech dekádách (Fontaine a kol., 1993; Watson, 2008; Stejskal a kol., 2010; Policar a kol., 2009, 2011,2014; Křišťan, 2013). Zatímco v roce 2016 se celosvětově vyprodukovalo 537 t akvakulturou tak k roku 2020 dosahovala globální produkce okouna již hodnoty 952 t (FAO, 2023). Chov okouna pomocí intenzivní akvakultury na speciálních chovných farmách se velmi rozšířil např. ve Švýcarsku (Percitech S.A., FTN Aquaart AG, Valperca AG), Irsku (Clune Fisheries Ltd.) nebo Francii (Lucas Perches SARL (Toner a Rouegot, 2008; Policar a kol., 2009; Toner, 2015). Přibližná rybniční produkce okouna říčního v České republice je 15-20 t.rok^{-1} (Stejskal a kol.,2010).



Obr. 2 Celosvětová produkce akvakulturou, FAO 2023

Hospodářský význam okouna říčního spočívá především v jeho zpracování a následné distribuci spotřebitelům, kteří preferují jeho chutné a křehké maso, které oproti kaprovitým rybám neobsahuje tzv. ypsilonové kůstky, stejně jak je tomu např. u candáta obecného (Saaristo a kol., 2019). Z toho důvodu je okoun považován za slibného kandidáta pro diverzifikaci moderní akvakultury (Kouřil, 2013). Jako typické spotřebitelské státy lze uvést Švýcarsko, Německo nebo Francii, u nichž je popisována rozdílná preference hmotnosti požadovaných cílových produktů (filetů), kdy ve francouzsky mluvící části Švýcarska se považují za žádoucí filety o hmotnosti 15 g tak v Německu nebo Skandinávii tamní obyvatelé s oblibou konzumují filety až 10x těžší. (Watson, 2008; Policar a kol., 2009; Stejskal a kol., 2010). Na okouna lze hledět i jako na biomeliorativní (v případě rybníka) a na biomanipulativní (v případě ÚN) druh ryby. V rybničním ekosystému vytváří predační tlak na nežádoucí druhy drobných kaprovitých ryb a snižuje tak kompetici kapra obecného s ostatní tzv. bílou rybou o přirozenou potravu. V případě údolních nádrží svou konzumací redukuje obsádky planktonivorních druhů ryb se sklonem k přemnožení (plotice obecná, ouklej obecná, cejnek malý). Tento ekologický vztah má za následek výskyt větších četností zooplanktonu (perloočky, buchanky), který požírá fytoplankton (řasy, sinice) což vede ke zvýšení průhlednosti vody a zlepšení bilance kyslíku v nádrži. Na druhou stranu nadměrný výskyt plůdku okouna říčního může mít spíše negativní biomanipulativní vliv vzhledem k predačnímu tlaku plůdku na zooplankton. Okoun je též považován sportovními rybáři za velmi atraktivní a oblíbený druh, nicméně podle dat z ČSR dochází v posledních letech k

rapidnímu poklesu jeho úlovků na sportovních revírech (Zalewski a kol., 1990; Meijer a kol., 1995; Dörner a kol., 2003; Adámek a kol., 2008; Policar a kol., 2009; Stejskal a kol., 2010; Randák a kol., 2015).



Obr. 3 Statistika úlovků okouna říčního na svazových vodách, ČRS, 2022

2.1.4. Metody chovu

2.1.4.1 Extenzivní chov

V tuzemsku a sousedních zemích jako Slovensko a Polsko je chov okouna spíše zaměřen na tradiční pojetí v rybničních akvakulturách, kdy je nasazován do polykultur s kaprem obecným či jinými kaprovitými rybami na dvouhorkový systém (loví se jednou za dva roky), přičemž s monokulturou se můžeme setkat pouze v případě produkce rychleného plůdku nebo výjimečně na malých produkčních rybníčcích (Policar a kol., 2008; Stejskal a kol., 2010; Hartman a Regenda, 2016). Polykulturní způsob chovu tržních ryb většinou čítá 2-5 % celkového objemu produkce ryb z akvakultury (Kestemont a kol., 1996). Mezi hlavní faktory limitace tohoto způsobu produkce patří především sezónnost (růst pouze ve vegetační sezóně), riziko kanibalismu v důsledku nemožnosti sortování velikostních kategorií, nízká obsádka na jednotku plochy, dostupnost ryb pouze v podzimním období a nekontrolovatelné kolísání fyzikálně-chemických parametrů vody (Boyd a Hanson, 2010; Policar a kol., 2015). Na druhou stranu využití výtažníkových rybníků do 2ha plochy pro odchov rychleného plůdku $Oř_r$ s následnou adaptací do RAS systému se jeví jako velmi efektivní metoda (Stejskal a Kouřil, 2006; Bláha a kol., 2013). Při produkci rychleného plůdku se nasazuje

120-150 000 ks $Oř_0.ha^{-1}$ (Policar a kol., 2015; Hartman a Regenda, 2016). V extenzivních chovech se plůdek okouna živí zpočátku drobným (vířníci) a následně hrubším (perloočky, buchanky) zooplanktonem s postupným přechodem na převážně piscivorní způsob získávání potravy. Přítomnost žádoucích velikostí zooplanktonu je podmíněna příslušným živinovým obohacením (dávka 400 kg hnoje.ha^{-1}) s ukončeným napouštěním výtažníku cca týden před nasazením plůdku (Smyly, 1952; Popova a Sytina, 1977; Guma'a, S. A. ,1978; Skrzypczak a kol., 1998; Bláha a kol., 2013; Policar a kol.,2014; Hartman a Regenda, 2016, Regenda, ústní sdělení).

2.1.4.2 Polo-intenzivní chov

Polo-intenzivní metody produkce s využitím klecového chovu či plachtových závěsných nádrží s průtočným systémem lze nalézt např. ve Švýcarsku, Skandinávii nebo Francii. Nutno zmínit, že v mnohých případech se jednalo spíše o experimentální práce. I přes zvýšenou obsádku (až 30 kg.m^3), nižší náklady a využití komerčních krmiv se stále jedná o spíše neúčinnou metodu z důvodu vysoké mortality a limitovaného růstu během zimních měsíců spolu s negativními důsledky působení patogenů a kanibalismu. Zefektivnění chovu připadá v úvahu pouze v případě zkrácení chovatelského cyklu do intervalu od června do září (Fontaine a kol., 1996; Kestemont a kol., 2008; Policar a kol., 2015).

2.1.4.3 Intenzivní chov v RAS

S technologickým postupem, zvyšující se odborností chovatelů a systémovou digitalizací lze nahlížet na intenzivní chov ryb v RAS systému jako na budoucí model příkladového oběhového hospodářství (Martins a kol., 2010; Stejskal a kol., 2010; Ebeling a Timmons, 2012; Kouřil, 2013; Policar a kol., 2015). Okoun říční bezpochyby patří do spektra ryb intenzivně chovaných v systémech RAS díky jeho schopnosti adaptovat se podmínkám intenzivního chovu a dosáhnout uspokojivých produkčních výsledků (Gebauer a kol., 2021). V systému RAS lze odchovat okouna do tržní velikosti (100-150 g) během 12-14 měsíců (Watson, 2008). Těchto výsledků je dosaženo za pomocí udržování konstantní teploty chovu (22-24°C), fotoperiody (12D:12L), nasycení kyslíkem (min. 70% na odtoku), udržení koncentrace dusíkatých látek metabolismu pod nebezpečnou úroveň (NH_3 < 0,03 mg.l^{-1}, NO_2^- < 0,5 mg.l^{-1}), technologie umělého a poloumělého výtěru s využitím hormonální

stimulace, velikostního třídění ryb, rozkrmu larev pomocí živé potravy jako žábronožka *Artemia salina* či vířník *Brachionus calyciflorus,* nekompromisní dodržování přísných zoohygienických opatření a pečlivé denní kontroly ryb i fyzikálně-chemických parametrů vody s možností ihned detekovat a neutralizovat rizikovou situaci. Jako příklad lze uvést farmové chovy ve Švýcarsku či Francii, kde hodnoty obsádek mohou dosahovat až 60 – 70 kg.m^3 vody (Sorgeloos a Persoon, 1975; Awais a kol., 1992; Mélard a kol., 1995; Vlavonou a kol., 1999; Kouřil a kol., 2002; Fiogbé a Kestemont, 2003; Fontaine a kol., 2008; Kestemont a kol., 2008; Policar a kol., 2008a, 2009b, 2015c). Nelze také opomenout aplikaci granulovaných krmných směsí s vyváženým obsahem živin. Podle Mareše a kol., (2015) by měly krmné granule pro juvenilní ryby obsahovat 55-60 % proteinu a kolem 10-12 % tuku, přičemž Fiogbé (1996) uvádí jako vyhovující obsah bílkovin 37-43 %, nicméně se oba shodují, že s rostoucí velikostí ryb i granulí by mělo množství bílkovin v krmivu mít klesající tendenci a obsah tuků by měl naopak postupně narůstat. Krmivo pro dospělé ryby by mělo podle Policara a kol. (2011) disponovat dostatečným a poměrově vhodným zastoupením vysoce nenasycených mastných kyselin HUFA. Konkrétní poměrové zastoupení by pak mělo vypadat následovně = 2 DHA (dokosahexanová kyselina): 1 EPA (eikosa pentaenová kyselina): 1 ARA (arachidonová kyselina) (Kestemont, 2008; Křišťan a kol., 2012). V současné době lze potenciálním chovatelům okouna doporučit krmiva od firem Biomar (Dánsko), Coppens (Supreme 10, Nizozemsko), Aller Aqua (Ocean Ivory Ex, Německo), Le Gousant (Percid Starter, Percid Range, Francie) (Policar a kol., 2009; Stejskal, ústní sdělení).

2.2. Faktory limitující chov okouna říčního v RAS

2.2.1. Bakterie *Aeromonas* sp.

2.2.1.1. Ekologie a rozdělení

Taxonomicky náleží gramnegativní bakterie rodu *Aeromonas* sp. do čeledi Aeromonadaceae v rámci kmene Proteobacteria. Široká škála druhů tohoto rodu reflektuje i variabilitu v optimálních podmínkách prostředí z hlediska teploty (psychrofilní a mezofilní), přítomnosti kyslíku (fakultativně anaerobní) i získávání energie v podobě chemoorganotrofie (Colwell a kol., 1986; Garrity, 2007; Parker a Shaw, 2011). Jedná se o zástupce bakterií typických pro vodní habitaty s nezávislostí na typu (lentický i lotický), původu (podzemní,

povrchová) či úrovně znečištění (Chowdhury a kol., 1990; Janda a Abbott, 2010). Z hlediska mobility lze rozdělit aeromonády na pohyblivé a nepohyblivé. V případě nepohyblivých druhů pozorujeme riziko patogenity pouze u ryb, kdežto pohyblivé aeromonády představují nebezpečí nákazy jak pro ostatní obratlovce, tak i pro bezobratlé. Mezi nepohyblivé se řadí např. *A. salmonicida*, jenž u ryb způsobuje onemocnění furunkulózou a z druhé skupiny lze zmínit např. *A. hydrophila* a *A. veronii*, jenž představují původce vzniku bakteriálních hemoragických septikémií ryb (Rahman a kol., 2002; Janda a Abott, 2010).

2.2.1.2. Patogenita

V chovu lososovitých ryb patří nepohyblivá *A. salmonicida* mezi jedny z nejstarších zdokumentovaných a také nejzávažnějších patogenů způsobující onemocnění furunkulóza a stává se tak významným limitačním faktorem úspěšného chovu lososovitých ryb v globálním měřítku (Dallaire-Dufresne a kol., 2014; Menanteau-Ledouble a kol., 2016). Typickým patologicko-morfologickým projevem chronické formy tohoto onemocnění u starších či rezistentních jedinců je přítomnost dermálních pukajících vředů neboli abscesů (tzv. ulcerace) též nazývaných furunkuly. (Hiney a kol., 1997; Austin a kol., 2007). U plůdku se lze setkat s per akutní formou charakterizovanou akutní mortalitou v řádu několika dnů, přičemž pro juvenilní a adultní ryby je spíše typická forma akutní, při které je bakterie distribuována do tkání cestou krevního řečiště (septikémie). Při těchto formách onemocnění jsou pozorovatelné morfologické změny jako ztmavnutí povrchu těla nebo přítomnost hemoragií (Palíková a kol., 2019).

Pohyblivé aeromonády stojí za vznikem řady infekčních septikemických onemocnění, které Palíková a kol. (2019) shrnuje pod zkratkou MAI (motile aeromonad infection). Mezi tuto skupinu aeromonád patří např. *A. hydrophila*, která často tvoří majoritní zastoupení tohoto rodu bakterií ve vodě, přičemž ji někteří autoři uvádí jako původce globálně rozšířeného onemocnění erytrodermatitidy u kaprovitých ryb, s níž jsou velmi dobře obeznámeni i tuzemští rybníkáři. Dalším známým MAI patogenem způsobující značné ekonomické škody v chovech ryb je *A. veronii* biovar *sobria.* jejíž negativní vliv byl prokázán i v chovu okouna říčního (Wahli a kol., 2005). Klinické příznaky MAI onemocnění se projeví buď v pozdějším stádiu nemoci (porucha příjmu potravy, shromažďování u břehových linií) nebo k nim v rámci akutní formy nedochází vůbec s následným úhynem.

Mezi nálezy morfologické patří především ulcerativní změny na pokožce s následnou nekrózou vnitřních orgánů (Schulz, 1980; Ghenghesh a kol., 2001; Kolářová a Svobodová, 2009; Palíková a kol., 2019).

2.2.1.3. Vliv na chov okouna říčního

Okoun říční se vyznačuje relativně vysokou rezistencí vůči nemocem bakteriálního původu, na druhou stranu pravděpodobnost vzniku povrchového poranění je v intenzivních chovech poměrně vysoká a v jejím důsledku může dojít k sekundární bakteriální infekci (Policar a kol., 2009).

Zdokumentovaný případ z nejmenované švýcarské okouní farmy popisuje prvotní detekci kožních lézí v laterálních rovinách chovaných jedinců s následnou mortalitou v chovu na úrovni cca. 1 % obsádky.den^{-1}. Po izolování vzorků peritoneálních tkání padlých ryb popisují identifikaci bakterie *A. sobria* s následnou expozicí buňkám pstruha duhového s výsledným hemolytickým a cytotoxickým efektem. Zprávu završuje deklarace *A. sobria* jako primárního patogenu okouna říčního (Wahli a kol., 2005). Případ z volných vod z francouzského jezera Annecy vypovídá o negativním patogenním účinku *A. hydrophila* na populaci okouna, kdy došlo k masovému úhynu 250 kg trofejních exemplářů (1,5 kg) s patrnými hemoragickými a ulcerativními lézemi na povrchu těla (Michel, 1981). O úhynu okounů v britském jezeře Windermere zapříčiněným *A. hydrophila* se krátce zmiňuje i Policar a kol. (2009). Pozorování Grignarda a kol. (2006) potvrzuje přítomnost bakterií *A. sobria*, *hydrophila* a *veronii* v intenzivním chovu juvenilních i adultních okounů s následnou mortalitou dosahující až k hodnotě 8 % obsádky. Jako nejvýznamnější patogen limitující produkci okouna v RAS uvádějí Rupp a kol., (2019) ve své práci také bakterie z rodu *Aeromonnas*.

2.2.1.4. Identifikace, prevence, léčba

V praxi se k léčbě MAI onemocnění využívá antibiotik přidaných do krmiva např. preparátu RUPIN SPECIAL, jenž obsahuje účinnou látku oxytetracyklin, přičemž Palíková a kol. (2019) doporučuje aplikovat 4-6 dávek o koncentraci 15 g.kg^{-1} váhy ryb. Oxytetracyklin je možné aplikovat i alternativně formou léčebné koupele při expozici 90 minut ve třech po sobě jdoucích interval s časovým odstupem 24 hodin. Další variantou je

koupel v roztoku NaCl v koncentraci 10-30 $g.l^{-1}$ v časovém rozmezí 15 min – 1 hod (Policar a kol., 2009). Z řad antibiotik se zda být řešením i aplikace léčebné koupele v přípravku Enrofloxacin v koncentraci 2 $mg.l^{-1}$ na denní bázi po dobu trvání 5 dní (Kolářová a Svobodová, 2009). V poslední době se mezi výzkumníky diskutuje o snížení účinnosti antibiotik v rámci jejich nadměrného užívání u lidí i zvířat. Tento trend lze také definovat jako postupné zvyšování antimikrobiální rezistence-(Moore, 2019).

Mezi základní preventivní opatření patří pravidelná kontrola kvality vody, maximální apel na dodržování zoohygienických podmínek, opatrná a odpovědná manipulace s rybami a také kvalitní vyvážená výživa. Dále nelze opomenout klasické rybníkářské ozdravovací metody (letnění, zimování) spolu s desinfekčními opatřeními (vápnění rybničního dna, ošetření nářadí v roztoku SAVO) nebo koupel ryb v roztoku manganistanu draselného po invazivním zásahu (umělý výtěr, značení). V intenzivní akvakultuře se přistupuje k eliminaci patogenů pomocí ozonizací a UV záření v kombinaci s případnými karanténními a izolačními procesy (Kestemont a Mélard, 2000; Kouřil, 2013; Hartmann a Regenda, 2016; Kolářová a Svobodová, 2009;).

K identifikaci bakterií z rodu *Aeromonas* sp. lze využít širokou škálu odborných metod počínaje kultivací, která zahrnuje biochemické metody jako oxidačně-fermentační test či redukci dusičnanů. Dále lze využít molekulárních metod jako je hybridizace nukleových kyselin, FISH (fluorescenční hybridizace *in situ*) nebo PCR (polymerázová řetězová reakce). Za zmínku stojí i využití metody MALDI-TOF (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace), která pracuje na principu hmotnostní spektrofotometrie (Miñana-Galbis a kol., 2002; Abbott a kol., 1992a, 2003b; Benagli a kol., 2012).

2.2.2 Stres

2.2.2.1. Definice a rozdělení stresu

Existuje velmi mnoho variant definic stresu z různých pohledů, nicméně většina odborných publikací zabývající se touto tématikou se shoduje v definici podle Hanse Seyleho (Seyle, 1950a, 1956b), který vysvětluje stres jako nespecifickou odpověď těla organismu na jakýkoliv požadavek s následným všeobecným adaptačním syndromem (GAS), neboli snahou organismu adaptovat se nové situaci a zachovat stabilitu homeostáze. Konkrétněji pak autoři popisují stres jako přirozenou reakci organismu na environmentální gradient

(změny teplotních režimů, srážkových poměrů, nadmořských výšek), přítomnost hrozby (predátora, konkurenta potravního, refugiálního, reprodukčního) onemocnění, zranění, intoxikaci či fyzickou zátěž. Obecně lze shrnout podněty zapříčiňující vznik stresu pod pojem stresory. Jiná definice hovoří o stavu způsobeném environmentálním či jiným faktorem, který rozšiřuje schopnosti organismu za běžný rozsah adaptace či významně poškozuje normální fungování organismu a v obou případech výrazně přispívá ke snížení pravděpodobnosti přežití organismu. Z endokrinologického hlediska je možné definovat stres jako stimul, jenž zodpovídá za uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z adenohypofýzy s následným zvýšením produkce glukokortikoidů (Seyle, 1950a, 1956b; Levine, 1985; Iwama a kol., 1998; Večeřová-Procházková a Honzák, 2008; Killen a kol., 2013; Chovatiya a Medzhitov, 2014; Fink, 2010a; Fink, 2016b).

Stres se vyskytuje ve dvojí formě, přičemž jeden typ rozpoznáváme jako tzv. pozitivní neboli motivační eustres, kdy se jedinec vystavuje únosné míře stresoru, při které se odpověď organismu projeví zvýšenou snahou o dosažení cíle s výsledným pozitivním efektem na celkovou fitness. Protilehlou reakci vyvolává negativní distres, jenž způsobuje maladaptivní odpověď s negativním efektem pro zdraví organismu (Le Fevre a kol., 2003; Večeřová-Procházková a Honzák, 2008; Schreck a Tort, 2016). Dále se lze setkat s pojmem oxidační stres, který z biochemického hlediska vyjadřuje nepoměr rovnováhy oxidantů a antioxidantů v těle v prospěch oxidantů. Reaktivní kyslíkové částice ovlivňují intracelulární procesy, které slouží k udržení homeostáze a v jejich nadbytku může docházet k poškození buněk následované nekrózou (Sies, 2000; Burton a Jauniaux, 2011).

2.2.2.2 Stresory ryb

Stresové podněty ryb se dají diferenciovat do tří hlavních skupin. Jedná se stresory environmentální, fyzické a biologické (Iwama a kol., 1998).

Environmentální stresory ryb spočívají v proměnlivosti hodnot fyzikálně-chemických parametrů vody tzv. gradient prostředí. Jedná se tedy o změny teplotního režimu, nasycení vody kyslíkem, pH, koncentrací dusíkatých látek metabolismu, parciálního tlaku nebo tvrdosti vody. Do této kategorie spadají i zvýšené koncentrace rozpuštěných xenobiotik jako jsou pesticidy, těžké kovy, kyanidy, farmaka a jejich metabolity. Dále se může jednat o přítomnost introdukovaných alochtonních druhů nebo antropogenních zásahů např.

napřimování vodních toků s následnou degradací habitatu. (Power, 1997; Iwama a kol., 1998; Mount a kol., 2012; McBryan a kol., 2013; Eissa a Wang, 2016). Mezi stresory fyzické poté řadíme především manipulaci s rybou, výlovy, třízení, transport, značení, umělé výtěry nebo sportovní rybolov (Iwama a kol., 1998; Mount a kol., 2012; Martos Sitcha a kol., 2020). Biologické stresory poté zahrnují koncepty populační dynamiky jako hejnová hierarchie a dominance, kdy se nedominantní jedinci (submisivní) dostávají do nevýhodných situací z hlediska potravní i reprodukční kompetice. Jako stresor působí i přítomnost patogenu v organismu, nicméně souvislosti mezi stresem a imunitním systémem se zdají být oboustranně destruktivní, neboť stresový stav sám o sobě navyšuje riziko nákazy v důsledku oslabení obranyschopnosti organismu (Steptoe, 1991; Rottman a kol., 1992; Fox a kol., 1997; Iwama a kol., 1998; Dahlbom a kol., 2011).

2.2.2.3. Stresové reakce ryb

Z fyziologického hlediska pozorujeme 3-fázovou reakci ryb na stimul stresorem. První alarmující fáze je charakteristická reakcí „bojuj nebo uteč “, druhá rezistenční fáze umožňuje organismu adaptovat se na zátěž. V případě úspěšné adaptace nastává třetí kompenzační fáze, která je typická stabilizací homeostázy a navrácení do původního stavu před expozici stresoru. Pokud však adaptační mechanismus selhává v důsledku již déle neúnosného působení stresoru tak nastává třetí fáze vyčerpání, v jejímž důsledku organismus umírá (Iwama a kol., 1998; Shreck a kol., 2016).

Z hlediska endokrinologického lze reakci ryb také rozdělit do tří fází. V rámci primární odpovědi dochází k uvolňování stresových hormonů katecholaminů (adrenalin a noradrenalin) z chromafinové tkáně hlavové části ledvin do krevního řečiště. Dále dochází k expresi a syntéze CRH (kortikotropní hormony nebo též CRF kortikotropní faktor) z hypotalamu, které stimulují hypofýzu k sekreci adrenokortikotropních hormonů (ACTH), které stimulují interrenální tkáň hlavové části ledvin k produkci a vyplavení kortizolu. Tento proces se též označuje jako HPI osa (hypotalamus – pituitary/hypofýza – interrenal). Primární odpověď je tedy charakteristická rapidním zvýšením koncentrace kortizolu a katecholaminů v krevní plasmě. Funkce kortizolu spočívá v aktivaci obranyschopnosti organismu pomocí zajištění dostatečného množství energetických zásob, konkrétně stimulace glukoneogeneze, metabolismu lipidů či syntézy proteinů v rámci

aminokyselinového metabolismu. Ve fázi sekundární dochází ke zvýšené potřebě respirace ve snaze znovuzískání energie. V důsledku zvýšené koncentrace adrenalinu v krvi se dostaví deficit iontových minerálů Na^+ a K^+, zapříčiněný snížením průtoku krve v žaberních oblucích. Zvýšené množství kortizolu v krvi při sekundární odpovědi také způsobuje efekt imunosuprese. Kaskáda těchto událostí vede k terciálním odpovědí organismu, které v případě přežití jedince vyústí v poruchy růstu, reprodukce, imunologické rezistence a změn v chování (Van Der Boon a kol., 1991; Pickering, 1993; Iwama a kol., 1998; Wendelaar Bonga, 1997; Pankhurst, 2011; Gorrisen a Flik, 2016; Shreck a kol., 2016).

2.2.4. Syndrom nenaplňování plynového měchýře a kanibalismus

K naplnění plynového měchýře (GB – gass bladder)) dochází u okounovitých ryb přirozeně v počátcích ranné ontogeneze zpravidla mezi přechodem na exogenní výživu (3DPH) a 10 – 14.DPH pomocí proražení hladinové blanky, spolknutí bublinky vzduchu s následným transportem do GB přes *ductus pneumaticus* (spojka jícnu a GB) (Egloff, 1996; Csezny, 2005; Dvořák a kol., 2014). V důsledku přítomnosti tučných emulzí na vodní hladině se posléze stává možnost prorazit vodní blanku znemožněnou, což vede k tzv. syndromu nenaplňování GB (NGB – non gass bladder, NISB – not-inflated swim bladder) s konsekvencemi v podobě morfologických malformací a retardace růstu u larev (Jacquemond, 2004). Pro severoamerické candáty (*Sander vitreum*) s NISB je také typický zvýšený energetický výdej při pohybu, jenž vede k omezení schopnosti shánět potravu a zvýšení atraktivnosti pro kanibaly (Summerfelt, 1996).

Kanibalismus je rizikový především u okouních larev, kdy je podmíněn heterogenitou růstu. Rychleji rostoucí jedinci disponují většími ústy a neváhají považovat za potravu své menší soukmenovce. Míru kanibalismu také umocňuje vyšší teplota vody (+17 °C) v intenzivním chovu spolu s neoptimálním krmením larev a nedostatečným sortování velikostních kategorií plůdku. Kanibalismus může způsobit ztráty až 40 % obsádky (Mélard a kol., 1995; Kestemont a kol., 2003, Król a Zieliński, 2015)

2.3. Možná efektivní dlouhodobá řešení

2.3.1. Šlechtitelský program

2.3.1.1. Domestikace

Z evolučního hlediska lze na domestikaci nahlížet jako na prodlouženou ruku mutualismu, při kterém jeden druh cíleně kontroluje fitness druhu jiného za účelem získání zdrojů (Purugganan, 2022). Z antropocentrického pohledu lze popsat domestikaci jako proces adaptace populací organismů na chov/pěstování v prostředí, které je kontrolováno člověkem, v případě živočichů se bavíme o tzv. chovu v zajetí. Někteří autoři jako Ducos a Mathew (2014) nebo Bökönyi (2014) hovoří dokonce o symbióze mezi chovatelem a zvířetem. Domestikace je charakteristická kombinací změn genetických kvantitativních (růst, plodnost) i kvalitativních (stresová a imunologická rezistence) znaků jako odpovědi na vývojové události vyvolané okolním prostředím artificiálního chovu/pěstění v rámci nově vychovaných generací. Tyto změny se v praxi projevují rozdílnou morfologickou formou, zbarvením těla i chováním oproti divokým předkům. Z těchto informací je patrné, že nedílnou součástí domestikace je absolutní kontrola reprodukce. Z behaviorálního hlediska lze u domestikovaných zvířat pozorovat sníženou citlivost na proměnlivost podmínek prostředí stejně jako méně agresivnější projevy chování v interakci s člověkem (Price, 1984a, 1999b; Clutton-Brock, 1992; Balon, 2004; Gjedrem a Baranski, 2010; Zeder, 2015; Milla a kol., 2021).

Domestikace zvířat i rostlin s největší pravděpodobností náleží mezi jeden z hlavních pilířů evolučního úspěchu lidského druhu v posledních 10 000 letech (Larson a Fuller, 2014). Mezi historicky první domestikované živočichy lze zařadit psa domácího (*Canis lupus f. familiaris*), prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*), koně domácího (*Equus ferus f. caballus*) nebo ovci domácí (*Ovis gmelini f. aries*). K domestikacím docházelo především za účelem zajištění udržitelného zdroje živočišných bílkovin s minimalizací rizika a energetického výdeje, jež byly s předcházejícím stylem „lovec – sběrač“ spojeny (Price, 2002; Vigne a kol., 2005; Trut a kol., 2009; Zeder, 2012).

V oblasti sladkovodní akvakultury se za první zdomestikovanou rybu považuje kapr obecný (*Cyprinus carpio*) k jehož zdomácnění došlo v Číně přibližně před 8000 lety v provincii Henan (Nakajima a kol., 2019; Balon, 2004). Umělý chov tilápie nilské (*Oreochormis niloticus*) zahrnující i pokusy o kontrolovanou reprodukci v předem

zbudovaných rybníčcích na území Egypta je datován až do 4. tisíciletí př.n.l. (Teletchea, 2019). Extenzivní chovy kapra obecného na území Evropy jsou zdokumentovány již z dob raného středověku, kde mu byla věnována pozornost především ze strany církve (Teletchea, 2021; Prchal a kol., 2022). Jako další hospodářsky významné domestikované druhy ryb lze uvést např. lososa obecného (*Salmo salar*) nebo pstruha duhového (Policar a kol., 2015). Proces domestikace okouna říčního zaznamenal značný posun v uplynulých třech dekádách, kdy bylo docíleno optimalizace v oblasti umělé reprodukce a chovu od plůdku až po tržní ryby v kontrolovaných podmínkách (Kouřil a kol., 2002; Rouegot a kol., 2007; Gebauer a kol., 2021). Například Policar a kol. (2009) popisují 33% zvýšení růstu u F1 generace domestikovaných ryb oproti nedomestikovaným během 300 dní dlouhého experimentu. V případě generace F2 při stejných časových podmínkách již rozdíl dosahoval hodnoty 72 %. Vzhledem k růstu poptávky po produktech akvakultury je zřejmé, že domestikace spadá mezi základní předpoklady úspěšného intenzivního chovu a spektrum domestikovaných ryb se bude nadále rozšiřovat (Telechtea, 2018; Gebauer a kol., 2021).

Prvotní domestikace ryb sestává z přirozené adaptace na chov v kontrolovaných podmínkách, kterou lze též nazývat jako domestikaci bezděčnou. V tomto prvopočátku je chovné hejno neustále doplňováno novými jedinci pro reprodukci, na což navazuje fázi kontinuálního řízeného rozmnožování, při kterém jsou již vstupy divokých jedinců do hejna zamezeny. Požadované užitkové vlastnosti (růst, reprodukční potenciál, tolerance vůči patogenům a stresu) jsou děděny s každou další generací a na domestikaci postupně navazuje proces šlechtění neboli selekce (Policar a kol., 2015; Milla a kol., 2021).

2.3.1.2. Umělá selekce

Umělá selekce neboli šlechtění je antropogenně indukovaným procesem, jenž si klade za cíl navýšení ekonomického potenciálu chovu z hlediska konzumní produkce tržních ryb (snížení produkčních nákladů, zvýšení kvality a konkurenceschopnosti produktu, redukce náchylnosti ke stresu, posílení rezistence vůči patogenům, zlepšení welfare) čímž se odlišuje od přirozeného výběru, který je poháněn pomyslným motorem evoluce v jejímž rámci dochází k větší reprodukční úspěšnosti u jedinců s vyšší adaptabilitou na proměnlivost environmentálních podmínek a s lepším celkovým fitness (Endler, 1986; Brodie a kol., 1995; Gjedrem a Baranski, 2010; Kocour a kol., 2010; Sober a Wilson, 2011). Proces umělé selekce

je charakteristický uzavřeným chovem rybího hejna, při kterém jsou do následujícího rozmnožovacího cyklu vybíráni pouze jedinci, jenž disponují hodnotami užitkových vlastností v požadovaném intervalu, který reflektuje genetický potenciál (Hershberger, 1990; Kocour a kol., 2010; Flajšhans a kol., 2013). Vzhledem k absolutní kontrole procesu reprodukce v selekčních programech je popředí zájmu soustředěno na předem zvolené užitkové vlastnosti, jež jsou selektovány. V rybářské praxi se jedná zejména o růst spolu s doplňkovými užitkovými vlastnostmi jako přežití, plodnost, dosažení pohlavní zralosti, či rezistence vůči patogenům a stresu (Vandeputte, 2003; Kocour a kol., 2010; Gjedrem a kol., 2012; Gebauer a kol., 2021).

Fyziologický projev požadovaného znaku je též znám jako fenotyp. V praxi lze jako typický příklad fenotypu uvést např. typ ošupení u kapra, zbarvení u lína nebo v případě růstu hmotnost či celkovou délku těla. Fenotypy individuálních jedinců v rámci populace přirozeně nesou známky variability, která je u většiny znaků vyjádřena normálním rozdělením Gaussovy křivky. Tato variabilita neboli fenotypová variance se skládá ze dvou složek, přičemž první se nazývá genotypová variance (genetická neproměnná složka), kde gen či soubory genů v DNA kódují patřičný znak, zatímco druhá environmentální složka odráží proměnlivost podmínek prostředí. Fúze variancí těchto dvou složek následně utváří varianci fenotypovou, kterou lze též vyjádřit jako rozptyl hodnot sledovaného znaku v populaci (Churchill, 1974; Bull, 1987; Wojcynszki a Tiwari, 2008; Kocour a kol., 2010; Flajšhans a kol., 2013a, 2018b; Orgogozo a kol., 2015). Míru vlivu zmíněných složek udává tzv. koeficient heritability, který vyjadřuje, jak významně se ve fenotypové varianci projevuje genetická složka. Tento ukazatel lze kvantifikovat na stupnici 0-1, kdy hodnoty blížící se 0 indikují větší podíl vlivu složky prostředí, a naopak při hodnotách blíže k 1 se na fenotypu významněji projevuje dědičnost a selekcí lze docílit vylepšení požadovaného znaku (Sussane, 1977; Stirling a kol., 2002; Kocour a kol., 2010; Fabian a Flatt, 2012; Battstone, 2022). S heritabilitou souvisí i pojmy genetický zisk (rozdíl mezi průměrnými hodnotami znaku u potomstva od selektovaných a neselektovaných rodičů) a selekční diferenciál (rozdíl mezi průměrnou hodnotou znaku u selektovaných rodičů a u základní populace z níž byli selektovaní rodiče vybráni). Na základě odhadovaného genetického zisku lze zhodnotit ekonomickou způsobilost selekce (Gjedrem, 1975; Kocour a kol., 2010). Jako rizikové selekční ukazatele lze uvést selekční strop a koeficient inbreedingu. Selekčním stropem se

rozumí dosažení maximální fyziologické hranice šlechtění s následnou ztrátou vlivu selekce na navyšování hodnoty požadovaného znaku. Inbreeding udává míru genetické příbuznosti mezi jedinci v populaci a pokud se v důsledku selekce snižuje počet jedinců v hejnu, vzniká riziko inbrední deprese, která se geneticky projevuje poklesem heterozygotnosti s následnými fyziologickými konsekvencemi v podobě morfologických malformací, inhibicí růstu, poruch reprodukce a snížení celkové fitness u dalších generací. Z toho důvodu je nutné udržovat dostatečně velkou efektivní velikost populace minimálně 120 ks při poměru pohlaví 1:1 (Kincaid, 1983; Wang a kol., 2002; Thünken a kol., 2007; Flajšhans a kol., 2009; Kocour a kol., 2010).

V akvakultuře je kvalitně popsán selektivní program pro lososa obecného, který dosáhl významných produkčních úspěchů, kdy z počátku spadalo do popředí zájmu především navýšení růstu (+113 % oproti divokým jedincům). Mezi další vyšlechtěné užitkové vlastnosti u lososa obecného spadá retence proteinu, barva svaloviny, krmný koeficient FCR (-20 % oproti divokým jedincům) a také rezistence vůči virovému patogenu IPNV (Thodesen a Gjedrem, 2006; Powel a kol., 2008; Gjedrem a Baranski, 2010). V tuzemsku se lze setkat s plemeny kapra obecného vyšlechtěnými již v 19. stol Josefem Šustou a to známými třeboňskými šupináči a lysci (Flajšhans a kol., 2013). Současný genofond české akvakultury nabízí kolem 15 plemen kapra obecného, 7 plemen lína obecného, 5 linií pstruha duhového, 2 populace pstruha potočního a 2 linie sumce velkého (Flajšhans, 2018).

2.3.1.3. Teoretický výběr kandidátů okouna říčního

V současnosti zatím nebyl popsán šlechtitelský program u okouna říčního, nicméně bylo identifikováno několik znaků indikující potenciální zlepšení kvality produkce jako % larev s naplněným plynovým měchýřem, % morfologických malformací, rychlost růstu, přežití, míra kanibalismu, agresivita, tolerance vůči stresu a rezistence vůči patogenům (Gebauer a kol., 2021). Jistou roli v potenciálním výběru jedinců okouna říčního pro šlechtitelský program hraje i geografický původ populací (Toomey a kol., 2021). Např. v práci Vanina a kol. (2019) byly pozorovány výrazné rozdíly mezi mírou mortality během transportu v rámci několika evropských populací. Embrya ze slovenské přehrady Liptovská Mara vykázala 96% přežití během 6 h transportu, čímž se umístila na první příčce mezi sedmi různými evropskými populacemi. Na druhou stranu pro indikátory růstu jako hmotnost, délka těla a

hmotnostní přírůstek se dle výsledků z práce Vanina a kol. (2019) jako nejvhodnější v rámci sledovaných populací jeví populace z finských jezer Valkea Kotinen a Majajärvi. Výsledky z výzkumů chovu příbuzného okouna žlutého naznačují, že při výběru jedinců (s rychlejším růstem, vyšším přežitím a nižší mírou kanibalismu) do šlechtitelských programů by se dalo teoreticky dosáhnout celkového navýšení efektivity chovu (Rosauer a kol., 2011; Rosburg, 2017). Potenciální kandidáti do selekčních programů by měli také disponovat behaviorálními aspekty, jenž odpovídají parametrům uzavřených intenzivních chovů jako je míra agresivity, aktivita či ochota přijímat krmivo. Správné porozumění intra-specifických behaviorálních rozdílů mezi jedinci by mohlo vést k částečné nicméně dlouhodobé eliminaci nežádoucích limitujících faktorů v chovech okouna (Toomey a kol., 2019).

2.3.2. Personalita u ryb a kontinuum plachý – odvážný

Personalitu neboli osobnost zvířat lze definovat jako konzistenci individuálních rysů chování napříč časem, která funguje jako adaptační mechanismus v rámci evoluce (Briffa a Weiss, 2010; Castanheira a kol., 2013). Na chování zvířat lze pohlížet jako na způsob, jak se jedinec vyrovnává s měnícími se podmínkami vnitřního i vnějšího prostředí (Carter a kol., 2013). Intra i inter-specifické rozdíly v chování u ryb byly v minulosti považovány za náhodné či za odchylky od optimálních životních strategií, nicméně v současnosti se snaží vědní disciplína etologie ryb popsat, definovat a rozdělit chování ryb na základě genetických predispozicí (chování vrozené/naučené) či v důsledku měnících se environmentálních či ekologických faktorů např. chování reprodukční, potravní, únikové, hejnové apod. (Magurran, 1986; Rowland, 1999; Kapoor, 2008).

Individuální rozlišnosti v chování různých druhů ryb vedou k jejich zařazení na pozici vhodných modelových organismů pro studium zvířecí personality (Mittelbach a kol., 2014). Jedna z nejzajímavějších typologických kategorizací spočívá v diferenciaci na proaktivní (odvážné/riskující/bold individuals/BI) a reaktivní (plaché /neriskující/shy individuals/SI) jedince (Sih a kol., 2004a, 2004b) neboli tzv. shy-bold kontinuum, které do češtiny překládáme jako kontinuum plachý - odvážný (Sneddon, 2003; Oswald a kol., 2012; Gebauer T, ústní sdělení).

Tento koncept zahrnuje typologické rysy individuálních jedinců, a především predikuje ochotu jedince zachovat se v nečekané situaci riskantně (Coleman a Wilson, 1998). Jako

jeden z hlavních rozdílů mezi BI a SI jedinci lze přirozeně popsat reakci na neznámou situaci, kdy výrazně SI jedinec vykazuje únikové chování se zvýšenou bdělostí a opatrností na rozdíl od extrémně BI jedince, který s největší pravděpodobností vyrazí neznámou situaci aktivně zkoumat. (Wilson a kol., 1993). Kontinuum plachý - odvážný již bylo zkoumáno a úspěšně popsáno u několika druhů sladkovodních ryb jako např. koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*), slunečnice pestrá (*Lepomis gibossus*), pstruh duhový (*Onchorhyncus mykkis*) nebo kančík příčnopruhý (*Amatitlania nigrofasciata*), kdy předmětem studií bylo nalezení korelací mezi „shy-bold kontinuuem" a fyziologicko-behaviorálními projevy jako ochota jedince získat potravu v/bez přítomnosti predátora či ochota opustit úkryt (risk taking behaviour), aktivita, sociální interakce, zkoumání nových objektů nebo úroveň respirace (Wilson a kol., 1993; Sneddon, 2003; Ioannou a kol., 2008; Jones a Godin, 2010). Existuje poměrně široká škála metod (testů) pro stanovení typu personality v rámci kontinua plachý-odvážný.

2.3.2.1. Aktivita

Jednou z nejčetnějších metod determinace typologie osobnosti u ryb se jeví experimenty, jejichž výstupem je aktivita (tzv. open field testy/OF). Nejvhodnější prostředí se zdá být nádrž bez překážek s volným prostorem, kdy se u ryb měří vzdálenost uplavaná rybou za předem stanovený časová interval, zpravidla se jedná o minuty až hodiny. Druhou proměnou se posléze stává aktivní a inaktivní čas, tedy poměr doby, kdy byla ryba v pohybu ku době, kdy vykazovala nulový pohyb (%). Pro vyhodnocení požadovaných výstupů se v praxi užívá speciálně upravených softwarů pro analýzu behaviorálních charakteristik testovaných živočichů např. Ethovision (Noldus Information Technology, Nizozemsko), Lolitrack (Loligo Systems, Dánsko) nebo interaktivní prostředí softwaru Matlab (Mathworks, USA). Jedinci s nejvyšším skóre aktivity mohou být dále kategorizováni jako BI a naopak ryby, jenž vykázali minimální či nulovou aktivitu spadají pod personální typ SI (Dahlbom a kol., 2011; Závorka a kol., 2017; Thörnqvist a kol., 2019; Gebauer a kol., 2021).

2.3.2.2. Průzkumnické a potravní chování

Jako další metodu typologické diferenciace na SI a BI jedince lze uvést stanovení ochoty jedinců riskovat tzv. risk-taking behaviour nebo exploratory behaviour (Jolles a kol., 2015).

Na rozdíl od předchozí metody se v tomto případě užívá uměle vytvořených úkrytů s cílem pozorovat a popsat tendence ryb k opuštění úkrytu a průzkumu nezmapovaného okolí (exploratory behaviour) bez potravní stimulace nebo naopak za přítomnosti potravy, kdy je snahou experimentu vypozorovat a časově kvantifikovat opuštění úkrytu rybou za účelem získání potravy (risk-taking behaviour). Běžně doba trvání experimentů nepřekračuje 30 min (Brown a Braithwhite, 2004; Jolles a kol., 2019;). U testovaných subjektů se zaznamenávají především dva významné parametry, kdy prvním je latentní čas prvního opuštění úkrytu tzn. čas mezi začátkem experimentu a počátečním vyplutím z úkrytu. Druhá proměnná se poté udává jako suma veškerého času stráveného mimo úkryt. Jedinci s nejkratším intervalem latence opuštění úkrytu a nejdelším časem stráveným mimo úkryt tak získávají skóre BI a naopak ryby bez odezvy nebo s největší úkrytovou latencí a nejkratším časem mimo úkryt se označují za SI (Riesch a kol., 2009; Errikson a kol., 2010; Spence a kol., 2013; White a kol., 2013; Jolles a kol., 2015a, 2019b; Lagesson a kol., 2019).

V případě přítomnosti potravní nabídky lze také zkoumat tzv. čas váhání, kdy se měří doba mezi překročením středové linie nádrže a prvním kontaktem s potravou, kdy se přirozeně za odvážné jedince označují ti s nejnižší hodnotou času váhání (Ioannou a kol., 2008).

Dále existuje možnost testovat ryby pomocí přímého krmení, kdy lze aplikovat potápivé krmivo do nádrže a zaznamenávat rozdílnost reakcí na jejímž základě lze následně diferenciovat osobnostní typy, kdy se za rozhodovací kritéria považuje aktivní pohyb za potravou či pasivní vyčkání, než krmivo dopadne před testovaný subjekt (Øverli a kol., 2006).

Riskantní predační chování lze také testovat za pomocí nádrže rozdělené na dvě zóny (aklimatizační a riskantní), kdy ryby dostanou po celonoční aklimatizaci možnost opustit bezpečnou aklimatizační zónu a pomocí průchodu proplavat do riskantní zóny, kde se nachází potrava. Za výstup testu se považuje individuální čas latence vstupu do riskantní zóny a počet návštěv (Castanheira a kol., 2013).

2.3.2.3. Zkoumání nových objektů

Kontinuum plachý-odvážný se také významně odráží ve schopnosti a ochotě individuálních jedinců zkoumat nové objekty v prostředí (Castanheira a kol., 2013; Gebauer

a kol., 2021). K tomu slouží tzv. novel object test (NO), který spočívá v umístění rybám neznámého předmětu (nejčastěji malý žlutý/zelený Lego bloček) do prostoru experimentální nádrže, která pozbývá úkryt. Lze přikročit i k vytvoření několika čtvercových zón vzdálenosti od nového objektu (5x5 cm, 10x10cm apod.) které reflektují míru „odvážnosti" neboli udávají tzv. BI skóre. Aklimatizace v experimentální nádrži před vložením nového objektu se liší podle dostupných zdrojů: 48 h (Jones a Godin, 2010), 24 h (Molnár a kol., 2018), 12 h (Gebauer a kol., 2021), 12 h (Castanheira a kol., 2013). Aklimatizace ryb v nádrži s nově přidaným objektem před počátkem testu kolísá v řádech jednotek až desítek minut. Účelem sekundární (s novým objektem, krátkodobé) aklimatizace je eliminace nežádoucího vlivu způsobeného vložením objektu do nádrže, ryby po tomto zásahu mohou jevit náznaky poplašení. Testy zkoumání nových objektů průměrně trvají 15-60 minut, kdy účelem experimentu je v případě přítomnosti zón vzdálenosti stanovení následujících parametrů: latentní čas vstupu do jednotlivých zón blízkosti, čas strávený v zónách blízkosti, počet návštěv jednotlivých zón. Pokud se aplikuje NO test bez vyhranění zón blízkosti tak lze zkoumat výchozí hodnoty jako počet návštěv nového objektu, nejkratší vzdálenost od objektu a latentní čas dosažení nejkratší vzdálenosti od objektu. Nejvyšší BI skóre poté získávají subjekty s nejnižším latentním časem vstupu do zón blízkosti a nejvyššími hodnotami času strávených v zónách a počtu návštěv (Brown a kol., 2007; Frost a kol., 2007; Jones a Godin, 2010; Dahlbom a kol., 2011; White a kol., 2013; Castanheira a kol., 2013; Molnár a kol., 2018; Gebauer a kol., 2021).

2.3.2.4. Ostatní typy testů

Mezi další metody determinace personality u ryb patří např. testy anti – predačního chování, které se zabývají stanovením schopnosti detekovat a uniknout potenciální hrozbě (měří se rychlost úniku v $cm.s^{-1}$ po expozici nebezpečí) predátorem či dokonce i přiblížení se k potenciálnímu zdroji ohrožení (vyjádřeno jako počet inspekcí) nebo ochotě vydat se za potravou i přes možnost ohrožení predátorem. Výstupní hodnoty jsou poté uváděny jako tzv. foragning time, který definujeme jako čas strávený aktivním vyhledáváním a konzumací potravy v přítomnosti predátora. V anti–predačních experimentech lze využít umělou atrapu, která testovaným subjektům substituuje predátora nebo je možné použít živého dravce

umístěného za průhlednou stěnou nádrže (Murphy a Pitcher, 1991; Peuhkuri, 1997; Ward a kol., 2004; Jones a Godlin, 2010; Lagesson a kol., 2019;).

Při zkoumání osobnosti ryb se také často vychází z úrovně agresivity, kterou lze kvantifikovat počtem útoků testovaného jedince na stimul (předmět, ryba) za čas nebo měřením doby pronásledování mezi jedinci tzv. chasing time (Bell, 2005, 2007).

Koncept kontinua plachý – odvážný nabízí možnost studovat nejen rozdíly v chování individuálních jedinců, ale také například rozdílné úrovně odvahy a plachosti v rámci pohlavního dimorfismu či v závislosti na velikosti nebo původu (Brown a Braithwaite, 2004; Benhaïm a kol., 2012; King a kol., 2013).

2.3.2.5. Význam personality u ryb

Korelace mezi individuálním chováním a funkčními kontexty (různé podmínky prostředí) lze také definovat jako behaviorální syndrom (Adriaenssens a Johnsson, 2013), který má evidentně významný vliv v evoluci, neboť dle tzv. hypotézy omezení jsou tyto syndromy výsledkem selekčního mechanismu (Bell, 2004; Sih a kol., 2004). V rámci behaviorálních syndromů může dojít i ke korelaci mezi dvěma typy chování např. odvážnost a agresivita s následným omezením a maladaptací novým podmínkám, což vede k vyřazení behaviorálního znaku z evoluce, neboť přírodní selekce upřednostňuje jedince s nejvyšší adaptabilitou ku konkrétním proměnlivým kontextům (Wilson, 1998).

Osobnostní aspekty odvážnosti a plachosti mohou mít významný vliv ve fyziologických projevech jako je celková fitness, růst, mortalita nebo rozmnožování (Oswald a kol., 2012). V první řade se nabízí dvě otázky. Za prvé, zda u zkoumaného druhu vůbec existuje kontinuum plachý – odvážný? A druhá otázka se zabývá tématikou korelací mezi osobnostním typem a ekologickým následky (Wilson a kol., 1993). Například v práci Warda a kol. (2004) byl pozorován větší přírůstek tělní hmoty u jedinců koljušky tříostné ze skupiny BI než u ryb SI během 6-týdenního experimentu. Jako příčinu lze uvést právě vyšší ochotu BI ryb zachovat se riskantně v rámci potravního zisku, což se projevuje aktivnějším vyhledáváním potravy s následným vyšším přírůstkem (Wilson a kol., 1994). Tento proaktivní přístup může zvýšit šanci jedince na přežití, právě díky větší pravděpodobnosti získání přístupu ke zdroji kvalitní potravy. Na druhou stranu jedinci se zvýšenou ostražitostí se sklony k bdělosti a odmítáním riskovat zvyšují svou šanci na přežití díky menší

pravděpodobnosti vystavení se nebezpečí (Dahlbom a kol., 2011). Avšak v intenzivním chovu ryb v RAS systému je přítomnost predátora vyloučena, z čehož plyne, že proaktivita u ryb se stává výhodou z hlediska přežití a přírůstku (Stamps, 2007; Kouřil a kol., 2013). Pozitivní korelaci mezi BI a vyšším příjmem potravy oproti SI jedinců u koljušky tříostné potvrzují i výsledky z experimentu Ioannou a kol. (2008). Nicméně odvážnost individuálních jedinců se zdá být variabilní v závislosti na kontextu. V některých studií se úspěšně podařilo diferenciovat typ osobnosti na SI a BI, nicméně při dalším zkoumání došlo k nalezení pozitivní korelace mezi odvážností a aktivním potravním chování, přičemž korelace s průzkumnickým chováním vykázala negativní tendenci (Wilson a Stevens, 2005; Ferrari a kol., 2014). Umístění jedince na škále kontinua plachý–odvážný se také může odrážet v jeho odpovědi na stresový podnět, kdy v případě pstruha duhového bylo zjištěno, že jedinci s nižší hladinou kortizolu v krvi po expozici stresovému podnětu vykázali chování odpovídající BI osobnostnímu typu (Øverli a kol., 2002; Oswald a kol., 2012). Podpoře této hypotézy odpovídají i skutečnosti vyplývající z inhibované exprese genů související se stressem, lepším růstem a menší produkcí kortizolu u BI exemplářů dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (Oswald a kol., 2012). Dále je popsána větší tolerance vůči stresu u BI zástupců pstruha duhového s lepší potravní adaptabilitou než u ryb s delším intervalem adaptování se na krmivo po expozici stresoru (Øverli akol., 2006). Větší odolnost vůči stresu u juvenilů lososa atlantského s vysokým skóre BI popisuje i Skov (2018), který uvádí 3 hodnotící kritéria: spotřeba kyslíku po stimulaci stresorem, čas zotavení a koncentrace kortizolu v krevní plasmě, přičemž výsledky pro všechny 3 kritéria vykázali největší toleranci vůči stresu právě u ryb BI oproti SI. Kontinuum plachý – odvážný se také odráží v tendenci sdružovat se v hejnech, kdy SI i BI jedinci koljušky tříostné vykazovali preference asociovat se více s BI rybami (Harcourt a kol., 2009). Na druhou stranu kontinuum plachý – odvážný může silně reflektovat efekt dominance, přičemž submisivní jedinci tak oproti dominantním rybám disponují sklony ke zvýšené hladině kortizolu v krvi, vedoucí ke snížení celkové fitness. U submisivních jedinců pstruha duhového byl např. popsán efekt inhibice růstu. Socio-behaviorální aspekty jako dominance podmíněná odvahou mohou také pramenit z fyziologických parametrů jako je např. velikost (Brown a Braithwaite, 2004; Di Battista, 2006; Dahlbom a kol., 2011).

Z dostupných informací tedy lze usoudit, že preference chovu ryb s odvážným typem personality může pozitivně ovlivňovat kvalitu chovu z hlediska přežití i růstu (Ward a kol., 2004; Dingemanse a Réale, 2005; Stamps, 2007; Ferrari a kol., 2014).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Cíl experimentu

V důsledku limitace tržního potenciálu okouna říčního jeho náchylností ke stressu a bakteriálnímu onemocnění *Aeromonnas* sp. bylo naším záměrem podrobit jedince okouna behaviorálnímu testu personality. Typologický cíl spočíval v diferenciaci na 2 typy osobnosti – proaktivní (BI) a reaktivní (SI). Po identifikaci osobnostních typů následovala druhá fáze testování, při které bylo naším cílem bylo popsat korelace mezi typem personality, stresovou tolerancí a imunologickou rezistencí vůči nákaze bakterií *Aeromonas* sp. za předpokladu lepší obranyschopnosti a tolerance u BI jedinců.

3.2. Design experimentu

Pro provedení experimentu byla nezbytná pečlivá příprava veškerého vybavení a zajištění jeho funkčnosti. Přípravy započaly s příchodem léta 2022. Nejprve bylo důležité zajistit prostory v podobě experimentální místnosti s omezeným přístupem, dále v ní postavit patřičný RAS systém viz. podkapitola níže. Následovalo plné vybavení místnosti potřebnou aparaturou spolu s vyškolením obsluhy a po těchto úspěšně splněných úkonech se mohlo začít se samotným experimentem, jehož trvání probíhalo během července, srpna a září 2022.

3.2.1. Ryby a RAS systém

Pro potřeby experimentu bylo získáno 1000 jedinců okouna říčního ze švýcarského intenzivního recirkulačního komerčního chovu. Ryby byly dopraveny do prostor FROV Husova třída v polyethylenových vacích s 30 % objemu vody a 70 % kyslíku. Po úspěšném transportu (mortalita 0 %) bylo třeba vysadit okouny do předem připraveného přechodného zaběhnutého RAS systému v dolním patře budovy (RAS 0), ve kterém ryby setrvaly před začátkem experimentu.

Dalším krokem bylo individuální značení jedinců, jehož bylo docíleno pomocí anestézie v koupeli s hřebíčkovým olejem při koncentraci 0,3 $ml.l^{-1}$ a manuální aplikaci PIT tag značky (7 x 1,4 mm, AB10320, Loligo Systems ApS) pomocí injektoru do škáry operkulární kosti v post-orbitální pozici. Kontrola funkčnosti značení probíhala pomocí speciální PIT tag čtečky HPR Lite (Biomark, Idaho, USA), která z označeného místa snímala čtyřmístný alfanumerický kód. Po označení byly ryby umístěny do desinfekční lázně s manganistanem draselným o koncentraci 0,1 $g.l^{-1}$, kde jim bylo umožněno zotavit se z anestézie (koupel 10 min) s následným přelovením do RAS 0. Průměrná hmotnost ryb se pohybovala okolo 20 g a celková délka těla (CD/TL) dosahovala přibližně 150 mm. Jednalo se o ryby ve věkové kategorii 2.-3. rok ($Oř_{2-3}$).

Obr. 4 Značení ryb PIT tag injektorem, foto: T.Gebauer

Obr. 5 Čtení alfanumerického kódu, foto: T.Gebauer

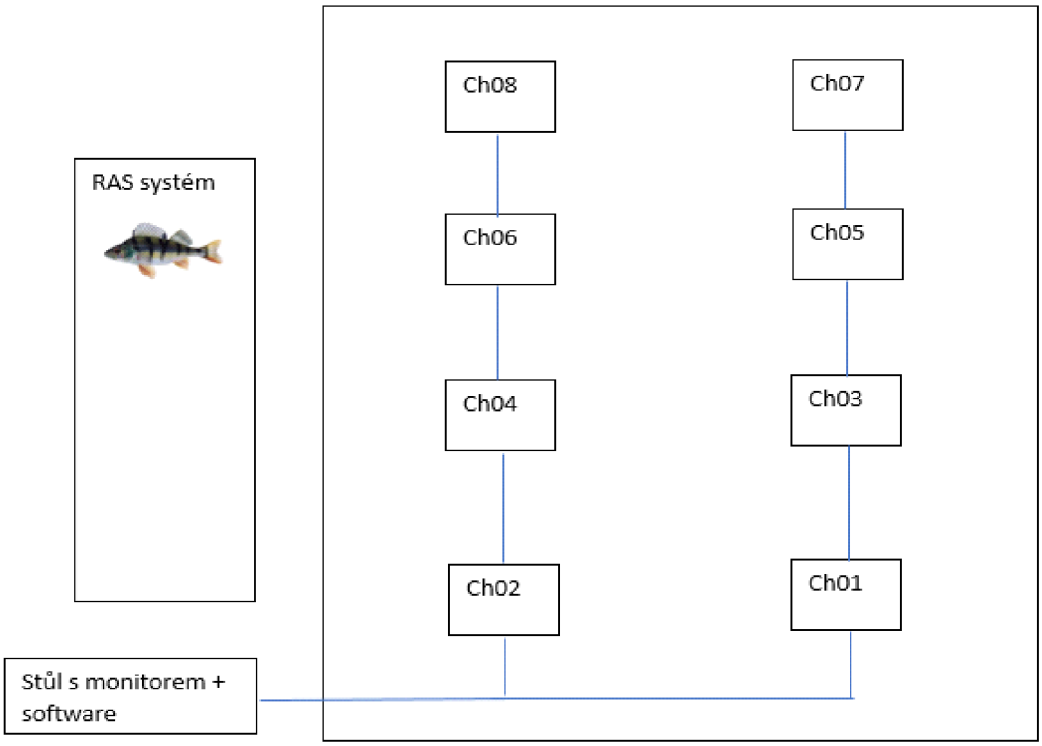
Pro bezpečné přechování ryb během experimentu bylo nutné postavit dostatečně funkční dočasný RAS systém (RAS 1) přímo v experimentální místnosti. Základem pro jeho konstrukci se stal třípatrový kovový regál s požadovanou stabilitou a nosností, jehož celková délka dosahovala 6 m a výška 3 m. Pod spodní patro regálu byly umístěny 3 propojené obdélníkové nádrže (200 x 150 cm x 50 cm) jako mechanický filtr, který byl naplněn přibližně 1 m^3 hrubého bioakvacitu (PPI10). Do jednoho z rohů bylo umístěno kalové vodní čerpadlo (6 $m^3.h^{-1}$) a zbytek volného prostoru byl vyplněn nitrifikačními elementy. První patro regálu posloužilo jako nosič pro 6 (A-F) obdélníkových chovných nádrží (300 l) s proskleným čelem a kónickým odkalovacím systémem. Do druhého patra byl umístěn přítokový žlab s jedním výtokem pro každou chovnou nádrž. Do patra nejvyššího byly umístěny 2 identické nádrže jako v mechanickém filtru, avšak byly naplněny cca 1 m^3 nitrifikačních elementů. V posledních krocích bylo propojeno čerpadlo s horním biofiltrem, ze kterého voda stékala gravitačně do přítokového žlabu a do chovných nádrží, ze kterých byla shromažďována pod spodním patrem v mechanickém filtru. Na závěr došlo k instalaci rozvodných hadiček ze vzduchového kompresoru (80 W), jenž pomocí vzduchovacích kamenů umožnil okysličovat biofiltr na potřebou koncentraci pro nitrifikaci (< 4$mg.l^{-1}$ O_2).

Po úspěšném zaběhnutí (14 dní) biologického filtru bylo možné rozdistribuovat ryby do jednotlivých chovných nádrží a začít 10denní aklimatizaci. Ryby byly umístěny do 3 z 6 (A-C) chovných nádrží, aby bylo možné separovat testované jedince od netestovaných. Během procesu byl kladen důraz na denní kontrolu fyzikálně-chemických parametrů vody jako nasycení O_2, pH a teplota stejně jako hydrochemických ukazatelů koncentrací NO_2^- a NH_3. Detailní obsluha RAS bude popsána v kapitole 3.3.3. Obsluha experimentální místnosti.

3.2.2. Vybavení experimentální místnosti

K dispozici nám byla nově zrekonstruovaná obdélníková místnost o rozměrech přibližně 20 x 7 m. Podlaha byla zhotovena z gumového nepropustného materiálu, neboť předpokladem pro provedení experimentu byla neustála manipulace s velkým množstvím vody. Z toho důvodu se v podlaze nacházeli odvodní otvory o průměru cca 20 cm zajištěné mřížkou. Podlaha byla schválně vyspádována v nepatrném sklonu k těmto otvorům, aby případná vylitá voda bezproblémově místnost opustila a zamezilo se tak riziku vytopení místnosti.

Následně jsme pokračovali montáží kamerového systému do stropu místnosti. Celkem bylo pomocí aku-šroubováku připevněno na strop 8 kamer (DS-2CD2043G0-I, Hikvision, Hangzhou, Čína), jejichž čočky směřovali kolmo se stropem dolů na podlahu. Zorné pole jedné kamery odpovídalo přibližně $3m^2$ místnosti. Dále byl sestaven počítačový systém pro natáčení. Základem se stal nerezový stůl 2 x 1 m, na který byl umístěn monitor a počítač jenž obsahoval software pro snímání ze všech 8 kamer. Pomocí síťových kabelů došlo k propojení počítače s kamerami a přes HDMI kabel bylo možné projektovat zorná pole kamer na monitoru viz Obr. 6.

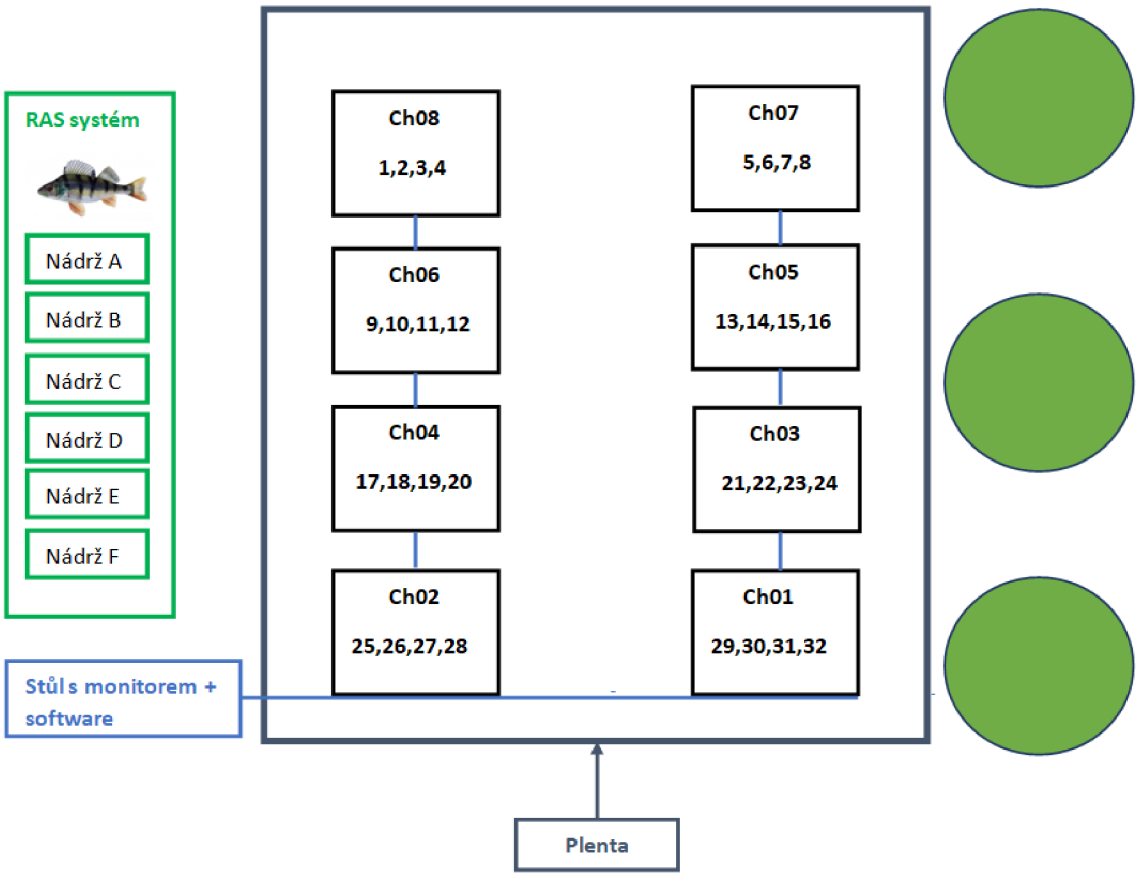


Obr. 6 Schéma rozložení RAS, kamer (Ch01-08) a stolu s monitorem v experimentální místnosti, síťové kabely modře

Po zapojení aparatury pro natáčení přišlo na řadu rozmístění natáčecích experimentálních nádrží. Pro natáčení byly použity obdélníkové nádrže bílé barvy o rozměrech 73,5 x 50 x 45 cm (délka x šířka x výška). Vzhledem k počtu instalovaných kamer, šířce zorného pole kamerové čočky a naší snaze maximalizovat efektivitu natáčení se nám podařilo do jednoho zorného pole umístit 4 natáčecí nádrže, tedy bylo možné provést natáčení 32 nádrží najednou, přičemž jedna nádrž pojala jeden testovaný subjekt. Každá z natáčecích nádrží byla označena číslem 1-32, ryskou indikující objem 100 l a křížkem ve středu stěny dna.

Abychom byli schopni eliminovat vliv vnějších činitelů jako např. nečekaný vstup do místnosti nebo nezbytný pohyb personálu během natáčení, ohraničili jsme celý natáčecí prostor bílou plentou, která se pomocí kolíčků dala roztáhnout či opět srolovat dle potřeby. Posledním důležitým komponentem experimentální místnosti se staly zásobníky na vodu v podobě zelených zahradních sudů (450 l) do nichž se napouštěla vodovodní voda přes uhlíkový filtr.

Obr. 7 Natáčecí nádrže za plentou před počátkem natáčení, foto: Jan Černý



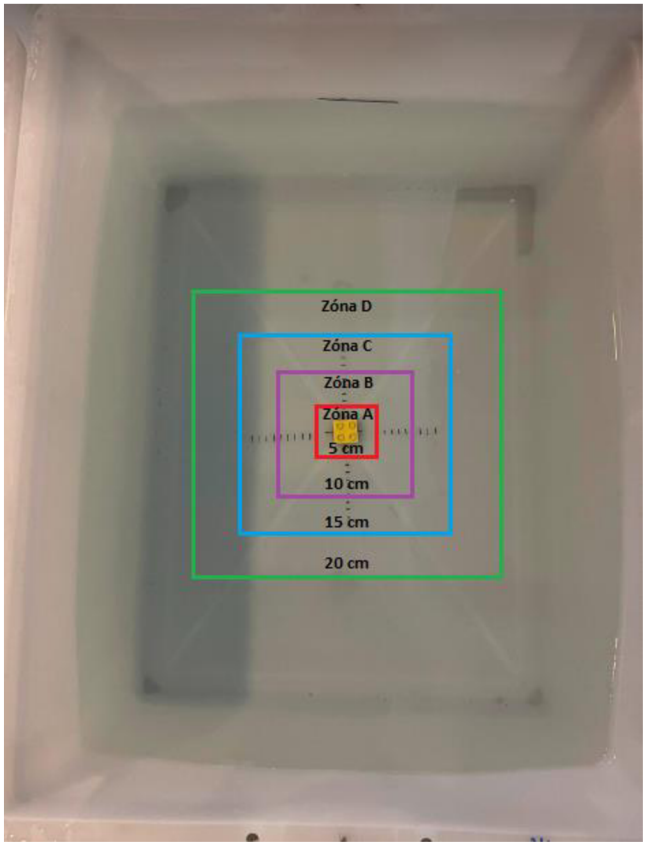
Obr. 8 Finální schéma experimentální místnosti se všemi komponenty, č.1-24 = čísla natáčecích nádrží, Ch01-08 = čísla kamer, zelené kruhy = zásobníky vody

3.2.3. Behaviorální testy

První tzv. OF, je test, při kterém bylo naším záměrem otestovat především pohybovou aktivitu pozorovaných jedinců, během empiricky zvoleného časového intervalu ve 100 l natáčecích nádržích. Po 12 h aklimatizaci v bílých natáčecích nádrží za zataženou plentou započalo natáčení spuštěním kamer od monitorovacího stolu po dobu 30 min. Pokud došlo u personálu ke zpozorování negativního efektu vnějších vlivů jako např. silné zabouchnutí dveří nebo křik ve vedlejší místnosti, jenž mělo za následek poplašení ryb, natáčení bylo ukončeno a spolu s 30 min. aklimatizací bylo nutné proces opakovat. Pokud bylo natáčení deklarováno jako úspěšné bez negativních vlivů na vypovídající hodnotu testu, bylo možné natáčení jedním klikem od počítače ukončit společně s automatickým uložením videí do

paměti hardwaru. Výstupní hodnotou testu pro nás byl počet cm uplavaných jednou rybou během 30 min. intervalu viz. kapitola 3.4. Vyhodnocení behaviorálních testů.

Na OF ihned navazoval druhý typ tvz. NO test. Účelem tohoto testu bylo determinovat aspekty chování jako je odvaha a zvědavost na nově přidaný objekt do nádrže. Jako nový objekt pro zkoumání byl zvolen žlutý Lego bloček o rozměrech 2x3 cm. Jeho umístění do středového křížku nádrže bylo docíleno pomocí 90 cm dlouhých kleští na odpadky skrz malé štěrbinovité otvory v plentě natáčecího prostoru. Tato metoda umožnila personálu uložit Lego bloček zpoza plenty, aniž by byl rybami zpozorován, nicméně samotná přítomnost kleští v prostoru nádrže dokázala některé okouny poplašit. Proto bylo nezbytně nutné poskytnout rybám 30 min. aklimatizace po instalaci nových objektů do nádrží. Jakmile byl proces přizpůsobení novým podmínkám ukončen, bylo možné přejít opět k natáčení, které v tomto typu testu dosahovalo délky 60 min. Podmínky pro prohlášení úspěšného natáčení setrvaly identické jako v přechozím testu. Jako výstup testu jsme identifikovali 2 hodnoty: latentní čas strávený v čtvercových zónách blízkosti (5,10, 15 a 20 cm) od Lego bločku a počet návštěv jednotlivých zón.



Obr. 9 zóny blízkosti nového objektu, foto: T.Gebauer

3.2.4. Obsluha experimentální místnosti

Denní povinnosti personálu spočívaly v natáčení, pravidelné údržbě rybochovného zařízení a přípravě místnosti pro následující pracovní den. Vzhledem k počtu testovaných subjektů 1000 ks a denní natáčecí kapacitě 32 ks.den^{-1} bylo třeba věnovat natáčecí části experimentu 32 dní. Práce probíhala každý pracovní den, jenž byl rozdělen na ranní, odpolední a večerní třetinu.

Ranní třetina práce započínala v 8:00 příchodem personálu do experimentální místnosti a zpuštěním natáčecích sekvencí obou po sobě jdoucích behaviorálních testů, jejichž časový interval byl vymezen od 8.00 do 10.00. Díky distribuci 4 nádrže.kamera^{-1} obdržel personál na konci testů celkem 16 videí z jednoho dne. Nahrávky byly z hardwaru překopírovány na pomocný externí disk a ihned docházelo k jejich kopírování a zálohování. Po bezpečném uložení a kontrole vytěžených dat se přistoupilo k demontáži ochranné plenty, odstranění s vysušením Lego bloků a přelovení otestovaných subjektů pomocí akvaristické síťky do druhé

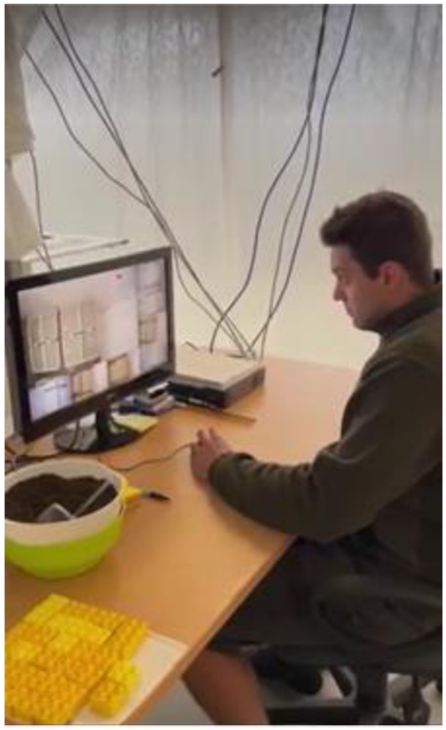
poloviny chovných nádrží RAS 1 (D-F). Posledním úkonem první části dne bylo odkalení systému RAS, které umožňovaly kónické výpusti chovných nádrží, jejichž vyústění směřovalo do instalovaného odtokového žlabu, kterým znečištěná voda odtékala do odpadní díry zabudované v podlaze. Účelem odkalení bylo především zbavení se exkrementů a zbytků krmiva, jenž negativně ovlivňují kyslíkovou bilanci v nádrži jeho spotřebou. Vypuštěním cca 1000 l vody ze systému a následným připuštěním stejného množství vody z vodovodního řadu také došlo k naředění koncentrací odpadních produktů dusíkatého metabolismu ryb NH_3^- a NO_2^-.

Během odpolední fáze bylo úkolem obsluhy provést měření fyzikálně chemických parametrů vody (T°, pH, O_2) pomocí multimetru HQ40D (Hach Lange, Německo) v 5 náhodných natáčecích nádržích, pro vyloučení impaktu neoptimálních či kolísavých parametrů vody na chování ryb, a tudíž vypovídající hodnotu testu. Stanovení zmíněných parametrů multimetrem bylo prováděno i ve všech nádržích systému RAS spolu s odběrem vzorků vody pro zjištění koncentrací anorganických dusíkatých látek metabolismu ryb pomocí hmotnostní spektrofotometrie. Mezi základní úskalí údržby systému patřily snížené hodnoty pH (pod 6,4) v důsledku probíhající nitrifikace, které bylo třeba řešit dodáním hydrogenuhličitanu sodného pro stabilizaci pH. Dále bylo možné setkat se s koncentrací dusitanových iontů nebezpečně se přibližující letální hodnotě pro okouna říčního 11 $mg.l^{-1}$ NO_2^- (Kroupová a kol., 2013), která byla zredukována přidáním chloridu sodného za využití kompetičního mechanismu dusitanů s chloridy. Po údržbě a případné optimalizaci funkčnosti RAS systému bylo nutné zbavit použité natáčecí nádrže vody pomocí speciálního vodního vysavače, jenž pomocí hadic a výkonného elektro-motoru odsál vodu z jedné nádrže do kanalizace během jedné minuty. Další krok spočíval v naplnění natáčecích nádržích čistou vytemperovanou vodou ze zásobních sudů pomocí zahradního kalové čerpadla (Easy CW 200, Neptun). Nejdéle trvající činností odpolední fáze bylo napouštění zásobních sudů z vodovodního řadu přes speciální tlakovou láhev upravující parametry vody. Odpolední fázi zakončovalo ruční krmení ryb *ad libitum* pomocí komerčního granulovaného krmiva (Coppens, Supreme 10).

Večerní třetina práce se soustředila na přípravu ryb a místnosti pro následující den natáčení. Počátečním krokem bylo nasazení ryb z nádrží RAS (A-C) a umístění do napuštěných natáčecích nádrží spolu s přečtením individuálního PIT tag kódu pomocí čtečky.

Tak byla obsluha schopna zaznamenat do distribučního protokolu číslo natáčecí nádrže spolu s patřičným kódem umístěné ryby. Nezbytnou součástí procesu bylo opětovné měření parametrů multimetrem v natáčecích nádržích. Hodnoty se běžně pohybovali ve škálách 18-19 °C, pH 6,8-7,2, koncentrace O_2 85-100% nasycení, což při naměřené teplotě odpovídá 8-9 $mg.l^{-1}$ O_2 a podle Policara a kol. (2009a; 2014b) se jedná o optimální hodnoty parametrů pro chov okounovitých ryb. Po těchto úkonech mohla obsluha spustit ze stropních nosníků krycí plentu a započít tak 12h trvající aklimatizaci, která byla ukončena následující den ráno, kdy na personál čekala kompletně připravená experimentální místnost s detailními záznamy o kvalitě vody a distribuci ryb v nádržích před počátkem natáčení. Rozvržení pracovního dne bylo následovné:

1. Natáčení 8:00 – 10:00
2. Úschova dat 10:00 – 10:05
3. Demontáž natáčecí části 10:05 – 10:30
4. Odkalení RAS + kontrola parametrů vody 10:30 – 11:30
5. 11:30 – 12:00 Pauza na oběd
6. Výměna vody v natáčecích nádržích + naplnění zásobníků vody 12:00 – 15:00
7. Krmení ryb 15:00 – 15:05
8. PIT tag determinace + distribuční protokol + vysazení ryb do natáčecích nádrží 19:00 – 19:30
9. Montáž natáčecí části 19:30 – 19:45



Obr. 10 Spouštění natáčecí sekvence, foto: T.Gebauer

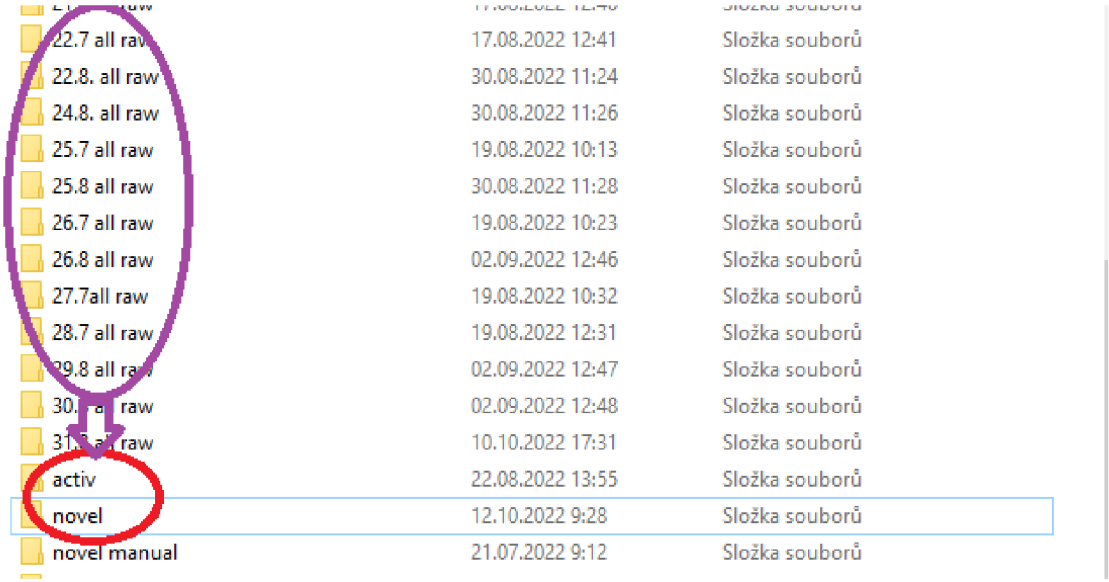
3.3. Vyhodnocení behaviorálních testů

Tato kapitola se zabývá detailním popisem procesu vygenerování potřebných informací o chování testovaných subjektů během behaviorálních testů popsaných v předchozí kapitole. Z pouhého videozáznamu nelze odečíst žádané informace pouhým okem, ale bylo nezbytné podrobit video analýze speciálním softwarem, z něhož jsme extrahovali finální hodnoty. Konkrétně pro OF se jednalo o aktivitu (počet cm uplavaných rybou během 30 min. intervalu ve 100 l nádrži bez překážek) a v NO bylo úsilí soustředěno na tzv. exploratorní chování v přítomnosti nového objektu v nádrži (latentní čas strávený v zónách blízkosti od nového objektu a počet návštěv jednotlivých zón). Výsledky obou testů posloužili k indikaci typu personality, kdy jedinci s nejvyšší aktivitou a exploratorním chováním byli determinováni

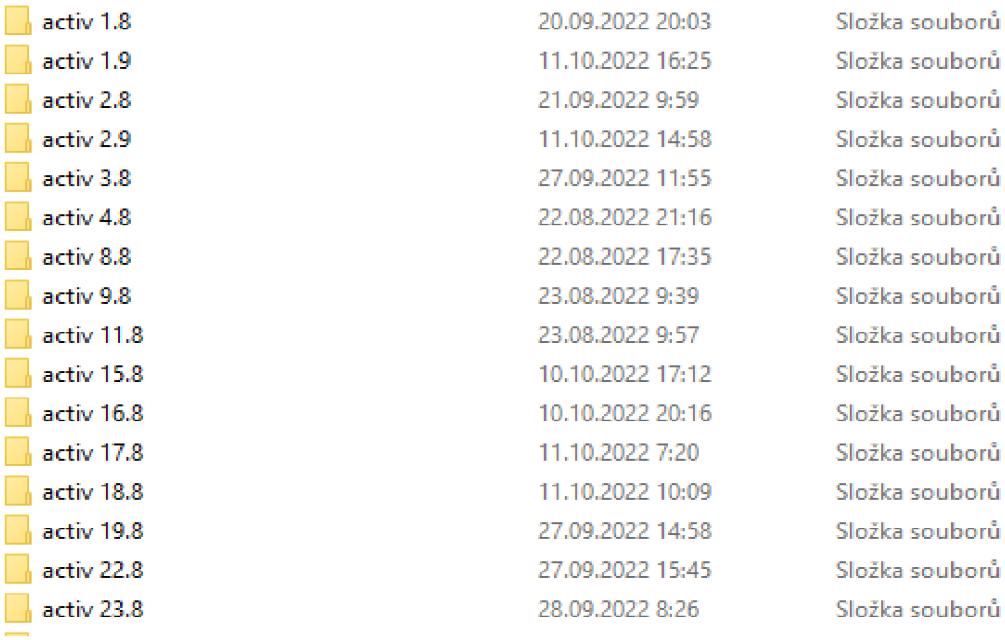
jako BI a jedinci bez odezvy naopak zaujali pozici v kategorii SI. Nicméně mezi hrubým videozáznamem a typologickou kategorizací se nacházelo mnoho nejednoduchých úkolů.

3.3.1. Diferenciace a kódování videa

16 hrubých neupravených (neroztříděných, nepojmenovaných, neostřižených) video souborů.den^{-1} ve formátu mp4 bylo zkopírováno z počítače v experimentální místnosti neprodleně po ukončení natáčení na přenosný externí disk a zálohováno. Software experimentálního počítače ukládal videa podle čísla kamery a data natáčení, v praxi název hrubého video souboru vypadal následovně: Ch01xxxxxxx1982022. Proto prvotních 16 souborů bylo uloženo bez diferenciace do složky nesoucí pouze datum v podobě: date.ALL RAW. Nejprve bylo důležité rozlišit 16 souborů podle typu testu, tedy na OF a NO. K tomu posloužila prostá znalost velikosti souborů v MB, kdy soubory s prvním typem testu vykazovali přibližně 2x menší počet MB než NO. Po této primární diferenciaci bylo nepojmenované video uloženo do složky podle typu testu a data natáčení, v praxi lze proces popsat jako post-diferenciační přesun videí ze složek ALL RAW do primárních složek ACTIV či NOVEL viz Obr. 11.



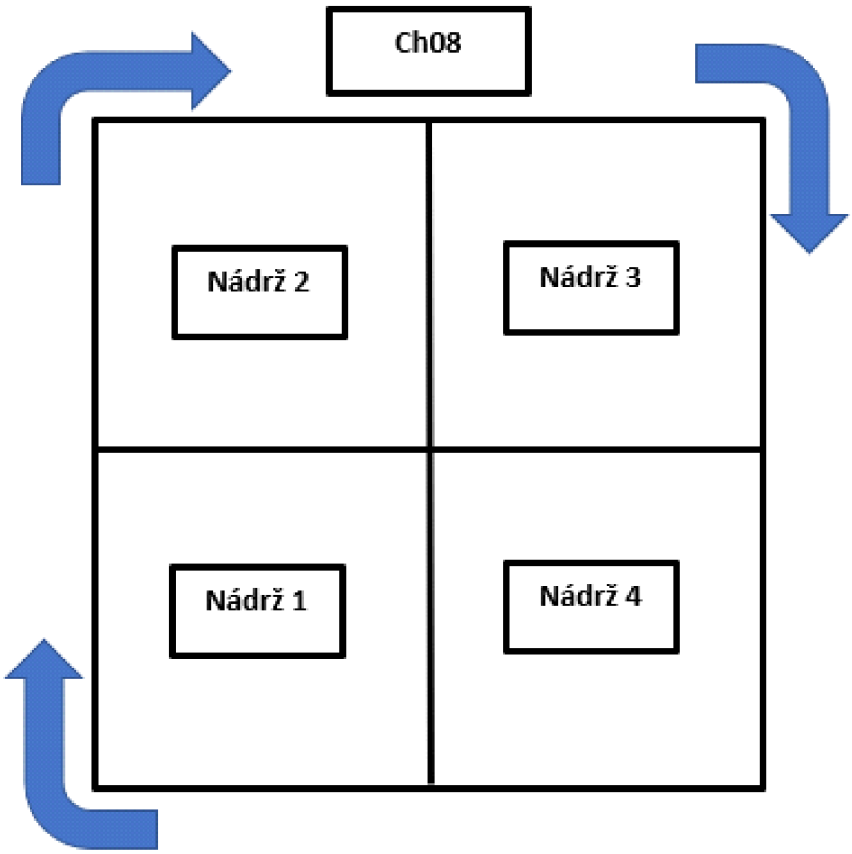
Obr. 11 Primární diferenciace na základě typologie testu a data, foto: Jan Černý



Obr. 12 Příklad sekundárních složek, kdy každá obsahuje 8 videí z 1 dne a 1 typu testu, foto: Jan Černý

Ve složkách ACTIV a NOVEL bylo následně vytvořeno 32 složek pro každý den natáčení. V praxi se tedy každá ze dvou primárních složek skládala ze 32 složek sekundárních viz Obr. 12. Pro úsporu místa je zde uveden pouze omezený počet sekundárních složek.

Vzhledem k faktu, že na 1 jednom videu se nacházel záznam s 4 nádržemi najednou, bylo velmi žádoucí opatřit video speciálním kódem pro rozlišení jednotlivých subjektů. K tomu byl využit již zmíněný distribuční protokol z večerní fáze pracovního dne, jenž obsahoval číslo natáčecí nádrže spolu s PIT tag kódem testovaného jedince. Další pomůckou pro pojmenování videa kódem se stal tzv. rotační vzorec, jenž posloužil dále v práci i pro analýzu v softwaru. Rotační vzorec byl nástrojem pro kódový název videa z hlediska pořadí jednotlivých jedinců, aby vznikla možnost bezpečně se orientovat ve velkém množství dat. Pravidla vzorce spočívala v ustálení pořadí PIT tag kódů 4 jedinců na jednom videu: **1. levá spodní nádrž, 2. levá horní, 3. pravá horní, 4. pravá dolní.**



Obr. 13 Rotační vzorec

Název videa tedy vychází z původního označení (číslo kamery + datum), primární diferenciace (typ testu), distribučního protokolu (PIT tag) a rotačního vzorce (pořadí značek). S těmito informacemi bylo možné vytvořit kódový název, dle kterého bylo snadné ihned deklarovat, kteří jedinci se v jaké nádrži nacházeli. Bez těchto úprav by následná analýza byla kompletně znemožněna.

Finální kód videa = číslo kamery, PIT tag 1, PIT tag 2, PIT tag 3, PIT tag 4, datum, typ testu

Praktická ukázka kódu = Ch08_4567_5678_4789_4376_1872022_OF

3.3.2. Střihání videa

Video opatřené kódem bylo distribuováno zpět do sekundární složky do nově vytvořené podsložky RAW (videa s kódem bez úpravy délky trvání). Dále se sekundární složka skládala z dalších dvou nových podsložek CUT a RESULTS.

Vzhledem k manuální aktivaci i ukončení natáčecího procesu se nikdy nepodařilo vytvořit soubor o přesně požadovaném časovém intervalu nýbrž s odchylkami v řádech několika sekund až minut. Soubory byly tedy vždy delší než stanovená doba testu. K jejich úpravě na cílovou časovou délku bylo docíleno pomocí zadarmo staženého programu na střihání videa Handbrake 4.0. Do programové fronty bylo možné nahrát neomezený počet souborů, střižna tedy mohla plnit svou funkci i přes noc. OF videa byla zkrácena na 30 min a (NO videa) na 60 min. Úprava délky trvání videa pro nás byla klíčová především pro přechod do další fáze v podobě analýzy behaviorálních testů. Výstupem tohoto procesu tedy bylo video plně připravené k analýze tzn. opatřené unikátním kódem s požadovanou délkou. Uložení videa proběhlo v sekundární složce do podsložky CUT.

3.3.3. Analýza testů

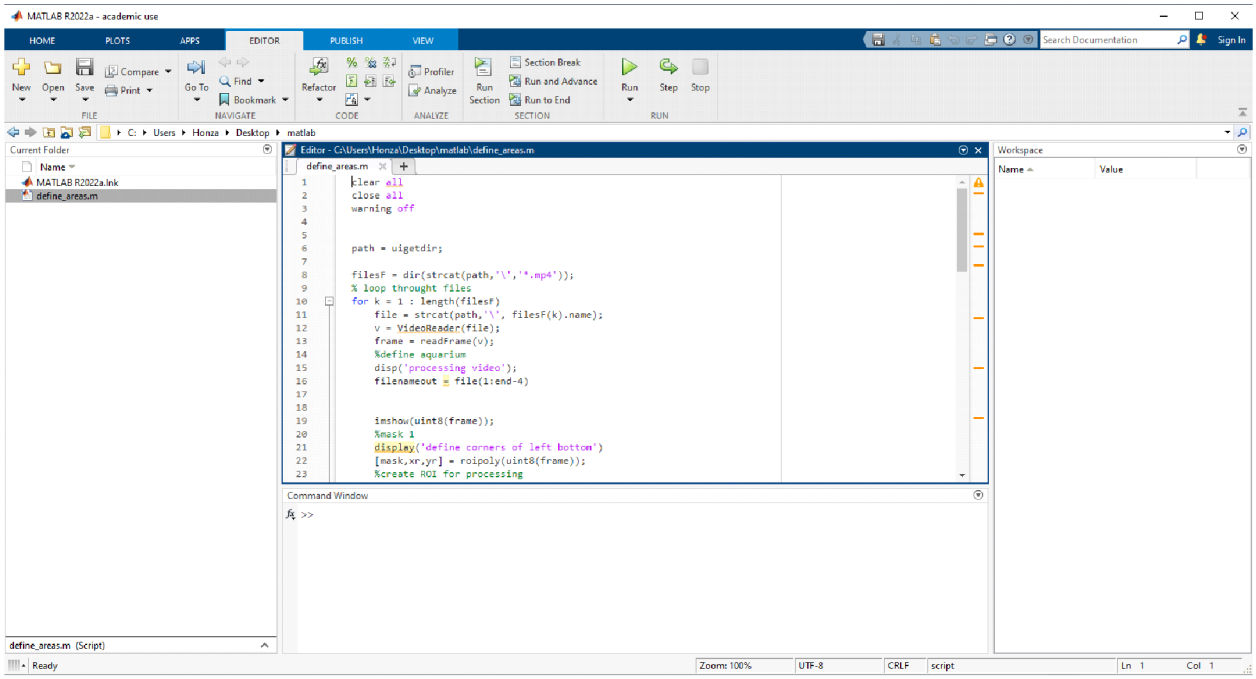
Vyhodnocení testů zaměřených na chování ryb bylo dosaženo díky odborné konzultaci s Ing. Petrem Císařem PhD. (Ústav komplexních systémů, Laboratoř zpracování signálu a obrazu), který nám umožnil přístup do univerzitního clusteru (počítače), vědeckého interaktivního programu MatLab a neváhal pro naše potřeby navrhnout 2 determinační a 2 vyhodnocovací programy, jež umožnili kvantifikovat námi požadované hodnoty.

V první řadě bylo pro personál správy videa nutné podstoupit školení v Nových Hradech, které mělo za účel seznámení s detailním postupem analyzování souborů. Ihned poté došlo po mailu k obdržení odkazů pro instalaci programů a aktivaci licence na vlastním zařízení obsluhy. Email obsahoval programy ke stažení: Matlab + přístupové kódy s licencí, Anydesk pro vzdálenou spolupráci na univerzitním počítači (clusteru), define arenas OF + NO a process data OF + NO. V tomto případě si konkrétně ukážeme, jak se postupovalo při analýze OF testu.

3.3.3.1. Definování arén

Základním pilířem úspěšné analýzy testu personality se stal program Matlab, jehož otevření znamenalo první krok celého pracovního procesu. Funkce interaktivního prostředí Matlabu lze popsat jako velmi variabilní, přičemž při našem experimentu posloužilo jako prostor, ve kterém bylo umožněno operovat s jinými pro naše účely navrženými programy.

Po otevření portálu Matlab bylo nejprve nutné pomocí nabídky v levém sloupci zvolit program pro tzv. definování arén dle typu testu, proto pro naše účely v případě OF testu bylo žádoucí otevřít program Define arenas OF. Tento program sloužil jako nástroj k vymezení prostoru, ve kterém se testovaný subjekt pohyboval. Program byl aktivován pomocí zeleného tlačítka RUN v horní nabídce funkcí Matlabu, což automaticky způsobilo zobrazení průzkumníka souborů vlastního zařízení s možností vybrat složku s připraveným videosouborem. Díky pečlivé distribuci videí do sekundárních složek s jejich podsložkami (RAW, CUT, RESULTS) bylo možné bezpečně se proklikat přes distribuci složek až k požadovanému datu testu a nahrát do programu všech 8 připravených videí z podsložky CUT. Při jedné analýze se tedy dala vyhodnotit aktivita u 32 jedinců najednou.



Obr. 14 základní nabídka programu Matlab, otevřený program Define arenas, aktivační zelené tlačítko RUN, foto: Jan Černý

Navazující fází bylo tzv. definování arén, které bylo automaticky zobrazeno v oknu Matlabu po zvolení požadované podsložky z jednoho konkrétního dne. Program vyobrazil screenshot z první kamery se 4 natáčecími nádržemi, konkrétně v případě kamery 1 se jednalo o nádrže č. 29, 30, 31 a 32. Vzhledem k tomu, že program nedokázal rozeznat čísla nádrží z pouhého screenshotu, byly jsme nuceni požádat autora programu, aby nastavil

řadovou posloupnost pro všechny 4 nádrže, abychom byli schopni eliminovat možnost záměny dat s nepatřičnou nádrží. K tomu nám opět posloužil již zmíněný rotační vzorec, jehož pravidlo posloupnosti bylo do programu zakomponováno.

Při definování arén bylo úkolem obsluhy vymezit dvourozměrný obdélníkový prostor pomocí kurzoru prostým okopírováním 4 hran nádrže. Hlavním a jediným kritériem této fáze bylo již zmíněné pořadí. Personál byl tedy zmocněn k definování arén podle rotačního vzorce: 1. levá dolní, 2. levá horní, 3. pravá horní, 4. pravá dolní. Po označení všech 4 arén na jednom screenshotu automaticky došlo k zobrazení screenshotu z následující kamery. Po nadefinování všech 32 arén se program automaticky ukončil a uložil data ve formátu mat. do původní podsložky CUT.

Jediný rozdíl v definování OF a NO arén spočíval v označení nového objektu pomocí prostého kliku, čímž byla lokalizována středová poloha lego bloku, od které program automaticky odečetl nastavené vzdálenosti a vytvořil tak zóny blízkosti objektu.

Obr. 15 definování arén, foto: Jan Černý

3.3.3.2. Zpracování dat

V závěrečné fázi personalisticky-typologické části experimentu bylo naším cílem zpracovat a vyhodnotit informace, jež jsme po celou dobu snažení shromažďovali. K tomu bylo zapotřebí programu Process data OF/NO a univerzitního clusteru s přístupem přes

software Anydesk. Prvním krok spočíval v přihlášení do Anydesku a vytvoření nové složky ACTIV. Nejdůležitějším prvkem práce bylo uvědomění si reality, že Anydesk fungoval jako prostředí jiného pevného zařízení, než je vlastní počítač obsluhy. Proto ze všeho nejdříve bylo nutné překopírovat všechna data, jež byla získána při definování arén z vlastního zařízení do složky ACTIV v Anydesku. Další postup byl téměř identický s přechozím počínáním při definování arén, tedy v prostředí Anydesku bylo nutné otevřít Matlab a v něm spustit program Process data OF pomocí tlačítka RUN a vybrat soubory ze složky, kterou jsme chtěli zpracovat. Rozdíly oproti definování arén tedy spočívaly přirozeně ve výběru jiného programu (Process data OF) a výběru cílové složky, kterou v tomto případě byla složka ACTIV na zařízení Anydesk.

Díky kontrastnímu rozdílu barev testovaných subjektů a natáčecí nádrže dokázal program Process data OF lokalizovat rybu a vykreslit její dráhu pohybu. Jako výstup programu byly identifikovány dva typy souborů, jeden ve formátu png., který nám poskytl obrázek s trajektorií (Obr. 16,17) která byla rybou uplavána a druhý txt. soubor kvantifikoval její trajektorii vyjádřenou v jednotkách pixelů. Pomocí jednoduché metody kalibrace byly pixely převedeny na cm a následně zaznamenány do výsledkové tabulky v excelu, kde byl počet cm uplavaných jednou rybou za 30 min deklarován jako aktivita.

V případě NO testu byla metoda zpracování dat identická jako u OF testu, avšak výstupem programu Process data NO se stal txt. soubor obsahující informace nikoliv o aktivitě, nýbrž o nebojácnosti přiblížit se novému objektu, prozkoumávat jeho okolí a setrvat v něm. Tyto informace pro nás byly vyjádřeny pomocí hodnotících parametrů: latentní čas setrvání v zónách blízkosti nového objektu a počet návštěv jednotlivých zón.

Obr. 16 a 17 trajektorie BI jedince s vysokou aktivitou (vlevo), trajektorie SI jedince s nízkou aktivitou (vpravo) foto: Jan Černý

3.4. Testování stresové tolerance

Po stanovení typů personality bylo 20 jedinců s nejlepším BI skóre a 20 nejvíce SI jedinců podrobeno indukčnímu stresovému testu. Ryby byly v testovací nádrži aklimatizovány přibližně měsíc před začátkem testu. Princip testu spočíval ve stresové stimulaci v podobě snížení hladiny v nádrži na úroveň 5 cm nad vrcholem paprsku dorzální ploutve po dobu 30 min. Poté byla hladina opět navrácena do původního stavu. Pomocí anestezie (MS-222, 20 $\mu g.l^{-1}$) byl subjektům odebrán vzorek krevního séra heparizovanou jehlou Omnifix-F Solo z kaudální tepny ve čtyřech časových bodech: 1. před stimulací (kontrola) a poté 30 min, 12 a 24 h po navrácení hladiny do původního stavu. Ryby byly odběrech ponechány 7 dní v aklimatizaci před další fází testování. Vzorky krevní plazmy byly až do analýzy uchovány v -80 °C. Ve vzorcích bylo hlavním cílem popsat fyziologické krevní parametry jako aktivitu enzymů alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST), alkalické fosfatázy (ALP), laktát dehydrogenázy (LDH) a koncentraci glukózy, osmolytů a kortizolu, které slouží jako indikátor stresové odpovědi organismu. Stanovení bylo zprostředkováno pomocí analyzátoru Abbott Architect 8000. Koncentrace kortizolu v krvi byla vyhodnocena přes Immulite 2000 Xpi analyzátor.

3.5. Testování imunologické rezistence

Celkem 30 jedinců (15 BI a 15 SI) bylo injikováno do peritoneální dutiny 100 µl suspenze obsahující inaktivovanou bakterii *Aeromonas* sp. Dalších 6 ryb (3 BI a 3 SI) bylo injikováno pomocí 100 µl sterilního PBS pufru jako negativní kontrola. V intervalech 1, 3 a 7 dní po injikaci byly u 15 jedinců z každé skupiny (5 ryb.skupina^{-1}.den^{-1}) izolovány buňky z *pronefros* (tzv. hlavová ledvina), jater, sleziny a peritonea. Vzorky buněk byly uloženy v 700 µl RLT pufru až do extrakce RNA. Cílem testování bylo zkoumat expresi genů kódujících imunitu a jejich markery IL-1B, IL-6, CXCL8, TNF, IL10, IFNG, SAA a IMG. Úroveň exprese genů reflektuje schopnost individuálního adaptivního imunitního systému odpovědět na stimulaci nákazou *Aeromonas* spp.

Pomocí softwaru Pyrosequencing Assay Design (verze 1.0.6; Biotage, Švédsko) byl vytvořen panel testů specifických pro 46 imunitně relevantních genů (Tabulka 1). Testy s dvojicemi primerů cílových genů a referenčních genů *actb* a *rna18s* byly testovány před měřením, aby se ověřila správná amplifikace fragmentů cílových genů pomocí systému LightCycler 96 (Roche, Mannheim, Německo) v doplňku se sadou SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline/Meridian Bioscience, Německo). Analýzy křivky tání a elektroforéza na agarosovém gelu potvrdily amplifikaci specifických produktů PCR s cílovou délkou (Tabulka 1).

Celková RNA z hlavové ledviny (n = 5 ryb na skupinu) byla extrahována pomocí 1 ml činidla TRIzol (Thermo Fisher Scientific) a následně přečištěna pomocí sady RNeasy Mini Kit (Qiagen). Pro izolaci celkové RNA z peritoneálních buněk byla použita souprava ISOLATE II RNA Micro Kit (Bioline/Meridian Bioscience). Zbytková DNA byla štěpena pomocí DNázy I bez RNázy (Qiagen, Německo) po dobu 12 minut při 37 °C. Koncentrace a čistota extrahované RNA byla hodnocena pomocí spektrofotometru NanoDrop OneC (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). Celková RNA byla upravena na koncentraci 10 ng/µl, z níž byl 1 µl reverzně transkribován (42 °C, 30 min) pomocí Reverse Transcription Master Mix (Standard BioTools, Kalifornie, USA). Výsledné alikvoty cDNA byly smíchány s výše uvedenými páry primerů (100 µM) a hlavní směsí PreAmp (Standard BioTools) a jednotlivě preamplifikovány ve 13 cyklech (95 °C, 15 s; 60 °C, 4 min) v termocykleru TAdvanced (Biometra). Po tomto předamplifikačním kroku byla přidána exonukleáza I (New

England BioLabs) k degradaci jedno-řetězcových oligonukleotidových primerů. Po 30minutové inkubaci při 37 °C bylo přidáno 43 µl TE pufru (Sigma) na vzorek. Analýzy multiplexní kvantitativní PCR (qPCR) byly provedeny na dvou biočipech 48.48 Gene Expression (Standard BioTools) pomocí systému BioMark HD (Standard BioTools). Nejprve byl každý z výše uvedených vzorků 50 µl DNA naředěn v SsoFast EvaGreen Supermix s nízkým obsahem ROX (Bio-Rad) a 20×DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Standard BioTools), aby se vytvořily směsi vzorků. Po primování biočipů (48pb) v MX Controlleru (Standard BioTools) byly primery a směsi vzorků spolu s jednou kontrolou bez šablony (voda) přeneseny do vstupů pro analýzu.

Tabulka 1. Přehled genů a jejich primerů použitých během experimentu s imunologickou odpovědí

Symbol genu	**Produkt genu**	**Výběrová funkce**	**Místo exprese (u savců)**	**Sense primer, antisense primer (5'→3')**
Referenční geny:				
rna18s	18S ribozomální RNA	Struktura eukaryotických ribozómů	Všudypřítomná exprese	GTCGCCTGAATACCGCAG CTA, GTGAAATTCTTGGACCGG CGC
actb	Aktin-beta	Buněčná struktura, pohyblivost, buněčné signály	Všudypřítomná exprese	AGACATCAGGGTGTGAT GGTTG, AGTACCCCATTGAGCACG GTAT
Cytokineze:				
CCL20	Chemokin (C-C motif) ligand 20	Působí jako chemotaktický faktor, který přitahuje lymfocyty a mírně i neutrofily	Buňky brzlíku a nadledvin, v epitelu spojené s MALT	CATCTGCAGTGCGCCATG GAT, CCCTCTTTGTGTGGAAAA TGATG

CCL25b	Chemokin (C-C motif) ligand 25, isoforma b	Vývoj T-buněk, chemotaxe thymocytů, makrofágů a dendritických buněk	Buňky brzlíku, nadledvin a tenkého střeva	AGTCTTGCACAAGGCTCG TTTG, GGAAACAGATGGGGATT GCAAC
CXCL8	Interleukin-8	Chemotaxe granulocytů; stimulace fagocytózy a respiračního vzplanutí; angiogeneze.	Makrofágy a další typy buněk, jako jsou epitelové buňky, buňky hladkého svalstva dýchacích cest a endotelové buňky.	GATGATCCCTGAGGGTAT TCTG, GATTTGTCTGGACCCTGA TGCT
IFNG	Interferon-gamma	Obrana proti virům zahrnující aktivaci makrofágů	Přirozené zabijácké buňky a cytotoxické T-lymfocyty; také necytotoxické vrozené lymfoidní buňky.	GCAGCACTATACTATCCC AATTAA, TGATCGGCCAGATGTTGA AGCA
IL1b	Interleukin-1 beta	Zánětlivá reakce	Aktivované makrofágy, monocyty, fibroblasty a dentritické buňky; také B buňky, NK buňky, epiteliální buňky.	CTTGAGGTTGTGGAGGCA GAC, ATGTCTGTTGCCTTCCCC AACT
IL6	Interleukin 6	Prozánětlivé a zánětlivé reakce	monocyty, endotelové buňky a tuková tkáň	AACTTCAGCAAGGAGGC TTGTC, CGCCGTAGTATCGGAACT CTT
IL10	Interleukin 10	Snížení regulace Th1 reakcí; podpora přežívání, proliferace a produkce protilátek u B buněk.	Monocyty, lymfocyty	GACTTCTATGAAGCCAAC GATGA, TACTGGAGTTTTATCTGA GCACG

IL15	Interleukin-15	Aktivace a proliferace T a NK buněk; vývoj NK buněk.	Mononukleární fagocyty	CGCCATTGAGAAATCTGATGCTA, GGAGTTGTTGGTGGTCATCATG
IL17α	Interleukin-17α	Prozánětlivé reakce	T buňky	ATGCTGCTGGGTTTGAGAGCTT, CCTCACCGTCTGGCCCTTCA
IL17F	Interleukin-17F	Zánětlivé a alergické reakce	Th 17 buňky	CGTGGACGTACAGAGACTCCT, CTGGAGGCCAAACCTATCTACT
IL4I1	Interleukin 4- indukován proteinem 1, alias L-amino acid oxidáza	Regulace polarizace makrofágů M2 a zánětu vyvolaného buňkami Th1; antibakteriální funkce	B buňky, makrofágy	CAAACTCTTTCCTCTGGTTCTA, ACTACAGCGAGCTTCTCGACAT
TNF	Faktor nádorové nákazy alfa	Přežití, proliferace, diferenciace a smrt buněk; zánět	Imunitní buňky včetně makrofágů, přirozených zabijáků a lymfocytů.	CCATTCATTTAGAAGGAGACTACA, CAAGGAGGGCTAGAACTCAACA
Proteiny akutní fáze :				
C3	Složka komponentu 3	Aktivace komplementové dráhy; opsonizace	Hepatocyty	GCTCCATTGAAGGTGATGTCTG, ACTTCCAGGAGCTCGGACAAAT
HP	Haptoglobin	Vazba volného plazmatického hemoglobinu; antioxidant; antibakteriální	Hepatocyty, buňky kůže, plic a ledvin	CTCTGTGTCAGCCTCCAGGTT, CATGGTCTACATCGCTGACAGT

		aktivita; reakce akutní fáze		
SAA5	Sérum amyloid A protein 5	Transport cholesterolu; nábor imunitních buněk do zánětlivých míst; indukce enzymů k degradaci extracelulární matrix.	Hepatocyty, adipocyty	TGAAGCCTTTCAAGGAGC TGGT, GAGGTTATCAGTAATGCC AGAGA
SERPING1	Serpin rodina G člen 1	Regulace klasické komplementové dráhy a srážení krve	Hepatocyty	AGTTGATGCATCCATTAG CTATAC, GTTCAAAGAGACGGGTC CTAAC
Markery populace buněk :				
TGFBR	Receptor pro transformující růstový faktor β	Podpora diferenciace regulačních T-buněk	Plazmocytoidní dendritické buňky a další imunitní buňky	CATACCGCCCTCCAGTGT TAC, TAAGTCGGGCGGCCAGC TGA
CD4	Diferenciační klastr 4	Komunikace s buňkami prezentujícími antigen	Th buňky	AGGGGCACAAGAGTTGA TATATTA, GCAAGTTCTATTTCACCA AAGTAC
CD8A	Diferenciační klastr 8, isoform A	Komunikace s buňkami prezentujícími antigen	Cytotoxické T buňky	GACTGGTCGGAGAAAAA GCTGA, TTTCCCCTTGCTCGTTAA TGTTG
CD8B	Diferenciační klastr 8, isofrom B	Komunikace s buňkami prezentujícími antigen	Cytotoxické T buňky	TGCAGCCTCAGCTGGATC TCT, TTGCTATCAGACCCGTAC ATAGA
CD14	Diferenciační klastr 14	Detekce bakteriálního lipopolysacharidu (LPS)	Makrofágy, granulocyty	ACTCTGGAAGAACTGGA TCTA, AAGCTACATTTGTCTAAT AACCGC

CD68	Diferenciačn í klastr 68		Monocyty/makro fágy	CTGGCTGTCTCAGCACTG TCA, CACGAAAACCACCCCCA AACC
ITGα2 or CD49b	Integrin alfa-2 nebo diferenciační klastr 49b	Kóduje alfa podjednotku transmembránové ho receptoru	T buňky, NK buňky, fibroblasty, krevní destičky	
CD74 or MHC2α	Diferenciačn í klastr 74 nebo hlavní histokompati bilní komplex, invariantní řetězec II. třídy α	Buněčný povrchový receptor pro cytokin makrofágový migrační inhibiční faktor	B buňky, makrofágy, dendritické buňky, epiteliální buňky.	GGACCCACAGGGGGCTC TAA, GATCTGCTCCTTCTGGTC AAAC
IgM	izotop Immunoglob ulinu μ	Opsonizace a aktivace komplementu; neutralizace toxinů	B buňky, především B buňky plazmy	TCTGCTGGGCAGGTGTTG ATG, ACTGGATGGCCTGGATCA GAC
IgT	Izotop Immunoglob ulinu	Specifická opsonizace a neutralizace	B buňky, především B buňky plazmy	GCTCTCCTCACAGTCAGT GAAT, TGCAGCCTGAGTTTGGTA TTTGT
IL2Rβ	Řetězec beta receptoru pro interleukin-2 alias CD122	Proliferace cytotoxických T-buněk	Lymfocyty	TCGCAAGGACTCTCCTGC GTA, GGACTGCTGGATCGTTGG TGT
IL6Rα	Interleukin-6 receptor-alfa	Moduluje zánětlivou reakci, reguluje růst a diferenciaci buněk.	Monocyty, lymfocyty, fibroblasty, endotelové buňky	AGAAAAGACCCTCCCCCT GGT, GTCTGGCAATGCTGACCT TTAC

IL6Rβ	Interleukin-6 receptor-beta	Moduluje zánětlivou reakci, reguluje růst a diferenciaci buněk.	Monocyty, lymfocyty, fibroblasty, endotelové buňky	CTCATCTTCAGCAGCGGAGATA, CTCCCTCCCCATCATGTAGTTT
IL7R	Interleukin - 7 receptor	Přežívání, proliferace a vývoj T-buněk	Naivní/thymocyty a paměťové T-lymfocyty	CGACACAGAGCCCAGAATCCT, GCAACAACGAGGACGACGAAG
IL17RE	Interleukin 17 Receptor E	Aktivace signálních drah vede k expresi a produkci zánětlivých cytokinů.	(Th17) buňky	GGTGTTCTCAGGGCCTTCACT, AGTTGTGAGGGGAGGCAAAGT
IL21R	Interleukin 21 Receptor	Proliferace a diferenciace lymfocytů	T, B, NK buňky	TATCACAGGTGTGGACCATGATT, GCTACTGGCTCACTTTCACAAG
IL22Rα2	Interleukin 22 receptor podjednotka alfa 2	Váže se na interleukin 22 a inhibuje jeho aktivitu tím, že blokuje interakci interleukinu 22 s jeho povrchovým buněčným receptorem.	Dendritické buňky, epiteliální buňky	CAACAGCATCCTCTGACAGTTG, GGCCCAGCCAATCAGGAGCA
Další imunitní geny:				
MAP3K7	Mitogenem aktivovaná proteinová kináza kináza 7, známá také jako TAK1	Buněčné reakce na výzvy prostředí	Hostitelské buňky	CTTTAGTGTTGAGCTCCGACAG, GTTTTCAGTGTTCCCAGGGCG
MARK3	Kináza 3 regulující afinitu k	Intracelulární signály	Hostitelské buňky	GGAAAGTCACACGTCTCACAGT,

	mikrotubulů m			AACTGGCCCGACACATCCTCA
MMP9	Matrix metalopeptidáza 9	Degradace extracelulární matrix, aktivace IL-1β a štěpení několika chemokinů.	Neutrofilní granulocyty, makrofágy a fibroblasty	GTCGTGACACCGCTGTAATTG, AGATGGCAAGTTGTGGTGCAG
MMP13β	Matrix metalopeptidáza 13, izoforma beta	Remodelace a obnova tkání; angiogeneze	Buňky hladké svalové tkáně, respirační epitelové buňky	CATATTTAGTGGGATCCAGATGTG, ACACCGGGAAAACTCTGCT
S100A1	S100 protein vázající vápník A1	Regulace progrese buněčného cyklu a diferenciace; stimulace uvolňování Ca2+, inhibice sestavování mikrotubulů.	Buňky srdečního a kosterního svalu	CCTAGCAGCCAGCAAGGACC, GGTGAAGTGGACTTCCAGGAG
UCHL1	Ubikvitinová karboxy-terminální hydroláza L1	Odbourávání nepotřebných proteinů	Buňky mozku a endokrinních tkání	GGTGGGGAATAAGATGATGAGC, GTTTCGGGACGGCGGACAGT
FTH1b	Těžký polypeptid feritinu 1b	Kóduje těžkou podjednotku feritinu, hlavního intracelulárního zásobního proteinu železa.	Exprese MHC třídy I a rozpoznávání NK buněk	ACCAGAAATGAGTTCGCAAATCC, GATAAACATAAGAGGCATAGAGCT
LYG	Lyzozóm g	Obrana proti bakteriální infekci	Myeloidní linie	AAGGAGGGATAGCAGCCTACAA, GCAACAACATCATTGGAGTAGTC

4. VÝSLEDKY

4.1. Behaviorální testování

Pomocí OF a NO testu bylo 1000 jedinců okouna říčního diferencióváno do dvou typologických kategorií (SI a BI). Tabulka č.2 uvádí výsledné hodnoty z obou testů pro 20 ryb, jež obdrželi nejvyšší hodnoty pro skupinu BI, zatímco 20 nejvíce SI jedinců získalo nulové hodnoty v obou testech. Aktivita během OF testu je vyjádřena v cm uplavaných za 30 min. Těchto hodnot bylo docíleno pomocí využití interaktivního programu Matlab s příslušnými dodatečnými programy. Vzdálenost uplavaná v pixelech byla konvertována na cm pomocí znalosti rozměrů nádrže. Pomocí snímkové frekvence byl určen i latentní čas (s) vstupu do zóny blízkosti během NO testu a dále opět pomocí Matlabu byly stanoveny parametry nejbližší vzdálenosti od nového objektu v rámci 4 čtvercových zón blízkosti (5, 10, 15 a 20 cm) společně s časem stráveným v jednotlivých zónách viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Top 20 jedinců s nejlepším BI skóre

Top 20 ryb	PIT tag	Aktivita	Latence (sec)	Nejbližší vzdálenost (cm)	Počet návštěv
1 X	7018	21.7	1	≤10cm	1
2 X	7413	19.9	1	≤10cm	1
3 X	7366	17.7	4	≤10cm	3
4 X	7522	6.1	4	≤10cm	3
5 Y	0464	55.5	1	≤10cm	1
6 Y	0100	3.5	1	≤5cm	1
7 X	7173	4.6	1	≤5cm	1
8 Y	7240	22.2	1	≤10cm	1
9 X	7674	20.4	1	≤5cm	1
10 X	7246	13.4	1	≤10cm	1
11 Y	0495	11.2	1	≤5cm	1
12 Y	8594	12.5	4	≤10cm	5
13 Y	7481	26.3	1	≤5cm	1
14 X	8752	13.7	9	≤10cm	2
15 X	0461	8.1	1	≤10cm	1
16 X	7536	2.4	1	≤10cm	2
17 Y	7074	3.2	2	≤5cm	1
18 Y	0410	3.1	1	≤10cm	1
19 Y	1386	5.3	1	≤10cm	1
20 Z	0063	7.8	6	≤10cm	8

X-samice, Y-samci, Z- jedinci bez determinovatelného pohlaví.

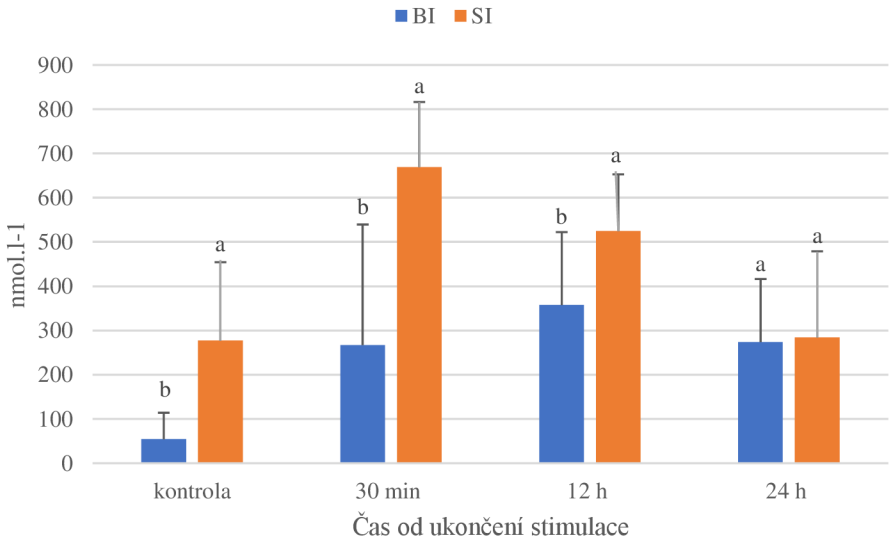
4.2. Stresové ukazatele

Výsledky ze 30 min. dlouhé stresové stimulace (snížení hladiny na úroveň 5 cm nad dorzální ploutví) vykázaly spíše minoritní vliv na rozdílnost krevních plazmatických parametrů mezi skupinami SI a BI viz Tabulka 3. Aktivita metabolických enzymů ALT, AST, LDH, ALP, množství glukózy a osmolytů zůstaly vcelku nezměněny ($p < 0.05$) po stimulačním zákroku ve srovnání s kontrolou. Metabolická aktivita neprokázala žádný signifikantní rozdíl v rámci jednotlivých skupin ani mezi oběma skupinami. Na druhou stranu rozdíl v hladinách kortizolu vykázal statistickou významnost, kdy jedinci ze skupiny SI disponovali nejvyšší hodnotou pro tento ukazatel (graf 1). Nejvyšší hodnoty kortizolu u SI jedinců přesahovali koncentraci 80 $ng.ml^{-1}$ krevního séra, a dokonce tak překročili fyziologickou mez. V intervalu 30 min až 12 h po stimulaci docházelo u jedinců ze skupiny SI k statisticky významnému ($p < 0.05$) postupnému až dvojnásobnému navýšení koncentrace kortizolu v krevní plazmě. Po 24 h od konce stresové události již nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly.

Tabulka 3. Hodnoty stresových ukazatelů (v $nmol.l^{-1}$ krevního séra, 5 jedinců ve skupině). Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru

	ALT	AST	LDH	ALP	Glukóza	Osmolyty
			Skupina BI			
Kontrola	0.31±0.18	3.02±2.27	6.82±4.16	0.64±0.38	4.98±1.10	220±126.90
30 min	0.39±0.33	1.85±1.07	9.45±10.29	0.41±0.28	10.72±6.99	119.80±148.25
12 h	0.22±0.08	3.43±2.16	16.23±8.27	0.29±0.09	5.60±1.35	265.40±133.62
24 h	0.55±0.09	5.61±3.34	34.57±29.82	0.82±0.52	4.52±2.37	334.60±11.64
			Skupina SI			
Kontrola	0.46±0.38	4.86±4.20	12.55±10.66	0.18±0.15	4.16±2.38	205.60±153.70
30 min	0.39±0.33	6.37±5.15	31.06±17	0.41±0.19	8.98±4.25	198.40±162.06
12 h	0.56±0.03	3.25±2.64	16.16±11.06	0.50±0.29	7.02±1.04	334.8±20.62
24 h	0.41±0.01	1.99±1.44	12.71±8.57	0.37±0.12	6.04±2.47	339.80±15.73

ALT = alaninaminotransferáza, AST = aspartátaminotransferáza, LDH = laktátdehydrogenáza, ALP = alkalická fosfatáza. 30 min, 12 h, 24 h = Doba uplynulá od stimulace. Rozdílný typ písma indikuje signifikantní rozdílnost ($p \leq 0.05$).



Graf 1. Koncentrace kortizolu (nmol.l^{-1}) u skupin SI a BI (5 jedinců ve skupině)

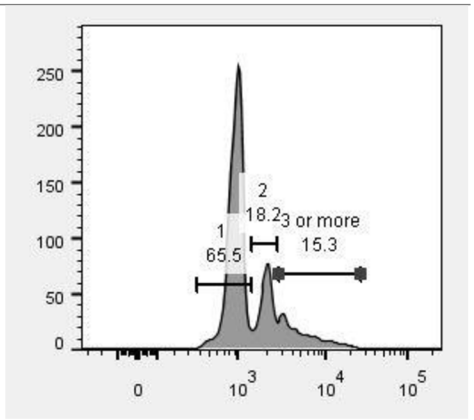
4.3. Imunologická rezistence

4.3.1. Přirozená imunita

Fluorescenčně značené latexové kuličky byly použity pro vyhodnocení interakce mezi patogenem a hostitelem během infekčních onemocnění okouna říčního a ke studiu potenciálu leukocytů trávit latexové kuličky jako infekční agens viz. Tabulka 4 (pravá strana) a vyvolávat prozánětlivé procesy. Procento lymfoidních buněk pohlcujících latexové kuličky bylo statisticky vyšší jak u BI, tak u SI skupin než u myeloidních buněk v hlavové části ledvin viz. tabulka 4. Ačkoli fagocytární kapacita ani pro myeloidní, ani pro lymfoidní buňky nebyla statisticky odlišná mezi BI a SI skupinami pro 1, 2, 3 a více kuliček. Rozdíl byl shledán v rámci skupin, kde během dvouhodinové inkubace byla silná fagocytární kapacita pro požití jedné latexové kuličky nejvyšší pro myeloidní a lymfoidní buňky. Fagocytární kapacita pro 2 a 3 a více kuliček byla u obou skupin buněk 2/3krát nižší než pro 1 kuličku.

Tabulka 4 Fagocytární kapacita z leukocytů izolovaných z hlavové části ledvin. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru

	BI	***SI***
	Fagocytární kapacita (%)	
Hmotnost ryb (g)	52.0±3.0	49.33±1.15
Myeloidní buňky	35.43±4.91	40.80±5.49
1 kulička	57.77±2.96[a]	55.47±6.64[a]
2 kuličky	22.83±2.36[b]	19.53±1.95[b]
3 a více	18.97±2.36[b]	23.07±3.83[b]
Lymfoidní buňky	56.33±4.52	52.27±5.72
1 kulička	65.97±2.21[a]	65.57±0.33[a]
2 kuličky	18.83±0.46[b]	18.27±1.09[b]
3 a více	14.13±1.77[b]	15.30±0.65[b]



Pravý graf znázorňuje příklad měření fagocytární kapacity pro 1, 2, 3 a více latexových kuliček

4.3.2. Adaptivní imunita

Pro studium profilování genové exprese po bakteriální expozici *in vivo* bylo stanoveno 46 genů souvisejících s imunitou včetně 2 referenčních genů pro naše imunologické qPCR testy (Tabulka 1, Obr. 18). Tyto testy zahrnovaly různé geny související s prozánětlivou reakcí, reakcí akutní fáze nákazy a genetické markery buněčných populací, které byly použity k profilování reakce *in vivo* v buňkách hlavové části ledvin a peritonea ve třech různých časových bodech (1, 3, 7 dní) po intraperitoneální injekci inaktivované *A. salmonicida*. Všechny vybrané geny byly po injekci *A. salmonicida* významně regulovány.

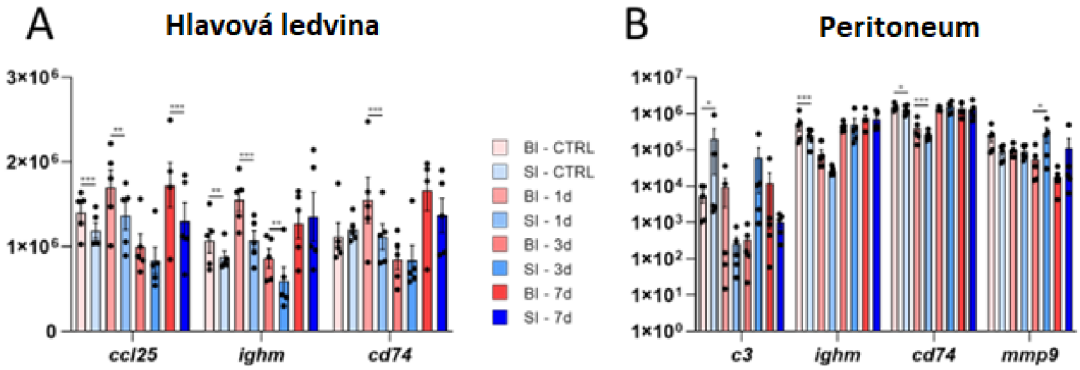
V buňkách hlavové ledviny skupin BI i SI byly hladiny genu *mmp9* během 1. dne zvýšené a poté konzistentně klesaly ve 3. a 7. dni po injikaci ve srovnání s kontrolními skupinami ($p \leq 0,03$) (Obr. 18). Kromě toho byly hladiny genu *saa5* běžně zvýšené ($p < 0,03$) u BI a SI ve srovnání s kontrolami v 1. den po injikaci. Ve stejném časovém bodě byly hladiny transkriptů sedmi imunitních genů (*cd14, ighm, il17rel, il1b, il6, il6ra* a *serpine1*) významně zvýšené ($p < 0,04$) u BI, zatímco šest imunitních genů (*cd8a, ight, il15, il6rb, il7r* a *tnf*) bylo významně sníženo ($p < 0,03$) u SI ve srovnání s kontrolními hodnotami. Tři dny po injekci

A. salmonicida byly hladiny šesti imunitních genů (*il17a, il2rb, il6ra/b, map3k7, kromě mmp9*) běžně sníženy ($p \leq 0,03$) v BI a SI skupinách ve srovnání s kontrolami, zatímco hladiny *cd4* byly indukovány (zvýšeny) v BI (s $p = 0,03$), avšak sníženy v SI (s $p = 0,02$). Exprese dalších čtyř genů byla tři dny po injikaci snížena ($p \leq 0,04$) u BI (*cd209, il17f, il1b a il22ra2*) i SI (*il7r, itga2, tgfbr* a *tnf*) skupiny ve srovnání s kontrolami. Hladiny *tgfbr* (kromě *mmp9*) byly významně indukovány v BI ($p = 0,01$), ale sníženy v SI skupinách ($p = 0,04$) 7. den po injekci. Ve stejném časovém bodě byly nalezeny rozdílně exprimované geny u BI (indukované: *ccl20* a *itga2*) a SI (indukované: *cd8a, ight a klrd1*; snížené: *il6rb* a *serpine1*) ($p < 0,05$).

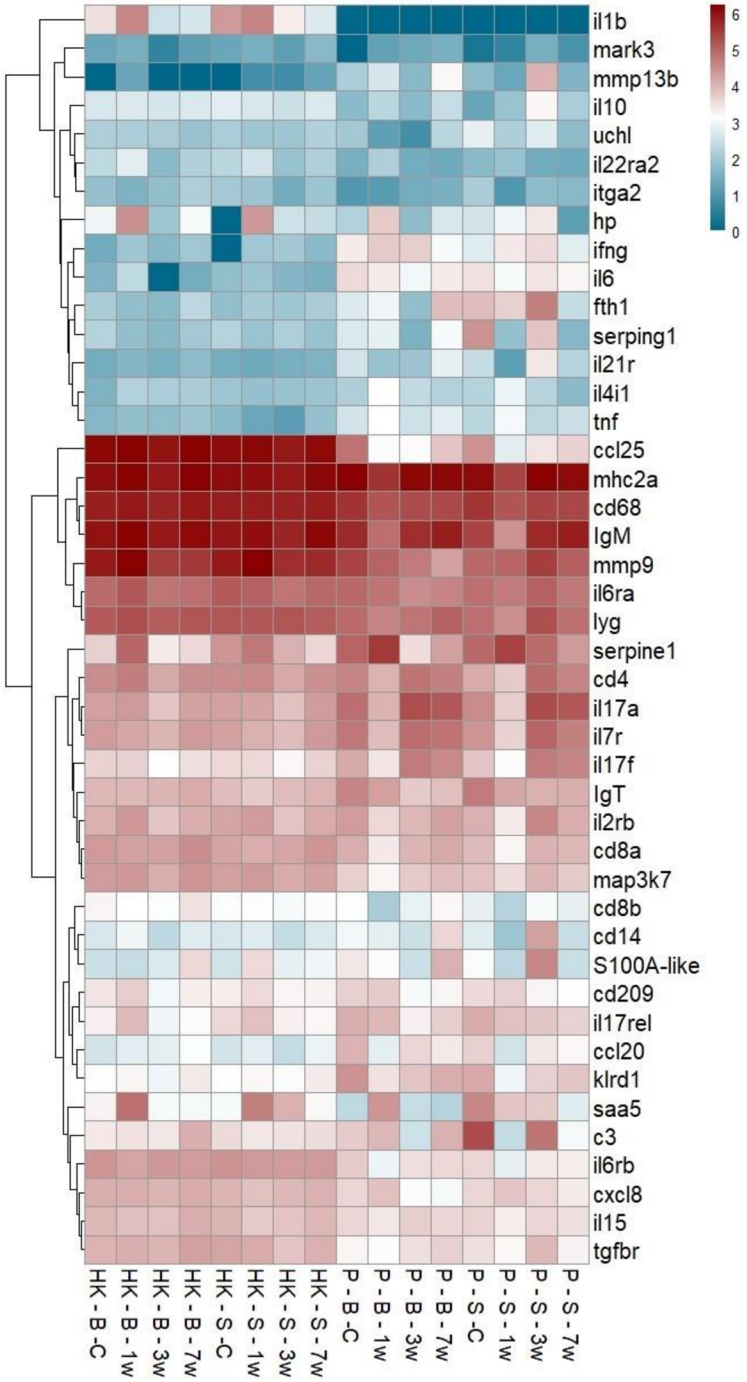
V peritoneálních buňkách BI i SI byly hladiny 15 imunitních genů (*ccl20, cd4, cd68, cd8a* a *cd8b, cd74, ighm, il17a, il17f, il2rb, il6rb, il17r, il4i1, klrd1* a *lyg*) běžně snížené ($p < 0,05$), zatímco pouze dva geny (*il10, serpine1*) byly indukované ($p \leq 0,01$) ve srovnání s kontrolami 1 den po injikaci bakterií. Hladiny dvou (*ight* a *klrd1*), respektive tří imunitních genů (*il17rel, ight* a *serpine1*) byly běžně sníženy (s $p < 0,04$) v BI a SI ve srovnání s kontrolami 3 a 7 dní po stimulaci.

Navíc dvanáct genů (zvýšené: *il17a, il17f* a *mark3*; snížené: *c3, cd14, cd209, il17rel, il2rb, il6, il6ra, serpine1 a uchl*) bylo 3 dny po injekci diferenciálně exprimováno ($p < 0,04$) u BI oproti kontrolám, zatímco u SI byly ve stejném časovém bodě různě exprimovány ($p < 0,04$) pouze dva geny (zvýšené: *il7r*; snížené: *cd4*). Hladiny tří genů (*cxcl8, cd209, mmp9*) byly u BI skupiny snížené ($p < 0,05$), zatímco jeden gen (*ighm*) byl v SI skupině indukovaný 7 dní po stimulaci.

Výsledné rozdíly v expresi imunitních genů mezi SI a BI skupinami poukázali na 1,2 až 1,3 násobný nárůst ($q < 0.003$) hladiny genu *cc125* v hlavové ledvině u BI oproti SI 1 a 7 dní po stimulaci. Hladina genu *Ighm* v hlavové ledvině byla 1,2-1,4 násobně vyšší ($q < 0.006$) u BI oproti SI skupině 1 a 3 dny po injikaci nákazou. U hladiny genu *Cd74* v peritoneu a hlavové ledvině byl pozorován 1,3-1,5 násobný ($q < 0.0001$) nárůst u BI oproti SI 1 den po stimulaci. V peritoneálních buňkách byly dále nalezeny rozdíly v hladinách u BI oproti SI skupině pro geny *ighm* (2,2 násobný nárůst; $q < 0.0001$), *c3* (36,7 násobný pokles; $q = 0.03$) 1 den po stimulaci a 5,1 násobný pokles ($q = 0.01$) hladiny genu *mmp9* viz grafy 2 a 3.



Grafy 2 a 3. Expresní profil vybraných genů rozdílně exprimovaných v (A) hlavové části ledviny a (B) peritoneálních buňkách BI (červené sloupce) versus SI (modré sloupce) 1 d, 3 d a 7 d po injekci *A. salmonicida*. CTRL = kontrola. Sloupce představují průměrné počty kopií genů (n = 5); tečky představují jednotlivé počty kopií; chybové úsečky představují standardní chybu průměru.



Obr. 18. Modulace imunitních genů pro hlavovou část ledvin (HK) a peritoneum (P) po injekci inaktivované *A. salmonicida* do skupin odvážný (B) a plachý (S). Tepelná mapa znázorňuje průměrné poměry genové exprese jako hodnoty násobné změny u skupin s injekcí *A. salmonicida* (po 1, 3 a 7 dnech po odběru) vzhledem ke kontrole (5 jedinců na každou skupinu) pro imunitní geny uvedené ve sloupcích, jak bylo měřeno pomocí multiplexní qPCR. Rna18s a actb byly použity jako referenční geny pro normalizaci dat.

4.4. Somatické indexy

Dodatečně bylo provedeno i vyhodnocení somatických ukazatelů, nicméně nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinami BI a SI. Ve skupině BI bylo více samic (n = 10) než samců (n = 9) a u jednoho exempláře nebylo možno determinovat pohlaví. Skupina SI obsahovala více samců (n = 12) než samic (n = 8).

Tabulka 5. Celková váha těla (v gramech; 5 jedinců ve skupině) a somatické indexy (v %; 5 jedinců ve skupině) okouna říčního

	W	**Sex**	**HSI**	**GSI**	**PVSI**	**SSI**	**CSI**
				Skupina BI			
Kon.	66.00±1.14	4X/1Y	1.86±0.49	2.56±1.96	2.96±0.95	0.08±0.01	0.14±0.01
1 dps	69.20±5.85	3X/2Y	2.00±0.64	1.76±1.78	3.49±0.96	0.06±0.02	0.12±0.01
3 dps	69.60±4.56	2X/3Y	2.05±0.75	3.44±2.25	3.23±1.96	0.08±0.03	0.15±0.03
7 dps	60.80±4.21	1X/3Y/1Z	1.88±0.47	3.11±2.01	2.86±0.28	0.08±0.03	0.12±0.01
				Skupina SI			
Kon.	65.20±4.44	1X/4Y	2.22±0.31	2.71±2.17	3.36±1.22	0.07±0.01	0.13±0.02
1 dps	71.80±9.09	4X/1Y	1.85±0.57	1.00±1.03	3.34±0.35	0.08±0.03	0.13±0.01
3 dps	70.80±5.93	1X/4Y	1.97±1.38	2.99±2.56	3.65±0.84	0.11±0.05	0.17±0.04
7 dps	57.40±3.29	2X/3Y	1.55±0.72	2.95±2.05	2.53±0.75	0.09±0.05	0.14±0.04

HSI—hepatosomatický index; GSI—gonadosomatický index; PVSI—periviscerální tukový index; SSI—splenosomatický index; CSI—kardiosomatický index. X-samice, Y-samec, Z- jedinci u nichž nebylo možno determinovat pohlaví, dps = počet dní po stimulaci, kon =kontrola, W = váha. Rozdílný typ písma indikuje signifikantní rozdílnost ($p \leq 0.05$)

4.5. Statistická analýza

Parametry OF a NO testu, stresové ukazatele krevní plazmy, somatické indexy a parametry fagocytární kapacity nesplňovaly předpoklad parametrického testu (MANOVA, ANOVA) a byly analyzovány pomocí Kruskal-Wallisova H testu s vícenásobným porovnáním průměrů jako post-hoc testem.

Data multiplexní qPCR byla analyzována pomocí softwaru RealTime PCR Analysis Software v. 4.5.2 (Standard BioTools) a normalizována vůči vhodnému referenčnímu genu *actb*. Tyto normalizované počty kopií cílových genů byly poté vyhodnoceny pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA; GraphPad PRISM, software 9.5.1, GraphPad

Software, Inc.) a hladiny významnosti jsou v následujícím textu uvedeny jako p-hodnoty. Pro identifikaci diferenciálně exprimovaných genů mezi BI SI skupinami byl použit Holm-Šídákův test vícenásobného porovnání (GraphPad PRISM, software 9.5.1), aby se kontrolovala tzv. familywise error rate (upravené p-hodnoty jsou v dalším textu označeny jako q-hodnoty).

5. Diskuse

5.1 Behaviorální testování

Ze všech 1000 testovaných jedinců okouna říčního bylo nalezeno jen velmi málo exemplářů vykazující nulovou aktivitu během OF, na druhou stranu jedinci, jenž dosáhli nulových hodnot v NO byli zastoupeni z valné většiny. K podobnému zjištění dospěli i Snedonn a kol. (2003), kteří dokonce popsali ve svém NO na pstruhovi duhovém tzv. neofobické chování, neboť většina ryb se během testu zdržovala v zónách daleko od nového objektu. V případech mnoha testovaných jedinců bylo obdrženo velmi vysoké skóre aktivity v OF, avšak odezva z NO byla negativní. Velmi podobnou variabilitu mezi výsledky téměř identického OF testu a skupinového testu na ochotu riskovat popisují Alfonso a kol. (2019) u mořčáka obecného (*Dicentrachus labrax*). Stejně tak Wilson a kol., (1993) narazili při identifikaci kontinua plachý - odvážný u slunečnice pestré (*Lepomis gibossus*) na část ryb, jenž prokázaly exploratorní rysy chování v testu s pastí, nicméně v předcházejícím NO testu se k pasti zdaleka ani nepřiblížily. Z těchto poznatků je zřejmé, že při vyhodnocení typologické kategorizace u ryb je potřebné vycházet z minimálně 2 po sobě jdoucích typů behaviorálních testů. Předcházející studie nabízejí několik možných variant, přičemž v praxi se většinou jedná o OF v kombinaci s již zmíněným NO, testem s úkrytem nebo predátorským simulačním testem (Dahlbom a kol., 2011). Pokusy popsat personalistické rysy jako odvážnost u okouna říčního lze nalézt v publikacích Magnhagen a Borcherding, (2008), kde identifikují rozdíly v behaviorálních rysech v rámci věkových kategorií a dvou různých populací pomocí OF testu a testu s potravou. Pro nás poněkud příbuznější typ experimentu (ryby z jedné populace a stejné věkové kategorie) provedli Magnhagen a Staffan, (2005) též s okounem říčním, nicméně velmi detailně popsali typologickou diferenciaci na SI a BI

jedince během testu s predátorem a potravou. Výchozí parametry testu byly stanoveny jako čas strávený v otevřeném prostoru v přítomnosti predátora a počet útoků na potravu v přítomnosti predátora. Subjekty, které byly zpozorovány alespoň v 8 z 10 situacích ve volném prostoru a provedly nejméně 10 útoků na potravu během jednoho pozorování, byly dále kategorizováni jako BI. V našem případě byli do kategorie top 20 BI vybráni jedinci disponující vysokou aktivitou v kombinaci s vysokým počtem návštěv a časem setrvaným v zónách blízkosti. V opačném případě skupina top 20 SI jedinců sestával z exemplářů, které obdržely skóre 0 v obou typech testů a všech kategoriích.

Přestože se v naší práci podařilo determinovat jedince s BI typem osobnosti okouna říčního, tak krom otázek ekologického vlivu a fitness je třeba se zajímat i o možnost dědičnosti těchto osobnostních aspektů v rámci potenciálního využití BI okounů ve šlechtitelských programech. Ačkoliv jsou individuální intra-specifické rozdíly v chování ryb často považovány za konsekvence především environmentálního gradientu v podobě adaptačních strategií (Dall a kol., 2004) tak výsledky z práce Brown a kol. (2007) naznačují jistou úroveň heritability osobnostních rysů u gambusenky síťované (*Brachyraphis episcopi*). Jejich práce poukazuje na velmi podobnou úroveň odvahy mezi divokými předky a jejich F1 generací odchovanou v zajetí, kdy zároveň v 2. fázi testování poukazují na neodmyslitelný vliv prostředí a snaží se personalitu gambusenek interpretovat jako fúzi genetické a environmentální složky. Při studiu dědičnosti osobnostních rysů u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) publikovali Ariyomo a kol. (2013) výsledky s koeficientem heritability 0,72 pro odvážnost a 0,36 pro agresivitu, což dokonce naznačuje většinový podíl genetické složky na celkové fenotypové varianci odvážnosti. Heritabilita vzorců chování u ryb byla zkoumána i u mořčáka evropského, kdy ochota jedinců riskovat u F1 generace vykázala $h^2 = 0,45$ (Ferrari a kol., 2016). Dědičnost osobnostních aspektů jako odvaha a ochota riskovat je popsána i pro juvenilního pstruha potočního v práci Kortet a kol. (2014), kde autoři publikují hodnotu $h^2 = 0,14$ pro odvážnost, riskantní chování a agresivitu. Ačkoliv se dle uvedené hodnoty jedná o převahu environmentální variance nad genetickou, tak autoři v abstraktu tvrdí, že genetická variance tvoří základ pro výslednou fenotypovou varianci projevu. Další výzkum naznačující jistou míru dědičnosti personality u ryb byl proveden na kančíkovi avokádovém (*Amatitlania siquia*), u kterého hodnoty heritability pro odvážnost a exploratorní chování dosáhly $h^2 = 0,37$ a 0,3 (Mazué a kol., 2015). V experimentu na pestřenci skvělém (*Neolamprologus*

pulcher) v rámci testování dědičnosti personalistických rysů u tohoto druhu dospěli Chervet a kol. (2011) ke heritabilitě na úrovni $h^2 = 0,15$, z čehož usuzují, že osobnostní aspekty tohoto druhu jsou majoritně utvářeny vlivem prostředí. Z dostupných informací lze soudit, že původ fenotypové variance chování ryb je inter-specificky velmi variabilní, nicméně některé z výsledků naznačují více či méně významný vliv genetické aditivní složky. Pokusy s heritabilitou osobnostních znaků okouna říčního nebyly dosud publikovány, ačkoliv z dostupných zdrojů je patrné, že možnost dědičnosti behaviorálních znaků prozatím nelze vyloučit. V případě potvrzení vlivu úrovně odvážnosti na užitkové vlastnosti (stresová tolerance a imunologická rezistence) by se dalo uvažovat o navazujících výzkumech v oblasti dědičnosti personality u okouna říčního a dopadů pro efektivitu v intenzivní akvakultuře s přesahem na ostatní druhy chovaných ryb.

Pro BI behaviorální typ ryb byly doposud popsány vlastnosti jako lepší růst, lepší příjem potravy, nižší mortalita a zvýšená tolerance ke stresu (Ward a kol., 2004; Raoult a kol., 2012; Long a kol., 2021). Na druhou stranu byla prokázána pozitivní korelace mezi odvážností a agresivitou např. u pstruha duhového (Schojdel a kol., 2005) nebo lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) (Salonen a Peuhkuri, 2006), která bohužel patří mezi nežádoucí behaviorální aspekty v intenzivních chovech okouna říčního (Toomey a kol., 2019). Prozatím nebyl popsán přímý vliv mezi odvážností a agresivitou u okouna, nicméně jedním z charakteristických rysů odvážnosti u ryb je aktivnější vyhledávání a vyšší příjem potravy (Wilson a kol., 1994). Vzhledem k hypotetickým personalistickým rozdílům u okouních larev lze předpokládat vysokou úroveň heterogenity růstu, která zapříčiňuje kanibalismus, jehož důsledky mohou vyústit ve vysoké ztráty na obsádkách (Mélard a kol., 1995; Kestemont a kol., 2003, Król a Zieliński, 2015). Výskyt kanibalismu u larev a juvenilů lze však redukovat pravidelným tříděním velikostních kategorií ve 14. - 28. denních intervalech, preferencí tmavého typu nádrže z důvodu lepší detekce potravy a také zodpovědným přístupem v aplikaci krmiva, kdy se v počátcích exogenní výživy (3-4 DPH) aplikuje nejjemnější artémie s postupným zvyšováním velikostí žábronožek (5-20 DPH) s následným přechodem na tzv. co-feeding artémie a umělého krmiva (20-25 DPH), který je ukončen 25. DPH v podobě aplikace pouze umělé krmné směsi (Policar a kol., 2009). Při zkoumání hustoty obsádek chovaných larev nebyl prokázán statisticky významný vliv na úroveň

kanibalismu mezi nízkou (13 larev.l^{-1} vody) a vysokou (26 larev.l^{-1} vody) hustotou obsádky (Król a Zielińsky, 2015).

5.2. Stresové ukazatele

Rozdíl v hladinách kortizolu mezi BI a SI jedinci se podařilo detekovat především 30 min a 12 h po expozici stresoru, přičemž průměrná koncentrace kortizolu u SI jedinců dosahovala více než dvojnásobných hodnot 30 min po stresové stimulaci oproti jedincům ze skupiny BI. K podobným výsledkům dospěli i Raoult a kol. (2012) při zkoumání rozdílných hladin kortizolu v krvi u SI a BI skupin ryb z čeledi smuhovitých *Argyosomus japonicus,* kdy popisují hladinu kortizolu v krvi u SI o 22% vyšší oproti BI. Je zajímavé, že v našem testu koncentrace kortizolu v krvi u BI jedinců nedosáhla svého píku 30 min po stimulaci stresorem nýbrž až po 12 h. Mezi SI jedinci byla nejvyšší koncentrace naměřena 30 min po stimulaci a poté vykazovala již klesající tendenci. Z našeho experimentu je tedy patrné, že jedinci okouna říčního ze skupiny BI prokázali větší toleranci vůči stresovým podnětům spolu s kratším intervalem návratu do normálního stavu oproti jedincům SI. Na druhou stranu v podobném experimentu s pstruhem duhovým nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v hladinách kortizolu mezi BI a SI jedinci (Thomson a kol., 2012). Velice zajímavé výsledky o této problematice u pstruha duhového přináší i výzkum Øverli a kol. (2004), kde autoři publikují nález negativní korelace mezi koncentrací kortizolu v krvi a úrovní agresivity. Podle autorů se u exemplářů disponujících skórem agresivity 7–10 útoků.min^{-1} podařilo naměřit hladinu kortizolu v intervalu 50–100 ng.ml^{-1} , zatímco pstruzi s 2,5 a méně útoky.min^{-1} disponovali koncentrací kortizolu v krevním séru až 150 ng.ml^{-1}. Na základě popsaného experimentu a znalosti pozitivní korelace mezi agresivitou a odvážností u pstruha duhového (Schojdel a kol., 2005) se lze domnívat, že BI jedinci tohoto druhu mohou vykazovat větší stresovou toleranci oproti SI skupinám, ačkoliv Thomson a kol. (2012) toto tvrzení popírá. K podobným výsledkům s kortizolem jako Thomson a kol. (2012) (žádný signifikantní rozdíl v hladinách kortizolu mezi SI a BI jedinci) dospěli i Alfonso a kol. (2012) u mořčáka obecného, nicméně ve své práci poukazují na větší expresi genů souvisejících se stresem u exemplářů ze skupiny SI oproti skupině BI. Úroveň odvážnosti byla zkoumána i u juvenilních lososů atlantských (Skov, 2018). Autor ve své publikaci uvádí,

že úspěšně identifikoval 3 rozdílné behaviorální skupiny na základě jejich exploratorního a potravního chování, přičemž jedna ze skupin (early) vykazovala nejvyšší BI skóre oproti zbylým skupinám (middle a late). Po stresové stimulaci (snížení hladiny) autor popisuje nejlepší stresovou toleranci pro skupinu early s nejvyšším BI skóre. Ryby byly testovány pomocí 3 hodnotících ukazatelů, konkrétně spotřeba kyslíku po stimulaci (early = 550 mg $0_2.kg^{-1}$; late = 850 mg $0_2.kg^{-1}$), čas zotavení (early = 200 min; late = 390 min) a koncentrace kortizolu v krevní plasmě (early = 83 $ng.ml^{-1}$; late = 140 $ng.ml^{-1}$). Souvislost mezi typem personality a odpovědí na fyzickou i psychickou zátěž je mezidruhově dosti variabilní a dle uvedených zdrojů se mohou výsledky lišit i v rámci stejného druhu (Øverli a kol., 2004; Thompson a kol., 2012). Tento trend může být zapříčiněn rozdílností původu testovaných populací, např. gambusenky síťované pocházející z lokality s vyšším zastoupením predátorů vykázali v behaviorálních testech vyšší BI skóre oproti exemplářům z lokality s menším predačním tlakem (Brown a kol., 2007). V této kapitole jsou uvedeny příklady publikací (Øverli a kol., 2004; Raoult a kol.,2012; Skov, 2018), které přinášejí výsledky téměř shodné či podobné s těmi, kterých bylo dosaženo v této práci. Ačkoliv je třeba navazujícího výzkumu tak naše dosavadní výsledky poukazují na existenci kontinua plachý - odvážný u okouna říčního s výraznými intra-specifickými rozdíly v odpovědi na stresový stimul, přičemž BI okouni vykázali více než dvojnásobně vyšší toleranci vůči stresu oproti SI jedincům.

5.3. Imunologická rezistence

Soubor buněčných procesů a struktur, jenž slouží k celkové obraně organismu proti patogenům lze nazývat imunitním systémem (Rauta a kol., 2012). Imunitní systém, imunologická odpověď nebo zjednodušeně imunita organismu je u ryb diferenciována na přirozenou a adaptivní, přičemž přirozená imunita setrvává v první obranné linii v boji s nákazou (Tort a kol., 2003). Hlavní pilíře přirozené imunity tvoří fyziologické a anatomické bariéry spolu s buněčnými (fagocyty, cytotoxické buňky) a humorálními (aktivní enzymy např. lysozymy) parametry (Magnadóttir, 2006). Fagocyty jsou buňky, které mají za úkol rozpoznat a eliminovat původce nákazy (Secombes a Fletcher, 1992). Eliminace patogenu dosáhnou pomocí endocelulárního procesu fagocytózy, při které fagocyt pohlcuje nežádoucí částice z extracelulárního prostoru do intracelulárního prostoru buňky. Mechanismus působení spočívá v obklopení patogenních buněk výčnělky v cytoplazmatické membráně

fagocytu s následnou fúzí membrány, která uzavře nežádoucí buňky v tzv. potravní vakuole, což vede k zahubení patogenu (Hirayma a kol., 2017). Mezi typické fagocyty patří především makrofágy, neutrofily a monocyty (Gordon, 2016). Nás experiment měl za účel porovnat úroveň přirozené imunity v podobě fagocytární kapacity mezi BI a SI jedinci okouna říčního. Během našeho pozorování nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v přirozené imunitě mezi BI a SI zástupci, z čehož lze soudit, že personalita nemá vliv na přirozenou imunitu u okouna říčního. Je však nutno dodat, že například Zylberger a kol. (2014) popisují zvýšenou odpověď přirozeného imunitního systému u zástupců hýla rudoprsého (*Haemorhous mexicanus*) s průzkumnickými a riskantními tendencemi oproti neriskujícím jedincům. Podle mnohých studií existuje souvislost mezi úrovni odvážnosti a aktivitou (Wilson a kol., 1993; Sneddon a kol., 2003; Dahlbom a kol., 2011; Závorka a kol., 2017; Thörnqvist a kol., 2019; Gebauer a kol., 2021). Pozitivní korelaci mezi aktivitou a přirozenou imunitou (aglutinace, reakce typu antigen-protilátka) u andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*) popisují také Callicrate a kol. (2011). Experiment na bezobratlém potemníku moučném (*Tenebrio molitor*) poukazuje na pozitivní korelaci mezi přirozenou imunitou a proaktivním behaviorálním stylem u samic tohoto druhu brouka, přičemž u samců byl pozorován opačný efekt (Monceau a kol., 2017).

Pokud přirozená imunita nedokáže zabránit šíření patogenu v organismu, dochází k aktivaci tzv. adaptivní obrany. Tento fylogeneticky mladší systém obranyschopnosti disponuje mnohem větší variabilitou obranných mechanismů, kdy zároveň oproti přirozené imunitě vytváří specifičtější odpovědi a vyznačuje se tzv. imunologickou pamětí (Tort a kol., 2003; Rauta a kol., 2012; Secombes a Belmonte, 2016). Základní komplementy adaptivní obrany jsou lymfocyty T a B (T a B buňky), jejich receptory (TCR), imunoglobuliny a produkty hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Tyto produkty jsou spojeny se specifickými geny jako *IgM*, *IgT* nebo *interleukin* 1b (Tabulka 1) a jejich následnou expresí (Rauta a kol., 2012). Hlavním cílem této práce bylo zkoumat expresi imunitních genů po nákaze *Aeromonnas sp.* u dvou behaviorálních skupin jedinců okouna říčního (BI a SI) *in vivo*. Tento experiment reflektuje vliv personality na úroveň adaptivního imunitního systému. Podobná studie popisuje expresi imunitních genů *CTS1*, *IRF4*, *KLFL3*, *NOTCH2*, *PIK3R1*, *INRC6B*, *ITGAV*, *PIK3CD* a *PRKCB* u dvou behaviorálních skupin (BI a SI) mořčáka obecného (Sadoul a kol., 2022). Výsledky poukazují na zvýšenou expresi 8/9 imunitních

genů u skupiny BI oproti SI rybám. Podobných výsledků bylo dosaženo také v práci Zhang a kol. (2021), kdy BI jedinci platýse *Parachthys olivaceus* vykázali stabilní regulaci imunitních genů *TNFα*, *IL6* a *IL10* během akutní stresové termální stimulace, zatímco ve skupině SI exemplářů byly pozorovány změny v regulaci všech 3 zmíněných genů. Vliv personality na adaptivní imunitní byl zkoumán i na zástupci plazů z čeledi ještěrkovitých *Iberolacerta monticola* v publikaci Lopéz a kol. (2005), kde autoři popisují pozitivní korelaci mezi odvážností a imunitní odpovědí v podobě PHA testu (imunokompetence zprostředkována T buňkami). Z dostupné literatury lze soudit, že adaptivní imunitní systém může souviset s personalitou u některých druhů ryb, přičemž naše výsledky tuto hypotézu potvrzují, neboť došlo ke znásobení exprese imunitních genů z hlavové ledviny *ccl25*, *Ighm* a *cd74* u BI skupiny okouna říčního oproti SI skupině 1,3, a 7 dní po intraperitoneální injikaci inaktivované nákazy *A. hydrophila*. Ačkoliv naše výsledky naznačují souvislost mezi typem personality a adaptivní imunitou, je třeba navazujícího výzkumu s možností replikace experimentu, ve kterém by bylo umožněno zmíněné korelace hlouběji prozkoumat a vyvodit tak přesnější závěry.

6. Závěr

Hlavním cílem této studie bylo prozkoumat a zhodnotit vliv personality (proaktivní/odvážný/bold/BI vs. reaktivní/plachý/shy/SI) na negativní faktory, které limitují produkční potenciál okouna říčního v intenzivní akvakultuře. Jednalo se především o imunologickou rezistenci vůči nákaze bakterií *Aeromonas* sp. a stresovou toleranci. Prvotním úskalím celého projektu bylo prokázat existenci intra-specifických behaviorálních rozdílů neboli personality u 1000 exemplářů okouna říčního s identickým původem i velikostí. Díky metodickým behaviorálním testům OF a NO bylo úspěšně dosaženo typologické diferenciace na BI a SI. První menšinová část vykázala SI typ chování v obou testech, přičemž majoritní část ryb získala vysoké skóre v OF, ale nízké či nulové v NO. Poslední minoritní část BI obdržela vysoké skóre v obou testech, což indikuje přítomnost výrazných rozdílů ve vzorcích chování u individuálních jedinců okouna říčního. Důležitým

empirickým zjištěním byla nutnost aplikace minimálně dvou po sobě jdoucích behaviorálních testů pro správnou typologickou kategorizaci.

Při testování stresové tolerance bylo zkoumány rozdíly v hladinách krevních stresových ukazatelů ALT, AST, LDH, ALP, glukózy, kortizolu a osmolytů mezi skupinami SI a BI. V tomto testu nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl v hladinách ALT, AST, LDH, ALP, glukózy ani osmolytů mezi SI a BI po stresové stimulaci, nicméně rozdíl v koncentraci kortizolu mezi SI a BI vykázal statistickou významnost. U SI ryb byla naměřena průměrná koncentrace kortizolu 2,5 krát vyšší oproti BI skupině 30 min po ukončení stresové stimulace. Tento výsledek poukazuje na výrazně vyšší odolnost vůči akutnímu stresu u BI oproti SI okouna říčního. Měření hladiny kortizolu 12 h po stimulačním zákroku vykázalo 1,5 násobně vyšší množství kortizolu v krvi u SI oproti BI. Zajímavostí pro nás bylo dosažení maximálního píku kortizolu u SI 30 min po stimulaci, přičemž BI skupina dosáhla svého maxima až 12 h po stimulaci. Nelze opomenout ani rozdíl v kontrolních skupinách, které nebyly nijak stresově stimulované, nicméně průměrná hladina kortizolu v krvi u SI jedinců byla pětkrát vyšší než u skupiny BI. Podle dosažených výsledků lze soudit, že typ personality má vliv na toleranci vůči stresu u okouna říčního, přičemž BI jedince lze považovat za více stresu odolné oproti SI jedincům.

Studium vlivu personality na přirozenou imunitu nepřineslo žádné statisticky významné výsledky, neboť fagocytární kapacita pro BI a SI skupiny nevykázala žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami. Na druhou stranu zkoumání vlivu personality na adaptivní imunitní systém přineslo zajímavé výsledky v podobě regulace genové exprese. Buňky hlavové ledviny stimulované nákazou *A. hydrophila* vykázali zvýšenou expresi imunitních genů *ccl25*, *ighm* a *cd74* u BI oproti SI skupině, což indikuje lepší obranyschopnost adaptivního imunitního systému u BI jedinců. Ačkoliv by bylo třeba navazujícího dlouhodobého výzkumu pro stanovení přesnějších závěrů, tak tato práce přináší zajímavé poznatky o pozitivním vlivu proaktivní personality na odolnost vůči stresu a imunologickou rezistenci u okouna říčního. Do budoucna by tato diplomová práce mohla posloužit jako základ pro rozsáhlejší a detailnější studie personality ryb a jejího vlivu na užitkové vlastnosti, přičemž také disponuje potenciálem poskytnout základní informace pro založení šlechtitelského programu pro okouna říčního.

7. Seznam použité literatury

Abbott, S. L., Cheung, W. K., Janda, J. M., 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. Journal of Clinical Microbiology, 41(6), 2348-2357.

Abbott, S. L., Cheung, W. K., Kroske-Bystrom, S., Malekzadeh, T., Janda, J. M., 1992. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. Journal of Clinical Microbiology, 30(5), 1262-1266.

Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2008. Aplikovaná hydrobiologie. VÚRH JU Vodňany, 256 s.

Adriaenssens, B., Johnsson, J. I., 2013. Natural selection, plasticity and the emergence of a behavioural syndrome in the wild. Ecology Letters, 16(1), 47-55.

Alfonso, S., Sadoul, B., Gesto, M., Joassard, L., Chatain, B., Geffroy, B., Bégout, M. L., 2019. Coping styles in European sea bass: the link between boldness, stress response and neurogenesis. Physiology & Behavior, 207, 76-85.

Ambrožová, J., 2003. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 226 s.

Ariyomo, T. O., Carter, M., Watt, P. J., 2013. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. Behavior Genetics, 43, 161-167.

Austin, B., Austin, D. A., Munn, C. B., 2007. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Chichester: Springer. Vol. 26, p. 552.

Awaiss, A., Kestemont, P., Micha, J. C., 1992. Nutritional suitability of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas for rearing freshwater fish larvae. Journal of Applied Ichthyology, 8(1-4), 263-270.

Balon, E. K., 2004. About the oldest domesticates among fishes. Journal of Fish Biology, 65, 1-27.

Baruš, V., Oliva, O., 1995. Mihulovci a ryby (Vol. 1). Nakl. Akad. Věd České Republiky. 623 s.

Batstone, R. T., 2022. Genomes within genomes: nested symbiosis and its implications for plant evolution. New Phytologist, 234(1), 28-34.

Behrmann-Godel, J., Gerlach, G., Eckmann, R., 2004. Postglacial colonization shows evidence for sympatric population splitting of Eurasian perch (*Perca fluviatilis L.*) in Lake Constance. Molecular Ecology, 13(2), 491-497.

Bell, A. M., 2005. Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback *(Gasterosteus aculeatus*). Journal of Evolutionary Biology, 18(2), 464-473.

Benagli, C., Demarta, A., Caminada, A., Ziegler, D., Petrini, O., Tonolla, M., 2012. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. PLoS One, 7(10), e48441.

Benhaïm, D., Péan, S., Lucas, G., Blanc, N., Chatain, B., Bégout, M.-L., 2012. Early life behavioural differences in wild caught and domesticated sea bass (*Dicentrarchus labrax)*. Applied Animal Behavioral Science. 141, 79–90.

Bertram, M. G., Saaristo, M., Martin, J. M., Ecker, T. E., Michelangeli, M., Johnstone, C. P., Wong, B. B., 2018. Field-realistic exposure to the androgenic endocrine disruptor 17β-trenbolone alters ecologically important behaviours in female fish across multiple contexts. Environmental Pollution, 243, 900-911.

Bláha, M., Šetlíkova, I., Musil, J., Policar, T., 2013. No reason for keeping 0+ perch (*Perca fluviatilis L.*) with the prey fish. Aquaculture International, 21, 883-896.

Bökönyi, S., 2014. Definitions of animal domestication. In The walking larder. Routledge. pp. 22-27.

Boyd, C. E., Hanson, T., 2010. Dissolved-oxygen concentrations in pond aquaculture. Ratio, 2, 42.

Briffa, M., Weiss, A., 2010. Animal personality. Current Biology, R912-R914, 20(21)

Brodie, E. D., Moore, A. J., Janzen, F. J., 1995. Visualizing and quantifying natural selection. Trends in Ecology & Evolution, 10(8), 313-318.

Brown, C., Braithwaite, V. A., 2004. Size matters: a test of boldness in eight populations of the poeciliid *Brachyraphis episcopi*. Animal Behaviour, 68(6), 1325-1329.

Brown, C., Jones, F., Braithwaite, V.A., 2007. Correlation between boldness and body mass in natural populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi.* Journal of Fish Biology 71, 1590–1601.

Brown, C., Burgess, F., Braithwaite, V. A., 2007. Heritable and experiential effects on boldness in a tropical poeciliid. Behavioral Ecology and Sociobiology, 62, 237-243.

Bull, J. J., 1987. Evolution of phenotypic variance. Evolution, 41(2), 303-315.

Burton, G. J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. Best practice & research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 25(3), 287-299.

C.C. Ioannou, M. Payne, J. Krause., 2008. Ecological consequences of the bold–shy continuum: The effect of predator boldness on prey risk. Oecologia, 157 (1), pp. 177-182

Carter, A. J., Feeney, W. E., Marshall, H. H., Cowlishaw, G., Heinsohn, R., 2013. Animal personality: what are behavioural ecologists measuring?. Biological Reviews, 88(2), 465-475.

Castanheira, M. F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L. E., Martins, C. I., 2013. Can we predict personality in fish? Searching for consistency over time and across contexts. PLoS One, 8(4), e62037.

Clutton-Brock, J.,1992. The process of domestication. Mammal Review, 22(2), 79-85.

Coleman, K., Wilson, D. S., 1998. Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context-specific. Animal Behaviour, 56(4), 927-936.

Colwell, R. R., MacDonell, M. T., De Ley, J., 1986. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 36(3), 473-477.

Craig, J.F., 2000. Percid Fishes - Systematics, Ecology and Exploitation. John Wiley and Sons Ltd, United Kingdom, 370 s.

Czesny, S. J., Graeb, B. D., Dettmers, J. M., 2005. Ecological consequences of swim bladder noninflation for larval yellow perch. Transactions of the American Fisheries Society, 134(4), 1011-1020.

Dahlbom, S. J., Lagman, D., Lundstedt-Enkel, K., Sundström, L. F., Winberg, S., 2011. Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*). PloS one, 6(8), e23565.Dall, S. R., Houston, A. I., McNamara, J. M., 2004. The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. Ecology letters, 7(8), 734-739.Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., Charette, S. J., 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. Veterinary Microbiology, 169(1-2), 1-7.

DiBattista, J. D., Levesque, H. M., Moon, T. W., Gilmour, K. M., 2006. Growth depression in socially subordinate rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: more than a fasting effect. Physiological and Biochemical Zoology, 79(4), 675-687.

Dingemanse, N. J., Réale, D., 2005. Natural selection and animal personality. Behaviour, 142(9-10), 1159-1184.

Dörner, H., Berg, S., Jacobsen, L., Hülsmann, S., Brojerg, M., Wagner, A., 2003. The feeding behaviour of large perch *Perca fluviatilis* (L.) in relation to food availability: a comparative study. Hydrobiologia, 506(1), 427-434.

Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. Obecné rybářství. 1. vyd., Informatorium, Praha, 308 s.

Ducos, P., Matthews, M., 2014. Defining domestication: a clarification. In The walking larder. Routledge. pp. 28-30.

Dvořák P., Pyszko M., Velíšek J., Dvořáková Líšková Z., Andreji J., 2014. Anatomie a fyziologie ryb. FROV JU, Vodňany. 189 s.

Dyk, V., 1956. Naše ryby. 4. vyd., Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 339 s

Egloff, M., 1996. Failure of swim bladder inflation of perch, *Perca fluviatilis* L. found in natural populations. Aquatic Sciences, 58, 15-23.

Eissa, N., Wang, H. P., 2016. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. Reviews in Aquaculture, 8(1), 61-88.

Endler, J. A., 1986. Natural selection in the wild, No. 21. Princeton University Press. USA. 354 s.

Eriksson, C.A., Booth, D.J., Biro, P.A., 2010. Personality in two species of temperate damselfish. Marine Ecology Progress Series 420, 273–276.

Fabian, D., Flatt, T., 2012. Life history evolution. Life History Evolution. Nature Education Knowledge 3(10):24

FAO 2023. *Perca fluviatilis* Linnaeus,1758. Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. [Cited Friday, March 10th 2023]. https://www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2298/en

Ferrari, S., Benhaïm, D., Colchen, T., Chatain, B., Bégout, M.L., 2014. First links between self-feeding behaviour and personality traits in European seabass: *Dicentrarchus labrax*. Applied Animal Behavioral Science. 161, 131–141.

Ferrari, S., Horri, K., Allal, F., Vergnet, A., Benhaim, D., Vandeputte, M., Begout, M. L., 2016. Heritability of boldness and hypoxia avoidance in European seabass, *Dicentrarchus labrax*. PloS one, 11(12).

Fink, G., 2010. Stress: Definition and history. Stress science: Neuroendocrinology, 3(9), 3-14.

Fink, G., 2016. Stress, definitions, mechanisms, and effects outlined: Lessons from anxiety. In Stress: Concepts, cognition, emotion, and behavior. Academic Press. pp. 3-11

Fiogbé, E. D., Kestemont, P., 2003. Optimum daily ration for Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. reared at its optimum growing temperature. Aquaculture, 216(1-4), 243-252.

Flajšhans, M., 2018. Genetické zdroje ryb. Náš chov: časopis chovatelů hospodářských zvířat, volume 2018, issue: 12.

Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č, 91, s 23.

Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen-Šlechtová, V.,Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. FROV JU, Vodňany, 306 s.

Fontaine, P., Kestemont, P., Mélard, C., 2008. Farming of Eurasian perch-Broodstock Management. In Farming of Eurasian perch-chapter 3 pp. 16-21.

Fontaine, P., Tamazouzt, L., Terver, D., Georges, A., 1993. Actual state of production of perch: problems and prospects: I. Mass rearing potentialities of the common perch under controlled conditions. Aquaculture of Freshwater Species (except salmonids), 20, 46-48.

Fontaine, P., Teletchea, F., 2019. Domestication of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). In Animal domestication. IntechOpen. pp 1-24.

Frič, A., 1859. České ryby. tisk A. František Řivnáč, Rakousko – Uhersko, 56 s.

Frost, A. J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. J., Sneddon, L. U., 2007. Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness?. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274(1608), 333-339.

Garrity, G.,2007. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer Science & Business Media. (1203)556-587.

Gebauer, T., Gebauer, R., Palińska-Żarska, K., Císař, P., Movchan, O., Tomášek, O., Stejskal, V., 2021. Assessment of behavioural and physiological traits as indicators of suitability for European perch aquaculture. Aquaculture, 544, 737048.

Ghenghesh, K. S., El-Ghodban, A., Dkakni, R., Abeid, S., Altomi, A., Abdussalam, T., Marialigeti, K., 2001. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96, 169-173.

Gjedrem, T., 1975. Possibilities for genetic gain in salmonids. Aquaculture, 6(1), 23-29.

Gjedrem, T., Baranski, M., 2010. Selective breeding in aquaculture: an introduction Vol. 10. Springer Science & Business Media. Germany. 221 s.

Gjedrem, T., Robinson, N., Rye, M., 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. Aquaculture, 350, 117-129.

Gordon, S., 2016. Phagocytosis: an immunobiologic process. Immunity, 44(3), 463-475.

Gorissen, M., Flik, G., 2016. The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation-physiological view. In Fish physiology. Academic Press. Vol. 35, pp. 75-111.

Griffiths, W. E., 1976. Food and feeding habits of European perch in the Selwyn River, Canterbury, New Zealand. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 10(3), 417-428.

Grignard, J. C., Mélard, C., Kestemont, P., 1996. A preliminary study of parasites and diseases of perch in an intensive culture system. Journal of Applied Ichthyology, 12(3-4), 195-199.

Gugger, P. F., Sugita, S., 2010. Glacial populations and postglacial migration of Douglas-fir based on fossil pollen and macrofossil evidence. Quaternary Science Reviews, 29(17-18), 2052-2070.

Guma'a, S. A., 1978. The food and feeding habits of young perch, *Perca fluviatilis*, in Windermere. Freshwater Biology, 8(2), 177-187.

Hanel, L.,1992. Poznáváme naše ryby. Brázda, Praha. 285 s.

Harcourt, J. L., Sweetman, G., Johnstone, R. A., Manica, A., 2009. Personality counts: the effect of boldness on shoal choice in three-spined sticklebacks. Animal Behaviour, 77(6), 1501-1505.

Hartman, P., Regenda, J., 2016. Praktika v rybníkářství. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 375 s.

Hershberger, W. K., 1990. Selective breeding in aquaculture. Food Reviews International, 6(3), 359-372.

Hewitt, G. M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biological Journal of the Linnean Society, 58(3), 247-276.

Hiney, M., Smith, P., Bernoth, E. M., 1997. Covert *Aeromonas salmonicida* infections. In Furunculosis. Academic Press. pp. 54-97.

Hirayama, D., Iida, T., Nakase, H., 2017. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. International Journal of Molecular Sciences, 19(1), 92.

Chervet, N., Zöttl, M., Schürch, R., Taborsky, M., Heg, D., 2011. Repeatability and heritability of behavioural types in a social cichlid. International Journal of Evolutionary Biology, 2011, 15 p.

Chovatiya, R., Medzhitov, R., 2014. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. Molecular Cell, 54(2), 281-288.

Chowdhury, M. A., Yamanaka, H., Miyoshi, S., Shinoda, S., 1990. Ecology of mesophilic *Aeromonas* spp. in aquatic environments of a temperate region and relationship with some biotic and abiotic environmental parameters. Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin= International Journal of Hygiene and Environmental Medicine, 190(4), 344-356.

Churchill, F. B., 1974. William Johannsen and the genotype concept. Journal of the History of Biology, 5-30.

Iwama, G. K., Afonso, L. O., Vijayan, M. M., 1998. Stress in fish. Annals-New York Academy of Sciences, 851, 304-310.

Jacquemond, F., 2004. Separated breeding of perch fingerlings (*Perca fluviatilis* L.) with and without initial inflated swim bladder: comparison of swim bladder development, skeleton conformation and growth performances. Aquaculture, 239(1-4), 261-273.

J.W. Jolles, A. Fleetwood-Wilson, S. Nakayama, M.C. Stumpe, R.A. Johnstone, A. Manica., 2015. The role of social attraction and its link with boldness in the collective movements of three-spined sticklebacks Animal Behaviour, 99, pp. 147-153

Janda, J. M., Abbott, S. L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical Microbiology Reviews, 23(1), 35-73.

Jolles, J. W., Briggs, H. D., Araya-Ajoy, Y. G., Boogert, N. J., 2019. Personality, plasticity and predictability in sticklebacks: bold fish are less plastic and more predictable than shy fish. Animal Behaviour, 154, 193-202.

Jones, K.A., Godin, J.G.J., 2010. Are fast explorers slow reactors? Linking personality type and anti-predator behaviour. Proceedings of the Royal Society B. 277, 625-632.

Kapoor, B., C. Magnhagen, V. Braithwaite., E. Forsgren., 2008 Enfield, NH: Science Publishers. Fish behaviour (p. 600)

Kestemont, P., Mélard, C., Fiogbe, E., Vlavonou, R., Masson, G., 1996. Nutritional and animal husbandry aspects of rearing early life stages of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Journal of Applied Ichthyology, 12(3-4), 157-165.

Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Mélard, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Baras, E., 2003. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. Aquaculture, 227(1-4), 333-356.

Kestemont, P., Rougeot, C., Musil, J., Toner, D., 2008. Farming of Eurasian perch-Larval and Juvenile Production. In Farming of Eurasian perch-chapter 5. pp. 30-41

Killen, S. S., Marras, S., Metcalfe, N. B., McKenzie, D. J., Domenici, P., 2013. Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. Trends in Ecology & Evolution, 28(11), 651-658.

Kincaid, H. L., 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. Aquaculture, 33(1-4), 215-227.

King, A. J., Fürtbauer, I., Mamuneas, D., James, C., Manica, A., 2013. Sex-differences and temporal consistency in stickleback fish boldness. PLoS One, 8(12), e81116.

Kocour, M., Flajšhans, M., Gela, D., Rodina, M., Hulák, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2010. Metodické postupy při aplikaci selekčního programu zaměřeného na zvyšování užitkovosti ryb v podmínkách českého rybářství. Edice Metodik VÚRH Vodňany, FROV JU Vodňany, č, 103, 86.

Kolářová, J., Svobodová, Z., 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický. Edice metodik č. 88, 33 s.

Kortet, R., Vainikka, A., Janhunen, M., Piironen, J., Hyvärinen, P., 2014. Behavioral variation shows heritability in juvenile brown trout *Salmo trutta*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 68, 927-934.

Kouřil, J., 2013. Recirkulační akvakulturní systémy. Sborník příspěvků z workshopu "Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu", Mendlova univerzita v Brně, Brno, 14-19.

Kouřil, J., 2015. Úvod do intenzivního chovu ryb včetně přehledu RAS v České republice. Potenciál recirkulačních akvakulturních systémů (RAS) pro české produkční rybářství, FROV JU, Vodňany. 53 s.

Kouřil, J., Hamáčková, J., Lepič, P., Mareš, J., 2002. Poloumělý a umělý výtěr okouna říčního a odchov jeho raného plůdku. Edice metodik FROV JU č, 68. 13 s.

Król, J., Zieliński, E., 2015. Effects of stocking density and weaning age on cannibalism, survival and growth in European perch *Perca fluviatilis* larvae. Polish Journal of Natural Sciences, 30(4), 403-415.

Kroupova, H., Stejskal, V., Kouril, J., Machova, J., Piackova, V., Zuskova, E., 2013. A wide difference in susceptibility to nitrite between Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) and largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lac.). Aquaculture International, 21, 961-967.

Lagesson, A., Saaristo, M., Brodin, T., Fick, J., Klaminder, J., Martin, J. M., & Wong, B. B. M. 2019. Fish on steroids: temperature-dependent effects of 17β-trenbolone on predator escape, boldness, and exploratory behaviors. Environmental Pollution, 245, 243-252.

Larson, G., Fuller, D. Q., 2014. The evolution of animal domestication. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 45, 115-136.

Le Fevre, M., Matheny, J., Kolt, G. S., 2003. Eustress, distress, and interpretation in occupational stress. Journal of Managerial Psychology, 18(7), 726-744.

Levine, S., 1985. A definition of stress? Animal stress, 51-69.

Long, T., Yuan, M., Yuan, H., Lu, W., 2021. Heritability of animal individuality in fish: Distribution, behavior, metabolism and stress response. Aquaculture, 536, 736415.

López, P., Hawlena, D., Polo, V., Amo, L., Martín, J., 2005. Sources of individual shy–bold variations in antipredator behaviour of male Iberian rock lizards. Animal Behaviour, 69(1), 1-9.

Magnhagen, C., Borcherding, J., 2008. Risk-taking behaviour in foraging perch: does predation pressure influence age-specific boldness?. Animal Behaviour, 75(2), 509-517.

Magnhagen, C., Staffan, F., 2005. Is boldness affected by group composition in young-of-the-year perch (*Perca fluviatilis*) ? Behavioral Ecology and Sociobiology, 57, 295-303.

Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology, 20(2), 137-151.

Magurran, A. E. (1986). Individual differences in fish behaviour. The behaviour of teleost fishes, Springer New York. 553 p, (338-365).

Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M., Prunet, P., Magnoni, L. J., 2020. Welfare and stressors in fish: Challenges facing aquaculture. Frontiers in Physiology, 11, 162.

Mazué, G. P., Dechaume-Moncharmont, F. X., Godin, J. G. J., 2015. Boldness–exploration behavioral syndrome: interfamily variability and repeatability of personality traits in the young of the convict cichlid (*Amatitlania siquia*). Behavioral Ecology, 26(3), 900-908.

McBryan, T. L., Anttila, K., Healy, T. M., Schulte, P. M., 2013. Responses to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. Integrative and Comparative Biology, 53(4), 648-659.

Meijer, M. L., Lammens, E. H. R. R., Raat, A. J. P., Breteler, J. K., Grimm, M. P.,1995. Development of fish communities in lakes after biomanipulation. Netherland Journal of Aquatic Ecology, 29(1), 91-101.

Mélard, C., Kestemont, P., Baras, E., 1995. First results of european perch (*Perca fluviatilis*) intensive rearing in tank – effect of temperature and size granding on growth. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, (336), 19-27.

Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. Diseases of Aquatic Organisms, 120(1), 49-68.

Midtlyng, P. J., Storset, A., Michel, C., Slierendrecht, W. J., Okamoto, N., 2002. Breeding for disease resistance in fish. Bulletin-European Association of Fish Pathologist. 22(2), 166-172.

Michel, C., 1981. A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis* L.) in an alpine lake: isolation and preliminary study of the causative organism. Journal of Wildlife Diseases, 17(4), 505-510.

Milla, S., Pasquet, A., El Mohajer, L., Fontaine, P., 2021. How domestication alters fish phenotypes. Reviews in Aquaculture, 13(1), 388-405.

Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J. G., Fusté, M. C., 2002. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. Journal of Applied Microbiology, 93(3), 420-430.

Mittelbach, G. G., Ballew, N. G., Kjelvik, M. K., 2014. Fish behavioral types and their ecological consequences. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 71(6), 927-944.

Moore, C. E., 2019. Changes in antibiotic resistance in animals. Science, 365(6459), 1251-1252.

Monceau, K., Dechaume-Moncharmont, F. X., Moreau, J., Lucas, C., Capoduro, R., Motreuil, S., Moret, Y., 2017. Personality, immune response and reproductive success: An appraisal of the pace-of-life syndrome hypothesis. Journal of Animal Ecology, 86(4), 932-942.

Mount, J., Bennett, W., Durand, J., Fleenor, W., Hanak, E., Lund, J., Moyle, P., 2012. Aquatic ecosystem stressors in the Sacramento-san Joaquin Delta. San Francisco: Public Policy Institute of California. 24 p.

Murphy, K. E., Pitcher, T. J., 1991. Individual behavioural strategies associated with predator inspection in minnow shoals. Ethology, 88(4), 307-319.

Nakajima, T., Hudson, M. J., Uchiyama, J., Makibayashi, K., Zhang, J., 2019. Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. Nature Ecology & Evolution, 3(10), 1415-1418.

Nesbø, C. L., Fossheim, T., Vøllestad, L. A., Jakobsen, K. S., 1999. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. Molecular Ecology, 8(9), 1387-1404.

Öberg, O. 2008. Perch farming, Swedish experience. In: P. Fontaine, P. Kestemont, F. Teletchea and N. Wang, (Eds.), Percid Fish Culture - From Research to Production, Proceeding of Abstracts and Short Communications of the Workshop, Namur, Belgium: 71-74.

Orgogozo, V., Morizot, B., Martin, A., 2015. The differential view of genotype–phenotype relationships. Frontiers in Genetics, pp 179.

Oswald, M. E., Drew, R. E., Racine, M., Murdoch, G. K., Robison, B. D., 2012. Is behavioral variation along the bold-shy continuum associated with variation in the stress axis in zebrafish?. Physiological and Biochemical Zoology, 85(6), 718-728.

Øverli, Ø., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Øverli, E., Winberg, S., 2002. Differences in behaviour between rainbow trout selected for high-and low-stress responsiveness. Journal of Experimental Biology, 205(3), 391-395.

Øverli, Ø., Korzan, W. J., Höglund, E., Winberg, S., Bollig, H., Watt, M., Summers, C. H. 2004. Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. Hormones and Behavior, 45(4), 235-241.

Øverli, Ø., Sørensen, C., Nilsson, G. E., 2006. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty?. Physiology & Behavior, 87(3), 506-512.

Palíková, M., Piačková V., Navrátil S., Zusková E., Papežíková I., Kolářová J., Pojezdal Ľ., Dyková I., Scholz T., Gelnar M., Svobodová Z., Řehulková E., Mareš J., Modrá H., Blažek R., Veselý T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 466 s.

Pankhurst, N. W., 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. General and Comparative Endocrinology, 170(2), 265-275.

Parker, J. L., Shaw, J. G., 2011. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. Journal of Infection, 62(2), 109-118.

Peuhkuri, N., 1997. Size-assortative shoaling in fish: the effect of oddity on foraging behaviour. Animal Behaviour, 54(2), 271-278.

Pickering, A. D.,1993. Growth and stress in fish production. In Genetics in Aquaculture. pp. 51-63.

Pimahkin, A., 2012. Color variability of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): a review. 1, Proceedings in Advanced Research in Scientific Areas. 1564-1569

Policar, T., Alavi, S. M. H., Stejskal, V., Křišťan, J., Kouřil, J., 2011. Umělý a poloumělý výtěr okouna říčního (*Perca fluviatilis*) používaný k masové produkci embryí. Edice metodik, FROV JU Vodňany, č, 117, 24 s.

Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Svačina, P., 2015. Metody a postupy využívané v intenzivní akvakultuře. Potenciál recirkulačních akvakulturních systémů (RAS) pro české produkční rybářství. Sborník příspěvků z odborného semináře, Vodňany, 1(2), 62-77.

Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., 2014. Optimalizace umělé inkubace jiker u okouna říčního (P*erca fluviatilis* L.) v kontrolovaných podmínkách chovu. Edice metodik, FROV JU, Vodňany, č, 159, 33 s.

Policar, T., Kouřil, J., Hamáčková, J., 2008. Induced artificial and semiartificial spawning by Supergestran IN perch (*Perca fluviatilis* L.) under different temperature. Percid Fish Culture, 124.

Policar, T., Stejskal, V., Bláha, M., Alavi, S. M. H., Kouřil, J., 2009. Technologie intenzivního chovu okouna říčního (*Perca fluviatilis* L.). Edice Metodik, FROV JU Vodňany, č. 89, 51 s.

Popova, O. A., Sytina, L. A., 1977. Food and feeding relations of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and pikeperch (*Stizostedion lucioperca*) in various waters of the USSR. Journal of the Fisheries Board of Canada, 34(10), 1559-1570.

Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 274(2-4), 225-231.

Power, M., 1997. Assessing the effects of environmental stressors on fish populations. Aquatic Toxicology, 39(2), 151-169.

Price, E. O., 1984. Behavioral aspects of animal domestication. The Quarterly Review of Biology, 59(1), 1-32.

Price, E. O., 1999. Behavioral development in animals undergoing domestication. Applied Animal Behaviour Science, 65(3), 245-271.

Price, E. O., 2002. Animal domestication and behavior. Cabi. Chapter1 s. pp 10-13.

Purugganan, M. D.,2022. What is domestication?. Trends in Ecology & Evolution, 37, Issue 8, 663-671.

R. Spence, R.J. Wootton, I. Barber, M. Przybylski, C. Smith., 2013 Ecological causes of morphological evolution in the three-spined stickleback Ecology and Evolution, 3 (6), pp. 1717-1726

Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J., Möllby, R. 2002. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Applied and Environmental Microbiology, 68(2), 650-655.

Rauta, P. R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. Immunology Letters, 148(1), 23-33.

Riesch, R., Duwe, V., Herrmann, N., Padur, L., Ramm, A., Scharnweber, K., Plath, M., 2009. Variation along the shy–bold continuum in extremophile fishes (P*oecilia mexicana, Poecilia sulphuraria*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 63(10), 1515-1526.

Rosauer, D. R., Biga, P. R., Lindell, S. R., Binkowski, F. P., Shepherd, B. S., Palmquist, D. E., Goetz, F. W., 2011. Development of yellow perch (*Perca flavescens*) broodstocks: initial characterization of growth and quality traits following grow-out of different stocks. Aquaculture, 317(1-4), 58-66.

Rosburg, A. J., 2017. Growth Potential and Genetic Diversity of Yellow Perch in South Dakota. South Dakota State University. pp 21-24.

Rottmann, R. W., Francis-Floyd, R., Durborow, R., 1992. The role of stress in fish disease . Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center. p. 474

Rougeot, C., Bervillers, C., Prignon, C., Gustin, D., Guidice, M.D., Vandecan, M., Mélard, C., 2007. Growth improvement of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) using domesticated strains under intensive rearing conditions. Aquaculture, 272 Supplement: S306–S306.

Rowland, W. J., 1999. Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. Environmental Biology of Fishes, 56, 285-305.

Rupp, M., Knüsel, R., Sindilariu, P. D., Schmidt-Posthaus, H., 2019. Identification of important pathogens in European perch (*Perca fluviatilis*) culture in recirculating aquaculture systems. Aquaculture International, 27(4), 1045-1053.

Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M. G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C. P., Brodin, T., 2019. Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch

(*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment. Science of the Total Environment, 655, 1311-1320.

Sadoul, B., Alfonso, S., Goold, C., Pratlong, M., Rialle, S., Geffroy, B., Bégout, M. L., 2022. Transcriptomic profiles of consistent risk-taking behaviour across time and contexts in European sea bass. Proceedings of the Royal Society B, Volume 289, Issue 1975, 23 p.

Salonen, A., Peuhkuri, N., 2006. The effect of captive breeding on aggressive behaviour of European grayling, *Thymallus thymallus*, in different contexts. Animal Behaviour, 72(4), 819-825.

Secombes, C. J., Fletcher, T. C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases, 2, 53-71.

Secombes, C. J., Belmonte, R., 2016. Overview of the fish adaptive immune system. Fish Vaccines, 35-52.

Selye, H., 1950. Stress. Montreal: Acta, 1955. 239 s.

Selye, H., 1956. What is stress. Metabolism, 5(5), 525-530.

Schjolden, J., Backström, T., Pulman, K. G., Pottinger, T. G., Winberg, S., 2005. Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness. Hormones and Behavior, 48(5), 537-544.

Schreck, C. B., Tort, L., 2016. The concept of stress in fish. In Fish Physiology. Adacemic Press. Vol.35, pp.1-34.

Schreck, C. B., Tort, L., Farrell, A. P., Brauner, C. J., 2016. Biology of stress in fish. Academic Press. 587 s.

Schulz, D., 1980. Erythrodermatitis of carp: studies of the mode of infection. In Fish Diseases: Third COPRAQ-Session. Springer Berlin Heidelberg. pp. 137-144.

Sies, H., 2000. What is oxidative stress? Springer US. pp. 1-8.

Sih, A., Bell, A. M., Johnson, J. C., Ziemba, R. E., 2004. Behavioral syndromes: an integrative overview. The Quarterly Review of Biology, 79(3), 241-277.

Sih, A., Bell, A. Johnson, J.C., 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. Trends in Ecology and Evolution, 19, 372–378.

Skov, P. V., 2018. Boldness in fishes: A selection tool for aquaculture or a personality type with no apparent return? DTU Aqua, Technical university of Denmark, 31 p.

Skrzypczak, A., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kucharczyk, D., Furgala-Selezniow, G., 1998. Feeding habits of larval Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (Percidae). Italian Journal of Zoology, 65(S1), 243-245.

Smyly, W. J. P., 1952. Observations on the food of the fry of perch (*Perca fluviatilis* Linn.) in Windermere. In Proceedings of the Zoological Society of London .Vol. 122, No. 2, pp. 407-416.

Sneddon, L.U., 2003. The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. Journal of Fish Biology. 62, 971–975.

Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., Gentle, M. J., 2003. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. The Journal of Pain, 4(8), 431-440.

Sober, E., Wilson, D. S., 2011. Adaptation and natural selection revisited. Journal of Evolutionary Biology, 24(2), 462-468.

Sorgeloos, P., Persoone, G., 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. II. Hatching and culturing of the brine shrimp, *Artemia salina* L. Aquaculture, 6(4), 303-317.

Summerfelt R, C., 1996. Intensive aquacuture of walley fry. In : R.C. Summerfelt (Eds.) Walley culture manual. NRAC culture series 101, North Central Region Aquaculture CentrePublication office, Iowa State University, Arnes, pp. 161 - 185

Stamps, J. A., 2007. Growth-mortality tradeoffs and 'personality traits' in animals. Ecology Letters, 10(5), 355-363.

Stejskal, V., Kouřil, J., 2006. Potravní adaptace plůdku okouna na podmínky intenzivního chovu. Buletin VÚRH Vodňany, 42(1), 18-24.

Stejskal, V., Policar, T., Bláha, M., Křišťan, J., 2010. Produkce tržního okouna říčního (*Perca fluviatilis*) kombinací rybničního a intenzivního chovu. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany. 36 s.

Stepien, C. A., Behrmann-Godel, J., Bernatchez, L., 2015. Evolutionary relationships, population genetics, and ecological and genomic adaptations of perch (*Perca*). Biology of perch, 7-46.

Steptoe, A., 1991. Invited review: The links between stress and illness. Journal of Psychosomatic Research, 35(6), 633-644.

Stirling, D. G., Réale, D., Roff, D. A., 2002. Selection, structure and the heritability of behaviour. Journal of Evolutionary Biology, 15(2), 277-289.

Susanne, C., 1977. Heritability of anthropological characters. Human Biology, 573-580.

Švátora, M., 1986. Okoun říční. Naše vojsko, n. p., Praha, 82 s.

Teletchea, F., 2021. Fish domestication in aquaculture: 10 unanswered questions. Animal Frontiers, 11(3), 87-91.

Teletchea, F., 2019a. Fish domestication: an overview. In: F.Teletchea, editor, Animal domestication. London (UK): Intechopen. p. 69–90.

Thörnqvist, P. O., McCarrick, S., Ericsson, M., Roman, E., & Winberg, S., 2019. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. Behavioural Brain Research, 359, 927-934.

Thorpe, J., 1977. Synopsis of biological data on the perch, *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1785 and *Perca flavescens* Mitchill, 1814. FAO Fisheries Synopses (FAO). no. 113.

Thünken, T., Bakker, T. C., Baldauf, S. A., Kullmann, H., 2007. Active inbreeding in a cichlid fish and its adaptive significance. Current Biology, 17(3), 225-229.

Toner, D., Rougeot, C., 2008. Farming of Eurasian perch: Volume 1: juvenile production. Farming of Eurasian perch: Volume 1: Juvenile production. No. 24, 82 p.

Toner, D.,2015. The market for Eurasian perch. Biology and culture of percid fishes: Principles and Practices, 865-879.

Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Inmunologia, 22(3), 277-286.

Toomey, L., Bláha, M., Mauduit, E., Vanina, T., Baratçabal, M., Ledoré, Y., Lecocq, T., 2019. When behavioural geographic differentiation matters: inter-populational comparison of aggressiveness and group structure in the European perch. Aquaculture International, 27, 1177-1191.

Toomey, L., Lecocq, T., Pasquet, A., Fontaine, P., 2021. Finding a rare gem: Identification of a wild biological unit with high potential for European perch larviculture. Aquaculture, 530, 735807.

Tribiloustova, E., 2005. Freshwater fish for European markets. Globefish Research Programme, I, 82.

Trut, L., Oskina, I., Kharlamova, A., 2009. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. Bioessays, 31(3), 349-360.

Van Der Boon, J., Van Den Thillart, G. E., Addink, A. D., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 100(1), 47-53.

Vandeputte, M., 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. Aquatic Living Resources, 16(5), 399-407.

Vanina, T., Gebauer, R., Toomey, L., Stejskal, V., Rutegwa, M., Kouřil, J., Lecocq, T., 2019. Genetic and aquaculture performance differentiation among wild allopatric populations of European perch (Percidae, *Perca fluviatilis*). Aquaculture, 503, 139-145.

Večeřová-Procházková, A., Honzák, R., 2008. Stres, eustres a distres. Interní medicína pro praxi, 10(4), 188-192.

Vigne, J. D., Peters, J., Helmer, D., 2005. The first steps of animal domestication. New archaeozoological approaches in New methods and the first steps of mammal domestication . Proceedings of the 9th International Council of Archeozoology.(Durham, 23rd-28th August 2002). Oxford: Oxbow Books : 1-16.

Vlavonou, R. S., Masson, G., Moreteau, J. C., 1999. Growth of *Perca fluviatilis* larvae fed with *Artemia* spp. nauplii and the effects of initial starvation. Journal of Applied Ichthyology, 15(1), 29-33.

Waas, J.R., Colgan, P.W., 1994. Male sticklebacks can distinguish between familiar rivals on the basis of visual cues alone. Animal Behaviour. 47, 7–13.

Wahli, T., Burr, S. E., Pugovkin, D., Mueller, O., Frey, J., 2005. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. Journal of Fish Diseases, 28(3), 141-150.

Wang, S., Hard, J. J., Utter, F., 2002. Salmonid inbreeding: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 11, 301-319.

Ward, A.J.W., Thomas, P., Hart, P.J.B., Krause, J., 2004. Correlates of boldness in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). Behavioral Ecology and Sociobiology. 55, 561–568.

Watson, L., 2008. The European market for perch (*Perca fluviatilis*). In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N., (eds.): Percid Fish Culture - From Research to Production. Proceeding of abstracts and short communications of the workshop, Namur, Belgium, 10–14.

Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews, 77(3), 591-625.

White, J. R., Meekan, M. G., McCormick, M. I., Ferrari, M. C., 2013. A comparison of measures of boldness and their relationships to survival in young fish. PLoS One, 8(7).

Wilson, A. D., Stevens, E. D., 2005. Consistency in context-specific measures of shyness and boldness in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Ethology, 111(9), 849-862.

Wilson, D. S., 1998. Adaptive individual differences within single populations. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 353(1366), 199-205.

Wilson, D. S., Clark, A. B., Coleman, K., Dearstyne, T., 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. Trends in Ecology & Evolution, 9(11), 442-446.

Wilson, D. S., Coleman, K., Clark, A. B., Biederman, L., 1993. Shy-bold continuum in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*): An ecological study of a psychological trait. Journal of Comparative Psychology, 107(3), 250.

Wojczynski, M. K., Tiwari, H. K., 2008. Definition of phenotype. Advances in Genetics, 60, 75-105.

Yanong, R. P., Pouder, D. B., Falkinham III, J. O., 2010. Association of mycobacteria in recirculating aquaculture systems and mycobacterial disease in fish. Journal of Aquatic Animal Health, 22(4), 219-223.

Zalewski, M., Brewinska-Zaraś, B., Frankiewicz, P., Kalinowski, S., 1990. The potential for biomanipulation using fry communities in a lowland reservoir: concordance between water quality and optimal recruitment. Hydrobiologia, 200, 549-556.

Závorka, L., Koeck, B., Cucherousset, J., Brijs, J., Näslund, J., Aldvén, D., Höjesjö, J., Fleming, I.A., Johnsson, J.I., 2017. Co-existence with non-native brook trout breaks down the integration of phenotypic traits in brown trout parr. Functional Ecology. 31, 1582-1591.

Zeder, M. A., 2012. The domestication of animals. Journal of Anthropological Research, 68(2), 161-190.

Zeder, M. A., 2015. Core questions in domestication research. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(11), 3191-3198.

Zylberberg, M., Klasing, K. C., Hahn, T. P., 2014. In house finches, *Haemorhous mexicanus*, risk takers invest more in innate immune function. Animal Behaviour, 89, 115-122.

8. Abstrakt

Existenci intra-specifických rozdílů v životních strategií zvířat popisuje tzv. proaktivní a reaktivní personalita, kdy jsou proaktivní jedinci charakterizováni vyšší ochotou riskovat a prozkoumávat nová prostředí oproti jedincům reaktivním, kteří volí pasivní a inaktivní přístup k novým výzvám v prostředí. Tento koncept je u ryb často definován jako tzv. kontinuum plachý - odvážný, přičemž odvážný (bold individual = BI) jedinec vykazuje proaktivní chování a pro plachého (shy individual = SI) jedince je typický přístup reaktivní. Bylo napsáno již několik studií, které potvrzují vliv personality na užitkové vlastnosti ryb jako je růst u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) nebo tolerance vůči stresu u lososa obecného (*Salmo salar*) či pstruha duhového (*Onchorhyncus mykkis*). Cílem našeho experimentu bylo popsat existenci souvislostí mezi personalitou a imunologickou rezistencí vůči nákaze bakterií *Aeromonas* sp. a tolerancí vůči stresu. V našem experimentu bylo 1000 jedinců okouna říčního podrobeno dvěma behaviorálním testům na personalitu (open field, počet cm uplavaných za 30 min; novel object, zkoumání zón blízkosti neznámého objektu). Bylo vybráno top 20 BI ryb (nejvyšší hodnoty v obou testech) a top 20 SI ryb (nulové hodnoty v obou testech). Zástupci obou behaviorálních skupin BI a SI byli následně podrobeni indukčnímu stresovému testu (snížení hladiny v nádrži na úroveň 5 cm nad dorzální ploutví) a poté byly měřeny hodnoty metabolické aktivity (ALT, AST, ALP, LDH, glukózy, osmolytů a kortizolu), přičemž jediný signifikantní rozdíl vykázala koncentrace kortizolu (2,5 násobně vyšší u SI oproti BI 30 min po stimulaci a 5 násobně vyšší u SI oproti BI v kontrole). Při testování imunologické rezistence byla prvně hodnocena fagocytární kapacita (přirozená imunita), přičemž nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi SI a BI skupinami. Dále byly buňky hlavové ledviny a peritonea zástupců BI a SI skupin *in vivo* stimulovány nákazou *A.salmonicida* a následně byla extrahována RNA k analýze genové exprese 46 imunitních genů 1,3 a 7 dní po stimulaci pro zhodnocení odpovědi adaptivního imunitního systému. Byl pozorován 1,2-1,3 násobný nárůst hladiny genu *ighm* v hlavové ledvině u BI oproti SI 1 den po stimulaci, přičemž hladina totožného genu vykázala 2,2 násobný nárůst u BI oproti SI v peritoneálních buňkách. Dále byl pozorován nárust hladin genů u BI oproti SI *cc125* (1,2 násobný v hlavové ledvině) a *Cd74* (1,3-1,5 násobný v peritoneu i hlavové ledvině). Z výsledků této práce plyne, že personalita má významný vliv na toleranci vůči stresu, nemá vliv na přirozenou imunitu, nicméně ovlivňuje úroveň

adaptivního imunitního systému u okouna říčního, přičemž BI jedinci se jeví jako odolnější vůči stresu i nákaze *Aeromonas hydrophila*.

Klíčová slovíčka: okoun říční, personalita, behaviorální testy, reaktivní/plachý/SI, proaktivní/odvážný/BI, stresová tolerance, imunologická rezistence, *Aeromonas* sp.

9. Abstract

The existence of intra-specific differences in the life strategies of animals is described by the so-called proactive and reactive personality, where proactive individuals are characterized by a higher willingness to take risks and explore new environments compared to reactive individuals who choose a passive and inactive approach to new challenges in the environment. This concept is often defined in fish as the shy-bold continuum, with the bold individual (BI) exhibiting proactive behaviour and the shy individual (SI) typically exhibiting a reactive approach. Several studies have already been written confirming the influence of personality on fish performance traits, such as growth in three spined-sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) or stress tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Onchorhyncus mykkis*). The aim of our experiment was to describe the existence of a link between personality and immunological resistance to *Aeromonas* sp. infection and stress tolerance in European perch. In our experiment, 1000 European perch were subjected to two behavioral tests for personality (open field, number of cm swum in 30 min; novel object, exploring zones of proximity to an unknown object). The top 20 BI fish (highest values in both tests) and the top 20 SI fish (zero values in both tests) were selected. Representatives of both behavioral groups BI and SI were then subjected to an induction stress challenge (lowering the tank level to 5 cm above the dorsal fin) and then metabolic activity values (ALT, AST, ALP, LDH, glucose, osmolytes, and cortisol) were measured, with the only significant difference shown by cortisol concentration (2.5-fold higher in SI compared to BI 30 min after stimulation and 5-fold higher in SI compared to BI in control). In immunological resistance testing, phagocytic capacity (natural immunity) was assessed first, and no significant differences were observed between SI and BI groups. Next, head kidney and peritoneal cells from representatives of the BI and SI groups were stimulated *in vivo* with *A. salmonicida* infection and then RNA was extracted to analyze gene expression of 46 immune genes 1, 3 and 7 days after stimulation to assess the adaptive immune system response. A 1.2-1.3-fold increase in the level of the *ighm* gene was observed in the head kidney of BI versus SI 1 day after stimulation, while the level of the identical gene showed a 2.2-fold increase in BI versus SI peritoneal cells. Furthermore, an increase in gene levels was observed in BI compared with SI for *cc125* (1.2-fold in the head kidney) and *Cd74* (1.3-1.5-fold in both peritoneum and head kidney). The results of this work suggest that personality

has a significant effect on stress tolerance, does not affect natural immunity, but does affect the level of the adaptive immune system in European perch, with BI individuals appearing to be more resistant to both stress and infection by *Aeromonas hydrophila*.

Key words: European perch, personality, behavioral tests, reactive/shy/SI, proactive/bold/BI, stress tolerance, imunological resistence, *Aeromonas* sp.