Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Diplomová práce

Produkce potenciálního feromonu PF2α u samic bolena dravého (*Leuciscus aspius*) a jeho specifická funkce na chování samců

Bc. Kateřina Boborová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Marek Šmejkal, Ph.D.

2021

Abstrakt

Feromony jsou látky, které živočichové používají ke komunikaci jak v suchozemském, tak ve vodním prostředí. Dělí se do několika kategorií podle svého složení a působení na chování zvířat, zejména na reprodukci. V rámci ryb jsou zkoumány zejména modelové kaprovité ryby, u nichž jsou prostaglandiny skupiny F významné pro komunikaci při reprodukčním chování. Jejich šíře uplatnění v rámci celé čeledi kaprovitých ryb však není známá. Pro tuto práci byl vybrán bolen dravý (*Leuciscus aspius*), u něhož feromonová komunikace zkoumána doposud nebyla. Výzkum byl zaměřen na detekci prostaglandinu F2-α, který je vylučován kaprovitými rybami v průběhu ovulace samic a zda má přítomnost tohoto feromonu vliv na chování samců. V prvním experimentu jsem sledovala změnu koncentrace prostaglandinu F2-α v průběhu ovulace samic. V druhém experimentu potom chování samce k samici před a po podání dávky prostaglandinu F2-α. Předpoklad, že samice bolena dravého během ovulace vypouštějí PF2-α, se potvrdil u všech zkoumaných vzorků analýzou na hmotnostním spektrofotometru. Dále se potvrdilo, že chování samců se mění vlivem přítomnosti PF2-α, vylučovaného ovulující samicí. Stimulační účinek prostaglandinu F2-α byl v předchozích výzkumech pozorován u karase zlatého (*Carassius auratus*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Tento výzkum potvrdil tento účinek i u bolena dravého, je tedy na možné, že prostaglandin F2-α funguje jako nespecifický stimulační feromon pro samce kaprovitých ryb.

Klíčová slova: bolen dravý; feromon; prostaglandin; PF2-α; chování ryb; kaprovité ryby

Abstract

Pheromones are substances used by animals to communicate in both terrestrial and aquatic environments.Pheromones are divided into several groups based on their composition and effect on animal behaviour, with substantial emphasis on their role during reproduction. Within fishes is pheromonal communication studied mostly on two model species of family *Cyprinidae*, which use F-group prostaglandins in communication during their reproductive behaviour. The extent of F-group prostaglandins in the communication among *Cyprinidae* is not known. The asp (*Leuciscus aspius*) was chosen as the model species of this thesis, because his use of pheromone communication hasn't been studied so far. The research focused on detection of prostaglandin F2-α which is known to be released by model *Cyprinidae* species during ovulation and whether the presence of prostaglandin F2-α influences male behaviour. In the first part of the experiment I tracked concentration changes of prostaglandin F2-α during asp ovulation.In the second part of the experiment I examined male asp behaviour towards the female before and after prostaglandin F2-α application. Mass spectrophotometer analysis proved that asp females indeed releasePF2α during ovulation. The influence of PF2-α released by female asp on male asp behaviour was confirmed as well. The stimulation effect of prostaglandin F2-α was previously reported in the goldfish (*Carassius auratus*) and the common carp (*Cyprinus carpio*). Because my research has confirmed the presence of stimulation effect in the asp, it's likely that prostaglandin F2-α works as a stimulation pheromone in *Cyprinidae* generally.

Keywords: asp; pheromone; prostaglandine; PF2-α; fish behaviour; *Cyprinidae*

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Marka Šmejkala, Ph.D., s použitím citované literatury.

V Olomouci 27. dubna 2021 Podpis:

Obsah

Poděkování **6**

Cíle práce **7**

1 Úvod **8**

1.1 Rozdělení feromonů **10**

1.2 Feromonová komunikace u ryb **14**

1.3 Feromonová komunikace u mihulovitých (*Petromyzontidae*) **16**

1.4 Feromonová komunikace u lososovitých ryb (*Salmonidae*) **17**

1.5 Feromonová komunikace u kaprovitých ryb (*Cyprinidae*) **18**

2 Bolen dravý **20**

3 Materiál a metody **21**

4 Výsledky **24**

5 Diskuze **26**

6 Závěr **29**

7 Literatura **30**

8 Přílohy **38**

Poděkování

V prvé řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce RNDr. Marku Šmejkalovi, Ph.D. za profesionální vedení, podnětné konzultace a nekonečnou trpělivost. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Pavlu Hrouzkovi, Ph.D., za pomoc při zpracování dat. Velké poděkování patří mým rodičům, jejichž podpora a obětavost mi umožnily studovat a v neposlední řadě také děkuji celé své rodině a přátelům.

Cíle práce

Předmětem této diplomové práce bylo zjistit, zda samice bolena dravého (*Leuciscus aspius*) vypouštějí během ovulace feromon PF2α a zda má zvýšená koncentrace tohoto feromonu vliv na chování samců bolena dravého.

1 Úvod

Všechny druhy organismů používají ke komunikaci (pokud jsou komunikace schopny) unikátní specifické dorozumívací prostředky jak fyzikální, jako jsou zrak, hmat a sluch, tak chemické povahy, mezi které řadíme chuť a pravděpodobně nejdůležitější komunikační nástroj v živočišné říši – čich. Látky, které slouží k dorozumívání mezi organismy, označujeme jako semiochemikálie, přičemž semiochemikálie, sloužící k mezidruhové komunikaci nazýváme allelochemikáliemi a ty dále rozdělují podle charakteru komunikace (Schulz, 2005). Allomony jsou látky, z jejichž účinku má prospěch druh látky vysílající, naopak z kairomonů má prospěch ten druh, který je přijímá a synomony jsou výhodné pro oba druhy (Schulz, 2005). Látky, sloužící primárně vnitrodruhové komunikaci, jsou zvány feromony (z řeckého „pherein“ – přenést a „hormon“ – povzbudit). V průběhu evoluce se organismy naučily na tyto účelově i zcela odlišné látky reagovat a spojovat si je s určitým významem; ten pro ně pak zcela převládl a jejich původní určení často zcela zaniklo (Wyatt, 2014). Oproti tomu širší pojem „chemical cues“ zahrnuje i chemické signály nekomunikační, které se vyskytují u organismu v reakci na nějaký druh stresu. Rozdíl je tom, že zdrojový jedinec nemá ze signalizace žádný prospěch, zatímco příjemce signálu ano (Wyatt, 2010; Wisenden et Chivers, 2006)

Feromony bývají nejčastěji hormonální povahy, jsou vylučovány mimo organismus (Kohl et al., 2001) a vyvolávají určitou endokrinní, neurologickou reakci či změnu chování u jiných jedinců téhož druhu (Wyatt, 2014). Způsob reakce na specifický feromonový stimul je vrozený, kupříkladu larvální stádia čolka *Nothopthalmus viridescens* nejsou sice sama schopna vyprodukovat varovný feromonový signál, jsou však schopni v případě, že ho nějaký dospělý jedinec poblíž vypustí, na něj reagovat a správně ho interpretovat i bez předchozí negativní zkušenosti s predátorem (Rajchard, 2006). Metabolická náročnost produkce feromonů bývá velmi malá, neboť jich k navození účinku bývá potřeba poměrně malá koncentrace, na druhou stranu úkony spojené s feromonovou komunikací, jako je například obcházení teritoria nebo tance při námluvách bývají pro živočicha fyzicky náročnější. (Tillman et al., 1999).

Feromony bývají zpravidla zjišťovány čichovými chemoreceptory, nemusí docházet k jejich aktivnímu vdechování, protože je často stačí zachytit vomeronasální (Jacobsonův) orgán. Jeho existence ovšem není podmínkou feromonové komunikace, protože i živočichové, kteří vomeronasální orgán v průběhu evoluce ztratili, jako jsou ptáci, prasata nebo primáti,

jsou schopni feromony čichem zachytit (Eisthen et Wyatt, 2006). U některých dokonce k zachycení stačí i chuťové receptory (Wyatt, 2010). K přenosu feromonů nemusí nutně docházet vzduchem – mnoho vodních druhů živočichů využívá feromonovou komunikaci, dokonce je velmi zřejmé, že se vyvinula původně ve vodním prostředí. Například samice karase zlatého (*Carassius auratus*) vypouštějí při ovulaci hormonální látky, které fungují jako sexuální feromony, které stimulují samce k páření (Sorensen et Stacy, 2004). Některé druhy eusociálního hmyzu se dorozumívají pomocí feromonů dotykem – například mravenci si předávají feromonové signály dotykem tykadel, která mají pokryta chemoreceptory (Morgan et Billen, 1998).

Feromonů jako prostředků komunikace využívá celá řada organismů od nejjednodušších bakterií přes rostliny až k živočichům, kde se uplatňují coby dominantní způsob dorozumívání zejména u sociálního hmyzu (Morgan et Billen, 1998) jako jsou například mravenci a včely, kde královny pomocí feromonů ovládají celé kolonie (Keller et Nonacs, 1993). U obratlovců závisí vzhledem ke složitosti nervové soustavy feromonová komunikace na aktuálním fyzickém stavu jedince – dobře dokumentovaným případem jsou křečci syrští (*Mesocricetus auratus*), u kterých samci nereagují na samičí feromony, pokud jejich hladina adrenalinu nedosahuje nadprůměrné výšky, což je stav typický pro jedince ve výborné kondici a tedy i vhodné jako sexuální partnery (Wyatt, 2010). Záleží též na vlivech a stimulech z okolního prostředí, např. k identifikaci v rámci sociální skupiny nebo naopak při značení a obraně teritoria (Wyatt, 2010).

Feromony také hrají důležitou roli v rituálech páření (Keverne, 2005), například samice ještěrky iberské (*Lacerta monticola*) si dle feromonových značek samců vybírají toho nejdominantnějšího a nejvýše společensky postaveného samce (Houck, 2009). Feromon navíc nemusí být specifický pro jeden druh; v roce 1996 se zjistilo, že sexuální feromon samic slona indického (*Elephas maximus*) je, patrně nezávisle, na své chemické bázi shodný se sexuálním feromonem běžným u motýlů. U obou druhů, přes jejich vzdálenou příbuznost, funguje jako atraktant (Rasmussen et al., 1996).

1.1. Rozdělení feromonů

Feromony rozlišujeme dle způsobu, délky a intenzity působení, byť hranice mezi nimi nejsou vždy úplně ostré, do následujících kategorií: agregační, antiagregační, varovné, teritoriální, epideiktické, značkovací, sexuální a primerové.

Agregační feromony

Feromony agregační jsou organismy využívány v obraně před predátorem, při hromadném napadení hostitelského organismu nebo při výběru sexuálního partnera. Je třeba Ne všechny sexuální feromony ovšem mají tuto funkci. Jako agregační bývají označovány sexuální feromony produkované samci, protože jejich účinkem dochází k agregaci nejen samic, ale i samců do dané oblasti (Eller et al.,1994). Přítomnost a užívání agregačních feromonů je dobře zdokumentované u hmyzu, zejména u řádů *Orthoptera, Diptera* a *Coleoptera*. V praxi se tohoto jevu využívá při likvidaci škůdců, jako jsou například brouci z čeledi *Curculionidae*, kteří způsobují významné hospodářské škody (Schlyter, 1992; Eller et al., 1994). Agregační feromony se jakožto látky specifické pro daný druh a netoxické pro prostředí na tuto funkci výborně hodí.

Antiagregační feromony

Feromony antiagregační fungují na principu opačném, kdy jsou jejich působením jedinci odháněni – když kupříkladu v mraveništi dochází potrava, královna vylučuje antiagregační feromon, který vyhání mravence ven, aby se udržela optimální koncentrace v mraveništi (Abrol, 2013).

Varovné feromony

Feromony varovné jsou vypouštěny jedincem daného druhu při napadení predátorem a reakce ostatních jedinců na ně bývá druhově specifická. U některých druhů mšic můžou varovné feromony pobízet k útěku (Vandermoten et al., 2011). Naopak u eusociálního hmyzu, jako jsou včely, vosy, mravenci nebo termiti, můžou varovné feromony vyvolávat zvýšenou agresi (Ono, 2005). Varovné feromony jsou též zdokumentované u rostlin, kde v případě okusu býložravcem některé rostliny vypouštějí feromon, kterým varují ostatní jedince svého druhu v okolí; ti začnou produkovat látku, například tanin, která je činí méně chutnými či toxickými. Zajímavým příkladem je početná populace můr druhu *Urania fulgens*, které

kladou svá vajíčka na tropické rostliny z rodu *Omphalea*. Tyto rostliny jsou schopny vylučovat zvýšené množství toxinů, které narušují vývoj larev a způsobují tah uránií na místa s jejich nižší populační hustotou (Bothma, 2002; Smith, 1983).

Teritoriální feromony

Feromony teritoriální slouží k označení a vymezení určitého území, které si jedinec či jedinci daného druhu nárokují pro sebe, oproti jiným jedincům daného druhu. Mohou k tomu využívat například specializované pachové žlázy, jako u jelence běloocasého (Gassett et al., 1996). U jiných organismů, jako jsou některé šelmy, jsou dané feromony přítomny v moči, kterou vylučují na svém teritoriu (Poddar-Sarkar et Brahmachary, 2014).

Epideiktické feromony

Feromony epideiktické jsou zvláštní formou teritoriálních feromonů, která je využívána některými organismy při rozmnožovacím procesu. Samice pomocí nich značí místo, kam nakladly vejce, pro jiné samice, aby tam již svá vlastní vejce nekladly. (Gupta et Yogeswari, 2010)

Značkovací feromony

Feromony značkovací jsou dobře známé u eusociálního hmyzu, zejména u mravenců (Schneirla, 1972) při hledání potravy nebo cesty. Některé druhy vos si značí cestu k nově založenému hnízdu, aby po ní mohly vést ostatní jedince z kolonie. Včely medonosné si takto označovávají vhodné květy a podle feromonové stopy je pak nacházejí další dělnice, aby se maximalizovala výtěžnost z dané louky (Wyatt, 2010). Obdobně některých druhů mravenců dělnice, která najde nějaký zdroj živin, si po cestě zpět k hnízdu značí cestu feromony, podle jejichž stopy pak ke zdroji chodí ostatní mravenci. Feromonová stopa je průběžně obnovována, aby nevyprchala, dokud zdroj není vyčerpán a následně je opuštěna (Schneirla, 1972). Specifický případ je u mravence faraona, který cestu k vyčerpanému zdroji přeznačí odpuzujícími feromony, aby na ní ostatní jedinci nemarnili čas (Robinson et al., 2008). Specifický je případ slepých amazonských mravenců rodu *Labidus*, kteří nestaví hnízda. Místo toho jsou neustále v pohybu a následují ostatní jedince v kolonii. Hrozí, že když vedoucí mravenci na pochodu pralesem zabloudí a omylem začnou následovat vlastní konvoj, celá kolonie se zacyklí a zemře vyčerpáním (Schneirla, 1972). Značkovací feromony jsou

pozorovány i u sociálních housenek některých druhů motýlů, které pomocí nich udržují při přesunech skupinu pohromadě (Fitzgerald, 2008).

Sexuální feromony

Feromony sexuální slouží u organismů k upozornění na připravenost k rozmnožování a také k přilákání partnera. Funkce sexuální je u feromonů velmi bazální a rozšířená a objevuje se u širokého spektra organismů, dokonce již u prokaryot, a sice bakterií (Bernstein et Bernstein, 1997). Některé druhy bakterií, jako *Bacillus subtilis* nebo *Bacillus cereus* vysílají do svého okolí feromony, kterými indukují u dalších jedinců svého druhu připravenost k výměně DNA mezi buňkami (Bernstein et Bernstein, 1997). Mezi eukaryotními organismy je sexuální funkce feromonů také velmi rozšířená. Vyskytuje se u bazálních skupin, jako jsou houby a řasy. Dobře studovaným příkladem je kvasinka pivní (*Saccharomycetes cerevisiae*), jejíž sexuální feromonové značení se využívá jako model pro studium tohoto mechanismu (Cox et al. 1997). U zelených řas je tento jev pozorován například u některých válečů (rod *Volvox*; Hallmann, 2003). Setkáváme se dokonce i s jevem, kdy feromonovou stopu využívá samčí gameta, aby našla samičí (Dusenbery, 2009). Velmi běžným jevem je výskyt užití sexuálních feromonů u členovců, zejména u hmyzu, jako jsou motýli či včely (Trhlin et Rajchard, 2011). Toho se využívá při monitorování jejich počtů a také na přilákání opylovačů do ovocných sadů (Trhlin et Rajchard, 2011) nebo na likvidaci nebo narušení vývojového cyklu u škůdců (Witzgall et al., 2010). Rovněž obratlovci využívají sexuálních feromonů při hledání partnera naprosto běžně. Bylo však zjištěno, že například výměšky uropygiální žlázy samice kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kterými si udržuje mastné peří, obsahují sexuální feromony, kterými stimuluje samce (Caro et Balthazart, 2010). U některých živočichů jako je myš domácí, slouží sexuální atraktanty i jako selektivní nástroj, kterým myš rozpozná blízce příbuzné jedince a při hledání partnera se jim vyhýbá – nedochází tak k inbreedingu (Asaba et al., 2014). Jako u výše zmíněných motýlů je toho využíváno i v komerční sféře, např. u prasete domácího, kde se pomocí aplikace samčího sexuálního feromonu zjišťuje estrální fáze za účelem chovu (Signoret, 1970). Zajímavostí je, že sexuální feromony nemusejí nutně sloužit jen jako atraktanty potencionálního partnera; samci čolka zelenavého (*Notophthalmus viridescens)* ve stavu sexuálního vybuzení produkují feromon, který odstrašuje samce téhož druhu (Rajchard, 2006).

Primerové feromony

Feromony primerové slouží k vyvolání změny v organismu během jeho vývojového období. Například královny včely medonosné vylučují hormony (tzv. „královniny hormony“), které (krom atraktantní funkce pro trubce v době, kdy ještě královna není oplodněna) zastavují pohlavní vývoj u dělnic. Pokud královna zahyne, začínají larvy prodělávat plný vývoj a rodí se nesterilní jedinci (Keller et Nonacs, 1993). Naopak samci saranče pustinné vylučují feromon, který, pokud se dostane do kontaktu s juvenilním jedincem, jeho pohlavní vývoj uspíší, ať už se jedná o samici, nebo o samce. Saranče pustinná si tak zajišťuje dostatek sexuálně zralých jedinců v hejnu. (Inayatullah et al., 1994)

Dělení feromonů popsané výše je však jen hrubé a založené čistě na behavioristickém pohledu na věc. Neodráží chemickou podstatu feromonů, která bývá často mnohem složitější. Jednak je vzhledem k zejména u obratlovců velmi komplikované nervové soustavě těžké spojit konkrétní feromon s určitým chováním, a také, jak již uvedeno, jeden chemicky jednoduchý feromon může mít současně více účinků. V jiných systémech se naopak žádoucího efektu dosáhne kombinací více látek v přesném, specifickém poměru, což do značné míry ztěžuje syntézu feromonů, natož jejich hromadnou výrobu či průmyslové využití (Wyatt, 2014). Například u kůrovců druhu *Dendroctonus frontalis* určuje množství a koncentrace feromonu verbenonu v atraktantech, vypouštěných samicí, reakci samce – ve velmi nízkých koncentracích účinek atraktantů umocňuje, naopak ve vyšších koncentracích vzbuzuje u samců agresivní reakci jako při přítomnosti jiného samce a sám ve vysoké koncentraci naopak účinkům atraktantů zabraňuje; je přitom známo, že samice jsou schopny vypouštět jak nízké, tak vysoké dávky verbenonu, čímž pravděpodobně regulují samčí chování a umožňuje jim to lepší sexuální výběr (Rudinsky, 1973).

Přestože je v živočišné říši je výskyt feromonů v komunikaci velmi běžný, u člověka jejich vliv nebyl dosud důkladně prozkoumán. Je známo, že u dětí matčiny feromony spouštějí sací reflex. (Marlier et Schaal, 2005) Spekuluje se, že podpažní výměšky (podpažní žlázy jsou nejžhavějším kandidátem na místo feromonové sekrece u lidí) u žen jsou schopny ve skupině způsobit sladění měsíční periody a také fungovat jako sexuální atraktant pro muže; dosud však v této oblasti nebyl podniknut žádný zevrubný výzkum (Brennan et Zufall,2006; Wyatt, 2014).

Samostatnou kapitolou je efektivní koncentrace feromonů, tedy jaké množství specifického feromonu nebo kombinace feromonů je nutné v prostředí, aby se projevilo na chování příjemce. Velmi v tomto záleží na tom, jak efektivní jsou receptory organismu, kterými feromony přijímá – u živočichů je to čichovými orgány. U některých příslušníků živočišné říše se setkáváme s odezvou na feromonovou stopu v neuvěřitelně nízkých koncentracích. Samci známého a komerčně využívaného bource morušového (*Bombyx mori*) reagují na přítomnost sexuálního feromonu bombykolu již při koncentraci 10^{-10} µg/cm^3 vzduchu, což se využívá při odlákávání samců z pesticidy stříkaných oblastí (Regnier et Law, 1968). Podobného komerčního využití došel i feromon gyptol, který vylučují samice obávaného škůdce bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*), zejména u evropského poddruhu *Lymatria dispar dispar*, kde jsou samice nelétavé a samci za nimi musejí až na zem (Regnier et Law, 1968; Pogue et Schaefer, 2007). Ta každoročně způsobuje velké škody na ovocných stromech a lesních porostech v Evropě a na východním pobřeží Severní Ameriky, kam byla v polovině devatenáctého století zavlečena (Pogue et Schaefer, 2007). U tohoto poddruhu reagují samci už při koncentraci 10^{-12} µg/cm^{3}vzduchu a gyptol se tedy používá na jejich odchyt do pastí (Regnier et Law, 1968). Naopak u japonského čolka ohňobřichého (*Cynops pyrrhogaster*) vylučuje atraktantní feromon sodefrin do vody z kloakální žlázy samec – a samice na něj reagují dokonce již při koncentraci 10^{-13} µg/l vody (Kikuyama et al., 1995). Karas zlatý (*Carasius auratus*), blízký příbuzný bolena dravého, detekuje steroidní feromon 17α,20β-DHP, urychlující dospívání, také při koncentracích 10^{-13} µg/l vody (Sorensen et al., 1978). Je tedy zřejmé, že vodní prostředí feromonové komunikaci svědčí.

1.2 Feromonová komunikace u ryb

U ryb má komunikace pomocí feromonů zvláštní význam. Na rozdíl od mnoha jiných obratlovců či bezobratlých se ryby pohybují téměř výhradně ve vodním prostředí, které ztěžuje a deformuje audiovizuální kontakt s okolím (Campbell et Reece, 2005). Zejména vizuální stránka je ve vodním prostředí omezena díky fyzikálním vlastnostem vody a jak množství organických a anorganických látek v ní, tak kvůli různé efektivitě pronikání jednotlivých vlnových délek světla. Paradoxně tato omezení vedou sice často k velké diversifikaci očních aparátů u vodních živočichů, zejména mořských, kde je vodní sloupec mnohem hlubší (Marshall, 2017), na nejrůznější vizuální podmínky. Stratigraficky rozčleněná

viditelnost a fakt, že mnoho mořských druhů žije ve stabilních hloubkách, umožňuje přizpůsobení se konkrétním, lokálně omezeným světelným a vizuálním podmínkám. Na druhou stranu se tímto vizuálně nestálým a proměnlivým prostředím zrak na hlavní senzorickou funkci příliš nehodí (Marshall, 2017). Lépe je na tom sluch, protože zvukové vlny se šíří vodou rychleji než vzduchem. Většina ryb tak má vyvinuté naslouchací orgány (Popper et al., 1988). Ovšem nejlépe z rybích smyslů je na tom čich (u ryb, podobně jako u některých jejich vzdálenějších terestrických příbuzných, např. hadů, velmi těsně spojený s chutí), který se pro toto médium jako orientační i identifikační prostředek hodí výborně a ryby se jej během své dlouhé evoluce naučily velmi efektně využívat v nejrůznějších situacích, ať už na vyhledávání potravy, prozkoumávání okolí kvůli hrozbě, či právě vnitrodruhové feromonové komunikaci (Sorensen et Stacey, 1999).

Z evolučního hlediska je pravděpodobné, že se feromonová komunikace vyvinula jako reakce na dlouhodobou opakovanou expozici chemickým látkám, resp. feromonům vylučovaných ostatními jedinci téhož druhu v určitých výrazně identifikovatelných situacích, např. v období páření, při vystavení nebezpečí, při detekci potravy či při prostém následování svého hejna. Ryby, u kterých se vytvořil v reakci na feromony v určité míře reflex, se pak přirozeně stávají efektivnějšími. Zda ryby jsou schopné vypouštět feromony úmyslně, je předmětem zkoumání (Stacy et Wisenden, 2004).

Z hlediska vědeckého má zkoumání feromonové komunikace (nejen) u ryb obrovský význam. Rozluštění a pochopení feromonových signálů a jejich interpretace a zpracování rybami by mohlo nejen detailně objasnit jejich chemickou podstatu a způsob zpracování, ale též evoluční mechanismy, jimiž k těmto adaptacím dochází. Tyto poznatky by pak mohly být využity jak ke zkoumání feromonových a obecně chemických typů komunikace u jiných živočichů, tak především ve sféře komerční; feromonové signály by teoreticky bylo možné efektivně, ekologicky a účinně uplatnit v rybářství a rybníkářství ke správě, údržbě a lovu (Sorensen et Stacy, 2004). Stejně tak by tyto postupy mohly být využity ve sféře ochranářské.

1.3 Feromonová komunikace u mihulovitých (*Petromyzontidae*)

Dobrým příkladem použití feromonů v ochraně přírody je případ invaze mihule mořské (*Petromyzon marinus*) do Velkých jezer. Tento poměrně velký (dospělci dosahují délky přes jeden metr) živočich se vyskytuje v severních částech Atlantského oceánu a podobně jako třeba lososi je anadromní – vytírá se v řekách, odkud mláďata migrují do moře či jezer, kde vyrůstají; navíc dobře snáší velké rozpětí salinity.

Mihule mořská se přirozeně vyskytovala v některých jezerech na východním pobřeží USA (Alexander, 2009), odkud se dostala pravděpodobně přes nově budované kanály už v první polovině 20. století do Velkých jezer (McClelland, 2008). V nich začaly mihuledecimovat původní rybí populace, zřejmě nejhůře byly postiženy velké dravé ryby jako siven obrovský (*Salvelinus namaycush*) a původní druhy síhů (rod *Coregonus*), jejichž úbytek umožnil rozšíření dalších invazivních druhů zejména sleďovitých ryb, jako je placka velkooká (*Alosa pseudoharengus*), které dále vytlačují původní populace (McClelland, 2008; Great Lakes Fishery Commision, 2017).

Vzhledem k tomu, jak dlouho již toto zamoření trvá, bylo na potlačení mihulí vynaloženo značné množství času a úsilí, většinou se střídavými úspěchy. Vynaložené prostředky ovšem umožnily jak popsání genomu mihule, tak důkladné prozkoumání jejich životního cyklu v naději, že se najde nějaký způsob jejich kontroly (Buchinger et al., 2015). Ani klasický odlov, lov elektrickým proudem či užití bariér se neukázaly jako efektivní (McClelland, 2008; Hayes et al., 2003). K pokusům o introdukci jiného druhu, který by mihule lovil, naštěstí nedošlo a plošnému nasazení jedů brání fakt, že Velká jezera jsou významným centrem biologické diverzity.

Lepší výsledky přinášely tzv. lampricidy- jedy vyvinuté specificky na mihule. Ty skutečně zasahují jen mihule a populace kostnatých ryb v jezerech jsou jimi nedotčeny (Bircenau et al., 2014), ukazuje se však, že mají špatný vliv na některé druhy jeseterů a na obojživelníky, jako jsou žáby či žábronoši, kterých je ve Velkých jezerech mnoho (Bircenau et al., 2014). Velké naděje se proto vkládají do výzkumu mihulích feromonů, které se jako druhově specifické komunikační prostředky podle nejnovějších výzkumů vědců z Michiganské státní univerzity a jejich kolegů ze spřátelených univerzit dají využít ke kontrole mihulí populace, zejména feromonů migračních, které vypouštějí mladí jedinci při stěhování do moře (Buchinger et al., 2015).

Zajímavý je totiž mechanismus, jakým funguje feromonová komunikace mihulí. Výzkum feromonové komunikace mihule mořské ukázal, že samice v místě trdlišť vypouštějí feromonový atraktant, který je velmi odolný vůči rozkladu, skládá se z nejméně tří steroidních komponent, z nichž jedna je specifická a unikátní pouze pro mihule (Warren et Burr., 2014). Tento atraktant je mihulemi detekovatelný při neuvěřitelně nízkých koncentracích (až 1 biliontina; Fine et Sorensen, 2010) a svým účinkem se odlišuje od atraktantů, používaných většinou anadromních ryb. Není druhově specifický, na jeho přítomnost reagují různé druhy mihulí (Warren et Burr., 2014) a není dokonce ani rodičovsky specifický – výzkum ukázal, že se mihule nevracejí přednostně do svých rodných řek, ale jdou obecně za pachem atraktantu (Warren et Burr., 2014). Tyto unikátní vlastnosti patrně zabezpečují mihulím genetickou variabilitu, lze je však paradoxně využít i proti nim. Pomocí této metody by tedy bylo možné nalákat mihule do pastí, aniž by se do nich dostaly jiné organismy. Nabízí se tak unikátní možnost managementu pomocí netoxické, environmentálně neškodné metody, která dosud nebyla u obratlovců použita (Hayes et al., 2003).

1.4 Feromonová komunikace u lososovitých ryb (*Salmonidae*)

Dominantním a nejvíce studovaným užitím feromonů u ryb lososovitých je jejich využití při migraci (Chung-Davidson et al., 2011). Lososovití jsou velmi využíváni ve sféře komerčního rybolovu a je o jejich výzkum tedy poměrně velký zájem. (Chung-Davidson et al., 2011). Podobně jako výše zmíněné mihule jsou lososovití katadromní – dospělci žijí v jezerech nebo v mořích, odkud cestují proti proudu řek na trdliště, na kterých se vylíhli, aby zde sami zplodili potomstvo. K nalezení svého domovského trdliště a k páření využívají lososovití právě feromonovou komunikaci (Sorensen et Wisenden, 2014).

Tato je právě u komerčně využívaných druhů, jako jsou siveni, lososi či pstruzi intenzivně studovaná, neboť se jedná o druhy ryb jednak podléhající intenzivnímu rybolovu, tak zároveň živočichy žijící na severní polokouli v poměrně industrializovaných oblastech (Sorensen et Wisenden, 2014), kde často vodní toky bývají lidskou činností těžce poznamenané. Jde především o narovnávání a betonování koryt, hustou lodní dopravu, vypouštění nejrůznějších odpadních a jiných látek do vody a v neposlední řadě budování přehrad, které jsou pro migrující rybu nepřekonatelné a ona tak nemůže svůj životní cyklus dokončit (Sorensen et Wisenden, 2014).

Z laboratorních chemických a behaviorálních analýz se zdá, že klíčovou funkci v migrační feromonové navigaci hrají žlučové kyseliny a aminokyseliny (Sorensen, 1996), za jejichž pachem lososovití cestují. Zajímavé je, že výzkum lososů naznačuje, že pro rozpoznání domovské řeky mohou krom migračních feromonů sloužit též specifické pachy, vylučované rostlinným pokryvem, živočichy i minerálním složením neživé složky v proudu řeky. Rovněž bylo dokázáno, že lososovití jsou schopni při postupu řekou dle vylučovaných feromonů rozpoznat jedince vlastního druhu (Olsen, 2011) a dokonce pak i vyhledávají jejich společnost, jsou v jejich přítomnosti méně agresivní a konzumují větší množství potravy (Olsen, 2011).

Velkým problémem, kromě přehrazení říčního toku, je pro lososovité ryby chemické znečištění. Lososovité ryby se při hledání vhodného partnera spoléhají na čich, kterým detekují sexuální feromony druhého jedince. Pokud však dojde ke znečištění, například pesticidy nebo měďnatými ionty, může dojít k porušení buněčných receptorů čichového aparátu nebo dokonce narušení funkci hypotalamu, takže pak k žádnému sexuálnímu chování, natož vypouštění feromonů, nemůže dojít (Olsen, 2011).

1.5 Feromonová komunikace u kaprovitých ryb (*Cyprinidae*)

U kaprovitých ryb je využití feromonů poměrně široké. Kaprovití jakožto poměrně sociální ryby spolu komunikují pomocí feromonů s agregační, antiagreagační, varovnou a sexuální funkcí. Podobně jako ryby lososovité preferují společnost jedinců svého vlastního druhu, nicméně se u nich ve feromonové funkci nijak neprojevují žlučové kyseliny (Sorensen et Wisenden, 2014).

Velmi dobře je u kaprovitých, konkrétně u kaprů a karasů, prozkoumán mechanismus vzájemného ovlivňování sexuálními feromony. Samicím se při ovulaci zvyšují hladiny hormonů, z nichž některé vypouštějí ven a fungují pak jako mocné sexuální atraktanty a induktory pro samce. Naopak samci jsou schopni také vylučovat feromony, kterými pak k sobě vábí samice. Tento jev byl konkrétně popsán na samičím sexuálním hormonu PGF (prostaglandin F) a samčím hormonu AD (androstenedion). V mnohasložkové směsi látek, kterou samice kaprů a karasů při ovulaci vypouštějí do svého okolí, působí právě prostaglandin F na samce nejvíce (Lim et Sorensen, 2012).

Zajímavé je, že na tento sexuální feromon reagují zvýšenou pohlavní aktivitou samci obou druhů; přesto pokud mají na výběr, volí si samci k rozmnožování samice vlastního druhu, což naznačuje, že i další přidružené feromony vypouštěné samicemi mají na rozmnožovací proces vliv. Samičím sexuálním feromonem prostaglandinem F vybuzení samci pak sami vylučují androstenedion, který má sám o sobě na ovulující samice jen mírně přitažlivý účinek. Pozoruhodné ovšem je, že když je v kombinaci s feromony vylučovanými pohlavně nedospělými samicemi, jeho přitažlivý účinek na dospělé ovulující samice prudce vzroste (Lim et Sorensen, 2012).

O možných příčinách této zvláštní a trochu matoucí kombinaci účinků se ve vědeckých kruzích dosud vedou spory, zda by mohlo jít o náhodu při evolučním vývoji, jestli nejde jen o nehotovou podobu či částečný metabolit prostaglandinu, která by byla místo tohoto atraktivní pro samice, nebo zda feromony nedospělých samic v kombinaci se samčím neindukují atraktivnost proto, aby se ovulující samice co nejdříve vytřela a nebyla vystavena budoucí potenciální hrozbě konkurence ze strany zatím nedospělých samic (Lim et Sorensen, 2012, Sorensen; Sorensen et Wisenden, 2014).

Tento mechanismus používání sexuálních feromonů má velký komerční potenciál. Kaprovité ryby mají dlouhou a silnou tradici v rybníkářství, kde se výzkum a zavedení těchto procesů dá velmi dobře zúročit v chovu. Stejně tak je nezanedbatelný význam těchto feromonů coby atraktantů v oblasti kontroly škůdců (Lim et Sorensen, 2012). Kaprovité ryby byly zejména v minulých dvou stoletích zavlečeny do různých částí světa, kde se původně nevyskytovaly (např. Austrálie; Lim et Sorensen, 2012). Pokud to podmínky a člověk dovolil, staly se z nich nebezpečné invazivní druhy, které za absence vhodného predátora rychle ničí místní, často velmi unikátní ekosystémy.

Využití feromonů coby atraktantů se jeví jako velmi vhodná možnost z důvodů podobných, jak byly již dříve zmíněny u mihulí – vysoká efektivita, žádná toxicita, nízké náklady a druhová (či rodová) specifičnost. (Lim et Sorensen, 2012; Sorensen 1996) Jedinou nevýhodou tohoto procesu je fakt, že tímto způsobem není možné nalákat nedospělé jedince a je tedy proces opakovat vícekrát, aby se zvýšila pravděpodobnost, že postupným odlovem právě dospělých jedinců už nedojde k opětovnému rozmnožení kaprovitého škůdce (Lim et Sorensen, 2012; Sorensen et Wisenden, 2014).

2 Bolen dravý

K výzkumu jsem si vybrala bolena dravého (*Leuciscus aspius*), protože Sorensen uvádí hypotézu, že PF2α funguje u kaprovitých ryb jako univerzální signalizátor ovulace, ale zatím se výzkumy reprodukčního chování prováděly u některých kaprovitých ryb, jako jsou komerčně atraktivní kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a karas zlatý (*Carassius aureus*). Bolen dravý je tak nejen v tomto ohledu dosud nezkoumaným druhem, ale je to také náš jediný zástupce kaprovitých, který se živí v dospělosti výhradně dravě a je tedy nejen rybářsky atraktivní rybou, ale má i význam jako predátor a regulátor stavu ryb.

Je to středně velká ryba, dosahující v průměru 60 – 80 cm délky a váží až 15 kg (Maitland, 1977), patřící do čeledi *Cyprinidae*. Pohlavně dospívá ve 4 – 8letech a dožívá se až 15 let (Kucharczyk et al., 1998). Má dlouhé laterálně zploštělé tělo, stříbřitou barvu, u hřbetu tmavší a směrem k břichu světlejší. Je to evropský druh, chráněný Bernskou úmluvou (Bern Convention on the Conservation of EuropeanWildlife and Natural Habitats, 1982) a v červeném seznamu IUCN je veden jako málo dotčený taxon (IUCN, 2021), proto je také povolen jeho lov (Kottelat et Freyhof, 2007).

Bolen dravý je potamodromní druh (Ciolac,2004; Kucharzyk et al., 1998), dospělci se vyskytují v jezerech a větších řekách, odkud migrují od dubna do června proti proudu do menších přítoků a potoků s písčito-kamenným dnem, aby se zde vytřeli a nakladli jikry na dno, či na vegetaci (Šmejkal et al., 2018; Maitland, 1977;). Boleni se vytírají většinou v noci, aby své jikry ochránili před denními dravci (Šmejkal et. al., 2018). Mláďata žijí v hejnech a živí se drobnými korýši, vodním hmyzem a pulci. Dospělci pak aktivně loví jiné ryby, zejména pak oukleje (Krpo-Cetkovic et al., 2010) a žijí většinou osaměle (Šmejkal et al., 2021).

3 Materiál a metody

Metodiku pokusu jsem převzala od Stacyho et al. (Stacey et al., 1987) a upravila pro bolena dravého. Látka prostaglandin F2α je fyziologicky aktivní lipidová sloučenina, která se odvozuje z kyseliny arachidonové. Jeho vznik je stimulován oxytocinem a zastavuje produkci progesteronu (Stacey et al., 1987). V medicíně se využívá na indukci porodu. (Baxi et al., 1980).

První část experimentu probíhala na Hydrobiologickém ústavu, Biologickém centru AV ČR, v. v. i. v termínu 22.3 – 27.3 2017. Šest samic bolena dravého bylo nejprve změřeno, zváženo a poté jim bylo aplikováno odpovídající množství ovopelu (3 mg/ kg živé hmoty). Ovopel je syntetický hormonální přípravek, který je používán k navození ovulace u ryb (Żarski et al., 2009), vyráběný maďarskou firmou Interfish Kft. (http://ovopel.hu/en/ovopel/). Po aplikaci ovopelu byly samice bolena umístěny každá do své vlastní kádě (550l) a každých 6 hodin byl z kádí odebrán vzorek 1 l vody, označen kódem a zamražen. Odebírání vzorků bylo ukončeno více než 24 hodin po začátku ovulace u samic, což je u modelového karase zlatého (*Carassius auratus*) považováno za vrchol ovulační produkce (Stacy et Sorensen, 1984).

Před samotnou analýzou vzorků bylo nutné je nejprve opět rozmrazit. Vzorky byly vytaženy z mrazáku, zkontrolováno jejich označení a do každého z nich přidáno 8ml kyseliny citronové, aby nedošlo k degradaci biologického materiálu při rozpouštění. Následně byl vzorek vrácen do lednice, kde pomalu rozmrzal při teplotě 4°C. Kdy byl vzorek zcela rozmražen, nachystala se na něj cartridge DSC-18 a aktivovala se dvojím propláchnutím 96% metanolem a následně dvojím propláchnutím destilovanou vodou. Methanolem a destilovanou vodou byl vypláchnut odměrný válec, do něj byl následně přelit vzorek a zaznamenán jeho objem pro případ, že by došlo při rozmrazování ke ztrátám. Cartridge DSC-18 se nasadila na podtlakový přístroj SPE Vacuum Manifold, v jehož stojanu byla umístěna sběrná nádoba na vodu. Manifold byl umístěn před odměrný válec, do cartridge DSC-18 byly napipetovány 3 ml vzorku a mezi odměrný válec a cartridge byla umístěna gumová hadička naplněná destilovanou vodou. Manifold postupně podtlakem přefiltroval veškerý objem vzorku přes cartridge. Přefiltrovaná voda ze sběrné nádoby byla vylita. Následně se nádobka na vodu vyměnila za mikrozkumavku typu Eppendorf, hadička a odměrný válec byly propláchnuty a

umyty a do cartridge se napipetoval 1ml roztoku MeOh + 10%BTH, který zachycený biologický materiál vzorku stáhl podtlakem do mikrozkumavky typu Eppendorf. Tekutá složka roztoku v mikrozkumavce byla odpařena proudem plynného dusíku, následně bylo do mikrozkumavky typu Eppendorf napipetováno 200 µl roztoku MeOH a octanu amonného. Peletka biologického materiálu, která vznikla vysušením pomocí dusíku, byla v tomto roztoku rozpuštěna pomocí ultrazvukové lázně. Mikrozkumavka byla centrifugována při 4°C po dobu 6 minut. Po centrifugaci bylo z mikrozkumavky odpipetováno 180 µl supernatantu do HPLC vialky s insertem, která byla následně umístěna do mrazáku do teploty -80°C.

Získané vzorky byly následně analyzovány pomocí kapalinového chromatografu (Thermo Scientific Dionex Ulti Mate 3000 UHPLC+, Sunnyvale, CA, USA) propojeného na hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (Bruker Impact HD high, Bruker Daltonics s.r.o., Brno). Vzorky byly separovány na chromatografické koloně s reverzní fází (Phenomenex Kinetex C18 column - 150 x 4.6 mm, 2.6 µm, Torrance, CA, USA) a vymývány následujícím gradientem za použití mobilní fáze složené z vody okyselené 0.1% kyselinou mravenčí (A) a acetonitrilu okyseleného 0.1% kyselinou mravenčí (B) při průtoku 0.5 ml/min: A/B 85/15 (0 min), 85/15 (in 1 min), 0/100 (in 25 min), 0/100 (in 30 min) a 85/15 (in 35 min). Hmotnostní spektrometr s následujícím nastavením (teplota sušicího plynu 200 °C; průtok sušicího plynu 12 l/min; tlak nebulizéru (rozprašovače) 3 bar; napětí na kapiláře 4500 V a napětí na koncové destičce- 500 V.) byl před analýzou kalibrován pomocí klastrů mravenčnanu sodného. Získané chromatogramy byly analyzovány na přítomnost nabité molekuly PF2α o hodnotě m/z 355.23. Chromatografický vrchol byl integrován a koncentrace ve vzorku byla vypočítána na základě externí kalibrační křivky obdržené pomocí nástřiku standardníhoPF2α před analýzou vzorků. Vybavení k této části experimentu je v tabulkách 1 – 4.

Druhá část experimentu probíhala přímo v lokalitě vodní nádrže Švihov, která je známá jako trdliště bolena dravého. Zde jsem se zabývala přímo účinkem feromonu PF2α na chování samců. Experiment probíhal mezi 27.3. –30.3. 2017, tedy v termínu, kdy se boleni shromažďují na lokalitě kvůli tření. Nejprve byli boleni odloveni pomocí elektrického agregátu (typ Electrofisher EL 65 II GL DC, Hans Grassel, Schönau am Königsee, Germany, 13kW, 300/600 V). Dle Kubečky et al. se jedná o jednu z nejméně invazivních metod odlovu ryb (Kubečka et al., 2010). Z omráčených bolenů byly následně vybrány vzorky podle těchto

kritérii: přibližně stejná velikost (rozmezí 48 – 51 cm), dobrý zdravotní stav a pohmatem absence ovulace u samic – břicho bylo pevné. Samicím byly nejdříve odstraněny dvě šupiny na hřbetě a byly jim vpraveny injekčně 2 ml fyziologického roztoku (aby v obou částech experimentu ryby prošly stejným zacházením lišícím se pouze absencí aktivní látky). Boleni byli vždy v páru umístěni do připravené kádě a každý pár byl monitorován po dobu 165 minut webkamerou (Genius FaceCam 1000X V2, KYE Systems Corp, Tchaj-wan). V druhé fázi tohoto experimentu byly samicím vpíchnuty 2 ml prostaglandinu o koncentraci 400 µg/kg, byly vráceny do stejných kádí a opět byly páry monitorovány po dobu 165 minut. Vybavení k této části experimentu je v tabulkách 6 a 7.

Pro zhodnocení vlivu prostaglandinu byly i na základě experimentu Staceyho et al. (Stacey et al., 1987) vybrány 3 behaviorální parametry, na kterých je průkazně možno pozorovat změny v chování samců.

a) **aktivita** - kolikrát samec bolena aktivně přeplave na druhou polovinu kádě za samicí, která naopak aktivní není, nejedná se tedy o náhodné setkání, kdy oba plují, často v protisměru; kádě jsou ve videích rozděleny na čtyři čtvrtiny, měřeno bylo tedy podle nich; předpoklad je, že sexuálně navnaděný samec plave za samicí aktivněji více

b) **čichový stimul** - samec sleduje ve vodě pach samice, pluje v její stopě a přibližuje se k ní v pohlavní oblasti

c) - **sociální stimul** - samec se přiblíží k samici a aktivně do ní rýpe čenichem nebo hlavou

Záznam byl opět uložen pod specifickým kódem k pozdější analýze. Po skončení experimentu byli všichni boleni vypuštěni zpět do vodní nádrže Švihov. Poté byl záznam vyhodnocen jako dvojitý slepý experiment.

Na zhodnocení získaných dat byl použit dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů (Tab. 8, 9, 10), ve kterém byly definovány nulová a alternativní hypotéza takto:

H_0: Prostaglandin nemá na reprodukční chování (aktivita, čichový stimul, sociální stimul) samců vliv.

H_A: Prostaglandin má na reprodukční chování (aktivita, čichový stimul, sociální stimul) samců vliv.

4 Výsledky

Na základě měření vzorků ve hmotnostním spektrofotometrubyly naměřeny ve vzorcích následující koncentrace PF2-α (Tab. 5), kterébyly vyneseny do grafu (Obr. 1). Samice bolena dravého začaly téměř ve všech případech po 48 hodinách uvolňovat prostaglandin F2-α, tím se jeho přítomnost u tohoto druhu potvrdila.Na grafu na Obr. 1 pozorujeme, že dochází k vrcholu naměřených hodnot až ve druhé polovině doby měření a nikde nedochází ke kontinuálnímu růstu nahoru, ani dolů. U téměř všech vzorků, s výjimkou samice v kádi 4, kde došlo k zaznamenání přítomnosti Pfg2-α jen u odběru 16 naopak hodnoty kolísají nahoru a dolů a ani u této fluktuace není patrný kontinuální růst kterýmkoliv směrem. Předpokládaný kumulativní trend jeho koncentrace v kádích jsem nezaznamenala (Obr.1).

Aktivita měla nejnižší naměřené hodnoty jak u kontrolního vzorku, kde byl $\bar{x}$ = 26,17, tak u experimentu, kde byl naměřen $\bar{x}$ = 52,17. Rovněž rozdíly v rozptylu zkoumaných hodnot nebyly velké, kontrolní vzorek aktivity měl s = 9,79 a experimentální vzorek vykazoval dokonce ještě menší rozptyl s hodnotou s = 6,2, aktivita byla tedy v obou případech poměrně konzistentně nízká s menším rozptylem. Sociální stimul byl řádově mnohem četnější, kdy u kontrolního vzorku bylo $\bar{x}$ = 134, 67 a u experimentálního vzorku 227,33. Podobně jako aktivita narostl počet sociálních stimulů u experimentálního vzorku zhruba dvojnásobně, lišil se však v rozptylu hodnot, kdy bylo naměřeno u kontrolního vzorku s = 9,2 a u experimentálního s = 16,91. Z jednotlivých behaviorálních parametrů byl nejvyšší rozdíl mezi hodnotami kontrolního testu a experimentálního testu naměřen u čichového stimulu a to jak v průměrných hodnotách, tak v jejich rozptylu. U kontrolního vzorku čichového stimulu byla naměřena velmi nízká hodnota $\bar{x}$ = 7, zato u experimentálního vzorku byla hodnota $\bar{x}$ = 110, 17. Podobně rozptyl vykazoval výraznější rozdíly, kdy u kontrolního vzorku bylo s = 2,71, ale u experimentálního vzorku bylo s = 18,49 (Tab. 5).

K vyhodnocení behaviorálních parametrů byl využit dvouvýběrový t-test, ve kterém bylo zjištěno, že aktivita se signifikantně zvýšila po aplikaci prostaglandinu F2-α ($t(1)=5{,}017$, $p < 0{,}001$, Obr. 2). U behaviorálního parametru čichový stimul došlo také po aplikaci prostaglandinu F2-α k signifikantnímu zvýšení četnosti ($t(1) = -12{,}346$, $p < 0{,}001$, Obr. 3). Sociální stimul rovněž zaznamenal signifikantní nárůst četnosti po aplikaci prostaglandinu PF2-α ($t(1) = -10{,}766$, $p < 0{,}001$, Obr. 4)

Tím byly pro tento test nulové hypotézy H_0 pro všechny tři parametry zamítnuty a alternativní hypotézaH_A, že reprodukčníchovánísamců je ovlivněno uvolňováním prostaglandinu do vody, byla dvouvýběrovým t-testem v tomto experimentu potvrzena.

5 Diskuze

Prostaglandiny jsou přírodně se vyskytující hormony, které během ovulace vypouštějí samice kaprovitých ryb (Stacey et Sorensen, 2004; Sorensen et al. 1988). Prostaglandin F2-α je doložen během rozmnožovacího procesu u blízkých příbuzných bolena, u karase zlatého (*Carassius auratus*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Předpoklad pro tento experiment byl takový, že PF2-α bude vylučován i samicemi bolena dravého a bude mít stimulovat samce k sexuálnímu chování. Výsledky z obou částí experimentu tento předpoklad potvrzují. Analýza vzorků vody, ve které byly umístěny ovulující samice, prokázala přítomnost PF2-α, vylučovaného samicemi s několikahodinovým zpožděním po indukci ovulace Ovopelem. Monitoring samců, umístěných do kádí s ovulujícími samicemi, také ukázal souvislost mezi vypouštěním PF2-α samicemi a behaviorálními změnami u samců.

Z výsledků nám vyplývá, že naměřené hodnoty u všech vzorků rostou až ve druhé části prvního experimentu. Začínají stoupat v průměru kolem osmého měření, tedy 48 hodin po začátku experimentu, na rozdíl od příbuzného karase zlatého, kde byly zvýšené hodnoty prostaglandinů zaznamenány již po sedmi hodinách po aplikaci ovulaci spouštějícího přípravku (Sorensen et al. 1988). Ani jeden vzorek nevykazuje kontinuální růst nahoru či dolů, snad s výjimkou vzorku v kádi 4, u kterého byly hodnoty naměřeny hodnoty pouze u měření 16 (po 72 hodinách). Na druhou stranu nepravidelné kolísání v druhé části pokusu pozorujeme shodně u všech ostatních vzorků, je tedy nepravděpodobné, že by příčinou byla statistická chyba. Měření u karasů naopak ukazovala kontinuální růst v čase. Možná vysvětlení těchto fluktuací vidím ve fyzikálních vlastnostech zkoumané látky. Feromon Pfg2-α je jakožto látka okamžitého účinku nestabilní a má poměrně krátkou životnost, uvádí se poločas rozpadu v průměru 15 hodin s odchylkou 8,2 hodiny (Ishihara et al., 1991). Jako první možné vysvětlení je tedy možné, že tvorba prostaglandinu je sice Ovopelem v těle stimulována, ale vzhledem k nestabilitě této látky se v rybách neudrží její stálá hladina dlouho a proto i množství vypouštěného prostaglandinu kolísá nahoru a dolů, podle toho, jak se rozpadá a tvoří v těle; bylo by na místě zvážit možnost, zda na kolísající hladinu Pfg2-α nemá vliv i stres, pramenící z přítomnosti ryb v nezvyklém a omezeném prostředí. Další variantou by bylo, že hladina prostaglandinu v těle ryby je stálá, ale vzhledem ke krátké životnosti látky dochází k jejímu rozpadu až po vypuštění do vody a výsledné hodnoty tedy neodrážejí nutně vnitřní stav v rybě samotné, ale pouze degradaci feromonu ve vodním prostředí. Z těchto

dvou možností považuji za pravděpodobnější možnost první, totiž že hladina prostaglandinu je kolísající už v rybě, kde se účastní ovulačního procesu. Nepovažuji za pravděpodobné, aby Pfg2-α byl vypouštěn ve stálé koncentraci a degradovaldo takto nepravidelně fluktuujících hodnot. Domnívám se, že pokud by byl vypouštěn ze stabilního zdroje, naměřené hodnoty by pravidelně oscilovaly kolem nějaké hodnoty, což nevidíme ani u jednoho vzorku (některé hodnoty u vzorku v kádi 6 vykazují tento jev, nelze to považovat za průkazné, protože k tomu dochází jen u části měření). Nelze však vliv vodního prostředí na degradaciferomonu vyloučit, proto mi jako nejpravděpodobnější přijde kombinace obou, totiž že hladina prostaglandinu kolísá jak v rybě vlivem krátké životnosti látky, tak ve vodě rychlým rozkladem; nasvědčovalo by tomu i to, že ani po několika dnech odebírání vzorků se prostaglandin ve vodě exponenciálně nerostl, jako u karasů. Jeho hodnoty byly v druhé části experimentu vyšší, ale stále kolísaly a u některých vzorků šly dokonce dolů; je tedy zjevné, že jeho životnost ve vodě je omezená.

Druhá část experimentu zahrnovala výzkum účinku přítomnosti PF2-α vylučovaného ovulující samicí bolena dravého na chování samců. Z naměřených hodnot (Tab. 5) vyplývá, že se prokázala souvislost mezi přítomností ovulující samice a všemi vybranými behaviorálními parametry u samců. U kontrolních skupin byly všechny behaviorální parametry nižší, než u experimentálních vzorků, někdy dokonce velmi výrazně. Aktivita se pohybovala v nízkých hodnotách u obou vzorků, sociální stimul se pohyboval naopak v poměrně vysokých číslech i u kontrolních vzorků – je nutno uvážit, jestli se zde promítají omezené prostory, ve kterých byly ryby umístěny. Oba parametry však narostly zhruba dvojnásobně u experimentálního vzorku, u obou je tedy patrná souvislost s přítomnosti PF2-α. Jednoznačně největší souvislost byla učichového stimulu. Ten byl u kontrolních vzorků velmi nízký a u experimentálních mnohonásobně vyšší. Výsledky tohoto experimentu odpovídají výzkumu u karase zlatého, který také velmi pozitivně reaguje na přítomnost ovulujících samic (Sorensen et al. 1988) a potvrzuje významnou roli čichu v rozmnožovacím procesu u kaprovitých ryb.

Je na místě se ptát, proč byly přes blízkou příbuznost s karasem zlatým naměřen u bolena delší nástup prostaglandinu u samic i kolísavé hladiny této látky ve vodě. Jednou možností, která by mohla tuto nepravidelnost ve výsledcích vysvětlovat, je zacházení s rybami samotnými, kdy při odebírání vzorků a při kontrole ryb mohlo dojít fyzickou manipulací

k úniku jiker ven z těla do vody a spolu s nimi k úniku většího množství prostaglandinu. Tento faktor nebyl v průběhu experimentu zaznamenáván. Nakolik by byl vzhledem k výsledkům relevantní, je otázka, protože ke spontánnímu vypouštění jiker dochází i bez fyzické stimulace. Kdyby vypouštění jiker a prostaglandinu záviselo na lidském zásahu, tj. na odebírání vzorků, je vzhledem k pravidelnému časovému intervalu odebírání pravděpodobné, že by hodnoty naměřeného prostaglandinu opět oscilovaly pravidelně kolem časové osy. Je to ovšem zajímavá hypotéza, která může obě již jmenované doplňovat a jistě by bylo vhodné ji ověřit dalším zkoumáním. Další možností jsou rozdíly ve fyzické stavbě – karas zlatý je omnivorní a je poměrně drobný, pokud není omezen prostory akvária, dorůstá 15-36 cm délky, kdežto bolen dravý je piscivorní, který dorůstá více než dvojnásobné velikosti. Je tedy možné se domnívat, že ve vnitřních procesech, vedoucí k ovulaci, mohou být rozdíly. Bylo by na místě uskutečnit experiment, který by zkoumal metabolizaci prostaglandinů v závislosti na fyzických znacích obou ryb a jak se tyto odlišnosti mohou projevovat na hladině prostaglandinu v těle samic.

6 Závěr

Feromony jsou chemické látky zpravidla hormonální povahy, které jsou v živočišné říši využívány k nejrůznějším formám komunikace. Nejčastější způsob jejich detekce je přes čichové orgány, a to jak v suchozemském, tak ve vodním prostředí. Cílem mé práce bylo zjistit, zda feromon prostaglandin F2-α, produkovaný samicemi bolena dravého (*Leuciscus aspius*) během ovulace má vliv na chování samců.

Experiment se skládal ze dvou částí. V první se zkoumala produkce prostaglandinu F2-α u ovulujících samic. Šesti neovulujícím samicím bolena dravého byl injekčně aplikován syntetický hormonální přípravek Ovopel, používaný k navození ovulace u samic. Byly umístěny do kádí s vodou, ze které byl každých 6 hodin po dobu 6 dní odebírán 1 l vody, která byla následně zpracována a vyhodnocena na hmotnostním spektrofotometru. Ve druhé byl zkoumán vliv přítomnosti prostaglandinu ve vodním prostředí na chování samců. Odlovilo se 6 samců a 6 neovulujících samic bolena dravého. V rámci kontrolního měření bylo monitorováno jejich vzájemné chování po dobu 165 minut, následně byl samicím injekčně aplikován PF2-α a opět bylo jejich chování monitorováno a následně vyhodnoceno.

Poznatky získané tímto výzkumem i přes jisté odlišnosti odpovídají obecným poznatkům o vlivu sexuálních feromonů na chování ryb a o důležitosti čichu jako komunikačního orgánu v životě ryb. Výzkumem se potvrdil i předpoklad, že samice bolena dravého bude reagovat pozitivně na indukci ovulace pomocí přípravku Ovopelu, který se používá i u jiných kaprovitých ryb. Potvrdil se rovněž i předpoklad, že samci budou pozitivně reagovat na přítomnost ovulujících samic. Soudím tedy, že je možné využít tyto mechanismy na bolena dravého v ochranářské i komerční sféře. Zároveň poznatky tohoto výzkumu potvrzují, že PF2-α funguje jako univerzální sexuální hormon u kaprovitých ryb. Vzhledem k tomu, že k vytírání bolena dravého dochází zejména v noci za úplné tmy (Šmejkal et. al., 2018), je velmi pravděpodobný nějaký druh doplňkové komunikace v rámci druhu. Domnívám se, že další výzkum této problematiky by se měl zaměřit na mechanismus této doplňkové komunikace.

7 Literatura

Abrol D. P. (2013). Integrated pest management: current concepts and ecological perspective. Academic Press, s. 531 - 534

Alexander J. (2009). Pandora's locks: the opening of the great lakes - St. Lawrence Seaway., Michigan State University Press, s. 25 – 36

Asaba A., Hattori T., Mogi K., Kikusui T. (2014). Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. Frontiers in Neuroscience, Vol. 8, s. 231

Baxi L.V., Petrie R. H., Caritis S.N. (1980). Induction of labor with low-dose prostaglandin F2 alpha and oxytocin. American Journal of Obstetics and Gynecology. 136 (1), s. 28-31

Bern Convention on the Conservation of EuropeanWildlife and Natural Habitats (1982).

Bernstein C., Bernstein H. (1997). Sexual communication. Journal of Theoretical Biology, s. 69 - 78

Bircenau O., Sorensen L. A., Henry M, McClelland G. B., Wang Y. S., Wilkie M. P. (2014). The effects of the lampricide 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM) on fuel stores and ion balance in a non-target fish, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Vol. 160, s. 30 - 41

Boogaard M. A., Bills T. D., Johnson D. A. (2003). Acute toxicity of TFM and a TFM/niclosamide mixture to selected species of fish, including lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) and mudpuppies (*Necturus maculosus*). Laboratory And Field Exposures, Journal Of Great Lakes Research, Vol. 29, Supplement 1, s. 529 - 541

Bothma J. du P. (2002). Game ranch management. Van Schaik Publishers, s. 979

Brennan P. A., Zufall F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. Nature Publishing Group, Vol. 444, s. 308 - 315

Buchinger T. J., Siefkes M. J., Zielinski B. S., Brant C. O., Li W.(2015). Chemical cues and pheromones in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). Frontiers In Zoology, Vol. 12, Article 32

Campbell N. A., Reece J. B. (2005). Biology. Benjamin-Cummings Pub. Co., s. 820 - 853

Caro S. P., Balthazart J., (2010). Pheromones in birds: myth or reality?. Journal of comparative physiology,Vol. 196, s. 751 - 766

Ciolac A, (2004). Migration of fishes in romanian Danube river. Applied Ecology & Environmental Research 2, s. 143 – 163

Chung-Davidson Y., Huertas M., Li W. (2011). A Review of Research in Fish Pheromones. Chemical Communication in Crustaceans, s. 467-482

Cox K. H., Rai R., Distler M., Daugherty J. R., Coffman J. A.,Terrance G. C. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* GATA Sequences Function as TATA Elements during Nitrogen Catabolite Repression and When Gln3p Is Excluded from the Nucleus by Overproduction of Ure2p. Journal od Biological Chemistry, Vol. 275, Issue 23, s. 17611 – 17618

Dusenbery D. (2002). Ecological models explaining the success of distinctive sperm and eggs (Oogamy). Journal of Theoretical Biology, Vol. 219(1), s. 1-7

Eisthen H. L., Wyatt T. D. (2006). The vomeronasal system and pheromones. Current biology, Vol. 16, s. 74

Eller F. J., Bartelt R. J., Shasha B. S., Schuster D. J., Riley D. G., Stansly P. A., Mueller T. F., Shuler K. D., Johnson B., Davis J. H., Sutherland C. A. (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii Cano* (*Coleoptera: Curculionidae*): identification and field activity. Journal Of Chemical Ecology, Vol. 20, s. 1573 – 1555

Fitzgerland T. D. (2008). Use of pheromone mimic to cause the disintegration and collapse of colonies of tent caterpillars (*Malacosoma* spp.). Journal of Applied Entomology, Vol. 132, Issue 6, s. 451 - 460

Gassett, J. W., Wiesler, D. P., Baker, A. G., Osborn, D. A., Miller, K. V., Marchinton, R. L.,, Novotny, M. (1996). Volatile compounds from interdigital gland of male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Journal of Chemical Ecology, Vol. 22, s.1689-1696.

Great Lakes Fishery Commision (2017). Sea lamprey: a Great Lakes invader. www.glfc.org

Gupta P. D., Yogeswari S. (2010) Multifunctionality of Pheromones. Journal of Cell and Tissue Research, Vol. 10(3), s. 2433 – 2435

Hallmann A. (2003). Extracellular Matrix and Sex-Inducing Pheromone in Volvox. International Review of Cytology, Vol. 227, s. 131 - 182

Hayes D. B., Baylis J. R., Leon M., Carl L. M., Dodd H. R., Goldstein J. D., McLaughlin R. L., Noakes D. L. G., Porto L. M. (2003). Biological effect of low-head sea lamprey barriers: designs for extensive surveys and the value of incorporating intensive process-oriented research. Journal of Great Lakes Research, Volume 29, Supplement 1, s. 373 - 385

Houck L. D. (2009). Pheromone communication in amphibians and reptiles. Annual review of physiology, Vol. 71, s. 161 – 176

Inayatullah C., El Bashir S., Hassanali A. (1994). Sexual Behavior and Communication in the Desert Locust, Schistocerca gregaria (Orthoptera: Acrididae): Sex Pheromone in Solitaria. Environmental Entomology, Vol. 23, Issue 6, s. 1544 – 1551

Ishihara O., Sullivan M. H., Elder M. G. (1991): Differences of metabolism of prostaglandin E2 - and F2 -alpha by decidual stromal cells and macrophages in culture. Eicosanoids, s. 203 - 207

IUCN Red List of Threatened Species (2021). IUCN, https://www.iucnredlist.org/

Keller L., Nonacs P., (1993). The role of queen pheromones in social insects: Queen control or queen signal?. Animal Behaviour,Vol. 45(4), s. 787 - 794

Keverne E., (2005). Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. Nature neuroscience, Vol. 8, s. 1637 - 1638

Kikuyama S., Toyoda F., Ohmiya Y., Matsuda K., Tanaka S., Hayashi H. (1995). Sodefrin: a female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands. Science, Vol. 267, s. 1643 - 1645

Kohl J. V., Atzmueller M., Fink B., Grammer K. (2001). Human pheromones: integrating neuroendocrinology and ethology. Ludwing-Boltzmann institute for urban ethology, University of Vienna, s. 309 - 321

Kottelat M., Freyhof J. (2007). Handbook of european freshwater fishes. Publications Kottelat, s. 646

Križek J.; Vostradovsky J., (2002). Population dynamics of the rapacious carp (*Aspius aspius L.*) in the Zelivka Reservoir in 1972-1992. 4th International Conference on Reservoir Limnology and Water Quality, s. 180 - 182

Krpo-Cetkovic J., Hegedis A., Lenhardt M., (2010). Diet and growth of asp, *Aspius aspius* (Linnaeus, 1758) in the Danube river near the influence with the Sava river (Serbia). Journal of Applied Ichthyology, Vol. 26, s. 513 - 521

Kubečka J., Frouzová J., Jůza T., Kratochvíl M., Prchalová M., Říha M., (2010). Metodika monitorování rybích společenstev nádrží a jezer. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Hydrobiologický ústav

Kucharczyk D., Kujawa R., Mamcarz A., Skrzypczak A., Wyszomirska E., (1998). Reproduction of asp (*Aspius aspius L.*), ide (*Leuciscus idus L.*), and chub (*Leuciscus cephalus L.*) under controlled conditions outsider of the natural spawning season. In: Rheophilous Cyprinids. The 1st Polish Conference on Rheophilous Cyprinid Culturists and Producers, s. 57 – 64

Lim H., Sorensen P. W. (2012). Common Carp Implanted with Prostaglandin F 2α Release a Sex Pheromone Complex that Attracts Conspecific Males in Both the Laboratory and Field. Journal of Chemical Ecology, Vol. 38(2):127-134

Maitland P. S. (1977). The Hamlyn guide to freshwater fishes of Britain and Europe. Hamlyn Publishing Group

Marlier L., Schaal. B. (2005). Human newborns prefer human milk: conspecific milk odor is attractive without postnatal exposure. Child Develompent vol. 76, s. 155 - 168

Marshall J. (2017). Vision and lack of vision in the ocean. Current Biology, Vol. 27, Issue 11, s. 493 - 502

McClelland E. (2008). Great lake invaders. E – The Environmental Magazine, Vol. 19, s. 10 - 11

Morgan E. D., Billen J. (1998). Pheromone communication in social insects: sources and secretions in pheromone communication. Westview Press, s. 3-33

Olsen K. H. (2011). Effects of pollutants on olfactory mediated behaviors in fish and crustaceans. Södertörn University, p. 507 - 523

Ono M. (2005). Semiochemicals that regulace social behaviour of hornets. Aroma research, Vol. 6, s. 230 - 236

Poddar-Sarkar M., Brahmachary R. L. (2014). Pheromones of tiger and other big cats. Neurobiology Of Chemical Communication, s. 407 - 460

Pogue M. G., Schaefer P. W. (2007). A review of selected species of Lymantria Hübner (1819) Including free new species. Forest Health Technology Enterprise Team Technology Transfer, Washington, D. C., s. 1–217

Popper A. N., Rogers P. H., Saidel W. M., Cox M. (2003). Role of the Fish Ear in Sound Processing. Sensory Biology of Aquatic Animals, s. 687-710

Rajchard J. (2006). Antipredator pheromones in amphibians: a review in Veterinarni medicina 1. Department of biological disciplines, faculty of agriculture, University of South Bohemia, Vol. 51, s. 409 - 413

Rasmussen, L. E. L., Lee, T. D., Roelofs, W. L., Zhang, A, J., Daves, G. D. (1996). Insect pheromone in elephants. Nature London, Vol. 379, s. 684

Regnier F. E., Law J. H. (1968). Insect pheromones. Journal of lipid research, Volume 9, s. 541 – 545

Robinson, E. J. H., Green K. E., Jenner E. A. (2008). Decay rates of attractive and repellent pheromones in an ant foraging trail network. Insectes Sociaux, s. 246 - 251

Rudinsky J. A. (1973). Multiple functions of the southern pine beetle pheromone verbenone. Environmental Entomology, Vol. 2, Issue 4, s. 511 – 514

Signoret J. P. (1971). The reproductive behaviour of pigs in relation to fertility. The Veterinary Record, Vol. 88, s. 34 - 38

Schlyter F. (1992). Sampling range, attraction range and effective attraction radius: estimates of trap efficiency and communication distance in coleopteran pheromone and host attractant systems. Journal Of Applied Entomology, Vol. 114, s. 439 - 454

Schneirla T. C. (1972). Army ants: a study in social organization. W. H. Freeman & Co. Ltd., s. 121 - 127

Schulz S. (2005). The chemistry of pheromones and other semiochemicals II. in: Topics in current chemistry, Vol. 240, s. 97 - 131

Smith N. G. (1983). Host plant toxicity and migration in the day flying moth *Urania*. Florida Entomologist, Vol. 66(1), s. 351 – 373

Sorensen P. W. (1996). Biological Responsiveness to Pheromones Provides Fundamental and Unique Insight into Olfactory Function. Chemical Senses, Vol. 21, Issue 2, s. 245–256

Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E. (1987). Extreme olfactory sensitivity of mature and gonadally-regressed goldfish to a potent steroidal pheromone, 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one. Journal Of Comparative Physiology, Vol. 160, s. 305–313

Sorensen P. W., Hara T. J., Stacey N. E,.Goetz F. W., (1988). F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. Biology of reproduction, s. 1039-1050

Sorensen P. W., Stacey N. E. (1999). Evolution and specialization of fish hormonal pheromones, advances in chemical signals in vertebrates. Kluwer Academic, Plenum Publishers, s. 15 - 48

Sorensen P. W., Stacey N. E. (2004). Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, s. 399 – 417

Sorensen P. W., Wisenden B. D. (2014). Fish Pheromones and Related Cues. Wiley-Blackwell, s. 1 – 9

Stacey N. E., Sorensen P. W. (2004). Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, Vol.38

Stacey N. E., Sorensen P. W., Dulka J., Kraak G. V. D., (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. Nature 325, s. 251 - 253

Stacey N. E., Wisenden B. D. (2004). Fish semiochemicals and the evolution of communication network. Minnesota State University, s. 540 – 561

Šmejkal M., Bartoň D., Brabec M., Sajdlová Z., Souza T. A., Moraes K. R., Soukalová K., Blabolil P., Vejřík L., Kubečka J. (2021). Climbing up the ladder: male reproductive behaviour changes with age in a long-lived fish. Behavioral Ecology and Sociobiology,Vol.75, Article number: 22

Šmejkal M., Souza A. T., Blabolil P., Bartoň D., Sajdlová Z., Vejřík L., Kubečka J. (2018). Nocturnal spawning as a way to avoid egg exposure to diurnal predators. Scientific Reports,Vol.8, Article number: 15377

Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., Blomquist, G.J. (1999). Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 29(6), s. 481-514.

Trhlin M., Rajchard J. (2011). Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): A review. Veterinarni medicina, vol. 56 (6), s. 265 - 273

Vandermoten S., Mescher M. C., Francis F., Haubruge E. (2011). Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 42(3), s. 155 – 163

Warren M. L., Burr B. M., (2014). Freshwater fishes of North America, Vol. 1, Petromyzontidae to catostomidae . Johns Hopkins University Press, s. 105-179

Witzgall P., Kirsch P. Cork A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. Journal of Chemical Ecology, Vol. 31 (1), s. 80 – 100.

Wisenden B. D., Chivers D. P. (2006). The Role of Public Chemical Information in Antipredator Behaviour. Communication in fishes 1, s. 259-278

Wyatt T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. Journal Of Comparative Physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology, s. 685 – 700

Wyatt T. D. (2014). Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures, seond edition. Cambridge University Press, s. 18

Żarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Jamróz, M.,Krejszeff, S. Mamcarz, A. (2009). Application of Ovopel and Ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two rheophilic cyprinid fish species. Polish Journal of Natural Science, s. 235 - 244

8 Přílohy

Tabulka 1: Laboratorní vybavení a přístroje použité na zpracování 1 odebraného vzorku

laboratorní vybavení
manuální SPE Vacuum Manifold na 20 vzorků
centrifuga
plastová hadička délky 70cm
ultrazvuková lázeň
lednice
aparatura pro odpařování vzorků plynným dusíkem
kapalinový chromatograf Thermo Scientific Dionex Ulti Mate 3000 UHPLC+
hmotnostní spektrometr Bruker Impact HD high

Tabulka 2: Laboratorní nádoby s objemy použité na zpracování 1 vzorku

nádoba	**objem**
odměrný válec	1000 ml
pipeta	10 ml
pipeta	5 ml
pipeta	500 µl
cartridge Supelco Discovery DSC-18	6 ml
střička s 96% metanolem	250 ml
střička s destilovanou H2O	250 ml
HPLC vialka s insertem	1,5 ml
mikrozkumavka Eppendorf	2 ml

Tabulka 3: Použité chemické látky a jejich objemy ke zpracování 1 vzorku

chemická látka	**množství**
15 % roztok $C_6H_8O_7$	8 ml
roztok CH_3OH + 10%BTH	1 ml
roztok CH_3OH + CH_3COONH_4	200 µl
96% roztok CH_3OH	cca 50-80 ml
destilovaná H_2O	cca 150 – 200 ml
0,1% roztok CH_2O_2	1 ml
C_2H_3N	5 ml
$CHNaO_2$	5 ml
Ovopel	2 mg

Tabulka 4: hodnoty koncentrací Pfg2-α v ng/l v jednotlivých kádích (K1-6)

datum	**22.3.**	**23.3.**				**24.3.**				**25.3.**				**26.3.**				**27.3.**		
čas	**18:00**	**0:00**	**6:00**	**12:00**	**18:00**	**0:00**	**6:00**	**12:00**	**18:00**	**0:00**	**6:00**	**12:00**	**18:00**	**0:00**	**6:00**	**12:00**	**18:00**	**0:00**	**6:00**	**12:00**
odběr	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	302,4	932,89	0	571,39	921,3	0	593	728,8	462,15	422,5
K2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4598,52	0	0	0	1002,1	0	548,21
K3	0	0	0	927,58	559,91	743,13	0	1463,01	3002,78	1478,66	1203,4	1612,13	2697,15	2101,37	3520,9	2514,59	2326,22	1321,73	1183,64	1669,28
K4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	554,39	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	1592,71	866,84	832,71	504,4	1877,93	1375,12	1138,11	1003,96	2178,62	2397,4	191,99	2042,05	4236,12
K6	0	0	0	0	0	0	448,3	877,41	1422,64	2971,13	3541,2	814,28	3832,82	1525,32	204,5	3459,48	1191,92	2885,52	1599,98	4089,39

Tabulka 5: Záznam pozorovaných behaviorálních parametrů samců bolena dravého

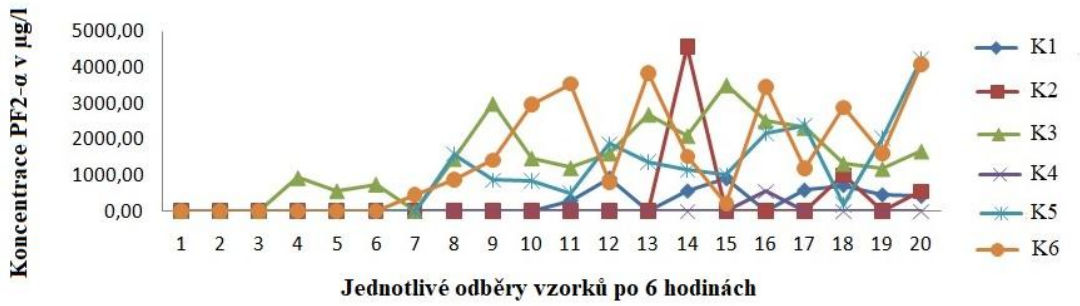
behaviorální parametr				
káď + vzorek	**šetření**	**aktivita**	**čichový stimul**	**sociální stimul**
1	kontrola	10	5	148
	experiment	43	118	245
2	kontrola	33	12	120
	experiment	53	124	225
3	kontrola	37	6	135
	experiment	59	76	203
4	kontrola	24	9	142
	experiment	52	97	221
5	kontrola	35	6	136
	experiment	60	115	217
6	kontrola	18	4	127
	experiment	46	131	253

Tabulka 6: Terénní vybavení a přístroje použité na monitoring behaviorálních parametrů 1 páru bolena dravého

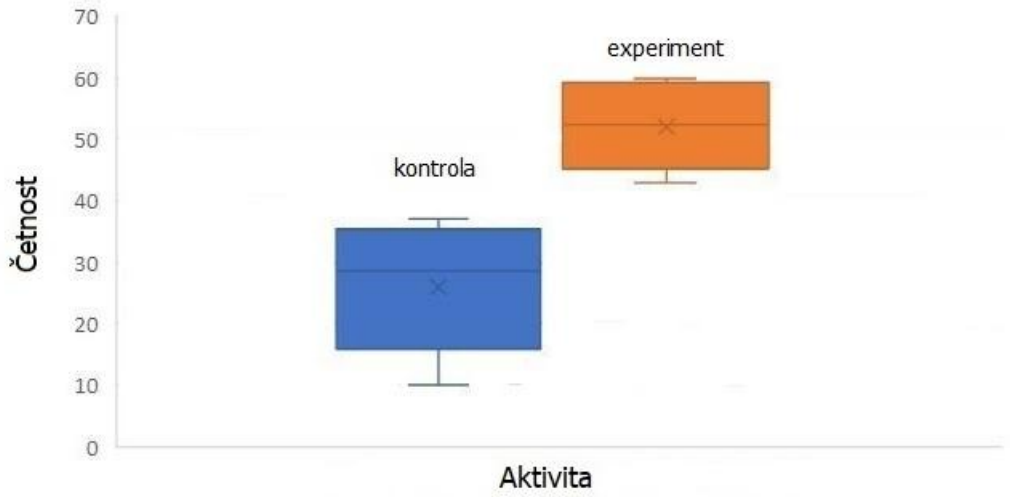
elektrický agregát Electrofisher EL 65 II GL DC
káď o objemu 550 l
nůž
injekční stříkačka o objemu 10 ml
webkamera Genius FaceCam 1000X V2

Tabulka 7: Chemické látky a jejich objemy použité na monitoring behaviorálních parametrů 1 páru bolena dravého

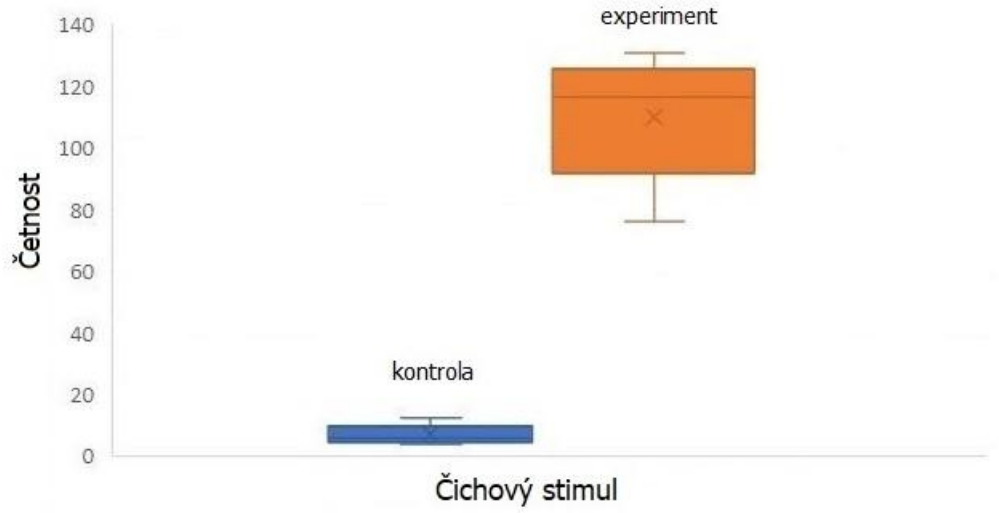
chemická látka	**objem**
vodný roztok 0,9% NaCl	2 ml
400 µg/kg roztok PF2-α	2 ml



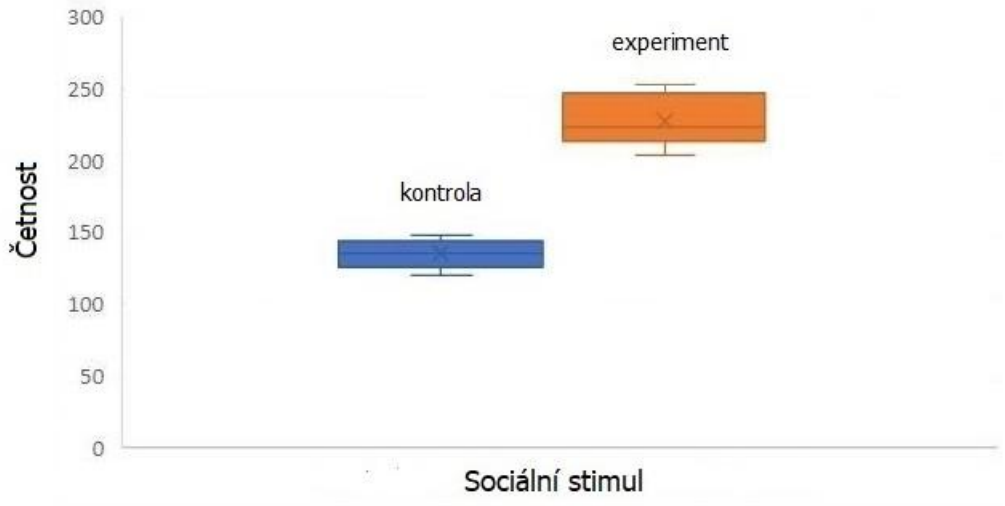
Obrázek 1: Porovnání naměřených hodnot Pfg2-α u zkoumaných samic v jednotlivých kádích (K1-6)



Obrázek 2: Krabicový graf behaviorálního parametru Aktivita. Vousy vyznačují interval spolehlivosti parametru (95%), krabice udává svým vertikálním rozměrem rozmezí mezi prvním a třetím kvartilem, prostřední čára udává medián a křížkem je vyznačen průměr.



Obrázek 3: Krabicový graf behaviorálního parametru Čichový stimul.Vousy vyznačují interval spolehlivosti parametru (95%), krabice udává svým vertikálním rozměrem rozmezí mezi prvním a třetím kvartilem, prostřední čára udává medián a křížkem je vyznačen průměr.



Obrázek 4: Krabicový graf behaviorálního parametru Sociální stimul. Vousy vyznačují interval spolehlivosti parametru (95%), krabice udává svým vertikálním rozměrem rozmezí mezi prvním a třetím kvartilem, prostřední čára udává medián a křížkem je vyznačen průměr.