

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vliv vysychání vody na vývoj pulců
Rana temporaria

Bakalářská práce

Denisa Modrá

Školitel: Mgr. Michal Berec, Ph.D.

České Budějovice 2014

Modrá, D., 2014: Vliv vysychání vody na vývoj pulců *Rana temporaria*. [The impact of water dessication on the development of *Rana temporaria* tadpoles. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Common frog (*Rana temporaria*, Anura: Ranidae) reproduces in various freshwater habitats including shallow ponds with variable water level and hence high risk of mortality due to the water losses. I performed a laboratory experiment with simulated drying and assessed whether continuous water loss supports phenotypic plasticity of common frog. I showed the influence of decreasing water volume on development time, body size and weight of tadpoles.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 12. 12. 2014

.....

Denisa Modrá

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli s touto prací. Děkuji školiteli Mgr. Michalovi Bercovi, PhD. za vedení a především za možnost zabývat se obojživelníky. Děkuji Oldovi Nedvědovi nejen za pomoc s nastavením pokusu, ale za ochotu mi pomoci s čímkoliv, co jsem potřebovala. Za pomoc s plánováním pokusu děkuji rovněž RNDr. Romanovi Fuchsovi, CSc. Děkuji Davidovi Boukalovi za umožnění držení snůšek s vajíčky v jeho klimaboxech na Entomologickém ústavu a za zapůjčení dataloggerů. Děkuji doc. Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, CSc. za propůjčení chladové místnosti, ve které probíhal můj pokus. Děkuji doc. Ing. Josefu Hejzlarovi, CSc. z Hydrobiologického ústavu za stanovení koncentrace dusíkatých látek ve vodách.

Mé největší poděkování ovšem patří Michalovi Šorfovi, který mi pomohl nejen s provedením časově náročného experimentu, ale také se zpracováním výsledků a vůbec za přátelskou podporu během tvorby této práce.

Rodině děkuji za podporu během studia a umožnění studovat na této škole.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Literární řešerše	3
3.1. Vysychání vody	3
3.2. Teplota vody	5
3.3. Chemické látky	6
3.4. Hustota jedinců a dostupnost potravy	7
3.5. Predace	8
3.6. Maternální investice	9
4. Experimentální část – metodika	10
4.1. Studovaný druh	10
4.2. Příprava studijního materiálu	10
4.3. Vlastní pokus	11
4.4. Statistická zpracování dat	13
5. Výsledky	14
5.1. Mortalita a dosažení metamorfózy	14
5.1.1. Mortalita	14
5.1.2. Dosažení metamorfózy	14
5.2. Velikost pulců v průběhu pokusu	15
5.3. Metamorfóza	15
5.3.1. Velikost pulců	15
5.3.2. Hmotnost pulců	16
5.3.3. Délka vývoje	17
5.4. Fyzikálně-chemické parametry ve vodě	18
5.4.1. Hodnoty pH	18
5.4.2. Obsah rozpuštěného kyslíku	19
5.4.3. Vodivost	20
5.4.4. Jednorázová porovnání denních a nočních hodnot	21
5.4.5. Obsah dusíkatých látek	22
5.4.6. Vztah fyzikálně-chemických parametrů a měřených faktorů fenotypové plasticity	23
6. Diskuze	24
6.1. Mortalita a dosažení metamorfózy	24
6.2. Velikost pulců v průběhu pokusu	24
6.3. Metamorfóza	25
6.4. Fyzikálně-chemické parametry ve vodě	26
7. Závěr	29
Použitá literatura	30
Příloha	35

1. Úvod

Globální změny klimatu mají za následek mimo jiné velký úbytek vodního prostředí a posun či zkrácení hydroperiody (např. Scott et Metts, 2011), a tedy obrovský dopad na populace druhů živočichů v nich žijících či se vyvíjejících. Kromě ztráty životního prostředí jsou tyto živočichové ohroženi rovněž jeho znečištěním, pesticidy, rozšířením nepůvodních druhů, parazity a patogeny. Nejvíce ohroženou třídou obratlovců podle Červeného seznamu IUCN jsou však obojživelníci (Amphibia, 32 % ohrožených, z toho 1 188 druhů v kategoriích kriticky ohrožení a ohrožení, což je dvakrát tolik než u ptáků a savců; Bailie et Hilton-Taylor, 2004; IUCN, 2014). Obývají vodní i suchozemské ekosystémy; na vodních jsou závislí zejména v době rozmnožování, až na některé, trvale závislé druhy. Mezi čtyřnožci jsou unikátními vzhledem ke svému složitému životnímu cyklu a míře odpovědi larev na podmínky prostředí – fenotypové plasticitě (Wells, 2007; Denver, 2009; Enriquez-Urzelai et al., 2013a).

Fenotypová plasticita je schopnost genotypu vytvářet různé fenotypy v reakci na měnící se podmínky prostředí (Stearns, 1989; Newman, 1992; Gotthard et Nylin, 1995; Laurila et al., 2002; Denver, 2009). U pulců je zprostředkována mj. hypotalamickými stresovými hormony - kortikotropin-releasing hormony (CRH) - aktivujícími činnost štítné a interrenální žlázy. Po jejich uvolnění dochází k sekreci kortikosteroidů v adrenálních žlázách, které ovlivňují fyziologii a chování pulců a spustí tak únikovou reakci jako odpověď na stresující podmínky. Tím je ovlivněna doba jejich vývoje a morfologie a tedy fyziologický fenotyp v následujících fázích života (Denver, 1997; Wells, 2007; Denver 2009).

Těmito odpověďmi na různé změny prostředí se zabývá stále více studií v souvislosti s klimatickými změnami za účelem ochrany a zachování druhů (McMenamin et al, 2008; Goldberg et al., 2012; Enriquez-Urzelai et al., 2013b).

2. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat řešení ohledně faktorů souvisejících s vysycháním vodních ploch a jejich možným dopadem na dynamiku vývoje a následný fenotyp obojživelníků a provést pokus za účelem ověření, zda jsou pulci skokana hnědého schopni reagovat na simulované vysychání vodního prostředí v laboratorních podmínkách, popř. jakým způsobem. Řešila jsem tyto hypotézy:

- pulci reagují na snižování objemu vody zkrácením délky vývoje
- pulci reagují na snižování objemu vody zmenšením tělesné velikosti v době metamorfózy

Během experimentu jsem se dále pokusila zjistit, jakou roli v případné reakci pulců na vysychání vody hrají fyzikálně-chemické parametry.

3. Literární rešerše

Pulci mnoha druhů obojživelníků vykazují značnou plasticitu v délce trvání vývoje a tělesné velikosti v době metamorfózy. Tato plasticita je běžnou reakcí na prostředí ovlivněné faktory abiotickými, např. stálostí vodního prostředí (Denver et al., 1998, Laurila et Kujasalo, 1999; Székely et al., 2010), teplotou (Wilbur, 1987; Newman, 1989, 1992; Tejedo et Reques, 1994), a biotickými, např. populační hustotou, dostupností a kvalitou potravy (Smith, 1983; Newman, 1994; Tejedo et Reques, 1994; Denver et al., 1998; Leips et al., 2000; Enriquez-Urzelai et al., 2013a) či predací (Smith, 1983; Travis 1983; Stav et al., 2007). Méně jasné jsou mechanismy, jakými tyto faktory prostředí do vývoje zasahují. Mohou různě ovlivňovat produkci hormonů endokrinními žlázami, regulaci hypotalamem, citlivost cílových tkání k hormonům či všechny tři dohromady a celý vývoj a růst tak urychlit či inhibovat (Wilbur et Collins, 1973; Wells, 2007). Do jaké míry bude jedinec těmito faktory nakonec ovlivněn, záleží na jeho aktuálním vývojovém stádiu a tělesné velikosti (Wilbur et Collins, 1973).

3.1 Vysychání vody

Adaptivní fenotypová plasticita v podobě schopnosti urychlit vývoj jako reakce na vysychání vody je známá u mnoha druhů obojživelníků (*Bufo calamita*: Reques et Tejedo, 1997; *Hyla gratiosa*: Leips et al., 2000; *Rana temporaria*: Laurila et Kujasalo, 1999; Loman, 1999; Merilä et al., 2000a; Laurila et al., 2002; Loman et Claesson, 2003; Merilä et al., 2004; *Scaphiopus couchii*: Newman, 1988; *S. holbrooki*: Wilbur, 1987; *S. hammondi*: Denver et al., 1998; obecně: Newman, 1992).

Pro evoluci fenotypové plasticity je podstatná heterogenita prostředí. Typickými příklady heterogenního prostředí (a tedy vhodnými systémy pro studium fenotypové plasticity) jsou dočasné rybníky a jiné menší vodní plochy charakteristické pravidelnými změnami výšky vodní hladiny, v nichž vysychání představuje pro pulce největší ohrožení (Newman, 1992; Loman et Claesson, 2003). V těchto systémech je pro obojživelníky přechod z vodního prostředí v odpovídající velikosti a stáří rozhodující pro následující život na pevnině (Rowe et Ludwig, 1991).

Současné modely zahrnují předpovědi související s vlivem časového omezení (délkou trvání vodního prostředí či sezónou) na dobu vývoje a následkem toho na stáří a velikost v době metamorfózy (Rowe et Ludwig, 1991; Abrams et al. 1996; Laurila et al., 2002; Rudolf et Rodel, 2007).

Jsou-li podmínky vodního prostředí pro pulce výhodné, umožňuje jim plasticita prodloužit dobu vývoje za účelem dosáhnouti maximální velikosti během metamorfózy (*Rana sylvatica*: Berven et Gill, 1983; *Rana temporaria*: Loman, 1999; *Scaphiopus hammondi*: Denver et al., 1998).

Avšak vysychá-li vodní prostředí a riziko mortality pulců se zvyšuje, stresové hormony (CRH) zrychlí ontogenezi, čímž zvýší šanci na přežití v těchto zhoršujících se podmínkách (Denver, 1997, 2009). Na druhou stranu, pulci nemají dostatek času pro svůj růst a často tak dosahují menší konečné velikosti, což může mít významný negativní vliv na fitness. Malá velikost souvisí s malou velikostí v dospělosti (Werner, 1986) a je tak spojená s nižším přežitím během přezimování (*Rana sylvatica*: Berven et Gill, 1983), nižším úspěchem při reprodukci (*Rana sylvatica*: Berven et Gill, 1983; *Rana temporaria*: Johansson et al., 2005; obecně: Clutton-Brock, 1988; Rowe et Ludwig, 1991; Denver, 2009), horším pohybovým výkonem (*Agalychnis callidryas*, *Xenopus laevis*: Gomez-Mestre et al., 2010; *Pelodytes punctatus*: Richter-Boix et al., 2006; *Rhinella spinulosa*: Márquez-García et al., 2009), či častějšími podlehnutím hladovění či dehydrataci (*Scaphiopus couchii*: Newman et Dunham, 1994). Dochází tedy k trade-off mezi pozdější metamorfózou pulce ve vyšší tělesné velikosti (a následnou vyšší šanci na přežití a reprodukční úspěch na souši) a dřívější metamorfózou spojenou s malou tělesnou velikostí (a tedy snížením rizika mortality během larválního vývoje) (Wilbur et Collins, 1973; Werner, 1986; Wilbur, 1987; Newman, 1988, 1989, 1992; Denver et al., 1998; Laurila et Kujasalo, 1999; Merilä et al., 2000b; Laurila et al., 2002; Loman et Claesson, 2003; Rudolf et Rodel, 2007).

Zvyšuje-li se ale v důsledku vysychání riziko mortality, dřívější metamorfóza může být přesto výhodnější i navzdory nákladům spojených s malou tělesnou velikostí a někteří autoři se tedy domnívají, že pulci mnoha druhů obojživelníků rozmnožujících se v dočasných vodách urychlují svůj vývoj záměrně tak, aby se z vody dostali ještě před úplným vyschnutím (*Bufo calamita*: Tejedo et Reques, 1994; *Hyla gratiosa*: Leips et al., 2000; *Pelobates syriacus*: Székely et al., 2010; *Phrynobatrachus guineensis*: Rudolf et Rodel, 2007; *Rana temporaria*: Laurila et Kujasalo, 1999; Loman 1999; Merilä et al., 2000b; Laurila et al., 2002; Loman, 2002; Lind et Johansson, 2007, 2009; *Scaphiopus holbrooki*: Wilbur, 1987; obecně: Werner, 1986; Rowe et Ludwig, 1991; Newman, 1992; Denver, 1997).

Výše zmíněné náklady spojené s fitness jsou však nejen druhově, ale také populačně specifické. Vyskytují se totiž zejména u populací s vysokou mírou odpovědi

vůči vysychání. Populace vyskytující se ve stálém vodním prostředí takovou variabilitu v délce trvání vývoje a velikosti pulců v metamorfóze nevykazují (*Pelobates syriacus*: Székely et al., 2010; *Rana temporaria*: Lind et Johansson, 2007; obecně: Wilbur et Collins, 1973; Newman, 1992). Totéž potvrzují i studie porovnávající fenotypovou plasticitu pulců stejného druhu, nicméně pocházejících z různých oblastí (*Rana temporaria*: Merilä et al., 2000a; Laurila et al., 2002; Merilä et al., 2004; Johansson et al., 2005; Lind et Johansson, 2009). Jedná se tedy o adaptaci na místní prostředí, pravděpodobně řízenou posunem průměrných znaků životního cyklu (life history traits; Lind et Johansson, 2007, 2011).

Márquez-García et al. (2010) ve svém experimentu zjistili, že pulci *Rhinella spinulosa* vystavení snižování objemu urychlili vývoj, avšak menší tělesné velikosti nedosáhli. Tento fakt ale přičítají možnému vlivu nízké hustoty pulců a dostatku potravy. Loman (1999, *Rana temporaria*) naopak vliv nízké hustoty popírá, místo toho stejný výsledek přičítá změně chování pulců, kdy jedinci v takovéto situaci urychleně konzumují potravu, a to i za cenu vystavení se případnému predáčnickému riziku.

Bezprostřední mechanismy související s urychlením vývoje v časově omezeném vodním prostředí jsou však stále nejasné (Newman, 1992; Gotthard et Nylin, 1995). Je totiž také možné, že pulci přímo cítí úbytek vodního objemu, čili nejde o množství vody, ale o aktuální snižování (*Pelobates syriacus*: Székely et al., 2010; *Rana temporaria*: Loman, 1999; Merilä et al., 2000b). V Székelyho studii pulci chovaní v nízkém, avšak konstantním objemu vody metamorfovali za stejnou dobu jako pulci ze skupiny s objemem vysokým. Vývoj urychlili pouze pulci ze skupiny s postupně snižovaným objemem. Ovšem nejmenší velikosti dosáhli pulci ze skupiny s konstantně nízkým objemem.

3.2 Teplota vody

Ze všech fyzikálních parametrů ve vodním prostředí má teplota zřejmě největší vliv na fyziologii, ekologii i chování pulců. Ovlivňuje biochemické procesy, které mimo jiné řídí morfogenezi, a je tedy důležitým faktorem, který může být příčinou urychlení vývoje.

Dočasné vodní plochy jsou často charakteristické vyšší teplotou způsobenou rychlejším prohřátím vody. Některé studie proto navrhují, že dřívější metamorfóza by tak mohla představovat odpověď na vyšší teplotu (*Bufo calamita*: Tejedo et Reques, 1994; *Hyla cinerea* a *H. gratiosa*: Blouin, 1992; *Scaphiopus couchii*: Newman, 1989; obecně: Smith-Gill et Berven, 1979; Newman, 1992; Gotthard et Nylin, 1995). Dle těchto studií má zvýšení teploty zpravidla za následek vyšší rychlost vývoje, tedy kratší dobu vývoje

a menší tělesnou velikost jedinců při metamorfóze. Zato Merilä et al. (2000a) ve své studii zjistili, že pulci *Rana temporaria* při zvyšující se teplotě neurychlili pouze vývoj, ale i růst.

Příliš zvýšená teplota má ale podle Berven et al. (1979, *Rana clamitans*) za následek naopak nižší rychlost růstu.

Nízká teplota snížila rychlost růstu a opozdila metamorfózu (*Rana temporaria*: Merilä et al., 2000a). Experimentálně nastavená nízká teplota v podmínkách neomezujících růst (tj. při hojnosti potravy) opozdila metamorfózu, ale konečná velikost pulců byla stejná jako u pulců chovaných ve vyšší teplotě (*Agalychnis callidryas*, *Xenopus laevis*: Gomez-Mestre et al., 2010).

Nicméně, Denver (1997), který porovnával pulce několika druhů, zjistil, že urychlený vývoj vyvolaný simulovaným vysycháním vodního prostředí v laboratoři není na teplotě závislý, tedy že zvýšení teploty reakci na vysychání nevysvětluje. Stejně tak i jiné studie reakci právě na teplotu vylučují (*Pelobates syriacus*: Székely et al., 2010; *Rana temporaria*: Laurila et Kujasalo, 1999; Loman, 1999; *Rhinella spinulosa*: Márquez-García et al., 2009; *Scaphiopus hammondi*: Denver et al., 1998).

Pokud by urychlení vývoje ve vysychajícím prostředí bylo ovlivněno teplotou, fenotypová plasticita by byla důsledkem nevyhnutelných neadaptivních účinků prostředí (Berven et Gill, 1983; Newman, 1992; Gotthard et Nylin, 1995) spíše než jako výsledek přírodní selekce.

3.3 Chemické látky

Dalším možným vysvětlením může být změna v obsahu chemických látek ve vodě. Vypařování má za následek zvýšení koncentrace přítomných látek. Spolu se zvýšenou hustotou pulců se zvyšuje obsah rozpuštěného oxidu uhličitého, snižuje se obsah kyslíku a zvyšuje se koncentrace metabolických odpadních látek či hormonů. Následkem toho může dojít k urychlení vývoje. Székely et al. (2010) ve svém pokusu přišel na to, že vystavením pulců *Pelobates syriacus* zvýšeným koncentracím metabolitů došlo rovněž ke snížení rychlosti růstu a menší velikosti během metamorfózy.

Denver (1997) pomocí laboratorních porovnávacích pokusů s pulci několika druhů naopak zjistil, že jedinci vystavení snižujícímu se objemu vody svůj vývoj neurychlují v reakci na koncentrace metabolitů.

Chemické faktory, jako jsou vysoké koncentrace amoniaku, dusitanů a dusičnanů, souvisejí především s prostředím s vysokým množstvím potravy. Pulci mohou sice

v prostředí s dostatkem potravy růst rychleji, na druhou stranu ale při přemíře potravy dochází ke znečištění vody, které růst pulců zase zpomaluje a navíc významně snižuje míru jejich přežití (*Rana sylvatica*: Wilbur, 1977; *Rana temporaria*: Merilä et al., 2000a). Na mortalitu má vliv zejména vysoká koncentrace dusičnanu amonného (Johansson et al., 2001). Johansson et al. (2001) nadále ve své studii, kde porovnávali vliv dusičnanů na populace *Rana temporaria* v severním a jižním Švédsku, zjistili, že pulci pocházející ze severního Švédska, kde žijí v poměrně na živiny chudých vodních prostředích, snížili vlivem dusičnanů rychlost růstu, a tedy dosáhli menší velikosti v době metamorfózy, zatímco jižní populace, žijící v prostředí s obecně vyšší koncentrací dusičnanů, byla vůči nim více tolerantní. Merilä et al. (2000a), kteří rovněž porovnávali populace *Rana temporaria* ze severního a jižního Švédska, si tímto vysvětlují zase rozdíly mezi populacemi v přežití pulců.

Každopádně, dusičnany jsou považovány za jedny z potenciálních činitelů přispívajících k celosvětovému poklesu populací obojživelníků (Blaustein et Wake, 1990).

3.4 Hustota jedinců a dostupnost potravy

Snižující se objem vody ve vysychajícím prostředí rovněž souvisí s hustotou jedinců. Spolu s vysycháním se zmenšuje životní prostor a zvyšuje se hustota populace, čímž dochází k omezení pohybu a horší dostupnosti potravy (Leips et al., 2000). Zvyšuje se kompetice vnitrodruhová i mezidruhová, kdy je jeden druh úspěšnější v hledání zdrojů potravy, konzumaci či schopnosti zdroj zabrat, čímž o něj připravuje druhy jiné (Cabrera-Guzmán et al., 2013).

Někteří autoři navrhují, že snížená růstová rychlost díky nižšímu přísunu potravy vlivem zvýšené hustoty pulců či menšímu prostoru aktivuje endokrinní žlázy k uvolnění hormonů vyvolávajících začátek metamorfózy (*Hyla gratiosa*: Travis, 1984; *Rana sylvatica*: Wilbur et Collins, 1973; *Rana temporaria*: Laurila et Kujasalo, 1999; *Scaphiopus couchii*: Newman, 1989; obecně: Alford et Harris, 1988; Newman, 1992, 1994).

Oproti tomu, jiní autoři se domnívají, že dostupnost potravy je mnohem důležitějším faktorem a hojnost potravy je potřeba k odpovědi na vysychání. Tedy, že pokud jsou dobře krmení pulci vystaveni vysychání, jsou schopni svůj vývoj urychlit a dosáhnout větší velikosti (*Rana sylvatica*: Wilbur, 1977; *Rana temporaria*: Merilä et al., 2000a; *Rhinella spinulosa*: Márquez-García et al., 2010), avšak pokud jsou zdroje potravy

omezené, a pulci tedy mají snížený přísun energie, nemohou reagovat zrychlením vývoje, ba naopak dochází k nižší rychlosti růstu, opožděné metamorfóze a menší velikosti pulců během ní (*Agalychnis callidryas*, *Xenopus laevis*: Gomez-Mestre et al., 2010; *Bufo calamita*: Tejedo et Reques, 1992; *Discoglossus pictus*: Enriquez-Urzelai et al., 2013a; *Hyla gratiosa*: Leips et al., 2000; *Rana temporaria*: Merilä et al., 2000a).

V několika studiích zvýšená larvální hustota, a tedy nižší dostupnost potravy, snížila tělesnou velikost, ale délku vývoje neovlivnila (*Bufo bufo*, *B. calamita*, *Rana temporaria*: Brady et Griffiths, 2000; *Scaphiopus holbrookii*: Stark et al., 2012).

Dle jiných nízka, avšak stále stejná dostupnost potravy prodlužuje délku vývoje, na druhou stranu ale snižující se dostupnost potravy ji zkracuje (*Hyla gratiosa*: Leips et Travis, 1994). Stejně tak přemíra potravy znečišťuje vodní prostředí, což má za následek sníženou růstovou rychlost a menší velikost v době metamorfózy (*Rana sylvatica*: Wilbur, 1977).

Loman (1999, *Rana temporaria*) a Székely et al. (2010, *Pelobates syriacus*) ve svém pokusu vliv dostupnosti potravy či zvyšující se hustoty jedinců na délku vývoje vyloučili.

3.5 Predace

S vysycháním vodního prostředí nesouvisí pouze zvýšení hustoty pulců, ale také hustoty predátorů a jejich možnosti pulce nalézt. Ovlivnit růst a vývoj pulců tak mohou i některá jejich antipredační opatření, např. snížená aktivita spojená s hledáním potravy za účelem vyhýbání se prostoru s predátorem (*Bufo viridis*: Stav et al., 2007) či agregační chování (*Bufo viridis*: Stav et al., 2007; *Scaphiopus holbrookii*: Wilbur, 1987). Plastická odpověď na faktory prostředí tedy může být zprostředkována chováním (Denver, 1997).

Snaha vyhnout se predátorovi snižuje dostupnost a příjem potravy, což má za následek nižší rychlost růstu a menší velikost v metamorfóze (*Rana temporaria*: Laurila et Kujasalo, 1999). Přítomnost predátora může stejně tak opozdit metamorfózu (*Agalychnis callidryas*, *Xenopus laevis*: Gomez-Mestre et al., 2010). Smith (1983, *Pseudacris triseriata*) přišel na to, že na druhou stranu predátor významně snižuje populaci pulců, čímž zvyšuje množství potravy na jedince a jejich rychlost růstu tak není ovlivněna. Tato situace se tedy nakonec může pro přeživší jedince jevit jako výhodná.

Stav et al. (2007, *Bufo viridis*) zjistili, že pulci v přítomnosti predátora uzavřeného v kličce urychlili metamorfózu, ale dosáhli větší velikosti ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento fakt si vysvětlují požíváním výživných výkalů predátora.

Podle Travise (1983, *Hyla gratiosa*) jsou pulci v důsledku velikostně selektivní predace nuceni svůj růst urychlit, aby se rychleji dostali do méně zranitelných stádií.

V pokusu Laurily et al. (1998, *Rana temporaria*) pulci v přítomnosti predátora dosáhli metamorfózy za delší dobu než v pokusech bez vlivu predace, ale růstová rychlost zůstala neovlivněna, čili pulci metamorfovali nakonec ve větší velikosti. Stejně tak predátor uzavřený v kličce zapříčinil nejen pozdější metamorfózu, ale i větší velikost pulců. Tento výsledek ovšem neplatil pro pulce vystavené navíc snižování objemu. Odpověď na zvyšující se riziko mortality vlivem vysychání vody je tedy silnější než na přítomnost predátora, dokonce i při společném působení těchto faktorů (*Rana temporaria*: Laurila et al., 1998; Laurila et Kujasalo, 1999).

3.6 Maternální investice

Maternální účinky mohou potenciálně ovlivňovat životní cyklus žab (Mousseau et Fox, 1998) a např. u *Rana temporaria* se většinou projevují ve velikosti vajíček (Merilä et al., 2000a; Laugen et al., 2002). Nicméně, fenotypová plasticita v trvání vývoje, růstová rychlost ani velikost a hmotnost během metamorfózy pulců nejsou těmito vlivy významně ovlivněny (*Bufo calamita*: Tejedo et Reques, 1992; *Rana temporaria*: Merilä et al., 2000b; Laurila et al., 2002; Johansson et al., 2005; Lind et Johansson, 2007).

4. Experimentální část - metodika

4.1 Studovaný druh

Skokan hnědý (*Rana temporaria* Linnaeus, 1758) z čeledi Ranidae je nejrozšířenější a na mnoha místech nejběžnější evropskou středně velkou žábou (Gasc et al., 1997). Je to suchozemský druh, na vodních plochách závislý jen po dobu rozmnožování a vývoje larev.

Začíná se rozmnožovat brzy na jaře, jakmile roztaje led na vodě, v různých sladkovodních biotopech. Samice kladou vajíčka ve velkých shlucích a mají-li možnost, umisťují je do litorálního pásma. K vykulení pulců z vajíček dochází cca 1–3 týdny po oplození, v závislosti na teplotě vody. Délka vývoje pulců vysoce závisí na podmínkách prostředí (Laurila et Kujasalo, 1999), obvykle však trvá 40–80 dní po vylíhnutí (Merilä et al., 2000a).

Tento druh se dokáže rychle a důsledně přizpůsobovat a měnit podle místních podmínek, a to nejen vzhledově, ale i svým chováním. Jeho vývoj je intenzivně studován, zejména v souvislosti s reakcemi pulců na zhoršující se podmínky ve vysychajících mělkých vodách a s nimi spojeným vysokým rizikem úmrtnosti (Laurila et Kujasalo, 1999; Loman, 1999; Brady et Griffiths, 2000; Merilä et al., 2000a; Laurila et al., 2002; Loman, 2002; Loman et Cleasson, 2003; Merilä et al., 2004).

4.2 Příprava studijního materiálu

Snůšky s vajíčky skokana hnědého byly získány koncem března roku 2014 na lokalitách: menší vodní plocha pod Velkým Vávrovským rybníkem v Českých Budějovicích (48°59'40"N, 14°26'17"E), s níž je propojená; lesní rybníček v Borku (49°1'48"N, 14°29'41"E) a ze dvou, vzdušnou čarou asi 1 km od sebe vzdálených lokalit na pískovných Cep I. (48°55'4"N, 14°52'56"E) a Cep II. (48°54'55"N, 14°52'30"E). Snůšky byly přeneseny do temperované místnosti, kde byly chovány odděleně v plastových nádobách o objemu cca 28 l naplněných odstátou a provzdušňovanou vodovodní vodou zhruba do dvou třetin výšky nádoby. Teplota vody odpovídala teplotě vzduchu v místnosti, která byla kolem 14 °C. Světelný režim byl nastaven na 15: 9 (světlo: tma) dle průměrných údajů zjištěných z dat ČHMÚ za měsíce duben a květen předchozího roku.

Po vylíhnutí pulců z vajíček byly odstraňovány zbytky snůšek. Pulci byli krmeni *ad libitum* rostlinným vložkovým krmivem pro rybičky VEGETABLE (Tropical, Polsko), a to každý den.

Takto byli pulci chováni až do nárůstu do vhodné tělesné velikosti pro posouzení a použití do pokusu, tedy zhruba dva týdny. Během této doby byla teplota v laboratoři postupně zvyšována na 21 °C a tato teplota zůstala poté víceméně konstantní (± 1 °C).

4.3 Vlastní pokus

Samotnému vybírání pulců předcházela příprava pokusných nádob. Použito bylo celkem 96 průhledných plastových krabiček (rozměry šířka x délka: horní okraj 120 x 170 mm, dno 90 x 145 mm, hloubka 100 mm) o objemu 1 500 ml a 32 krabiček (rozměry šířka x délka: horní okraj 120 x 170 mm, dno 100 x 145 mm, hloubka 125 mm) o objemu 2 000 ml. Všechny krabičky byly opatřené víčkem. 64 krabiček o objemu 1 500 ml bylo z vnější strany (včetně víček) očíslováno lihovým fixem čísly 1–64 a rozděleno po 16 do čtyř pokusných skupin (skupina 1, 2, 3, 4) a zbylých 32 bylo určeno jako náhradní krabičky pro skupinu 1 a 2. 16 krabiček o objemu 2 000 l bylo očíslováno čísly 65–80 a tvořilo skupinu kontrolní. Dalších 16 takovýchto krabiček bylo určeno rovněž jako krabičky náhradní. Na počátku pokusu byly krabičky s čísly 1–64 o objemu 1 500 ml naplněny jeden den odstátou, vytemperovanou a provzdušněnou vodovodní vodou do objemu 750 ml a krabičky 65–80 o objemu 2 000 ml stejnou vodou do objemu 1700 ml.

Po přípravě následovalo samotné vybírání pulců pro pokus. Od každé ze čtyř snůšek bylo vybráno 20 stejně velkých jedinců odpovídajících vývojovému stádiu 25 dle Gosnera (1960). Pulci byli umístěni do krabiček po jednom. Rovnoměrného umístění pulců z různých snůšek bylo docíleno tak, že do každé z pěti skupin byli přiděleni právě čtyři pulci z každé snůšky. Naměřené údaje o tělesných velikostech pulců byly zaznamenány jako nultý den.

Vlastní pokus probíhal od 11. 4. 2014 do 2. 6. 2014. Pulci byli chováni v temperované místnosti s nastavenou laboratorní teplotou ± 21 °C a světelným režimem 15: 9 (světlo: tma) po celou dobu pokusu. Krmeni byli *ad libitum* každý den. Každý den se rovněž přemísťovaly krabičky tak, aby se pravidelně měnilo jejich umístění vůči osvětlení.

Další měření pulců probíhala ve čtyřdenních intervalech. Pomocí fotografií pořízených za použití stereomikroskopu Olympus SZX10 byla v programu QuickPHOTO CAMERA 2.3 měřena délka těla od předního okraje hlavy po řitní otvor (*snout-vent length*, SVL) s přesností na 0,01 mm. Měření byla ukončena vždy v den dosažení metamorfózy, čili po dosáhnutí 43. stádia dle Gosnera (1960), nebo po úhynu.

U uhynulých jedinců bylo určováno stádium. Veškeré naměřené velikosti, údaje o metamorfóze či úhynu byly zaznamenávány do protokolu.

Ve čtyřdenních intervalech byly prováděny také změny v objemech vody. Skupinám 1 a 2 byla voda měněná celá tím způsobem, že pulci byli přeneseni do čistých náhradních krabiček s novou odstátou, vytemperovanou a provzdušněnou vodou, zatímco skupinám 3 a 4 byla voda měněná jen částečně, resp. vyměněno bylo vždy 13,2 % vody ze současného objemu (toto množství bylo vypočítáno z předpokládané teoretické doby zdržení vody 30 dnů). Dále docházelo ke snižování objemu. Zatímco skupiny 1 a 3 měly objem po celou dobu trvání pokusu konstantní, u skupin 2 a 4 byl objem snížen vždy o 17,5 % vody ze současného objemu. U kontrolní skupiny, s objemem 1 700 ml, byla voda měněná celá a objem byl po celou dobu pokusu zachován konstantní. Tato skupina představovala prostředí bez vlivu množství vody a metabolitů. Celkem tak byly v pokusu čtyři různé zásahy (Tab. 1). Změny provedené v objemech všech skupin shrnuje tabulka 2.

Od 20. dne pokusu bylo nadále ve vodách s pulci průběžně měřeno pH, obsah rozpuštěného kyslíku a vodivost. Měření bylo prováděno pomocí multimetru WTW 340i (WTW, Německo) a probíhalo vždy před výměnou vody. V druhé polovině pokusu proběhlo také jedno srovnávací měření v temné fázi za účelem zjištění případných změn v hodnotách, které by mohly reakce pulců ovlivňovat.

Jako poslední byla voda testována na obsah dusíkatých látek. Z každé skupiny bylo odebráno několik reprezentativních vzorků. Vzorky byly přefiltrovány, zamrazeny a zaslány v označených zkumavkách ke stanovení laboratoří Hydrobiologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Koncentrace dusitanových a amonných iontů byla stanovena iontovou chromatografií na analyzátoru Dionex ICS-5000 (Thermo Scientific) a koncentrace dusičitanů spektrofotometrickou metodou dle Procházkové (1959).

Ke konci pokusu, v době metamorfózy, probíhala každodenní kontrola metamorfujících jedinců. Jedinci byli změřeni stejným způsobem jako pulci, ale od předního okraje hlavy po urostyl (*snout-urostyl length*, SUL), a zváženi na analytických vahách Kern ABJ 120-4M (Kern & Sohn, Německo). Tyto údaje spolu s datem byly zaznamenány.

Celý pokus byl ukončen po 52 dnech, poté, co snižovaný objem dosáhl 62 ml. Veškerí pulci nezahrnuti do pokusu a později i metamorfované žabky byli navráceni zpět do přírody na místo nálezu.

Tab. 1: Souhrn zásahů u jednotlivých pokusných skupin.

	měněný celý objem	měněná část objemu
konstantní objem	skupina 1, kontrola	skupina 3
snížovaný objem	skupina 2	skupina 4

Tab. 2: Změny v objemech v průběhu pokusu.

	výměna celého objemu			výměna části objemu			
	skupina kontrolní	skupina 1	skupina 2	skupina 3		skupina 4	
každý 4. den	konstantní objem (ml)	konstantní objem (ml)	snížení o 17,5 % (konečný objem, ml)	konstantní objem (ml)	výměna 13,2 % (kolik vyměnit, ml)	snížení o 17,5 % (konečný objem, ml)	výměna 13,2 % (kolik vyměnit, ml)
0. den: 11. dubna	1700	750	750	750		750	
4. den: 15. dubna	1700	750	619	750	99	619	82
8. den: 19. dubna	1700	750	510	750	99	510	67
12. den: 23. dubna	1700	750	421	750	99	421	56
16. den: 27. dubna	1700	750	347	750	99	347	46
20. den: 1. května	1700	750	287	750	99	287	38
24. den: 5. května	1700	750	236	750	99	236	31
28. den: 9. května	1700	750	195	750	99	195	26
32. den: 13. května	1700	750	161	750	99	161	21
36. den: 17. května	1700	750	133	750	99	133	18
40. den: 21. května	1700	750	110	750	99	110	14
44. den: 25. května	1700	750	90	750	99	90	12
48. den: 29. května	1700	750	75	750	99	75	10
52. den: 2. června	1700	750	62	750	99	62	8

4.4 Statistická zpracování dat

Délka vývoje, velikosti a hmotnosti pliců byly vyhodnoceny neparametrickou obdobou analýzy variance – Kruskal-Wallisovým testem. Těsnost vazby mezi velikostní a hmotností pliců byla vyhodnocena jednoduchou lineární regresí. Lineární regrese byla rovněž použita pro popis vztahů mezi fyzikálně-chemickými parametry a velikostí, hmotností, délkou vývoje a mortalitou pliců. Rozdíly ve fyzikálně-chemických parametrech mezi dnem a nocí byly srovnány neparametrickou obdobou párového t-testu – Wilcoxonovým testem. Všechny statistické analýzy byly zpracovány v programu Statistica (verze 12.0). Grafy byly vytvořeny v programu SigmaPlot (verze 12.5).

5. Výsledky

5.1 Mortalita a dosažení metamorfózy

Pro pokus bylo použito 80 pulců, v každé z pokusných skupin 16. Během pokusu metamorfovalo celkem 55 pulců (69 %) a 21 uhynulo (26 %). Zbylí čtyři pulci (5 %) pokus přežili, ovšem k metamorfóze nedospěli.

5.1.1 Mortalita

Mortalita se v rámci skupin pohybovala od 0 % do 69 %. Nejvyšší úmrtnost (69 %) byla zaznamenána ve skupině 4. Tito uhynulí pulci se také dožili v průměru pouze 32 dní. Zato nulová úmrtnost byla ve skupině kontrolní. Průměrná dosažená vývojová stádia dle Gosnera (1960) v den úhynu se pohybovala od 36. u skupiny 4 do 40. u skupiny 1 (Tab. 3).

Tab. 3: Úmrtnost během pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

Skupina	počet mrtvých jedinců	úmrtnost skupiny	průměrný počet dosažených dní	průměrné dosažené vývojové stádium
Kontrola	0	0 %		
1	1	6 %	36	40
2	1	6 %	29	37
3	8	50 %	37	39
4	11	69 %	32	36

5.1.2 Dosažení metamorfózy

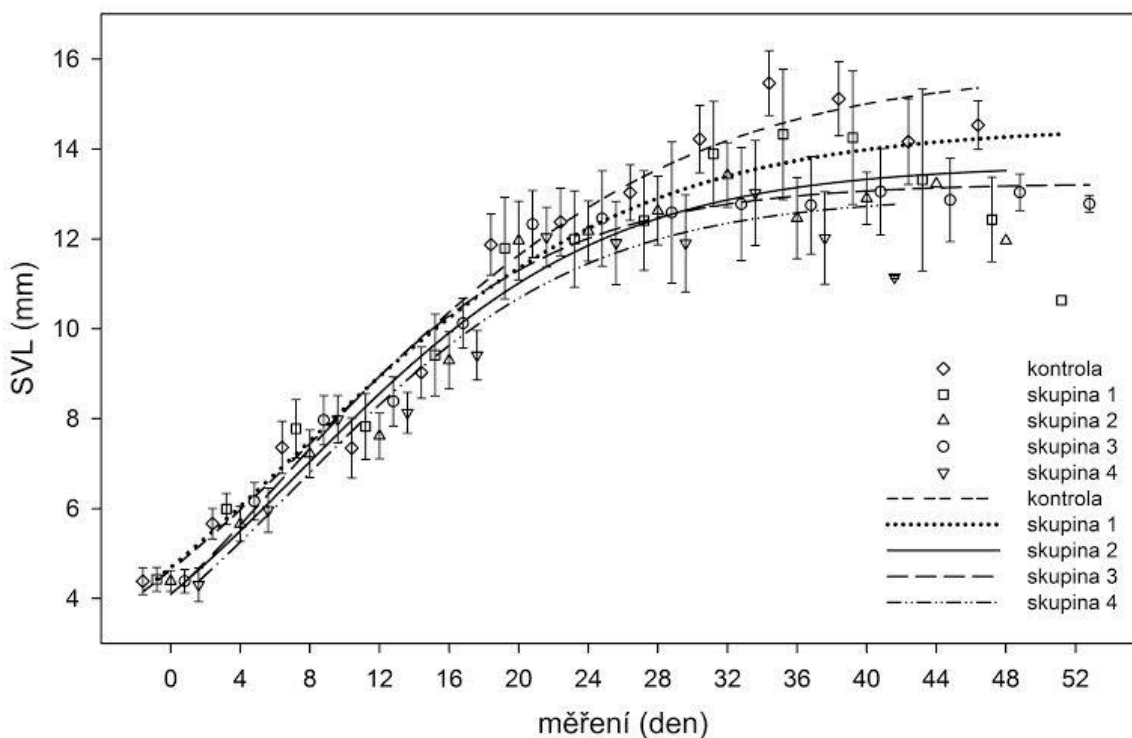
Do metamorfózy, neboli 43. stádia dle Gosnera (1960), dospělo z celkového počtu pulců 55 jedinců. Zatímco u skupiny kontrolní, 2 a 4 metamorfovali všichni přeživší jedinci, ze skupiny 1 metamorfovalo 14 z 15 (93 %) a ze skupiny 3 pouze pět z osmi přeživších jedinců (63 %; Tab. 4).

Tab. 4: Počet metamorfovaných jedinců. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

Skupina	počet metamorfovaných jedinců	počet přeživších jedinců	procentuální zastoupení
Kontrola	16	16	100 %
1	14	15	93 %
2	15	15	100 %
3	5	8	63 %
4	5	5	100 %

5.2 Velikosti pulců v průběhu pokusu

Statisticky průkazně se velikosti pulců (SVL) začaly lišit ve 32. dni měření (Kruskal-Wallisův test: $H = 16,83$, $df = 4$, $P < 0,01$). Od té doby se velikosti snižovaly v pořadí: skupina kontrolní, skupina 1, skupina 2 a 3, skupina 4 (Obr. 1).

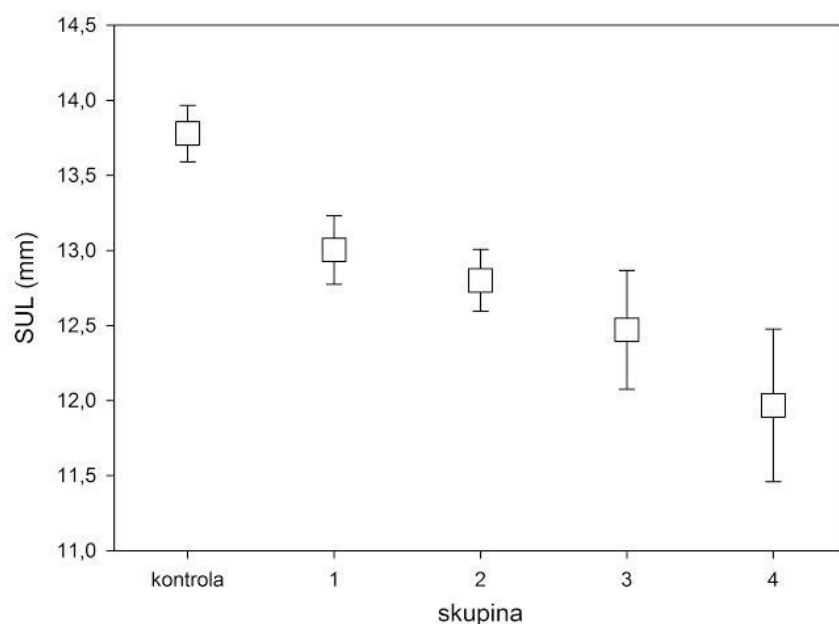


Obr. 1: Průběh změn velikostí (SVL) během pokusu měřený ve čtyřdenních intervalech. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD. Proložení jednotlivých skupin bylo provedeno pomocí logistické křivky.

5.3 Metamorfóza

5.3.1 Velikost pulců

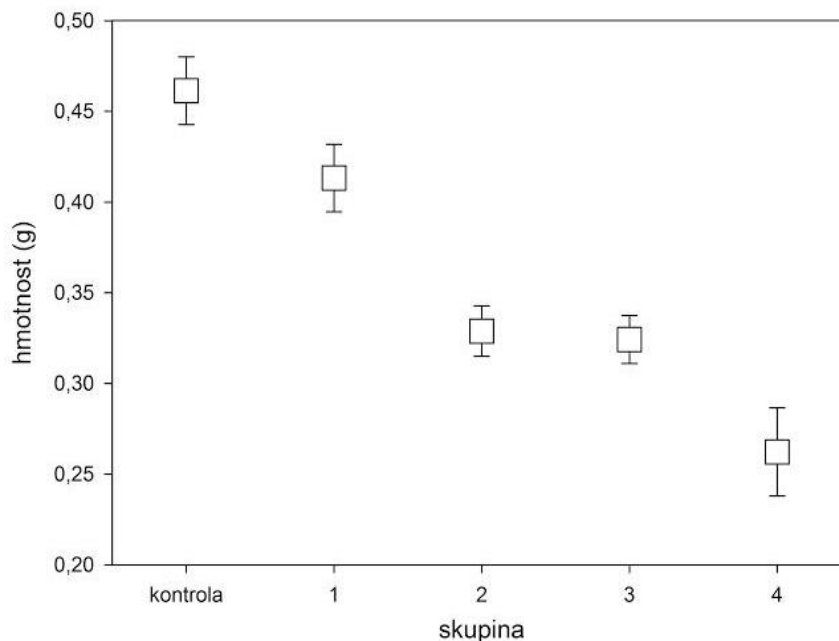
Velikost pulců v době metamorfózy (SUL) se pohybovala průměrně od $12,0 \pm 1,14$ mm u skupiny 4 do $13,8 \pm 0,75$ mm u skupiny kontrolní (hodnoty uvádějí průměr a směrodatnou odchylku; platí i pro všechny následující průměry). Z následných vzájemných porovnání vyplynulo, že skupina kontrolní se liší od skupin 2 a 4 (Kruskal-Wallisův test: $H = 17,27$, $df = 4$, $P < 0,01$; Obr. 2; Tab. 6, Příloha).



Obr. 2: Velikost pliců (SUL) v době metamorfózy u jednotlivých skupin. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SE.

5.3.2 Hmotnost pliců

Hmotnost pliců v době metamorfózy se pohybovala průměrně od $0,2623 \pm 0,054$ g u skupiny 4 do $0,4614 \pm 0,075$ g u skupiny kontrolní a průkazně se lišila mezi skupinami: skupina kontrolní se skupinami 2, 3 a 4, a skupina 1 se skupinami 2 a 4 (Kruskal-Wallisův test: $H = 32,73$, $df = 4$, $P < 0,001$; Obr. 3; Tab. 7, Příloha).

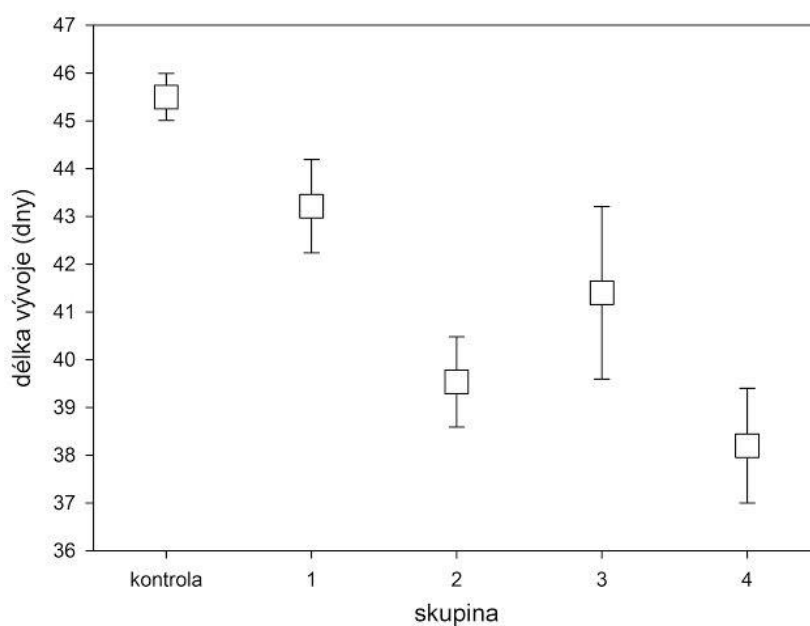


Obr. 3: Hmotnost pliců v době metamorfózy u jednotlivých skupin. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SE.

Vzájemná korelace mezi velikostmi a hmotnostmi pliců je průkazná, avšak ne příliš těsná ($R^2 = 0,41$; $F = 36,82$; $df = 54$; $P < 0,001$).

5.3.3 Délka vývoje

Vlastní pokus trval 52 dní. Délka vývoje u jednotlivých skupin se mezi sebou průkazně lišila (Kruskal-Wallisův test: $H = 25,07$, $df = 4$, $P < 0,001$). Největší, statisticky průkazné rozdíly v délce vývoje skupin byly mezi skupinou kontrolní a skupinou 2 a mezi skupinou kontrolní a skupinou 4 (Obr. 4). Nejkratší délka vývoje, čili nejmenší počet dní od počátku pokusu do metamorfózy, byla zaznamenána u skupiny 4 (v průměru $38,2 \pm 2,7$ dní) a naopak nejdelší délku vývoje měla skupina kontrolní ($45,5$ dne $\pm 2,0$; Obr. 4; Tab. 8, Příloha).

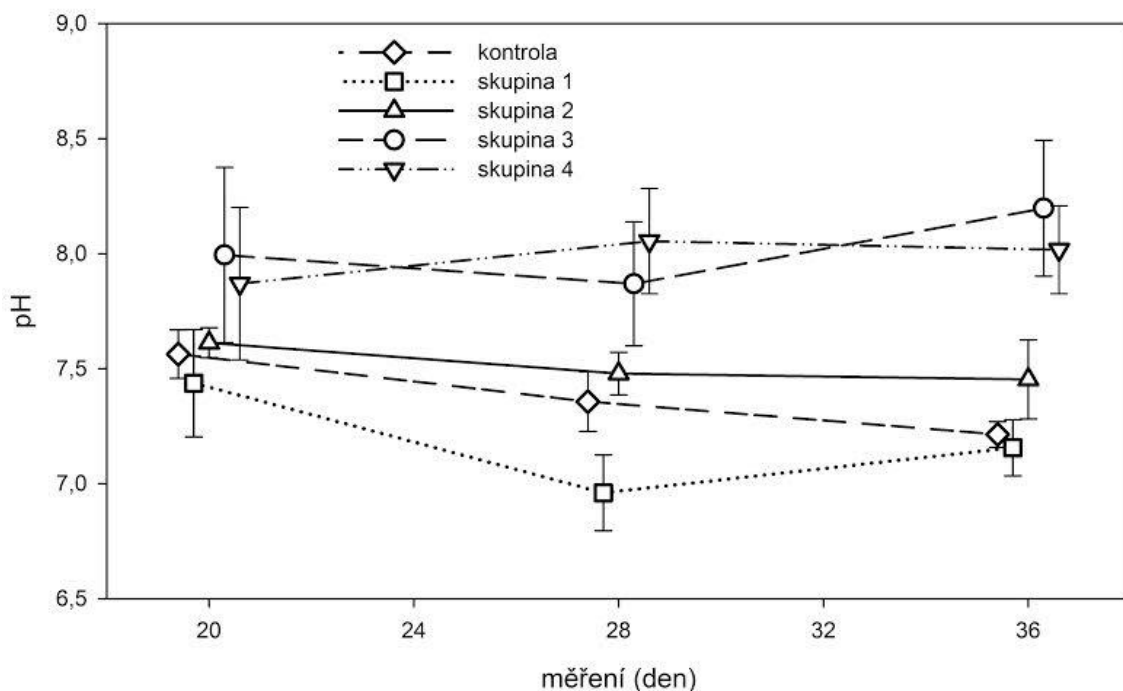


Obr. 4: Délka vývoje pulců u jednotlivých skupin. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SE.

5.4 Fyzikálně-chemické parametry ve vodě

5.4.1 Hodnoty pH

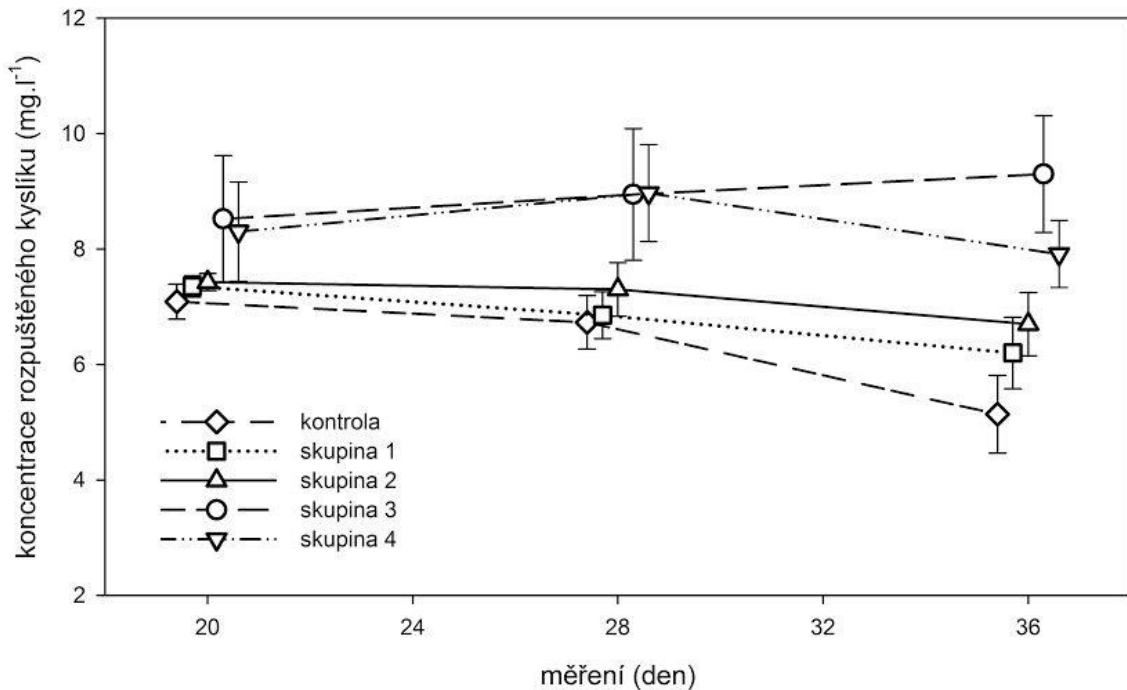
Průběhy hodnot pH byly vyšší u skupin s částečně měněným objemem (3 a 4; Obr. 5). Při porovnání posledních hodnot vyšly statisticky průkazně rozdíly mezi skupinou kontrolní a skupinami 3 a 4, skupinou 1 a skupinami 2, 3 a 4, a skupinou 2 a skupinou 3 (Kruskal-Wallisův test: $H = 56,42$, $df = 4$, $P < 0,001$; Tab. 9, Příloha).



Obr. 5: Průběh změn pH během pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SD.

5.4.2 Obsah rozpuštěného kyslíku

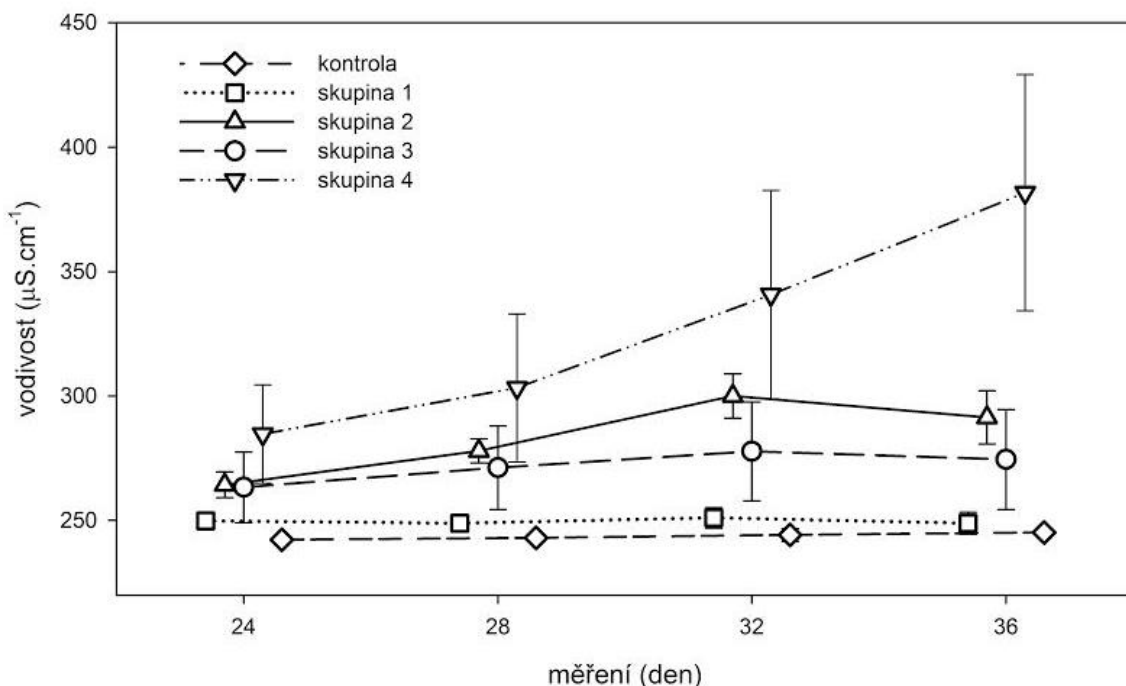
Průběhy obsahu rozpuštěného kyslíku byly zpočátku vyšší u skupin s částečně měněným objemem (3 a 4), avšak od analýzy druhého vzorku se rozdíly stupňovaly a průměrné hodnoty se snižovaly v pořadí: skupina 3, 4, 2, 1, kontrola (Obr. 6). Při porovnání posledních hodnot vyšly statisticky průkazně rozdíly mezi skupinou kontrolní a skupinami 2, 3 a 4, skupinou 1 a skupinou 3, a skupinou 2 a skupinou 3 (Kruskal-Wallisův test: $H = 58,18$, $df = 4$, $P < 0,001$; Tab. 10, Příloha).



Obr. 6: Průběh změn obsahu rozpuštěného kyslíku během pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SD.

5.4.3 Vodivost

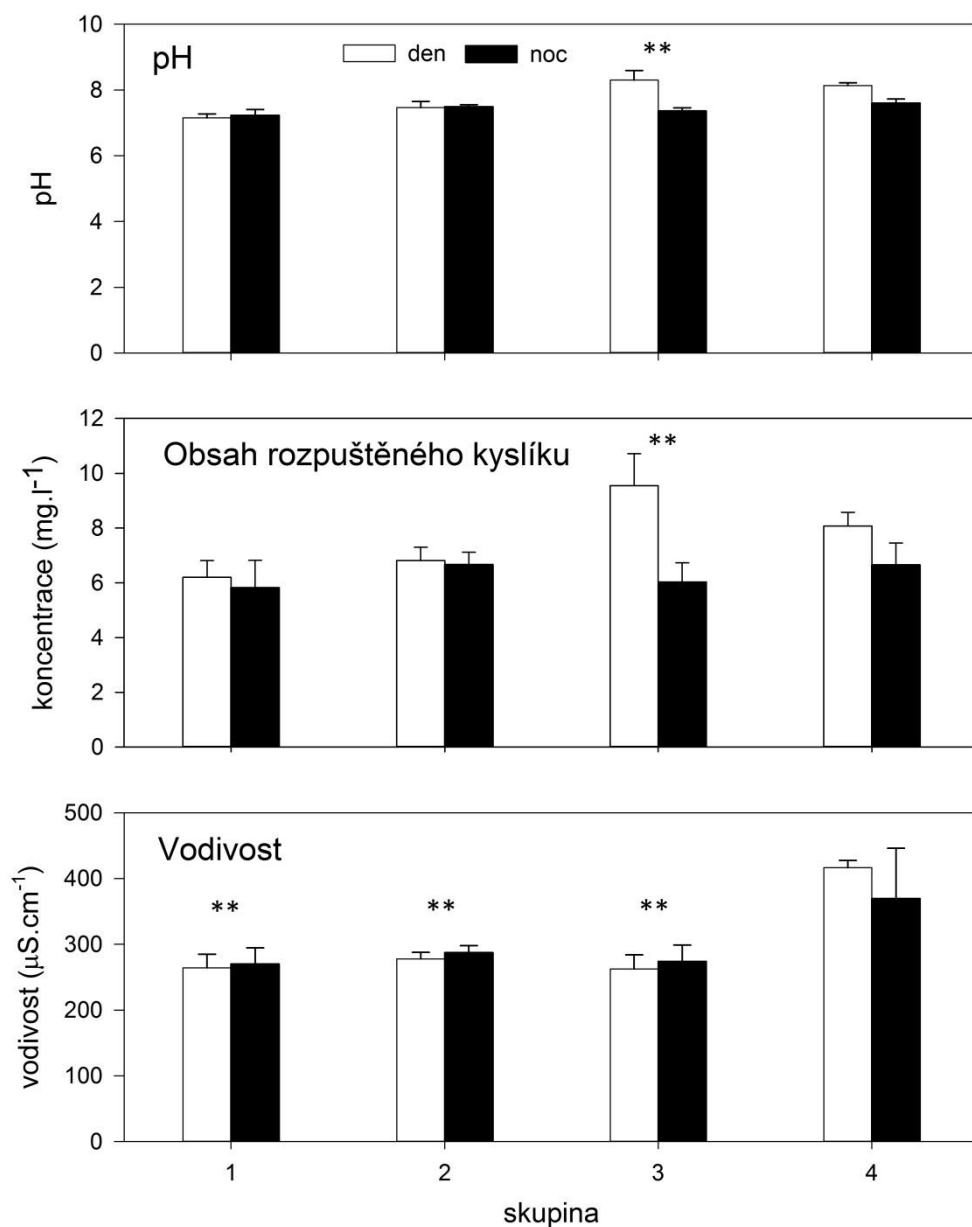
Vodivost, tedy míra koncentrace ve vodě rozpuštěných iontů, se průběžně dramaticky zvyšovala u skupiny 4 (Obr. 7). Při porovnání posledních hodnot vyšly statisticky průkazně rozdíly mezi skupinou kontrolní a skupinami 2, 3 a 4, a skupinou 1 a skupinami 2 a 4 (Kruskal-Wallisův test: $H = 55,32$, $df = 4$, $P < 0,001$; Tab. 11, Příloha).



Obr. 7: Průběh změn vodivosti během pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SD.

5.4.4 Jednorázové porovnání denních a nočních hodnot

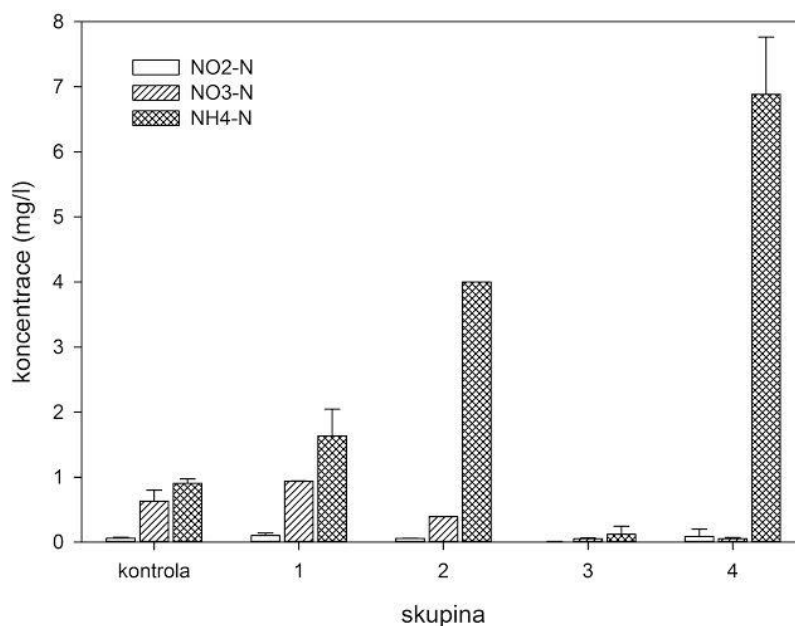
Jednorázové porovnání denních a nočních hodnot pH vyšlo průkazně pouze u skupiny 3 (Wilcoxonův test: $Z = 2,93$, $df = 10$, $P < 0,01$), kdy denní pH bylo vyšší než noční. Také u obsahu rozpuštěného kyslíku byly denní hodnoty u skupiny 3 průkazně vyšší než noční (Wilcoxonův test: $Z = 2,84$, $df = 10$, $P < 0,01$). Porovnání denních a nočních hodnot vodivosti vyšlo průkazně u skupiny 1 (Wilcoxonův test: $Z = 2,86$, $df = 15$, $P < 0,01$), skupiny 2 (Wilcoxonův test: $Z = 2,93$, $df = 10$, $P < 0,01$) a skupiny 3 (Wilcoxonův test: $Z = 2,93$, $df = 10$, $P < 0,01$). U těchto skupin byly vyšší hodnoty vždy noční (Obr. 8).



Obr. 8: Jednorázová porovnání nočních a nejbližších denních hodnot fyzikálně-chemických parametrů v druhé polovině pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem; ** = $P < 0,01$. Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD.

5.4.5 Obsah dusíkatých látek

Pro jednorázovou analýzu koncentrací dusíkatých látek ve vodách bylo použito 12 vzorků. Z výsledků testování koncentrace dusitanových, dusičitanových a amonných iontů vyplývá, že koncentrace dusitanových a dusičitanových iontů výrazně nekolísají, zatímco u amonných iontů bylo nejvyšších koncentrací dosaženo ve vodách skupin 2 a 4 (Obr. 9).



Obr. 9: Koncentrace dusíkatých látek ke konci pokusu. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem. Hodnoty v grafu představují průměr ± SD.

5.4.6 Vztah fyzikálně-chemických parametrů a měřených faktorů fenotypové plasticity

Lineární regrese velikostí (SUL), hmotností, délek vývoje pulců a fyzikálně-chemických parametrů ve vodě udává tabulka 5 (Obr. 10–13, Příloha). Lineární regrese mortality pulců a koncentrace amonných iontů ve vodě není průkazná ($R^2 = 0,217$; $F = 0,831$; $df = 4$; $P = 0,429$; Obr. 14, Příloha).

Tab. 5: Lineární regrese velikostí (SUL), hmotností, délek vývoje pulců a fyzikálně-chemických parametrů ve vodě (a = směrnice přímky; R^2 = korelační koeficient; F = testová statistika; df = počet stupňů volnosti; P = pravděpodobnost).

	pH					obsah rozpuštěného kyslíku				
	a	R^2	F	df	P	a	R^2	F	df	P
velikost (SUL)	- 0,161	0,158	9,758	53	< 0,01	- 0,630	0,174	10,953	53	< 0,01
hmotnost	- 2,215	0,261	18,329	53	< 0,001	- 9,314	0,332	25,832	53	< 0,001
délka vývoje	- 0,028	0,080	4,519	53	< 0,05	- 0,084	0,052	2,870	53	0,096
	vodivost					koncentrace amonných iontů				
	a	R^2	F	df	P	a	R^2	F	df	P
velikost (SUL)	- 14,714	0,176	11,077	53	< 0,01	- 1,191	0,256	3,434	11	0,094
hmotnost	- 239,066	0,405	35,364	53	< 0,001	- 18,534	0,531	11,331	11	< 0,01
délka vývoje	- 3,718	0,190	12,226	53	< 0,01	- 0,566	0,763	32,170	11	< 0,001

6. Diskuze

6.1 Mortalita a dosažení metamorfózy

Mortalita jedinců v mém pokusu byla dána zřejmě kvalitou vody. Skupina kontrolní, resp. skupina s největším, konstantním a zároveň celým měněným objemem, měla nulovou mortalitu. Kontrolní skupina tudíž pro pulce představovala podmínky vyhovující pro dosažení metamorfózy. Ze skupin 1 a 2, čili ze skupin s výměnou celého objemu, uhynul vždy jen jeden pulec. Takovéto množství se dá považovat za zanedbatelné. Nejvyšší mortalitu jsem sledovala u skupin 3 a 4. Ze 3. skupiny s konstantním objemem, kde byla v průběhu pokusu měněna pouze část objemu, byla mortalita poloviční, a u 4. skupiny, kde k výměně pouze části objemu přibylo navíc postupné snižování objemu, uhynulo dokonce 11 pulců z 16 (Tab. 3). Z výsledků je patrné, že byla-li voda čistá, nemělo její množství na mortalitu v pokusu významný vliv. Pulec v menším objemu čisté vody tedy přežije spíše než pulec ve větším objemu vody, avšak méně čisté, jak dokládá srovnání mortalit u skupin 2 a 3.

Co se týče dosažení metamorfózy, u skupiny kontrolní, 2 a 4 dosáhli metamorfózy všichni přeživší jedinci a u skupiny 3 metamorfovalo pět jedinců z osmi přeživších (Tab. 4). Dá se tedy říci, že skupiny 3 a 4 tvořily jakousi hranici mezi úmrtností během pokusu a dosažením metamorfózy. Zbylí pulci ze skupiny 3 a jeden pulec ze skupiny 1 sice přežili, nicméně metamorfózy nedosáhli a v den ukončení pokusu byli ve 37.–41. vývojovém stádiu dle Gosnera (1960). Že by tito pulci byli příliš ovlivněni podmínkami dané pokusné skupiny, je ve srovnání s ostatními jedinci té samé skupiny nepravděpodobné. Je zde však možný genetický vliv, protože tři pulci z těchto čtyř pocházeli ze stejné snůšky. Takovýmito vlivy jsem se však ve své práci nezabývala. Do budoucna by bylo vhodné tomuto tématu věnovat pozornost i z hlediska variability mezi jednotlivými populacemi skokana hnědého.

6.2 Velikosti pulců v průběhu pokusu

Pulci se začali velikostně lišit již v 32. dni měření a pořadí, v jakém se poté jejich velikosti snižovaly, zůstalo stejné až do dosažení metamorfózy (Obr. 1, 2). Jelikož pulci ze skupiny s nejkratším vývojem metamorfovali průměrně za 38,2 dní od začátku pokusu, což je o týden později než se projevíly tyto rozdíly ve velikosti, výsledek říká, že pulci v mém pokusu nedosáhli menší tělesné velikosti v metamorfóze kvůli kratší době potřebné pro růst.

6.3 Metamorfóza

Pulci skokana hnědého jsou známi svojí schopností reagovat na vysychání vody urychlením vývoje a zmenšením velikosti během metamorfózy (Laurila et Kujasalo, 1999; Loman, 1999; Laurila et al., 2002; Loman et Claesson, 2003; Merilä et al., 2004; Johansson et al., 2005; Lind et Johansson, 2009). V mém pokusu pulci podrobeni simulovanému vysychání vody skutečně vývoj urychlili, a to až o týden oproti skupině kontrolní, ve které pulci nebyli ovlivněni snižováním objemu, ani koncentrací metabolitů. Fakt, že nejdelší doba vývoje souvisí především s velkým objemem vody, dokazují i statisticky průkazné rozdíly mezi skupinou kontrolní a skupinami se snižovaným objemem – 2 a 4 (Obr. 4).

O něco kratší dobu vývoje oproti skupině kontrolní měli pulci ze skupiny 1 a 3, obě rovněž s objemem konstantním, avšak nižším než skupina kontrolní. Rozdíl (pravděpodobně z důvodu nižšího množství vzorků statisticky neprůkazný) mezi těmito dvěma skupinami mohl být způsoben vlivem koncentrace metabolitů, jelikož skupina 1, s delší dobou vývoje, měla objem v průběhu pokusu zcela měněný, zato skupina 3 jen zčásti. Výměna celého objemu vody u skupiny 1 postupnému hromadění metabolitů zabraňovala.

Nejkratší dobu vývoje pak měli pulci ze skupiny 2 a 4, obě se snižovaným objemem. Také u této dvojice mohl sehrát svou roli vliv koncentrace metabolitů, kdy se pulci s pouze částečně měněným objemem vyvinuli opět o něco rychleji než ti s celým měněným objemem (Obr. 4). Vidíme tedy zřejmý trend, že – a zejména v případě snižování objemu – mohou být pulci navíc ovlivněni zvyšující se koncentrací metabolitů. Při větším množství pulců a měření by tyto rozdíly byly pravděpodobně statisticky významné.

A konečně, v porovnání skupin 1 a 2, čili skupin se zcela měněným, avšak rozdílným objemem, vidíme zřetelné urychlení vývoje pulců ze skupiny 2. Zde však nelze jednoznačně rozhodnout, zda je urychlení způsobené navíc vlivem koncentrace metabolitů, či pouhým nižším objemem vody. Vzhledem k použité metodice totiž nelze zabránit tomu, aby v takto malém, byť zcela měněném objemu, nedošlo během čtyřdenního intervalu k alespoň částečnému hromadění metabolitů.

Pulci ze skupiny kontrolní neměli pouze nejdelší vývoj, ale dosáhli rovněž největší velikosti a hmotnosti v době metamorfózy, jak ukazují statisticky průkazné rozdíly mezi skupinou kontrolní a skupinami se snižovaným objemem - 2 a 4 (Obr. 2, 3). Výsledek je

tedy v souladu se závěry prací Lomana (1999) a Goldberga et al. (2012), kteří tvrdí, že ve výhodných podmínkách vodního prostředí pulci prodlouží dobu vývoje, aby dosáhli co největší velikosti během metamorfózy. Větší velikost během metamorfózy zvyšuje budoucí fitness, resp. zvyšuje šanci na přežití na souši, na reprodukci atd. (Rowe et Ludwig, 1991; Laurila et Kujasalo, 1999; Johansson et Giles, 2005; Denver, 2009; Márquez-García et al., 2010; Stark et al., 2012).

O něco menší velikost a hmotnost oproti skupině kontrolní měli pulci ze skupiny 1 a 2, obě rovněž s celým měněným objemem, a nejmenší pak skupiny 3 a 4, s částečně měněným objemem. Výsledky naznačují, že velikost a hmotnost, na rozdíl od délky objemu, byla ovlivněna naopak spíše koncentrací metabolitů. Avšak ani tentokrát nemůžeme naprosto vyloučit vliv druhého faktoru (v tomto případě snižování objemu), porovnáváme-li mezi sebou skupiny 1 a 2 a skupiny 3 a 4. Zde ale vidíme trend opačný, čili že vlivu koncentrace metabolitů na velikost a hmotnost pulců napomáhá snižování objemu vody. Pro silnější výsledek by bylo rovněž potřeba více pulců a měření.

Stejně tak neprůkazný, avšak z výsledků patrný vliv snižování objemu vody na délku vývoje pulců a vliv koncentrace metabolitů na velikost pulců nejlépe vystihuje porovnání délky vývoje a velikosti pulců skupin se snižovaným a zcela měněným objemem se skupinou s objemem konstantním, ale měněným jen částečně. Vliv koncentrace metabolitů na délku vývoje byl překonán vlivem snižování objemu, jak ukazuje srovnání skupiny 2 a 3. Pulci ze skupiny 2 se snižovaným objemem vody metamorfovali dříve i přes nižší koncentraci metabolitů oproti skupině 3. Na druhou stranu, pulci ze skupiny 3 pravděpodobně vlivem koncentrace metabolitů metamorfovali v menší velikosti, i přes větší objem vody. Hmotnostně se však pulci obou skupin nelišili.

6.4 Fyzikálně-chemické parametry ve vodě

Fyzikální a biologické změny spojené s eutrofizací vodního prostředí mohou být potenciální příčinou stresu pro mnoho vodních organismů (Johansson et al., 2001). Ve vodním prostředí se vyskytují různé chemické látky a snižováním objemu vody dochází ke změnám jejich koncentrací. Pulci tak mohou reagovat například na nižší obsah kyslíku, vyšší obsah oxidu uhličitého, vyšší koncentraci metabolických odpadních látek, hormonů či kairomonů (Denver, 1997). To všechno může způsobit urychlení vývoje a Székely (2010) prokázal, že pulci vlivem vyšších koncentrací metabolitů dokonce snižují svoji růstovou rychlost a metamorfuji tak v menší velikosti. Totéž prokázali i Johansson et al. (2001) ve své studii srovnávající vliv dusičnanů na populace skokana hnědého

ze severního a jižního Švédska, ovšem pouze u populace severní, zatímco jižní populace byla vůči vyšší koncentraci více tolerantní. Denver (1997) naopak tvrdí, že vyšší koncentrace metabolitů urychlení vývoje nezpůsobuje.

V této práci byl chovem pulců samostatně v krabičkách s vodovodní vodou vyloučen vliv chemické komunikace pocházející od jakýchkoliv dalších živočichů. Naopak jsem se zabývala hodnotami pH, vodivostí, a koncentrací rozpuštěného kyslíku a dusíkatých látek. Hodnoty pH i obsah rozpuštěného kyslíku byly vyšší u skupin s částečně měněným objemem (Obr. 5, 6), což mohlo být zapříčiněno nárůstem řas (pravidelné střídání pozic všech krabiček během pokusu naznačuje, že vyšší biomasa řas byla skutečně způsobena podmínkami pokusných skupin). Nejvyšších hodnot, a zřejmě tedy nejvyššího nárůstu řas, z těchto dvou skupin bylo dosaženo u skupiny 3. Nejvyšší nárůst řas u skupiny 3 potvrzují i jednorázová porovnání nočních a nejbližších denních hodnot, která ukázala největší a statisticky průkazné rozdíly mezi dnem a nocí právě u této skupiny. Rozdíly byly zjištěny jak v hodnotách pH, tak i v množství rozpuštěného kyslíku, a u obojího byly hodnoty vyšší vždy během dne (Obr. 8). Mírný pokles obsahu kyslíku u všech tří skupin se zcela měněným objemem v druhé polovině měření naopak svědčí o možném vlivu metabolismu pulců: větší pulci měli vyšší spotřebu kyslíku.

Vodivost se dramaticky zvyšovala pouze u skupiny 4 (Obr. 7), kde nebyl ani konstantní, ani zcela měněný objem vody. Je možné, že ve vodách s pulci skupiny 3, kde byla také měněna pouze část objemu, se nedosáhlo takových hodnot vodivosti z důvodu konstantního objemu. Výsledné rozdíly v hodnotách vodivosti odpovídají rozdílům koncentrací amonných iontů mezi skupinami (viz níže).

Jednorázová analýza koncentrací dusíkatých látek ukázala, že koncentrace dusitanových a dusičitanových iontů výrazně nekolísaly. Avšak skupiny 2 a 4, obě se snižovaným objemem, měly jednoznačně nejvyšší koncentraci amonných iontů (Obr. 9). To může souviset s faktem, že pulci skokana hnědého jsou v době vývoje amonotelní, resp. amoniak přímo vylučují (Wells, 2007), a vlivem snižování objemu tak dochází k jeho nahromadění a možné následné toxicitě. Johansson et al. (2001) přišli na to, že pulci v testu toxicity byli schopni tolerovat vyšší koncentrace dusičnanů, ale ne amonných iontů. Dá se tedy předpokládat, že pulci mohou reagovat právě na zvýšený obsah amoniaku, což by se shodovalo s mým výsledkem, že nejdříve dosáhli metamorfózy pulci právě ze skupin 2 a 4. Tomuto faktu odpovídají navíc výsledky získané regresní analýzou. Zajímavé je, že nejnižších koncentrací dusíkatých látek bylo dosaženo u skupiny 3, a to i přes to, že u ní byla prováděna výměna pouze části objemu vody. Domnívám se, že zde svoji roli mohla

sehrát opět činnost řas, které navíc ze všech forem dusíku přednostně využívají amonné ionty (Reynolds, 2006).

Mé výsledky jsou v souladu se studii porovnávajícími fenotypovou plasticitu pulců skokana hnědého pocházejících z různých oblastí, které došly k závěru, že fenotypová plasticita je populačně specifická a může být omezená časem (Lind et Johansson, 2009; Merilä et al., 2004). Selekcční tlak na rychlý vývoj a velkou tělesnou velikost během metamorfózy kvůli vyšší šanci na přežití během následné dlouhé zimní periody u pulců pocházejících ze severního Švédska potlačuje jejich schopnost reagovat na změny prostředí. Naopak pulci z jižního Švédska reagovali na snižování objemu vody urychlením vývoje a zmenšením velikosti (Merilä et al., 2000a; Laurila et al., 2002; Merilä et al., 2004). Pulci v mém pokusu, a tedy pocházející z oblasti s nejnižší nadmořskou výškou, projeví v porovnání s populacemi pocházejícími ze Švédska nejvyšší schopnost fenotypové plasticity.

7. Závěr

Během mého pokusu se mi podařil prokázat vliv vysychání vody na vývoj pulců *Rana temporaria*. Ověřila jsem, že:

- pulci reagují na snižování objemu vody zkrácením délky vývoje
- pulci reagují na snižování objemu vody zmenšením tělesné velikosti a hmotnosti v době metamorfózy

Z uspořádání provedeného pokusu nelze jednoznačně říci, zda pulci reagují na samotný snižující se objem vody či na zvyšující se koncentraci metabolitů.

Použitá literatura

- Abrams, P. A., Leimar, O., Nylin, S. & C. Wiklund, 1996. The effect of flexible growth rates on optimal sizes and development times in a seasonal environment. *The American Naturalist* 147 (3): 381–395.
- Alford, R. A. & R. N. Harris, 1988. Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *The American Naturalist* 131 (1): 91–106.
- Berven, K. A. & D. E. Gill, 1983. Interpreting geographic variation in life history traits. *American Zoologist* 23: 85–97.
- Berven, K. A., Gill, D. E. & S. J. Smith-Gill, 1979. Counter-gradient selection in the green frog, *Rana clamitans*. *Evolution* 33: 609–623.
- Blaustein, A. R. & D. B. Wake, 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5: 203–204.
- Blouin, M. S., 1992. Comparing bivariate reaction norms among species: time and size at metamorphosis in three species of *Hyla* (Anura: Hylidae). *Oecologia* 90: 288–293.
- Brady, L. D. & R. A. Griffiths, 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *Journal of Zoology* 252: 61–69.
- Cabrera-Guzmán, E., Crossland, M. R. & R. Shine, 2013. Mechanisms of competition between tadpoles of Australian frogs (*Litoria* spp.) and invasive cane toads (*Rhinella marina*). *Freshwater Biology* 58 (12): 2584–2600.
- Clutton-Brock, T. H. (ed.), 1988. Reproductive success: studies of individual variation in contrasting breeding systems. *University of Chicago Press*, Chicago, 548 pp.
- Denver, R. J., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *American Zoologist* 37: 172–184.
- Denver, R. J., 2009. Stress hormones mediate environment–genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology* 164: 20–31.
- Denver, R. J., Mirhadi, N. & M. Phillips, 1998. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79: 1859–1872.
- Enriquez-Urzelai, U., San Sebastian, O., Garriga, N. & G. A. Llorente, 2013a. Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia* 173 (1): 117–127.
- Enriquez-Urzelai, U., Montori, A., Llorente, G.A., 2013b. Aridification, phenotypic plasticity and the fate of mediterranean amphibians. *FrogLog* 107: 27–29.
- Gasc, J. P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínéz Rica, J. P., Oliveira, M. E., Sofianidou, T. S., Veith, M. & A. Zuiderwijk, A. (eds), 1997. Atlas of amphibians and reptiles in Europe. *Societas Europaea Herpetologica and Museum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN)*, Paris, 496 pp.

- Goldberg, T., Nevo E. & G. Degani, 2012. Phenotypic plasticity in larval development of six amphibian species in stressful natural environments. *Zoological Studies* 51: 345–361.
- Gomez-Mestre, I., Saccoccio, V. L., Iijima, T., Collins, E. M., Rosenthal, G. G. & K. M. Warkentin, 2010. The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1364–73.
- Gosner, K. N., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes of identification. *Herpetologica* 16: 183–190.
- Gotthard, K. & S. Nylin, 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review in morphology and life history. *Oikos* 74: 3–17.
- Hilton-Taylor, C., Baillie, J. & S. N. Stuart (eds.), 2004. 2004 IUCN Red list of threatened species: a global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 191 pp.
- IUCN, 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <http://www.iucnredlist.org>. Navštívno 17.11.2014.
- Johansson, F., Hjelm, J. & B. E. Giles, 2005. Life history and morphology of *Rana temporaria* in response to pool permanence. *Evolutionary Ecology Research* 7: 1025–1038.
- Johansson, M., Räsänen, K. & J. Merilä, 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquatic Toxicology* 54: 1–14.
- Laugen, A. T., Laurila, A. & J. Merilä, 2002. Maternal and genetic contributions to geographical variation in *Rana temporaria* larval life-history traits. *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 61–70.
- Laurila, A., Karttunen, S. & J. Merilä, 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* 56: 617–627.
- Laurila, A. & J. Kujasalo, 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology* 68: 1123–1132.
- Laurila, A., Kujasalo, J. & E. Ranta, 1998. Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Oikos* 83: 307–317.
- Leips, J., McManus, M. G. & J. Travis, 2000. Response of treefrog larvae to drying ponds: comparing temporary and permanent pond breeders. *Ecology* 81: 2997–3008.
- Leips, J. & J. Travis, 1994. Metamorphic responses to changing food levels in two species of hylid frogs. *Ecology* 75: 1345–1356.
- Lind, M. I. & F. Johansson, 2007. The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1288–1297.
- Lind, M. I., & F. Johansson, 2009. Costs and limits of phenotypic plasticity in island populations of the common frog *Rana temporaria* under divergent selection pressures. *Evolution* 63: 1508–1518.

- Lind, M. I. & F. Johansson, 2011. Testing the role of phenotypic plasticity for local adaptation: growth and development in time constrained *Rana temporaria* populations. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2696–704.
- Loman, J., 1999. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: And experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia* 20: 421–430.
- Loman, J., 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology* 258: 115–129.
- Loman, J. & D. Claesson, 2003. Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: tests of cost models. *Evolutionary Ecology Research* 5: 179–194.
- Márquez-García, M., Correa-Solis, M. & M. A. Méndez, 2010. Life-history trait variation in tadpoles of the warty toad in response to pond drying. *Journal of Zoology* 281: 105–111.
- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M. & M. A. Méndez, 2009. Effects of pond drying on morphological and life history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research* 11: 803–815.
- McMenamin, S. K., Hadly, E. A. & A C. K. Wright, 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (44): 16988–16993.
- Merilä, J., Laurila, A., Laugen, A. T., Räsänen, K., & M. Pahkala, 2000a. Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* – comparison of high and low latitude populations. *Ecography* 23: 457–465.
- Merilä, J., Laurila, A. & B. Lindgren, 2004. Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1132–1140.
- Merilä, J., Laurila, A., Pahkala, M., Räsänen, K. & A. T. Laugen, 2000b. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecoscience* 7: 18–24.
- Mousseau, T. A. & C. W. Fox, 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 403–407.
- Newman, R. A., 1988. Adaptive plasticity in development of *scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution* 42 (4): 774–783.
- Newman, R. A., 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70: 1775–1787.
- Newman, R. A., 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: what type of phenotypic variation is adaptive, and what are the costs of such plasticity. *BioScience* 42, 671–678.
- Newman, R. A., 1994. Effects of changing density and food level on metamorphosis of a desert amphibian, *Scaphiopus couchii*. *Ecology* 75 (4): 1085–1096.
- Newman, R. A. & A. E. Dunham, 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* 1994: 372–381.

- Procházková, L., 1959. Bestimmung der Nitrate im Wasser. *Zeitschrift für analytische Chemie* 167: 254–260.
- Reques, R. & M. Tejedo, 1997. Reaction norms for metamorphic traits in natterjack toads to larval density and pond duration. *Journal of Evolutionary Biology* 10 (6): 829–851.
- Reynolds C. S., 2006. The ecology of phytoplankton. *Cambridge University Press, Cambridge*, 535 pp.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A. & A. Montori, 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research* 8: 309–320.
- Rowe, L. & D. Ludwig, 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology* 72: 413–427.
- Rudolf, V. H. W. & M. O. Rodel, 2007. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under certain time constraints. *Evolutionary Ecology* 21: 121–142.
- Scott, D. E. & B. S. Metts, 2011. Shifts in the amphibian community over 30 years at an isolated Wetland: has climate change Altered wetland hydrology? *Proceedings of the 2011 Georgia Water Resources Conference*.
- Smith, D. C., 1983. Factors controlling tadpole populations of the Chorus frog (*Pseudacris triseriata*) on Isle Royale, Michigan. *Ecology* 64 (3): 501–510.
- Smith-Gill, S. J. & K. A. Berven, 1979. Predicting amphibian metamorphosis. *The American Naturalist* 113 (4): 563–585.
- Stark, K., Scott, D. E., Tsyusko, O., Coughlin, D. P. & T. G. Hinton, 2012. Effects of two stressors on amphibian larval development. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 283–287.
- Stay, G., Kotler, B. P. & L. Blaustein, 2007. Direct and indirect effects of dragonfly (*Anax imperator*) nymphs on green toad (*Bufo viridis*) tadpoles. *Hydrobiologia* 579 (1): 85–93.
- Stearns, S. C., 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* 39 (7): 436–445.
- Székely, P., Tudor, M. & D. Cogălniceanu, 2010. Effect of habitat drying on the development of the eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*) tadpoles. *Amphibia-Reptilia* 31: 425–434.
- Tejedo, M. & R. Reques, 1992. Effects of egg size and density on metamorphic traits in tadpoles of the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Journal of Herpetology* 26 (2): 146–152.
- Tejedo, M. & R. Reques, 1994. Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos* 71: 295–304.
- Travis, J., 1983. Variation in growth and survival of *Hyla gratiosa* larvae in experimental enclosures. *Copeia* 1983: 232–237.
- Travis, J., 1984. Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology* 65: 1155–1160.

- Wells, K. D., 2007. The ecology and behavior of amphibians. *The University of Chicago Press*, Chicago and London, 1148 pp.
- Werner, E. E., 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *American Naturalist* 128: 319–341.
- Wilbur, H. M., & J. P. Collins, 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305–1314.
- Wilbur, H. M., 1977. Interactions of food level and population density in *Rana sylvatica*. *Ecology* 58: 206–209.
- Wilbur, H. M., 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology* 68: 1437–1452.

Příloha

Tab. 6: Porovnávání velikostí (SUL) pulců mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

Kruskal-Wallisův test: $H = 17,27$, $df = 4$, $P < 0,01$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		2,247	2,998	2,562	3,427
1	2,247		0,687	0,941	1,792
2	2,998	0,687		0,455	0,313
3	2,562	0,941	0,455		0,701
4	3,427	1,792	1,313	0,701	

Tab. 7: Porovnávání hmotností pulců mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

Kruskal-Wallisův test: $H = 32,73$, $df = 4$, $P < 0,001$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		1,309	4,298	3,202	4,274
1	1,309		2,868	2,229	3,284
2	4,298	2,868		0,186	1,249
3	3,202	2,229	0,185		0,868
4	4,274	3,284	1,249	0,868	

Tab. 8: Porovnání délky vývoje pulců mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

Kruskal-Wallisův test: $H = 25,07$, $df = 4$, $P < 0,001$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		1,794	4,317	1,916	3,670
1	1,794		2,409	0,624	2,349
2	4,317	2,409		1,104	0,637
3	1,916	0,624	1,104		1,421
4	3,670	2,349	0,637	1,421	

Tab. 9: Porovnání posledních hodnot pH vody mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

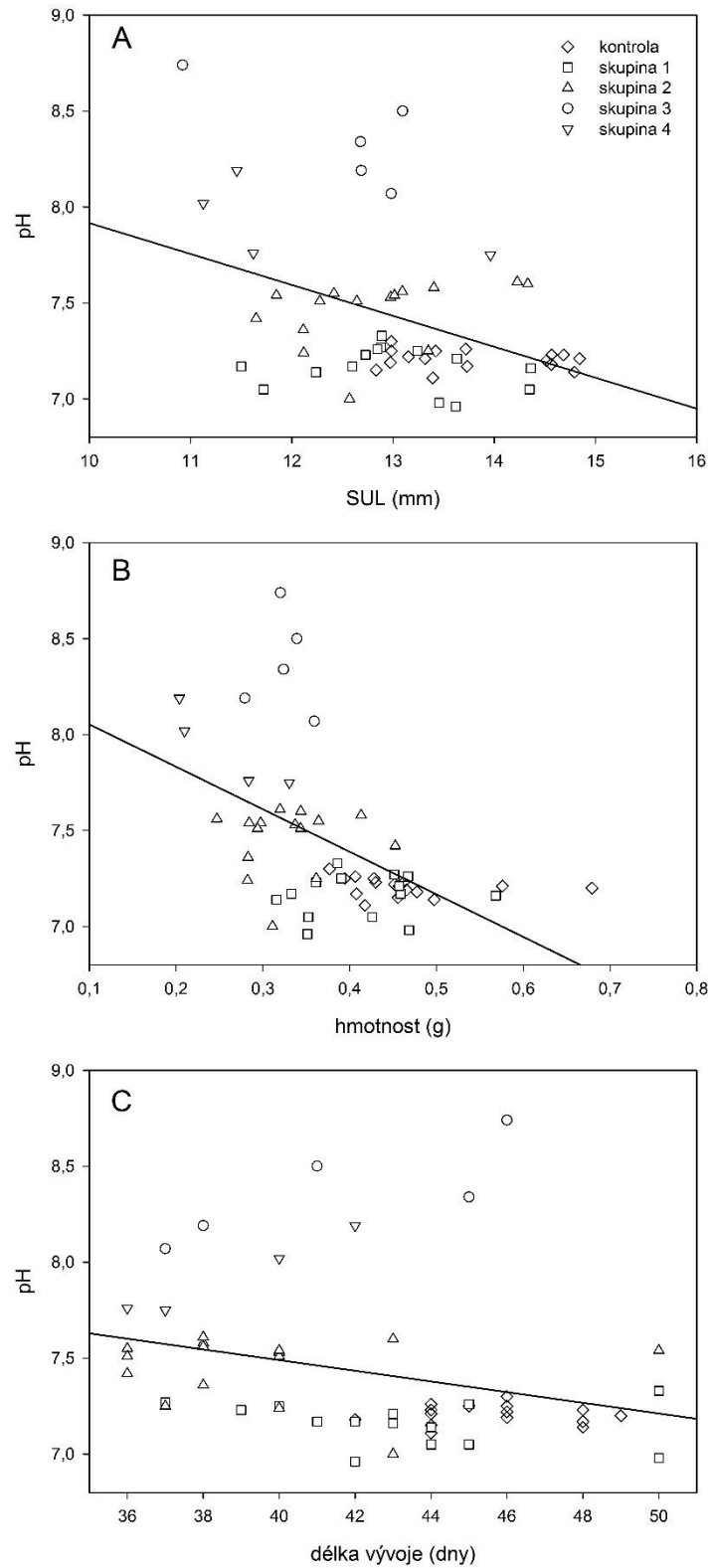
Kruskal-Wallisův test: $H = 56,42$, $df = 4$, $P < 0,001$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		0,533	2,371	5,769	3,907
1	0,533		2,854	6,214	4,281
2	2,371	2,854		3,214	1,998
3	5,769	6,214	3,214		0,499
4	3,907	4,281	1,998	0,499	

Tab. 10: Porovnání posledních hodnot koncentrací rozpuštěného kyslíku ve vodě mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

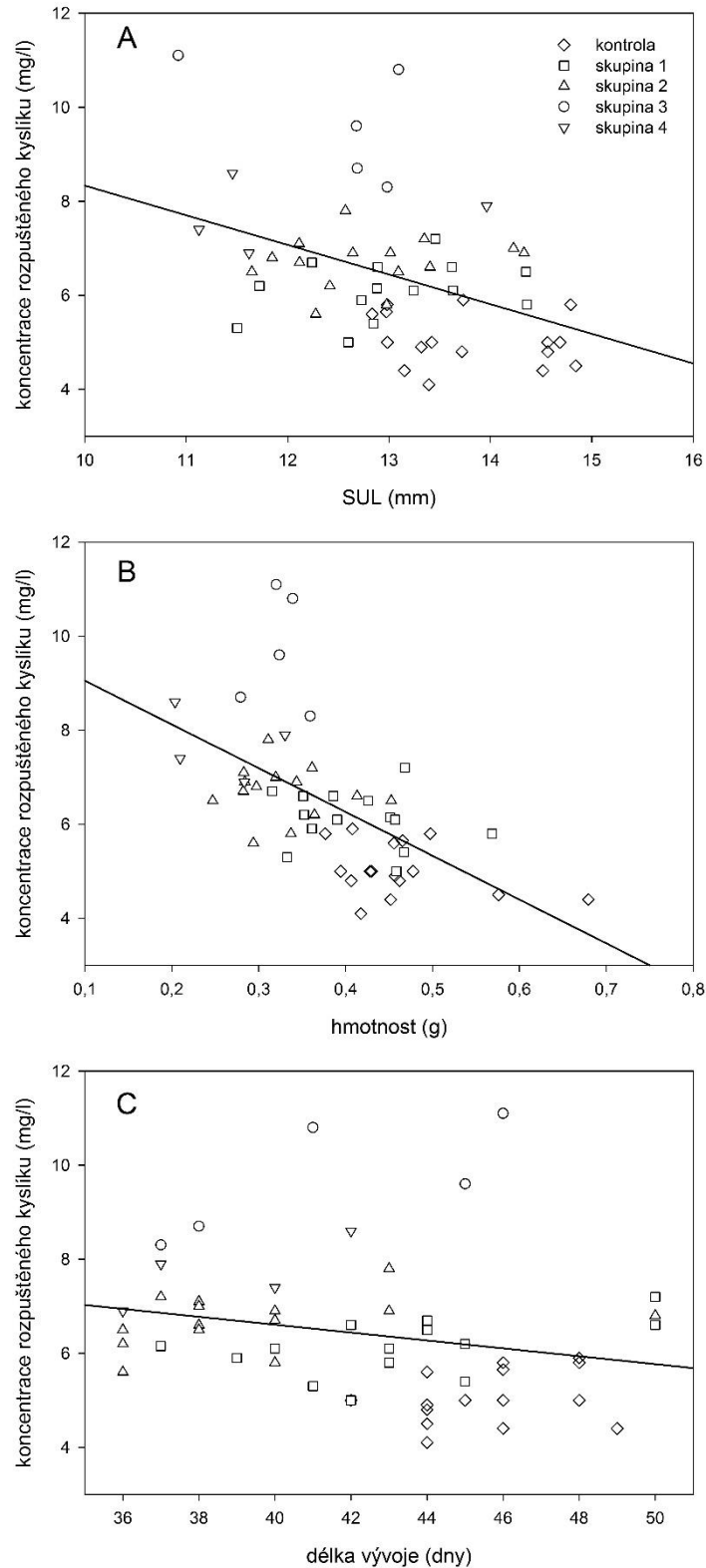
Kruskal-Wallisův test: $H = 58,18$, $df = 4$, $P < 0,001$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		2,197	3,344	7,166	4,295
1	2,197		1,167	4,860	2,568
2	3,344	1,167		3,594	1,625
3	7,166	4,860	3,594		1,178
4	4,295	2,568	1,625	1,178	

Tab. 11: Porovnání posledních hodnot vodivosti ve vodě mezi skupinami. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.

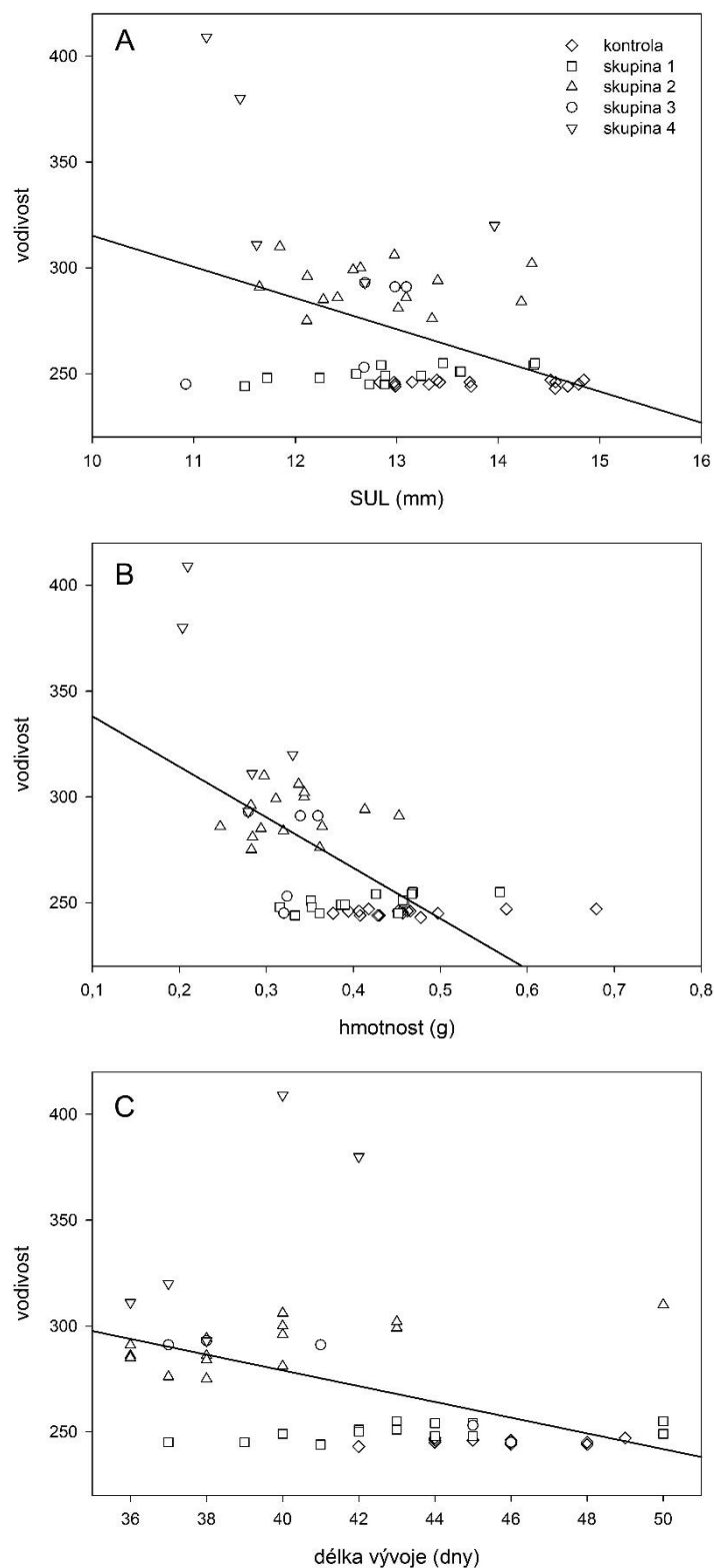
Kruskal-Wallisův test: $H = 55,32$, $df = 4$, $P < 0,001$					
skupina	kontrola	1	2	3	4
kontrola		1,255	5,384	4,085	5,849
1	1,255		4,091	2,768	4,832
2	5,384	4,091		1,429	1,572
3	4,085	2,768	1,429		2,729
4	5,849	4,832	1,572	2,729	



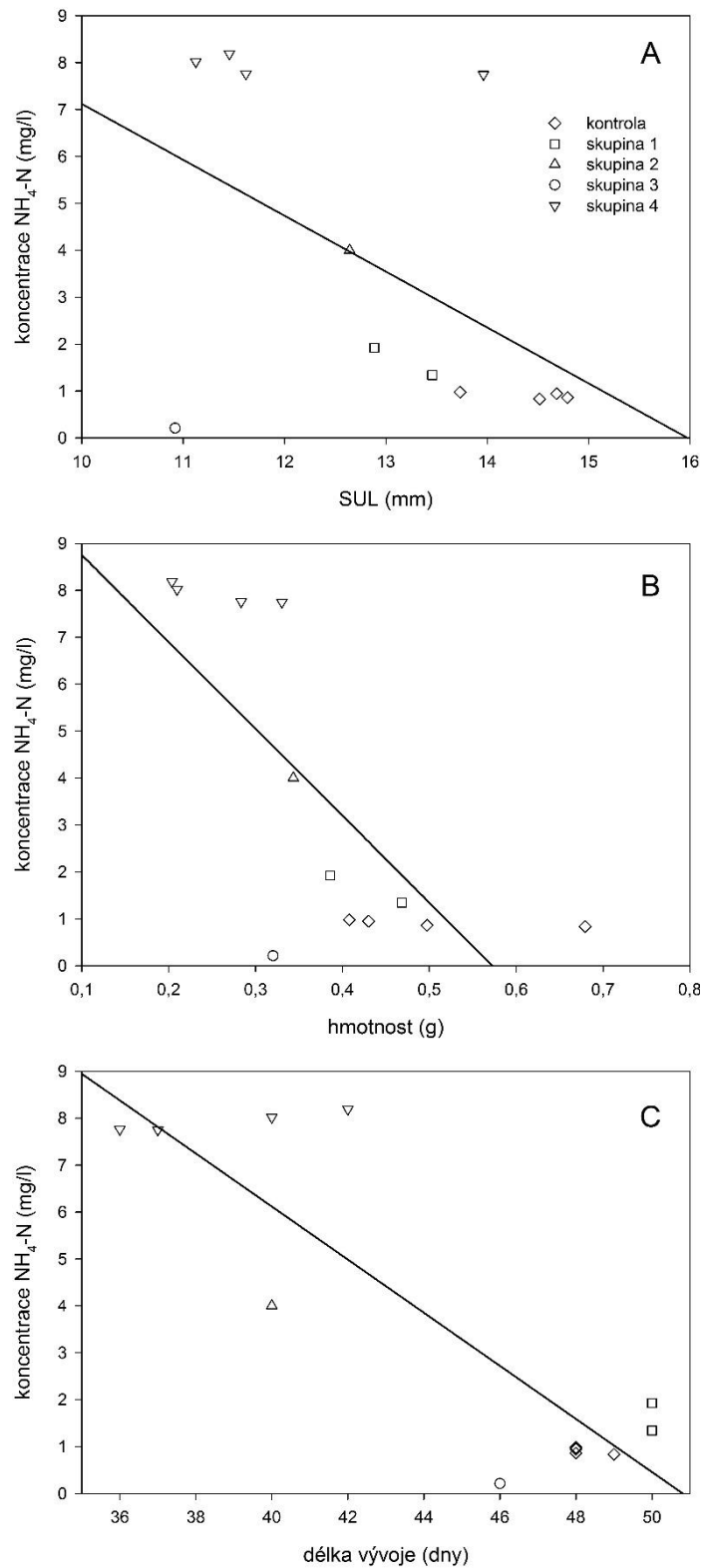
Obr. 10: Lineární regrese velikostí (SUL; A), hmotností (B) a délek vývoje (C) pulců a pH vody. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.



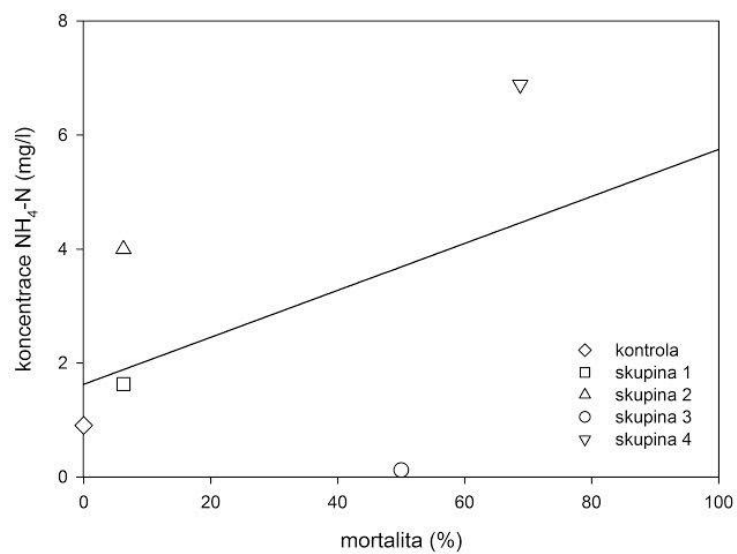
Obr. 11: Lineární regrese velikostí (SUL; A), hmotností (B) a délek vývoje (C) pulců a koncentrací rozpuštěného kyslíku ve vodě. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.



Obr. 12: Lineární regrese velikostí (SUL; A), hmotností (B) a délek vývoje (C) pulců a vodivosti ve vodě. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.



Obr. 13: Lineární regrese velikostí (SUL; A), hmotností (B) a délek vývoje (C) pulců a koncentrací amonných iontů ve vodě. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.



Obr. 14: Lineární regrese mortality pulců a koncentrací amonných iontů ve vodě. Vysvětlivky ke skupinám: **kontrola** = výměna celého objemu, konstantní objem (1 700 ml); **1** = výměna celého objemu, konstantní objem (750 ml); **2** = výměna celého objemu, snižovaný objem; **3** = výměna části objemu, konstantní objem (750 ml); **4** = výměna části objemu, snižovaný objem.