

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra ekologie a životního prostředí



Určování věku kuňky obecné (*Bombina bombina*) pomocí
skeletochronologie

Age determination by skeletochronology of European fire-bellied toad
(*Bombina bombina*)

Bc. Jan Růžička

Diplomová práce

předložená

na katedře Ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: Mgr. Jan Losík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lukáš Weber

Olomouc 2020

Bibliografická identifikace:

Růžička J. 2020. Určování věku kuňky obecné (*Bombina bombina*) pomocí skeletochronologie. Diplomová práce. Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 50 pp.

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá určováním věku jedinců kuňky obecné (*Bombina bombina*) pomocí metody skeletochronologie a případnými souvislostmi mezi věkem a délkou těla jedinců. Kuňka obecná je chráněný druh a získání dat o její ekologii může přispět k její ochraně. Odchyty jedinců probíhaly na třech lokalitách v Tověři, v rybníce Černý Nadýmač a v tůních u rybníka Vilém. Odchyt jedinců probíhal pomocí podběráku a celkem bylo chyceno 57 jedinců. Nejvíce odchycených jedinců bylo na lokalitě Černý Nadýmač a to 34 jedinců, v Tověři bylo 16 jedinců a v tůních u rybníka Vilém bylo odchyceno 7 jedinců. Žádné podstatné rozdíly v naměřených délkách těl mezi odchycenými samci a samicemi nebyl. Avšak rozdíly ve velikosti těl, mezi jedinci odchycenými na různých lokalitách zjištěny byly. Největší jedinec byl odchycený v Tověři a jednalo se o samce, který měřil 4,8 cm. Určení věku jedinců pomocí skeletochronologie, bohužel nebylo úspěšné z důvodu špatně zvládnuté metodiky. Hlavní problém v metodice, zřejmě byla špatně nastudovaná literatura a její neprozkoušení pomocí pilotních pokusů na zkušebních vzorcích. Hlavní nedostatek byla nejspíše příliš krátká dekalifikace a nepoužití fixačního média, které by pomohlo při obarvování vzorků. Takže žádné závislosti mezi délkou těla a věkem nebyly zjištěny, stejně tak jako možné rozdíly v délce života samců a samic.

Klíčová slova: *Bombina bombina*, kuňka obecná, skeletochronologie.

Bibliographical identification:

Růžička, J. 2020. Age determination by skeletochronology of European fire-bellied toad (*Bombina bombina*). Master's thesis. Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc. 50 pp.

Abstract:

This thesis deals with determining the age of *Bombina bombina* individuals using the method skeletochronology and eventual the connection between the age and body length of individuals. *Bombina bombina* is a protected species and data gain about its ecology can contribute to its protection. Individuals of *Bombina bombina* were captured at three locations – in Tověř, in the pond Černý Nadýmač and in the pools by the pond Vilém. Capture of individuals was done by landing net. In summary 57 individuals were captured. The most individuals were captured at the location Černý Nadýmač – overall 34 individuals, in Tověř 16 individuals and in the pools by the pond Vilém 7 individuals. Substantial differences between the length of male and female bodies were not found. However, the differences between the length of individuals captured at different locations were found. The largest individual was captured in Tověř. It was a male with a length 4,8 cm. Determining the age of individuals using skeletochronology was not unfortunately successful because of unmanaged method. The main issue of the method was obviously wrong studied literature that was not tested by pilot experiments with test samples. The main disadvantage was obviously too short decalcification and non-use of fixation medium, that would help with staining of the sample. As a result any connection between the age and body length was not found as well as differences between life expectancies of males and females.

Keywords: *Bombina bombina*, European fire-bellied toad, skeletochronology.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Jana Losíka, Ph.D. s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 27. července 2020

.....

Bc. Jan Růžička

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
Seznam příloh	ix
Seznam zkratk	x
Poděkování.....	xi
1. Úvod.....	12
1.1. Kuňka obecná (<i>Bombina bombina</i>).....	13
1.2. Určování věku obojživelníků	14
1.3. Skeletochronologie	16
2. Cíle práce	24
3. Materiál a metody.....	25
3.1. Charakteristika lokalit	25
3.2. Odchyt jedinců	29
3.3. Skeletochronologie	29
3.4. Statistické zpracování	30
4. Výsledky	31
4.1. Skeletochronologie	31
4.2. Demografie	32
4.2.1. Velikosti těl odchycených jedinců	32
4.2.2. Porovnání velikosti těl samců a samic	35
4.2.3. Poměr pohlaví	36
5. Diskuse.....	37
5.1. Skeletochronologie	37
5.2. Velikost těla a početnost na lokalitách.....	38
6. Závěr	40
7. Zdroje:.....	41
8. Přílohy	49

Seznam tabulek

Tab. 1 – Demografické znaky měnící se s nadmořskou výškou a zeměpisnou šířkou. NV= nadmořská výška, PZ = věk pohlavní zralosti, SV = střední věk, MV = maximální věk. Převzato a upraveno od Sinsch 2015.	23
--	----

Seznam obrázků

Obr. 1 - Ukázka přirozených vzorů („pattern maps“) u kuňky obecné.....	16
Obr. 2- Růst kosti a s tím spojený každoroční přírůstek LAG. Převzato a upraveno od Rozenblut & Ogielska 2005.....	18
Obr. 3 – Podélný řez článkem prstu skokana zeleného (<i>Pelophylax esculenta</i>). Převzato a upraveno od Rozenblut & Ogielska 2005.....	18
Obr. 4 – Řez kostí ropuchy zelené (<i>Bufo viridis</i>), čtyřletý jedinec. Převzato od Sinsch 2015.....	20
Obr. 5- Řez kostí ropuchy zelené (<i>Bufo viridis</i>), juvenilní dvouletý jedinec. Převzato od Sinsch 2015.....	20
Obr. 6 - Mapa lokality Tověř s vyznačenou vodní plochou.....	26
Obr. 7 - Mapa rybníku Černý Nadýmač s vyznačenou vodní plochou.....	27
Obr. 8 - Mapa rybníku Vilém s vyznačenou vodní plochou a tůněmi.....	28
Obr. 9 - Nesprávně obarvený a seříznutý vzorek.....	31
Obr. 10 – Částečně srolovaný vzorek a špatně udělaný řez.....	32
Obr. 11 - Všichni odchycení jedinci a jejich délky těla.....	33
Obr. 12 - Jedinci odchyceni na rybníce Černý Nadýmač.....	33
Obr. 13 - Jedinci odchycení v Tověři.....	34
Obr. 14 - Jedinci odchycení v tůních u rybníka Vilém.....	34
Obr. 15 - Porovnání délky těl samců a samic v Tověři.....	35
Obr. 16 - Porovnání délky těl samců a samic na Černém Nadýmači.....	35
Obr. 17 - Poměr pohlaví na jednotlivých lokalitách.....	36

Seznam příloh

Příloha 1 - Práce v terénu.....	49
Příloha 2 - Dekalcifikace vzorků.....	49
Příloha 3 - Příprava a řezání vzorků na mikrotonu.....	50
Příloha 4 - Odparafinování jednotlivých vzorků.....	50

Seznam zkratek

CMR – capture-mark-recapture

IUCN – International Union for Conservation of Nature

LAG – čáry zastaveného růstu

LC – least concern (málo dotčený druh)

EN – Endangered (ohrožený)

Obr. - Obrázek

Tab. - Tabulka

Poděkování

Rád bych zde poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Janu Losíkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a poskytnutí cenných rad. Konzultantovi Mgr. Lukáši Weberovi za poskytnutí cenných rad, pomoc v laboratoři a v terénu. Dále bych chtěl také poděkovat mému otci RNDr. Milanovi Růžičkovi za pomoc při odchytu jedinců v terénu. A nakonec bych chtěl poděkovat Ing. Janu Černoorskému, Richardovi Kabelkovi a Dominikovi Hlubkovi za pomoc při práci v laboratoři.

V Olomouci, 27. července 2020

1. Úvod

Obojživelníci jsou skupinou přechodnou mezi suchozemskými a vodními obratlovci. Jsou považováni za ektotermní a poikilotermní živočichy, jelikož své tělesné teplo neregulují sami, ale získávají ho z vnějšího prostředí. Jejich tělesná teplota tedy kolísá podle okolní teploty (Dungel & Řehák 2011). Svým stylem života a rozmnožováním jsou vázáni na vodní prostředí, avšak některé druhy ve zbylém průběhu roku obývají i suchozemské prostředí (Baruš et al. 1992, Zavadil et al. 2011, Růžička 2015). Jsou považováni za velmi dobré ekologické indikátory, jelikož jsou velmi citliví na změnu prostředí, ve kterém žijí (Welsh & Olliver 1998, DeGarady & Halbrook 2006).

V posledních letech dochází k velkému vymírání obojživelníků, a to nejen v České republice, ale celosvětově (Houlán et al. 2000, Nyström et al. 2007). Z důvodu jejich významu v ekosystémech má tento úbytek velký vliv i na ostatní organismy (Weber 2016). Pro tento obrovský pokles početností obojživelníků existuje několik hypotéz a pravděpodobně jde i o kombinaci několika faktorů najednou (Collins & Stoffer 2003). Hlavní příčinou úbytku obojživelníků v našich krajinách je ztráta vodních biotopů (Oertli et al. 2005), ať už se jedná o zničení či jakoukoliv jinou nevhodnou manipulaci s mokřady a tůňemi (Beebee 1997). Následně pak zbývají méně vhodné vodní plochy, hlavně ty, kde se nalézá rybí obsádka či vodní ptactvo (Kyek & Maletzky 2006). Další možnou příčinou, obzvláště v posledních letech, jsou různá plísňová onemocnění, a to především chytridiomykózy (Baláž et al. 2009, Civiš et al. 2010). Dalšími negativními vlivy jsou používání pesticidů (Alford & Richards 1999, Houlán et al. 2000) nebo změna klimatu (Lips et al. 2006). Fragmentace naší krajiny a vliv dopravy má také negativní vliv na obojživelníky. Hlavně v období migrace dochází k velkému množství úmrtí vlivem dopravy (Vojar 2007).

Obojživelníci jsou taxonomickou skupinou s největším podílem ohrožených zástupců a největším nárůstem těchto druhů včetně vyhynulých druhů (Vojar 2007). V České republice se vyskytuje 21 druhů obojživelníků, z toho 13 druhů žab. Stav jejich ohrožení odráží už jen skutečnost, že všechny druhy žab, vyskytující se na území státu jsou chráněny, výjimkou je skokan hnědý (*Rana temporaria*), který se nalézá pouze v Červeném seznamu ČR (Vojar 2007, Chobot & Němec 2017, Růžička 2018).

Jelikož dochází k velkým úbytkům obojživelníků z výše uvedených důvodů a vzhledem k tomu, že úbytek obojživelníků má i nepřímý vliv na člověka, jakožto sekundární konzument (likvidují různé druhy hmyzu, kteří působí jako škůdci), je potřeba tyto živočichy aktivně chránit. Velkou komplikací v ochraně obojživelníků je fakt, že v průběhu roku využívají různé biotopy, mezi kterými migrují (Vojar 2007, Dervo 2014). Ochrana jednotlivých ohrožených druhů má smysl pouze tehdy, známe-li ekologii daného druhu, jeho rozšíření a aktuální stav populací (Vojar 2007, Jeřábková 2011) a zároveň vyžaduje používání efektivních metod, které minimalizují vliv vnějších faktorů a poskytnou reálná data o zkoumané populaci (Jenkins et al. 2003, Dervo 2014, Růžička 2018).

Tato práce se věnuje neprobádané možnosti užití a efektivitě metody skeletochronologie na kuňku obecnou (*Bombina bombina*). Získání možných spojitostí mezi věkem a délkou těla jedinců. Zároveň zjištění možných rozdílů mezi pohlavími v délkách těla. Výsledky této práce mohou rozšířit znalosti o ekologii druhu a přispět ke zlepšení ochrany a managementu kuňky obecné.

1.1. Kuňka obecná (*Bombina bombina*)

Bombina bombina (Linnaeus, 1761) patří podle vyhlášky č. 395/1992 Sb. ve znění vyhlášky č. 175/2006 Sb. do kategorie silně ohrožených druhů. Podle červeného seznamu obojživelníků a plazů ČR (Chobot & Němec 2017) je zařazena mezi druhy ohrožené (EN) a je chráněna také v rámci práva Evropského společenství, kdy je uvedena v příloze II Bernské úmluvy o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť a v příloze II a IV Směrnice o stanovištích (92/43/EEC). *B. bombina* je dle Červeného seznamu IUCN (IUCN 2017), kde je klasifikován jako druh málo dotčený (LC) (IUCN 2017, Růžička 2018).

B. bombina dorůstá zpravidla do velikosti 4,2 až 5,4 cm, je pro ni charakteristická silně bradavičnatá kůže s oválnými rohovinovými výrůstky a výrazně pestře zbarvené břicho (Baruš et al. 1992, Nečas et al. 1997). Tělo je zploštělé a končetiny jsou relativně krátké. Kuňky jsou také známi takzvaným „kunčím reflexem“. Spočívá ve specifickém prohnutí těla, při kterém je vidět pestře zbarvené břicho, čímž odrazuje útočníka, který se už jednou setkal s účinným kožním jedem kuněk, obsahující dráždivou bílkovinu alytesin

(Moravec 1999). Hrdelní rezonátory jsou párové a vnitřní, v období skřehotání jsou dobře viditelné (Zwach 2013). Zbarvení svrchní strany těla je nenápadné, nejčastěji blátivě hnědošedé, někdy tmavší, téměř černé. Břišní strana těla a končetin jsou zbarveny nápadně pestře, zde jsou velké nepravidelné ohnivě červené, někdy i cihlově červené, oranžové skvrny (Baruš et al. 1992). U kuňky obecné je znám pohlavní dimorfismus, pohlaví lze odlišit podle zrohovatělých plošek pokožky na předních končetinách samců (Baruš et al. 1992, Moravec 1999).

B. bombina zimuje v úkrytech na souši, často na bahnitých místech. Pokud nemusí, nevykonává daleké migrační cesty, je však schopna migrovat i na vzdálenost až kolem 800 m (Baruš et al. 1992, Růžička 2015). Typickými biotopy pro tento druh jsou mělké, vegetací hustě zarostlé stojaté vody na dobře osluněných místech: pobřežní pásma vodních nádrží, tůň. Obývá také periodické nádrže. (Nečas et al. 1997, Zavadil 2011). Ve vodě ji můžeme nalézt již v první polovině dubna (Nečas et al. 1997). *B. bombina* se obecně nerozmnožuje jednorázově, ale vytváří snůšky od dubna do června, někdy až do července (Růžička 2015), v závislosti na klimatických podmínkách. Snůšky jsou oválné, sestavené z několika vajíček a mnohdy mají k sobě přichycen povlak z bahna nebo různé nárůsty řas (Maštera et al. 2015, Růžička 2015). Ploutevní lem pulců je dlouhý až po přední třetinu těla a v celé své délce je vysoký. Oči pulců jsou při pohledu shora ve středu hlavy (Maštera et al. 2015, Růžička 2015). Mladí jedinci po deštích často vyhledávají nové lokality. Koncem léta migrují k zimním úkrytům (Zavadil 2011).

Jelikož je kuňka obecná téměř celoročně vázána na vodní biotop, jsou faktory ohrožující tento druh spojeny především se změnami vodního režimu v krajině a s hospodařením na vodních plochách. Konkrétně jde o rušení malých vodních ploch, intenzifikaci rybářství, zpevňování lesních a polních cest. Zároveň na ní i negativně působí změny v blízkosti vodních ploch, jako jsou například prameniště a zejména navazující vlhké louky, které jsou potřebné pro metamorfované žabky, protože se na těchto místech vykrmují, případně zde dokonce i zimují (Růžička 2015).

1.2. Určování věku obojživelníků

Přesné stanovení věku a míry růstu jedinců je jedním z nejdůležitějších zájmů biologů, protože znalost věkové struktury populace je důležitým nástrojem pro studium

demografie a stavu ochrany jakéhokoli druhu (Halliday & Tejedo 1995). Byly zavedeny různé metody stanovení věku. V některých studiích je zmiňována závislost věku na počtu erytrocytů v krvi. Ale není jisté, zda počet erytrocytů s věkem stoupá či klesá, protože je zde spousta jiných proměnných (pohlaví, roční období, stav zvířete), které mění počet erytrocytů v krvi (Arikan & Çiçek 2014). Zároveň existuje i metoda, která vyšetřuje vnitřní orgány obojživelníků, ale tato metoda je neprůkazná (Marunouchi et al. 2000). Avšak nejspolehlivější, ale mimořádně náročnou metodou pro získání závislosti mezi velikostí těla a věkem je metoda odchyty, označení a vypuštění (CMR) velkého počtu jedinců u kterých známe věk (ideálně čerstvě metamorfovaných jedinců). Poté musí následovat pravidelné odchvy (Wagner et. al 2011, Sinsch 2015). Metoda je založena na odchytu jedince a následném vrácení do populace a jeho opakovaném zpětném odchytu během další akce (Tkadlec & Losík 2013). Metoda zpětných odchytů je založena na individuálním značení, a to může být buď invazivní nebo neinvazivní. Mezi invazivní metody můžeme řadit různé zastřihávání prstů, tetování či cejchování a mnoho dalších možností (Holicová 2012). V posledních letech, se u obojživelníků používá neinvazivní metoda, která využívá přirozených vzorů jedinců („pattern maps“, Obr. 1). Metoda tak umožňuje rozeznání jedinců mezi sebou, bez jakéhokoliv způsobení traumat jedincům. Pro následné vyhodnocení dat se používá fotografie, nákres nebo naskenovaný snímek zvířete (Donnelly et al. 1994). Velkou výhodou této metody je v podstatě neomezená velikost zkoumané populace, avšak s rostoucím počtem vzorku samozřejmě roste i náročnost identifikace. Hlavní úskalí této metody je obrovská časová náročnost, protože pro správné určení věku, je potřeba jedince sledovat po celou dobu jejich života. Kromě toho má tato metoda i další úskalí jako je například technický problém identifikace čerstvě metamorfovaných žabek, které mají malé tělesné rozměry. Nebo případná možnost emigrace sledovaného jedince ze sledované plochy (Kopecký et al. 2009). CMR studie, také bohužel nezjistí stárnutí neoznačených jedinců. Zároveň pokusy zjistit závislosti mezi délkou těla a věku selhávají (Loman 1978, Schnäbele 1987), protože růst obojživelníků po dosažení pohlavní zralosti zpomaluje, a tedy velikost dospělých jedinců je hlavně závislá na velikosti těla dosažené v období subadultního růstu (Smirina 1994, Sinsch 2015).



Obr. 1 - Ukázka přirozených vzorů („pattern maps“) u kuňky obecné.

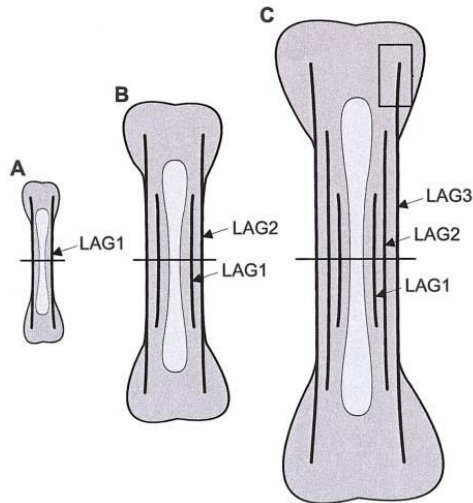
Během posledních desetiletí se používá na určení věku obojživelníků spíše metoda skeletochronologie (Smirina 1994), tj., určení věku jedince na základě počtu čar zastaveného růstu (lines of arrested growth, LAG). Čáry jsou patrné na řezu kostí a odpovídají obdobím neaktivity – hibernaci či aestivaci (Senning 1940, Smirina & Roček 1976, Smirina 1994, Kopecký et al. 2009). Byly popsány dva typy růstových linií (Bruce et al. 2002). Jsou to růstové linie a čáry zastaveného růstu (LAG). Růstové linie jsou složeny z tenkých vrstev avaskulární kosti. Růstové linie rostou každý rok během období aktivity a jsou podstatně silnější. Zatímco LAG jsou mnohem tenčí a vznikají v období neaktivity (Francillon-Vieillot et al. 1990, Makovický et al. 2015). Skeletochronologie byla poprvé aplikována u obojživelníků z mírného pásu, kde klimatické podmínky vyžadují zastavení aktivity v zimě, a prokázala přítomnost růstových značek uložených v kostní tkáni a její roční chronologii (Castanet & Smirina 1990, Piñeiro 2019). V této studii jsem se rozhodl použít metodu skeletochronologie, a proto se jí budu podrobně věnovat v následující kapitole.

1.3. Skeletochronologie

Tato metoda se stala již standardním postupem. První úspěšné pokusy na obojživelnících byly založeny na lebečních kostech (Senning 1940, Schroeder & Baskett 1968), poté se používaly kulaté kosti (Kleinenberg & Smirina 1969). Avšak použití dlouhých kostí, jako je humerus a femur

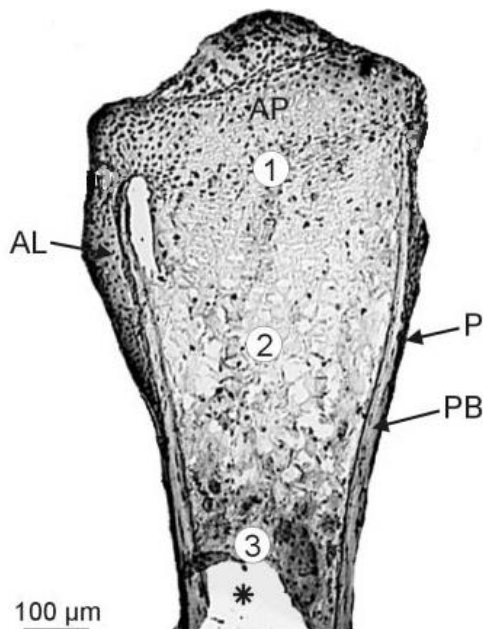
vyžadovalo nepříjemně velké množství jedinců, kteří museli být usmrceni. Následně bylo zjištěno, že je možné i nedestruktivní stanovení věku, protože Smirina (1972a) prokázal, že články prstů (takzvané falangy) získané uříznutím špičky prstů poskytují úplně stejné informace. Provádění této metody na člancích prstů (falangách) je důležité i v rámci ochrany přírody, protože se vyhýbá usmrcení zvířat a umožňuje tedy i demografické studie v dlouhých časových intervalech (Guarino et al. 2011). Tento zásah nemá na přežívání jedinců negativní vliv (Dolmen 1981, Weddeling et al. 2004, Kopecký et al. 2009) a zároveň u obojživelníků dochází k následně rychlé regeneraci ustřižených článků prstů (Kopecký et al. 2009).

Jak již bylo řečeno tato metoda je založena na tvorbě LAG, které odrážejí sezónní změny metabolické aktivity u žab mírného pásma a s tím spojené růstové cykly. Během hibernace se zastaví růst kostní tkáně a vytvoří se linie zastaveného růstu (LAG; Rozenblut & Ogielska 2005). Tvorba LAG může být vyvolaná několika týdny chladu nebo hladověním (Smirina et al., 1986, Sinsch 2015). Konečná příčina roční tvorby LAG je však geneticky založená na cirka ročním rytmu synchronizovaným se sezónními cykly (Castanet et al. 1993, Sinsch 2015). A tak je každý rok života „zaznamenán“ přímo v kosti během hibernace (Obr. 2), věk jedince se tak rovná počtu hibernací (Rozenblut & Ogielska 2005). Tvorba LAG, ale může odrážet nejen sezónní, ale i vnitřní biologické rytmy, jako je tomu u tropických druhů, které jsou aktivní po celý rok bez hibernace (Guarino et al. 1998, Rozenblut & Ogielska 2005). Na následující obrázku (Obr. 2) vidíte schéma vzniku LAG pozorované na podélných řezech dlouhých kostí žab po první (A), druhé (B) a třetí (C) hibernaci.



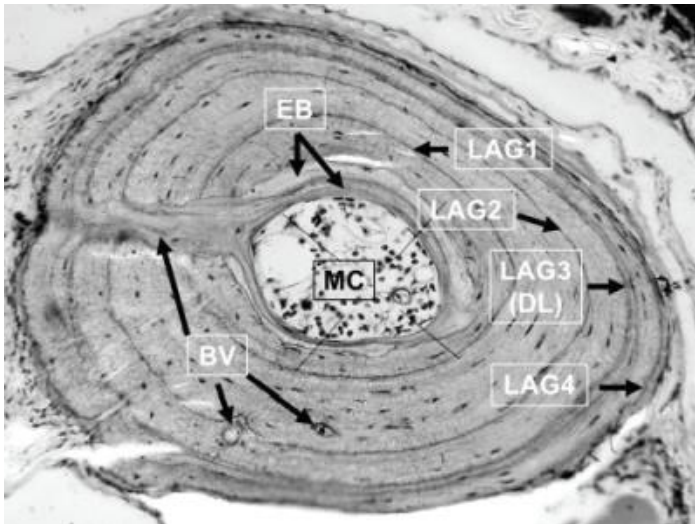
Obr. 2- Růst kosti a s tím spojený každoroční přírůstek LAG. Převzato a upraveno od Rozenblut & Ogielska 2005.

LAG je vidět na řezu kostí, tvorba LAG je zapříčiněná přírůstkem periostemu (česky okostice). Periostem je vazivový obal kryjící povrch kostí, který má dvě odlišné vrstvy. Vnější vláknitou vrstvu a vnitřní vrstvu, která má díky osteoblastům významný růstový potenciál (Dwek 2010). Na podélném řezu článku prstu skokana zeleného (*Pelophylax esculenta*; Obr. 3) vidíme kost (PB), periostem (P), laterální kloubní chrupavku (AL), vlastní kloubní chrupavku (AP).

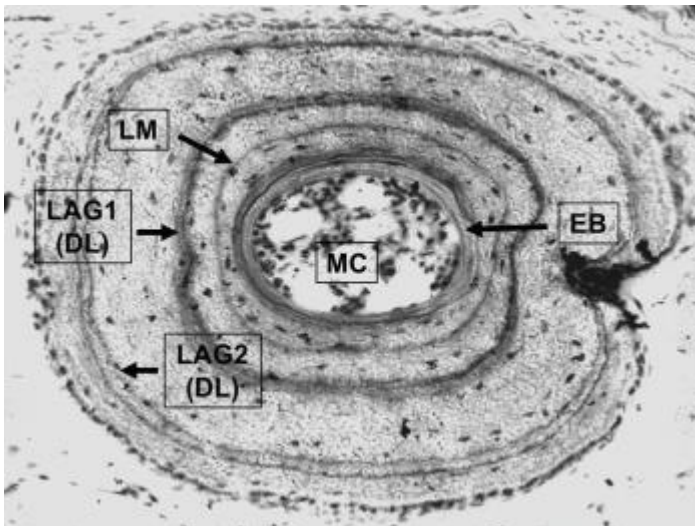


Obr. 3 – Podélný řez článkem prstu skokana zeleného (*Pelophylax esculenta*). Převzato a upraveno od Rozenblut & Ogielska 2005.

Identifikace a interpretace růstových značek má řadu úskalí. Protože kost je nejširší a středová dutina nejužší ve střední části končetinových kostí, je tato sekce nejvhodnější pro skeletochronologickou detekci růstových značek (Castanet & Smirina 1990, Castanet et al. 1993, Sinsch 2015). Jsou-li použity články prstů, poskytují bazální články lepší rozlišení než okrajová část prstu. Po získání materiálu, může být vzorek následně skladován jako suchá, čistá kost nebo konzervován v 70% ethanolu nebo 4% formaldehydu při pokojové teplotě (Sinsch 2015). Následné laboratorní postupy během této metody obvykle zahrnují odvápnění kostí (3-5% kyselinou dusičnou nebo mravenčí), fixaci (např. v Bouinově tekutině) a zalití do vhodného parafinu (Sinsch 2015). Takto připravené kosti je následně vhodné nařezat na mikrotonu obvykle na velikosti 10–16 μm . Poté jsou jednotlivé sekce obarveny Ehrlichovým, Delafieldovým nebo Mayerovým hematoxylinem, akridinovými pomeranči, cresylvioletem nebo podobnými barvivy, dokud se neobjeví růstové značky (Smirina 1972a, Sinsch et al. 2001, Sinsch 2015). Následně se doporučuje mikroskopické vyšetření dělat z nejméně 10 řezů na jeden vzorek, protože ne každá sekce poskytuje úplné informace. Případná identifikace by měla ideálně probíhat dvěma nezávislými pozorovateli. Nejvhodnější průřezy jsou charakterizovány minimální velikostí medulární dutiny a maximální velikostí kosti (Sinsch 2015). Následné histologické určení věku obojživelníka obývajícího mírné klima můžete vidět na Obr. 4. Uprostřed obrázku můžete vidět medulární dutinu (MC), někdy je vyplněná chrupavkou (u juvenilů) nebo endostiální kostí (EB). Konkrétně u mladých jedinců je první rozpoznatelnou růstovou značkou často slabá linie metamorfózy (LM; Obr. 5). Mezi LM a vnějším okrajem kosti, jsou vidět slabě obarvené úzké zóny zastaveného růstu, takzvané LAG (Obr. 4 a 5; Castanet et al. 1993, Sinsch 2015).



Obr. 4 – Řez kostí ropuchy zelené (*Bufotes viridis*), čtyřletý jedinec. Převzato od Sinsch 2015.



Obr. 5- Řez kostí ropuchy zelené (*Bufotes viridis*), juvenilní dvouletý jedinec. Převzato od Sinsch 2015.

Úspěšnost skeletochronologie a tvorba LAG každý rok, byla ověřována pomocí CMR metody. Výsledky většiny studií potvrdily vytvoření jedné linie zastaveného růstu (LAG) za rok (Sinsch 2015). U žab se správnost odhadu věku pomocí skeletochronologie pohybuje kolem 86 %. Odchyly od skutečného věku jsou téměř obecně způsobeny podhodnocením (většinou 1–2 roky) a zřídka nadhodnocením (1 rok). Podhodnocení může být způsobeno nerozpoznanou resorpcí vnitřních LAG nebo sblížením periferních LAG po dosažení sexuální zralosti. Nadhodnocení je způsobeno často nerozpoznanými dvojími čarami nebo zmatením LM s LAG (Castanet & Smirina 1990, Smirina 1994,

Sinsch 2015). Určení správnosti odhadu histologického věku u jedinců se známým věkem tedy potvrzuje, že použití skeletochronologie je dostatečně přesné pro demografické studie, pokud jedinci, kteří tvoří dominantní věkovou frakci, jsou mladší než 8 let (Sinsch 2015). Toto tvrzení jistě platí pro většinu žab obývajících mírné pásmo a tropické žáby obývající nízké nadmořské výšky (např. Morrison et al. 2004). Opatrnost se doporučuje, pokud jsou populace z vysokých zeměpisných šířek nebo větších nadmořských výšek, což může prodloužit délku života obojživelníků (např. Hjernquist et al. 2012, Zhang & Lu 2012; tabulka 1). Procento správně zjištěného věku obojživelníků klesá skoro až na nulu ve věku 13 let (Sinsch 2015). Věk jedince je poté většinou podhodnocen nejméně o tři roky (Eden et al. 2007, Sinsch et al. 2006, Wagner et al. 2011). Protože u obojživelníků s dlouhým životem se růst kostí u starších jedinců tak silně zpomaluje, že růstové zóny jsou příliš malé na to, aby oddělily jednotlivé LAG nebo LAG dokonce mohou i zcela chybět, jak je ukázáno například ve studiích Alcobendas & Castanet 2000, Sinsch et al. 2010 (Sinsch 2015). Vhodnými příklady studií zjištění průměrného a maximálního věku obojživelníků žijících u nás, jsou například údaje od Pattrelle et al. (2012), který prováděl průzkum v nadmořské výšce 480 m n. m a zjistil, že skokan hnědý (*Rana temporaria*) se dožívá věku až 18 let a průměrný věk odchycených jedinců byl 12 let. Ale Hjerguist et al. (2012), který prováděli průzkum v nadmořské výšce 5 m n. m u stejného druhu zjistili průměrný věk 5 let a maximální věk 8 let. Socha & Ogielska (2010) zjistili, že skokan skřehotavý (*Pelophylax ridibundus*) se může dožít až 7 let a jeho průměrný věk se pohybuje kolem 4 roků. Ropucha zelená (*Bufo viridis*) se průměrně dožívá 3 let a maximální délka života byla zjištěna jako 6 let (Sinsch et al. 2007b). Nemnich et al. (1995) zjistili, že rosnička zelená (*Hyla arborea*) se průměrně dožívá 2 let a její maximální délka života jsou 4 roky.

Životní vývoj obojživelníků je složitým procesem růstu, vývoje a reprodukce. Morrison & Hero (2003) upřesnili obecné biogeografické vzorce pro obojživelníky a dospěli k závěru, že dospělí jedinci mají tendenci být větší a dosáhnout dospělosti v pozdějším věku ve vyšších zeměpisných šířkách a nadmořských výškách. Avšak Zhang & Lu (2012) zjistili pomocí metaanalýz dvou ocasatých obojživelníků a devíti druhů žab, že maximální věk jedinců vzrostl ve vyšších nadmořských výškách, ale nikoliv ve vyšších zeměpisných šířkách (Sinsch 2015). Vynikajícím vzorovým druhem těchto předpovědí je ropucha krátkonohá (*Epidalea calamita*). Jedná se pravděpodobně o jednu

z nejlépe studovaných žab mírného pásma s ohledem na demografii. K dnešnímu dni bylo zkoumáno přes 20 populací v celém geografickém a nadmořském rozsahu výskytu druhu podrobena skeletochronologickému hodnocení klíčových parametrů (Sinsch 2015). Jako je věk pohlavní dospělosti (PZ) a maximální věk (podrobné informace jsou uvedené v tabulce 1). Tyto výsledky tedy umožňují komplexní metaanalýzu faktorů v životních strategiích tohoto druhu. Maximální délka života ropuchy krátkonohé, která je zjišťována v přirozených populacích je pouze asi třetinová oproti délce života zaznamenané u jedinců žijících v zajetí, tedy bez limitace nedostatkem potravy a bez rizika predace (Sinsch et al. 2006, Sinsch 2015). To je i v souladu s podobnými zjištěními u několika dalších druhů (Blanco & Sherman 2005, Guarino et al. 2014). Protože neexistuje žádný důkaz, že potrava je pro ropuchu krátkonohou omezujícím zdrojem (Leskovar et al. 2004), je tedy tlak predace pravděpodobně hlavní příčinou toho, že realizovaná maximální délka života v přírodě je u tohoto druhu daleko pod potenciální maximální délkou života (Sinsch 2015). Analýza kombinovaných účinků zeměpisné šířky, délky a nadmořské výšky na demografické rysy specifické pro pohlaví ukazuje, že (1.) zeměpisná délka neovlivnila žádný z testovaných rysů životní historie; (2.) věk pohlavní zralosti samců byl významně nižší (přibližně 0,5 roku) než u samic se vzrůstající nadmořskou výškou; (3.) maximální délka života se významně nelišila mezi pohlavími, ale zároveň se zvyšuje se vzrůstající zeměpisnou šířkou a nadmořskou výškou (Sinsch 2015). Tato metaanalýza potvrzuje zobecněnou predikci Morrison & Hero (2003), že u žab věk pohlavní zralosti roste podél zeměpisné šířky a také s nadmořskou výškou, a je také v souladu se závěry vyvozenými z menších datových souborů populací ropuchy krátkonohé (Leskovar et al. 2006, Sinsch et al. 2010; Sinsch 2015). Nárůst maximální délky života ve vyšších zeměpisných šířkách, ale také nesouhlasí se zjištěními Zhang & Lu (2012). Příklad této studie ukazuje, že pro spolehlivé závěry o příčinách geografické variace je zapotřebí více skeletochronologických studií u stejných druhů (Sinsch 2015).

Tab. 1 – Demografické znaky měnící se s nadmořskou výškou a zeměpisnou šířkou. NV= nadmořská výška, PZ = věk pohlavní zralosti, SV = střední věk, MV = maximální věk. Převzato a upraveno od Sinsch 2015.

Lokalita	Souřadnice	NZ	Pohlaví	PZ	SV	MV	Literatura
		[m n.m.]		[LAG]	[LAG]	[LAG]	
Dunnerholme (UK)	54°12' N 3°12' W	3	M	3	5	9	Denton & Beebee, 1993
			F	3	4	8	
Birkdale (UK)	53°36' N 2°59' W	8	M	2	3	7	Denton & Beebee, 1993
			F	3	5	9	
Dingle Peninsula (Ireland)	52°08' N 10°19' W	11	M, F	2	2	7	Gibbons & McCarthy, 1983
Halle (Germany)	51°29' N 11°58' E	96	M, F	2	3	7	Große, 1999
Palamós (Spain)	41°51'49''N 3°07'59''E	10	M	1	3	5	Oromi et al., 2012
			F	2	3	5	
Mas de Melons (Spain)	41°30'50''N 0°43'30''E	240	M	2	4	6	Leskovar et al., 2006
			F	3	4	4	
Navaluenga (Spain)	40°24'57''N 4°40'47''W	752	M	2	4	6	Oromi et al., 2012
			F	2	3	5	
Dehesa del Barraco (Spain)	40°27'53''N 4°38'12''W	920	M	2	3	5	Oromi et al., 2012
			F	3	3	5	
La Cedrera (Spain)	40°30'33''N 4°39'16''W	1472	M	2	3	6	Oromi et al., 2012
			F	3	3	6	
Cavadores (Spain)	40°16'19''N 5°15'12''W	2100	M	2	6	9	Oromi et al., 2012
Navasomera (Spain)	40°15'07''N 5°15'49''W	2270	M	5	7	12	Oromi et al., 2012
			F	5	6	6	
Navas (Spain)	37°47'28''N 6°04'41''W	420	M	1	2	3	Sinsch et al., 2010
			F	2	3	8	

2. Cíle práce

- 1) Skeletochronologie
 - a. Určení věku odchycených jedinců kuňky obecné
 - b. Zjištění závislostí mezi velikostí a věkem
 - c. Rozdíly věku mezi samicemi a samci
- 2) Demografie
 - a. Poměr pohlaví
 - b. Srovnání velikostí těl u samců a samic

3. Materiál a metody

3.1. Charakteristika lokalit

Odchyt zvířat probíhal na třech lokalitách, a to v obci Tověř, v rybníku Černý Nadýmač a tůň u rybníku Vilém. Původně měl být odchyt pouze na lokalitě v Tověři, kde se během roku 2019 chytlo pouze málo jedinců a následující rok se zde neodchytl žádný jedinec, proto studie musela být rozšířena o další dvě lokality.

První lokalita se nachází v obci Tověř, která se nalézá severovýchodně od města Olomouc. Jedná se o malou retenční nádrž, která má vodní plochu asi 500 m² a jelikož nemá žádný stálý vodní přítok, je tedy závislá na aktuálním množství srážek. Z jižní a severovýchodní strany má břeh pozvolný sklon. V nádrži je bohatá vodní fauna vodních bezobratlých a také je zde dobře vytvořený litorál (Weber 2016, Růžička 2018). Kolem retenční nádrže se vyskytují zástupci listnatých stromů jako je jilm (*Ulmus*), lípa (*Tilia*) a dub (*Quercus*), z nepůvodních druhů se zde vyskytuje trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*). Celkové zastínění plochy se blíží k 60 % (Weber 2016). Vodní plocha v některých letech zarůstá okřehkem (*Lemna sp.*), někdy poroste celou vodní plochu (Botorová 2018, Růžička 2018). Ve vodní ploše se nenalézá žádná rybí osádka. Vyskytuje se zde vodní ptactvo, zejména kachna divoká (*Anas platyrhynchos*). Jedním z dalších možných predátorů vyskytujících se na lokalitě je užovka obojková (*Natrix natrix*). Samotná nádrž se nachází na samém okraji obce, je však lemována zástavbou, která představuje problémy. Vzhledem k chybějícím dalším vhodným biotopům pro obojživelníky (Růžička 2018). Z ostatních druhů obojživelníků, kromě kuňky obecné (*Bombina bombina*), zde byl potvrzen výskyt žab rosničky zelené (*Hyla arborea*), skokana štíhlého (*Rana dalmatina*), ropuchy obecné (*Bufo bufo*) a ropuchy zelené (*Bufo viridis*) a z ocasatých zde žijí čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*), čolek velký (*Triturus cristatus*) a čolek horský (*Ichthyosaura alpestris*).



Obr. 6 - Mapa lokality Tověř s vyznačenou vodní plochou.

Druhá lokalita rybník Černý Nadýmač se nachází 1,5 km od malé obce Vlčí Habřina a severně od města Přelouč. Rybník je součástí EVL Černý Nadýmač. Vodní plocha rybníka je cca 13 ha, tento rybník patří do skupiny Bohdanečských rybníků a je napájen Opatovickým kanálem. Rybník se nachází uprostřed lesa, ve kterém se nachází i spousta různých tůňek, takže se dá říci, že je v okolí dostatek dalších možných úkrytů. Dominantou této vodní plochy je významná makrofytní vegetace přirozeně eutrofních a mezotrofních vod s bohatým výsketem rdesna obojživelného (*Persicaria amphibia*) a stolítku klasnatého (*Myriophyllum spicatum*). Díky hospodaření se zde, při letnění rybníku, vytváří vegetace s rozsáhlým výskytem evropsky významné travičky puchýřky útlé (*Coleanthus subtilis*) a dalších významných druhů, jako je např. ostřice šáchorovitá (*Carex bohemica*) nebo blatěnka vodní (*Limosella aquatica*). Rybník je využíván k polointenzivnímu chovu ryb, a to jakož násadový rybník. Z ryb se zde tedy vyskytuje hlavně kapr obecný (*Cyprinus carpio*), méně početné jsou zde druhy jako amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*), štika obecná (*Esox lucius*) nebo sumec velký (*Silurus glanis*). Mezi možné predátory obojživelníků vyskytujících se na lokalitě patří čejka chocholatá (*Charadrius dubius*), volavka bílá (*Ardea alba*) či volavka popelavá (*Ardea cinerea*). Kromě výskytu kuňky obecné (*Bombina bombina*) se zde nalézají i populace ropuchy

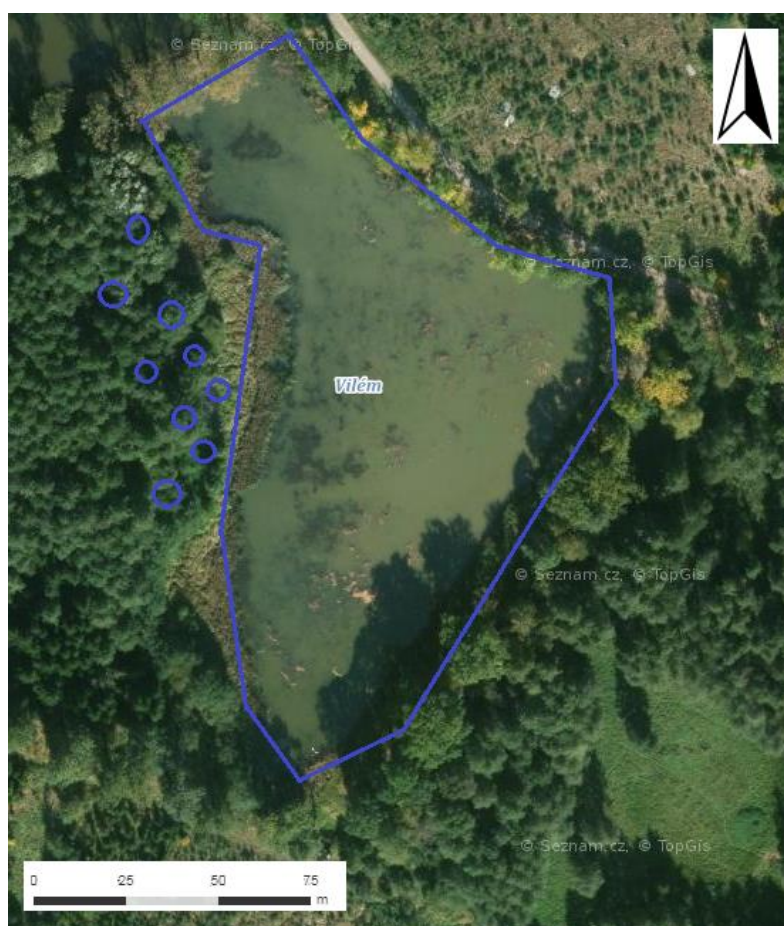
obecné (*Bufo bufo*), skokana zeleného (*Pelophylax esculentus*), skokana krátkonohého (*Pelophylax lessonae*) a skokana skřehotavého (*Pelophylax ridibundus*).



Obr. 7 - Mapa rybníku Černý Nadýmač s vyznačenou vodní plochou.

Jako třetí lokalita byly zvoleny tůně u rybníku Vilém, který se nachází v EVL Kochánovické rybníky a tůně. EVL se nachází jižně od města Chrudim. Vodní plocha rybníku činí 1,44 ha. Nad rybníkem se nachází 9 tůní, jsou průtočné i neprůtočné. Jednotlivé tůně se liší velikostí (od několika m² až cca po 110 m²), hloubkou i sklonem svahů, úrovní zazemnění apod. Některé tůně dokonce během roku zcela vysychají v závislosti na úhrnu srážek, v některých zůstává voda jen v nejhlubších místech. Vegetace je spíše sporadická, často se jedná o ponořené rostliny terestrických mokřadních ekosystémů (např. svízel bahenní (*Galium palustre*), které obklopují tůně v úzkých lemech na březích. Nejčastěji se setkáme s chrasticí rákosovitou (*Phalaris arundinacea*), orobincem širokolistým (*Typha latifolia*), ostřicemi (*Carex sp.*), okřehky (*Lemna sp.*) a dalšími. Tůně, které se nacházejí přímo v olšině jsou silněji zastíněné, leckdy se sporadickou vegetací, obojživelníci zde využívají k úkrytu listí spadané do tůní (Růžička 2015). V rybníce Vilém se chovají převážně ryby, jako jsou kapr obecný

(*Cyprinus carpio*), lín obecný (*Tinca tinca*) a štika obecná (*Esox lucius*). V samotných tůních žádná rybí obsádka nebyla nalezena. Z možných predátorů se zde vyskytuje užovka obojková (*Natrix natrix*). Z počátku tůně sloužily spíše jako stanoviště čerstvě metamorfovaných mladých žabek, avšak v posledních letech, kvůli jarnímu vypouštění rybníku, kdy vodní hladina nedosahuje do litorálních porostů, se kuňky začaly rozmnožovat pravidelně i v tůních. Z obojživelníků se zde vyskytují druhy jako je kuňka obecná (*Bombina bombina*), ropucha obecná (*Bufo bufo*), rosnička zelená (*Hyla arborea*), skokan hnědý (*Rana temporaria*), skokan skřehotavý (*Pelophylax ridibundu*), skokan štíhlý (*Rana dalmatina*), skokan zelený (*Pelophylax esculentus*), čolek horský (*Ichthyosaura alpestris*), čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*) a čolek velký (*Triturus cristatus*). Samotná populace kuňky na lokalitě stále roste (Růžička 2015).



Obr. 8 - Mapa rybníku Vilém s vyznačenou vodní plochou a tůněmi.

3.2. Odchyt jedinců

Odchyty jedinců kuňky obecné na retenční nádrži v Tovéři probíhaly v období od 1.5. do 30.7.2019. V roce 2020 zde probíhaly v dubnu, avšak protože nebyl žádný jedinec odchycen, byly odchyty rozšířeny o další dvě lokality, a to o rybník Černý Nadýmač a tůň u rybníka Vilém, zde probíhaly odchyty od 1.4. do 30.5.2020.

Odchyty jedinců byly prováděny podběrákem, podle velikosti a hloubky vodní plochy byly lokality proloveny buď ze břehu nebo bylo třeba nádrži projít. Velikost ok podběráku má být volena s ohledem na rozměr chytaných zvířat. Pro dospělé žab stačí síť o velikosti ok 5–10 mm. Vhodný je podběrák s pevnou rukojetí i obručí, nejlépe z kovu a pevně přichycenou k násadě (Vojar 2007). Nejdříve bylo potřeba prolovit celou lokalitu, tak aby nedocházelo ke zpětným odchytům, které by zbytečně stresovaly jedince. Každý chycený jedinec byl tedy ukládán do plastového kbelíku. Po prolovení celé lokality byli jednotliví odchycení jedinci změřeni posuvným měřítkem od hlavy po konec těla, následně bylo určeno pohlaví. Pohlavní dimorfismus u kuňky obecné lze odlišit podle zrohovatělých plošek pokožky na předních končetinách samců (Baruš et al. 1992, Moravec 1999). Tyto plošky nalezneme na svrchní straně prvních třech prstů. Nakonec byly každému jedinci ustříženy poslední dva články druhého prstu na pravé zadní noze tak, aby se mohla použít metoda skeletochronologie (viz. níže). Takto získaný prst byl následně vložen do ependorfky se 70 % ethanolem. Následně byl jedinec vypuštěn zpátky na lokalitu.

3.3. Skeletochronologie

Tkáň jednotlivých vzorků musela být nejprve dekalciifikována v roztoku 5% kyseliny dusičné po dobu 30 minut, následně vyprané vodou. Poté musely být vzorky odvodněné pomocí alkoholové řady a to v 70% a 80% ethanolu po dobu 1 hodiny a 96% ethanolu po dobu 24 hodin (Kopecký et al. 2009, Guarino et al. 2019). Následně byly jednotlivé vzorky zality do parafinových bloků. Takto připravené parafinové bloky s kostmi byly připevněny na dřevěnou kostku. Fixace na dřevěnou kostku byla provedena, kvůli lepšímu přichycení při samotném řezání na mikrotomu. Na sáňkovém mikrotomu poté byly provedeny sériové řezy po jednotlivých tloušťkách 12 μm . K odparafinování byl použit roti-histol na bázi limonenu ve kterém byly jednotlivé preparáty uloženy

30 minut. Následně byly vzorky vloženy do 96% a 70% ethanolu ponechány 15 minut a závěrečný krok k odparafinování vzorků, byl ten, že vzorky byly promyty destilovanou vodou po dobu 15 minut. Barvení proběhlo pomocí hematoxylin-eosin barvicího kytu. Na začátku byly preparáty dány do prvního barviva na dobu 6 minut, poté byly promyty vodou na 10 sekund. Následně byly vloženy do 0,1% kyseliny chlorovodíkové na dalších 10 sekund. Následovalo promytí pod tekoucí vodou po dobu 6 min a inkubování do druhého roztoku barviva na 30 sekund. Poslední krok byl propláchnutí vodou po dobu 30 sekund.

Takto připravené jednotlivé vzorky na krycích sklíčkách byly následně připraveny ke zkoumání pod mikroskopem Olympus CHK2-F-GS.

3.4. Statistické zpracování

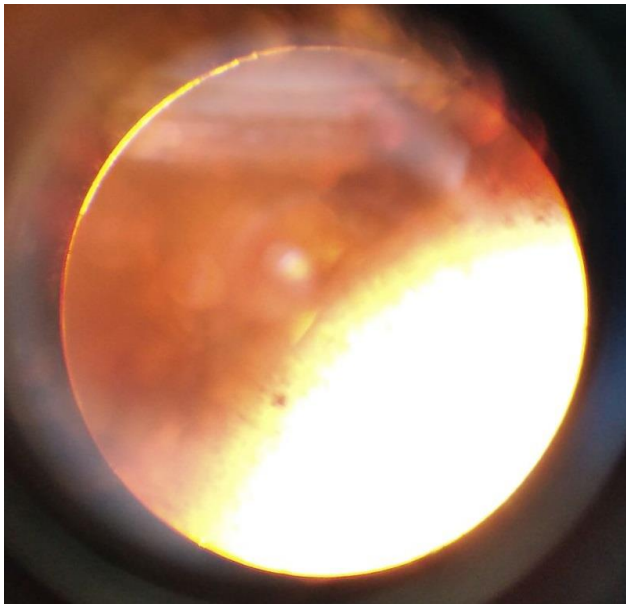
Deskriptivní statistické zpracování proběhlo v programu R 4.0.2 a grafické výstupy byly zpracovány v programu microsoft office excel 365.

4. Výsledky

4.1. Skeletochronologie

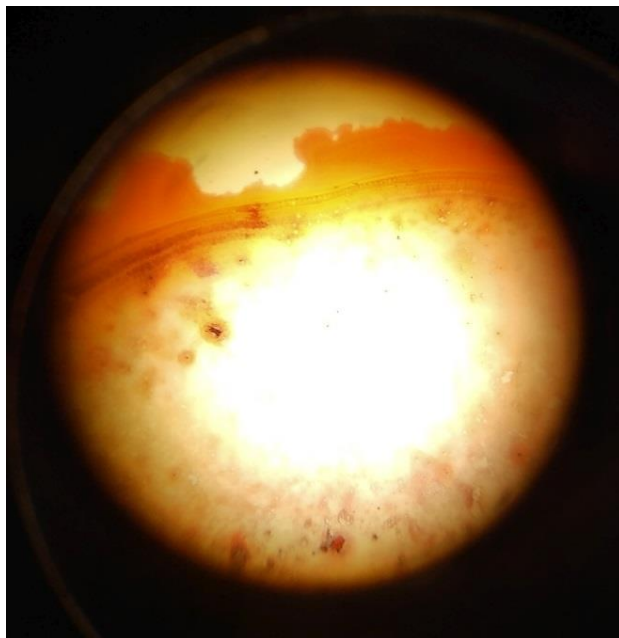
Každému odchycenému jedinci byly ustříženy dva poslední články prstu tak, aby se dala použít metoda skeletochronologie. Bylo tedy nasbíráno celkem 57 vzorků, které byly následně dekalifikovány, odvodněny a odbarveny (viz. metodika). Bohužel žádný z pokusů o analýzu věku pomocí skeletochronologie nevyšel. V mikroskopu nebylo buď viděno vůbec nic anebo pouze jednotlivé fragmenty kostí, ze kterých bohužel nebylo možné vyčíst možný věk.

Např. na této fotce je vidět, že kost není dostatečně obarvena a že řez není správně narovnan, proto se z tohoto vzorku nedá vyčíst vůbec nic (Obr. 9)



Obr. 9 - Nesprávně obarvený a seříznutý vzorek.

Na druhé fotce vidíme již kvalitnější vzorek, na kterém již jdou vidět čáry zastaveného růstu (LAG), avšak jelikož vzorek není správně narovnan a není úplně dokonale obarven, správný výsledek se ani zde nepovedlo zjistit (Obr. 10).

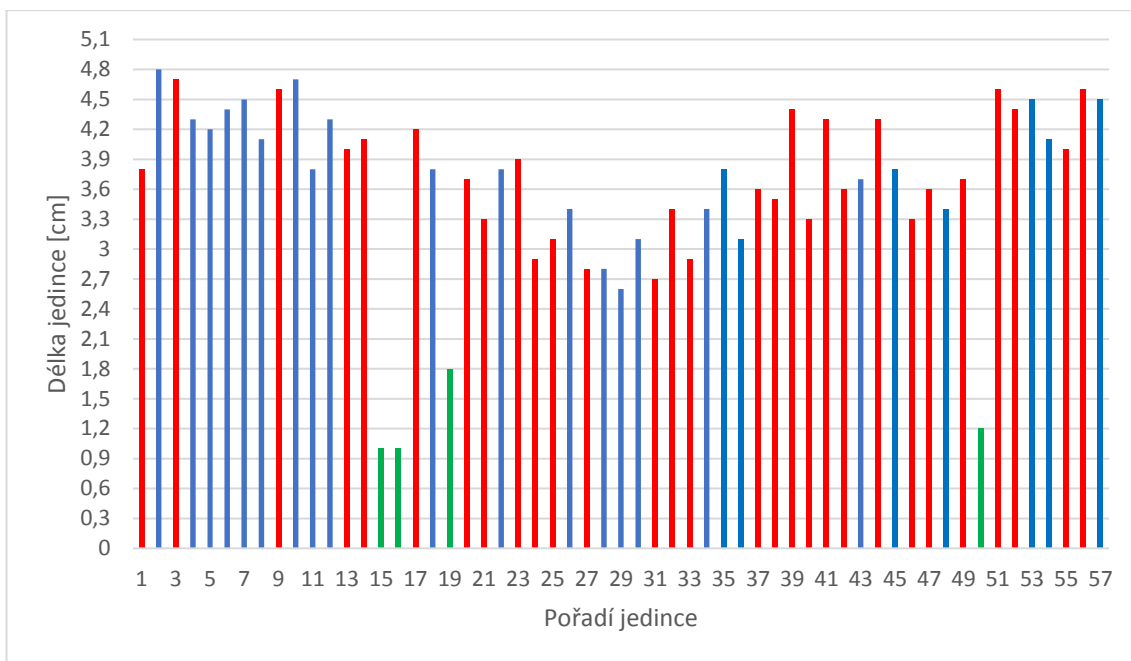


Obr. 10 – Částečně srolovaný vzorek a špatně udělaný řez.

4.2. Demografie

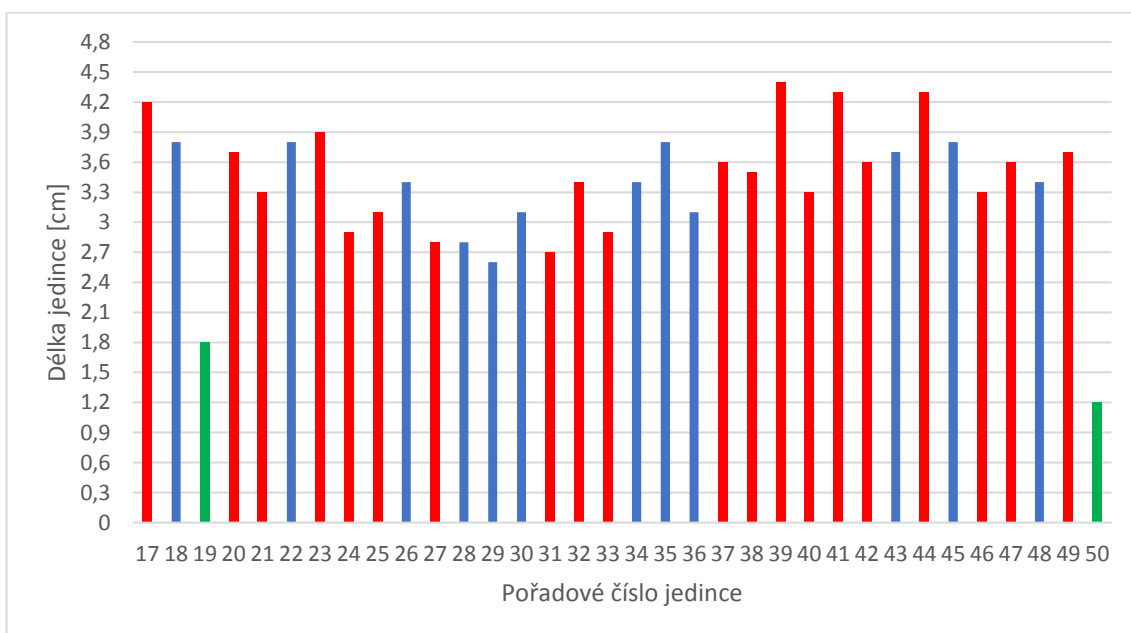
4.2.1. Velikosti těl odchycených jedinců

Celkem bylo chyceno 57 jedinců kuňky obecné (*Bombina bombina*) na všech 3 lokalitách. Nejvíce vzorků bylo z rybníku Černý Nadýmač, kde bylo odchyceno 34 jedinců. 16 jedinců bylo chyceno v Tověři a posledních 7 jedinců bylo získáno v tůních u rybníka Vilém. Každý jedinec byl změřen a následně byly tyto hodnoty vyneseny do grafu (Obr. 11). Celkově největším odchyceným jedincem byl samec s délkou těla 4,8 cm. Samice s největším naměřeným tělem měřila 4,7 cm. Oba tyto největší jedinci byli odchyceni na lokalitě v obci Tověř.



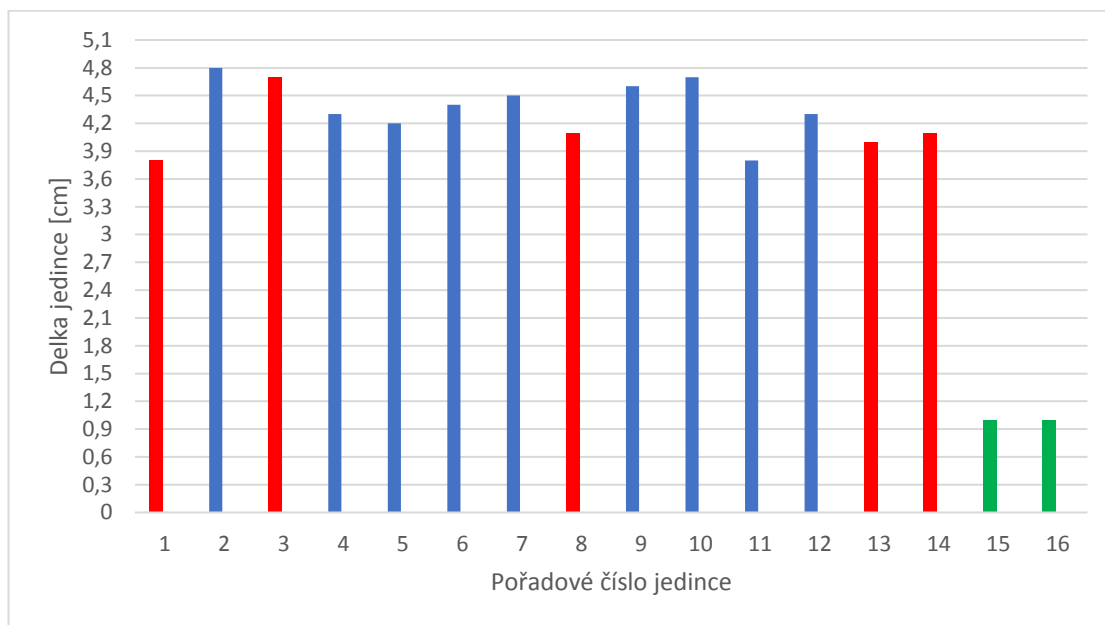
Obr. 11 - Všichni odchycení jedinci a jejich délky těla.

Na Černém Nadýmači bylo celkem chyceno 34 jedinců. Z toho bylo 20 samic (vyznačené na grafu červeně), 12 samců (modře) a 2 juvenilní jedinci (zeleně). Největší jedinec, který byl odchycen na této lokalitě, byla samice s délkou 4,4 cm (Obr. 12). Nejdelší chycený samec měl délku 3,8 cm. A největší juvenil měl 1,8 cm dlouhé tělo.



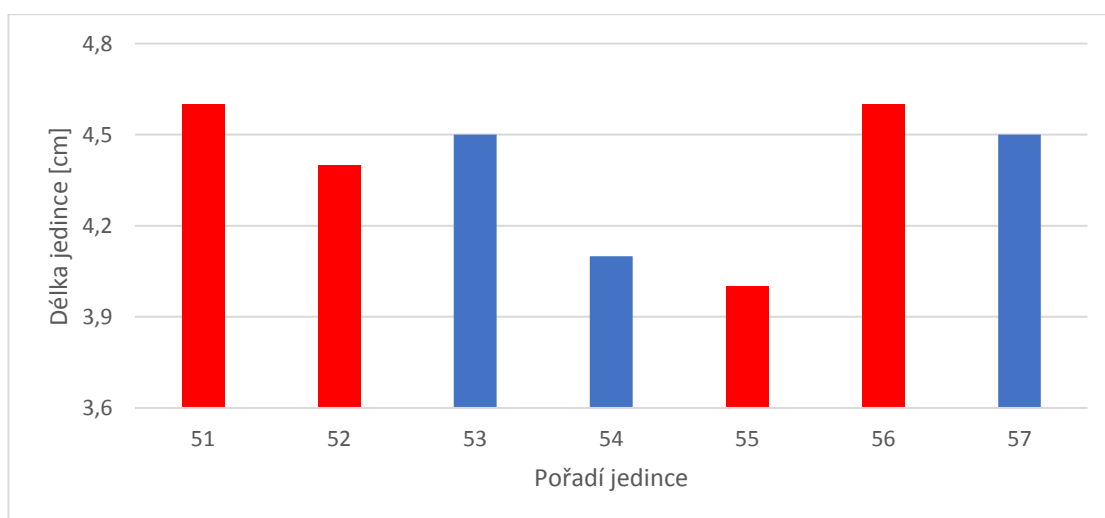
Obr. 12 - Jedinci odchyceni na rybníce Černý Nadýmač.

Na lokalitě v Tověři bylo celkem odchyceno 16 jedinců. Na této lokalitě bylo odchyceno celkem 9 samců, 5 samic a 2 juvenilové. Největší odchycený jedinec byl samec s délkou těla 4,8 cm. Největší samice měřila 4,7 cm a oba dva juvenilní jedinci měli 1 cm (Obr. 13).



Obr. 13 - Jedinci odchycení v Tověři.

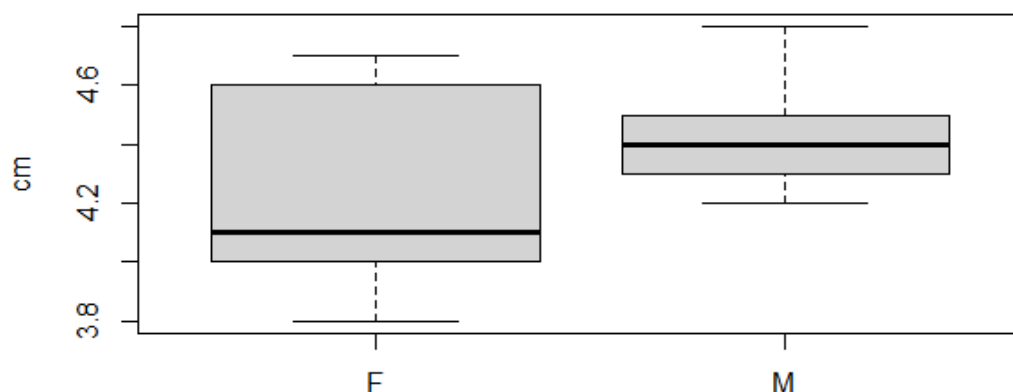
Na poslední lokalitě v tůních u rybníka Vilém bylo celkem chyceno 7 jedinců. Jednalo se o 4 samice a 3 samce, juvenilní jedinec zde nebyl chycen žádný. Největším odchyceným jedincem byla samice s délkou těla 4,6 cm. Nejdelší samec odchycený na této lokalitě měřil 4,5 cm (Obr. 14).



Obr. 14 - Jedinci odchycení v tůních u rybníka Vilém.

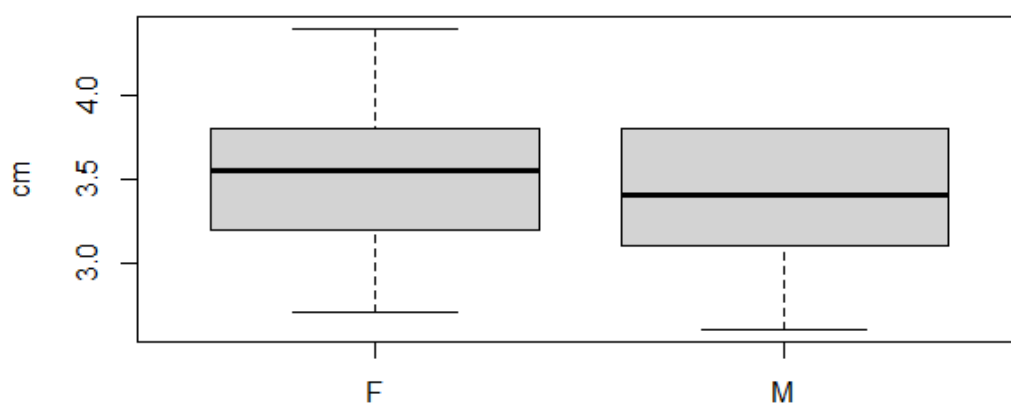
4.2.2. Porovnání velikosti těl samců a samic

Na lokalitě v Tovéři jsem porovnával velikosti těl samců (M) a samic (F), jak je vidět na obrázku č. 15. Také jsem provedl dvouvýběrový t-test. Výsledek testu je nesignifikantní (t-test; $\alpha = 0,05$; $t = 0.55741$; $df = 12$; $p\text{-value} = 0.5875$). Průměrná velikost samce je 4,35 cm a průměrná velikost samice je 4,24 cm na této lokalitě.



Obr. 15 - Porovnání délky těl samců a samic v Tovéři.

Na lokalitě Černý Nadýmač byli také porovnány velikosti těl samců (M) a samic (F; Obr. 16). Zde jsem také provedl dvouvýběrový t-test. Výsledek testu je signifikantní (t-test; $\alpha = 0,05$; $t = -0.76212$; $df = 30$; $p\text{-value} = 0.4519$). Průměrná velikost odchycených samců je 3,39 cm a průměrná velikost odchycených samic je 3,52 cm.

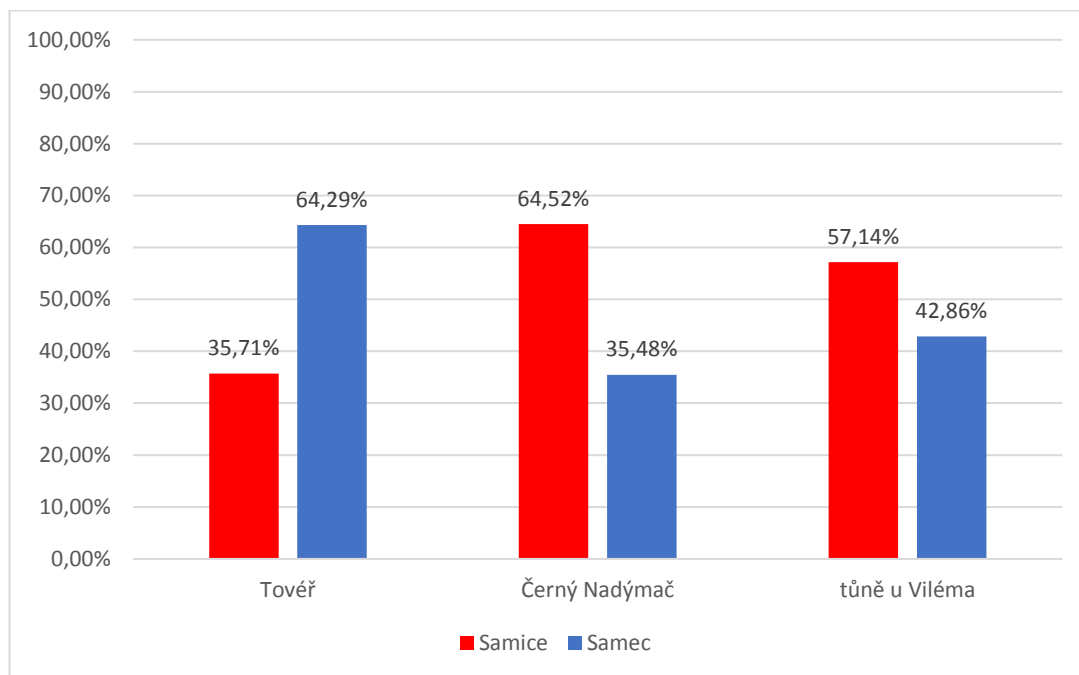


Obr. 16 - Porovnání délky těl samců a samic na Černém Nadýmači.

Na lokalitě v tůních u Viléma toto porovnání nebylo provedeno z důvodu příliš malého datasetu.

4.2.3. Poměr pohlaví

V Tověři byl poměr pohlaví 9/5 v prospěch samců. Na lokalitě Černý Nadýmač bylo odchyceno více samic, a to v poměru 20/11. V tůních u rybníku Vilém byl poměr pohlaví 4/3 ve prospěch samic.



Obr. 17 - Poměr pohlaví na jednotlivých lokalitách.

5. Diskuse

5.1. Skeletochronologie

Důvodů neúspěšné skeletochronologie může být více a zřejmě zde byla i možná kombinace těchto faktorů. První z důvodů může být, že parafín byl starší, a ne již tak kvalitní a při míchání se objevily bubliny, které znemožňovaly pozorování pod mikroskopem a případné určení věku. Druhý důvod může být, že byla zvolena ne příliš dobrá metodika. Například to, že by mohly být vzorky špatně uchovány z důvodu použití špatné chemikálie i když autoři jako Guarino (2011) a Kopecký et al. (2009), používají 70% ethanol, avšak někteří autoři používají 10% neutrálně pufrovaný formalin (Kyle et al. 2015, Yan et al. 2013). Problémem by také mohlo být, že při dekalifikaci nebylo použito žádné fixační médium, i když autoři jako Guarino (2011) a Kopecký et al. (2009), žádné fixační médium neuvádí. Ale například Sinsch (2015) uvádí, že je dobré použít na fixaci například Bouinovu fixační tekutinu, tak aby se vzorky následně lépe obarvily. Nebo také jednotlivé vzorky mohly být v kyselině dusičné delší dobu, tak aby dekalifikace proběhla lépe. Např. Wen (2010) nechával v 5% kyselině dusičné až 48 hodin, avšak to je extrém. Ostatní jako Piñeiro (2019), Ufuk (2018) nechávali v 5 % kyselině dusičné až 3 hodiny. Někteří autoři (Guarino 2019) nechávají jednotlivé články prstů v kyselině dusičné „jen“ 1,5 hodiny, což se stále velmi liší od námi zvolených 30 minut. Ale tento krátký čas byl zvolen z toho důvodu, že se jednalo o malé vzorky a byla zde obava z úplného rozpuštění kosti. Také se používá k dekalifikaci i 15 % kyselina mravenčí (Jeckel et al. 2015) na dobu 24-96 hodin, podle velikosti vzorků. Bohužel jsme neměli dostatek času, abychom zkusili všechny možnosti a zjistili, která metodika by byla úspěšnější oproti té námi zvolené. Jeden z dalších důvodů může být, to že nůž u mikrotonu nebyl dostatečně ostrý, jelikož je již dlouho používán. Byl zřejmě otupen a kosti při řezání na jednotlivé vzorky spíše praskaly, než by byly rozříznuty na jednotlivé příčné řezy. To následně znemožnilo identifikaci správného věku jedince, jelikož byly vidět pouze fragmenty kostí, nikoliv celý příčný řez. Další možný důvod neúspěchu skeletochronologie je ne příliš dokonalá manipulace při odparafinování a obarvování vzorků. U některých vzorků se stalo, že během práce v laboratoři, z důvodu mé malé zkušenosti, sjely některé řezy z krycího sklíčka, a proto byl znemožněn jakýkoliv pokus o následné zjištění věku jedince. Jedna z dalších

možných příčin, proč se skeletochronologie nepovedla, může být nedostatečné zastřížení prstů. Zjišťování věku by mělo být pomocí nejproximálnější části těla (Kopecký et al. 2009). Je potřeba použít část prstu, kde je kost nejširší a středová dutina nejúžší. Pokud tomu tak není a jsou použity pouze krátké špičky prstů, nemůže tak dojít ke správnému určení věku, protože nejsou správně vidět všechny LAG (Sinsch 2015). Takže je možné, že mnou zvolený druhý prst na zadní končetině nebyl příliš vhodný a hlavně, že ustřížení dvou článků prstů není dostatečné. Avšak větší části jsem stříhat nechtěl, protože jsem měl obavy ze zbytečně velkého traumatu pro jedince.

Žádné pilotní průzkumy na vyzkoušení správné metodiky nebyly bohužel z časových důvodů možné. Jelikož v roce 2020 byl po většinu jarního období znemožněn vstup do laboratoří z důvodu koronaviru a s tím spojeného vyhlášení nouzového stavu. Z tohoto důvodu jsem byl nucen v této studii vsadit na jednu metodiku, která, jak se bohužel ukázalo, nebyla příliš vhodná. V budoucnu bych určitě doporučil lépe si práci v laboratoři připravit a na zkušebních vzorcích si ověřit funkčnost metodiky a nacvičit laboratorní postupy.

5.2. Velikost těla a početnost na lokalitách

Naměřené velikosti těl jedinců se mezi lokalitami liší. Na lokalitě v Tovéři byli v průměru chyceni větší jedinci než na Černém Nadýmači. Samci v Tovéři byli průměrně větší o 0,96 cm a samice o 0,72 cm. V tůních u rybníka Vilém byly odchyceny průměrně největší jedinci, avšak na této lokalitě bylo odchyceno extrémně málo jedinců, aby se z těchto dat dal dělat nějaký závěr. Rozdíly v naměřených délkách jedinců mezi jednotlivými lokalitami mohou být zapříčiněny nejspíše příliš malým počtem odchycených jedinců. Protože se na lokalitách nepovedlo odchytit dostatečně velkou část populace. Pokud tyto počty srovnáme s předchozími odhady populací, jako například Růžička (2015), který během sezóny 2012 v rybníce Vilém a v tůních kolem, odhadl populaci na 300–500 dospělých jedinců. A v Tovéři Růžička (2018) odhadl celkový počet vyskytujících se jedinců na 527. Vidíme, že se v této práci jedná pouze o malý zlomek odchycené populace z celkové. Na lokalitě Černý Nadýmač se mi bohužel nepovedlo dohledat odhady početnosti populace z předchozích let, avšak můžu odhadovat, že i zde byl počet odchycených jedinců pouhým zlomkem celkové populace tohoto druhu. Naměřené délky těl se shodují s Baruš et al. (1992) a Nečas et al. (1997), kteří uvádějí,

že délka trupu jsou obvykle do 5 cm a většinou se délka těl pohybuje kolem 3-5 cm u samců a 2,7 – 5,2 cm u samic. Cogălniceanu a Miaud (2003), kteří prováděli průzkum v Rumunsku, uvádějí rozptyl délky těla u samců 3,03 – 4,0 cm a u samic 3,05 – 4,1. Což se shoduje i s Bülbül et al. (2018), který prováděl průzkum v Turecku a uvádí délku těla u samců 2,83 – 4,44 a u samic 3,01 - 3,8. Avšak Fog z Dánska (1996) a Rafińska (1991) v Polsku uvedli jedince o mnoho větší. Maximální velikost byla zaznamenána v Dánsku u samice s velikostí 5 cm. A samice v Polsku měly průměrnou velikost 4,71 cm. U žab se očekává, že se velikost těla zvýší v chladnějších oblastech, což nepřímo souvisí s klimatickými faktory (tj. teplem a slunečním světlem), které přímo upravují individuální termoregulaci (Hutchinson a Dupre, 1992).

Mezi naměřenými velikostmi těla obou pohlaví v této studii na jednotlivých lokalitách nebyly zjištěny žádné podstatné rozdíly. Což se shoduje i s literaturou (Baruš et al. 1992) a s výsledky ze studií Cogălniceanu & Miaud (2003) a Bülbül et al. (2018), kde se uvádí, že se pohlaví jedinců nedá rozeznat podle délky těla, ale pouze podle tmavohnědých plošek zrohovatělé pokožky na předních končetinách samců.

6. Závěr

Celkem bylo v rámci této práce chyceno 57 jedinců kuňky obecné. Nejvíce odchycených jedinců bylo na lokalitě Černý Nadýmač a to 34 jedinců, v Tovéři bylo 16 jedinců a v tůních u rybníka Vilém bylo odchyceno 7 jedinců. Zřejmě se jedná pouze o malou část odchycených jedinců z celkových populací. Z výsledků této práce vyplývá, že délky těla dospělých jedinců kuňky obecné (*Bombina bombina*) se pohybují mezi 2,6 - 4,8 cm v závislosti na lokalitě. Na jednotlivých lokalitách byly odchyceni jedinci s různými délkami těl. Na lokalitě v Tovéři byli v průměru chyceni větší jedinci než na Černém Nadýmači. Samci v Tovéři byli průměrně větší o 0,96 cm a samice o 0,72 cm. V tůních u rybníka Vilém byly odchyceni průměrně největší jedinci, avšak na této lokalitě bylo odchyceno extrémně málo jedinců. Rozdíly v délkách těla mezi pohlavími jsem nezjistil, což se plně shoduje s literaturou. Určení věku jedinců pomocí skeletochronologie, bohužel nebylo úspěšné z důvodu špatně zvládnuté metodiky a dalším problémům v laboratoři. A celkovému časovému tlaku, který byl způsoben hlavně vládními opatřeními, kvůli epidemii koronaviru. Takže bohužel žádné závislosti mezi délkou těla a věkem jsem nezjistil, stejně tak jako možné rozdíly v délce života samců a samic.

Pro případné možné budoucí studie pomocí skeletochronologie bych doporučoval pořádně si prostudovat literaturu s metodikou a například nechat delší dobu jednotlivé vzorky dekalifikovat nebo použít fixační médium. Také bych doporučil si zkusit pilotní pokusy. Tak aby se poté neobjevily problémy při následném výzkumu.

7. Zdroje:

Alford R. A. & Richards S. J. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 133–165.

Alcobendas M., Castanet J., 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: Interactions between internal and external factors. *Herpetologica* 56, 14–26.

Arikan H., Çiçek K., 2014. Haematology of amphibians and reptiles: A review. *North West J Zool.* 10(1):190–209.

Baláž V, Balážová A & Haleš J. 2009. Epidemická nemoc obojživelníků už i v ČR. In: Bryja J, Řehák Z, Zukal J (eds.). *Zoologické dny Brno. 2009. Sborník abstraktů z konference. Ústav biologie obratlovců AV ČR.* p. 25.

Baruš V. & Oliva O. 1992. *Fauna ČSFR. Obojživelníci – Amphibia.* Academia, Praha 340 pp.

Beebee TJC, 1997. Changes in dewponds numbers and amphibian diversity over 20 years on chalk downland in Sussex, England. *Biological Conservation.* 81:215-219

Botorová M. 2018. Efektivita živolovných pastí pro odchyt čolka velkého (*Triturus cristatus*). Bakalářská práce. Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 49 pp.

Bruce R. C., Castanet J., and Francillon-Viellot H., 2002. Skeletochronological analysis of variation in age structure, body size, and life history in three species of desmognathine salamanders. *Herpetologica.*, 58(2): 181–193.

Bülbül U., Erođlu A. Ý., Kurnaz M., Kaya Z. M., Koç H., Erođlu S. A., 2018. Age structure and some growth parameters in population of *Bombina bombina* (L., 1761) from Turkey. *Russian Journal of Herpetology* Vol. 25, No. 3, pp. 221-226.

Castanet J., Smirina E., 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles*, 13. ser. Zoologie 11, 191– 196.

- Castanet J., Francillon-Vieillot H., Meunier F. J., de Ricqlès A., 1993. Bone and individual aging. In: Bone growth. B.K. Hall (ed.). Boca Raton, CRC Press. 7, 245–283.
- Civiš P, Vojar J & Baláž V. 2010. Chytridiomykóza – hrozba pro naše obojživelníky? *Ochrana přírody*. 4:18-20.
- Cogălniceanu D., Miaud C., 2003. Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Can. J. Zool.* 81: 1096–1106
- DeGarady C. J., Halbrook R. S., 2006. Using anurans as bioindicators of PCB contaminated streams. *Journal of Herpetology* 40: 127–130.
- Denton J. S., Beebee T. J. C., 1993. Density related features of natterjack toad (*Bufo calamita*) populations in Britain. *Journal of Zoology* 229, 105–119.
- Dolmen D., 1981. Local migration, rheotaxis, and philopatry by *Triturus vulgaris* within a locality in central Norway. - *British J. Herpetol.* 6: 151-158
- Donnelly M. A., Guyer C., Juterbock E. J., Alford R. A., 1994. Techniques for Marking Amphibians. Techniques for marking amphibians. In Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmind R.W., Hayek L.C., Foster M.S., (1994): *Measuring and Monitoring biological diversity: standart methods for amphibians*, 275-276, Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA.
- Dwek R. J., 2010. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol.* 2010 Apr; 39(4): 319–323.
- Eden C. S., Whiteman H. H., Duobinis-Gray, L., Wissinger S.A., 2007. Accuracy assessment of skeletochronology in the Arizona tiger salamander (*Ambystoma tigrinum nebulosum*). *Copeia* 2007, 471–477.
- Fog K., 1996. “*Bombina bombina* in Dänemark: Verbreitung, Bestandssituation und Lebensweise. In Die Rotbauchunke (*Bombina bombina*): Ökologie und Bestandssituation,” *Rana*, 1, 123 - 131.

- Francillon-Viellet H., De Buffrenil V., Castanet J., 1990. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. 471– 530. In: CARTER, J. G., Skeletal biomineralization. New York: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends.
- Gibbons M. M., McCarthy T. K., 1983. Age determination of frogs and toads (Amphibia, Anura) from Northwestern Europe. *Zoologica. Scripta* 12, 145–151.
- Große W. R., 1999. Altersbestimmung bei mitteleuropäischen Amphibien mittels Skeletochronologie am Beispiel der Kreuz, Erd und Wechselkröte (Anura, Bufonidae). *Elaphe* 7, 73–76.
- Guarino M. F., Andreone F., Angelini F., 1998. Growth and longevity by skeletochronological analysis in *Mantidactylus microtympanum*, a rain-forest anuran from southern Madagascar. *Copeia* 1998:194–198.
- Guarino M. F., Pous P., Crotini A., Mezzasalma M., Andreone F., 2011. Age structure and growth in a population of *Pelobates varaldii* from northwestern Morocco. *Amphibia-Reptilia* 32: 550-556
- Guarino M. F., Crotini A., Mezzasalma M., Randrianirina J. E., Andreone F., 2019. A skeletochronological estimate of age and growth in a large riparian frog from Madagascar. *Herpetozoa* 32: 39–44
- Halliday T. R., Tejedo M., 1995. Intrasexual selection and alternative mating behaviour. pp. 419–468. In: Heatwole, H., Sullivan, B.K. (eds.), *Amphibian Biology*, vol. II, Social Behaviour. Chipping Norton, Surrey Beatty.
- Hjernquist M. B., Söderman F., Jönsson K. I., Herczeg G., Laurila A., Merilä J., 2012. Seasonality determines patterns of growth and age structure over a geographic gradient in an ectothermic vertebrate. *Oecologia* 170, 641–649.
- Holicová T. 2012. Individuální značení a rozpoznávání obojživelníků. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 45 pp.
- Houlan J. E., Findlay C. S., Schmidt B. R., Meyer, A. H. & Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755.

- Chobot K. & Němec M., 2017. Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Obratlovci. Příroda, Praha. 34:1–182.
- Jeckel A., Saporito R. & Grant T., 2015. The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Frontiers in Zoology* 12:27
- Jeřábková L. 2011. Obojživelníci a plazi: Metodika mapování. AOPK ČR. 4 pp.
- Kleinenberg S. E., Smirina E. W., 1969. A contribution to the method of age determination in amphibians. *Zoologichesky Zhurnal* 48, 1090–1094.
- Kopecký O., Makovický P., Vojar J., 2009. Věková struktura populace čolka horského (*Mesotriton alpestris*) rozmnožující se v malých periodických nádržích. *Příroda, Praha*, 28: 61-70
- Kyek M., Maletzky A., 2006. Atlas und Rote Liste der Amphibien und Reptilien Salzburgs. Stand Dezember 2005. *Naturschutz-Beit.*, 33: 1-240.
- Kyle G., NEWMAN R., Pulis E., CABARLE K., 2015. A Skeletochronological Assessment of Age–Parasitism Relationships in Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Journal of Herpetology*, Vol. 49, No. 1, 122–130
- Leskovar C., Oromi N., Sanuy D., Sinsch U., 2006. Demographic life history traits of reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*) vary between northern and southern latitudes. *Amphibia-Reptilia* 27, 365–375.
- Loman J., 1978. Growth of brown frogs *Rana arvalis* Nilsson and *R. temporaria* L. in south Sweden. *Ekologia Polska* 26, 287–296.
- Maštera J., Zavadil V. & Dvořák J. 2015 Vajíčka a larvy obojživelníků České republiky. Academia 180 pp.
- Makovický P., Kopecký O., Makovický P., Matlach R., 2015. The Using of Skeletochronology as a Screening Method for Age Determination of Alpine Newts (*Mesotriton Alpestris*): a Technical Report. *Acta universitatis agriculturæ et silviculturæ Mendelianæ Brunensis* Volume 63 Number 3.

- Marunouchi J., Ueda H., Ochi O., 2000. Variation in age and size among breeding populations at different altitudes in the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*. *Amphibia-Reptilia* 21: 381–396.
- Moravec J., 1999. Svět zvířat VII – Obojživelníci, plazi. Albatros Praha 183 pp.
- Morrison C., Hero J. M., 2003. Geographic variation in lifehistory characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology* 72, 270–279.
- Morrison C., Hero J. M., Browning J., 2004. Altitudinal variation in the age at maturity, longevity, and reproductive lifespan of anurans in subtropical Queensland. *Herpetologica* 60, 34–44.
- Nečas P., Modrý D., Zavadil V., 1997. Czech recent and Fossil Amphibians and Reptiles, Chimaira.
- Nemnich S., Kissel G., Sinsch U., 1995. Skeletochronological assessment of the age structure of a treefrog population (*Hyla arborea*) in western Germany. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 88, 43.
- Nyström P., Hansson J., Månsson J., Sundstedt M., Reslow C. & Broström A. 2007. A documented amphibian decline over 40 years: Possible causes and implications for species recovery. *Biological Conservation*. 138(3-4):399.411.
- Oertli B., Auderset D. J., Catella E., Juge R., Lehmann A., Lachavanne J. B., 2005. PLOCH a standardized method for sampling and assesing the biodiversity in ponds. *Wiley Inter Science* 15: 665–679.
- Oromi N., Sanuy D., Sinsch U., 2012. Altitudinal variation of demographic life-history traits does not mimic latitudinal variation in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Zoology* 115, 30–37.
- Patrelle C, Hjernquist M. B., Laurila A., Söderman F., Merilä J., 2012. Sex differences in age structure, growth rate and body size of common frogs *Rana temporaria* in the subarctic. *Polar Biology* 35, 1505–1513.

Piñeiro J. M., Cajade R., Curtis A., Ingaramo M. R., Marangoni F., 2019. Chronology of the LAGs formation and body growth in *Argenteohyla siemersi* from northeastern Argentina. North-Western Journal of zoology 15 (2): 152-156.

Rafińska A., 1991. Reproductive biology of the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae): egg size, clutch size and larval period length differences, Biol. J. Linn. Soc., 43, 197 - 210.

Red list: Guiding conservation for 50 years [Internet]. The IUCN Red list of threatened species. Version 2017-3. IUCN. Dostupné z <<http://www.iucnredlist.org>>.

Rozenblut B, Ogielska A, 2005. Development and Growth of Long Bones in European Water Frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), With Remarks on Age Determination. Journal of morphology 265:304–317

Růžička M., 2015. Vodní plochy v CHKO Železné hory a jejich obojživelníci. Centrum ochrany přírody a Východočeské muzeum v Pardubicích. Pardubice.

Růžička J., 2018. Migrační charakteristiky a stanovení základních demografických parametrů u vybraných druhů žab. Bakalářská práce. Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 49 pp.

Senning W.C., 1940. A study of age determination and growth of *Necturus maculosus* based on parasphenoid bone. American Journal of Anatomy 66, 483–495.

Schnäbele H., 1987. Grundlagen der Altersbestimmung durch Skeletochronologie bei Kreuzkröten (*Bufo calamita*) und Wechselkröten (*Bufo viridis*). Ein Beitrag zum Schutz bedrohter Tierarten. Beihefte Veröffentlichungen Naturschutz Landschaftspflege Baden Württemberg 41, 485–497

Schroeder E. E., Baskett T. E., 1968. Age estimation, growth rates and population structure in Missouri bullfrogs. Copeia, 538–592.

Sinsch U., Lehmann H., Geiger A., 2006. Zur potenziellen und realisierten Lebenserwartung von Kreuzkröten (*Bufo calamita*). Zeitschrift für Feldherpetologie 13, 101–112.

- Sinsch U., Leskovar C., Drobig A., König A., Grosse W. R., 2007b. Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Canadian Journal of Zoology* 85, 665–673.
- Sinsch U., Marangoni F., Leskovar C., Tejedo M., 2010. Proximate mechanisms determining size variability in natterjack toads. *Journal of Zoology* 281, 272–281.
- Sinsch U., 2015. Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *The Herpetological Journal* Volume 25, 5–13.
- Smirina E. M., 1972a. Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zoologicheskyy Zhurnal* 51, 1529–1534.
- Smirina E. M., Roček Z., 1976. On the possibility of using annual bone layers of alpine newts *Triturus alpestris* (Amphibia: Urodela), for their age determination. - *Věst. Čs. Spol. Zool.* 3: 232–237.
- Smirina E. M., Klevezal G. A., Berger L., 1986. Experimental investigation of the annual layer formation in bones of amphibians. *Zoologicheskyy Zhurnal* 65, 1526–1534.
- Smirina E. M., 1994. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology* 40, 133–146.
- Socha M., Ogielska M., 2010. Age structure, size and growth rate of water frogs from central European natural *Pelophylax ridibundus* – *Pelophylax esculentus* mixed populations estimated by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia* 31, 239–250.
- Tkadlec E., Losík J., 2013. *Základní metody populační ekologie*. Olomouc: Univerzita Palackého 99pp.
- Vojar J., 2007. *Ochrana obojživelníků: ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana*. Doplněk k metodice č.1 ČSOP. První vydání. Praha: Český svaz ochránců přírody - ZO ČSOP Hasina Louny. 155 pp.
- Wagner A., Schabetsberger R., Sztatecsny M., Kaiser R., 2011. Skeletochronology of phalanges underestimates the true age of long-lived Alpine newts (*Ichthyosaura alpestris*). *Herpetological Journal* 21, 145–148.

Weber L. 2016. Srovnání trofického spektra druhů *Triturus cristatus*, *Lissotriton vulgaris* a *Ichtyosaura alpestris* na lokalitách s rozdílnou nadmořskou výškou a stanovení velikosti populace *T. cristatus*. Diplomová práce. Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 67 pp.

Weddelling K., Hachtel M., Sander U., Tarkhnishvili D., 2004. Bias estimation of newt population size: a field study at five ponds using drift fence, pitfalls and funnel traps. *Herpetol. J.* 14: 1-7.

Welsh, H. H. & Ollivier, L. M. (1998): Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's redwoods. *Ecological Applications* 8: 1118–1132.

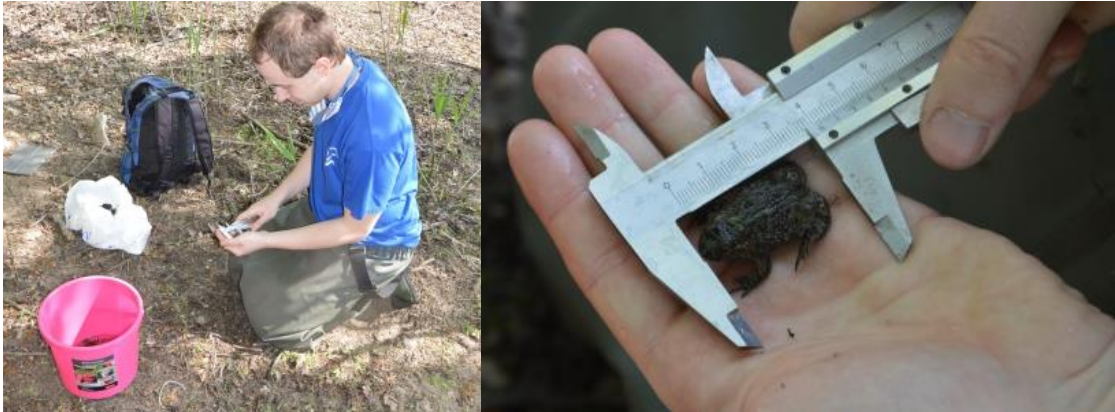
Yan H., Zhu Q. H., Liao M. Y., Jin L., Liao B. W., 2013. Age and body size of the toad *Bombina moximo* in a subtropical high-altitude population. *Herpetological Volume* 23, 229-232.

Zavadil V, Sádlo J, Vojar J, Fischer D, Šimonek J, Rozínek R, Mařík J, Smutný Z & Kautman J. 2011. Biotopy našich obojživelníků a jejich management: Metodika AOPK ČR. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. 178 pp.

Zhang L., Lu X., 2012. Amphibians live longer at higher altitudes but not at higher latitudes. *Biological Journal of the Linnean Society* 106, 623–632.

Zwach, I. 2013. Obojživelníci a plazi České republiky. Grada Publishing, Praha. 344 pp

8. Přílohy



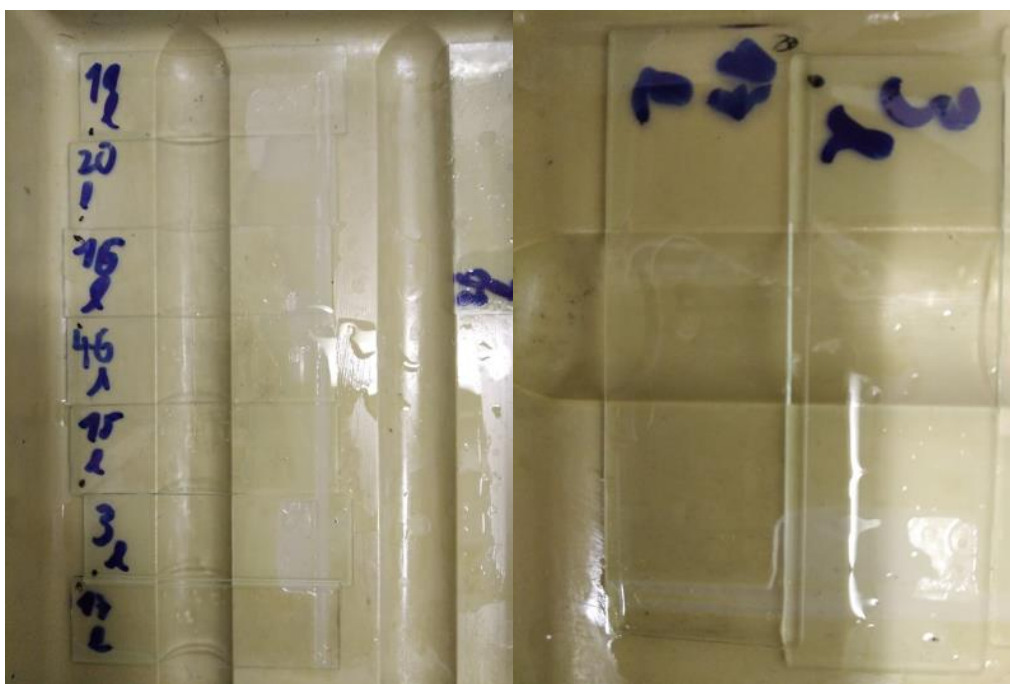
Příloha 1 - Práce v terénu.



Příloha 2 - Dekalcifikace vzorků.



Příloha 3 - Příprava a řezání vzorků na mikrotonu.



Příloha 4 - Odparafinování jednotlivých vzorků.