

UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



Stanovení věku u čolka velkého

(Triturus cristatus)

Determination of age for Great crested newt

(Triturus cristatus)

Dominik Hlubek

Bakalářská práce

předložená

Na katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Weber

Olomouc 2020

Bibliografická identifikace

Hlubek D. (2020): Použití metody skeletochronologie u čolka velkého (*Triturus cristatus*). Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 46 pp., v češtině.

Abstrakt

Čolek velký (*Triturus cristatus*) je u nás silně ohroženým druhem, o kterém jsou záznamy úbytku nejen u nás, ale i po celém světě. Tato bakalářská práce se zabývá rešeršním zpracováním metod stanovení věku u *T. cristatus*, jako zástupce ocasatých obojživelníků. Popisuje několik různých metod, jejich účinnost a vhodnost použití, s důrazem zejména na metodu skeletochronologie. Metoda skeletochronologie pak udává, že stanovení věku pomocí velikosti těla od hlavy ke kloace (SVL) může být nepřesné. Mnoho výzkumů nasvědčuje tomu, že na velikost těla mají významný vliv faktory vnějšího prostředí, jako jsou třeba nadmořská výška, teplota, dostupnost potravy a predátoři obývající stejnou lokalitu. Práce také zmiňuje metodu, která se zakládá na počtu erytrocytů v krvi. Ta říká, že s vyšším věkem jedince se v krevním oběhu vyskytuje více erytrocytů. Metoda skeletochronologie rozpoznává věk díky příčným řežům v diafýze, na kterých se zobrazují kruhové linie (LAGy), které vznikají v zimně, tedy v době, kdy tito obojživelníci hibernují čímž jasně stanoví věk jedince.

Klíčová slova: čolek velký (*Triturus cristatus*), věk, délka těla, skeletochronologie

Bibliographical identification

Hlubek D. (2020): Determination of age for Great crested newt (*Triturus cristatus*). Bachelor's thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc, 46 pp., in Czech.

Abstract

The Great crested newt (*Triturus cristatus*) is a highly endangered species in our country, of which there are records of decline not only in our country but also around the world. This bachelor's thesis deals with the research of methods for determining the age structure of tailed amphibians and especially *T. cristatus*. It describes several different methods, their effectiveness and suitability, with particular emphasis on the method of skeletochronology. The method of skeletochronology confirms the inaccuracy of the method of determining age by body size (SVL). Many studies suggest that body size is significantly affected by environmental factors such as altitude, temperature, food availability, and predators living in the same area. Therefore, body size in different areas does not have the same telling value. The thesis also mentions a method that is based on the number of erythrocytes in the blood. According to this method, there are more erythrocytes in the bloodstream as an individual gets older. The method of skeletochronology identifies age through cross-sections in the diaphysis, which show circular lines (LAGs), which form in winter, is at a time when these amphibians hibernate, and thus clearly determine the age of the individual.

Key words: Great crested newt, (*Triturus cristatus*), age, body length, skeletochronology

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Lukáše Webera s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 25. července 2020

.....

Dominik Hlubek

Obsah

Seznam obrázků	vii
Seznam tabulek	viii
Seznam příloh.....	ix
Seznam zkratk	x
Poděkování.....	xi
Úvod.....	12
1.1 Čolek velký (<i>Triturus cristatus</i>)	13
1.2 Anatomie <i>T. cristatus</i>	17
1.3 Určení věku	18
2 Cíle práce	21
3 Metodika	22
3.1 Zpracování vzorků kostní tkáně u <i>T. cristatus</i>	22
3.2 Barvení a pozorování.....	23
4. Výsledky	24
5. Diskuze.....	25
6. Závěr	35
7. Literatura.....	36
8. Přílohy	44

Seznam obrázků

Obr. 1: Výskyt <i>T. cristatus</i> ve světě.....	14
Obr. 2: Rozšíření <i>T. cristatus</i> v ČR.	15
Obr. 1: Ukázka vývojového stádia <i>Triturus cristatus</i> (Langton et al. 2001, upraveno)	16
<i>Obr. 2: Kostra ocasatého obojživelníka s označením odebraných kostí: 1) 3 články prstů, 2) tibia, 3) femur, 4) radius a ulna, 5) humerus.</i>	18
Obr. 3: pět viditelných LAGů (šipky) společně s metamorfózní čarou (ML) u pamloka temného (Kyoko 2002).	19
Obr. 12: Porovnání velikostí erytrocytů u různých živočichů: 1) <i>Pteromyzon marinus</i> , 2) <i>Raja</i> sp., 3) <i>Pleuronectes solea</i> , 4) <i>Amphiuma</i> sp., 5) <i>Proteus anguineus</i> , 6) <i>Rana</i> sp., 7) <i>Testudo graeca</i> , 8) <i>Lacerta</i> sp., 9) <i>Struthio camelus</i> , 10) <i>Gallus gallus</i> , 11) <i>Lama</i> sp., 12) <i>Elephas</i> sp., 13) <i>Capra</i> sp., 14) <i>Homo</i> sp. (Stephan 1954, upraveno: Arikani & Çiçek 2014)	26

Seznam tabulek

Tab. 2: Statistika SVL rodu <i>Calotriton asper</i> obývající jezerní biotop a tekoucí vody podle pohlaví (Oromi 2014).	27
Tab. 3: Statistika věku, SVL a váhy u druhu <i>B. bombina</i> (Bülbül et al. 2018).	27
Tab. 4: Biometrické hodnoty SVL <i>M. caucasica</i> (Beşer et al. 2017).....	27
Tab. 5: Počet jedinců, průměrná dlouhověkost a SVL pro <i>N. kaiseri</i> (Farasat & Shafiri 2016)	28
Tab. 6: Věková struktura populace (dle skeletochronologie) a délka těla u 4 syntopických druhůbojživelníků (Cogălniceanu & Miaud 2003).	28
Tab. 7: Porovnání dekalcefikace a fyzikální fixace vzorků.....	31
Tab. 8: Ukázka několik metod skeletochronologie. Autor, fixace, dekalcefikace, tloušťka řezů, barvení (A Protocol for Aging Anurans Using Skeletochronology 2008).....	32

Seznam příloh

Příloha 1: Oddělování končetin od těla.....	44
Příloha 2: Vyvařování přebytečné tkáně.....	44
Příloha 3: Fixace kostí do parafínu.	45
Příloha 4: Posuvný mikrotom s připraveným vzorkem.....	45
Příloha 5: Odstranění parafínu použitím histolu.	46

Seznam zkratek

LAG – linie zadržného růstu (line of arrested growth)

SVL – délka od špičky hlavy po kloaku

IUCN – mezinárodní svaz ochrany přírody

Poděkování

Děkuji Mgr. Lukáši Weberovi za vedení mé práce a odbornou pomoc. Dále bych chtěl podělovat Ing. Janu Černoorskému a doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D za výpomoc v laboratoři. Taky bych rád poděkoval mým přátelům a rodině. Děkuji i Adalbertu Kolínskému a Elišce Kutnoorské za podporu při celém studiu

Úvod

V poslední době se setkáváme s informacemi o úbytku populací obojživelníků nejen v Česku, ale i ve světě (Krása 2009). Infratřída Caudata, neboli ocasatí obojživelníci, jsou ohrožováni hned několika faktory (Krása 2009). Ve většině případů za to může úbytek vhodného prostředí v důsledku narušování původního biotopu a vysušování, případně odvádění vody z krajiny, takový biotop pak nemá dost živin a energie na uživení takové biodiverzity (Krása 2009). Dalším významným faktorem, který ohrožuje stav obojživelníků je šíření parazitické houby *Batrachochytrium dendrobatidis*, která způsobuje nemoc zvanou chytridiomykóza, která zapříčinuje rohovatění kůže a znemožní výměnu plynů přes kůži. Proti takové nemoci se těžce brání a zatím jedinou obranou je vysušování použitého odchyťového vybavení v terénu (Campbell et al. 2018). Podle výzkumu Weldon et al. (2004) tato houba *B. dendrobatidis* pochází z Afriky a rozšířila se díky trhu s drápatkou vodní (*Xenopus laevis*). Chytridiomykóza způsobuje vysokou mortalitu nejen u ocasatých, ale i u jiných skupin obojživelníků (Campbell et al. 2018). V neposlední řadě obojživelníky ohrožují i hnojiva, které se smývají z pohnojených polí v okolí jejich výskytu (Alford & Richards 1999), ale i např. liniové stavby jako jsou dopravní komunikace, dálnice, vlakové tratě apod., které zaviňují nejen úbytek biotopů, ale taky značnou mortalitu při jarní migraci obojživelníků k tůňm (Hlaváč 2018). Klimatické změny také přispívají k úbytku stanovišť díky vyšším teplotám a většímu suchu se ztrácejí původní biotopy (Krása 2009). Obojživelníci hrají důležitou roli v ekosystému, ale i v životech nás všech, aniž bychom si to uvědomili (Vojar 2007; Zavadil et al. 2011). Mezi výhody přítomnosti těchto živočichů je, že se jedná o likvidátory různých biologických škůdců (Vojar 2007). *T. cristatus* je bioindikátor čistého životního prostředí. Další využití mají ve farmakologii, díky jejich látkám na povrchu kůže např. polyglykany (Pietääinen et al. 2009). Bez znalosti ekologie a biologie nemá cenu chránit přírodu z důvodu neznalosti příčin ohrožení (Vojar 2007).

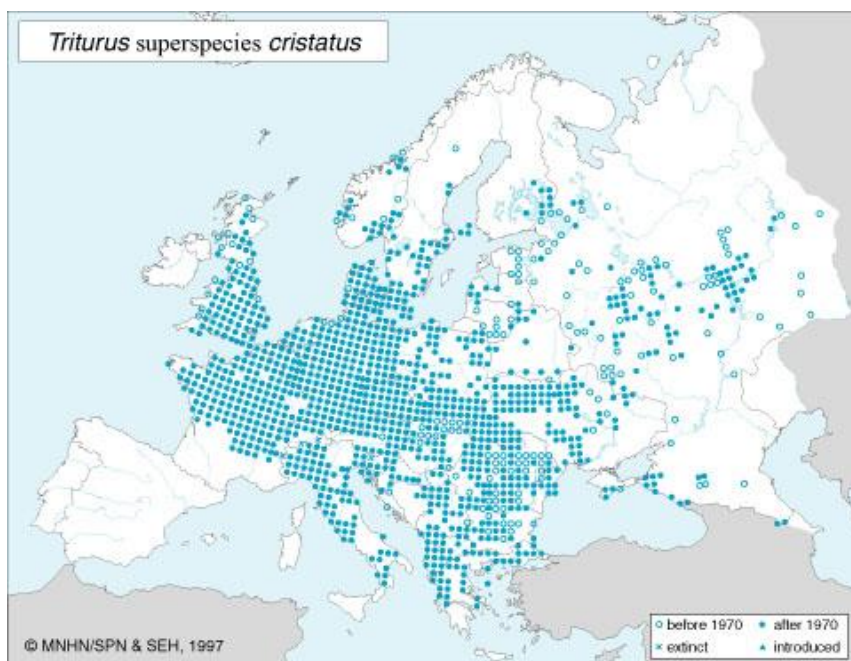
Všichni obojživelníci jsou poikilotermové, což znamená, že se jejich tělesná teplota mění v závislosti na okolní teplotě (Cogălniceanu et al. 2017). Teplota tak ovlivňuje celou řadu fyziologických funkcí (Witzmann & Soler-Gijón 2010). Při vyšších teplotách se zrychluje metabolismus a jsou schopni vyvinout větší rychlost pohybu (Pörtner 2001). Život čolků začíná, při vylíhnutí z vajíček, které nejsou

chráněny žádnou tvrdou skořápkou, jako třeba u plazů (Székely et al. 2017), ale rosolovitým obalem (Reinhard et al. 2015), které chrání vajíčko, před vyschnutím, i tak potřebují všichni obojživelníci vodu k životu (Lukanov & Tzankov 2016). po vylíhnutí se pulci ve vodě zdržují přibližně 14 týdnů mezi tu dobu se metamorfují (Ngo et al. 2020). Poté vylezou na souš a začínají terestrický život (Jehle 2000; Zavadil et al. 2011). Na podzim se stahují do různých dutin stromů, škvír mezi kamením, ale také např. do sklepů a stodol, aby prezimovali (Malmgren et al. 2007; Zavadil et al. 2011). Když dospějí a přijde doba rozmnožování, stahují se na jaře do kaluží, tůní, retenčních nádrží a dalších vodních biotopů (Langton et al. 2001; Zavadil et al. 2011), kde se samci zbarví do nápadných a barevných forem (Malmgren et al. 2007; Oromi et al. 2014; Arantes et al. 2015; Beşer et al. 2017; Guarino et al. 2019). Poté se samci pustí do tzv. svatebních tanců, aby přilákali samice ke spáření (Osikowski & Cierniak-Zuzia 2013; López et al. 2017). Oplodněná vajíčka pak samice nalepí na vegetaci či jiný podklad, kde se vajíčka vyvíjejí (Monello & Wright 2001). Při každé hibernaci čolek méně roste a proto se na kostech objevují linie přerušného růstu, tzv. LAGy (Malmgren et al. 2007; Socha & Ogielska 2010). Tyto kruhové linie můžeme pozorovat pod mikroskopem na obarveném příčném řezu kosti v diafýze (Bouragaoui & Nourira 2019). Diafýza je část kosti, která se nachází mezi dvěma metafýzami (M. Comas et al. 2016). Tato metoda se možná zdá jako drastická či nehumánní, ale díky velké schopnosti regenerace končetin je ztráta prstů životně neohroží (Brockes 1997).

1.1 Čolek velký (*Triturus cristatus*)

Čolek velký (*Triturus cristatus*, Laurenti, 1768), je v České republice uvedený ve vyhlášce č. 395/1992 Sb. zákona č. 114/1992 Sb. jako silně ohrožený druh. Čolek se nachází i v II. příloze Bernské úmluvy. Ve směrnici EU ho nalezneme v II. a IV. příloze směrnici o stanovištích 92/43/EEC. Dále je uveden v Červeném seznamu obojživelníků a plazů ČR. IUCN uvádí tento druh jako málo dotčený (LC).

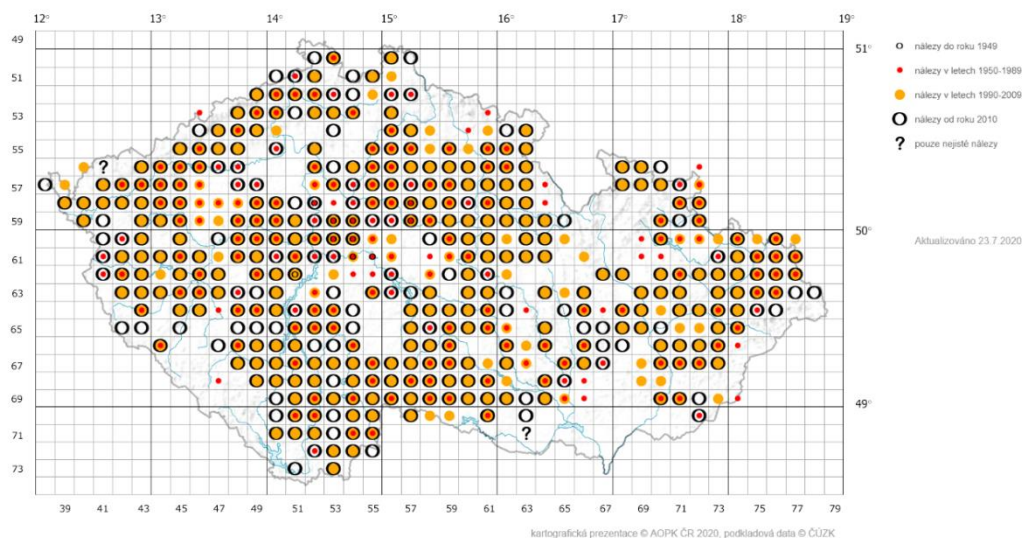
T. cristatus dorůstá délky okolo 150 mm (Jehle 2000). Samice jsou obvykle větší než samci (Sun et al. 2016). Dorzální strana dospělce je hnědá až hnědočerná (Roček 1992). Ventrální strana těla má oranžovou až světle oranžovou barvu s černými tečkami, podle kterých se rozeznávají jedinci při zpětném odchytu (Mazerolle 2015). Samci mají v době rozmnožování vyklenutý vysoký hřbetní lem, na ocasu má stříbrný pruh (Langton et al. 2001). Kloaka samců je tmavá, až černá, zatímco samice mají kloaku světlou (Roček 1992). Dalším rozeznávacím znakem u samic je na spodní straně ocasu, na kterém má světlý pruh (Kuzmin 2001). Podle některých výzkumů využívají čolci různé úkryty, jako jsou např. mezírky pod kamením, nory hlodavců a dokonce i sklepení (Jehle 2000). Úkryty ale neslouží jen pro přezimování, slouží také k ochraně před nepříznivými vlivy a nebo taky před predátory (Malmgren et al. 2007). Jelikož čolci střídají terestrický a akvatický způsob života, bývají k nalezení od jara do podzimu v tůních, retenčních nádržích, vodních ploškách apod. (Zavadil et al. 2011). *T. cristatus* se vyskytuje ve všech státech střední Evropy (Harper et al. 2019). Nejsevernější výskyt má v Norsku a nejnižnější na Balkáně. Nejvýchodnější nálezy jsou v Rusku, kde areál *T. cristatus* zasahuje až k Uralu (Kuzmin 2001).



Obr. 1: Výskyt *T. cristatus* ve světě.

V ČR jsou pro čolka velkého (*Triturus cristatus*) biotopové preference spíše nižší až střední nadmořské výšky (Zavadil et al. 2011), ale jsou záznamy, že se může vyskytovat i v 800 m n. m. (Zavadil, 1993). Většinou v blízkosti listnatého lesa (Gustafson et al. 2011). *T. cristatus* se prakticky vyskytuje ostrůvkovitě na celém území ČR, větší zastoupení mají pak ve východních Čechách, Podbeskydí a Vysočině (Mačát 2012). V ČR se také vyskytují dvě hybridní zóny s čolkem dunajským (*Triturus dobrodicus*) a čolkem dravým (*Triturus carnifex*), přičemž první zóna s *T. carnifex* se vyskytuje na Znojemsku a druhá s *T. Dobrodicus* na Břeclavsku (Mačát et al. 2019). Nevyhýbají se lidskému osídlení blízko lokalit (Kaczmarški et al. 2016). Brzy na jaře opouští *T. cristatus* své zimoviště a vydává se do vodního biotopu, který jim slouží jednak pro reprodukci, ale taky je to úkryt před teplem a suchem v letním období (Maštera 2017).

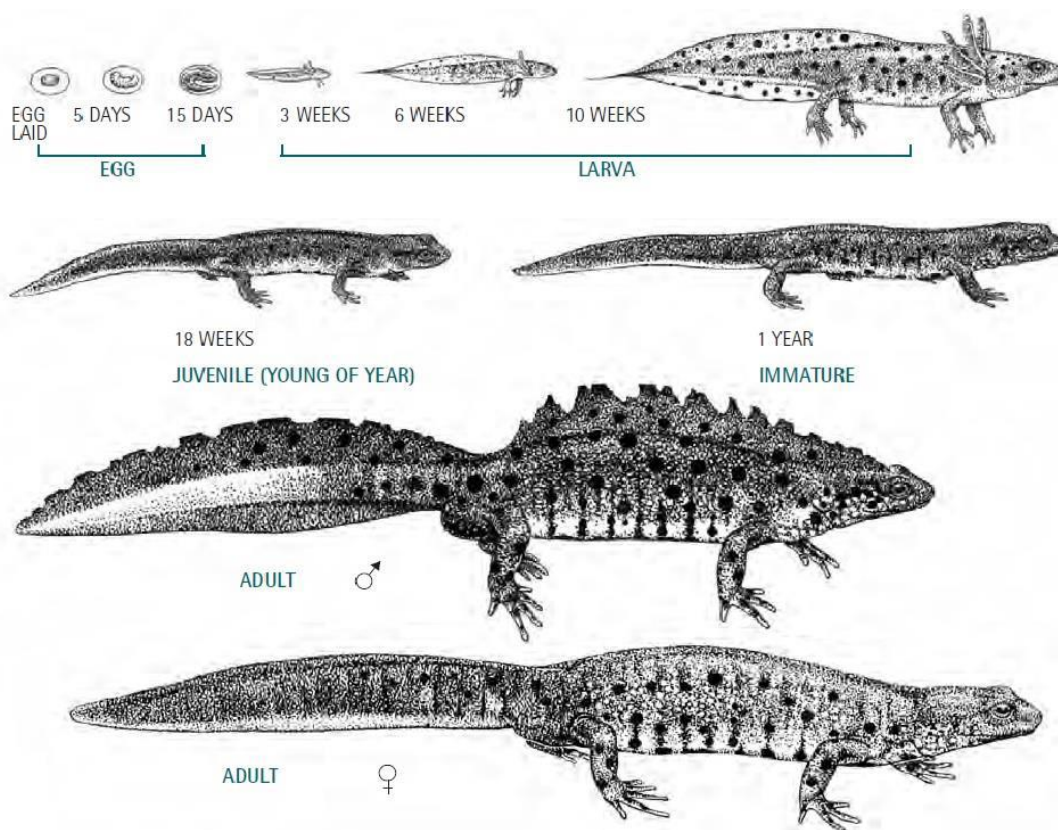
Výskyt druhu *Triturus cristatus* podle záznamů v ND OP



Obr. 2: Rozšíření *T. cristatus* v ČR.

Při přechodu do vody se samcům začnou tvořit vysoké hřbetní hřebeny, ploutevní lemy a také se zbarví (Moravec 2019). Moravec (2019) také uvádí, že při reprodukci se samci, při pokusu o předání spermatoforu, staví příčně před samice a výrazně se vyhrbí, tzv. „kočičí hřbet“, vzpřímí ocas vůči samici a vibruje. Jejich potravu tvoří zejména různé druhy bezobratlých jako např. larva komára (*Culex sp.*)

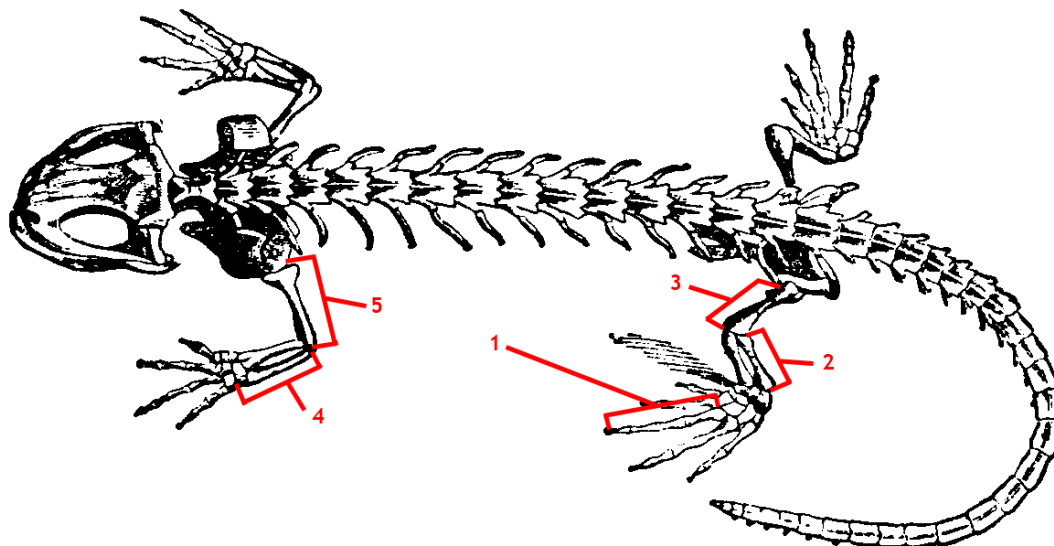
nebo dokonce i larvy obojživelníků (Maštera 2017). Larvy *T. cristatus* metamorfuji obvykle v červnu až v červenci (Moravec 2019). Na konci léta se čolci přesouvají na svá zimoviště, kde přečkají zimu (Malmgren et al. 2007). Jejich místa pro hibernaci jsou různá (Jehle 2000). Zavadil (2011) uvádí, že predátorů ocasatých obojživelníků je mnoho, od všežravých prasat, kteří redukují počty jedinců hlavně v terestrické fázi jejich života, až po vodní ptáky, jako je volavka popelavá (*Ardea cinerea*), či čáp bílý (*Ciconia ciconia*). Ve vodách s přítomnou rybí obsádkou se nevyskytují vůbec nebo aspoň ne v takovém počtu jako bez ní, je to dáno tím, že ryby jsou přirozenými predátory a konzumují tyto živočichy od vajíček až po dospělé (Wells, 2007). Mezi tyto predátory se řadí např. štika (*Esox sp.*), okoun (*Perca sp.*), ale třeba i kapr (*Cyprinus sp.*) a cejn (*Abramis sp.*) a další (Monello & Wright 2001; Janků 2017). Jsou však i známy výskyty ryb i obojživelníků na jednom stanovišti (Baker et al. 2011).



Obr. 3: Ukázka vývojového stádia *Triturus cristatus* (Langton et al. 2001, upraveno)

1.2 Anatomie *T. cristatus*

Pulci nemají žádné kosti, pouze chrupavky (Urszán et al. 2015; Székely et al. 2017; Ngo et al. 2020). Kosti se začínou vytvářet až s metamorfózou (Székely et al. 2017) přičemž se na kosti znázorňuje první LAG (Cajade et al. 2013; Piñeiro et al. 2019). Obojživelníci jsou první skupinou, která opustila vodu a přizpůsobila se životu na souši (Szrek 2020). To přivedlo mnoho změn nejenom v jejich ekologii, ale i anatomii (Szrek 2020). Nejvýraznější změnou oproti vodním formám, jako jsou ryby je, že celá kostra se stala nosnou jednotkou celého těla (Gao et al. 2018). Další důležitou změnou může být přeměna ploutví na kráčivé končetiny (Tomašević Kolarov 2013). Tito živočichové jsou sice prvními, kdo obydlel zemi, ale vodu k životu stále potřebují (Székely et al. 2017). Voda hraje důležitou roli v životě obojživelníků, právě kvůli rozmnožování (Woodley 2015). Co se končetin týče, u obojživelníků jsou na předních končetinách 4 prsty a na zadních 5 prstů (Brum et al. 2019). Na předních končetinách směrem k trupu jsou kosti loket (*ulna* a *radius*) a paže (*humerus*), na zadních končetinách jsou kosti lýtko (*tibia* a *fibula*) a stehno (*femur*), které jsou také v zájmu skeletochronologie (Mednikov 2009; Vasilyan & Böhme 2012; Mar Comas et al. 2016). Pulci nemají žádné kosti, pouze chrupavky (Urszán et al. 2015; Székely et al. 2017; Ngo et al. 2020). Kosti se začínou vytvářet až s metamorfózou (Székely et al. 2017) přičemž se na kosti znázorňuje první LAG (Cajade et al. 2013; Piñeiro et al. 2019). Pro samotnou skeletochronologii jsou podstatné řezy v diafýze (Carranza et al. 2015). V diafýze jsou nejlepší řezy, kvůli minimální velikosti medulární dutiny a největší velikosti periostální kosti (M. Comas et al. 2016). Existují případy, kdy můžeme na jedinci sledovat tzv. malformace tzv.abnormality na těle, které jsou způsobeny např. UV zářením, antropogenními vlivy, ale také po zranění (Mačát et al. 2019). Záznamy uvádějí polydaktylii či bifurkaci ocasu (Mačát et al. 2019).



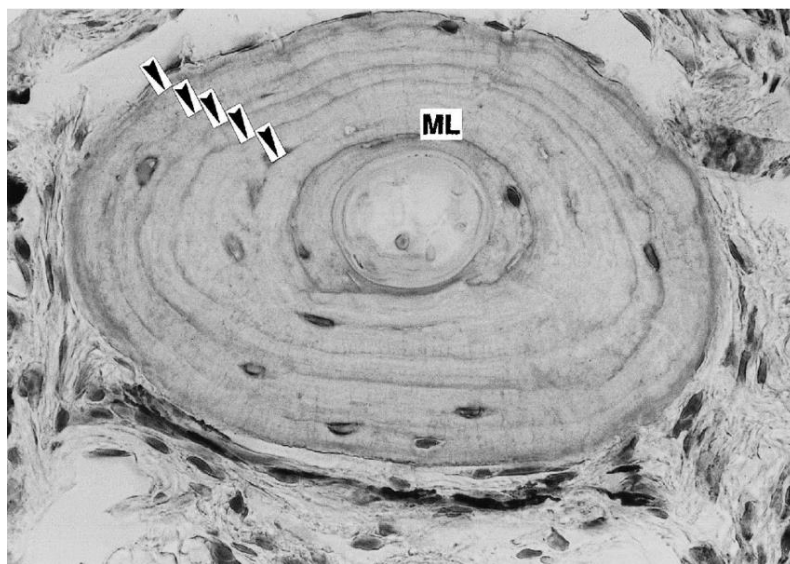
Obr. 4: Kostra ocasatého obojživelníka s označením odebraných kostí: 1) 3 články prstů, 2) *tibia*, 3) *femur*, 4) *radius* a *ulna*, 5) *humerus*.

1.3 Určení věku

Existuje mnoho výzkumů o stanovení věku u ocasatých obojživelníků (Guarino et al. 2016). Méně probádanou metodou je počítání erytrocytů v krvi (Arikan & Çiçek 2014). Další metodou je SVL, která je asi nejznámější (Roitberg & Smirina 2006). SVL funguje na principu měření délky těla od špičky hlavy po kloaku (Guarino et al. 2019), podle velikosti jedince se určuje jeho věk (Santoyo-Brito et al. 2018).

Skeletochronologie je jedna z metod, jak zjistit věk zvířat (Brum et al. 2019). Jedná se o příčné řezy kostí, které se získávají odnětím článku prstu či celé končetiny (M. Comas et al. 2016; Farasat & Sharifi 2016). Poté se se od kostí odstraní přebytečná tkáň (Kaczmariski et al. 2016; Brum et al. 2019). Kosti se musí dekalifikovat, toho docílíme ponořením kosti do kyseliny dusičné (McCreary 2008). Po dekalifikaci následuje ethanolová řada, která má za úkol odvodnit kosti (Oromi et al. 2014). Následně se použije fixační činidlo a vložení kosti do parafínu (Üzüm & Olgun 2009; Piñeiro et al. 2019). Parafín slouží k lepšímu zachycení na řezačce, která nařeže kosti na 14-16 μm , ale třeba na jiné tloušťky (Cajade et al. 2013; Bülbül et al. 2018). Po nařezání se odstraní parafín, samotný vzorek se zafixuje a nabarví (Makovický et al. 2015). Na nabarvených řezech jsou vidět LAGy (McCreary 2008; Üzüm & Olgun 2009; Marangoni et al. 2012; Cajade et al. 2013;

Makovický et al. 2015; Beşer et al. 2017; Kumbar & Lad 2017). LAGy (anglicky Lines of arrested growth) jsou kruhové proužky viditelné na příčném řezu kosti obojživelníka (Bouragaoui & Nourira 2019; Piñeiro et al. 2019). Tyto LAGy vznikají při hibernaci či estivaci, kdy obojživelníci při hlubokém spánku zpomalují svůj metabolismus a také méně rostou, to se právě projevuje na kostech těchto živočichů (Üzüm & Olgun 2009; Kumbar & Lad 2017). Kosti se získávají oddělením článku nejdelšího prstu na zadní končetině (Sinsch et al. 2007). Sinsch et al. (2007) také uvádí, že nejvhodnější na pozorování LAGů jsou kosti *humerus* a *femur*. Skeletochronologie je nejvhodnější metoda pro živočichy žijící v mírných pásech, kdy využívají zimní či letní spánek (Üzüm & Olgun 2009).



Obr. 5: pět viditelných LAGů (šipky) společně s metamorfózní čarou (ML) u pamloka temného (Kyoko 2002).

Výhodou této metody je, že můžeme určit přesný věk, a to i bez usmrcení jedince (M. Comas et al. 2016; Kaczmariski et al. 2016), pokud se odebere pouze článek prstu, když je zapotřebí jiná kost, je třeba ho usmrtit (M. Comas et al. 2016). Nevýhodou může být např. to, že starší jedinec mohl už o končetinu či článek prstu přijít a získáme tak regenerát (Brockes 1997).

Tato bakalářská práce se zabývá zejména rešeršním zpracováním metod stanovení věku u ocasatých obojživelníků a zejména *T. cristatus*. Popisuje několik různých metod, jejich účinnost a vhodnost použití, s důrazem zejména na metodu

skeletochronologie. Informace v této práci mohou být užitečné při dalších studiích obojživelníků a jejich stanovení věku.

2 Cíle práce

- 1) Rešerše na téma stanovení věku u ocasatých obojživelníků, zejména čolka velkého (*Triturus cristatus*) s důrazem na použití metody skeletochronologie
 - a) stanovení věku na základě délky těla – od hlavy ke kloace (SVL)
 - b) určení přesnosti metody skeletochronologie
 - c) vhodnost jejího použití

- 2) Stanovení účinnosti metody skeletochronologie na jedincích čolka velkého (*T. cristatus*)
 - a) v rámci řezů různých typů kostí – rozdílných článků prstů, *femur*, *tibia*, *humerus*, *radius* a *ulna*
 - b) různé síle řezů – 7-50 μm
 - c) při použití fixačního činidla

3 Metodika

3.1 Zpracování vzorků kostní tkáně u *T. cristatus*

Jedinci určené k výzkumu byly získány z předešlých výzkumů či nalezení mrtví v blízkosti silnic. Byli umístěni v mrazáku na katedře Ekologie a životního prostředí Univerzity Palackého v Olomouci. Před začátkem odebrání vzorků, jsem každého jedince změřil od špičky hlavy po koaku (SVL). Z těchto jedinců jsem získal 7 druhů kostí, které jsem oddělil od těla pomocí skalpelu v místě kloubu. První, druhý a třetí článek nejdělsího prstu na zadní končetině, lýtko (*fibula*), stehno (*femur*), loket (*radius* a *ulna*) a paži (*humerus*). Na těchto kostech jsem zkusil mnoho různě tlustých řezů. Na mikrotomu jsem nastavil tloušťku na 7 μm a pak jsem zvyšoval hodnotu až na 50 μm . U prstů jsou tyto klouby viditelné jako světlé skvrnky mezi články prstů (Kumbar & Lad 2017). Získané kosti byly vloženy do eppendorfy s 96 % ethanolem. Vzorky byly uloženy do mrazáku pro pozdější použití. Dále byly kosti vyvařeny ve vodě se 100 °C tak, aby přebytečná měkká tkáň odpadla, tím jsem dostal čisté, bílé kosti, které jsem vrátil zpět do eppendorfy s 96 % ethanolem. Mé metody pro výzkum skeletochronologie bylo několik: s dekalifikací a bez dekalifikace a bez použití či s použitím fixačního činidla. Mezi těmito metodami je rozdíl, že část vzorků pro dekalifikaci byly ponořeny do kyseliny dusičné na 90 minut. A s fixačním činidlem a bez. Zde jsem vzorky rozdělil na části 2 části. První část jsem dekalifikoval v 5 % HNO_3 po dobu 90 minut a s druhou částí jsem tento krok vynechal. Následně byly vzorky dány do ethanolové řady pro odvodnění kostí. Ethanolová řada začínala při 70 % ethanolu, po 90 min. byly vzorky předány do 80 % ethanolu a na závěr po dalších 90 min. do 96 % ethanolu ve kterém byly ponechány do dalšího dne (24 hod). Po ethanolové řadě následovala fixace vzorků do parafínu. Opět u některých jsem použil před parafinováním Fixační činidlo Roti®-Histofix ECO Plus, které mělo za úkol obalit kost ochrannou vrstvou. Vzorky byly vloženy do platové nádoby ve tvarech krychle o rozměrech 14,5×9,5 cm s tím, že jednotlivé krychle měly 1,5×2×1 cm. Vzorky v parafínu se následně řezali na řezače Microm Ergostar HM 200 na 7-50 μm tlusté proužky. Hotové řezy se daly do kapky vody na vařičku Präzitherm s 50-60 °C, kde se srolované proužky roztáhly. Na některé podložní sklíčka byl použit lysin pro lepší zafixování.

3.2 Barvení a pozorování

Pro odparafinování jsem použil ROTI®-HISTOL na bázi limonenu. Na podložní sklíčko se vzorkem jsem nakapal Pasteurovým kapátkem histol. S opakováním v intervalu 3×10 min. Histol jsem vyměnil za 96 % ethanol a opět jsem opakoval 3×5 min. nakonec přišla řada na 70 % ethanol také v intervalu 3×5 min. Pro každou chemikálii jsem použil jiné kapátko, aby nedošlo k ředění či sloučení chemických látek. Posledním krokem bylo už jen opláchnout vzorky destilovanou vodou v intervalech 3×5 min. Pro nabarvení vzorků jsem použil H&E Fast Staining Kit, který obsahoval Fast Staining H&E roztok 1 a Fast Staining H&E roztok 2. Tato chemikálie se skládá ze dvou složek, a to jsou hematoxylin a eosin. Barvení má kroky: i) deparafinace, ii) zavodnění, iii) vlastní barvení, iv) odvodnění, v) projasnění a vi) zamontování. Barvení probíhalo tak, že jsem na vzorky nakapal činidlo č.1 a po 6 min. opláchnul kohoutkovou vodou po dobu 10 sec., dalším krokem byla 0,1 % kyselina chlorovodíková pro diferenciaci. Poté jsem omýval podložní sklíčko se vzorky opět kohoutkovou vodou po dobu 6 min. Při tomto kroku se začaly vzorky postupně obarvovat do modré až fialové barvy. Následovalo činidlo č.2, které jsem nechal působit po dobu 30 sec. Konečným krokem celého postupu barvení bylo oplachování kohoutkovou vodou také po dobu 30 sec. Veškerou kohoutkovou vodu jsem pokapával Pasteurovým kapátkem, abych minimalizoval výplach vzorku kosti mimo podložní sklíčko. Nabarvené vzorky jsem nechal okapat a usušit, poté jsem pozoroval pod světelným mikroskopem typu Olympus CHK2-F-GS.

4. Výsledky

Pro výzkum jsem použil 40 jedinců uhynulých z předchozích výzkumů. Determinoval jsem pohlaví u všech jedinců, vzorky pocházely od 17 samic a 23 samců. Při měření velikosti těla (SVL) jsem naměřil nejvyšší hodnotu 80 mm. Nejmenší jedinec měřil 50 mm. Průměr všech naměřených hodnot je 63,9 mm, SD \pm 5,2 mm. Průměrná velikost u samic činila 66,5 mm, SD \pm 5,1 mm. U samců tato hodnota byla výrazně menší 61,9 mm, SD \pm 4,2 mm (viz Tab. 1). Na plátcích při 7 μ m se vzorky ztrácely a na vzorcích kolem 50 μ m se kosti tříštily, což bylo poznat i podle zvuku, při kontaktu s nožem na mikrotomu. Některé vzorky jsem ponechal ve fixačním činidle. Fixační činidlo obalilo kost a mělo zaručit nedrcení kostí při tlaku nože, ale nebyla zaznamenána žádná změna s použitím či bez použití fixačního činidla. Dohromady bylo těchto vzorků 280. Pro dekalifikaci bylo použito 24 kostí. Bohužel ani to nepřispělo k lepšímu výsledku.

Tab. 1: Naměřené hodnoty jedinců *T. cristatus*.

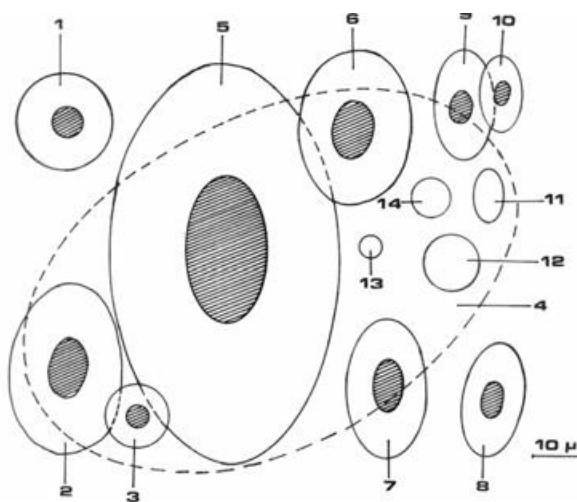
číslo	sex	mm	číslo	sex	mm
1	F	60	21	M	65
2	F	65	22	F	65
3	M	65	23	M	65
4	F	64	24	F	70
5	M	62	25	F	70
6	M	60	26	M	65
7	M	60	27	M	60
8	M	67	28	M	70
9	F	60	29	M	60
10	F	60	30	M	60
11	M	62	31	M	65
12	F	65	32	M	60
13	M	57	33	F	70
14	F	67	34	M	50
15	F	65	35	M	60
16	F	70	36	F	60
17	M	65	37	F	80
18	M	55	38	F	70
19	M	60	39	M	65
20	F	70	40	M	65

5. Diskuze

Je známo hned několik způsobů, jak zjistit věk u obojživelníků (Psittacosis 1973). Nejznámější je asi pomocí SVL - určování věku podle velikosti těla od špičky hlavy po kloaku (Roitberg & Smirina 2006; Guarino et al. 2015; Kanat & Tok 2015). Tato metoda je nepřesná právě díky vlivu vnějších faktorů na jedince (Ngo et al. 2020). Výhodou této metody je neinvazní přístup ke zvířatům, ale na úkor přesnosti. Odchylka stanoveného věku může být i několik let. Může se tak stát, že dva jedinci, kteří budou mít stejnou velikost těla, budou mít rozdílný věk. V několika pracích je zmiňován věk se závislostí na počtu erytrocytů v krvi (Arikan & Çiçek 2014). Erytrocyty patří mezi největší krevní buňky u zvířat (Çevik et al. 2006). Nabízí se zde otázka, zdali nenastává závislost obsahu erytrocytů v krvi na nadmořské výšce. Na totu metodiku je stále málo studií a mohlo by být zájmem dalších studií. Existuje i metoda, která vyšetřuje vnitřní orgány obojživelníků, ale tato metoda je neprůkazná (Marunouchi et al. 2000). Další metodou je metoda skeletochronologie (Ento & Matsui 2002; Roitberg & Smirina 2006). Dle studie Reinharda (2015) měly samice délku těla 86,7-109,9 mm (průměr činil 98 mm, $SD \pm 7,6$ mm) a byly v průměru 11,1 roků staré (5-19 let), velikost samců činila 81,8-112,2 mm (v průměru 96,0 mm, $SD \pm 8,0$ mm) a rozmezí stáří bylo 4-20 let. Ve studii Ūzuma & Olguna (2005) měli samci délku těla, od kloaky po hlavu, od 60-82 mm (průměr 72 mm, $SD \pm 6,6$ mm) a samice měly délku těla od 55-90 mm (s průměrem 73,7 mm, $SD \pm 10,3$ mm), věk samců činila 5,5, $SD \pm 1,2$ roku a u samic 5,6, $SD \pm 2,1$, nejstarší juvenil měl 2 roky a věk dospělosti je odhadován na 3-4 roky.

Metoda skeletochronologie se mi zdá jako jedna z nejpřesnějších metod, i když existují situace, kdy kroužkové linie (LAGy) nejsou dosti čitelné či se překrývají. Věk se spočítá sečtením LAGů, které znázorňují přerušené období růstu. Sinsch (2015) uvádí ve své práci, že u jedinců do 8 let se dá přesně stanovit věk, u starších jedinců LAGy ztrácí. Aby byla determinace věku co nejpřesnější, doporučují se LAGy počítat ve více pozorovatelů, kteří jsou nezávislí (Sinsch 2015). Hrozí zde i riziko, že starší jedinci už někdy přišli o končetinu a získaný vzorek je regenerát, čímž zkreslí výsledky. Tato metoda je vhodná pro všechny adultní savce, obojživelníky i plazi mírných klimatických pásů, kde se střídají roční období. Čerpal jsem z mnoha článků, které pochází právě z mírných pásů severní polokoule, jako je např. Turecko,

Německo, Polsko, USA a další, dokonce jsem našel i články z Jižní Ameriky, jako je Argentina čili tato metoda má uplatnění v mnoha státech po celé Zemi. Rozlišovat věk podle délky těla (od kloaky po hlavu) se mi zdá nespolehlivé, na velikost těla může mít vliv mnoho faktorů, jako např. rybí osádka – vliv predátorů, nadmořská výška, chemizmus vody, vegetace ve vodě anebo třeba početnost syntopních druhů apod. Také růst po dosažení dospělosti se významně zpomaluje (Caetano & Leclair 1999). Tato metoda má velké výhody, ale také nevýhody. Výhodou je např. to, že se jedná o přesnou metodu zjištění věku nejen u ocasatých obojživelníků. Dále, díky vysoké regeneraci končetin obojživelníků, se zvíře nemusí usmrcovat a chybějící článek znovu doroste. Největší nevýhodou této metody je nepochybně narušení tkání u zvířete, dále stres a riziko zánětu rány vytvořené uštípnutím prstu (Clark 1972). Zde je i možnost malformací po ztrátě tkáně a prožitému stresu (Mačát et al. 2019). Skeletochronologie je invazní metoda, která má složitý postup, ve kterém se nesmí udělat chyba. Dále k nevýhodám přidávám i věk čolka, což se zdá být absurdní, ale je zde i možnost, že starší jedinec mohl o článek prstu či končetinu přijít a mohlo by se jednat o regenerát (Brockes 1997). Také u starších jedinců jde determinovat věk hůře (Sinsch 2015).



Obr. 6: Porovnání velikostí erytrocytů u různých živočichů: 1) *Pteromyzon marinus*, 2) *Raja sp.*, 3) *Pleuronectes solea*, 4) *Amphiuma sp.*, 5) *Proteus anguineus*, 6) *Rana sp.*, 7) *Testudo graeca*, 8) *Lacerta sp.*, 9) *Struthio camelus*, 10) *Gallus gallus*, 11) *Lama sp.*, 12) *Elephas sp.*, 13) *Capra sp.*, 14) *Homo sp.* (Stephan 1954, upraveno: Arikan & Çiçek 2014)

Tab. 1: Statistika SVL rodu *Calotriton asper* obývající jezerní biotop a tekoucí vody podle pohlaví (Oromi 2014).

Population	Sex	<i>n</i>	Mean ± EE	Minimum-Maximum
Lake	males	55	62.8 ± 0.4	54.0-71.0
	females	23	62.9 ± 0.8	56.0-70.0
	immatures	32	48.6 ± 1.1	39.7-60.0
Stream	males	21	70.1 ± 0.5	64.8-74.5
	females	45	72.4 ± 0.5	63.8-78.1

Tab. 2: Statistika věku, SVL a váhy u druhu *B. bombina* (Bülbül et al. 2018).

Charac- ters	Sex	<i>n</i>	Mean	Range	SE	SD
SVL	♂♂	20	34.6	28.3 – 44.3	0.9	3.83
Age		20	4.1	2 – 6	0.3	1.25
SVL	♀♀	15	34.9	30.1 – 38.0	0.7	2.64
Age		15	4.5	3 – 7	0.3	1.06
SVL	♂♂	35	34.7	28.3 – 44.3	0.6	3.34
Age	♀♀	35	4.2	2 – 7	0.2	1.19

Note. For abbreviations, see the text; *n*, number of samples; SD, standard deviation; SE, standard error.

Tab. 3: Biometrické hodnoty SVL *M. caucasica* (Beşer et al. 2017).

Age, years	<i>N</i>	Mean	Minimum	Maximum	S.E.	S.D.
Males						
5	1	59.20				
6	7	60.34	57.4	62.7	0.79	2.1
7	9	63.28	61.0	65.6	0.47	1.45
8	7	66.37	64.8	68.1	0.47	1.25
9	1	67.69				
10	2	70.41	69.8	71.1	0.64	0.9
11	1	74.46				
Females						
4	4	52.06	51.0	52.6	0.38	0.76
5	9	54.68	51.9	54.5	0.72	2.18
6	8	59.66	58.1	61.1	0.37	1.06
7	7	62.96	60.1	65.5	0.8	2.12
8	2	67.60	66.0	69.2	1.61	2.27

Notes. *N*, The number of specimens; S.E., standard error; S.D., standard deviation.

Tab. 4: Počet jedinců, průměrná dlouhověkost a SVL pro *N. kaiseri* (Farasat & Shafiri 2016)

	Age (years)			SVL (mm)		
	<i>n</i>	Mean ± SE	Range	<i>n</i>	Mean ± SE	Range
Branchial juveniles	4	0.4	-	4	23.67 ± 1.16	20.7–26.9
Metamorph juveniles	8	0.7	-	8	31.78 ± 0.58	29.33–33.24
Adult males	27	7.74 ± 0.30	4–14	27	54.67 ± 0.72	48.8–60.1
Adult females	46	6.81 ± 0.58	4–12	46	63.31 ± 0.68	54.1–73.8

Tab. 5: Věková struktura populace (dle skeletochronologie) a délka těla u 4 syntopických druhů obojživelníků (Cogălniceanu & Miaud 2003).

	Age (years)						Body length (mm)					
	<i>N</i>	Mean	Min.	Max. ^a	SD	CV (%)	<i>N</i>	Mean	Min.	Max. ^a	SD	CV (%)
<i>Triturus vulgaris</i>												
Males	3	—	3	5	—	—	4	—	30.0	36.9	—	—
Females	14	4.1	3	6	1.2	29.7	17	34.7	30.9	39.8	2.09	6.1
<i>Triturus dobrogicus</i>												
Juveniles	11	1.7	1	3	0.79	45.4	10	46.3	38.1	61.8	6.71	14.5
Males	16	3.2	2	4	0.75	23.5	16	65.0	41.2	78.1	8.80	13.5
Females	21	3.5	3	5	0.68	19.5	21	68.9	62.0	84.8	6.60	9.6
<i>Bombina bombina</i>												
Males	13	3.4	2	5	0.93	27.6	13	36.6	30.3	40.0	2.95	8.1
Females	20	3.4	2	5	1.04	31.2	20	36.8	30.5	41.0	2.96	8.0
<i>Rana esculenta</i> complex												
Juveniles	9	2 ^b	0	4	—	—	9	46.9 ^b	32.1	67.8	—	—
Males	7	5 ^b	4	10	—	—	7	81.5 ^b	64.2	89.0	—	—
Females	29	6.7	4	10	1.89	28.28	29	95.6	66.6	118.8	16.29	17.1

^aLongevity.

^bMedian.

Skeletochronologie se běžně používá jak u obojživelníků (Arantes et al. 2015; Campbell et al. 2018), tak u plazů (Borczyk & Paško 2012; Castanet et al. 2014; Altunışık et al. 2016). Oromi (2014) se ve své práci zabývá rozdílnostmi mezi populacemi mloka bradavičnatého (*Calotriton asper*), jenž jedna obývá jezero a druhá tekoucí vody za užití metody skeletochronologie. Dle studie Piñeira (2019) zabývající se chronologií LAGů a velikosti těla u druhu *Argenteohyla siemersi* zase uvádí, že kůstky očistil v čisté vodě po dobu 30 minut a poté je nechal v 5 % kyselině dusičné na 1-3 hodiny, poté byly vzorky zafixovány do parafínu a nařezány rotačním mikrotomem na plátky tlusté 14-16 μm, pak byly nabarveny Harrisovým hematoxylinem (Piñeiro et al. 2019). Piñeiro et al. (2019) uvádí, že LAGy byly pozorovány optickým mikroskopem. Metamorfózní linie byla viditelná u všech vzorků, u dvou vzorků byl pozorován první LAG. Bülbül (2018) studoval věkovou strukturu a velikosti v turecké populaci kuňky obecné (*Bombina bombina*). Kosti nechal v 5 % kyselině dusičné po dobu 2,5 hodiny, následně dal vzorky do parafínu

a nařezal plátky na 15 μm rotačním mikrotomem a pro plátky pak také udělal hematoxylinový postup (Bülbül et al. 2018). Obarvené vzorky ještě pokryl entellanem a pozoroval na světelném mikroskopu (Bülbül et al. 2018). Co se týče výsledků, Bülbül (2018) uvádí 92,5 % vzorků, které odpovídaly zimní linii na průřezu kosti, byla resorpční linka u 13,51 %, ale nikdy nebyla potíž s determinací věku jedince, u 17,14 % byla pozorována dvojitá čára (Bülbül et al. 2018). Nejstarší pozorovaní jedinci měli 6 a 7 let, věk dospělců byl 2 let, pozorován v 74,29 %, 3 roky u 22,86 % a 4 roky u 2,85 % (Bülbül et al. 2018). Rozsah věků pozorovaných jedinců byl 3-7 u samic a 2- 6 u samců a mezi délkou těla a věkem nebyla žádná korelace. Gustafson (2015) jehož práce se zabývala skeletochronologickým hodnocením vztahu věku a parazitismu u skokana lesního (*Lithobates sylvaticus*) ve své práci napsal, že články prstů uchoval v 10 % formalínu s neutrálním pufrům pro minimální dobu 3 dny, pak použil 3 % kyselinu dusičnou a nechal působit 5-7 hodin, reakce byla neutralizována nahrazení kyseliny fosfátovým pufrům, tak to nechal po dobu 24 hodin, aby zajistil neutralizaci. Odstranil přebytečnou tkáň a vložil kosti do mrazícího gelu, teplota činila $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a na mrazícím mikrotomu řezal na tloušťku 18-20 μm , pro obarvení použil hematoxylin dle Ehrlicha, pak přesunul vzorky do vodní lázně s destilovanou vodou na 6-10 minut (Gustafson et al. 2015). Pozorovaní jedinci měli věkový rozdíl 4-9 roků (Gustafson et al. 2015). Rozlišný postup měl Kaczmariski (2016), ve své práci o anomáliích v kostech evropské žáby ropuchy obecné (*Bufo bufo*), který dekalcifikoval 10 % kyselinou mravenčí a 4 % formalinem po dobu 2-4 hodiny. Vzorky byly následně opláchnuty čistou vodou po čtyřech výměnách po 10 minut, po dokončení oplachu byly uloženy v 80 % ethanolu a vystaveny mrazivému mediu, kosti krájel na 10 μm mrazícím mikrotomem a články prstů byly obarveny 0,05 % Kresolovou violetí (Kaczmariski et al. 2016). Jedinci byli sbíráni už mrtví u silnic ze dvou rozlišných míst, a to z venkova a z příměstské oblasti (Kaczmariski et al. 2016). V obou populacích převládaly 3-4 roky staří jedinci, nejmladší jedinec byl 2roční a nejstarší měl 7 let přičemž nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi populacemi (Kaczmariski et al. 2016). Podobný postup měl i Reinhard (2015) studoval věk a plodnost u druhu mloka alžírského (*Salamandra algira*), který se ale ve své práci nezmiňuje o dekalcifikaci, jeho vzorky byly 7 μm tenké. Beşer et al. (2017) zmiňuje ve své práci o věkové struktuře a velikosti těla u mertensiely kavkazské (*Mertensiella caucasica*) uchovávání části kostí v 70 % ethanolu následně opláchnutí a největší kosti dal na dekalcifikaci do 5 % kyseliny dusičné na 1,5-2 hodiny, dekalcifikované kosti

pak nechal přes noc v čisté vodě. Kostí pak nařezal v oblasti diafýzy na 18 µm tenké proužky kryostatickým mikrotomem, vzorky byly ponechány v hematoxylinu dle Ehrlicha po dobu 5 minut a následně byly vzorky přeneseny do glycerinu na podložní sklíčko (Beşer et al. 2017). Výsledné LAGy sledoval pod mikroskopem, všechny vzorky měly pod mikroskopem po obarvení jasné soustředné kruhovitě linie. Beşer (2017) také pozoroval linie po hibernaci a linie po aestivaci. Aestivační linie byly vždy světlejší barvy a blízko hibernačním liniím (Beşer et al. 2017). Farasat & Sharifi (2016), kteří měli výzkum na téma stárnutí a růst čolka luritánského (*Neurergus kaiseri*) zase použili metodu, kdy odstraněné kosti vložili do 70 % ethanolu a pro dekalifikaci zvolili kyselinu ethylendiamintetraoctovou, kterou nechali působit 24 hodin. Na rotačním mikrotomu pak nařezali kost na proužky na 8-10 µm a výsledky pak sledovali na světelném mikroskopu (Farasat & Sharifi 2016). Hodnotili celkem 73 vzorků z toho 27 samců a 46 samic, na vzorcích pozorovali silně hematoxylinové nepravidelné linie, vzorky odebírali dvakrát v roce v hlavních obdobích: reprodukční období (květen-červen) a období růstu (květen-listopad), přičemž většinu dospělých (97,26 %) získali v reprodukčním období (Farasat & Sharifi 2016). Mezi dospělci byl signifikantní rozdíl mezi velikostí samic a samců (Farasat & Sharifi 2016). Üzümlü & Olgun (2009) ve své práci: věk, velikost a růst čolka balkánského (*Triturus karelinii*) uvádí, že kosti napřed oplachoval pod tekoucí vodou 24 hodin, dekalifikoval 2 hodiny v 5 % kyselině dusičné a znova nechal pod vodou asi 12 hodin, pak řezal na mrazícím mikrotomu na 14-16 µm tenké plátky, tyto plátky obarvoval hematoxylinem dle Ehrlicha, poté je dal do glycerinu a pozoroval světelným mikroskopem. Cogălniceanu & Miaud (2003) píše o věkové struktuře a růstu populace u čtyř syntopických druhů obojživelníku obývajících lužní nivu. Použil pro dekalifikaci použil 3 % kyselinu dusičnou a nechal působit 1-4 hodiny, podle toho, jak byla kost velká, následně nechal kosti opláchnout pod tekoucí vodou 12 hodin, na mrazícím mikrotomu nařezal kost v místě diafýzy na 12-16 µm tenké plátky a tyto vzorky nabarvil hematoxylinem dle Ehrlicha (Cogălniceanu & Miaud 2003). Pozorování proběhlo světelným mikroskopem, kde u jednoho druhu čolka byli nejmladší dospělci u samců i samic 3 roky, zatímco u druhého druhu byli samci o rok dřív v dospělém stádiu než samice (Cogălniceanu & Miaud 2003). Kopecný (2009) zveřejnil výsledky svého výzkumu na věkovou strukturu populace čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*) rozmnožující se v malých periodických nádržích. Jeho úspěšnost byla 16 % s komentářem, že nedostatečně odstříhávali prsty (Kopecný

2009). Miaud et al. (2000) měl úspěšnot 42 %, ale třeba Diaz- Paniagua & Mateo (1999) uvádějí úspěšnost 95 %. Smirina & Roček (1976) měli dokonce 100 % úspěšnost.

Tab. 6: Porovnání dekalifikace a fyzikální fixace vzorků.

Autor	dekalifikace/čas	fixace
Oromi (2014)	3% HNO ₃ /5 min.	—
Piñeiro (2019)	5% HNO ₃ /1-3 hod.	parafin
Bülbül (2018)	5% HNO ₃ /2,5 hod.	parafin
Gustafson (2015)	10% formalin/ 72 hod. 10% CH ₂ O ₂ + 4% formalin/2-4	parafin
Kaczmariski (2016)	hod.	—
Reinhard (2015)	—	parafin
Beşer (2017)	5% HNO ₃ /2,5-3 hod.	—
Farasat & Shafiri (2016)	EDTA/24 hod.	—
Üzum & Olgun (2009)	5% HNO ₃ /2 hod.	—
Cogalnicean (2003)	3% HNO ₃ /1-4 hod.	—

Tab. 7: Ukázka několik metod skeletochronologie. Autor, fixace, dekalcifikace, tloušťka řezů, barvení (A Protocol for Aging Anurans Using Skeletochronology 2008).

Source ¹	Fixative	Decalcifier (type/duration)	Section ²	Stain (type ³ /duration)
Acker and others, 1986(a)	1-2% trypsin	RDO/2 h	15 µm/r	Delafield;s hema./30-35 m
Ash and others, 2003(u)	70% ethanol	3% nitric acid/6-8 h	15 µm/f	Ehrlich's hema./7 m
Bastien and Leclair, 1992(a)	ns ⁴	3%nitric acid/6 h	16 µm/f	Ehrlich's hema./ ns
Bruce and others, 2002(u)	(see Castanet and others, 1996)			
Castanet and others, 1996(u)	10%formalin/70% ethanol	3% nitric acid/1-2 h	15 & 20 µm/f	Ehrlich's hema./15 & 20 m
Driscoll, 1999(a)	Bouins Fluid	Bouins Fluid/overnight	7 µm/r	Ehrlich's hema./15 m
Eaton and others, 2005(a)	70% ethanol	RDO Rapid Decal/3 h	8 µm/r	Harris' hema./3-10 m
Eden and others, 2007(u)	70% ethanol	3% nitric acid/ns	20 µm/f	Harris' hema./ ns
Erismis and others, 2002	70% alcohol	5% nitric acid/4 h	10-12 µm/ns	ns/ns
Gibbons and McCarthy, 1983(a)	10% formol	Dilute formol-nitric acid/1-2 d	10-15 µm/ ns	Ehrlich's hema./ ns
Hasumi and Watanabe, 2007	10% formalin	5% formic or nitric acid/24 h+	8-16 µm/r	Carazzi's hema. or Jordet Dip-Quick/ns
Hemelaar, 1985(a)	(see Hemelaar and van Gelder, 1980)			
Hemelaar and van Gelder, 1980(a)	70% ethanol	5% formic acid/ ≥1 h	20 µm/f	Delafield's hema./30 m
Khonsue and others, 2002(a)	10% formalin	5% nitric acid/60-90 m	20-22 µm/f	Hayer's acid hemalum hema./30 m
Kumbar and Pancharatna, 2001(a)	10% formalin	5% nitric acid/ns	8 µm /r	Harris hema./ns
Kusano and others, 1995(a)	10% formalin	5% nitric acid/2-3 h	20 µm/f	Delafield;s hema./30 m
Kusrini and Alford, 2006(a)	4% formalin	10% formic acid/~24 h	10 µm/r	Mayer;s hema./ ns
Leclair, 1990(a)	(see Leclair and Castanet, 1987)			
Leclair and Castanet, 1987(a)	70% alcohol	3% Nitric acid/9 h	20 µm/f	Ehrlich's hema./25 m

Při pozorování vzorků pod světelným mikroskopem, jsem pozoroval pouze malé fragmenty rozdrčených kostí. Začátek výzkumu jsem zahajoval odnětím končetin od těla. Dalším krokem bylo vyvaření přebytečné tkáně. Mohlo dojít k několika chybám, které mohly nastat během následných kroků. Po vyvaření následovala, u některých vzorků, dekalcifikace v 5 % kyselině dusičné po dobu 1,5 hodiny. Můj postup dekalcifikace se shodoval hned s několika autory jako je např. Piñeiro (2019) a Beşer (2017), kteří taktéž použili 5 % kyselinu dusičnou po dobu 1,5 hodiny. Nejkratší dobu pro dekalcifikaci měl Oromi (2004), který použil 3 % kyselinu dusičnou po dobu jen 5 minut. Naopak nejdelší dekalcifikace trvala 5-7 hodin se 3 % kyselinou dusičnou (Gustafson 2015). Kaczmariski (2016) jako jeden z mála použil 10 % kyselinu mravenčí smíchanou se 4 % formalinem v poměru 1:1 a to po dobu 2-4 hodiny. Podle Reinharda (2015), který nepublikoval žádnou dekalcifikaci jsem některé vzorky hned vložil do parafínu bez dekalcifikace. Dalším krokem v mém výzkumu byla ethanolová řada, kdy si vzorky prošly několika kroky s různým poměrem ethanolu, kvůli odvodnění kosti. U žádného z nich jsem neviděl tento krok. Autoři zmiňují přechovávání vzorků v 70 % alkoholu. Několik z nich uvádí, že měli

nějaký krok po dekalifikaci, jako Kaczmariski (2016), který po dekalifikaci oplachoval kosti vodou po čtyřech výměnách a následně je uskladnil v 80 % ethanolu, pak nechal na vzorky působit mrazivé medium. Práce od Beşera (2017) informuje o ponechání vzorků v kohoutkové vodě do druhého rána. V tomto bodě jsem rozdělil vzorky, které prošly jinými postupy. Jeden z postupů bylo, že jsem kosti zafixoval do parafínu. Stejný postup uvádějí i Piñeiro (2019) a Gustafson (2015). Další postup bylo ponechání působení fixačního činidla ROTI® Histofix ECO Plus, které mělo obalit kost a tím snížit šanci na její rozdrčení při tlaku nože mikrotomu. Všechny vzorky uložené do parafínu jsem nechal vychladnout. Parafinové vzorky s kostmi jsem připevnil na dřevěnou kostku pomocí skalpelu a kahanu. Fixace na dřevěnou kostku jsem provedl kvůli lepšímu přichycení na mikrotomu. Mikrotom, který jsem použil byl posuvný. Na rozdíl od autorů jsem použil jiný typ mikrotomu. Posuvný mikrotom má nůž ve vertikální poloze. Náklon nože se dá změnit od 0 ° po 5 °. Vzorek se upevní do držáku a posouváním páčkou se posouvá nůž blíže ke kosti. Drtivá většina uvádí použití mrazícího mikrotomu, který má nůž horizontálně a vzorek se připevňuje pomocí mrazícího plynu. Nůž u mrazícího mikrotomu je v horizontální poloze a posouvá se pákou do půlkruhu. Dalším typem mikrotomu je mikrotom rotační, který je funkčně podobný posuvnému mikrotomu až na ten rozdíl, že rotační mikrotom má páčku, která se točí do kruhu. Výsledné řezy vypadají jako dlouhý koberec. Rotační mikrotom uvádí třeba Farasat & Sharifi (2016) či Bülbül (2018). Co se tloušťky řezů týče, každý autor uvádí jiné tloušťky. Nejtencí hodnoty měl Reinhard (2015), který řezal na 7 µm. Hned po něm následoval Kaczmariski (2016) s 10 µm. Piñeiro (2019) a Olgun (2009) uvádějí stejnou hodnotu 14-16 µm a nejtlustší vzorky měli Beşer (2017) a Gustafson (2015), kteří měli vzorky na 18-20 µm.

V mé práci jsem experimentoval i s tloušťkou řezu u všech částí kostí. V různých postupech je pokaždé uváděno jiná hodnota tloušťky řezu, v mém případě jsem zkoušel řezy na škále od 7 µm až po 50 µm. Ve studiích, viz výše, je uvedeno několik hodnot jako např. 14-16 µm (Beşer 2017), 18-20 µm (Gustafson 2015) nebo dokonce 8-10 µm (Farasat & Sharifi 2016). Odřezával jsem na větší škále hodnot, než jsou hodnoty v uvedených pracích, to však nepomohlo a kost se odštipovala či drtila při jakékoli tloušťce řezu. Je možné, že použitá břitva byla zastaralá a nemusela být tak ostrá jako nová. S nejlepšími vzorky jsem zkusil odstranit parafín a následně nabarvit. Další možnosti, proč mi výzkum nevyšel je ten, že při odstraňování parafínu roztokem

Histolu či barvení se mohly vzorky lehce spláchnout s vodou, kterou jsem umýval podložní sklíčka se vzorky i přes použití Pausterova kapátka a opatrného zacházení. Posledním krokem před samotným pozorováním je barvení. Drtivá většina autorů uvádí použití při barvení Ehlrichův hematoxylin. Pro moji práci jsem použil hematoxylin-eosin. Na trhu můžeme najít hned několik typů hematoxylinu. Beşer (2017), Gustafson (2015) i Olgun (2009) uvádějí použití hematoxylinu dle Ehlricha. Piñeiro (2019) ve své práci publikoval Harrisův hematoxylin a práce Bülbüla (2018) neuvádí žádný určitý typ hematoxylinu. Pod mikroskopem jsem buďto nenašel žádné vzorky anebo jsem pozoroval jen malé fragmenty rozdrčené kosti na kterých se nedaly vypožorovat LAGy. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl u vzorků s použitím tohoto činidla či bez.

6. Závěr

V mé práci jsem porovnával metody pro stanovení věku u ocasatých obojživelníků s důrazem na metodu skeletochronologii. Metoda SVL se ukázala jako málo přesná. Pro určování věku z krevních erytrocytů je dle mých současných poznatků málo publikací. Ze všech metod se ukázala metoda skeletochronologie jako nejpřesnější a časově méně náročná oproti jiným metodám. V mé studii nebylo možné stanovit věk *T. cristatus* nejspíš z důvodu nesprávného chemického postupu (problém v dekalifikaci a fixaci) anebo tupého nože na posuvném mikrotomu. Pro další výzkum bych zvolil jiný typ mikrotomu, jako např. kryo-mikrotom, který by mohl ulehčit práci se vzorky, které by nepotřebovaly fyzikální fixaci. Dále bych zvolil delší či odlišný typ dekalifikace. Jako posledním bodem bych se zaměřil na články prstů anebo kost *femur*. Tato práce i přesto může poskytnout cenné informace o určování věku u obojživelníků, zejména jedinců *T. cristatus*.

7. Literatura

- Alford RA, Richards SJ. 1999. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1999. 30:133–65
- Altunışık A, Kalaycı TE, Uysal İ, Tosunoğlu M, Özdemir N. 2016. Age, adult survival rate, and adult life expectancy of a *Podarcis tauricus* population (reptilia: lacertidae) from saros bay, Turkey. Russ J Herpetol. 23(4):278–282.
- Arantes Í da C, Vasconcellos MM, Boas TC V., Veludo LBA, Colli GR. 2015. Sexual Dimorphism, Growth, and Longevity of Two Toad Species (Anura, Bufonidae) in a Neotropical Savanna. Copeia. 103(2):329–342.
- Arikan H, Çiçek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: A review. North West J Zool. 10(1):190–209.
- Baker J, Beebee T, Buckley J, Gent T, Orchard D, Teacher A, Bennett A, Bernhard T, Brady L, Coward D, et al. 2011. Amphibian Habitat Management Handbook. Bournemouth.
- Beşer N, Avcı A, Ilgaz Ç, Tuniyev SB, Tuniyev BS, Üzüm N. 2017. Age structure and body size of *Mertensiella caucasica* (waga, 1876) (caudata: Salamandridae) in a population from Turkey. Russ J Herpetol. 24(3):202–208.
- Borczyk B, Paško Ł. 2012. How Precise are Size-Based Age Estimations in the Sand Lizard (*Lacerta Agilis*)? Zool Pol. 56(1–4):11–17.
- Bouragaoui Z, Nouira S. 2019. Age Determination in the Sand Lizard *Psammmodromus algirus* (Reptilia; Lacertidae) by Means of Skeletochronology. Curr Herpetol. 38(2):173–179.
- Brockes JP. 1997. Amphibian limb regeneration: Rebuilding a complex structure. Science (80-). 276(5309):81–87.
- Brum AJC, Loebens L, Dos Santos MB, Cechin SZ. 2019. First record of growth rings for 11 native subtropical anuran species of South America. An Acad Bras Cienc. 91(4):1–7.
- Bülbül U, Eroğlu AI, Kurnaz M, Kaya ZM, Koç H, Eroğlu SA. 2018. Age structure and some growth parameters in a population of *Bombina bombina* (L., 1761) from Turkey. Russ J Herpetol. 25(3):221–226.

- Cajade R, Marangoni F, Gangenova E. 2013. Age, body size and growth pattern of *Argenteohyla siemersi pederseni* (Anura: Hylidae) in northeastern Argentina. *J Nat Hist.* 47(3–4):237–251.
- Campbell LJ, Garner TWJ, Tessa G, Scheele BC, Griffiths AGF, Wilfert L, Harrison XA. 2018. An emerging viral pathogen truncates population age structure in a European amphibian and may reduce population viability. *PeerJ.* 2018(11):1–20.
- Carranza S, Oromí N, Amat F, Sanuy D. 2015. Sexual dimorphism and age structure of the Montseny newt (*Calotriton arnoldi*). *Amphib Reptil.* 36(3):245–252.
- Caetano M. H. & Leclair R. Jr. (1999): Comparative phenology and demography of *Triturus boscai* from Portugal. – *J. Herpetol.* 33: 192–202.
- Castanet AJ, Newman DG, Girons H Saint, Herpetologica S, Mar N. 2014. Herpetologists ' League Skeletochronological Data on the Growth , Age , and Population Structure of the Tuatara , *Sphenodon punctatus* , on Stephens and Lady Alice Islands , New Zealand SKELETOCHRONOLOGICAL DATA ON THE GROWTH , AGE , AND POPULATION STRUCTU. 44(1):25–37.
- Çevik IE, Arikan H, Kaya U, Atatür MK. 2006. Comparative morphological and serological studies of three Anatolian Mountain frogs, *Rana macrocnemis*, *R. camerani* and *R. holtzi* (Anura, Ranidae). *Amphib Reptil.* 27(1):63–71.
- Clarke R. D., (1972): The effect of toe clipping on survival in Fowler's toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Copeia* 1972: 182–185.
- Cogălniceanu D, Băncilă RI, Plăiașu R, Roșioru D, Merilä J. 2017. Small-scale spatial and temporal variation of life-history traits of common frogs (*Rana temporaria*) in sub-Arctic Finland. *Polar Biol.* 40(8):1581–1592.
- Cogălniceanu D, Miaud C. 2003. Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Can J Zool.* 81(6):1096–1106.
- Comas Mar, Reguera S, Zamora-Camacho FJ, Salvado H, Moreno-Rueda G. 2016. Effectiveness of phalanx skeletochronology to estimate age in living reptiles. *PeerJ Prepr.*

Comas M., Reguera S, Zamora–Camacho FJ, Salvadó H, Moreno–Rueda G. 2016. Comparison of the effectiveness of phalanges vs. humeri and femurs to estimate lizard age with skeletochronology. *Anim Biodivers Conserv.* 39(2):237–240.

Diaz–Paniagua C. & Mateo J. A. (1999): Geographic variation in body size and life–history traits in Bosca’s newt (*Triturus boscai*). – *Herpetol. J.* 9: 21–27.

Ento K, Matsui M. 2002. Estimation of Age Structure by Skeletochronology of a Population of *Hynobius nebulosus* in a Breeding Season (Amphibia, Urodela). *Zoolog Sci.* 19(2):241–247.

Farasat H, Sharifi M. 2016. Ageing and Growth of the Endangered Kaiser’s Mountain Newt, *Neurergus kaiseri* (Caudata: Salamandridae), in the Southern Zagros Range, Iran . *J Herpetol.* 50(1):120–125.

Gao J, Li X, Zhang Y, Wang H. 2018. Endochondral ossification in hindlimbs during *bufo gargarizans* metamorphosis: A model of studying skeletal development in vertebrates. *Dev Dyn.* 247(10):1121–1134.

Guarino FM, Crottini A, Mezzasalma M, Randrianirina JE, Andreone F. 2019. A skeletochronological estimate of age and growth in a large riparian frog from Madagascar (Anura, Mantellidae, *Mantidactylus*). *Herpetozoa.* 32:39–44.

Guarino FM, Crovetto F, Mezzasalma M, Salvidio S. 2015. Population size, age structure and life expectancy in a *Lacerta agilis* (Squamata; Lacertidae) population from northwest Italian Alps. *North West J Zool.* 11(2):241–246.

Gustafson DH, Malmgren JC, Mikusiński G. 2011. Terrestrial Habitat Predicts use of Aquatic Habitat for Breeding Purposes — A Study on the Great Crested Newt (*Triturus cristatus*) . *Ann Zool Fennici.* 48(5):295–307.

Gustafson KD, Newman RA, Pulis EE, Cabarle KC. 2015. A Skeletochronological Assessment of Age–Parasitism Relationships in Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) . *J Herpetol.* 49(1):122–130.

Harper LR, Downie JR, McNeill DC. 2019. Assessment of habitat and survey criteria for the great crested newt (*Triturus cristatus*) in Scotland: a case study on a translocated population. *Hydrobiologia.* 828(1):57–71.

- Hlaváč. 2018. Hodnocení fragmentace krajiny dopravou - metodická příručka. AOPK.
- Janků M. 2017. Behaviorální odpověď čolka obecného (*Lissotriton vulgaris*) v konfrontaci s původními a nepůvodními predátory.
- Jehle R. 2000. The terrestrial summer habitat of radio-tracked great crested newts (*Triturus cristatus*) and marbled newts (*T. marmoratus*). Herpetol. J. 10:137-142.
- Kaczmariski M, Kolenda K, Rozenblut-Kościsty B, Sośnicka W. 2016. Phalangeal bone anomalies in the European common toad *Bufo bufo* from polluted environments. Environ Sci Pollut Res. 23(21):21940–21946.
- Kanat B, Tok CV. 2015. Age structure of *Hemidactylus turcicus* (L., 1758) (Sauria: Gekkonidae) from southwestern Anatolia (Muğla, Turkey). Turkish J Zool. 39(3):373–377.
- Kopecký. 2009. Věková struktura populace čolka horského (*Mesotriton alpestris*) rozmnožující se v malých periodických nádržích. (May 2014).
- Kráska A. 2009. Globální úbytek obojživelníků. Ochr přírody.(5):30–33.
- Kumbar SM, Lad SB. 2017. Determination of age and longevity of road mortal Indian common toad *Duttaphrynus melanostictus* by skeletochronology. Russ J Herpetol. 24(3):217–222.
- Kuzmin SL. 2001. Current State of *Triturus cristatus* Populations in the former Soviet Union. :5–22.
- Langton T, Beckett C, Foster J. 2001. Great Crested Newt Conservation Handbook. Froglife, Halesworth.
- López JA, Antoniazzi CE, Llanes RE, Ghirardi R. 2017. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. Amphib Reptil. 38(3):371–379.
- Lukanov S, Tzankov N. 2016. Life history, age and normal development of the Balkan-Anatolian crested newt (*Triturus ivanbureschi*) Arntzen and Wielstra, 2013) from Sofia district. North West J Zool. 12(1):22–32.

Mačát Z. 2019. Morfológ ická analýza a aktualizace rozšíření velkých čolků na Znojemsku.

Makovický Peter, Kopecký O, Makovický Pavol, Matlach R. 2015. The using of skeletochronology as a screening method for age determination of Alpine newts (*Mesotriton alpestris*): A technical report. Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun. 63(2):439–446.

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.

Malmgren JC, Andersson PA, Ekdahl S. 2007. Modelling terrestrial interactions and shelter use in great crested newts (*Triturus cristatus*). Amphib Reptil. 28(2):205–215.

Marangoni F, Barrasso DA, Cajade R, Agostini G. 2012. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. North West J Zool. 8(1):63–71.

Mazerolle MJ. 2015. Estimating Detectability and Biological Parameters of Interest with the Use of the R Environment. J Herpetol. 49(4):541.

McCreary B. 2008. A Protocol for Aging Anurans Using Skeletochronology. U.S. Geological Survey Open-File Report 2008-1209, 38 pp.

Mednikov DN. 2009. Development of limbs in urodeles and the origin of tetrapod limbs. Biol Bull. 36(2):148–158.

Miaud C., Guyétant R. & Faber H. (2000): Age, size, and growth of the alpine newt, *Triturus alpestris* (Urodela : Salamandridae), at high altitude and a review of life–history trait variation throughout its range. – Herpetologica 56: 135–144.

Monello RJ, Wright RG. 2001. Predation by Goldfish (*Carassius auratus*) on Eggs and Larvae of the Eastern Long-Toed Salamander (*Ambystoma macrodactylum columbianum*). J Herpetol. 35(2):350.

Ngo B V., Lee YF, Ngo CD. 2020. Tadpole survival and metamorphosis in the granular spiny frog, *Quasipaa verrucospinosa* (Dicroglossidae, anura, amphibia) in central vietnam. Russ J Herpetol. 27(2):63–69.

- Oromi N, Amat F, Sanuy D, Carranza S. 2014. Life history trait differences between a lake and a stream-dwelling population of the Pyrenean brook newt (*Calotriton asper*). *Amphib Reptil.* 35(1):53–62.
- Osikowski A, Cierniak-Zuzia K. 2013. Cloacal Anatomy of the Male Carpathian Newt, *Lissotriton montandoni* (Amphibia, Salamandridae), in the Breeding Season . *Zoolog Sci.* 30(9):748–753.
- Pietiäinen M, François P, Hyyryläinen HL, Tangomo M, Sass V, Sahl HG, Schrenzel J, Kontinen VP. 2009. Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of vraDE and vraSR in antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 10:429.
- Piñeiro JM, Cajade R, Curtis A, Ingaramo MDR, Marangoni F. 2019. Chronology of the LAGs formation and body growth in *Argenteohyla siemersi* from northeastern Argentina. *North West J Zool.* 15(2):152–156.
- Pörtner H. 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften.* 88(4):137–146.
- Psittacosis E-M. 1973. JO URN A L u REg'LN~~~~~ Tseg. *Br Med J.* 23(October):229–232.
- Reinhard S, Renner S, Kupfer A. 2015. Age and fecundity in *Salamandra algira* (Caudata: Salamandridae). *Salamandra.* 51(1):19–24.
- Roček, Z. (1992): rod *Triturus* Rafinesque, 1815 – Čolek, Mlok, 107-132 pp. Baruš V., Oliva O., Král B., Opatrný E., Reháč I., Roček Z. Roth P., Špinar Z. & Vojtková L.: Fauna ČSFR, svazek 25, Obojživelníci (Amphibia). Academia, Praha, str. 85–87.
- Roitberg ES, Smirina EM. 2006. Age, body size and growth of *Lacerta agilis* boemica and *L. strigata*: A comparative study of two closely related lizard species based on skeletochronology. *Herpetol J.* 16(2):133–148.
- Sinsch U. 2015. Life-History Traits in Amphibians. *Herpetol J.* 25(January):5–13.
- Sinsch U, Leskovar C, Drobig A, König A, Grosse WR. 2007. Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: Indicators of habitat quality. *Can J Zool.* 85(5):665–673.

- 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.
- 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. Amphib Reptil. 31(2):239–250.
- Sun Y, Xiong J, Lv Y, Zhang Y. 2016. Age, body size, and growth in a population of the asiatic toad *Bufo gargarizans* from central China. Russ J Herpetol. 23(1):35–40.
- Székely D, Denoël M, Székely P, Cogălniceanu D. 2017. Pond drying cues and their effects on growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. J Zool. 303(2):129–135.
- Szrek P. 2020. Comments on distribution and taphonomy of Devonian placoderms in the holy cross mountains, Poland. Bull Geosci. 95(1):23–39.
- Tomašević Kolarov N. 2013. Heterochrony and limb form variation in crested newts. J Zool. 290(1):68–79.
- Urszán TJ, Török J, Hettyey A, Garamszegi LZ, Herczeg G. 2015. Behavioural consistency and life history of *Rana dalmatina* tadpoles. Oecologia. 178(1):129–140.
- Üzüm N, Olgun K. 2009. Age and growth of the Southern Crested Newt, *Triturus karelinii* (Strauch 1870), in a lowland population from northwest Turkey. Acta Zool Acad Sci Hungaricae. 55(1):55–65.
- Vasilyan D, Böhme M. 2012. Pronounced Peramorphosis in Lissamphibians-*Aviturus exsecratus* (Urodela, Cryptobranchidae) from the Paleocene-Eocene Thermal Maximum of Mongolia. PLoS One. 7(9):1–10.
- Vojar J. 2007. Ochrana obojživelníků: ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana. Biol Conserv. 79:157.
- Witzmann F, Soler-Gijón R. 2010. The bone histology of osteoderms in temnospondyl amphibians and in the chroniosuchian *Bystrowiella*. Acta Zool. 91(1):96–114.

Woodley S. 2015. Chemosignals, hormones, and amphibian reproduction. *Horm Behav.* 68:3–13.

Zavadil V, Sádlo J, Vojar J. 2011. Biotopy našich obojživelníků a jejich management. *Metod AOPK ČR.*:91.

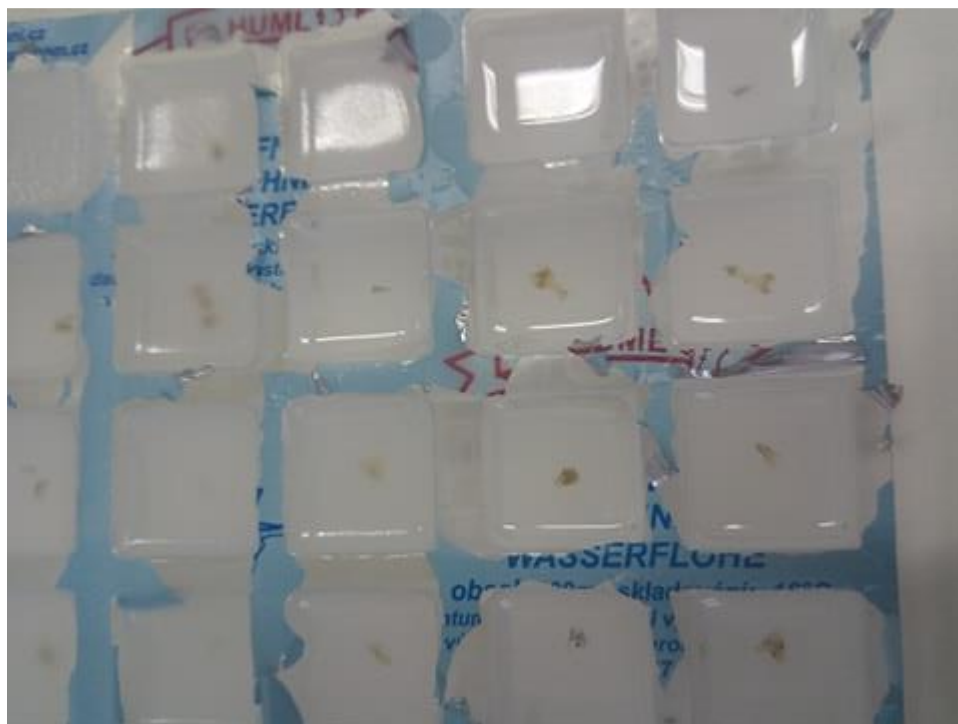
8. Přílohy



Příloha 1: Oddělování končetin od těla.



Příloha 2: Vyvařování přebytečné tkáně.



Příloha 3: Fixace kostí do parafínu.



Příloha 4: Posuvný mikrotom s připraveným vzorkem.



Příloha 5: Odstranění parafínu použitím histolu.