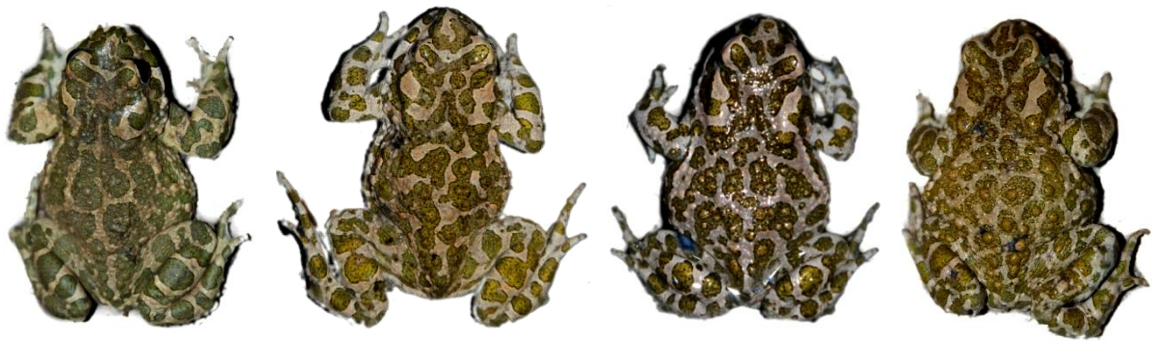


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



Individuální značení a rozpoznávání obojživelníků

Bakalářská práce



Tereza Holicová

Školitelka: RNDr. Robovská Pavla, Ph.D.

České Budějovice 2012

Holicová, T., 2012: Individuální značení a rozpoznávání obojživelníků –[Individual marking and identification of amphibians. Bc. Thesis, in Czech.] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This thesis contains the compilation of marking techniques in amphibians. It compares their advantages and disadvantages based mainly of their application in practice and also the comparison of these methods. The thesis is most focuses on pattern maps method and its application to the amphibian species of Czech Republic. This thesis also contains a test of this method on selected species.

Prohlášení

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

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

České Budějovice 27. 4. 2012

Tereza Holicová

Poděkování

Děkuji především mé školitelce Pavle za příkladné vedení a odborné rady při tvorbě této bakalářské práce, dále jí děkuji za pomoc při mapování kuňky žlutobřiché. Srdečný dík patří i Pavlu Sucháčkovi především za pomoc při nočním mapování ropuchy zelené, ale i psychickou podporu. Heleně Strakové děkuji za poskytnutí fotografií kuněk z předchozích let výzkumu na Omleničce. Přírodovědecké fakultě děkuji za poskytnutí finanční částky na pokrytí nákladů za cestovné. A také nemalý dík patří všem jedincům žab, kteří se nechali odchytit pro pokus.

OBSAH

1	Úvod	1
1.1	Techniky značení obojživelníků	1
1.2	Invazivní metody značení	1
1.2.1	Zastříhávání prstů (ocasu)	1
1.2.2	Cejchování	4
1.2.3	Autotransplantace	6
1.2.4	Tetování	7
1.2.5	VIE (Visible implant elastomers – Viditelný implantovaný elastomer)	7
1.2.6	Akrylové polymery	8
1.2.7	VIAalpha značky (Visible Implant Alphanumeric tags – Viditelné implantované alfanumerické značky).....	8
1.2.8	PIT (passive integrated transponders - Pasivní integrované transpondéry)	9
1.2.9	Radioaktivní značení	10
1.2.10	Kroužky, pásy.....	11
1.2.11	Telemetrie	12
1.3	Neinvazivní metody značení.....	13
1.3.1	Metoda přirozených vzorů (pattern maps).....	13
1.4	Značení červorů	15
2	Diskuse rešeršní části	16
2.1	Srovnání metod	16
2.2	Metoda přirozených vzorů s ohledem na druhy obojživelníků v ČR	19
3	Cíle práce.....	21
4	Metodika.....	21
4.1	Ropucha zelená	22
4.2	Kuňka žlutobřichá.....	22
5	Diskuse metodiky	23
5.1	Výběr metody, monitorovaného druhu	23
5.2	Zhodnocení metody přirozených vzorů	24
5.2.1	Vyhodnocení metody přirozených vzorů - ropucha zelená	25
5.2.2	Vyhodnocení metody přirozených vzorů - kuňka žlutobřichá	26
6	Závěr.....	28
7	Literatura	29

1 Úvod

1.1 Techniky značení obojživelníků

Každý výzkum, ať laboratorní nebo terénní, vyžaduje odlišení testovaných subjektů pro budoucí identifikaci, jestliže značíme skupiny – mají všichni jedinci v této skupině stejné značení, chceme-li značit individuálně jednotlivce, každý jedinec má svoji unikátní značku (Seber 1982). K nejčastějším terénním studiím patří metoda mark-recapture, která je považována za spolehlivou metodu k demografickým výzkumům a všem jejich aspektům (Schmidt 2003). Každý experiment má své nároky, pro mark-recapture studie musí být značky unikátní, snadno interpretovatelné, trvalé nebo dlouhodobé a nesmí mít vliv na chování nebo přežití studovaného zvířete (Otis et al. 1978).

Značení obojživelníků navíc stěžuje fakt, že patří mezi zvířata, která se značí obtížně. Značení obojživelníků stěžuje jejich poměrně malá velikost. Dále jejich citlivá kůže (Halliday 1996), která se navíc rychle obměňuje a kterou po malých částech svlékají. Obojživelníci jsou rovněž proslulí svojí regenerační schopností, z čehož vyplývá další nesnáze při značení zvláště pak toho dlouhodobého.

Experimentátor by proto měl při výběru vyhovující nebo alespoň přijatelné metody značení brát v úvahu povahu a dobu značení, rozsah ovlivněné tkáně, stres a možné negativní vlivy vyplývající ze značení, jako je vyšší riziko predace, snížená schopnost rozmnožování nebo riziko infekce (Steven et al. 2004). Ricker (1956) navrhl čtyři podmínky, které by měly metody značení splňovat (1) neměly by mít vliv na přežití nebo chování jedinců, (2) neměly by ovlivnit individuální úspěšnost zachycení, (3) metoda by měla rozlišit jedince individuálně, (4) měla by být dlouhodobá.

Značení obojživelníků je velmi různorodé, praktikované techniky jsou podrobněji rozepsané v následujících odstavcích.

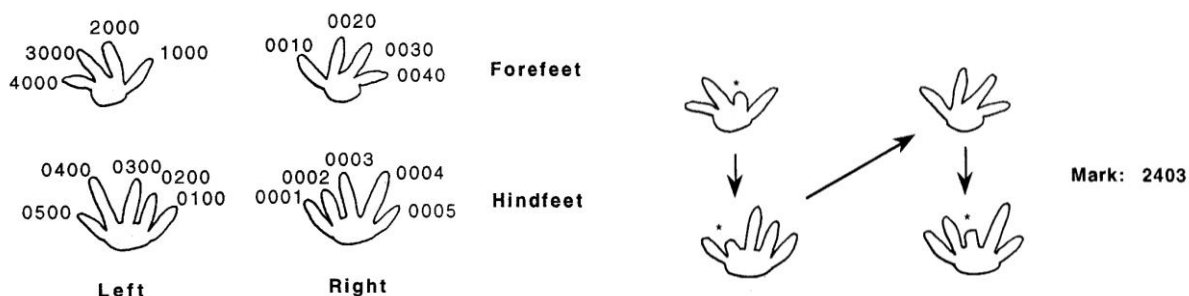
1.2 Invazivní metody značení

Mohou být různých typů, nicméně při jakékoliv invazivní metodě dochází k narušení těla obojživelníka, a to v menší nebo větší míře.

1.2.1 Zastřihávání prstů (ocasu)

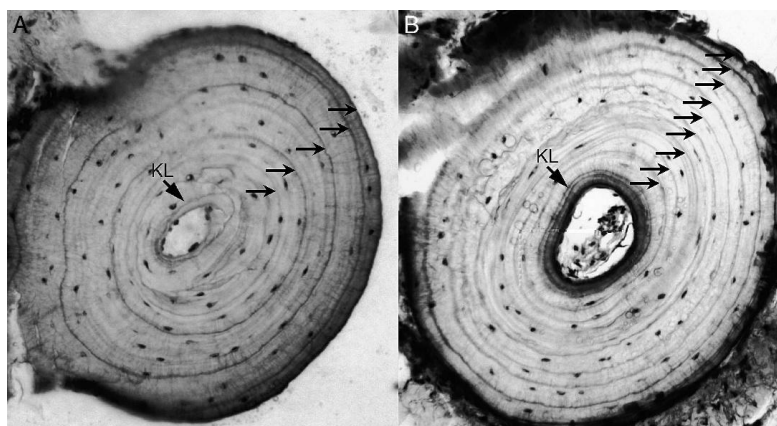
Mezi nejčastěji používanou metodu patří stříhání prstů, u ocasatých obojživelníků se také někdy zastřihává ocasní ploutevní lem (Parris & McCarthy 2001), stejně jako u larválních stádiích (Turner 1960). Tuto metodu jako první popsal Bogert (1947). Konkrétně se tedy

jedná o amputaci prstu, buď u jeho báze nebo nad plovací blánou (Clark 1972, Lemckert 1996). Odstřížením různých prstů na různých končetinách, vznikne unikátní kombinace pro každého jedince (McCarthy & Parris 2004). Jednotlivé kombinace se liší počtem a umístěním odstřížených prstů. Marfot (1953) vyvinul systém číslování, který umožnil individuální identifikaci 6399 jedinců, s maximálním odstraněním dvou prstů na jednu končetinu. Několik dalších kódujících systémů navrhl Donnelly et al. (1994) (Obr 1.), avšak kódující systém většinou záleží na osobním vkusu a zkušenosti experimentátora.



Obr. 1 : Schematické znázornění kombinace, vytvářející unikátní značení (Donnelly et al. 1994).

K výhodám tohoto značení patří i odběr tkáně, která může posloužit například pro pozdější genetické a molekulární analýzy, k detekci nemocí, jenž obojživelníky postihují (Funk et al. 2005) nebo k určení věku podle metody skeletochronologie (Yilmaz et al. 2005). Skeletochronologie, je metoda, která určuje věk zvířete na základě letokruhů kosti (McCreary et al. 2008). Zejména obojživelníci žijící v mírném pásu, rostou v teplém období a v chladnějším období dochází ke zpomalení jejich růstu, čímž se vytváří opakované vzory v jejich kostech (Obr. 2). Linie vytvořené v období hibernace lze počítat podobně jako letokruhy u stromů v mírném pásu (Hemelaar & van Gelder 1980).



Obr. 2: (A) 5 let starý samec, (B) 9 let stará samice (Wen Bo Liao & Xin Lu 2010).

K nevýhodám patří různá míra poškození tkání a stres, jenž u zvířete může vyvolat negativní vlivy spojené především s příjmem potravy, dále zvyšuje riziko infekce, zánětu nebo nekrózy (Clarke 1972), a to buď následnou infekcí, nebo přenesením pomocí nástroje. Proto je nezbytné před značením dalšího jedince nástroj dezinfikovat, například ponořením do alkoholu a následným vypálením (Steven et al. 2004). Pravděpodobnost opětovného odchycení je rovněž nižší (Clarke 1972), označení jedinci mohou mít sklon opustit studovanou oblast v návaznosti na prožitý stres (Lemckert 1996). Současnou hrozbou je i vyšší riziko chytridiomykózy. Chytridiomykóza je houbové onemocnění obojživelníků způsobené houbou *Batrachochytridium dendrobatidis*, které se rozšířilo po celém světě a způsobuje populační poklesy nebo v krajních případech až vyhynutí obojživelníků v dané oblasti (Daszak et al. 1999, Carey et al. 2003). Epidemiologické studie *B. dendrobatidis* naznačují, že tato houba pochází z Afriky a rozšířila se pomocí světového obchodu s drápatkami vodními (*Xenopus laevis*) (Weldon et al. 2004). Úmrtnost a čas smrti napadeného jedince je ovlivněna jeho věkem a druhem, teplotou okolí a rozsahem infekce (Berger et al. 1999, Lamirande & Nichols 2002, Woodhams et al. 2003).

Z etického hlediska je tato metoda sporná a jeví se jako krutá (May 2004, Funk et al. 2005). Proto se ve snaze zmírnit bolest používají analgetika nebo sedativa, ale i ty mohou mít negativní vliv na obojživelníkovu homeostázu. Žádný druh anestetika navíc není stejně účinný pro různé druhy, a to kvůli jejich druhově specifickým reakcím (Fellers et al. 1994). Chemický zásah sice zvyšuje a ulehčuje dobu manipulace, nicméně zvyšuje i dobu regenerace, čímž pravděpodobně zvířeti působí další stres, mimo to, bolest je adaptivní odpověď, která snižuje využití končetiny v průběhu hojení (Steven et al. 2004). Další nevýhodou může být přirozené zranění jedince, konkrétně ztráty prstu nebo části končetiny, které naruší kódovací systém, nebo ke ztrátě značky může naopak vést rychlá regenerace, kterou jsou obojživelníci proslulí. Regenerační schopnosti jsou zvláště problematické u ocasatých obojživelníků (Caudata) (Davis & Ovaska 2001), ale tyto regenerační schopnosti se objevují u i některých druhů žab (Anura), nicméně jen malý počet rodů byl dobře prostudován (Scadding 1980). Thornton (1949) zjistil, že dusičnan berylnatý inhibuje regeneraci. Heatwole (1961) na jeho studie navázal, při pokusech na mločikovi popelavém (*Plethodon cinereus*) a potvrdil zpomalení nebo úplné zastavení regenerace v závislosti na normalitě roztoku. Nicméně dusičnan berylnatý může přivodit otoky na postižených končetinách nebo dokonce smrt (Thornton 1949).

Míra poškození a možný negativní vliv, zvláště u jedinců s více ustřiženými prsty (efekt nezávisí na konkrétním prstu, u všech je stejný), znamená narušení schopnosti pohybu a rovnováhy. Prsty slouží jako podpora rovnováhy a pohybu. Adhezní lepící disky na prstech stromových druhů žab, umožňují pohyb ve strmé až svislé poloze, prsty dále souvisí s řadou jiných činností obojživelníků, jako je hrabání (například nor) nebo při uchop při páření (amplexus). Není tedy divu, že odstraněním většího množství prstů se zvyšuje i možný negativní efekt na přežití nebo změnu chování jedince. Tato problematika je předmětem mnoha studií. McCartney a Parris (2004) ve dvouleté studii (2003 – 2004), zabývali právě touto otázkou - tedy jaký vliv má zastřihávání prstu na tělesnou kondici značených oproti neznačeným jedincům. Experiment se uskutečnil nedaleko rumunského města Sighișoara a modelovým organismem byla kuňka žlutobřichá (*Bombina variegata*). Pečlivé posouzení všech jedinců nezachytilo žádné známky infekce, studie tedy neprokázala predikce nižší tělesné kondice u značených jedinců. Zdá se tedy, že zastřihávání prstů nemá žádný nebo velice malý vliv na fitness jedince v krátkodobém horizontu, dále nebylo narušeno ani reprodukční chování jedinců, byli pozorováni jak volající, tak spárování samečci se zastřihnutými prsty (Hartel & Nemes 2006). Oproti tomu Golay a Durrer (1994) uvádějí, že zastřihnutí prstů u ropuchy krátkonohé (*Epidela calamita*) může vést k infekci a nekróze občas postihující i celou končetinu. Avšak z literatury se tato metoda jeví jako nejlepší možná, a to zejména u druhů bez barevných vzorů. V současnosti se objevuje kombinování této metody s jinými, zejména kvůli snížení počtu uříznutých prstů. Například hybridní metoda VIE-C kombinuje zastřihávání prstů (C:toe-clipping) s viditelným implantovaným elastomerem (viz kapitola 1.2.5.) (Hoffmann et al. 2008, Campbell et al. 2009).

1.2.2 Cejchování

Cejch neboli značku, vytvoříme poškozením tkáně, které můžeme způsobit nadměrným teplem, zimou nebo použitím chemikálie. Značkami mohou být symbolické tvary, nebo alfanumerické kódy, které identifikují buď jedince nebo skupinu. Vzniklá značka může vydržet až po celý život zvířete (Beausoleil et al. 2004).

Vymrazování - při této metodě se používá značkovací železo, nejčastěji vyrobené z oceli, nerezové oceli, mosazi nebo mědi a jejich slitin (ty se zdají být nejúčinnější). Namočením do tekutého dusíku nebo suchého ledu kovový předmět zchladíme, přiložením na kůži vytvoříme unikátní značku (Obr. 3). Zasažená tkáň postupně ztrácí pigment, protože tato metoda selektivně ničí melanocyty (buňky produkující pigment). Doba, kdy ponecháváme

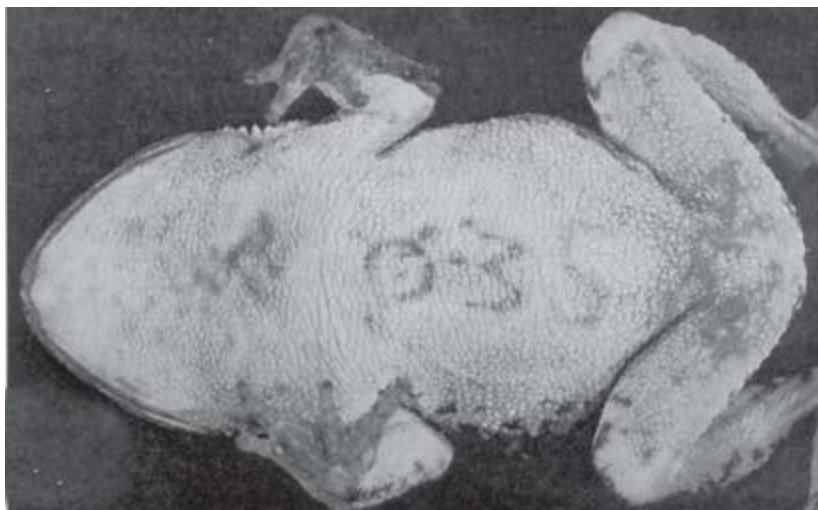
kov na těle jedince, však nesmí být příliš dlouhá. Pro značení dalšího jedince je nutné kov opět zchladit. Individuální kódování je většinou numerické nebo alfanumerické a mohou jím být označeny až stovky jedinců. Čitelnost tohoto značení je velmi dobrá již po 24 hodinách i po 24 měsících (Daugherty 1979).



Obr. 3: Ukázka vymrazování na drápatce vodní (*Xenopus leavis*), jedinec na obrázku vlevo má dvouletou značku znázorňující č. 089 pro individuální identifikaci (www.botany.uwc.ac.za/presents/focuson/frogs/freeze.htm).

Cejchování teplem, neboli vypalování, probíhá stejně jako vymrazování s tím rozdílem, že železo je zahřáno na vysokou teplotu. Nástroje jsou vyrobeny z oceli nebo litiny. Způsob zahřátí může být různý, od přímého vytápění, elektřinu až po otevřený oheň, a využívá stejné značení jako vymrazování (Obr. 4). Přestože teplo sterilizuje zranění samo o sobě, následné riziko infekce je vzhledem k závažnosti poškození a času nutnému k zahojení vyšší než u jiných invazivních značení (Beausoleil et al. 2004). U obojživelníků je nutné věnovat zvýšenou pozornost jejich kůži, kvůli jejímu fyziologickému významu. Vypalování může způsobit fatální ztráty vody (Ferner 1979). Navíc cejchování pomocí tepla způsobuje větší bolest a obtíže než vymrazování (Schwartzkopf–Genswein et al. 1997), nicméně v roce 2000 vymyslel Ehmann systém malých bodových značek. Značky jsou umístěné na různých částech těla a každá část těla má přidělený kód. Například pravá přední noha jsou jednotky, počet značek na ní odpovídá číslům 1-9, levá přední noha desítky, počet značek na ní odpovídá desítkám 10-90, na dalším místě odpovídá stovkám a pak tisícům, čímž dohromady vzniká unikátní značení – identifikační číslo – a to pro velký počet jedinců. Navíc tato technika snižuje manipulační čas a pravděpodobně i riziko infekce. Objevují se však nové problémy, rozptýlené bodové značky mohou narušit kryptické zbarvení či vzory

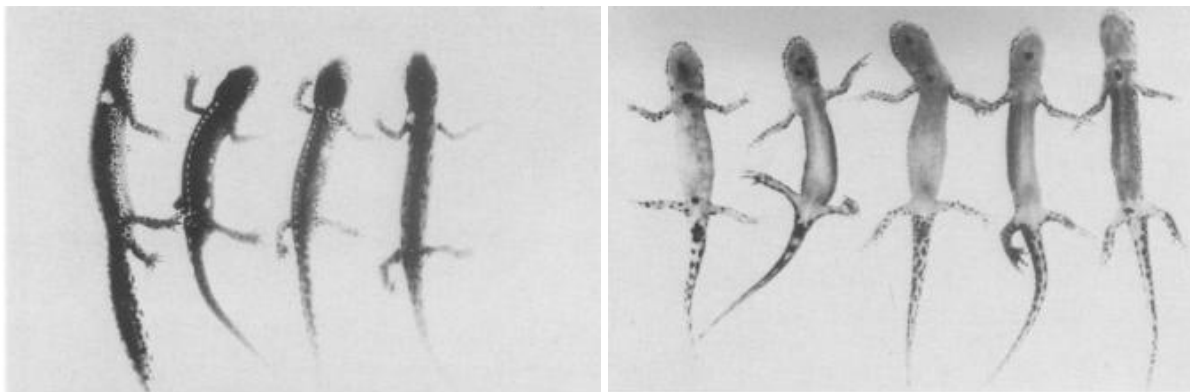
nebo sociální signalizaci (Murray & Beacham 1990). Navíc se zhoršuje i rychlost čtení a zvyšuje chybovost (Beausoleil et al. 2004).



Obr. 4: Ropucha zahradní (*Incilius valliceps*) označena individuálně (035) vypalováním (Clark 1971).

1.2.3 Autotransplantace

Použitím vlastní kůže, neboli transplantátu, k značení můžeme odlišit různé populace. Tento zákrok provedl Rafijski (1977) u druhu čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*) (Obr. 5). Z oranžově zbarvené ventrální strany se vystříhne kousek kůže cca 3 x 3mm, druhý, stejně velký, kousek vystříhne z dorzální strany a tyto transplantáty pak vzájemně vyměníme. Nemusíme přidávat žádné lepidlo, plazmový exudát by měl transplantát dostatečně udržet. Po zákroku je nutné uchovat daného jedince mimo vodu a samostatně. Výhodou této metody je dlouhá trvanlivost, naopak nevýhodné je, že metoda může být užitá jen u druhů s kontrastními barvami, dále potřeba dlouhé doby manipulace (Rafijski 1977).



Obr. 5: čolci horští (*Ichthyosaura alpestris*) značení pomocí transplantované kůže (Rafijski 1977).

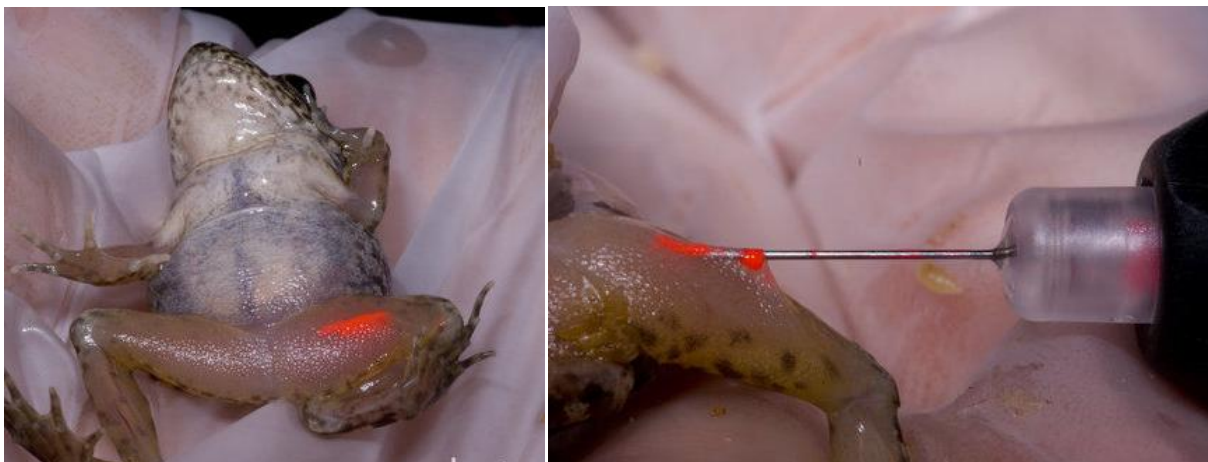
1.2.4 Tetování

Kaplan (1958) byl první, kdo značil obojživelníky vkládáním inkoustu pod jejich kůži. Při tetování se pomocí tetovacího strojku aplikuje dané barvivo pod tlakem skrze malý otvor (Wisniewski et al. 1979). Ještě před značením by měly být vyřešeny tři potenciální problémy: (1) výběr barviva, jenž bude kontrastovat s přirozenou pigmentací kůže daného druhu, (2) výběr barviva, které neztratí čitelnost kvůli zvětšování plochy nebo UV degradaci barviva, (3) toxicita, daného barviva, ale i rozpouštědla. Tedy barva i rozpouštědlo by měly být netoxické, nejsou-li známé účinky, měly by být provedeny laboratorní testy (Steven et al. 2004). Problémem může být i vytvoření velkého počtu individuálních značek, jelikož s vyšší složitostí značení se zvyšuje i čas čtení značky (Maesey et al. 2001). Vytetované skvrny navíc postupně ztrácí čitelnost a mizí z důvodu regenerace kůže (Perret & Joly 2002). Problémem pro samotné zvíře pak mohou být zářivé barvy, které mohou narušit maskování zvířete (Steven et al. 2004). Nicméně Judge a Brooks (2001) při svém výzkumu nepozorovali žádné negativní účinky značení na zvíře. Stejně tak Perret a Joly (2002) v laboratorním a terénním výzkumu prováděném na čolkovi horském (*Ichthyosaura alpestris*) ve Francii neprokázali negativní účinky na fitness, stejně jako Joly & Miaud (1989). Nicméně se ukázalo, že značení není zcela bez následků, označené samičky se statisticky významnou odchylkou kladly větší počet vajec na snůšku. Autoři tento jev vysvětlují jako adaptivní reakci na prožitý stres způsobený značením. Jestliže jedinec prožije zranění (stres), může snížit úsilí přežít do dalších let a bezprostředně investuje do rozmnožování, což může mít neblahý dopad na fitness v dalších letech (Perret & Joly 2002). Naopak výhodou tohoto značení je rychlost provedení a ve srovnání s jinými technikami, jako je oříznutí prstů, i velký počet značených jedinců (Joly & Miaud 1989), ovšem s již předem zmíněným problémem při velké složitosti značení (Maesey et al. 2001).

1.2.5 VIE (Visible implant elastomers – Viditelný implantovaný elastomer)

VIE neboli viditelný implantovaný elastomer, je fluorescenční gumový materiál, který se může aplikovat na různých místech pod kůži obojživelníka, čímž vytvoří unikátní značku (Obr. 6) (Northwest Marine Technology, 2000). Tato metoda je snadno viditelná a dlouhodobá (Hoffmann et al. 2008), avšak vyžaduje namíchání materiálu ve sterilních nebo téměř sterilních podmínkách a delší manipulaci se zvířetem (Phillott et al. 2007), při níž se barvivo vpravuje pomocí injekce pod kůži. Může však dojít k jeho posunu nebo dokonce ke ztrátě skrze otvor, způsobený jehlou a tím k znehodnocení značky (Moosman & Moosman 2006). Vytvoření individuálních značek pro velký počet jedinců může být rovněž

problematické, jelikož zvyšuje složitost značení čímž, se zvyšuje i čas čtení značky (Maeseý et al. 2001). Potenciálním rizikem pro samotné zvíře může být zhoršení jeho maskování (Steven et al. 2004).



Obr. 6: Skokan velkohlavý (*Lithobates capito*) označený metodou VIE (Dante Fenolio. www.sciencephotolibrary.com).

1.2.6 Akrylové polymery

Akrylové barvivo je injekčně vpraveno pod kůži jedince (Wooley 1973). Tato metoda je vhodná i ke značení larválních stádií, na rozdíl od většiny metod, které nejsou přizpůsobené k takovému značení. U pulců se barvivo vpichuje dorzálně nebo ventrálně k ocasu. Vytváří se unikátní kombinace různobarevných teček, ale po druhém až třetím měsíci může dojít ke smíchání barev, další nevýhodou je, že barvivo se vstřebává při metamorfóze. Kromě ztráty značky však nepůsobí škodlivě (Cecil & Just 1987). Wooley (1973) ukazuje, že při použití této metody není vhodné pro druhy s tmavě pigmentovanou kůží. Barvivo může navíc ovlivnit schopnost maskování zvířete (Steven et al. 2004).

1.2.7 VIAalpha značky (Visible Implant Alphanumeric tags – Viditelné implantované alfanumerické značky)

Jedná se o barevné, fluorescenční, měkké značky na nichž jsou napsané alfanumerické kódy (Obr. 7), přibližné velikosti 2,8 x 1,2mm a tloušťky méně než 0,1mm. Tyto značky jsou vkládány injekčně do epidermis. Potenciální hrozbou tohoto značení, může být přenos patogenů z jednoho jedince na druhého skrze nástroje, pokud nebudou sterilizovány (Fellers et al. 1994). VIAalpha značení má dobrou čitelnost po dlouhou dobu (Measeý et al. 2001).



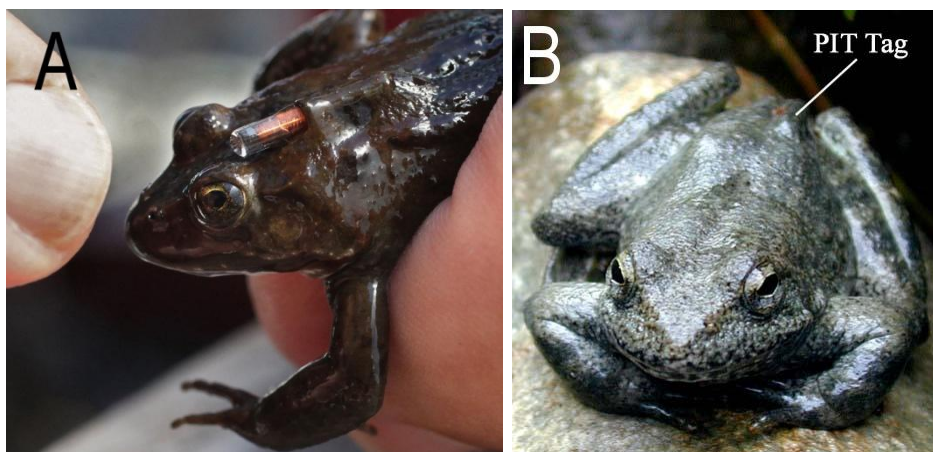
Obr. 7: Hvízdalka ostrovní (*Leptodactylus insularum*) označená VIAAlpha značkou firmy Northwest Marine Technologies, Inc. (Kristiina Hurme, www.ristohurme.com/insularum.htm).

1.2.8 PIT (passive integrated transponders - Pasivní integrované transpondéry)

Jedná se o elektromagnetické cívky nesoucí unikátní alfanumerický kód obalené ve skleněném pouzdře a čtené pomocí skenovacího zařízení (Zydlewski et al. 2001). Implantace zařízení často zahrnuje chirurgický zásah do tělní dutiny nebo vložení pod kůži jedince (Obr. 8), v tomto případě jsou pak rány sceleny lepidlem. Tyto zákroky zvyšují riziko vážnějších infekcí, měly by tedy při nich být nezbytně dodržovány zásady aseptické práce (Funk et al. 2005). Dostupná data ze studií o vlivu tohoto značení na fitness obojživelníků nenaznačují žádné vážné poškození nebo trvalé následky u žab (Schnis 1992, Brown 1997, Jehle & Hödl 1998), ani ocasatých (Faber 1997, Jehle & Hödl 1998, Ott & Scott 1999). Rovněž v laboratorním i terénním výzkumu Perrety a Jolyho (2002) prováděném na čolku horském ve Francii nebyly u označených jedinců prokázány žádné škodlivé účinky, nicméně se ukázalo, že toto značení, stejně jako tetování (viz 1.2.4), způsobilo, že označené samičky se statisticky významnou odchylkou kladly větší počet vajec do snůšek (Perret & Joly 2002).

Hlavní nevýhodou této metody je, že nemůže být použita u všech druhů. Přestože jsou značky veliké zhruba 10mm, pro malé druhy žab a ocasatých nemohou být použity (Funk et al. 2005). Navíc, pokud nějakým způsobem vyčnívají z těla, mohou způsobit tělesné poškození nebo zvyšují riziko zapletení v podrostu nebo ve vodním krytu (Steven et al. 2004). K dalším nevýhodám patří vysoké náklady na jednotlivé značky, ale i na čtečky značek. Tato metoda může být tedy pro některé výzkumné programy značně neekonomická

(Steven et al. 2004). Naopak výhodou této metody je, že nemá horní limit počtu označených jedinců a můžeme tedy pomocí ní značit i velké populace.



Obr. 8 : (A) PIT vkládaný pod kůži jedince skokan skvrnkovaný (*Rana preciosa*) (Steve Ringman for The Seattle Times. 2011). (B) skokan žlutohý (*Rana boylei*) s PIT značkou pod kůží (www.fs.fed.us/psw/topics/wildlife/herp/rabo.shtml).

1.2.9 Radioaktivní značení

Stejně tak byly použity ke značení i radioaktivní značky (Karlstrom 1957), například izotopem tantalu¹⁸² (Madison & Shoop 1970). Tato látka byla vpravena do břicha jedince pomocí injekce. Metoda pracuje na principu energetických emisních profilů, který má každý radioaktivní izotop jiný a na jehož základě, jej detekujeme. Toto značení může způsobit poškození tkáně, rozsah poškození souvisí s mírou radioaktivity a energetického profilu izotopu (Linn 1978). Existuje však reálná možnost, že může být zkrácena i celková délka života zvířete z důvodu ozáření (Pendleton 1956). Patt a Swift (1948) vystavili jedince skokana levhartího (*Lithobates pipiens*) dávce 1000 rentgenů a do 6 týdnů zahynulo 81% označených jedinců, vysokou mortalitu 50% jedinců popisuje i Steaner (1950), kdy stejný druh byl vystaven dávce rovné 700 rentgenů. Navíc tato metoda není schopna rozlišit jedince individuálně a přispívá k radioaktivnímu znečištění prostředí (Madison & Shoop 1970). Proto by měla volba konkrétního izotopu brát v potaz jeho toxicitu, druh emitovaného záření, poločas rozpadu, ale i dostupnost izotopu a potřeby studie, tedy její trvání a vzdálenost detekce (Linn 1978). Experimentátoři by měli stanovit minimální množství k detekci na dostatečnou vzdálenost. I přes rizika je značení radioaktivní izotopy vhodné pro sledování druhů, které jsou příliš malé nebo jinak nevhodné pro sledování pomocí telemetrického zařízení (Ferner 1979).

1.2.10 Kroužky, pásy

Hliníkové ptačí kroužky byly aplikovány i na obojživelníky, u kterých se kroužek umísťuje kolem prstu, stehna nebo čelisti (Raney 1940, Kaplan 1958). Při nasazování kroužku na prst kroužek stáhneme pomocí malých kleští tak, že jeho konci se probodne plovací blána. Při tomto kroku si musíme dát pozor, aby stáhnutí nenarušilo cirkulaci krve (Kaplan 1958). Kroužky umístěné na dolní čelisti (Obr. 9) aplikované při výzkumu Raneyem (1940) nezpůsobily žádnou infekci, stejně tak nepozoroval, že by u označených jedinců snížila chuť na potravu nebo změnil nějakým způsobem hlas. Kroužek na čelisti se tedy dle jeho názoru jeví jako vhodná metoda ke značení.



Obr. 9: Samička skokana volského (*Lithobates catesbeianus*), foto ukazuje umístění kroužku na spodní čelisti (Raneyen 1940).

Objevila se také varianta pásů, které se mohou použít samostatně nebo pro telemetrii. Bývají vyrobeny z plastů, latexu (Kluge 1981), Emlen (1968) použil dokonce nylonové pásy při své behaviorální studii samců skokana volského (*Lithobates catesbeianus*). Nylonové pásy použil i Woolbright a jeho kolegové (1990), přičemž pro odlišení jedinců mezi sebou, sloužily na páse umístěné korálky různých barev, jejichž kombinace vytvářela unikátní kód pro konkrétního jedince. Tuto metodu pro svůj výzkum zvolila také Whelerová (2007) (Obr. 10), pro odlišení samečků skokana žlutonohého (*Rana boylei*). Autorka uvádí, že tuto metodu zvolila, aby nenarušovala chování samců, během rozmnožování. Tuto domněnku potvrzují i pozorování studie, kdy bylo u samců zaznamenáno agnostické chování, volání nebo amplexus.



Obr.10 : Sameček skokana žlutohého (*Rana boylii*) označený pomocí korálkového pásku (Wheler 2007).

Rathbun a Murphey (1996) použili kuličkový řetěz pro rádiové sledování skokana červenonohého (*Rana aurora*). Kuličkový řetěz byl vybrán pro svou flexibilitu, nemá totiž ostré hrany a převrací se s malým třením. Byl také černě zbarven pro snížení odlesku. K pásu byl připojen i vysílač o hmotnosti 1, 8g. Přes úsilí experimentátorů se u 13% jedinců vyvinuly drobná poranění (Rathbun & Murphey 1996).

Kroužky a pásy mohou mít na obojživelníky nepříznivý vliv, související s problémy podráždění nebo zraněním kůže, zvýšenou hmotností, bráněním v pohybu nebo krmení, možnosti uvíznutí v terénu nebo mohou zmařit pokusy úniku před predací. Rovněž mohou zvýšit nápadnost vůči predátorovi (Harker et al. 1999). Proto by tato zařízení měla být navržena individuálně pro jednotlivé druhy a jejich životní prostředí (Griesemer et al. 1999).

1.2.11 Telemetrie

Vzhledem k malé velikosti obojživelníků není telemetrie vhodnou metodou (British Columbia Environment Resources Inventory Committee 1997). Nicméně i radio-telemetrie byla na obojživelnících vyzkoušena, například při studiích migrace, habitatových návyků, hibernace a hledání potravy (Sinsch 1989, Seitz et al. 1992, Richards et al. 1994). Radio-telemetrické zařízení se skládá z vysílače, zdroje energie a vysílací antény. Všechny tyto komponenty musí být připojeny k tělu zvířete (Cochran & Lord 1963). Platí obecné doporučení, že hmotnost vysílače by neměla přesáhnout 10% tělesné hmotnosti zvířete (Richards et al. 1994). Vysílače mohou být implantovány do těla nebo připevněny na jeho povrchu. Nevýhody externího vysílače: zvýšený stres, změna chování (ovlivní výsledky studie), snížení schopnosti pohybu v prostředí, poškození kůže a zvýšená náchylnost

k predaci (Richards et al. 1994, Goldberg et al. 2002). Studie Blomquista a jeho kolegů (2007) zkoumala reakce skokanů levhártiho (*Lithobates pipiens*) a lesního (*Lithobates sylvaticus*) na umělé útoky, zda se liší označení proti neoznačeným jedincům. Jejich experimenty odhalily drobné změny v antipredačním chování nebo schopnosti pohybu po prostředí.

K nevýhodám implantovaného zařízení patří chirurgický zákrok a s ním spojená rizika, navíc oproti externímu má nižší rozsah detekce (Richards et al. 1994).

1.3 Neinvazivní metody značení

Taková metoda nijak nepoškozuje tělo jedince. Identifikace probíhá na základě přirozeného vzhledu a vyžaduje, aby jedinci měli mezi sebou alespoň několik málo rozlišovacích znaků. Ke znakům používaným pro identifikaci patří: pohlaví, velikost, barvy, přítomnost nebo nepřítomnost tvaru, velikosti a umístění skvrny nebo skvrn, popřípadě zvláštní znamení, jako jsou jizvy a jiné deformace, ovšem ty by se měly používat s opatrností, jelikož nemusí být trvalé (Pennycuik 1978).

1.3.1 Metoda přirozených vzorů (pattern maps)

Označení zvířat není nutné, pokud lze jednotlivá zvířata spolehlivě odlišit na základě unikátní kresby na jejich těle – jedná se tzv. „pattern maps“, volně bych přeložila jako „přirozené vzory“. Pro vyhodnocení se používá fotografie, nákres nebo naskenovaný snímek zvířete (Donnelly et al. 1994). Přestože je tato metoda neinvazivní a zvíře žádným způsobem neznačí, je v literatuře označována jako značení, na tento paradox poukazují ve své studii Arntzen a spol. (2004).

Tato metoda se běžně užívá pro mark-recapture studie, kde analýza vzorků poskytuje efektivní a neinvazivní metodu pro individuální odlišení jedinců (Arntzen et al. 2004). Přirozené vzory tedy může být u některých druhů spolehlivou metodou k identifikaci. U jiných obojživelníků není spolehlivá, protože se jejich vzory mohou měnit s věkem. Experimentátoři by tedy měli mít jistotu, že zkoumaný druh má stabilní kresbu (Reaser 1995). Nespornou výhodou je neomezená velikost zkoumané populace, nicméně s velikostí vzorku, roste i náročnost identifikace. Možným řešením se tedy jeví počítačové programy, které by samy vyhledávaly shodu v zadané databázi.

Řada studií tuto metodu úspěšně využívala k identifikaci jedinců v rámci různých druhů: kuňky obecné (*Bombina bombina*) (Nilsson 1954), kuňky žlutobřiché (*Bombina variegata*) (Pláiașu et al. 2005), čolka obecného (*Lissotriton vulgaris*), čolka velkého (*Triturus*

cristatus) (Hagström 1973), čolka zelenavého (*Notophthalmus viridescens*) (Gill 1978), cecilie mexické (*Dermophis mexicanus*) (Wright & Minott 1999), leiopelmy Archeyovy (*Leiopelma archeyi*) (Bradfield 2004), *Litoria genimaculata* (Kenyon et al. 2009) a dokonce i larválních stádiích mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) (Eitam & Blaustein 2002).

Tato metoda je vhodná zejména pro ohrožené druhy. Leiopelma Archeyova (Obr. 11) je evolučně starobylá terestrická žába, žijící endemicky na Novém Zélandu. Podle národního práva Nového Zélandu je hodnocena jako „Nationally Critical“, což je nejvyšší stupeň ohrožení. Ohrožená je především houbovou nákazou chytridiomykózou a savčími predátory. A právě z důvodu jejího ohrožení a nutnosti monitoringu byla zvolena neinvazivní metoda značení tedy identifikace pomocí fotografie na základě jejího zbarvení a skvrnitosti. Invazivní metody by mohly narušit fitness jedinců, nebo v krajních případech přivodit i jejich smrt (Smale et al. 2005).



Obr. 11: Leiopelma Archeyova (*Leiopelma archeyi*) (Robin Bush, www.arkive.com).

Metoda přirozených vzorů, byla aplikovaná i na druhy, které na první pohled nejsou nápadně skvrnité, například rosnice krajovaná (*Litoria genimaculata*) (Obr 12.). Aby mohla být metoda přirozených vzorů na tento druh použita, muselo se fotografování co nejvíce standardizovat. Jelikož k návštěvám lokality docházelo v noci, byl zajištěn umělý zdroj světla, který tak mohl být standardní pro všechny fotografie. Ohnisková vzdálenost byla také vždy stejná, o což se postaral speciální stojan, stejně tak byla upravována i poloha jedince. Nicméně úspěšnost rozpoznání jedince byla jen 61,5%. Bylo také odhaleno, že dorzální vzor, který byl používán jako identifikační, se může během dvou měsíců změnit (Kenyon et al. 2009).



Obr. 12: Tři jedinci rosnice krajkové (*Litoria genimaculata*) (Kenyon et al. 2009).

Rozvoj v multi-zobrazovacích technikách umožňuje rychlou dokumentaci, například zařízení vyvinuté Novozélandským odborem ochrany (New Zealand Department of Conservation) obsahuje zrcadlovou složku, která umožňuje zachytit čtyřstranný obraz na jediné digitální fotografii (Obr. 13) (Hlozapfel pers. comm. ex Beausoleil 2004).

Analýza skvrn může také sloužit k určování druhů a pomoci při odhalování mezidruhových – hybridních jedinců (Gollmann 1984, Vörös et al. 2007).



Obr. 13: Multi-zobrazovací zařízení (Avi Holzzapfel 2004 ex Beausoleil 2004).

1.4 Značení červorů

Mezi obojživelníky patří také červorů (Gymnophiona), skupina beznohých zástupců žijících převážně v půdě tropů. O ekologii těchto zvířat existuje jen velmi málo kvantitativních údajů. Melasey a jeho kolegové (2003) se tedy snažili provést mark-recapture studie

na cecíliovitých (Caeciliidae) řádu půdních predátorů, žijících v tropech (O'Reilly, 2000), aby mohli hodnotit potenciál zkoušených technik a určit nejzákladnější charakteristiku populace - její velikost. Potenciální metody k trvalému značení červorů hledali Measey a jeho kolegové (2001) v předchozím výzkumu, kdy v laboratorních podmínkách porovnávali čtyři metody (tetování, vymrazování, VIE značení a VIAAlpha značení). Ostatní metody vyloučili již před výzkumem. Pro absenci končetin nebo prstů vyloučili použití klasické metody zastřížení prstů. Nepoužili ani metodu, kterou navrhli Wright a Minott (1999), jenž využívala přírodní variabilitu prstencových vzorů u cecílie mexické (*Dermophis mexicanus*), protože v terénních podmínkách a při velkém počtu jedinců se zdá být nepraktická, jelikož prstencové vzory mohou mít velice jemné a snadno opomenutelné rozdíly. Ze studie vyplynulo, že nejjednodušší a nejrychlejší způsob značení je tetování a VIE značení, vhodné však spíše pro skupinové značení nebo pro menší počet jedinců. Naopak pro velký počet se hodí vymrazování a VIAAlpha značky. Vymrazování, ale není vhodné při terénním výzkumu z důvodu rychlého odpařování tekutého dusíku a nesnadné přenosnosti (Maese et al. 2001). Jako vhodné metody značení červorů při terénních pokusech tedy navrhli (1) tetování (viz kapitola 1.2.4), tetovací strojkem nabitým 2% roztokem alcianové modři, (2) VIAAlpha značení (Northwest Marine Technology), VIAAlpha značky vpichované injekčně pod kůži (viz kapitola 1.2.7). Obě tyto metody otestovali při terénním výzkumu v roce 2003. Z jejich pokusů se obě metody jeví pro terénní pokusy jako vhodné. Nevyskytovaly se žádné větší potíže při zpětném čtení značek, označená zvířata nevykazovala škodlivé účinky značení, čímž studie potvrdila vhodnost tohoto značení, především k demografickým studiím. Při porovnání mezi sebou, vykazuje VIAAlpha značení delší trvanlivost než tetování.

2 Diskuse rešeršní části

2.1 Srovnání metod

Žádnou z uvedených metod nelze aplikovat na všechny druhy obojživelníků, nebo pro potřeby všech experimentů. Neexistuje tedy žádná univerzální metoda pro značení všech druhů obojživelníků nebo pro jejich individuální rozlišení. K výběru vhodné metody pro experiment a druh obojživelníka by se měl experimentátor rozhodovat na základě výhod a nevýhod dané metody. Potenciální nevýhody výše zmíněných metod jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tab. 1: Potenciální negativní vlivy vyplývající z aplikací metod značení

Legenda	Metoda značení												
	Zastřihávání prstů	PII značení	Vypalování	Vymazování	Autotransplantace	Tetování	VIE značení	Akrylové polymery	VIAlpha značky	Radioaktivní značení	Kroužky, pásy	Telemetrie	Přirozené vzory
Významný vliv	++												
Má vliv	+												
Nemá vliv	-												
Neznámo	N												
Negativní vlivy													
Invazivní	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Infekce / smrt	+	+	+	+	+	N	+	N	+	++	+	+	-
Vliv na pohyb	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Vliv na chování	+	N	N	N	N	+	-	-	-	+	-	+	-
Doba manipulace	-	+	+	+	++	-	+	+	+	+	+	+	-
Anestezie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Rekonvalescence	+	N	+	+	+	+	-	-	-	++	-	-	-
Změna nebo ztracení značky	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Čtivost značky (čas)	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Čtivost značky (rozlišitelnost)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Množství značených jedinců	+	-	+	+	++	-	+	+	-	+	-	-	-
Velikost jedince	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Druh jedince	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	++
Kryptické zbarvení, soc. signalizace	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Finanční náročnost	-	++	-	+	-	+	+	+	+	+	+	++	-

Přestože nelze určit univerzální metodu, některé lze doporučit k užívání více než jiné a některé úplně vyloučit. Méně nebo vůbec by se neměly užívat zejména nejvíce invazivní metody, jako je značení pomocí cejchování, ať teplem nebo chladem, a to hlavně kvůli mrzačení a vyvolanému stresu u značeného zvířete. Stejně negativní vliv na fitness jedince má autotransplantace nebo radioaktivní metody, které zároveň nejsou běžně užívané a nehodí se k experimentům s jednotlivci.

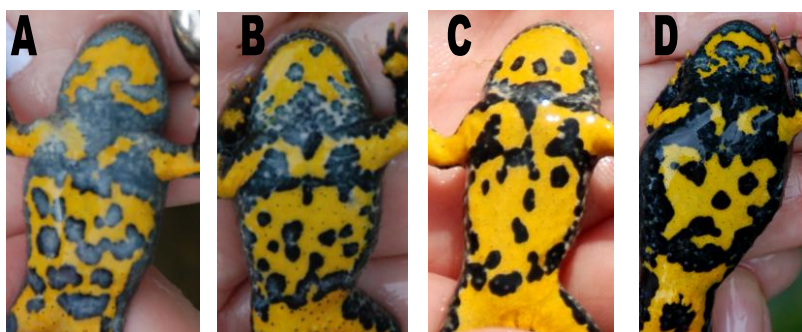
Nejčastěji používaná metoda zastřihávání prstů také není příliš vhodná, jelikož působí negativně na pohyb a zdraví zvířete, navíc se u některých druhů vyskutekuje vysoká míra regenerace a značení tedy není trvalé. Výhody této metody spočívají spíše na straně experimentátora, protože je snadno proveditelná a finančně nenáročná. Proto pokud se experimentátor rozhodne tuto metodu použít, měl by jí zkombinovat s jinou metodou (například VIE- C značení (Hoffmann et al. 2008)), čímž by snížil počet oříznutých prstů a zároveň zvýšil počet značených zvířat. Nicméně odstřížení prstu je vhodné k jiným účelům, jako je odběr tkáně ke genetickým, molekulárním a jiným analýzám (Funk et al. 2005) nebo pro určení stáří jedince na základě skeletochronologie (Yilmaz et al. 2005).

Vhodnější a méně invazivní metody značení jsou metody využívající cizího tělesa. Mezi metody využívající cizí těleso ke značení patří VIA α značení, pasivní integrované transpondéry, telemetrické zařízení a kroužky nebo pásy. Právě poslední jmenované patří k rozporupným značení, zejména varianta hliníkových kroužku (Raney 1940, Kaplan 1958), protože kvůli stabilitě musí být kroužek propíchnutý tkání zvířete. Z tohoto faktu vyplývají dvě potenciální hrozby: riziko infekce a riziko zaklesnutí kroužku a jeho možné strhnutí, což by jedince vážně poranilo a vyvolalo ještě větší riziko infekce. Vhodnější jsou perličkové pásy, zejména pro jednosezónní studie. Ale i u perličkových pásů je riziko zaklenutí. Navíc se tato metoda zdá vhodná jen pro samce, u samic by mohla být problematická v období rozmnožování, protože perličky ve spodní části zad mohou znesnadnit úchyt samečka při amplexu. Pásy také často slouží k upevnění telemetrického zařízení na jedince. Telemetrie rovněž není pro obojživelníky vhodná metoda, avšak pokud experiment zkoumá pohyby jedince, není jiná alternativa. Proto by mělo být předem rozhodnuto, zda je výzkum potřebný a zda je vybraný druh dostatečně veliký, aby ho telemetrické zařízení co nejméně obtěžovalo. Tato metoda má však veliký potenciál do budoucna, kdy s postupem miniaturizace technologií bude dostupnější pro více druhů a nebude tolik jedince zatěžovat. Stejně rozporupné jsou pasivní integrované transpondéry, které jsou modernější metodou. Problematický je opět zásah do zvířete, při kterém je mu pod kůži vpraveno zařízení. Toto zařízení může být vypouklé a v tom případě by jedinci mohlo působit potíže v průchodnosti terénem a při páření. Možnosti této metody se však s rozvojem technologií neustále posouvají. V současnosti je aplikace PIT značení omezená hlavně velikostí zvířete a finančními náklady. Nejvíce vhodné značení z této skupiny je, ale VIA α značení. V porovnání s PIT značením nebo pásy má více výhod. Není tolik invazivní, při čtení nevyžaduje další techniku, ani čas potřebný k dešifrování kódování. U VIA α značení je kód vidět okamžitě. V porovnání s PIT značením je i méně finančně nákladné.

Vhodnější a méně invazivní metody značení jsou také metody využívající barvivo. K metodám značení pomocí barvy patří tetování, VIE značení a akrylové polymery. Co se týče dopadu na zvíře, jsou VIE značení a akrylové polymery vhodnější, jelikož ke vpravení barviva pod kůži používá jen jeden vpich, naproti tomu tetování poraní jedince na celé své ploše. Dále se metodou VIE dají značit i tmavě pigmentované druhy, což u tetování může být problematické. Tetování má výhodnější kódování (používáme-li alfanumerické) VIE značení vyžaduje delší dobu pro dekódování značky.

Z hlediska testovaného subjektu je nejlepší metoda přirozených vzorů, jelikož žádným způsobem nemrzáčí nebo neraní zvíře a nenarušuje tak ani jeho chování. Nicméně konkrétní

druh musí splňovat dvě podmínky (1) musí mít dostatečnou vnější vnitrodruhovou variabilitu mezi jedinci, (2) vzhled vzorů se nesmí měnit v průběhu života (experimentu). V opačném případě tuto metodu, nelze použít. Jestliže však, daný druh obojživelníka obě podmínky splňuje, měla by tato metoda být použita přednostně a to i u velkých populací. Při experimentech s velkým počtem jedinců, lze porovnávání skvrn urychlit rozdělením do skupin ať na základě pohlaví, přibližné velikosti nebo podle skvrn. Například u kuňky žlutobřiché lze skvrny rozdělit podle zbarvení (šedivé (Obr. 14 A, B, vs. černé Obr. 14 C,D) nebo podle charakteru skvrn (drobné skvrny Obr. 14 B, vs. velké skvrny Obr.14 A, D) nebo podle malého počtu skvrn (Obr. 14 C, D).



Obr.14: Příklad variability ventrálních skvrn kuňky žlutobřiché (*Bombina variegata*).

2.2 Metoda přirozených vzorů s ohledem na druhy obojživelníků v ČR

V této kapitole se zaměřím na potenciální vhodnost metody přirozených vzorů pro české druhy obojživelníků, jelikož metoda přirozených vzorů je pro obojživelníky nejvhodnější. Pokud má daný druh dostatečnou vzhledovou variabilitu mezi jedinci, měla by tato metoda být použita. V České republice se celkem vyskytuje 21 druhů obojživelníků, kteří jsou zástupci dvou řádů.

Řád ocasatých je na území České republiky zastoupen jedinou čeledí, mlokovitých (Salamandridae). Zástupci mlokovitých se na první pohled jeví jako vhodné druhy, ať už se jedná o dorzální skvrny mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) (Příloha 1, Obr. 20) nebo břišní skvrny čolků. Například čolek velký (*Triturus cristatus*), čolek dunajský (*Triturus dobrogicus*), čolek dravý (*Triturus carnifex*), čolek horský (*Ichthyosaura alpestris*) (Příloha 1, Obr. 21) nebo čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*) (zejména samci) jsou výrazně skvrnití. Při bližším prozkoumání čeledi mlokovitých, ale odhalíme problémy variability skvrn, hlavně u samičího pohlaví. Problém by mohl nastat zejména u druhů, jejichž samice mají zbarvení málo nápadné nebo jsou úplně beze skvrn, a to hlavně u samiček čolka karpatského (*Lissotriton montandoni*) a čolka hranatého (*Lissotriton helveticus*). Rovněž

problematické by mohlo být rozpoznávání samců po rozmnožovací sezóně, kdy přecházejí k terestrickému způsobu života a ztrácejí své pestré zbarvení a jejich ploutevní lem se zmenšuje. Mlok skvrnitý se naopak nezdá být v žádném z dříve uvedených aspektů problematický, ostatně tato metoda na něm byla úspěšně aplikovaná (Eitam & Blaustein 2002).

Další otázkou je změna skvrnitosti v průběhu života jedinců. Jestliže se experimentátor rozhodne pro použití této metody, měl by v literatuře vyhledat zda-li byla tato metoda na daný druh již vyzkoušena, a zda-li jsou skvrny trvalé. Jestliže tento údaj v literatuře chybí, měl by sám experimentátor zjistit, zda-li tomu tak není. Tato metoda byla aplikovaná například švédským biologem Hagströmem (1973, 1977) na čolka obecného a čolka velkého. V jedné ze svých studií (1977) zkoumal růst u dospělých jedinců po dobu tří let (1969-1972) a rozpoznával je právě na základě metody přirozených vzorů, konkrétně pomocí dorzálních skvrn. Oproti tomu Arntzen a Teunis (1993) upozorňují na změnu břišních vzorů u čolka velkého.

U žab, které jsou na území České republiky zastoupeny 5 čeledmi s 12 druhy a jedním kleptonem, je to od začátku složitější. Problematická je čeleď skokanovitých (Ranidae), která je v České republice zastoupena dvěma rody (*Rana*, *Pelophylax*), jejichž zástupci sice mají kontrastní vzory zejména na zadních nohou, ale jejich variabilita je diskutabilní. U obou rodů je častá i barevná variabilita jedinců (například u skokana hnědého (*Rana temporaria*) viz Příloha 2, Obr.22), která by mohla být rovněž využita. Přestože je metoda přirozených vzorů u této čeledi problematická, nelze ji zcela vyloučit. Drobenkov a spol. (2005) studovali polymorfismus skokana ostronosého (*Rana arvalis*) a skokana hnědého a zjistili, že zbarvení jedinců je velice odlišné mezi populacemi i geograficky a také, že krční a břišní vzory jsou natolik charakteristické, že lze jednotlivce rozlišit. Za nevhodnou lze metodu přirozených vzorů pokládat pro rosničku zelenou (*Hyla arborea*), jejíž jedinci se mezi sebou vnějším vzhledem velice málo odlišují (Příloha 2, Obr. 23). Naopak metoda je velice vhodná pro kuňkovité (Bombinatoridae), ropuchovité (Bufonidae) a blatnicovité (Pelobatidae). Čeleď kuňkovitých má na ventrální straně nápadné a kontrastní zbarvení, které je pro metodu přirozených vzorů vhodné (Příloha 2, Obr. 27, 28). Tato metoda byla u této čeledi aplikována na obou druzích, kuňce obecné (*Bombina bombina*) (Nilsson 1954) i kuňce žltobřiché (*Bombina variegata*) (Plăiașu et al. 2005). V rámci čeledi ropuchovitých je vhodné použít dorzální skvrny u ropuchy zelené (*Pseudepidalea viridis*) a ropuchy krátkonohé (*Epidalea calamita*). Skvrnitost ropuchy zelené podrobněji rozeberu v kapitole 4.1. Ropucha krátkonohá má podobnou skvrnitost, nejčastěji se odlišuje

s charakteristickým podélným, úzkým páskem na hřbetě (Baruš & Oliva 1992). U ropuchy obecné (*Bufo bufo*), jejíž dorzální skvrny jsou málo viditelné a ztrácejí se v její bradavčité pokožce (Příloha 2, Obr. 25A), by bylo možno rozpoznávat jedince podle skvrn na břiše nebo vnitřní straně nohou (Příloha 2, Obr. 25B, C). Blatnice skvrnitá (*Pelobates fuscus*) by měla mít pro použití metody přirozených vzorů dostatečnou variabilitu dorzálních skvrn (Příloha 2, Obr. 24). Stejně jako u ocasatých by měla být ověřena stálost skvrn v průběhu života jedince a to buď údaji z literatury nebo vlastními pokusy.

3 Cíle práce

- 1) Aplikace metody přirozených vzorů na vybrané druhy obojživelníků za účelem individuálního rozpoznání jedinců pro výzkum monitorování jejich pohybu v rámci vybraných lokalit v průběhu sezóny a meziročně jejich přítomností na lokalitách.
- 2) Kritické zhodnocení metody přirozených vzorů a posouzení její vhodnosti pro výzkum monitorování pohybu jedinců vybraných druhů v rámci vybraných lokalit v průběhu sezóny a meziročně jejich přítomností na lokalitách

4 Metodika

Jako metodu značení jsem zvolila metodu přirozených vzorů, která má oproti ostatním metodám řadu výhod. Pro již probíhající výzkum (započatý v roce 2011, který se zabývá monitorováním pohybu jedinců v rámci vybraných lokalit v průběhu sezóny a meziročně jejich přítomností na lokalitách) jsem tedy aplikovala metodu přirozených skvrn na ropuchu zelenou (*Pseudepidalea viridis*) a kuňku žlutobřichou (*Bombina variegata*). Pro dokumentaci jsou používána technika značky NIKON, tělo fotoaparátu byl typ NIKON D80, objektiv NIKKOR AF-S DX 18-200/3,5-5,6 G ED VR II.

Každý odchycený jedinec byl vyfotografován. Žába byla natočena tak, aby její poloha pro fotografii vždy zachycovala oblast, která byla zvolená jako rozlišovací, tedy dorzální nebo ventrální strana. Rovněž bylo dbáno na to, aby zvíře nebylo znečištěné nebo zkroucené, aby skvrny na fotografii byly dobře viditelné a nedeformované. Se zvířetem bylo manipulováno za jeho bdělého stavu, aby nemuselo být použito anestetikum, které by ho dále stresovalo. Již při fotografování bylo jedinci přiřazeno evidenční číslo (Obr. 15). Pod evidenčním číslem byla zaznamenána jeho lokalita do mapy, dále pak pohlaví a velikost jedince.



Obr. 15 : Ventrální pohled na jedince kuňky žlutobřiché s evidenčním číslem F9.

Při každé návštěvě lokality byla snaha odchytit všechny jedince na lokalitě, tito jedinci byly vždy vyfotografováni, podle předem zmíněných kritérií. Poté následovalo porovnávání fotografií jedinců s fotografiemi, již dříve odchycených jedinců. Porovnávání probíhalo pomocí digitálního katalogu jedinců kuňek nebo ropuch. Jestliže byla nalezena shoda, číslo jedince bylo převidováno na číslo prvního odchyty.

4.1 Ropucha zelená

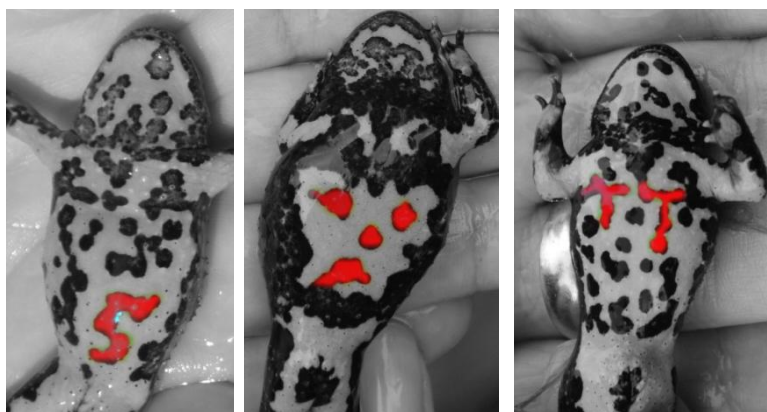
Ropucha zelená (*Pseudepidalea viridis*), která na našem území dorůstá maximální délky těla něco málo přes 8 cm, je základním zbarvením z dorzální strany bělavá až šedá s hojností nepravidelných skvrn zelené, šedozelené, olivové až tmavozelené barvy, mezi nimiž se mohou vyskytnout cihlové až suříkově červené tečky. Břišní strana je bílá, někdy až krémově nažloutlá s drobnými černošedými skvrnami (Baruš & Oliva 1992).

Ve výzkumu jsem uplatnila dorzální skvrnitost ropuchy zelené, přičemž při vyhodnocování stačilo využívat variabilitu skvrn na hlavě nebo parotidách. Ale i přesto bylo foceno celé zvíře v dorzálním pohledu.

4.2 Kuňka žlutobřichá

Kuňka žlutobřichá (*Bombina variegata*) je menší žába, jejíž tělo dosahuje délky kolem 5 cm. Hlavní rozlišovací znaky pro tento druh se nalézají na břišní straně těla a končetin zbarvených sytě žlutou barvou s černým mramorováním, přičemž plocha žlutého zbarvení by měla převyšovat nad černým zbarvením. Dorzální zbarvení je blátivě hnědošedé, jednolitě nebo s tmavšími skvrnami (Baruš & Oliva 1992).

U kuňky žlutobřiché jsem pro výzkum využila, jejího kontrastního zbarvení na ventrální straně těla. Jedinec byl vyfocen z ventrálního pohledu, přičemž muselo být zachyceno hlavně tělo s hlavou, nohy již na snímku být nemusely. Rozpoznávání probíhalo porovnáváním převážně hrdelních skvrn; pro kontrolu nebo u podobných, nejasných hrdelních skvrn byly použity skvrny břišní. Jestliže měl jedinec v rámci hrdla nebo těla unikátní skvrnu nebo skupinu skvrn (Obr. 16), byly k porovnání použity přednostně. Po nalezení odpovídajícího snímku byla zkontrolována i shoda ostatních skvrn.



Obr. 16: Vybraní jedinci s unikátními skvrnami (vyznačeny červeně), které pomáhaly k identifikaci jedince.

5 Diskuse metodiky

5.1 Výběr metody, monitorovaného druhu

Z potenciálně možných metod rozpoznávání jsem se rozhodla pro metodu přirozených vzorů. Důvodem bylo několik výhod: (1) metoda není invazivní, (2) nenáročná z finančního hlediska, pokud experimentátor vlastní fotoaparát nebo jiné vizuálně- paměťové zařízení, (3) snadno proveditelná i v terénních podmínkách, (4) navíc samotnou fotografií (hlavičce IDIF), získáváme informace o zachycení v čase.

Výběr monitorovaných druhů vycházel ze zvolené metody přirozených vzorů, tedy konkrétní druhy musely splňovat podmínku vnější variability jedinců v rámci druhů. Dále byly voleny i podle dostupnosti lokality. Vybrané druhy by se měly vyskytovat v Jihočeském kraji (poblíž Českých Budějovic), aby bylo zajištěno průběžné monitorování lokalit. Na základě těchto dvou kritérií by se daly využít následující druhy: čolek velký (*Triturus cristatus*), čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*), čolek horský (*Ichtyosaura alpestris*), blatnice skvrnitá (*Pelobates fuscus*), kuňka obecná (*Bombina bombina*), kuňka žlutobřichá (*Bombina variegata*), ropucha obecná (*Bufo bufo*), ropucha zelená (*Pseudepidalea viridis*) a ropucha

krátkonohá (*Epidela calamita*). Všechny druhy čolků jsem na začátku vyloučila, a to z důvodu náročného pozorování (jedná se o velice nenápadné druhy, které jsou těžce pozorovatelné), stejně tak i blatnici skvrnitou. Zbyli mi tedy zástupci čeledí Bufonidae a Bombinatoridae. Z každé čeledi jsme si zvolili jednoho zástupce, jelikož zvolené druhy se liší svou ekologií, takže metodu odzkouším jak na terestrickém tak na vodním druhu obojživelníka.

Konkrétně byly zvoleny tyto druhy: (1) ropucha zelená, která je druhem synantropním, jenž se běžně vyskytuje i v Českých Budějovicích. (2) Kuňka žlutobřichá s vhodnou lokalitou s vysokým počtem jedinců nedaleko obce Omlenička. Na této populaci kuňky žlutobřiché, již v minulosti probíhal výzkum hybridní zóny kuněk (Havelková 2002, Straková 2010). Díky tomu mám k dispozici fotografie jedinců odchycených i během minulých sezón. Tyto snímky jsem tedy mohla porovnat s fotografiemi jedinců ze současného výzkumu.

5.2 Zhodnocení metody přirozených vzorů

Na základě získaných dat, která tvoří jednosezónní pozorování, lze vyhodnotit metodu přirozených vzorů, a určit její potenciální výhody a nevýhody.

K výhodám této metody patří: finanční nenáročnost, neomezená kapacita monitorovaných jedinců, tato metoda není omezená velikostí ani stářím jedince, dále nemá vliv na pohyb, chování, maskovací schopnosti nebo na sociální komunikaci mezi jedinci, a jak již bylo zmíněno dříve, metoda je zcela neinvazivní. Pro fotografování není nutné jedince uspat, jedinec může být v naprosto bdělém stavu, tímto postupem tedy urychlíme práci a vyhneme se nežádoucím účinkům na obojživelníky, které uvádí ve své práci Fellers a spol. (1994), viz kapitola 1.2.1. Nicméně odchyty se musí účastnit minimálně dva lidé, z nichž jeden drží žábu a druhý fotografuje. Plăiașu a spol. (2005) ve svém výzkumu, při kterém také používali metodu přirozených vzorů, umisťovali jedince pro fotografování do Petriho misky, přičemž do jedné poloviny misky byl umístěn molitan, aby se kuňka nemohla obrátit. Toto řešení pak umožňuje focení dorzálních skvrn jedním člověkem.

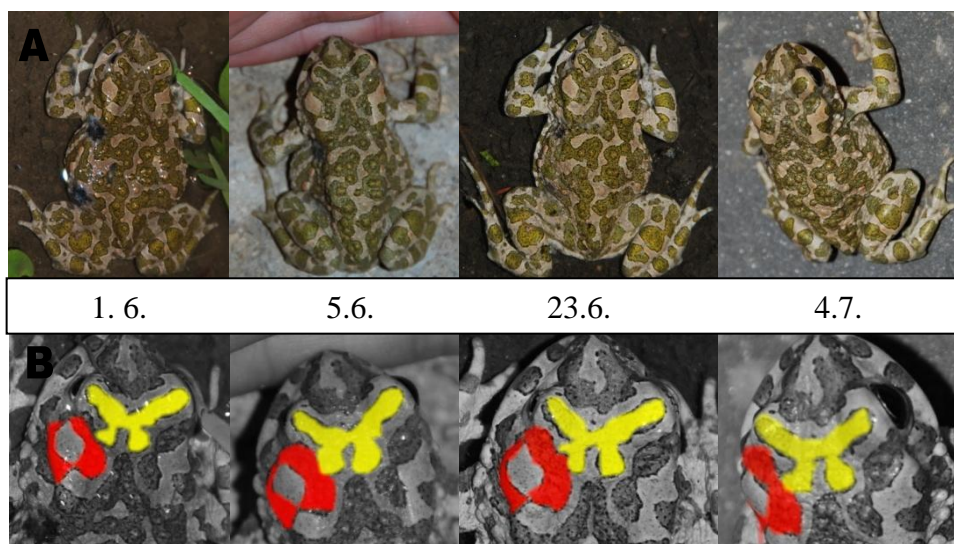
Naopak nevýhody jsem prozatím žádné neobjevila. Jelikož byly druhy zvoleny s ohledem na tuto metodu, jejich vnější vnitrodruhová variabilita není omezujícím faktorem. Existuje však hypotetická možnost změny skvrn, která by byla problematická zejména pro víceletý výzkum. Měla by být tedy vyvrácena dalším studiem, při kterém by na vybrané jedince byla aplikovaná další metoda sloužící jako kontrola, aby nedocházelo chybám nebo nejasnostem při identifikaci. Nicméně Kenyon a spol. (2009) ve svém výzkumu na rosnici krajkované (*Litoria genimaculata*) zaznamenali změnu skvrnitosti, již po dvou měsících. Při mém

výzkumu, kdy mapováno probíhalo po dobu pěti měsíců, jsem žádné změny nezaznamenala, podrobněji je toto téma diskutováno v kapitolách 5.2.1 a 5.2.2. Dále existuje i nepatrná možnost identických jedinců – jednovaječných dvoj- či „vícečet“, která by měla i stejné skvrny. Tomuto jevu se dá vyhnout, jenom druhým značením, které bude sloužit jako kontrola. Nicméně pravděpodobnost výskytu takových jedinců je malá. Ani časová náročnost, ať už terénní nebo při zpracování dat, nebyla nijak výrazná. Terénní část se naopak oproti jiným invazivním metodám ještě zkrátila, protože, jak již bylo zmíněno, nebylo užíváno žádné uspávací. Porovnávání jedinců bylo urychleno katalogovým systémem (podrobněji tuto problematiku rozeberme v následujících kapitolách). Jestliže porovnáme zkoumané druhy mezi sebou, determinace u kuňky žlutobřiché je snazší než u ropuchy zelené, jelikož skvrny kuňky žlutobřiché jsou kontrastnější a lépe čitelné. Typ skvrn tedy nejvíce ovlivňuje délku a náročnost vyhodnocování a rozpoznávání konkrétních jedinců.

5.2.1 Vyhodnocení metody přirozených vzorů - ropucha zelená

U ropuchy zelené (*Pseudepidaea viridis*) byla jako determinační oblast vybrána dorzální část těla, jelikož skvrny v této oblasti jsou větší a lépe identifikovatelné oproti skvrnám na ventrální části. Drobenkov a spol. (2005) ve své knize uvádí, že variabilita dorzálních skvrn je natolik vysoká, že najít identické vzory se zdá být nemožné. Pro konkrétní rozpoznávání byla za účelem snadnějšího porovnávání využita oblast hlavy a parotid. Variabilita hlavových skvrn nebo skvrn na parotidách je dostačující viz Příloha 2, Obr. 26. Pro případné ověření správně určené totožnosti jedince nebo při nejasnostech v určení byly navíc použity skvrny hřbetní. Rozložení skvrn se v průběhu sezóny nemění (Obr. 17), nicméně by se možnost změny skvrn neměla podcenit a bylo by vhodné u tohoto druhu prozkoumat stálost skvrn i mezi sezónami, podle návrhu zmíněného v předešlé kapitole.

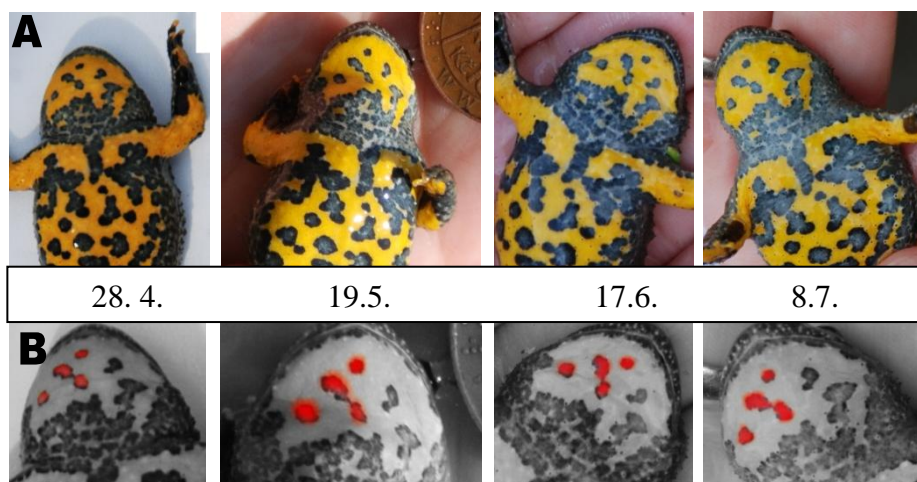
Celková srovnávaná populace čítala 54 jedinců, k porovnání bylo 73 snímků. Celková náročnost identifikace nebyla velká. Přestože se doba s přibývajícím jedinci zvyšovala, maximální čas identifikace jedince se pohyboval kolem jedné minuty. Počet jedinců odchycených během jedné návštěvy se pohyboval v rozmezí 4-18 jedinců. Při následné kontrole po ukončení sezóny, kdy byly k určení použity jiné skvrny, nebyla odhalena žádná chyba.



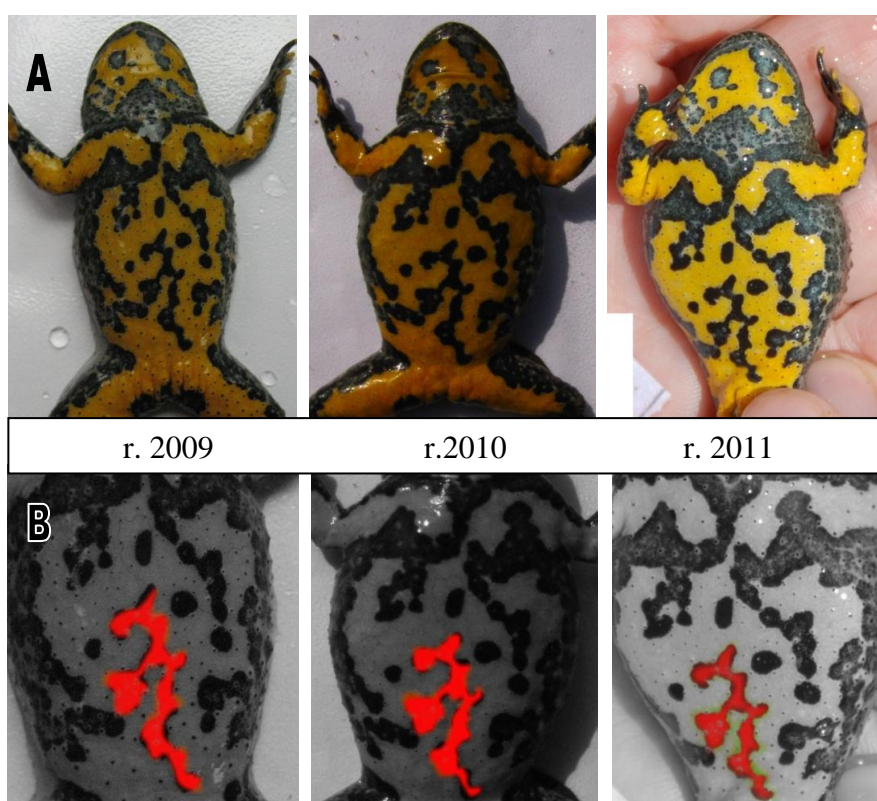
Obr. 17: A) Tentýž jedinec v průběhu sezóny 2011, B) vyznačení determinačních skvrn.

5.2.2 Vyhodnocení metody přirozených vzorů - kuňka žlutobřichá

U kuňky žlutobřiché (*Bombina variegata*) byla zvolena jako rozlišovací ventrální strana těla, jelikož tato část je nápadně kontrastně skvrnitá a skvrny lze snadno rozpoznat. Konkrétně byly využívány hrdelní skvrny a unikátní skvrny na bříše. Stejně jako u ropuchy zelené jsem základní determinační oblast zmenšila, jelikož její variabilita byla dostačující (Příloha 2, Obr. 28) a toto zmenšení usnadňovalo identifikaci. Navíc jsem k identifikaci jedinců používala již dříve zmíněné unikátní skvrny, jelikož tyto skvrny byly velice nápadné a urychlovaly identifikaci. Změna skvrn v čase je u kuňky žlutobřiché nepravděpodobná. Metoda přirozených vzorů byla bez problémů použita na její sesterský druh a druhého českého zástupce čeledi Bombinatoridae, kuňku obecnou (Nilsson 1954). Pláiša a spol. (2005) ve svém dvouletém výzkumu nezaznamenali změnu břišních skvrn a ani při mém výzkumu jsem jejich změnu v průběhu sezóny roku 2011 nepozorovala (Obr. 18). Žádná změna ve vzoru skvrn se neodehrála ani v průběhu tří let (Obr. 19), jak nám potvrdila dostupná data. V sezónách 2009 a 2010 byl na lokalitě prováděn výzkum hybridní zóny kuňky žlutobřiché a kuňky obecné. V rámci této studie byli jedincům odebrány vzorky tkáně (prsty) pro genetické analýzy. Při zpětném porovnání jedinců z let 2009, 2010 s daty roku 2011, bylo u pěti jedinců pozorované i způsobené poškození (odstřihnutí prstu), které můžeme považovat jako kontrolu identifikace jedinců.



Obr. 18: A) Tentýž jedinec v průběhu sezóny 2011, B) vyznačení determinačních skvrn.



Obr. 19: A) Tentýž jedinec v průběhu tří sezón (2009-2011), B) vyznačení determinačních skvrn.

Velikost srovnávané populace čítala 119 jedinců, k porovnání bylo 170 snímků. Náročnost identifikace snížilo rozdělení podle pohlaví. Konečný počet samic byl 67 jedinců, u samců pak 52 jedinců. Přestože se časová náročnost s přibývajícími jedinci zvyšovala, maximální doba identifikace jedince se pohybovala kolem jedné minuty. Počet jedinců odchycených během jedné návštěvy se pohyboval v rozmezí 3-58 jedinců. Po ukončení sezóny byla ověřena správnost identifikace všech jedinců na základě jiných determinačních skvrn. V počtu 120 jedinců byl odhalen jedinec, který byl evidován pod dvěma evidenčními čísly.

Po opravě této chyby jsem tedy získala konečný počet 119 jedinců. Žádní jedinci nebyli evidováni pod stejným číslem. Vzniklá chyba byla tedy způsobena přehlédnutím, nikoliv záměnou jedinců.

6 Závěr

Pro značení obojživelníků neexistuje žádná univerzální metoda, všechny používané metody však nejsou stejně vhodné. K metodám, které by se používat neměly, jelikož jsou pro obojživelníky většinou velice invazivní a lze je plnohodnotně nahradit jinými, patří cejchování, autotransplantace, radioaktivní značení, ale i zastřihávání prstů v nezkombinované podobě. K rozporuplným metodám patří kroužky, pásy nebo PIT značení. Naopak velice vhodnými metodami jsou tetování, VIE značení, VIAalpha značení a metoda přirozených vzorů. Právě poslední zmíněná metoda je pro obojživelníky nejvhodnější, jelikož je plně neinvazivní, a právě proto by měla být používána přednostně, pokud to daný druh umožňuje. A to i přes tu nevýhodu, že pro experimentátory může být časově náročné rozpoznání daného jedince ve velkém vzorku.

Metoda zvolená pro výzkum monitorováním pohybu jedinců v rámci vybraných lokalit v průběhu sezóny a meziročně jejich přítomností na lokalitách se zdá být vhodně zvolenou metodou. Metodu přirozených vzorů lze tedy doporučit jako hodnotnou metodu pro značení obojživelníků, zejména pro výzkumy ve kterých je potřeba odlišovat jedince.

7 Literatura

Arntzen J. W., Goudie I. B. J., Halley J., Jehle R., (2004): Cost comparison of marking techniques in long-term population studies: PIT-tags versus pattern maps. *Amphibia-Reptilia* :25, 305–315.

Arntzen J.W., Teunis S. F. M., (1993): A six year study on the population dynamics of Crested newt (*Triturus cristatus*) following the colonization of a newly created pond. *Herpetological Journal* 3: 99-110.

Baruš V., Oliva O., (1992): Obojživelníci – Amphibia, Academia Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1992 : 145- 147, 166- 167, 173.

Beausoleil N. J., Mellor D. J., Stafford K. J., (2004): Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals. Wellington, Department of Conservation. 147 p.. 29-32, 65-66.

Berger L., Speare R., Hyatt A., (1999): Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A (ed) Declines and disappearances of Australian frogs. Environment Australia, Canberra, p 23–33.

Blomquist S. M., Malcolm L., Hunter Jr., (2007): Externally Attached Radio-Transmitters Have Limited Effects on the Antipredator Behavior and Vagility of *Rana Pipiens* and *Rana Sylvatica*. *Journal of Herpetology*, 41:430-438.

Bogert C. M., (1947): A field study of homing in the Carolina toad. *Am. Mus. Novit.* 1355: 1-24.

Bradfield K. S., (2004): Photographic Identification of Individual Archey's frogs, *Leiopelma archeyi*, from Natural Markings. Wellington: Department of Conservation.

British Columbia Environment Resources Inventory Committee (1997): Standardized inventory methodologies for components of British Columbia's biodiversity: live animal capture and handling guidelines for wild mammals, birds, amphibians and reptiles. Version 1.1. British Columbia Environment Resources Inventory Committee (Resources Inventory Branch), Victoria, British Columbia, Canada.

Brown L. J., (1997): An evaluation of some marking and trapping techniques currently used in the study of anuran population dynamics. *J. Herpetol.* 31:410-419.

Campbell T. S., Irvin P., Campbell K.R., Hoffmann K., Dykes M.E., Harding A.J., Johnson S.A., (2009): Evaluation of a new technique for marking anurans. *Applied Herpetology* 6: 247-256.

Carey C., Bradford D. F., Brunner J. L., Collins J. P., Davidson E. W., Longcore J. E., Pessier A. P., Schock D. M., (2003): Biotic factors in amphibian population declines. In:

Lindre G, Krest SK, Sparling DW (eds) Multiple stressors and declining amphibian populations. Society for Environmental Toxicology and Chemistry Press, Pensacola, FL, 153–208.

Cecil S.G., Just J.J., (1978): Use of acrylic polymer for marking tadpoles (*Anura, Amphibia*). *Jurnale of Herpetology* 12: 95-96.

Clark, D.R. 1971: Branding as a marking technique for amphibians and reptiles. *Copeia* 1971: 148–151.

Clarke R. D., (1972): The effect of toe clipping on survival in Fowler's toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Copeia* 1972: 182–185.

Cochran W. W., Lord R. D., (1963): A radio-tracking system for wild animals. *Journal of Wildlife Management* 27: 9–24.

Daszak P., Berger L., Cunningham A. A., Hyatt A. D., Green D. E. , Speare R., (1999): Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Inf Dis* 5:735–748.

Daugherty C. H., (1976): Freeze-branding as a technice for marking anurans. *Copeia* 1976: 836–838.

Davis T. M., Ovaska K., (2001): Individual recognition of amphibians: Effects of toe clipping and fluorescent tagging on the salamander *Plethodon vehiculum*. *Journal of Herpetology* 35:217–225.

Donnelly, M. A., Gutoad, C., Juterbock, J. E., Alford, R. A., (1994): Techniques for marking amphibians. *In* Heyer W.R., Donnelly M.A., Mc Diarmind 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.

Drobenkov S. M, Novitsky R.V., Kosova L.V., Ryzhevich K. K., Pikulik M. M., (2005): The Amphibians of Belarus, *Advances in Amphibian research in the former soviet union VOL. 10, 2006, PENSOFT Sofia – Moscow 2005: 28-32, 81-92.*

Ehmann H., (2000): Microbranding: a low impact permanent marking technique for small reptiles and frogs as an alternative to toe clipping. *ANZCCART News* 13: 6–7.

Eitam A., Blaustein L., (2002): Noninvasive individual identification of larval *Salamandra* using tailfin spot patterns. *Amphibia–Reptilia* 23, 215–219.

Emlen S.T., (1968): A technique for marking anuran amphibians for behavioural studies. *Herpetologica* 24: 172–173.

Faber H., (1997): Der Einsatz von passiven integrierten Transpondern zur individuellen Markierung von Bergmolchen (*Triturus alpestris*) im Freiland. *Mertensiella* 7:121–132.

Fellers G. M., Drost C.A., Heyer W.R., (1994): Handling live amphibians. *In* Heyer W.R., Donnelly M.A., Mc Diarmind 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.

Ferner J. W., (1979): A review of marking techniques for amphibians and reptiles. *Herpetological Circular* 9: 1–42.

Funk W. C., Donnelly M. A., Lips K. R., (2005): Alternative views of amphibian toe-clipping. *Nature* 433: 193.

Gill D. E., (1978): The metapopulation ecology of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque). *Ecol. Monogr.* 48: 145-166.

Golay N., Durrer H., (1994): Inflammation due to toe-clipping in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Amphibia-Reptilia* 15:81-83.

Goldberg C. S., M. J. Goode M. J., Schwalbe C. R., Jarchow J. L., (2002): External and implanted methods of radio transmitter attachment to a terrestrial anuran 436 S. M. Blomquist and M. L. Hunter JR. (*Eleutherodactylus augusti*). *Herpetological Review* 33:191–194.

Gollmann G., (1984): Allozymic and morphological variation in the hybrid zone between *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura, Discoglossidae) in north-eastern Austria. *Zeitschrift für Zoologische Systematic und Evolutionsforschung.* 22: 51–64.

Griesemer S. J., Hale M. O., Roze U., Fuller T. K., (1999): Capturing and marking adult North American porcupines. *Wildlife Society Bulletin* 27: 310–313.

Hagström T., (1973): Identification of newt specimens (Urodela, *Triturus*) by recording the belly paternand a description of photographic equipment for such ragistration. *Brit. Journal Herpetology* 4: 321-326.

Hagström T., (1977): Growth Studies and Ageing Methods for Adult *Triturus vulgaris* L. and *T. cristatus* Laurenti (Urodela, Salamandridae). *Zoologica Scripta* 1: 61–68.

Halliday T., (1996): Amphibians. *Ecological Census Techniques, A Handbook* (ed. W.J. Sutherland), pp. 205–217. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Harker M. B., Rathbun G. B., Langtimm C. A., (1999): Beaded chain collars, a new method to radiotag kangaroo rats for short term studies. *Wildlife Society Bulletin* 27: 314–317.

Hartel T., Nemes S.Z., (2006): Assessing the effect of toe clipping on the yellow bellied toads. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 52: 359–366.

Havelková P. (2002): Genetická analýza hybridní zóny mezi *Bombina bombina* a *B. variegata* v předšumaví, Diplomová práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, (nepublikovaná diplomová práce).

Heatwole H., (1961) : Inhibition of digital regeneration in salamanders and its use in marking individuals for field studies, *Ecology* 42: 593 – 594 .

Hemelaar A. S. M., Vangelder J. J., (1980): Annual growth rings in phalanges of *Bufo bufo* (Anura, Amphibia) from the Netherlands and their use for age determination. *Netherlands Journal of Zoology* 30:129–135.

Hoffmann K.E., McGarrity M.E., Johnson S.A., (2008): Technology meets tradition: A combined VIE-C technique for individually marking anurans. *Appl. Herpetol.* 5: 265-280.

Jehle R., Hödl W., (1998): Pits versus patterns: effects of transponders on recapture rate and body condition of Danube crested newts (*Triturus dobrodigus*) and common spadefoot toads (*Pelobates fuscus*). *Herpetological Journal* 8:181–186.

Joly P., Miaud C., (1989): Tattooing as an individual marking technique in urodeles. *Alytes* 8:11– 16.

Judge K. A., Brooks R. J., (2001): Chorus participation by male bullfrogs, *Rana catesbeiana*: a test of the energetic constraint hypothesis. *Animal Behaviour* 62: 849–861.

Kaplan N.M., (1958): Marking and banding Frogs and turtles, *Herpetologica* 14: 131-132.

Karlstrom E. L., (1957): Method for radioactive tagging in the field, *Ecology* 38:187-195.

Kenyon N., Phillott A. D., Alford R. A., (2009): Evaluation of the photographic identification method (PIM) as a tool to identify adult *Litoria Genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology* 4 (3):403-410.

Kluge A. G., (1981): The life-history, social organization, and parental behaviour of *Hyla rosenbergi*, Boulenger, a nest building gladiator frog. *Miscellaneous Publication of the Museum of Zoology, University of Michigan* 160: 1–170.

Lamirande E. W., Nichols D. K., (2002): Effects of host age on susceptibility to cutaneous chytridiomycosis in blue and yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). In: McKinnell RG, Carlson DL (eds) *Proc 6th International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians*. Saint Paul, MN, 3–13.

Lemckert F., (1996): Effects of toe-clipping on the survival and behaviour of the Australian frog *Crinia signifera*. *Amphibia- Reptilia*. 17: 287–290.

Linn I. J., (1978): Radioactive techniques for small mammal marking. Pp. 177–191 in Stonehouse, B. (Ed.): *Animal marking: recognition marking of animals in research*. Proceedings of the RSPCA symposium 1977. MacMillan Press, London.

Madison D.M., Shoop C. R., (1970): Homing behavior, orientation and home range of salamanders tagged with tanthalam -182. *Science* 168: 1481-1487.

Martof B.S., (1953): Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Ecology* 34: 165–174.

May R., (2004): Ethics and amphibians. *Nature* 431: 403.

McCarthy M. A., Parris K. M., (2004): Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology* 41: 780–786.

McCreary B., Pearl C. A., Adams M. J., (2008): A protocol for aging anurans using skeletochronology: U.S. Geological Survey Open-File Report 2008-1209, 38 p. : 1-2.

Measey G. J., Gower D. J., Oommen O. V., Wilkinson M., (2001): Permanent marking of a fossorial caecilian, *Gegeneophis ramaswamii* (*Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae*). *J. S. Asian Nat. Hist.* 5: 141–147.

Measey G.J., Gower D.J., Oommen V., Wilkinson M., (2003): A mark–recapture study of the caecilian amphibian *Gegeneophis ramaswamii* (*Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae*) in southern India, *J. Zool., Lond.* 261:129- 133.

Moosman D.L., Moosman P.R., (2006): Subcutaneous movements of visible implant elastomers in wood frogs (*Rana sylvatica*). *Herpetol. Rev.* 37: 300-301.

Murray C. B., Beacham T. D., (1990): Marking juvenile pink and chum salmon with hot brands in the form of a binary code. *Progressive Fish Culturist* 52: 122–124.

Nilsson O. H. A., (1954): On the larval development and ecological conditions governing the distribution of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L., in Scania. *Kungliga Fysiografiska Sällskapets Handlingar.* 65: 1– 24.

Northwest Marine Technology (2000): *Visible Implant Elastomer Sample Kit: Instructions for Use*. Northwest Marine Technology, Inc., Shaw Island, Washington, USA.

O'Reilly J., (2000): Feeding in caecilians. In: *Feeding: form, function, and evolution in tetrapod vertebrates*: 149–166. Schwenk, K. (Ed.). San Diego: Academic Press.

Otis D.L., Burnham K.P., White G.C., Anderson D.R., (1978): Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildl. Monogr.* 62: 3-135.

Ott J. A., Scott D.E. (1999): Effects of toe-clipping and PIT-tagging on growth and

survival in metamorphic *Ambystoma opacum*. *J. Herpetol.* 33:344-348.

Parris K. M., McCarthy M. A., (2001): Identifying effects of toe-clipping on anuran return rates: the importance of statistical power. *Amphibia-Reptilia* 22: 275–289.

Patt H., Swift M., (1948): Influence of temperature on radiation to frogs. *American Journal of Physiology* 155: 388–393.

Pendelton R. C., (1956): Uses of marking animals in ecological studies: labelling animals with radioisotopes. *Ecology* 37: 686–689.

Pennycuik C. J., (1978): Identification using natural markings. Pp. 147–159 in Stonehouse, B. (Ed.): *Animal marking: recognition marking of animals in research*. Proceedings of the RSPCA Symposium 1977. MacMillan Press, London.

Perret N., Joly P., (2002): Impact of tattooing and PIT-tagging on survival and fecundity in the Alpine newt (*Triturus alpestris*). *Herpetologica*, 58: 131–138.

Phillott A.D., Skerratt L.F., McDonald K.R., Lemckert F.L., Hines H.B., Clarke J.M., Alford R.A., Speare R., (2007): Toe-clipping as an acceptable method of identifying individual anurans in mark recapture studies. *Herpetol. Rev.* 38: 305-308.

Plăiașu R., Hartel T., Băncilă R. I., Cogălniceanu D., (2005): The use of digital images for the individual identification of amphibians. *Studii si Cercetari Biologie, Universitatea din Bacău* 10: 137-140.

Rafijski J.N., (1977): Autotransplantation, *Journale of Herpetology* 11:241-242.

Raney E.C., (1940): Summer movements of the bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw, as determined by the jaw tag method, *Amer. Mild. Natur.* 23:733-745.

Rathbun G. B., Murphey T. G., (1996): Evaluation of a radio-belt for Ranid frogs. *Herpetological Review* 27: 187–189.

Reaser J., (1995): Marking amphibians by toe-clipping: a response to Halliday. *Froglog*. Newsletter of the World Conservation Union (IUCN), Species Survival Commission (SSC) Declining Amphibian Populations Task Force (DAPTF) 12. www.open.ac.uk/daptf/froglog/FROGLOG_12.html (Viewed: 11/12/2001).

Ricker W.E. (1956): Uses of marking animals in ecological studies : the marking of fish, *Ecology* 37: 666-670.

Richards S. J., Sinsch U., Alford R.A., (1994): Radio cracking. *In* Heyer W.R., Donnelly M.A., Mc Diarmind R.W., Hayek L.C., Foster M.S., (1994): *Measuring and Monitoring biological diversity: standart methods for amphibians*, 155- 158, Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA.

Scadding S. R., (1980): Limb regeneration in adult amphibia. *Canadian Journal of Zoology* 59: 35–45.

Seber G.A.F., (1982): *The Estimation of Animal Abundance and Related Parameters*, 2nd edn. Macmillan, New York, NY.

Seitz A., Faller-Doepner U., Reh W., (1992): Radio-tracking of the common frog (*Rana temporaria*). Pp. 484–489 in Priede, I.G.; Swift, S.M. (Eds): *Wildlife telemetry: remote monitoring and tracking of animals*. Ellis Horwood Ltd., Chichester.

Schmidt B. R., (2003): Count data, detection probabilities, and the demography, dynamics, distribution, and decline of amphibians. *C. R. Biologies* 326: 119–124.

Schwartzkopf–Genswein K. S., Stookey J. M., De Pasille A. M., Rushen J., (1997): Comparison of hotiron and freeze branding on cortisol levels and pain sensitivity in beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 77: 369–374.

Sinsch U., (1989): The migratory behaviour of the common toad *Bufo bufo* and the natterjack toad *Bufo calamita*. Pp. 113–124 in Langton, T.E.S. (Ed.): *Amphibians and roads*. Proceedings of the toad tunnel conference. Aco Polymer Products, Shefford.

Smale A., Holzapfel A., Crossland M., (2005): Development of a capture-recapture monitoring programme for Archey's frog (*Leiopelma archeyi*) in New Zealand based on photographic identification of individual frogs, *New Zealand Journal of Zoology* 32: 229.

Steaner S. P., (1950): The effect of x-irradiation on *Rana pipiens* with special reference to survival and the response of the peripheral blood. *Journal of Experimental Biology* 115: 251–262.

Steven J. B., Jacobson E.R., Lillywhite H.B., Zamudio K., (2004): *Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research*, Second Edition, Revised by the Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 19-23.

Straková H. (2010): *Nové metody studia hybridních zón obojživelníků*, Diplomová práce, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, (Nepublikovaná diplomová práce).

Thornton C.S., (1949): Beryllium inhibition of regeneration. I. Morphological effect of beryllium of amputated fore limbs of larval *Amblystoma* *Jour. Morphology* 48: 459 - 493 .

Turner F.B., (1960): Population structure and dynamics of western stopped frog, *Rana preciosa pretiosa*. Biard and Giard, in Yellowstone park, Wyoming *Ecol. Monographs* 30: 251- 278.

Yilmaz N., Kutrup B., Coranoglu Ü., Özorán Y., (2005): Age determination and some growth parameters of a *Rana ridibunda* population in Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 51: 67–74.

Vörös J., Szalay F., Barabás L., (2007): A new method for quantitative pattern analysis applied to two European *Bombina* species. *HERPETOLOGICAL JOURNAL* 17: 97–103.

Wen Bo Liao, Xin Lu (2010): Age and Growth of a Subtropical High-Elevation Torrent Frog, *Amolops mantzorum*, in Western China. *Journal of Herpetology*. 44: 172–176.

Weldon C., Preez L.H., Hyatt A. D. , Muller R., Speare R., (2004): Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis* 10:2100–2105 Woodhams DC, Alford.

Wisniewski P. J., Paull L. M., Merry D. G., Slater E.M., (1979): Studies on the breeding, migration and intermigratory movements of the common toad (*Bufo bufo*) using Panjet Dyemarking techniques. *British J. Herp.*, 6: 71–74.

Wheeler C. A., (2007): Temporal breeding patterns and mating strategy of the foothill yellow-legged frog (*Rana boylei*). A Thesis Presented to The Faculty of Humboldt State University. 8-10.

Woodhams D. C., Alford R. A., Marantelli G., (2003): Emerging disease cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Org* 55:65–67.

Woolbright L. L., Greene E. J., Rapp G.C., (1990): Density-dependent mate searching strategies of male woodfrogs. *Animal Behaviour* 40:135-142.

Wooley H.P., (1973): Subcutaneous acrylic polymer injection as a marking technique for amphibians. *Copeia* 1973 :340-341.

Wright K. M., Minott T., (1999): Individual identification of captive Mexican caecilians (*Dermophis mexicanus*). *Herpet. Rev.*, 30: 32–33.

Zydlewski G.B., Haro A., Whalen K.G., McCormick S.D., (2001): Performance of stationary and portable passive transponder detection systems for monitoring of fish movements. *J. Fish Biol.* 58: 1471-1475.

Internetové odkazy

www.arkive.com

www.biolib.cz

www.botany.uwc.ac.za/presents/focuson/frogs/freeze.htm

www.fs.fed.us/psw/topics/wildlife/herp/rabo.shtml

www.ristohurme.com/insularum.htm

www.sciencephotolibrary.com

Příloha 1: Variabilita skvrnitosti u vybraných českých druhů skupina Caudata



Obr. 20: Mlok skvrnitý (Dorzální skvrny)



Obr. 21: Čolek horský (Laterální skvrny)

Zdroj : www.biolib.cz

Příloha 2: Variabilita skvrnitosti u vybraných českých druhů skupina Anura



Obr. 22: Skokan hnědý (Dorzální pohled)

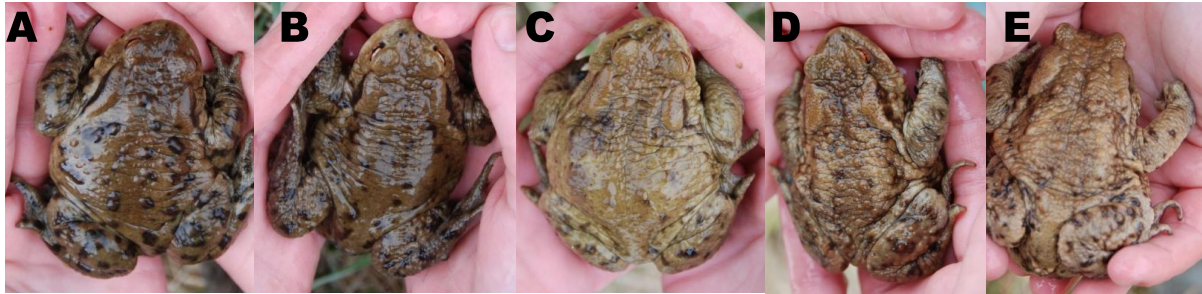


Obr. 23: Rosnička zelená (Laterální pohled)



Obr. 24: Blatnice skvrnitá (Laterální pohled)

Zdroj : www.biolib.cz



A. Dorzální skvrny



B. Ventrální skvrny



C. Skvrny na stehnech

Obr. 25: Ropucha obecná (tytéž jedinci A-E, v různých pohledech)



Obr. 26 :Ropucha zelená (Dorzální skvrny)



Obr. 27: Kuňka obecná (Ventrální skvrny)



Obr. 28: Kuňka žlutobřichá (Ventrální skvrny)