

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

**Individuální značení obojživelníků zastřiháváním prstů a jeho vliv
na přežívání**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Magda Vodrážková

Vedoucí práce

Mgr. Michal Berec, Ph.D.

České Budějovice 2016

Anotace

This bachelor thesis is focused on marking techniques of amphibians. As the main point of interest was chosen "toe clipping" method, it's application on individual species and it's influence on the survival of marked amphibians. This thesis also contains the summary of various techniques used for marking of amphibians, including pros and cons of each method as well as their comparison.

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 15. 4. 2016

.....
Magda Vodrážková

Poděkování

Děkuji panu Mgr. Michalovi Berecovi Ph.D. za podporu, cenné rady, připomínky a odborné vedení během zpracování mé bakalářské práce. Mé díky patří všem, kteří mi poskytli potřebné informace, pomoc a radu pro vypracování této práce. Také velmi děkuji své rodině za jejich pomoc a podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Techniky značení	2
1.1.1. Zastříhávání prstů a ocasu	3
1.1.1.1. Postup při značení	5
1.1.1.2. Zákony	7
1.1.1.3. Skeletochronologie	8
1.1.2. Alternativní metody	9
1.1.2.1. Značky, kroužky, pásky	9
1.1.2.2. Autotransplantace	11
1.1.2.3. Telemetrie	11
1.1.2.4. Radioizotopové značení	12
1.1.2.5. Chemické značení	13
1.1.2.6. Cejchování teplem	13
1.1.2.7. Vymrazování	14
1.1.2.8. Tetování	15
1.1.2.9. Viditelný implantát elastomer (VIE - Visible implant elastomers)	15
1.1.2.10. Passive Integrated Transponders (PIT)	16
2. Metodika	18
3. Výsledky a diskuze	18
4. Závěr	29
5. Literatura	31
6. Příloha	40

1. Úvod

Obojživelníci patří mezi jednu z nejohroženějších skupin živočichů na světě. Mnoho druhů je ohroženo vyhynutím v důsledku ztráty a znečišťování jejich přirozeného prostředí, změnami klimatických podmínek a dalších faktorů působících jak v lokálním, tak v globálním měřítku (Stuart et al. 2008). Mnoho typů ekologických studií vyžaduje unikátní identifikaci jednotlivců, která je zpravidla dosažena jejich označením.

Individuální značení jedinců je při terénním nebo laboratorním výzkumu některých aspektů biologie živočichů naprosto nezbytným metodickým požadavkem pro následnou identifikaci. Výsledky získané označením jednotlivců mohou poskytnout přesné informace o trendech populace a o jejich demografických odhadech (Manly et al. 2005).

Výzkum spojený s obojživelníky, s jejich volně žijící populací a s osídlenými stanovišti je významný pro rozvoj základního vědeckého poznání, důležitého k zlepšení zpracování údajů a přežití těchto obratlovců ve volné přírodě i v zajetí (Steven et al. 2004).

Mnoho studií může být prováděno jednoduchým pozorováním zvířat, zatímco jiné studie vyžadují manipulaci v terénu nebo v zajetí. Tyto výzkumy mohou narušit normální činnost zvířat, vyvolávat u nich stres nebo vést k abnormálnímu chování, které eventuálně může způsobit jednotlivci riziko zvýšené náchylnosti k predaci, úrazu nebo nemoci. Tedy stejně jako u jiných skupin obratlovců, použití obojživelníků v oblasti výzkumu a výuky vyvolává etické otázky, které musí být pečlivě zváženy již před zahájením výzkumu (Steven et al. 2004).

Humánní zacházení s volně žijícími a v zajetí chovanými obratlovci je etická, právní a vědecká nutnost. Traumatizované nebo stresované zvíře může vykazovat abnormální fyziologické, behaviorální a ekologické reakce, které zkreslují výsledky. Humánní zacházení s divoce žijícími zvířaty usnadňuje jejich schopnost obnovit normální činnost po jejich vrácení do volné přírody.

Metody pro značení živočichů, jako například tetování a vymrazování, je obtížné aplikovat na obojživelníky vzhledem k jejich jedinečné anatomii a povaze jejich kůže (Halliday 1996), která se navíc rychle regeneruje a svléká po malých částech. Tento proces ztěžuje nároky na dlouhodobé značení - značky nemusí být dobře čitelné nebo po čase mizí. Navíc značení obojživelníků komplikuje jejich poměrně malá velikost. Stále nejběžnější technikou pro jednotlivé identifikování obojživelníků je metoda zastřihávání prstů (nebo

jejich částí), při které vzniká jedinečná kombinace číslic (McCarthy et Parris 2004, Halliday 1996).

V posledních době se objevilo několik publikací, upozorňujících na riziko ovlivnění vědeckých výsledků při studiu biologie pomocí individuálního značení jedinců zastřiháváním článků prstů. Ne všichni vědci s touto metodou souhlasí. Proto se v bakalářské práci zabývám literární rešerší prací, zabývajících se přežíváním obojživelníků v populacích s individuálně značenými jedinci. Cílem této práce je zjištění vztahu přežívání značených jedinců a vybraných biologických charakteristik, dále vyhodnocení vhodnosti použití metody zastřihávání prstů a vlivu této metody na přežívání u obojživelníků. Dalším cílem práce je zhodnocení alternativních metod pro značení, jeho výhody, nevýhody a použití v praxi.

1.1. Techniky značení

Při výběru značkovacích technik je důležité zabývat se aspekty, které mají vliv na chování, fyziologii a přežití zvířete (Steven et al. 2004).

Zdaleka nejvíce populární metoda, jak změřit velikost populace, se nazývá „Mark and recapture“. Metoda spočívá v označení množství jednotlivců v přirozené populaci, jejich navrácení zpět a následný odchyt některých z nich jako základ pro odhad velikosti populace v době značení a vypouštění. Počet označených jedinců v rámci druhého měření by měl být úměrný počtu značených jedinců v celé populaci. Odhad celkové velikosti populace je možno získat takto: počet označených jedinců je podílem počtu značených jedinců ve druhém měření (Green 2001).

Široké využití jednotlivých metod značení nacházíme ve studiích k odhadu početnosti populace, ke zjištění demografických parametrů, k získání informací o přirozené historii a k provádění behaviorálních průzkumů (Grafe et al. 2011).

Způsoby používané k identifikaci jedinců mohou být trvalé, dočasné, specifické k danému datu nebo individuálně specifické. Jejich použití závisí na cílech výzkumu a charakteristice pozorovaného organismu (Beausoleil et al. 2004). Při výběru vhodné označovací techniky musíme brát v úvahu povahu a dobu trvání, omezení a množství odebrané nebo poškozené tkáně. Důležitou roli hraje také to, zda zvíře nebylo vystaveno příliš velkému stresu, větším rizikům predace, infekce nebo onemocnění (Green 2001). Pro správné

použití metod je zapotřebí dlouhodobé pozorování daného druhu a získání více informací o jejich biologii (Läma et al. 2011).

U obojživelníků se používá několik invazivních technik k označení jedinců: zastříhávání prstů (ocasu), cejchování teplem, vymrazování, autotransplantace, tetování, VIE (Visible Implant Elastomers – Viditelný implantovaný elastomer), akrylové polymery, VIA značky (Visible Implant Alphanumeric tags – Viditelné implantované alfanumerické značky), PIT (Passive Integrated Transponders – pasivní integrované transpondéry), radioaktivní značení, kroužky, pásy a telemetrie. Všechny vyjmenované metody více či méně poškozují tělo obojživelníků.

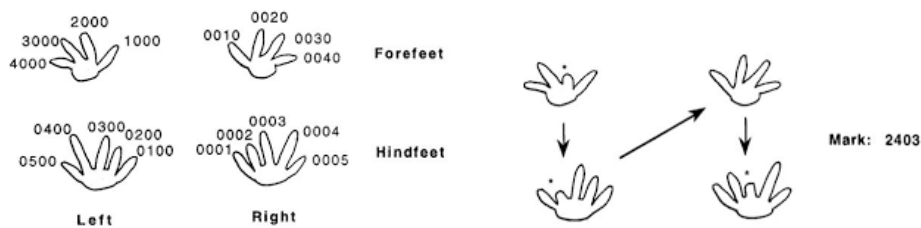
Prováděný výzkum by měl splňovat obecné kritéria:

- A. Postupy by se měly vyhnout stresu jedinců nebo ho minimalizovat.
- B. Nevytvářet zbytečně zdvojování předchozích prací.
- C. Postupy, které mohou způsobit momentální nebo dlouhodobější stres, by měly být prováděny za použití příslušného sedativa, analgetik nebo anestézie, pokud je to u druhu nebo jedince možné.
- D. Jedinci ohrožených taxonů by neměli být odebráni z přírody ani dovezeni nebo vyvezeni, s výjimkou případů týkajících se úsilí o zachování druhu, které je plně v souladu s platnými předpisy (Steven et al. 2004).

1.1.1. Zastříhávání prstů a ocasu

Tato metoda je velmi využívána při studování ekologie a chování obojživelníků. Značení zastříháváním prstů poprvé aplikoval Hamilton (1934), který studoval rychlost růstu amerických ropuch. Biologové té doby neměli příliš velkou starost o welfare zvířete. Martof (1953) vyvinul systém číslování, který umožňuje individuální identifikaci 6399 jednotlivců s maximálním odstraněním dvou prstů na jedné končetině. Postupem času Donnelly a Hero (1989) vymysleli systémy, při kterých odstraňují menší počet prstů než Martof (1953).

Metoda spočívá v odstranění jedinečné kombinaci prstů, z nichž každá část prstu odpovídá předem definovanému číselnému kódovacímu systému používanému k identifikaci jednotlivců (Martof 1953, Donnelly et al. 1994) (obr. 1).



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

Jde o správný způsob jak uchovat odříznutý prst pro genetickou analýzu, histologické vyšetření na infekční onemocnění nebo k určení (odhadu) stáří obojživelníka (Green 2001).

V současné době má označování další tři hlavní funkce (pokud je odstřižená špička uložena), kde mohou být prsty použity:

- 1) ve studiích genetických / DNA (populační genetika, detekce mikrobiálních onemocnění),
- 2) histologické vyšetření na infekční choroby (chytridiomykóza a ranavirus),
- 3) určování věku obojživelníků pomocí skeletochronologie.

Aby bylo zajištěno co největší využití odebrané tkáně, používá se 70 až 75% ethanol. Formalin se doporučuje pro histologii, ale formalinem fixovaná tkáň je téměř nepoužitelná pro obnovu DNA. Ethanolem fixované tkáně zachovávají morfologii buněk pro histologické vyšetření a mohou být použity pro molekulární testy, včetně získání DNA pro genetickou analýzu (Green 2001).

Uvedený způsob značení se provádí především na malých zvířatech proto, že ztráta krve je u nich nízká nebo je dobře snášena. Množství ztracené krve se liší podle jednotlivých druhů (Clark 1971). Všechny metody odstranění tkáně jsou velmi snadno, rychle a levně proveditelné. Ačkoliv postup značení je sám o sobě jednoduchý, čtení identifikačních kódů je obtížnější a potenciál pro nesprávnou identifikaci je velký. Kódovací systém by měl být dobře zdokumentovaný, aby budoucí identifikace byla pokud možno co nejpřesnější. Kromě toho, ztráta přirozené tkáně může zkreslit identifikační systémy. Zvířata musíme téměř vždy znovu odchytit pro identifikaci. Mnozí vědci se domnívají, že pokud se metoda provádí opatrně, je nejméně nákladově náročná, spolehlivá a nejméně stresující pro značené obojživelníky.

Jednotlivé prsty mají i své specializované funkce. Například samci ropuchy krátkonohé (*Bufo calamita*) využívají první tři prsty na předních nohou k rozmnožování. Dlouhý čtvrtý prst ze zadní nohy by neměl být odstraňován u obou pohlaví, vzhledem k jeho významu při svlékání (Clark 1971).

Mezi potenciální nevýhody používání zastřihávání prstů patří bolest a stres z fyzického zmrzačení a následné riziko infekce. Současnou hrozbou je i vyšší riziko

chytridiomykózy. Jde o houbové a infekční onemocnění u obojživelníků způsobené *Batrachochytrium dendrobatidis*. Onemocnění bylo spojeno s populačním poklesem či vymíráním druhů obojživelníků v západní části Severní Ameriky, Střední Americe, Jižní Americe, východní Austrálii a v Karibiku. Endemitická houba se vyskytovala v Africe po dobu 23 let, než se rozšířila do ostatních kontinentů. Prostředkem šíření byl mezinárodní obchod s drápatkami vodními (*Xenopus laevis*), který začal v třicátých letech devatenáctého století (Weldon et al. 2004). Kromě toho je zde možnost zvýšeného rizika úmrtnosti, nemocnosti a změny v chování. Po prožitém stresu se mohou jedinci přesouvat na jiné stanoviště.

V poslední době se metoda dostala pod kontrolu vzhledem k tvrzení, že tento způsob snižuje přežití jedinců všech druhů a je neetický (McCarthy et Parris 2004). Objevilo se několik publikací, upozorňujících na riziko ovlivnění vědeckých výsledků při studiu biologie obojživelníků pomocí individuálního značení jedinců zastřiháváním článků prstů. Ne všichni vědci ale s touto kritikou souhlasí. Na základě těchto názorů se rozšířila diskuze o výhodách a nevýhodách této metody (Parris et McCarthy 2008, Phillott et al. 2007, viz níže).

1.1.1.1. Postup při značení

Tento postup představuje bezpečný, jednoduchý, hygienický a humánní způsob odstranění prstů. Zároveň by měl eliminovat nebo výrazně snížit případné negativní účinky. Popsaný postup je omezen na úplně metamorfované žáby, není vhodný pro pulce, larvy a mloky (Perry 2011).

Příprava

Očistíme končetinu čistou vodou, abychom odstranili bahno a nečistoty. Proud vody by měl působit alespoň 5 sekund na dorsální i ventrální plochu prstů. Doporučuje se nastříkat místo řezu antiseptickým přípravkem jako je Bactine nebo Betadine. Pro ustříhnutí používáme ostré, dezinfikované, chirurgické nůžky z nerezové oceli. Dezinfikujeme ponořením do 70% nebo více procentuálního ethanolu. Nůžky po namočení zapálíme a necháme zchladit. Po každé kontaminaci opětovně dezinfikujeme. Nůžky by měly být extrémně ostré, jinak mohou

způsobovat podlitiny, roztržení kůže a poranění tkáně. Zároveň musí být i velmi čisté, aby se zabránilo přenosu nemocí a minimalizovalo riziko infekce (Beausoleilat et al. 2004).

Alkoholy, fenoly a látky na bázi jódu nelze použít u obojživelníků, protože tyto látky zabrání produkci hlenu v epidermis, který je chrání před dehydratací, viry, bakteriemi a houbami. Při absorpci kůží mohou být alkoholy, jód a fenolické látky pro obojživelníky toxické. V současné době existuje pouze jeden komerčně dostupný antiseptický a antibakteriální přípravek, který neobsahuje olej, tuk nebo alkohol. Jde o Bactine® sprej, který je určen pro aplikaci na rány po ustřížení prstu (Green 2001).

Postup

Obojživelníci mají pět prstů na zadních a čtyři prsty na předních končetinách. Prsty jsou označovány římskými číslicemi I až V. První číslice (I) označuje nejkratší prst (palec), číslice IV nejdelší. Každý prst se skládá ze dvou druhů kostí: kost nártu a článků prstů. Číslice I a II mají po dvou člancích, číslice III a V mají po třech člancích a číslice IV má čtyři články. Krvácení je minimální a obvykle trvá pouze 15 až 30 sekund. Proudí-li krev z rány po dobu delší než několik sekund, můžeme použít látky pro zastavení krvácení a zvýšení srážení krve (Green 2001). Po ukončení krvácení je třeba ránu dezinfikovat Bactine®. Obojživelník by měl být vypuštěn na půdu ne do vody. Voda okamžitě smyje dezinfekci, navíc může obsahovat vysoké množství bakterií a plísní, které mohou infikovat ránu (Green 2001).

Amputované prsty umístíme do lahvičky se 70 až 75% ethanolem. Objem ethanolu by měl být nejméně 10 krát větší než objem odebrané tkáně.

Prsty III a V jsou doporučeny pro odstřížení tehdy, pokud má být prst oříznut pouze jako biopsie pro analýzy a ne jako způsob individuální identifikace obojživelníka. Mnoho herpetologů doporučuje, aby číslici I (palec) nebyl uříznut u samců žab. U některých druhů se na tomto prstu během období rozmnožování vytváří mozol, který samci používají k přichycení k samici (Green 2001).

1.1.1.2. Zákony

V reakci na zvýšený tlak veřejnosti politici v mnoha zemích přijali legislativu, která ovlivňuje výzkum zvířat a to buď přímo, nebo prostřednictvím pravidel ze strany různých agentur. Pravidla se liší jak stát od státu, tak i v rámci jedné země v závislosti na studovaných organismech a daných podmínkách studie. Práce s mnoha druhy se řídí ustanoveními úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES). V zákonech musí být zohledněny i terénní výzkumy, ne jen práce v laboratorních podmínkách, která je složitěji aplikovatelná pro terénní studie. V terénním výzkumu není možné předem vymezit přesný počet jedinců, kteří se v místě výzkumu mohou vyskytnout (Perry et al. 2011).

Zastříhávání prstů může být používáno pro označení volně žijících obojživelníků, pokud nemůže zhoršit běžnou činnost označeného zvířete. Prsty nezbytné pro činnosti hrabání, šplhání, rozmnožování nebo pro tvorbu hnízda by nikdy neměly být odstraněny. Není dovoleno odstranění více než dvou prstů na zadních končetinách. Aseptický postup musí být zachován, aby se zabránilo infekci. Chirurgická zařízení musí být dezinfikována před každým použitím. Používají-li se nůžky, musí být žíhané a ponořené v alkoholu (Perry et al. 2011).

Jedinci ohrožených taxonů by neměli být odebráni z přírody, ani dovezeni nebo vyvezeni, s výjimkou případů týkajících se úsilí o jejich zachování, které jsou plně v souladu s platnými předpisy.

Manipulace a zastříhávání prstů na žábách žijících v Novém Zélandu musí být provedeno během 4 minut, aby vše bylo v souladu s požadavky Massey University Animals Ethics Committee requirement (MUAEC) (Eggers 1998). Nebyly zde zaznamenány žádné zprávy o vlivu zastříhávání prstů na chování nebo přežívání žab. I přes odbor ochrany zvířat Etické komise bylo schváleno používání metody pouze na populacích žijících na ostrovech Maud a Stephens (Beausoleilat et al. 2004).

1.1.1.3. Skeletochronologie

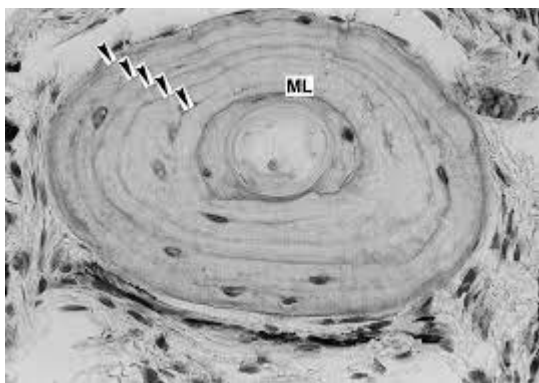
Skeletochronologie přinesla demografické údaje o více než 200 druhů obojživelníků, převážně žab. Jedná se o spolehlivou metodu pro určení věku, pokud nemáme záznamy o odchytu zvířete. Spoléhat pouze na odhad věku podle velikosti je zavádějící, jelikož při dosažení pohlavní dospělosti se růst obojživelníků zpomaluje. Metoda se stala standardním postupem odhadu věku obojživelníků (Bruce 2002), šupinatých (Buffrénil et Castanet, 2000), dinosaurů (Horner et al. 1999), ptáků (Bourdon et al. 2009) a savců (Marin-Moratalla et al. 2013). První úspěšné pokusy u obojživelníků byly použity na lebečních kostech skokana *Lithobates catesbeianus*, které prováděl v roce 1940 William C. Senning.

Tato metoda je založena především na histologickém vyšetření kostí prstu. Využívá zbarvení průřezů kostí, které umožňuje zviditelnění letokruhů (Makovický et al. 2015).

Využívá se především u obojživelníků žijících v mírném pásmu. Oproti tomu se velmi málo studií zabývá červorami a tropickými obojživelníky. Sezónní klima ovlivňuje fyziologické aktivity obojživelníků jako je růst kostí, což má za následek tvorbu opakovaných vzorů v jejich kostech v době, kdy byl růst pozastaven (lines of arrested growth, LAG). Čáry jsou patrné na řezu kostí a odpovídají obdobím neaktivity - hibernaci či aestivaci (obr. 2). Dosažení pohlavní zralosti může být doprovázeno náhlým zpomalením růstu skeletu, což se pak projeví v posledním ročním růstu (mezikruží).

Nejpřesněji lze věk stanovit z dlouhých kostí jako humerus nebo femur. To však vyžaduje usmrcení vyšetřovaného jedince, což u populací vzácných nebo ohrožených druhů není žádoucí. Alternativou je použít k zjištění věku u obojživelníků pouze kosti z prstu, který je jim odstřížen. Pokud jsou použity články prstů získané jejich zastřiháváním, jsou nejvhodnější bazální a střední články prstů, které poskytují lepší rozlišení než distálněji vzdálené články (Sinsch 2015).

Kost může být uložena buď suchá a čistá nebo konzervovaná v 70% ethanolu nebo 4% formaldehydu a to při pokojové teplotě. Standardní laboratorní postupy s kostmi zahrnují odvápnění (3-5% kyselina dusičná nebo kyselina mravenčí), fixaci (Bouinův roztok) a vložení do parafínu nebo do ledu (Sinsch 2015).



Obr. 2: Průřezu kosti dospělého 5-ti letého samce. Znárodněny letokruhy - LAGs (šipky) a metamorfóza (ML) (Ento et Matsui 2002)

1.1.2. Alternativní metody

Mezi alternativní metody můžeme zařadit trvalé metody vytvářející značky, které jsou méně viditelné a často zahrnují poškození tkání (stálé nebo dočasné). Přesto, že tyto značky jsou trvalé, neexistuje na označení žádná záruka. Vzhledem k regeneraci a k vlastnostem povrchu těla obojživelníků má většina metod charakter „Semi-permanent“. Trvalost většiny značek je značně ovlivněna věkem zvířete a vlivem prostředí, ve kterém žije (Neitfeld et al. 1994).

1.1.2.1. Značky, kroužky, pásy

Výrobní materiál je různorodý. Nejčastěji se používá kov, plast, kůže, vinyl nebo nylon. Značky jsou obvykle doplněny alfanumerickými kódy pro individuální nebo skupinové označení. Značky mohou být aplikovány na končetiny, prsty, na čelist nebo v oblasti pasu (obr. 3) a jsou doplněny identifikačními symboly nebo kódy. Obecně platí, že existuje „trade-off“ mezi zviditelněním značky a jejím negativním dopadem na nositele.

Trvanlivost a udržení značky závisí na faktorech, jako je materiál, velikost, tvar a umístění. Stejně na vlastnostech nositele, které zahrnují anatomii, chování, lokalitu a četnost výskytu infekcí. Značky mohou být také použity jako doplňkové pro jiné metody (např. pro radioaktivní značky nebo telemetrické zařízení pro sledování zvířat).

Kovové značky musí být vyrobeny z lehkého materiálu, který nepodléhá korozi. Nejčastěji jsou vyrobeny z hliníku, nerezové oceli, titanu, monelu (nikl-měď) a dalších slitin. Kovové štítky méně viditelné lidským okem jsou také méně viditelné pro dravce nebo kořist.

Vyrábí se i plastové visačky v široké škále barev, které jsou vhodné k identifikaci zvířat na dálku. Některé barvy ale mohou rychle vyblednout působením přírodních vlivů, hlavně UV zářením. Například modré zbarvení slábne a je často již za dva roky nepoznatelné. Barevné značky narušují maskování a mohou přilákat predátory, popřípadě předem varovat svou kořist.

Důležitým hlediskem pro aplikaci značek je jejich správná instalace. Příliš pevné uzavření kroužku může způsobit poškození kůže, infekci, omezení cirkulace v cévách a může vést až k nekróze a ztrátě končetin. Krční kroužky by neměly omezovat v krmení, v krevním oběhu a v dýchání (Neufeld et al. 1994). Volně připevněné zařízení vystavuje možnost zapletení se zvířete do vegetace nebo jeho uškrcení. U mladých a ještě rostoucích jedinců by měl být materiál navržen tak, aby se mohl rozšířit, povolit nebo odtrhnout. Toto hledisko bychom měli u obojživelníků obzvláště zvážit, protože mají neukončený růst a rostou po celý život (Beausoleilat et al. 2004).

Emlen (1968) při studiích samců skokana *Lithobate scatesbeianus* použil ke značení nylonové pásky. Po jejich aplikaci neshledal žádné rozdíly v chování, úmrtnosti nebo emigraci jedinců. Rathbun a Murphey (1996) hodnotili použití kovových korálkových řetízků, připojených kolem pasu a noh žab *Rana aurora*. U označených žab se u 13% vytvořily v oblasti značení malé vředy a to po obou stranách řetízků. Kromě toho vědci zjistili, že řetěz musí být vyměňován při každém odchycení kvůli korozi a opotřebení.



Obr. 3: Samec skokana žlutohého (*Rana boylii*) označený zeleno-bílým korálkovým pásem (Wheeler 2007).

1.1.2.2. Autotransplantace

Transplantací se označuje děj, kdy se uskutečňuje přenos živých buněk, tkáně nebo celých orgánů z jedné části jedince na jeho jinou část, nebo z jednoho jedince na jiného. Autotransplantace je transplantace v rámci jednoho organismu. Individuální označení je možné pomocí různých kombinací lokalit a počtu zákroků. Nicméně, tato metoda je vhodná pouze pro druhy s výraznými přirozenými vzory. Pro ohrožené druhy je tato metoda nevhodná, vzhledem k vysokému riziku infekce a nepřijetí implantátu.

Rafinski (1977) používá k označení autotransplantací evropské a alpské čolky horské (*Triturus alpestris*). Kousky kůže 3 mm x 3 mm byly vystřiženy z oranžového břicha, tmavší hřbetní strany a navzájem vyměněny. Zvířata byla anestetizována během zákroku na 3 minuty. Autotransplantace byla také použita k označení drápatek vodních (*Xenopus laevis*) (Verhoeff-de Fremery et Vervoordeldonk 1982). Při výměně kousků kůže bylo použito lepidlo, které není přímým požadavkem pro tuto metodu. Autoři uvádějí, že odmítnutí tkáně několik dní po zákroku činí pouze 3% - 5%.

1.1.2.3. Telemetrie

Telemetrií se rozumí zachycování signálů vysílaných ze zařízení připojeného k živočichovi, s cílem vzdáleně shromažďovat údaje o umístění, chování, fyziologii a charakteristice životního prostředí, ve kterém se pohybují. Tato metoda umožňuje výzkumníkovi udržet určitou vzdálenost mezi ním a sledovaným jedincem, který pak může být studován s minimálním dopadem na jeho přirozené chování.

Energetické formy pro přenos dat zahrnují akustické, elektrické, magnetické a elektromagnetické vlny. Nejčastěji se přenáší pomocí vysokofrekvenčních radiových vln (radio-telemetrické). Radio-telemetrické zařízení se skládá z vysílače, zdroje energie a vysílací antény, které musí být připojeny k jedinci. Pro tento požadavek je omezující velikost zvířete, ke kterému je vysílač připojen. Vysílače se liší ve velikosti, hmotnosti, dlouhověkosti a v kapacitě baterie. Signály mohou být vysílány nepřetržitě nebo v určitých intervalech. Vysílačky se připojují externě (pomocí lepidla, stehů, pásků nebo kroužků) nebo interně. Obecné doporučení je, že hmotnost vysílače by neměla být vyšší než 10% tělesné hmotnosti zvířete (Heyer et al. 1994).

Největšími nevýhodami metody jsou, že záznamová zařízení musí být vrácena za účelem načtení dat, je zde relativně vysoká časová náročnost, složitost zařízení, omezení napájecího zdroje a pracovní náklady podílející se na sledování označených zvířat. Zvířata navíc musí být často znovu odchyťována kvůli odstranění zařízení na konci studie nebo pro výměnu baterie. Telemetrii lze použít ke sledování jakéhokoliv zvířete dostatečné velikosti, aby mohlo nést vysílací zařízení bez nepříznivých vlivů.

1.1.2.4. Radioizotopové značení

Tato metoda pracuje na principu energetických emisních profilů, které má každý radioaktivní izotop jiné a jejichž základ umožňuje detekci. Toto značení může způsobit poškození tkáně. Rozsah poškození souvisí s mírou radioaktivity a energetického profilu izotopu (radiotoxicitu) (Linn 1978).

Radioaktivní materiál může být aplikován různými způsoby a slouží ke studiu malých, maskovaných, solitérních nebo nočních živočichů, které by bylo jinak obtížné studovat. Radioizotopy jsou zvláště důležité pro sledování jedince příliš malého nebo jinak nezpůsobilého pro výkon telemetrického zařízení (Ferner 1979, Thompson 1993). Radioizotopové značky nejsou detekovány smysly zvířat, ke kterým jsou připojeny ani nezvýrazňují jejich nápadnost k predátorům nebo kořisti.

Volba radioizotopu je závislá na dostupnosti, typu emitovaného záření, radiotoxicitě, poločasu rozpadu izotopu, vzdálenosti detekce a na době trvání studie (Linn 1978). Optimální poločas rozpadu radioizotopu je vypočten na přibližně dvě třetiny délky studie.

Radioizotopy mohou být také vpraveny injekčně do těla, což často vyžaduje anestezii. Tyto značky jsou začleněny do tkání a metabolických procesů v těle. Mohou být vylučovány močí nebo výkaly, a tak přenosné i na potomstvo a do okolí (Beausoleilat et. 2004). Některé izotopy jsou dobře dispergovány po celém těle, zatímco jiné jsou koncentrovány v určitých tkáních (např. jód ve štítné žláze). Vzhledem k dlouhým poločasům rozpadu některých izotopů, může existovat riziko kontaminace životního prostředí. Taková kontaminace může vystavit záření i necílové živočichy.

1.1.2.5. Chemické značení

Určité chemické látky mohou být aplikovány na kůži zvířat k vytvoření značek, které jsou v kontrastu s okolní kůží. Současná teorie představuje tyto sloučeniny jako inhibitory tvorby melaninu, což vede k produkci de-pigmentované kůže (Schwartzkopf et al. 1994).

Sloučeniny mohou být aplikovány do dermis nebo přímo na epidermis. Dlouhotrvající čitelnost závisí na použité chemické látce a dobré aplikaci. Depigmentační chemické látky jsou často velmi dráždivé pro tkáň (Beausoleilat et al. 2004).

Thomas (1975) označil žáby čeledi *Hylidae* použitím 75% dusičnanu stříbrného s 25% dusičnanem draselným. Sloučenina byla použita na hřbetní stranu, kde způsobila hnědé značky. O dva týdny později značky vybledly na světle hnědou, takže dobře kontrastovaly s barvou pozadí těchto žab. Značky byly rozeznatelné na více než 9 týdnů bez známky poškození zvířat. Pokud je značka umístěna na hřbetu, pak není nutné odchyťovat jedince pro identifikaci. Metoda je vhodná pouze pro obojživelníky s barvou těla, která je odlišná od světle hnědé značky. Tato metoda může opět porušit kryptické zbarvení žab a zvýšit jejich nápadnost pro dravce (Beausoleilat et al. 2004).

1.1.2.6. Cejchování teplem

Metoda používá značkování ocelí a železem, které může být zahřáto třemi způsoby: přímým vytápěním, elektrinou nebo otevřeným ohněm. Stálá značka je výsledkem poškození tkáně, ke kterému dochází při aplikaci nadměrného tepla na kůži. Značky mohou mít symbolické tvary a slouží k identifikaci skupiny nebo jednotlivce.

Kůže obojživelníků hraje důležitou roli v termoregulaci, regulaci vody a ve výměně plynů (Dorit et al. 1991). Metoda cejchování zasahuje do fyziologického významu kůže. Pokud je vypálení provedeno na velké ploše jedince, hrozí úbytek tělesné tekutiny a žába může zemřít na dehydrataci (Ferner 1979). Proto by měla být tato metoda použita u obojživelníků pouze tehdy, pokud neexistuje žádná lepší alternativa.

Cílem vypálení je podporovat tvorbu jizevnaté tkáně, která se viditelně liší od okolní kůže. Při správném použití je výsledkem vysoce viditelné a trvalé značení, které může přetrvávat po celý život. I když teplo ránu sterilizuje, riziko následné infekce je vyšší než u některých méně invazivních metod a to vzhledem k závažnosti poškození tkáně a potřebnému času k hojení ran (Beausoleilat et al. 2004).

Vypalování bylo použito k označení 311 ropuch *Incilius valliceps* a 159 skokanů volských (*Rana catesbeiana*) a skokana levhartího (*Rana pipiens*) (Clark 1971). Drát (20% chrom, 80% nikl) byl vytvarován do číslic, které byly zahřívány pomocí přenosného propan hořáku. Tři číslice byly aplikovány na ventrální stranu každého zvířete. V místě značky nebyla následně pozorována ztráta tělesných tekutin. Taber a kol. (1975) použili podobné metody k označení velemloků amerických (*Cryptobranchus alleganiensis*). Čitelnost značky 1,5 cm vysoké trvala po celou dobu dvouletého studia.

1.1.2.7. Vymrazování

Cejchování za pomoci mrazu probíhá stejně jako cejchování teplem s tím rozdílem, že kovový předmět (vyrobený z oceli, železa, mosazi nebo mědi - měď a slitiny mědi jsou prezentovány jako neúčinnější pro přenos tepla) ponořením do tekutého dusíku nebo suchého ledu zchladíme. Tekutý dusík sice udržuje konstantní teplotu (-196 °C), ale je obtížný a nebezpečný pro přepravu a navíc se v tropickém podnebí rychle vypařuje (Measey et al. 2001). Pevný oxid uhličitý (suchý led) ve směsi s alkoholem (například 99% isopropylalkohol) je vhodnější pro vymrazování železem (teplota se pohybuje v rozmezí od -67 °C do -77 °C). Suchý led je snadno dostupný, je snadněji skladovatelný a údajně vykazuje lepší výsledky než kapalný dusík (Newton 1978).

Metoda ničí buňky produkující pigment (melanocyty), což vede k produkci depigmentované kůže, která kontrastuje s původní barvou kůže. Při správné aplikaci vytváří dlouhotrvající, jasné a vysoce viditelné stopy. Kůže by měla být očištěna od nečistoty alkoholem, aby se zabránilo slepení s chladným železem a trhání kůže.

Measey a Tinsley (1998) při studiích na drápatkách vodních (*Xenopus laevis*) zjistili, že všechny číslice bylo snadné rozlišit i 2 roky po značení. Measey a kol. (2001) také potvrdil, že značky jsou dlouhotrvající na *Xenopus laevis*. Measey (2001) takto značil červory cecílie modré (*Gegeneophis ramaswami*). Značky byly hned po aplikaci slabě viditelné a zřetelněji se objevily o 15 minut později. Svoji čitelnost si udržely po dobu 4 měsíců studie. Žádné známky infekce, nebo dalších nežádoucích účinků nebyly na označených jedincích pozorovány. Na rozdíl od toho Klewen (1982) zjistil, že použití měděných značek ochlazených v suchém ledu, způsobily těžkou újmu na zdraví nebo smrt u několika druhů mloků a čolků (*Salamandra atra*, *Triturus alpestris*, *Triturus vulgaris*). Klewen v závěru pronesl, že vymrazování by nemělo být používáno k označení těchto druhů mloků a čolků.

1.1.2.8. Tetování

Kaplan (1958) byl první, kdo značil obojživelníky vkládáním inkoustu pod jejich kůži. Číslice byly aplikované na ventrální stranu do kůže pomocí jehly s naplněným inkoustem ve směsi s glycerinem, který napomáhá šíření barviva. První pokusy způsobovaly nadměrné otoky. Při zdokonalování techniky se začal používat tetovací strojek a tím se negativní účinky redukovaly.

Před tetováním by měly být vyřešeny tři potencionální problémy:

- 1) výběr barviva, který bude v kontrastu s normální pigmentací kůže,
- 2) ztráta čitelnosti značky vzhledem k měnícímu se tvaru těla nebo ultrafialové degradace barviva,
- 3) míra toxicity barviva a rozpouštědla (Steven et al. 2004).

Trvanlivost tetování závisí nejen na druhu a stáří zvířete, ale stejně i na kvalitě, hloubce aplikace a jeho umístění. Prakticky můžeme individuálně identifikovat neomezený počet jedinců. Tetování je často používáno ve spojení s jinými, více viditelnými značkami, umožňující identifikaci na dálku.

Infekce nebo bradavice se vytváří v případě, že je tetování umístěno na špinavou kůži. Proto je doporučováno před tetováním kůži očistit alkoholem. Tetovací materiály obsahují kyselinu pikrovou, methylenovou modř, žlutý eosin, rhodamin a různé černé inkousty a barviva. Černý nebo červený inkoust se používá na nepigmentovanou kůži, zatímco žlutý nebo bílý inkoust na kůži pigmentovanou. Vlivem UV záření může dojít ke ztrátě čitelnosti (Beausoleilat el. 2004).

1.1.2.9. Viditelný implantát elastomer (VIE - Visible implant elastomers)

VIE je gumový materiál, který je aplikován pomocí injekčních stříkaček pod kůži. Využívá se pět fluorescenčních (červená, žlutá, zelená, oranžová a růžová) a pět nefluorescenčních (černá, modrá, hnědá, bílá a fialová) barev (obr. 4). Je-li značka vpravena příliš hluboko, může se zhoršit její viditelnost a čitelnost. V případě, že je značka umístěna mělce, může dojít k její ztrátě, což je hlavní nevýhodou značení. Značky by měly být vkládány do průsvitných částí těla, jako je břišní nebo boční plocha, a to pro její maximální viditelnost (Beausoleilat el. 2004).

Tato metoda může být použita u malých zvířat. Značení je obzvláště vhodné k identifikaci mloků a čolků, které je obtížné značit vzhledem k malé velikosti, citlivosti, kluzkosti kůže a schopnosti regenerace prstů. Vytvořením individuálních značek můžeme označit i velkou skupinu. Riziko pro jedince může představovat narušení kryptického zbarvení, což může mít za následek zvýšené riziko predace.

Woolley (1973) označil mločiky zářivé (*Eurycea lucifuga*) a mločika dlouhoocasého (*Eurycea longicauda melanopleura*) aplikací akrylového polymeru pod kůži. Výsledné značky (7-10 milimetrů dlouhé) byly aplikovány v různých barvách. Oba druhy značek byly rozpoznatelné po celou dobu trvání studie (19 měsíců) a umožnily identifikaci z 3-5 metrů. Pozorování teplotní preference, výběr substrátu, fototrofní reakce a preference relativní vlhkosti značených a neznačených jedinců byly zaznamenány, ale nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky na vyznačených zvířatech, ani rozdíly mezi skupinami.



Obr. 4: (A) Označené žáby hned po aplikaci elastometru (B, C) 14 dní po aplikaci, (D) migrace z ventrální strany na dorsální (L. Brannelly).

1.1.2.10. Passive Integrated Transponders (PIT)

Pasivní integrované transpondéry (neboli PIT tagy) představují nejnovější pokrok v technikách značení zvířat (Camper et Dixon 1988). Jedná se o elektromagnetické cívky nesoucí unikátní alfanumerický kód. Jsou obalené skleněným pouzdem a čtené pomocí skenovacího zařízení (Zydlewski et al. 2001). Mohou být aplikovány subkutánně nebo intraperitoneálně (obr. 5). Zařízení jsou čtena snímacím zařízením, které vysílá elektromagnetickou energii ke značce (obr. 6). Ta pak odráží jedinečnou řadu čísel nebo

písmen (Steven et al. 2004). Přesto, že je implantace zařízení poměrně jednoduchá, vyžaduje chirurgický zákrok a aseptické postupy. Pro zacelení rány se používá chirurgické lepidlo, které zabraňuje i ztrátě PIT tagů (Beausoleilat el. 2004).

Studie, které posuzují vliv PIT značek na chování, růst a přežití jsou vzácné. Dostupné údaje však naznačují, že nemají žádný silný vliv na fitness a trvalé škodlivé účinky u žab (Brown 1997), ani u mloků či čolků (Ott et Scott 1999) nebyly zaznamenány. PIT značky jsou sice malé (10 mm), ale i tak jsou nevhodné pro malé druhy obojživelníků. Značky se mohou ztrácet nebo migrovat v těle, tlačít na vnitřní orgány a bránit v pohybu. Míra migrace závisí na velikosti a umístění implantátu, metody implantace, tkáňové reakce, věku a druhu zvířete. Negativní dopady mohou nastat, pokud část značky vyčnívá z těla ven. Jedinec se může zaplést do vegetace či někde uvíznout. Další nevýhodou této metody jsou poměrně vysoké náklady na jednotlivá zařízení (každý stojí přibližně 5,00 dolarů) a čtečky štítků. Vysoká cena činí tuto techniku ekonomicky nevýhodnou pro některé výzkumné programy (Steven et al. 2004). Naopak pozitivní využití této metody spočívá v téměř neomezeném počtu jedinců. Každý PIT je naprogramován unikátním kódem, který umožňuje označení prakticky neomezeného počtu zvířat. Mohou se tak označovat i velké populace druhů.



Obr. 5 : Zavádění Pit značky pod kůži.

(http://www.fs.fed.uspswtopicsecosystem_processsierrabio_diversityaquatic_lessdisturbed_sub2site_fidelity.shtml)



Obr. 6 : Skenování značky pomocí skenovacího zařízení.

(<https://whenilookatthestars.wordpress.com/2014/03/26/precious-frog/>)

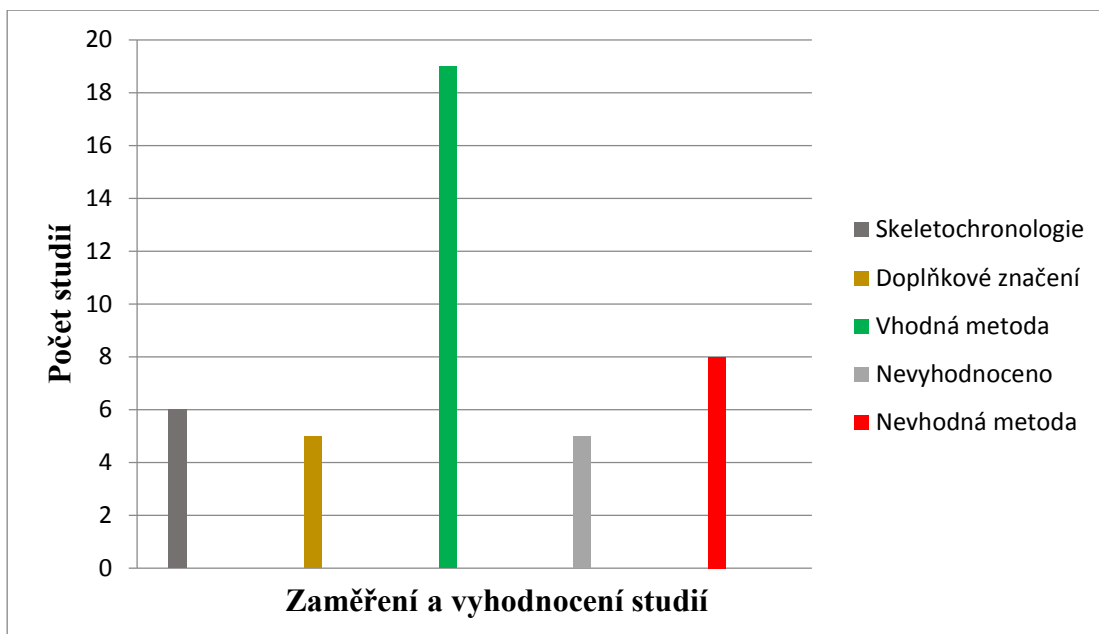
2. Metodika

Pomocí internetového vyhledávače <https://scholar.google.cz/> a databáze web of science jsem vyhledávala studie, které se zabývaly zastříháváním prstů u obojživelníků v posledních 15 letech. Jako klíčové heslo jsem do vyhledávače zadala „toe clipping“ v období od roku 2000 do roku 2015. Vyhodnotila jsem studie, které shledaly metodu za nevhodnou a které ji naopak doporučovaly pro značení obojživelníků. Následně jsem jednotlivé studie zpracovala a vhodnost použití metody blíže konkretizovala v diskuzi.

3. Výsledky a diskuze

Označování metodou zastříhávání prstů bylo praktikováno na obojživelníky, vodní ptactvo a na drobné hlodavce po celá desetiletí. Přesto se tento postup považuje za méně humánní.

Během posledních 15 let se vlivem zastříhávání prstů na obojživelnících zabývalo 43 studií. Zkoumal se přímo vliv na přežívání, využila se při studiích skeletochronologie nebo se metoda použila jako doplňkové značení (graf 1).



Graf 1: Zaměření a vyhodnocení studií, které se zabývaly zastřiháváním prstů.

Zastřihávání prstů bylo použito u šesti studií, které se zabývaly skeletochronologií (Measey 2001, Etno 2002, Kumbar 2002, Marunouchi 2002, Leskovar 2006, Sinsch 2007).

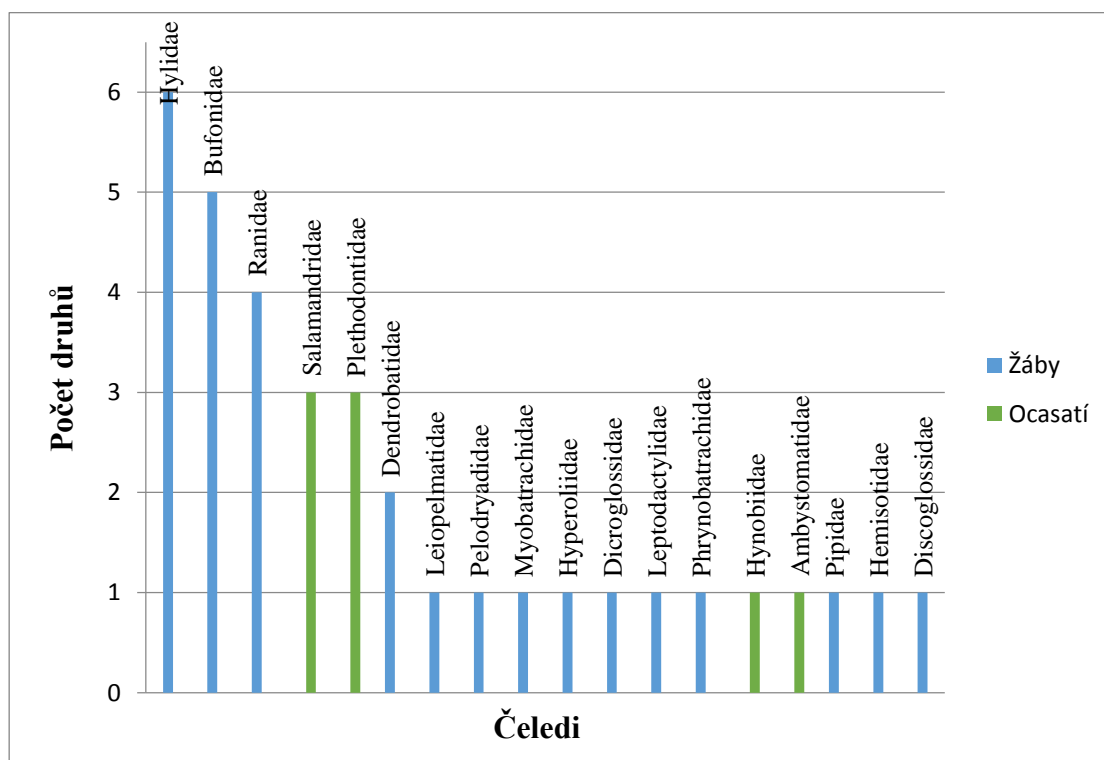
Jako doplňkové značení bylo použito u pěti studií. Vliv zastřihávání prstů na přežívání nebyl někdy vůbec zkoumán (Weddeling 2004), jiné studie vliv na přežívání nezaznamenaly (Denöel 2001, Anholt 2003, Grafe 2004, Woolbright 2006).

19 studií zaměřených na výzkum vlivu stříhání prstů hodnotilo metodu jako vhodnou a přijatelnou pro značení obojživelníků. Nebyl zaznamenán žádný (Pröhl 2002, Hartel 2006, Kinkead 2006, Phillott 2007, Hartel 2008, Phillott 2008, Waddle 2008, Grafe 2011, Perry 2011, Ursprung 2011, Caorsi 2012, Corrúa 2013, Ginonama 2014, Guimaes 2014) nebo jen malý vliv na přežívání značených jedinců (Bell 2005). Například dočasně oteklé končetiny nebo malá míra infekce.

U některých studií nebyl vyhodnocen účinek metody (Ovaska 2001, Minter 2005, Liner 2007, McCarthy 2008, Heard 2009).

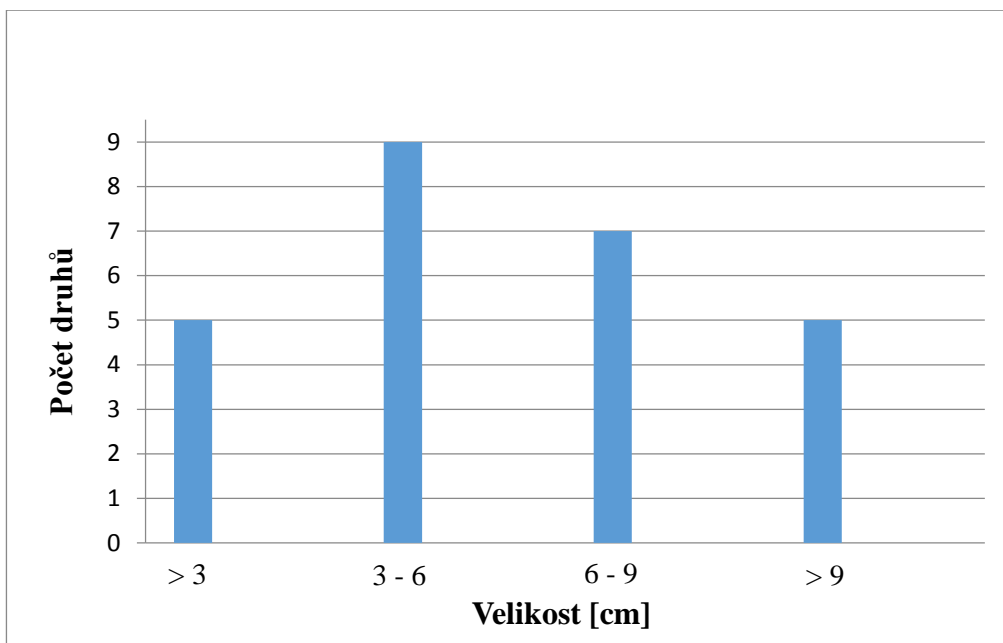
Pouze osm studií zaregistrovalo negativní účinky. Mezi ně patří snížení životaschopnosti (McCarthy et Parris 2001, McCarthy et Parris 2004, Ovaska 2001), vliv na pohyblivost značených jedinců (Schmidt et Schwarzkopf 2010) a zpochybňování vhodnosti metody pro značení obojživelníků (Funk 2005). Green (2001) a Narayan (2011) považovali metodu za psychický a environmentální stresor pro ropuchu obrovskou (*Rhinella marina*) a ropuchu yosemitskou (*Bufo canorus*). May (2004) označil metodu za barbarskou a zastával se alternativních metod pro značení obojživelníků.

Nejvíce se metoda používala u čeledi Hylidae s počtem šesti značených druhů. Bylo označeno dvacet sedm druhů žab zastoupených v čtrnácti čeledích. Nejvíce značených ocasatých patřilo do čeledí Salamandridae a Plethodontidae. U obou čeledí byly značeni tři zástupci. Celkem bylo značeno třicet pět druhů obojživelníků (dvacet sedm druhů žab a osm druhů ocasatých) (graf 2).

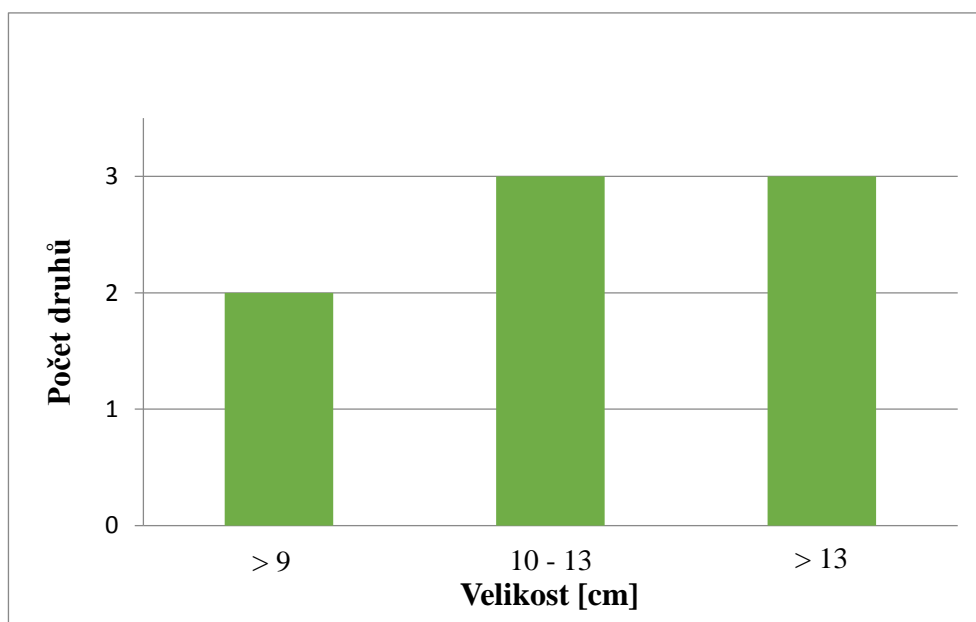


Graf 2: Množství značených žab zařazených do čeledí.

Nejčastěji byly značeny žáby o průměrné velikosti těla 3 – 6 cm a ocasatí o průměrné velikosti 10 cm a více (graf 3, 4).

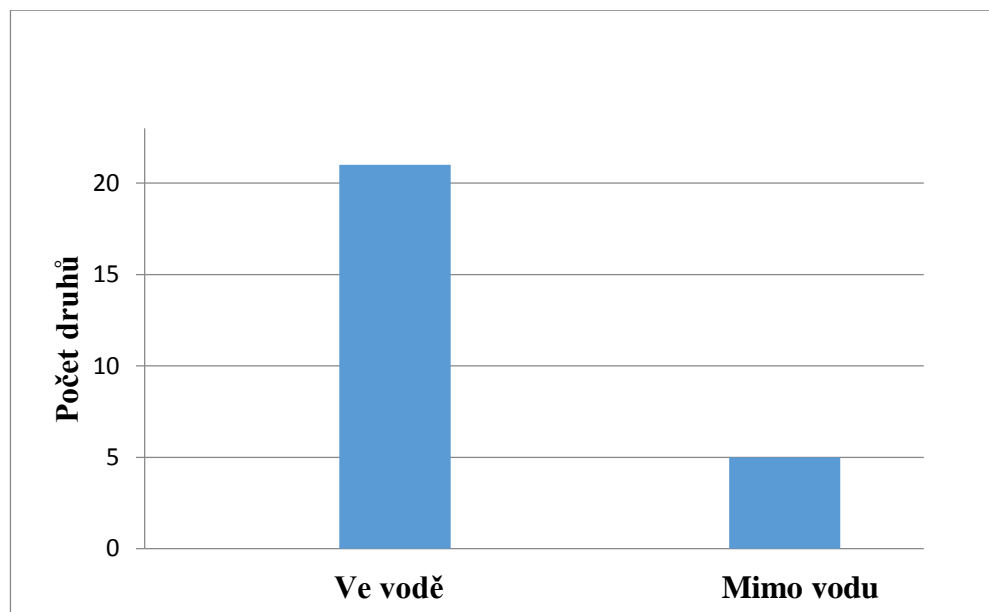


Graf 3: Průměrná velikost značených žab.



Graf 4: Průměrná velikost značených ocasů.

Ve studiích je důležité zohlednit místo rozmnožování vzhledem k velké pravděpodobnosti infekce ze znečištěné vody. Větší zastoupení značených žab (dvacet jedna) se rozmnožuje ve vodě a pouze pět se jich rozmnožuje mimo vodu – ti své vejce ukládají převážně na listy (graf 5).



Graf 5: Místo rozmnožování značených žab.

Účinky zastřihávání prstů se liší mezi taxony. Potenciální účinky na mobilitu by mohly být významným zdrojem předpojatosti při studiu stromových žab ve srovnání s vodními druhy. Značení může vyžadovat odstranění až šesti prstů (Hero 1989). To má však větší pravděpodobnost negativně ovlivnit pohyblivost, zdraví a přežití jedince (Clarke 1972, Golay et Dürrer 1994, Davis et Ovaska 2001, Parris et McCarthy 2001, McCarthy et Parris 2004).

Snížení pravděpodobnosti přežití (Clarke 1972, Humphries 1979, Williamson et Bull 1996) může vyplynout z infekce, z omezení pohyblivosti či z přirozených činností značených zvířat a následné zvýšené náchylnosti k predaci nebo k hladovění. Řada studií pozorovala infekce končetin (Clarke 1972, Humphries 1979, Golay & Dürrer 1994, Lemckert roku 1996, Reaser et Dexter 1996, Williamson et Bull 1996). To může vést ke změně v jejich chování, ke snížení aktivity nebo ke sklonu opouštět stanoviště po prodělaném stresu (Lemckert 1996). Dochází k znehodnocení jednoho ze základních předpokladů „mark-recapture“ studie (Donnelly a Guyer 1994). Pozorované změny v přežití a / nebo chování žab vyvolávají obavy o etice použité techniky, a to zejména v případě, že studie je praktikována na ohrožené druhy nebo je odstraněn velký počet prstů.

Počty jedinců potřebných pro zkoumání se budou značně lišit v závislosti na povaze zkoumaných otázek. Výzkumy mohou vyžadovat označení relativně velkého počtu jedinců, i když procentuální zastoupení v populaci těchto značených jedinců, je velmi malé. Studie by měly pokud možno označit co nejmenší množství jedinců nezbytných k zodpovězení otázek

studie. Použití odpovídajícího počtu jedinců pro zajištění statistické spolehlivosti má zásadní význam, neboť neadekvátní studie budou nakonec požadovat opakování, což může mít za následek zbytečné značení většího množství obojživelníků.

Odstřižený prst obojživelníků může poskytnout materiál pro genetickou analýzu a kostní tkáň jako podklad pro odhad věku pomocí skeletochronologie (Friedl et Klump 1997, Driscoll 1998, McGuigan et al. 1998). V tomto případě je zapotřebí odříznutí pouze jednoho prstu, takže dopad na jednotlivce či populace je podstatně nižší než u značení, které vyžaduje odstranění více prstů. Measey (2001) při určování věku pomocí skeletochronologie neshledal na drápatkách vodních (*Xenopus leavis*) při ustřížení prstů žádné negativní vlivy.

Golay a Dürrer (1994) amputovali konce prstů z přední a zadní nohy 96 ropuchám krátkonohým (*Bufo calamita*). Po znovu odchytení mělo 18% ropuch zánětlivé komplikace v rozmezí od infekce, nekrózy zbytku prstu až k odumření celé nohy, metastatické onemocnění a nekrózy prstů jiných nohou. 4% odchytených ropuch měly nerozpoznatelné kódy. Golay & Dürrer (1994) dospěli k závěru, že metoda by neměla být používána k označení tohoto druhu ropuchy. Reaser a Dexter (1996) zjistili velmi nízkou míru infekce <1% (8 ze 122 označených) na skokanech skvrnkovaných (*Rana pretiosa*), avšak byly sledovány pouze po krátkou dobu. Díky nulové úmrtnosti došli k závěru, že „toe-clipping“ je vhodný pro *Rana pretiosa* přinejmenším v krátkodobém horizontu. Van Gelder a Strijbosch (1996) nenašel žádný zánět v průběhu 10 měsíců trvání studie na ropuchách obecných (*Bufo bufo*). U jedinců se špatným fyzickým stavem se rány vyléčily během 1 týdne. Proces hojení je možné urychlit odříznutím kosti dál než je kůže nebo přetažením kůže přes kost.

Také byly pozorovány změny v chování a přežívání. Nejznámější je Clarkeho (1972) studie o účincích výstřížku kůže a vlivu na přežívání u ropuchy Fowlerovy (*Anaxyrus fowleri*). Clarke (1972) odstranil jeden až dva prsty na končetině použitím Martofovo systému (1953). Označil 828 a znovu odchytil 463 ropuch. Zjistil, že pravděpodobnost opětovného odchyty označených ropuch se snížila, když se zvýšilo množství odstraněných prstů. Tento výsledek znamená, že se v populaci vyskytovalo méně označených ropuch než neoznačených, a že zastřihávání prstů ovlivnilo přežívání ropuchy *Anaxyrus fowleri*.

Reaser (1995) publikoval články kritizující Clarke (1972) studii. Reaser poznamenal, že korelace mezi znovu odchytením a zatřiháváním se bere jako důkaz, že chybějící ropuchy uhynuly v důsledku odstřížení prstu. Množství chybějících ropuch nemusí být následkem úmrtí, ale mohou se přemísťovat i mimo zkoumané oblasti. Příčinou může být stres ze značení ale i z jiných nesouvisejících důvodů. Clarkova studie (1972) byla provedena na golfovém hřišti, kde sečení a používání biocidů byly časté příčiny úmrtnosti ropuch. Van

Gelder a Strijbosch (1996) uvádí, že u Clarke (1972) nebyla vytvořena negativní korelace mezi úhynem a počtem oříznutých prstů, kdyby se odřízly pouze 2-4 prsty na všech končetinách (což je obvyklé ve většině značících schémat).

McNally (1979) zjistil, že zastřihávání prstů způsobuje dočasnou poruchu v chování při rozmnožování dvou druhů žab rodu *Ranidella*. Váhový úbytek byl zaznamenán u leopardích žab (Daugherty 1976). Skokaní pulci (*Rana luteiventris* / *Rana pretiosa*) označení vyříznutím řadou zářezů do ocasu vykazovali vyšší mortalitu než pulci, kteří byli obarveni neutrální červení (Turner 1960). Turner (1960) naznačuje, že zvýšená mortalita byla pravděpodobně způsobena snížením schopnosti pohybu, a proto se stávali snadnou kořistí pro predátory. Humphries (1979) zjistil, že 14 z 30 druhů australských žab vykazovalo sníženou schopnost přežívání s rostoucím počtem zastřižených prstů. Autor uvádí, že vzniklý pokles pohyblivosti snižuje schopnost žáby uniknout před predátory. Humphries (1979) také zjistil, že žáby měřící méně než 40 mm byly více ovlivněny než ty větší. Silné důkazy pro negativní vlivy byly prokázány ve studiích Williamson a Bull (1996), Lüddecke a Amézquita (1999) a Clarke (1972). Schmidt a Schwarzkopf (2010) studovali vliv zastřihávání prstů na pohyblivost a délku skoku u rosnice nosaté (*Litoria nasuta*). Metoda měla okamžitý negativní účinek na délku skoků. Po dvou týdnech se negativní účinek zmírnil, ale metoda byla prohlášena za metodu silně ovlivňující pohyblivost obojživelníků. Beausoleilat (2004) studoval obojživelníky na Novém Zélandu a metodu vyhodnotil jako vhodnou, ale upozorňoval na riziko nákazy chytridiomykózou.

Jen 6 z 500 australských paropušek proměnlivých (*Crinia signifera*) vykazovalo infekci. Tyto infekce byly pozorovány pouze u nově označených žab (1-10 dní po označení). Podobný druh paropuška východoaustralská (*Uperoleia laevigata*). Navíc měla oteklé končetiny a odumřelou tkáň v místě odstřížení a vykazovala míru infekce téměř 100% (Reaser et Dexter 1996). Tyto dva druhy jsou podobné ve velikosti, biotopu a v životním stylu. Rozdíl ilustruje rozdíly v účinnosti metody mezi druhy se stejnými životními podmínkami (Beausoleilat et al. 2004). Pröhl (2002) doporučil metodu pro značení pralesničky drobné (*Dendrobates pumilio*) vzhledem k malé velikosti tohoto druhu. Kinkead (2006) studie o účincích výstřížku a jeho vlivu na přežívání u mločka šedavého (*Desmognathus fuscus*) a mločka horského (*Desmognathus monticola*) byla použita za podání anestetik a bez jejich podání. Metoda byla doporučena, pokud bude provedena bez použití anestezie.

Existují další zprávy, v nichž jsou publikované jen malé nebo žádné negativní vlivy značení na chování nebo úmrtnost obojživelníků (např. Castellano et Giacoma 1993, Reaser et

Dexter 1996, Schlaepfer 1998). Van Gelder a Strijbosch (1996) zjistili, že metoda neměla žádný vliv na množství konzumované potravy u ropuch obecných (*Bufo bufo*) nebo na jejich průměrnou hmotnost. Byli odchyceni i jedinci, kteří přišli o celé chodidlo nebo celou končetinu v důsledku přirozených příčin. Někteří se odchytily vícekrát než jednou v průběhu několika let, což naznačuje, že absence některých prstů nemá vážný dopad na přežití. Důsledky takovýchto zranění na fitness, reprodukční úspěšnost a na vliv chování jsou neznámé, a mohou být důležité pro ohrožené druhy.

Van Gelder a Rijdsdijk (1987) prováděli studii na stejném druhu (*Bufo bufo*) a nezjistili žádné rozdíly v podílu odchycených ropuch, kterým chyběly 2 až 4 prsty. Dokonce i opakované ustříhávání prstu v krátkých intervalech neprokázalo, že by byla narušena schopnost páření u samců hvízdalky johnstonovy (*Eleutherodactylus johnstonei*) (Ovaska et Hunted 1992). Standaert (1967) našel jen mírný, statisticky nevýznamný pokles růstu nově označených skokanů karolínských (*Rana virgatipes*). Závěrem měla tato metoda jen mírný a dočasný účinek na tomto druhu žáby. Bogert (1947) uvedl, že nezaznamenal žádné negativní vlivy jako důsledek způsobené rány na ropuchách. Chování bylo stejné u značených i neoznačených žab, což svědčí o jejich prospěchu a blahu. Grafe (2011) studoval čtyři druhy *Eleutherodactylus coqui*, *Hemisus marmoratus*, *Hyperolius nitidulus* a *Phrynobatrachus guineensis*. Druhy *Eleutherodactylus coqui*, *Hemisus marmoratus* vykazovaly minimální účinky metody. U druhů *Hyperolius nitidulus* a *Phrynobatrachus guineensis* shledal vliv značení na přežívání. Přesto metodu doporučuje za předpokladu odstranění maximálně čtyř prstů.

Lemckert (1996) srovnával australské žáby se 2-mi, 3-mi nebo 4-mi odstraněnými prsty a nenalezl žádný významný vztah mezi počtem odstraněných prstů a počtem odchytů v průběhu studie. Podobně studoval Luddecke (1999) účinky odstřížením přísavek na rosníčkách vysokohorských (*Hyla labialis*). Oba autoři nenalezli významný vztah mezi počtem odstraněných přísavek a změnou v chování, fitness nebo v pravděpodobnosti odchytu. Autoři dospěli k závěru, že žádný z měřených parametrů se významně nesnížil v závislosti na počtu odříznutých přísavek a proto je metoda vhodná, pokud se provádí správně. Bell (2005) zapojen do dlouhodobých terénních studií na Novém Zélandu hlásil, že neshledal žádný důkaz regenerace prstu u leiopelmovitých žab. Newman (1996) nikdy nezaznamenal regeneraci prstu u leiopelmy maudské (*Leiopelma pakeka*). Slaven (1992) označoval žáby leiopelmy novozélandské (*Leiopelma hochstetteri*) na poloostrově Coromandel odstraněním jen distálního článku prstů. Následné průzkumy odhalily snížení míry úmrtnosti značených

žab. Z 3,8% v roce 1994 na 0,8% v roce 1996 a na 0% v roce 1998 (Whitaker et Alspach 1999).

Mloci jsou stále označováni pomocí zastřihávání prstu nebo hřbetní blány i přes velkou schopnost regenerace, avšak použitím inhibičních sloučenin na ránu se dokáže oddálit regenerace (Heatwole 1961, Efford et Mathias 1969). Regenerace byla také hlášena u některých druhů žab (anura), ale regenerační schopnosti byly dobře prostudovány pouze u omezeného počtu rodů a druhů. Eggers (1998) zaznamenal případ částečného opětovného růstu prstu po předchozím ustříhnutí u leiopelmy archejovy (*Leiopelma archeyi*). Regenerace prstů je často neúplná, což bude mít pravděpodobně za následek špatně rozeznatelné značení a ovlivňování výsledků.

O čeledi rosničkovití (Hylidae) je známo, že mají regenerační schopnosti (Singera et al. 1967). Při studiích Ovasky (2001) vykazaly rosničky západoamerické (*Pseudacris regilla*) výraznou regeneraci nohou kompletně i s přísavkami sedm měsíců po zastřížení prstu. U rosničkovitých žab, u kterých byla prokázána regenerace prstů, není metoda trvalým způsobem identifikace. Rosničky mohou být znevýhodněny odstraněním špičky, protože specializované struktury prstů mohou být důležité pro funkci jako je šplhání, přichycení se na podklad, pohyb nebo reprodukci. Davis a Ovaska (2001) zjistili, že ustřížené prsty na mločikovi lesním (*Plethodon vehiculum*) byly oteklé na dvojnásobek původní velikosti a objevilo se i zanícení. Někteří jedinci měli oteklé zbytky prstů 240 dnů po označení, ale díky dobré regeneraci se prsty uzdravily.

Fisher (2013) hodnotil množství vyplaveného stresového hormonu u značených ropuch obrovských (*Rhinella marina*) a ropuch, se kterými se pouze manipulovalo. Prohlásil, že metoda nepůsobí větší stresovou reakci než samotná manipulace. Jeho studie reagovala na Narayan (2011), který použil zastřihávání prstů na stejném druhu (*Rhinella marina*), ale porovnával označené jedince s jedinci, se kterými bylo manipulováno jen minimálně a metodu vyhodnotil jako stresovou a nevhodnou pro značení. Obdobná studie proběhla i na plazech u scinka *Eulamprus heatwolei*, kde zastřihávání prstů nevyvolalo významné zvýšení hladiny kortikosteronu, což naznačuje, že nezpůsobilo velký stres (Langkilde et Shine 2006).

Hoffmann a kol. (2008) použil metodu „mark and recapture“ ve střední Floridě. Metoda byla praktikována na čtyřech druzích rosničkovitých žab: rosnička bělopruhá (*Hyla cinerea*), rosnička borovicová (*Hyla femoralis*), rosnička hádavá (*Hyla squirella*), rosnička kubánská (*Osteopilus septentrionalis*). Každé tři týdny se odchytávali jedinci v intervalech tří po sobě jdoucích dnů. Definovali se "neúspěšné" značky, které se staly nečitelné z důvodu regenerace prstu nebo u kterých věřili, že by se značky staly nečitelné během dalších tří týdnů

(před příštím odchytáváním). Při značení nebyl odstraňován palec, vzhledem k jeho významu při rozmnožování. Množství označovaných druhů rosníček: 372 *Osteopilus septentrionalis* 259 *Hyla femoralis*, 80 *Hyla cinerea* a 5 *Hyla squirella*.

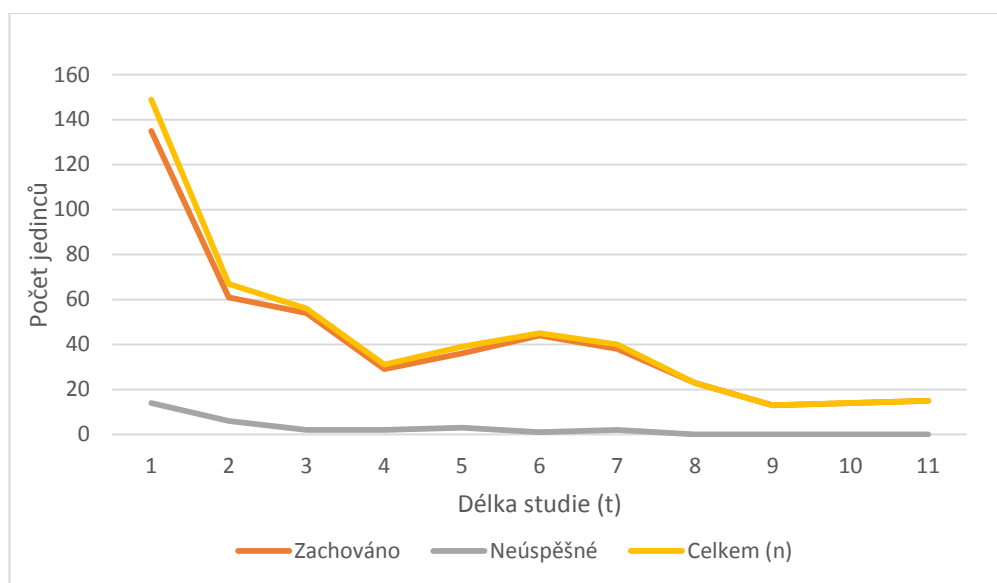
Re-analýza údajů získaných ze čtyř předchozích studií ukázala výrazný lineární pokles opětovného odchycení s rostoucím počtem odstřižených prstů (Parris et McCarthy 2001, McCarthy et Parris 2004). Phillott a kol. (2008) zpochybnil mechanismus tvořící základ zjištění u Parris a McCarthy (2001) a McCarthy a Parris (2004) a tvrdil, že zastřihávání prstů je přijatelnou metodou pro individuální značení obojživelníků.

Hoffmann a kol. (2008) a Campbell (2009) zaznamenali drobné problémy s oteklými prsty, drobné krvácení a deformace zregenerovaného prstu. Otok prstu byl pozorován u šesti označených žab, i když oteklé prsty byly také pozorovány na jedné neznačené žábě bez známých souvislostí. Menší krvácení bylo pozorováno u čtyř žab (1,5%). Určitý stupeň regenerace byl pozorován u 30 žab (11,4%). Nenormální regenerace byla nalezena u čtyř žab (1,5%). Regenerované prsty rostly s více přísavkami nebo vyrostly z jiného místa na noze. Při prvním pozorování se nezdálo, že by byla výrazně snížena pohyblivost žab.

Retenční míra byla nejnižší u mladších značek, ale rychle se stabilizovala a zůstala stabilní. Po 18-27 týdnech od označení se stabilizovala na téměř na 100%. Průběh odchytů při studii je zaznamenán v tabulce 1 a grafu 1. Počet odchycených žab se během času snižoval, což nemusí být následek úhynu žab, ale také například migrací na jiná stanoviště nebo jinými nesouvisejícími důvody.

Tab. 1: Průběh odchytů při studii. Doba značení (t) je měřena v 3 týdenních intervalech od doby značení (například v čase t = 11 je značka 33 týdnů stará). Celkový počet odchyceným jedinců (n) (Hoffmann et al. 2008).

Doba značení (t)	Zachované	Neúspěšné	Celkem (n)
1	135	14	149
2	61	6	67
3	54	2	56
4	29	2	31
5	36	3	39
6	44	1	45
7	38	2	40
8	23	0	23
9	13	0	13
10	14	0	14
11	15	0	15



Graf 6: Vliv zastřihávání prstů a úspěšnost značek na značené žáby v průběhu třiceti tří týdnů. Vstupní údaje z tabulky 1.

McCarthy a Parris (2004) se ve dvouleté studii (2003 - 2004) zabývali vlivem zastřihávání prstu na tělesnou kondici značených a neznačených jedinců. Experiment se uskutečnil nedaleko rumunského města Sighișoara a studovaným organismem byla kuňka žlutobřichá (*Bombina variegata*). Výsledky byly v souladu s ustanoveními Parris a McCarthy (2001).

Metoda snižuje návratnost o 4-11% s každým odstraněným prstem za předpokladu stejného vlivu na každý odstraněný prst. Poměr návratnosti žab, které měly odstraněné 2 prsty, byl odhadnut na cca 96% z těch, kterým byl odstraněn jen jeden prst. Tento poměr klesl na 65% u žab s pěti odstraněnými prsty a na 28% pro ty, kterým se ustříhlo osm prstů.

Návratnost označených žab je výsledek pravděpodobnosti přežití a pravděpodobnosti znovu odchycení živého zvířete. Pokud u jedince zastříhneme tři prsty, sníží se přežití o 5 až 19,7% ve srovnání s jedinci, kteří mají odříznutý jeden prst, což bylo dokázáno u afroskokana guinejského (*Phrynobatrachus guineensis*) (McCarthy et Parris 2004). Pečlivé posouzení všech jedinců nezachytilo žádné známky infekce. Studie tedy neprokázala predikce nižší tělesné kondice u značených jedinců. Zdá se tedy, že v krátkodobém horizontu nemá zastříhávání prstů žádný nebo velice malý vliv na fitness jedince. Nebylo narušeno ani jejich reprodukční chování. Dál studie ukázala, že u jedinců s více odstraněnými prsty se snižuje možnost odchycení, což odpovídá vlivu na chování a přežití značených žab.

Metoda je také doporučena pro malé druhy obojživelníků, které by bylo jinak obtížné značit. Avšak Woolbright (2006) nedoporučoval metodu pro značení mladých jedinců *Eleutherodactylus coqui*, kteří mají velikost kolem 6 mm.

Podle Reasera (1996) je pozoruhodné, že u stovek studií nebyly zaznamenány žádné negativní účinky. To může být způsobeno částečně neochotou vědců hlásit výsledky, které naznačují, že jejich práce způsobila negativní dopad na jedince, a tudíž ovlivnění jejich dat.

4. Závěr

Externí značky jsou obtížně aplikovatelné a mohou ovlivnit chování, vzhled a přežití jedinců. Vzhledem k velmi malé velikosti žab, existují obavy z používání implantovaných přístrojů (například PIT tagy).

Zastříhávání prstů není univerzální a nejvhodnější metodou pro značení všech druhů obojživelníků, jelikož někteří ocasatí obojživelníci (mloci a čolci) jsou schopni regenerace prstů a končetin. Zastříhávání prstů je v současné době nejpoužívanější metodou k označování žab. Při zavlečení chytridiomykózy lze předpokládat snižování populace, proto mohou být v tomto hledisku vhodnější méně invazivní metody značení.

Pro minimalizaci negativních dopadů na jedince je doporučeno, aby nebyly odstraněny více než čtyři prsty a nanejvýš jeden prst na každé noze. Kromě toho, funkčně důležité prsty,

jako první prst na předních končetinách a čtvrtý prst na zadních končetinách, by neměly být odstřiženy vůbec. 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 nebo úchop při páření (amplexus). Odstraněním většího množství prstů se zvyšuje i možný negativní efekt na přežití nebo změnu chování jedince. Proto je metoda nejvhodnější jako kombinace s jinými metodami, zejména kvůli snížení počtu uříznutých prstů, a tím snížení rizika možných negativních vlivů.

V posledních letech se většina vědců shoduje, že pokud je metoda dobře provedená, je vhodná a nejefektivnější pro značení většiny obojživelníků. Dopad na přežití, fitness a pohyblivost je přijatelný a není větší než u jiných invazivních metod. Stres způsobený zastřižením není větší než stres způsobený manipulací. Výhody této metody jsou zejména na straně experimentátora, protože je snadno proveditelná a finančně nenáročná. Navíc se odstřižený prst může použít při skeletochronologii, odběru tkáně ke genetickým, molekulárním a jiným analýzám.

5. Literatura

Anholt, B. R., Hotz, H., Guex, G. D., & Semlitsch, R. D. (2003). Overwinter survival of *Rana lessonae* and its hemiclinal associate *Rana esculenta*. *Ecology*, 84(2), 391-397.

Barbin Zydlewski, G., Haro, A., Whalen, K. G., & McCormick, S. D. (2001). Performance of stationary and portable passive transponder detection systems for monitoring of fish movements. *Journal of Fish Biology*, 58(5), 1471-1475.

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.

Bell, B. D., & Pledger, S. (2005). Does toe clipping affect the return rates of the terrestrial frog *Leiopelma pakeka* on Maud Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 32, 219-220.

Biek, R., Funk, W. C., Maxell, B. A., & Mills, L. S. (2002). What is missing in amphibian decline research: insights from ecological sensitivity analysis. *Conservation Biology*, 16(3), 728-734.

Bloch, N., & Irschick, D. J. (2005). Toe-clipping dramatically reduces clinging performance in a pad-bearing lizard (*Anolis carolinensis*). *Journal of Herpetology*, 39(2), 288-293.

Bogert, C. M. (1947). A field study of homing in the Carolina toad. *American Museum novitates*; no. 1355, 1-24.

Bourdon, E., Castanet, J., De Ricqlès, A., Scofield, P., Tennyson, A., Lamrous, H., & Cubo, J. (2009). Bone growth marks reveal protracted growth in New Zealand kiwi (Aves, Apterygidae). *Biology Letters*, 5(5), 639-642.

Brown, L. J. (1997). An evaluation of some marking and trapping techniques currently used in the study of anuran population dynamics. *Journal of Herpetology*, 31(3), 410-419.

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

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(3), 247-256.

- Camper, J. D., & Dixon, J. R. (1988). Evaluation of a microchip marking system for amphibians and reptiles. Texas Parks & Wildlife Department, 193-200.
- Caorsi, V. Z., Santos, R. R., & Grant, T. (2012). Clip or snap? An evaluation of toe-clipping and photo-identification methods for identifying individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. South American Journal of Herpetology, 7(2), 79-84.
- Care, H. A., & Use Committee. (2004). Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, 1-33.
- Clark, D. R. (1971). Branding as a marking technique for amphibians and reptiles. Copeia, 1971(1), 148-151.
- Corrêa, D. T. (2013). Population declines: Toe-clipping vital to amphibian research. Nature, 493(7432), 305-305.
- Daugherty, C. H. (1976). Freeze-branding as a technique for marking anurans. Copeia, 1976(4), 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(2), 217-225.
- de Buffrénil, V., & Castanet, J. (2000). Age estimation by skeletochronology in the Nile monitor (*Varanus niloticus*), a highly exploited species. Journal of Herpetology, 34(3), 414-424.
- Denoël, M., & Poncin, P. (2001). The effect of food on growth and metamorphosis of paedomorphs in *Triturus alpestris apuanus*. Archiv für Hydrobiologie, 152(4), 661-670.
- Donnelly, M. A., Guyer, C., Juterbock, J. E., & Alford, R. A. (1994). Techniques for marking amphibians. Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians, 277-284.
- Dorit, R. L., & WFW, R. Barnes (1991). Zoology, Saunders College Publishing,
- Efford, I. E., & Mathias, J. A. (1969). A comparison of two salamander populations in Marion Lake, British Columbia. Copeia, 1969(4), 723-736.
- Eggers, K. E. (1998). Morphology, ecology and development of leiopelmatid frogs (*Leiopelma* spp.). Whareorino Forest, New Zealand. M. Sc. Thesis. Massey University, New Zealand (unpublished), 169.
- Emlen, S. T. (1968). A technique for marking anuran amphibians for behavioral studies. Herpetologica, 24(2), 172-173.

- Ento, K., & Matsui, M. (2002). Estimation of age structure by skeletochronology of a population of *Hynobius nebulosus* in a breeding season (Amphibia, Urodela). *Zoological science*, 19(2), 241-247.
- Fisher, K. J., Guilfoyle, K. J., & Hatch, K. A. (2013). Stress induced by toe-clipping in cane toads (*Rhinella marina*). *Copeia*, 2013(3), 539-542.
- Ferner, J. W. (1979). review of marking techniques for amphibians and reptiles.
- Ginnan, N. A., Lawrence, J. R., Russell, M. E., Eggett, D. L., & Hatch, K. A. (2014). Toe Clipping Does Not Affect the Survival of Leopard Frogs (*Rana pipiens*). *Copeia*, 2014(4), 650-653.
- Golay, N., & Durrer, H. (1994). Inflammation due to toe-clipping in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Amphibia-Reptilia*, 15(1), 81-83.
- Grafe, T. U., Kaminsky, S. K., Bitz, J. H., Lüssow, H., & Linsenmair, K. E. (2004). Demographic dynamics of the afro-tropical pig-nosed frog, *Hemisus marmoratus*: effects of climate and predation on survival and recruitment. *Oecologia*, 141(1), 40-46.
- Grafe, T. U., Stewart, M. M., Lampert, K. P., & Rödel, M. O. (2011). Putting toe clipping into perspective: a viable method for marking anurans. *Journal of Herpetology*, 45(1), 28-35.
- Green, D. E. (2001). Toe-clipping of frogs and toads standard operating procedure ARMI SOP no. 110. National Wildlife Health Center, Madison, Wisconsin, 539-542.
- Guimaraes, M., Corrêa, D. T., Sérgio Filho, S., Oliveira, T. A., Doherty, P. F., & Sawaya, R. J. (2014). One step forward: contrasting the effects of Toe clipping and PIT tagging on frog survival and recapture probability. *Ecology and evolution*, 4(8), 1480-1490.
- Hamilton, W. J. (1934). The rate of growth of the toad (*Bufo americanus americanus* Holbrook) under natural conditions. *Copeia*, 1934(2), 88-90.
- Hartel, T. (2008). Movement activity in a *Bombina variegata* population from a deciduous forested landscape. *North-Western Journal of Zoology*, 4(1), 79-90.
- Hartel, T., & Nemes, S. (2006). Assessing the effect of toe clipping on the yellow bellied toads. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 52(4), 359-366.
- Heatwole, H. (1961). Inhibition of digital regeneration in salamanders and its use in marking individuals for field studies. *Ecology*, 42(3), 593-594.
- Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & Mcdiarmid, R. (Eds.). (2014). Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution, 215-364.

- Hero, J. M. (1989). A simple code for toe clipping anurans. *Herpetological Review*, 20(3), 66-69.
- Hoffmann, K., McGarrity, M. E., & Johnson, S. A. (2008). Technology meets tradition: a combined VIE-C technique for individually marking anurans. *Applied Herpetology*, 5(3), 265-280.
- Humphries, R. B. (1979). Dynamics of a breeding frog community. Australian National University.
- Chao, A. (1987). Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 43(4), 783-791.
- Kinkead, K. E., Drew Lanham, J., & Montanucci, R. R. (2006). Comparison of anesthesia and marking techniques on stress and behavioral responses in two *Desmognathus* salamanders. *Journal of Herpetology*, 40(3), 323-328.
- Kluge, A. G. (1981). The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest-building gladiator frog, 2-163.
- Kruger, K. M., Hines, H. B., Hyatt, A. D., Boyle, D. G., & Hero, J. M. (2006). Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of aquatic organisms*, 71(2), 141.
- Kumbar, S. M., & Pancharatna, K. (2002). Annual growth layers in the phalanges of the Indian Skipper frog *Rana cyanophlyctis* (Schn). *Copeia*, 2002(3), 870-872.
- Lama, F. D., Rocha, M. D., Andrade, M. Â., & Nascimento, L. B. (2011). The use of photography To identify individual Tree frogs by Their natural marks. *South American Journal of Herpetology*, 6(3), 198-204.
- 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 *Proceedings of the sixth international symposium on the pathology of reptiles and amphibians*. Saint Paul, Minnesota USA, 3-13.
- Langkilde, T., & Shine, R. (2006). How much stress do researchers inflict on their study animals? A case study using a scincid lizard, *Eulamprus heatwolei*. *Journal of Experimental Biology*, 209(6), 1035-1043.
- Lemckert, F. (1996). Effects of toe-clipping on the survival and behaviour of the Australian frog *Crinia signifera*. *Amphibia-Reptilia*, 17(3), 287-290.
- Leskovar, C., Oromi, N., Sanuy, D., & Sinsch, U. (2006). Demographic life history traits of reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*) vary between northern and southern latitudes. *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 365-375.

- Liner, A. E., Smith, L. L., & Castleberry, S. B. (2007). Effects of toe-clipping on the survival and growth of *Hyla squirella*. *Herpetological Review*, 38(2), 143.
- Linn, I. J. (1978). Radioactive techniques for small mammal marking. In *Animal Marking*. Macmillan Education UK, 177-191.
- Lüddecke, H., & Amézquita, A. (1999). Assessment of disc clipping on the survival and behavior of the Andean frog *Hyla labialis*. *Copeia*, 1999(3), 824-830.
- Mac Nally, R. C. (1979). Social organisation and interspecific interactions in two sympatric species of *Ranidella* (Anura). *Oecologia*, 42(3), 293-306.
- Makovický, P., Kopecký, O., Makovický, P., & Matlach, R. (2015). The Using of Skeletochronology as a Screening Method for Age Determination of Alpine Newts (*Mesotriton Alpestris*): a Technical Report. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 63(2), 439-446.
- McCarthy, M. A., & Parris, K. M. (2004). Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology*, 41(4), 780-786.
- Marín-Moratalla, N., Jordana, X., & Köhler, M. (2013). Bone histology as an approach to providing data on certain key life history traits in mammals: implications for conservation biology. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 78(6), 422-429.
- Martof, B. S. (1953). Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Ecology*, 34(1), 165-174.
- Marunouchi, J., Kusano, T., & Ueda, H. (2002). Fluctuation in abundance and age structure of a breeding population of the Japanese Brown frog, *Rana japonica* Günther (Amphibia, Anura). *Zoological science*, 19(3), 343-350.
- May, R. M. (2004). Ecology: ethics and amphibians. *Nature*, 431(7007), 403-403.
- McCarthy, M. A., & Parris, K. M. (2004). Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology*, 41(4), 780-786.
- McCarthy, M. A., Weller, W. F., & Parris, K. M. (2009). Effects of toe clipping on survival, recapture, and return rates of Jefferson salamanders (*Ambystoma jeffersonianum*) in Ontario, Canada. *Journal of Herpetology*, 43(3), 394-401.
- Measey, G. J. (1998). Diet of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, UK. *Journal of Zoology*, 246(03), 287-298.
- Measey, G. J. (2001). Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, UK. *Journal of Zoology*, 254(04), 547-555.

- Measey, G. J., Gower, D. J., Oommen, O. V., & Wilkinson, M. (2001). Permanent marking of a fossorial caecilian, *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). *Journal of South Asian Natural History*, 5, 141-147.
- Minteer, B. A., & Collins, J. P. (2005). Why we need an “ecological ethics”. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(6), 332-337.
- Narayan, E. J., Molinia, F. C., Kindermann, C., Cockrem, J. F., & Hero, J. M. (2011). Urinary corticosterone responses to capture and toe-clipping in the cane toad (*Rhinella marina*) indicate that toe-clipping is a stressor for amphibians. *General and comparative endocrinology*, 174(2), 238-245.
- Nietfeld, M. T., Barrett, M. W., & Silvy, N. (1994). Wildlife marking techniques. *Research and management techniques for wildlife and habitats*, 5, 140-168.
- Newman, D. G. (1982). New Zealand herpetology: proceedings of a symposium held at the Victoria University of Wellington, 29-31 January 1980 (No. 2). New Zealand Wildlife Service, Dept. of Internal Affairs, 495p.
- Newman, D. G. (1990). Activity, dispersion, and population densities of Hamilton's frog (*Leiopelma hamiltoni*) on Maud and Stephens Islands, New Zealand. *Herpetologica*, 46(3), 319-330.
- Newman, D. G. (1996). Native frog (*Leiopelma* spp.) recovery plan. Threatened Species Unit, Department of Conservation, 1-26.
- Halliday, T. R. (1996). 6 Amphibians. SUTHERLAND, W. J. *Ecological Census Techniques: A Handbook*. Cambridge University Press. Great Britain, 205-217.
- Heard, G. W., Scroggie, M. P., & Malone, B. (2009). Visible Implant Alphanumeric tags as an alternative to toe-clipping for marking amphibians—a case study. *Wildlife Research*, 35(8), 747-759.
- Newton, D. (1978). Freeze branding. In *Animal Marking*. Macmillan Education UK, 142-144.
- Ott, J. A., & Scott, D. E. (1999). Effects of toe-clipping and PIT-tagging on growth and survival in metamorphic *Ambystoma opacum*. *Journal of Herpetology*, 33(2), 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(3), 275-289.
- Parris, K. M., & McCarthy, M. A. (2008). Toe clipping of anurans for markrecapture studies: acceptable if justified. *Herpetological Review*, 39, 148-149.

Perry, G., Wallace, M. C., Perry, D., Curzer, H., & Muhlberger, P. (2011). Toe Clipping of Amphibians and Reptiles: Science, Ethics, and the Law 1. *Journal of Herpetology*, 45(4), 547-555.

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

Phillott, A. D., Skerratt, L. F., McDonald, K. R., Lemckert, F. L., Hines, H. B., Clarke, J. M., Speare, R. (2008). Toe clipping of Anurans for mark-recapture studies: acceptable if justified. That's what we said!. *Herpetological Review*, 39, 149-150.

Pröhl, H. (2002). Population differences in female resource abundance, adult sex ratio, and male mating success in *Dendrobates pumilio*. *Behavioral Ecology*, 13(2), 175-181.

Rafiński, J. N. (1977). Autotransplantation as a method for permanent marking of urodele amphibians (Amphibia, Urodela). *Journal of Herpetology*, 11(2), 241-242.

Rathbun, G. B., & Murphey, T. G. (1996). Evaluation of a radio-belt for ranid frogs. *Herpetological Review*, 27(4), 197-189.

Reaser, J. K., & Dexter, R. E. (1996). *Rana pretiosa* (spotted frog). Toe clipping effects. *Herpetological Review*, 27(4), 195-196.

Schlaepfer, M. A. (1998). Use of a fluorescent marking technique on small terrestrial anurans. Utilización de una técnica de marcado con sustancias fluorescentes en pequeños anuros terrestres. *Herpetological Review*., 29(1), 25-26.

Schmidt, K., & Schwarzkopf, L. (2010). Visible implant elastomer tagging and toe-clipping: effects of marking on locomotor performance of frogs and skinks. *The Herpetological Journal*, 20(2), 99-105.

Sinsch, U., Oromi, N., & Sanuy, D. (2007). Growth marks in natterjack toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *The Herpetological Journal*, 17(2), 129-137.

Sinsch, U. (2015). Review: skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *The Herpetological Journal*, 25(1), 5-13.

Slaven, D. C. (1992). *Leiopelma hochstetteri*: a study of migratory thresholds and conservation status (Doctoral dissertation, Environmental Science and Geography--University of Auckland).

Standaert, W. F. (1967). Growth, maturation, and population ecology of the carpenter frog (*Rana virgatipes* Cope). Rutgers University.

- Steven, C., Amstrup, T., McDonald, L., Bryan, F., & Manly, J. (2005). Handbook of capture-recapture analysis, 1-272.
- Stuart, S., M. Hoffman, J. Chanson, N. Cox, R. Berridge, P. Ramani and B. Young (eds.). 2008. Threatened Amphibians of the World. xv + 758 pp; Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, USA
- Taber, C. A., Wilkinson Jr, R. F., & Topping, M. S. (1975). Age and growth of hellbenders in the Niangua River, Missouri. *Copeia*, 1975(4), 633-639.
- Thompson, G. (1993). Daily movement patterns and habitat preferences of *Varanus caudolineatus* (Reptilia: Varanidae). *Wildl. Res*, 20, 227-231.
- Ursprung, E., Ringler, M., Jehle, R., & Hödl, W. (2011). Toe regeneration in the neotropical frog *Allobates femoralis*. *The Herpetological Journal*, 21(1), 83-86.
- van Gelder, J. J., & Strijbosch, H. (1996). Marking amphibians: effects of toe clipping on *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Amphibia-Reptilia*, 17(2), 169-174.
- Verhoeff-De Fremery, R., & Vervoordeldonk, F. J. M. (1982). Skin autografts as markers in the toad (*Xenopus laevis*), 156-158.
- Weddeling, K., Hachtel, M., Sander, U., & Tarkhnishvili, D. (2004). Bias in estimation of newt population size: a field study at five ponds using drift fences, pitfalls and funnel traps. *Herpetological Journal*, 14(1), 1-8.
- Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Speare, R. (2004). Origin of amphibian chytrid fungus. *Emerging infectious diseases*, 10, 2100-2105.
- Wheeler, C. A. (2007). Temporal breeding patterns and mating strategy of the Foothill yellow-legged frog (*Rana boylei*) (Doctoral dissertation, Humboldt State University), 1-37.
- Whitaker, A. H., & Alspach, P. A. (1999). Monitoring of Hochstetter's frog (*Leiopelma hochstetteri*) populations near Golden Cross Mine, Waitekauri Valley, Coromandel. *Science for Conservation*, (130), 5-36.
- Woolbright, L. L., Hara, A. H., Jacobsen, C. M., Mautz, W. J., & Benevides Jr, F. L. (2006). Population densities of the coqui, *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae) in newly invaded Hawaii and in native Puerto Rico. *Journal of Herpetology*, 40(1), 122-126.
- Woolley, H. P. (1973). Subcutaneous acrylic polymer injections as a marking technique for amphibians. *Copeia*, 1973(2), 340-341.

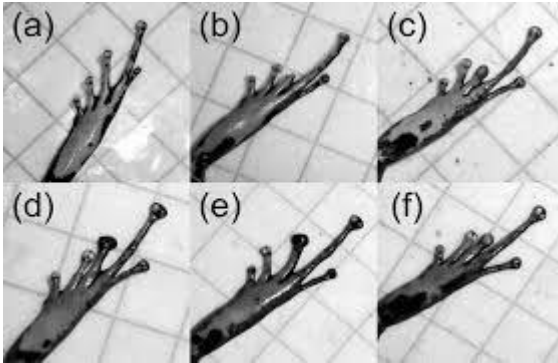
Internetové odkazy:

<https://onlinecourses.science.psu.edu/stat506/node/57> (21.2.2016)

<https://ssarherps.org/>

<http://www.chesterzoo.org/attractions-and-exhibits/zoo-news/silicone-implants-for-frogs>
(29.3.2016)

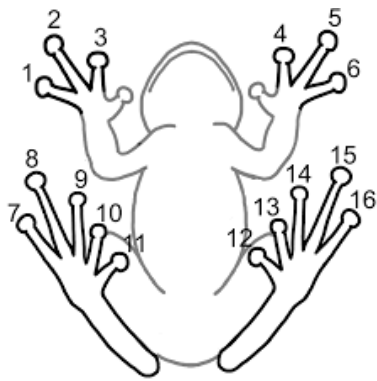
6. Přílohy



Obr. 7: Prsty pralesničky hnědavé (*Allobates femoralis*) (a) před ustřížení prstu, (b) bezprostředně po ustřížení, (c) po 6 týdnech, (d) po 1 roce, (e) po 2 letech, (f) regenerace bez změny barvy (Eva Ursprung 2011).



Obr. 8: *Mantella aurantiaca* s implantovaným fluorescenčním silikonovým gelem na noze (<http://www.chesterzoo.org/attractions-and-exhibits/zoo-news/silicone-implants-for-frogs>).



Obr. 9: Čísla odpovídají místům zastříhnutí prstů. Palec nebyl odstraněn vzhledem k jeho roli při reprodukci (Hoffmann et al. 2008).



Obr. 10: Zánětlivá reakce prstu skokana skvrnkovaného (*Rana pretiosa*) po zastřížení (Reaser et. Dexter 1996).