

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská diplomová práce

**Fylogeneze žab rodu *Leptopelis* (Anura: Arthroleptidae:
Leptopelinae)**

Michaela Holubová

Školitel: Mgr. Michal Berc, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.

České Budějovice

2008

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská diplomová práce
2008

Holubová, M. (2008): Fylogeneze žab rodu *Leptopelis* (Anura: Arthroleptidae: Leptopelinae).

[Phylogeny of Frogs of the genus *Leptopelis* (Anura: Arthroleptidae: Leptopelinae). Bc. Thesis, in Czech.] – 31 p., Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

To analyze the relationships among species of the genus *Leptopelis*, mitochondrial gene 16S rRNA was sequenced and analyzed using Maximum Parsimony and Bayesian inference methods. Sequences of 15 individuals of 13 species of the genus *Leptopelis* were involved. The 16S rRNA based phylogeny trees indicate that the genus *Leptopelis* forms a paraphyletic group, with *L. barbouri* and *L. parkeri* being more closely related to a group composed of the Arthroleptidae + Astylosternidae than to other representatives of the genus *Leptopelis*.

Výzkumný záměr PřF JU MŠM6007665801

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 7.5.2008

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Michalu Berecovi, za odborné vedení, trpělivost a především za pomoc při shánění literatury, Ogarovi za uvedení do problematiky laboratorní praxe a Oldovi Říčanovi za odborné konzultace a ochotu pomoci se započatým projektem. Dále bych ráda poděkovala Andy a Petře za psychickou podporu a své sestře a matce za umožnění studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. FYLOGENETICKÉ POSTAVENÍ RODU <i>LEPTOPELIS</i>	1
1.2. CHARAKTERISTIKA RODU <i>LEPTOPELIS</i> (RESP. PODČELEDI LEPTOPELINAE)	3
2. CÍLE PRÁCE	6
3. MATERIÁL A METODY	7
3.1 MATERIÁL	7
3.2 LABORATORNÍ METODIKA A ANALÝZA SEKVENCÍ	7
4. VÝSLEDKY	10
4.1 FYLOGENETICKÁ ANALÝZA	10
4.2 MAPOVÁNÍ ZNAKŮ	11
5. DISKUZE	21
5.1. POSTAVENÍ RODU <i>LEPTOPELIS</i>	21
5.2. VNITŘNÍ VZTAHY RODU <i>LEPTOPELIS</i>	22
5.3 LEPTOPELINAE SENSU STRICTO (TEDY BEZ <i>L. BARBOURI</i> A <i>L. PARKERI</i>).....	23
5.4. NOVÝ ROD PRO <i>LEPTOPELIS BARBOURI</i> A <i>L. PARKERI</i> ? – VÝHLED	24
6. ZÁVĚR	25
7. LITERATURA	26
8. PŘÍLOHY	30

1. Úvod

1.1. Fylogenetické postavení rodu *Leptopelis*

Rod *Leptopelis* (resp. monogenerická podčeleď Leptopelinae) je málo prozkoumanou skupinou převážně stromových žab subsaharské Afriky. V současné době se v databázi GenBank nachází z celkových 52 druhů sekvence pouze devíti zástupců (*L. argenteus*, *L. bocagei*, *L. brevirostris*, *L. concolor*, *L. kivuensis*, *L. modestus*, *L. natalensis*, *L. palmatus* a *L. vermiculatus*) a dvou neurčených jedinců. Ve všech pracích však bylo zkoumáno pouze zařazení rodu *Leptopelis* do čeledi (Hyperoliidae vs. Arthroleptidae). Doposud však nebyly zkoumány vnitřní vztahy v rámci rodu.

Skupiny Hyperoliidae a Astylosternidae spolu s Arthroleptidae jsou celkově dosud málo prozkoumány a kvůli značným nejasnostem a nedostatku morfologických synapomorfí jednotlivých linií byly mnoha autory spojeny a zase rozděleny (Dubois, 1981; Laurent 1984; Dubois 1987 “1985“, 1992; Frost 2006)

Původně byl rod *Leptopelis* řazen do čeledi Hyperoliidae (Günther 1858; Liem 1970; Schiøtz 1999; Rödel 2000; Channing a Howel 2006), se kterou sdílí řadu morfologických znaků (Liem 1970). Liem (1970) se domníval, že je *Leptopelis* skupinou velmi raně odvozenou od předků hyperoliidů. Po molekulární analýze 14 taxonů čeledi Hyperoliidae (Richards a Moore 1996), založené na sekvencích fragmentu 12S rRNA genu, vyšel *Leptopelis* jako sesterská skupina všech ostatních analyzovaných druhů v čeledi. Emerson a kol. (2000) provedli analýzu kombinací molekulárních a morfologických dat a našli náznaky, že Hyperoliidae nejsou monofyletickou skupinou, protože *Leptopelis* je blíže příbuzný Arthroleptidae než ostatním Hyperoliidae. Toto zjištění potvrzuje i analýza na základě sekvencí nukleárního *Rag-1* genu (Van der Meijden a kol. 2004). V práci Vences a kol. (2003a) bylo zjištěno na základě sekvencí fragmentů genů 16S rRNA, 12S rRNA a cytochromu b, že Leptopelinae jsou příbuznější s africkou čeledí Astylosternidae a Arthroleptidae než s ostatními Hyperoliinae (přičemž k Astylosternidae je příbuznější než k Arthroleptidae), byl ale ponechán v parafyletické skupině Hyperoliidae kvůli nedostatku vzorků. Tento fakt byl podpořen v práci jak další prací Vences (2003b) tak Bossuyta (2006) a Van der Meijdena (2007). Ve všech *Leptopelis* vystupuje jako sesterský taxon k Astylosternidae, tato linie je seterskou skupinou Arthroleptidae a celá tato skupina je

sesterská k Hyperoliidae. Vences a kol. (2003a) si povšimli rozdílné kalcifikace vsunutých elementů prstů. U rodu *Leptolelis* jsou mineralizovány vnitřně v centru elementu, ne zvenčí jako u hyperoliidů, což potvrzuje pozorování Drewese (1984), který uvádí, že tyto elementy jsou u Hyperoliidae a Leptopelinae histologicky zcela odlišné, a rod *Leptopelis* jde rozpoznat morfologicky podle struktury těchto elementů. Drewes (1984) ještě dodává, že u rodu *Leptopelis* chybí řada apomorfních znaků, které jsou u Hyperoliidae běžné, obzvláště hrdelní žláza u samců.

Srovnání vsunutých prstových elementů (Manzano a kol. 2007) ukázalo, že u rodu *Leptopelis* jsou tyto elementy podobné všem ostatním příslušníkům nadčeledi Ranoidea, jsou však tvořeny jinou tkání. U rodu *Leptopelis* je tvaru klínu a je tvořen pojivovou tkání, zatímco u příslušníků Hyperoliidae je tvořen hyalinní chrupavkou. Vsunutý prstový element tvořený pojivovou tkání by mohl být důsledkem pomalé diferenciační rychlosti, u které se buňky a matrix zachovávají jako kondensovaný mesenchym (Manzano a kol. 2007).

Scottová (2005) udává ve své práci na základě morfologických a molekulárních dat, že podčeď Astylosterninae spojuje Arthroleptinae s čeledí Hyperoliidae a dohromady tvoří dobře podpořenou monofyletickou linii. *Leptopelis* je pravděpodobně na bázi skupiny Hyperoliidae-Arthroleptidae, nebo je sesterskou skupinou Hyperoliidae, obě teorie opravňují k uznání samostatné čeledi Leptopelidae.

Další práce (Frost a kol. 2006) potvrdila, že Leptopelinae tvoří monofyletickou skupinu oddělenou od ostatních Hyperoliidae a přiřadili ji ke skupině složené z Astylosternidae + Arthroleptidae. Navíc je čeď Hyperoliidae bez Leptopelinae monofyletická, a tak byl tento rod přeřazen do čeledi Arthroleptidae.

Odierna a kol. (2007) zkoumali cytosystematické hledisko, které podporuje izolovanou pozici *Leptopelis* od Hyperoliidů řadou důkazů. Příslušníci rodu *Leptopelis* mají různé počty chromozomů ($2n=22, 24, 30$), zatímco všichni zástupci Hyperoliidae sledovaní v této studii mají vždy $2n=24$ chromozomů. Arthroleptidae jsou charakterističtí redukcí počtu chromozomů ($2n=18, 16$ a 14), zatímco dva studovaní zástupci čeledi Astylosternidae mají vyšší počet ($2n=28$ u *Nyctibates*, a $4n=54$ u *Astylosternus diadematus*; King 1990), u kterých pravděpodobně tetraploidní počty u rodu *Astylosternus* však ještě potřebují potvrzení. Všichni doposud studovaní příslušníci rodu *Leptopelis* mají alespoň jeden pár telocentrických chromozomů. Tento stav nebyl u hyperoliidů pozorován. Také pozice NORů (organizátory

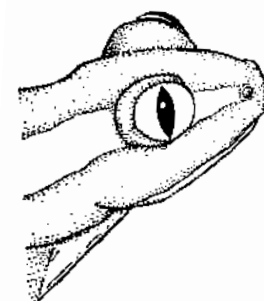
jadérka, nucleolar organizer regions) na pátém chromozomálním páru se liší od hyperoliidů. Umístění NORů prokázalo svou významnost při určování fylogenetických vztahů a systematiky obojživelníků (King 1990), ale zatím nebyly provedeny výzkumy zjišťující lokalizaci NORů u příslušníků Astylosternidae ani Arthroleptidae.

1.2. Charakteristika rodu *Leptopelis* (resp. podčeledi Leptopelinae)

Podčeď Leptopelinae obsahuje pouze jeden rod, *Leptopelis*. Rod *Leptopelis* může být feneticky definován jako skupina firmisternalních žab se zřetelně vertikální zorničkou (obr. 1) a vsunutým elementem mezi posledním a předposledním článkem prstu. V současnosti obsahuje 52 popsaných druhů (Frost 2007). Schiøtz (1999) udává, že *Leptopelis* zahrnuje malé až velmi velké (20–110 mm) žáby žijící výhradně na africkém kontinentě.

Morfologie.

Tělo je většinou robustní, ale příležitostně i štíhlé s hladkou nebo šagrénovou kůží (Liem 1970). Mají vertikální zorničky (obr. 1) a zoubky na vomeru. Hrdelní vak je dobře vyvinutý, bez jícnové záklopy (Schiøtz 1999). Bubínek je viditelný (Pickersgill 2007), je přítomen u všech druhů, i když u některých východoafrických druhů (např. *L. barbouri*, *L. karissimbensis*, *L. parkeri*, *L. uluguruensis*) může být malý nebo nevýrazný, ale vždy přítomný (Schiøtz 1999), s výjimkou *L. crystallinoron* (Lötters a kol. 2005).



Obr. 1: Vertikální zornička. (Channing and Howel 2006)

Metasternum může být od úzké po širokou destičku, omosternum celé nebo jen zezadu vroubkované (Schiøtz 1999). Obratle jsou diplasiocélní, středně dlouhé (s výjimkou *L. vermiculatus*, obratle procélní (Scott 2005)). Sakrální výběžek obratle distálně prodloužený. Vento-posteriorní část sphenethmoidu srostlá. Frontoparietale pravoúhlé nebo lehce širší na jeho anteriorním konci (Liem 1970). Vnitřní metatarsální hrbolek vyčnívající (Schiøtz 1999). Poslední segment prstu bývá protažený vsunutou chrupavkou (viz příloha). Poslední články prstů bývají rozdvojené (Liem 1970) a spolu s vsunutými prstovými elementy, svaly a prstovými přísavkami působí jako komplexní jednotky sloužící základní funkci - zvýšení schopnosti šplhání (Noble 1931; Emerson a Diehl 1980; Mc Allister a Channing 1983; Paukstis a Brown 1987, 1991; Burton 1996, 1998; Manzano a kol. 2007; mimo jiné). Taková jednotka umožňuje konečku prstu vyvinout dodatečné pohyby, které zvyšují možnost

posunout prst bez oddělení prstové přísavky (Hanna a Barnes 1991). Mediální větev pterygoidu (kosti křídlové) je úměrně dlouhá, ale úzká (stejný stav u Astylosterninae)(Scott 2005).

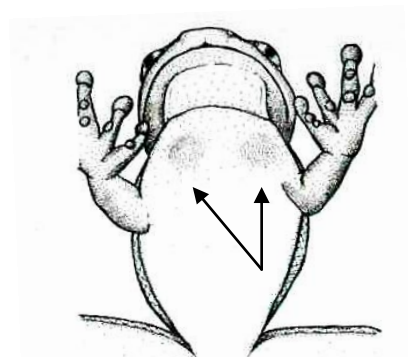
Liem (1970) udává, že *aponeurosis palmaris* je obvykle nepřítomen. *M. adductor longus* není přítomen. *M. extensor digitorum longus* se skládá ze dvou proužků, jeden napojený na proximální části metatarsa třetího prstu zadní končetiny, zatímco druhý napojený na distální část metatarsa čtvrtého prstu zadní končetiny. *M. geniohyoideus lateralis* je napojen na thyrohyale. *M. petrohyloideus posterior* je složen ze tří proužků, dva posteriorní se překrývají. U některých druhů rodu *Leptopelis* je obrys centra osmého obratle cylindrický (Wilkinson a Drewes 2000).

Skupina se vyznačuje neobvyklou diverzitou (Schiøtz 1999; Rödel 2000; Channing and Howel 2006; Pickersgill 2007 atd.). Nalezneme zde jak stromové formy s hladkou kůží a plovacími blánami, tak ropuchovité, bradavičnaté, hrabavé formy bez blan mezi prsty a adhesivních disků. Typ biotopu má vliv na velikost prstových disků.

Žáby rodu *Leptopelis* se obtížně sbírají ve velkém počtu, protože obvykle netvoří agregace v období rozmnožování a znaky oddělující druhy, jako barevný vzor, nejsou obvykle moc zřetelné. Přesto však lze běžně získat přiměřeně jasnou představu o identitě druhů v určité oblasti pomocí kombinací znaků jako preference pro místa výskytu a místa vokalizace, hlasu, plovacích blan a někdy barevného vzoru. Systém je nicméně ustálený, s výjimkou několika nejasných druhů v savanách jižní poloviny Afriky.

Mnoho druhů vypadá velmi podobně, a proto se několikrát stalo, že byly považovány za poddruhy. Ale jelikož podobnost nemusí hned znamenat příbuznost, jsou v současnosti pokládány za samostatné druhy (Schiøtz 1999).

U samců některých druhů jsou přítomny pectorální (prsí) žlázy (obr. 2), u jiných chybí, ale jestli má tohle takovou významnost, na které by mohla být založená sytematika, není známo. Tento znak může být přítomný nebo chybět u velmi podobných druhů, které by mohly být považovány za poddruhy (tj. *L. oryi* bez pectorální žlázy, velmi podobný *L. nordequatorealis* s ní; *L. broadleyi* bez, *L. cynamomeus* s ní.)



Obr. 2: Pectorální žláza samců. (Channing and Howel 2006)

Zbarvení.

Často se vyskytují ve dvou barevných stádiích (Schiøtz 1999), a to je zelená fáze a hnědá fáze, pozdější často s tmavším vzorem. Juvenilové jsou u několika druhů zelení dokonce i v případech, kde jsou všichni dospělci v hnědé fázi. Je známá krátká zpráva, že u druhů v zajetí mohou žáby přejít ze zelené na hnědou fázi (Schiøtz 1999).

Rozmnožování. (Schiøtz 1999)

U mnoha druhů se zdá, že postrádají sekundární sexuální znaky. Wolfova chodba není svinutá, semenné včky chybí, stejně jako hlasové vaky a pářící mozoly, pektorální žlázy jsou u samců obvykle přítomny (Liem 1970). Ty druhy, u kterých je způsob reprodukce znám, zahrabávají velká, bezbarvá, žloutkem vyplněná vajíčka do půdy blízko vody nebo do jamky, kde se vytvoří dešťová kaluž. Larvy se vyvíjejí velmi pomalu. Mají úhořovitý tvar a jsou schopny s velkou hbitostí domrskat se po souši do vody, a můžou překonat nemalé překážky. Jsou náznaky, že *L. brevirostris* má přímý vývoj bez vodního stádia (Schiøtz 1999). Zubní vzorec larev je 1,3 + 3/3. Mladší larvy mají méně řad zubů. Liem (1970) udává, že pulci mají levostranné žaberní štěrbinu a pravostranný anální otvor.

Hlas. (Schiøtz 1999)

Hlas většiny forem je buď nemelodický klapot (unmelodious clack) nebo krátký skřípot (brief creaking)/bzukot (buzzing), nebo obojí. U některých lesních forem má klapot zvláštní zvukovou kvalitu, bývá složen z početných harmonických kmitů krátce po sobě. S podobnou strukturou, ale s rozdílnou zvukovou kvalitou, se setkáme u skupiny možná příbuzných druhů východních savan s nezvyklým jekotem (screaming).

Jsou důkazy (Amiet 1978; Largen and Dowsett-Lemaire 1991), že klapot slouží k lákání samic, zatímco bzukot nebo skřípot může mít teritoriální funkci při udržování vzdáleností mezi sousedními samci. Není známo, jestli všichni *Leptopelis* vydávají oba typy volání, nebo jestli tato dvojité funkce je univerzální u těch, kteří ji mají. Backwell (1988) zaznamenává podobné rozdělení na volání, která slouží k lákání samic, a na ty která zabezpečují rozestupy mezi samci u některých druhů rodu *Africalus*.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je:

1. Studium fylogenetických vztahů afrických žab rodu *Leptopelis*.
2. Mapování morfologických znaků příslušníků rodu.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Vzorky prstů nebo svaloviny pro extrakci DNA byly získány ze sedmi druhů žab dovezených obchodníkem se zvířaty (firma Animal farm) z Tanzánie a poskytnutých Alanem Channingem (University of the Western Cape). Sekvence ostatních druhů byly získány z databáze GeneBank.

Aby byla potvrzena příslušnost rodu *Leptopelis* do čeledi Arthroleptidae byly krom druhů rodu *Leptopelis* jako outgroupy zpracovány zástupci z čeledi Hyperoliidae. Jako představitelé čeledi Arthroleptidae byly použity sekvence druhů *Astylosternus diadematus*, *Arthroleptis variabilis* a *Schoutedenella schubotzi*, a jako zástupci čeledi Hyperoliidae byly použity sekvence druhů *Kassina senegalensis* a *Hyperolius puncticulatus*. Přehled všech analyzovaných zástupců uveden v tabulce 2.

Pro fylogenetickou analýzu byl zvolen mitochondriální gen pro 16S rRNA. Tento gen byl vybrán kvůli možnosti srovnání s ostatními popsánymi sekvencemi DNA z žab (GeneBank).

3.2 Laboratorní metodika a analýza sekvencí

DNA byla extrahována ze svaloviny (10-25 mg) s použitím soupravy Dneasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN®). Fragment genu pro 16S rRNA (o délce ca 600 bp) byl amplifikován metodou PCR s použitím primer 16SL3 forward (5'- AGC AAA GAH YWW ACC TCG TAC CTT TTG CAT -3') (Palumbi a kol. 1991) a 16SAH reverse (5'- ATG TTT TTG ATA AAC AGG CG -3') (Vences a kol. 2003a) Reakce PCR zahrnovala počáteční denaturaci (94 °C, 3 min.), 35 - 40 cyklů (denaturace 94°C, 60 s; nasednutí primeru 45-62°C, 40 s; extenze 72 °C, 60-90 s) a finální extenzi (72 °C, 6 min.). Produkty PCR byly přečištěny soupravou NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL).

Tab. 1: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Typ primeru	Sekvence primeru
16SL3	DNA forward	5'- AGC AAA GAH YWW ACC TCG TAC CTT TTG CAT -3'
16SAH	DNA reverse	5'- ATG TTT TTG ATA AAC AGG CG -3'

Tab. 2: Seznam analyzovaných jedinců.

Taxon	Lokalita	Původ sekvence
<i>Leptopelis argenteus</i>	Kenya: Kilifi District, 14.4 km W Kakayuni, towards Lake Jilore, on Kakayuni Rd. roadside pond (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283226
<i>Leptopelis barbouri</i>	Tanzania - pet dealer	vlastní
<i>Leptopelis bocagei</i>	Tanzania: Iringa, Kibebe Farm, 07'48'12.4"S, 35'45'24.2"E (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283418
<i>Leptopelis flavomaculatus</i>	Tanzania - pet dealer	vlastní
<i>Leptopelis kivuensis</i>	Uganda (Bossuyt a kol. 2006)	GeneBank / DQ347005
<i>Leptopelis modestus</i>	Cameroon (Vences a kol. 2003a)	GeneBank / AJ437009
<i>Leptopelis natalensis</i>	(Vences a kol. 2003b)	GeneBank / AY341692
<i>Leptopelis oryi</i>	Yambio, jižní Sudán (AC2891; Channing)	vlastní
<i>Leptopelis palmatus</i>	CAS 219177 (Drewes and Wilkinson 2004)	GeneBank / AY603992
<i>Leptoeplis parkeri</i>	West Kilombero Forest Reserve, Tanzánie (DCM1387; Channing)	vlastní
<i>Leptopelis uluguruensis</i>	Tanzania - pet dealer	vlastní
<i>Leptopelis vermiculatus</i>	Tanzania -pet dealer	vlastní
<i>Leptopelis vermiculatus</i>	Tanzania: Tanga Region, Muheza District, East Usumbara Mountains, Amani-Muheza Rd. 3-5 km SE Amani	GeneBank / DQ283242
<i>Leptopelis viridis</i>	Yambio, jižní Sudán (AC2869; Channing)	vlastní
<i>Leptopelis sp. AM</i>	Žádná data – pet trade (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283161
<i>Astylosternus diadematus</i>	(Vences a kol. 2003b)	GeneBank / AY341691
<i>Arthroleptis variabilis</i>	Cameroon: Southwestern Province: vicinity of Babong (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283081
<i>Schoutedenella schubotzi</i>	Uganda (Bossuyt a kol. 2006)	Genebank / DQ347006
<i>Kassina senegalensis</i>	Tanzania: Iringa, Kibebe Farm, 07'48'12.4"S, 35'45'24.2"E (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283473
<i>Hyperolius puncticulatus</i>	Tanzania: Morogoro, Udzungwa Mountains National Park, Njokamoni River drainage, 1100-1200 m (Frost a kol. 2006)	GeneBank / DQ283390

Sekvenační reakce byly provedeny se stejnými primery, vzorky byly sekvenovány na servisním pracovišti ÚMBR. Chromatogramy byly kontrolovány a sestavovány s použitím programu BioLign version 4.0.6.2 (Hall, 2005). Sekvence byly alignovány softwarem BioEdit version 6.0.5 (Hall, 2004). Pro výrobu alignmentu byly použity tři různé kombinace parametrů (počátek indelu / pokračování indelu : default; 10/10; 10/1). Fylogenetické analýzy byly provedeny třemi způsoby. 1) Z každým alignmentem zvlášť. 2) Metodou Elision (Wheeler a kol., 1995), tj. kombinací všech třech alignmentů. 3) Byl vyroben alignment, který obsahoval pouze jednoznačně zalignované oblasti.

Fylogenetické vztahy byly studovány metodou Maximální parsimonie (MP; PAUP*; Swofford, 2002) a metodou Bayesian inference (BI). Následující parametry a příkazy byly použity k výrobě MP stromu. V prvním kroku byl extenzivně prozkoumán fylogenetický prostor (hsearch addseq=random nchuck=10 chuckscore=1 10 nreps=500). V dalším kroku byly hledány všechny MP stromy pomocí příkazů hsearch start=current nchuck=0 chuckscore=0. Podpora byla studována metodou bootstrapu (nreps=1000).

Fylogeneze metodou Bayesian inference byla provedena v programu MrBayes 3.1 (Ronquist a Huelsenbeck, 2003) s následujícími parametry (dva nezávislé běhy deseti řetězců s jedním milionem generací; burnin 25%). Modeltest 3.7 (Posada a Crandall, 1998) byl použit ke zvolení modelu evoluce.

4. Výsledky

4.1 Fylogenetická analýza

Výsledkem všech tří alignmentů byla velmi podobná fylogeneze. Pro finální analýzy tak byl použit alignment vyrobený metodou Elision, který obsahuje všechny pozice. Dva různé přístupy byly použity k výrobě MP stromů. V jedné analýze jsou indely vyloučeny (obr. 3), zatímco ve druhé jsou přítomny (obr. 4). Indely přispívají k fylogenetickému signálu nukleotidových pozic zvýšením konzistenčního indexu (0.52 vs. 0.56) a bootstrapové podpory.

Fylogenetický strom sestrojený metodou maximum parsimony (MP) bez indelů potvrdil, že rod *Leptopelis* nepatří do čeledi Hyperoliidae. Hyperoliidae jsou sesterskou skupinou linie *Leptopelis*-Astylosternidae-Arthroleptidae, jejíž monofylie je podpořena 100% hodnotou bootstrapu. Druhy *L. barbouri* a *L. parkeri* se vyštěpily jako sesterská skupina k linii Astylosternidae-Arthroleptidae (bootstrap 58%). Tato monofyletická větev je sesterskou skupinou k ostatním analyzovaným zástupcům rodu *Leptopelis*, což jej činí parafyletickým taxonem. V rámci druhé linie ostatních druhů rodu *Leptopelis* se nejvíce na bázi odštěpil druh *L. viridis*. Zbylé druhy tvoří dvě skupiny. V první skupině se nacházejí dvě podskupiny podpořené vysokými hodnotami bootstrapu, první obsahující západoafrické lesní druhy (*L. modestus*, *L. palmatus*, *L. kivuensis*), a druhá s *L. bocagei*, *L. oryi* a *L. flavomaculatus*. Druhou skupinu tvoří větev s *L. natalensis*, *L. argenteus* a *L. uluguruensis* a větev s *L. vermiculatus* a *L. sp.* (sekvence zjevně ukazuje, že jedinec DQ283161 náleží ke druhu *L. vermiculatus* – sekvence mezi jednoznačně determinovaným *L. vermiculatus* a tímto jedincem se shodují na 100%).

Fylogenetický strom sestrojený MP analýzou s přítomnými indely podpořil umístění skupiny *L. barbouri* a *L. parkeri* k linii Astylosternidae-Arthroleptidae velmi vysokou bootstrapovou hodnotou (92). V rámci linie *Leptopelis* se nejvíce na bázi vyštěpila větev s *L. argenteus* a *L. uluguruensis*, následovaná *L. natalensis*. Ostatní druhy vytvořily tři větve. Dobře podpořenou linií (99) je opět skupina západoafrických lesních druhů *L. kivuensis*, *L. modestus* a *L. palmatus*. Další větev tvoří *L. vermiculatus* s *L. sp.* Málo podpořenou větví (54) je *L. viridis*, *L. bocagei*, *L. oryi* a *L. favomaculatus*. Vzájemný vztah těchto tří větví je nejasný (trichotomie).

Výsledky Bayesian inference (BI) analýzy jsou velmi podobné výsledkům MP analýzy s indely (obr. 5). Stejně jako u obou předcházejících stromů vyšli Hyperoliidae jako sesterská skupina všech ostatních analyzovaných taxonů a větev *L. parkeri* - *L. barbouri* vyšla jako sesterská skupina k Arthroleptidae-Astylosternidae. Mezi zbývajícími druhy rodu *Leptopelis* se nejvíce na bázi odštěpil druh *L. argenteus*, jehož umístění se shoduje s MP stromem s indely (obr. 3). V tomto případě se liší umístění *L. uluguruensis*, který je sesterským druhem všech ostatních druhů rodu *Leptopelis* mimo *L. argenteus*. Dalším postupným taxonem je *L. natalensis*, jehož umístění se rovněž shoduje s tím v MP stromu s indely. Druhy *L. vermiculatus* a *L. sp.* se vyštěpily jako sesterská linie k větvě se dvěma dobře podpořenými skupinami: (1) *L. palmatus*, *L. modestus* a *L. kivuensis* a (2) *L. viridis*, *L. bocagei*, *L. oryi* a *L. flavomaculatus*.

4.2 Mapování znaků

Na získaný kladogram metodou Bayesian inference (obr. 5) jsem namapovala následující znaky, které jsou v rodu *Leptopelis* proměnlivé: plovací blány (obr. 6), pektorální (prsí) žlázy (obr. 7), hlas (obr. 8), bubínek (obr. 9) a biotop (obr. 10).

Plovací blány (obr. 6). Původní stav byl jednoznačně s redukovanými plovacími blanami. Přítomnost plovacích blan je odvozený stav, vyskytuje se jak u *L. vermiculatus*, *L. flavomaculatus* a *L. palmatus* tak u *L. parkeri*. Nikdy však u sledovaných druhů čeledi Arthroleptidae, Astylosternidae či Hyperoliidae.

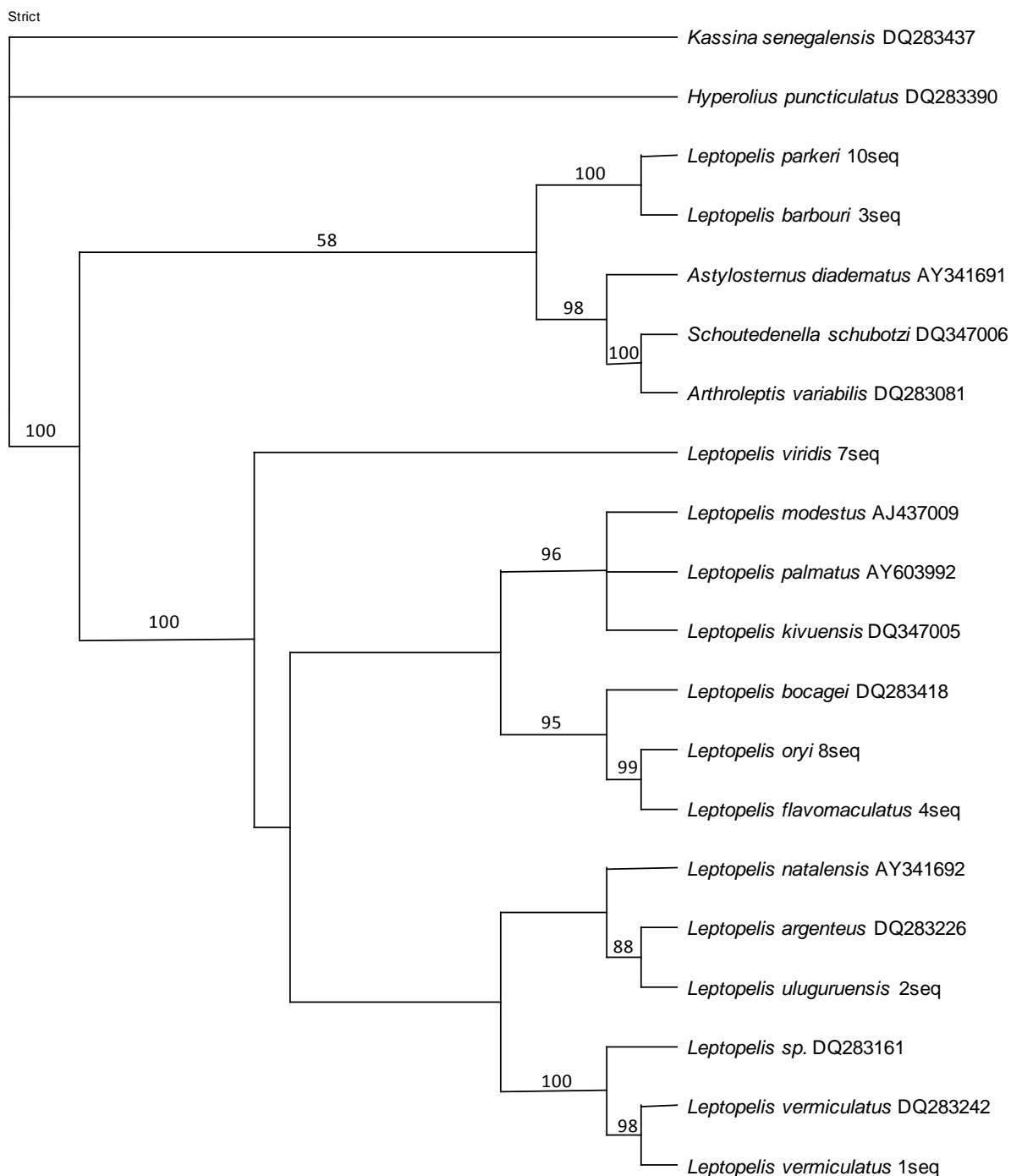
Pektorální (prsí) žlázy (obr.7). Tento znak se vyskytuje pouze u zástupců rodu *Leptopelis* a u *L. barbouri* (Pickersgill (2007) sice tvrdí, že pektorální žlázy nejsou u *L. barbouri* přítomny, v této práci však vycházím z Channinga a Howela (2006) a Schiøtze (1999), podle kterých přítomny jsou, i když by jejich nepřítomnost podpořila přiřazení *L. barbouri* a *L. parkeri* ke skupině Arthroleptidae-Astylosternidae), nikoliv však u astylosternidů či arthroleptidů. Společný předek pektorální žlázy zcela evidentně neměl, což potvrzuje jejich nepřítomnost u nejbazálnějších zástupců (*L. argenteus* a *L. uluguruensis*) a znovu se objevuje u *L. oryi*.

Hlas (obr. 8). Analýza ukazuje, že sledované linie lze v případě typu hlasu rozdělit na dvě monofyletické skupiny. První tvoří druhy s hlasem „buzzing“ (*L. barbouri*, *L. parkeri*,

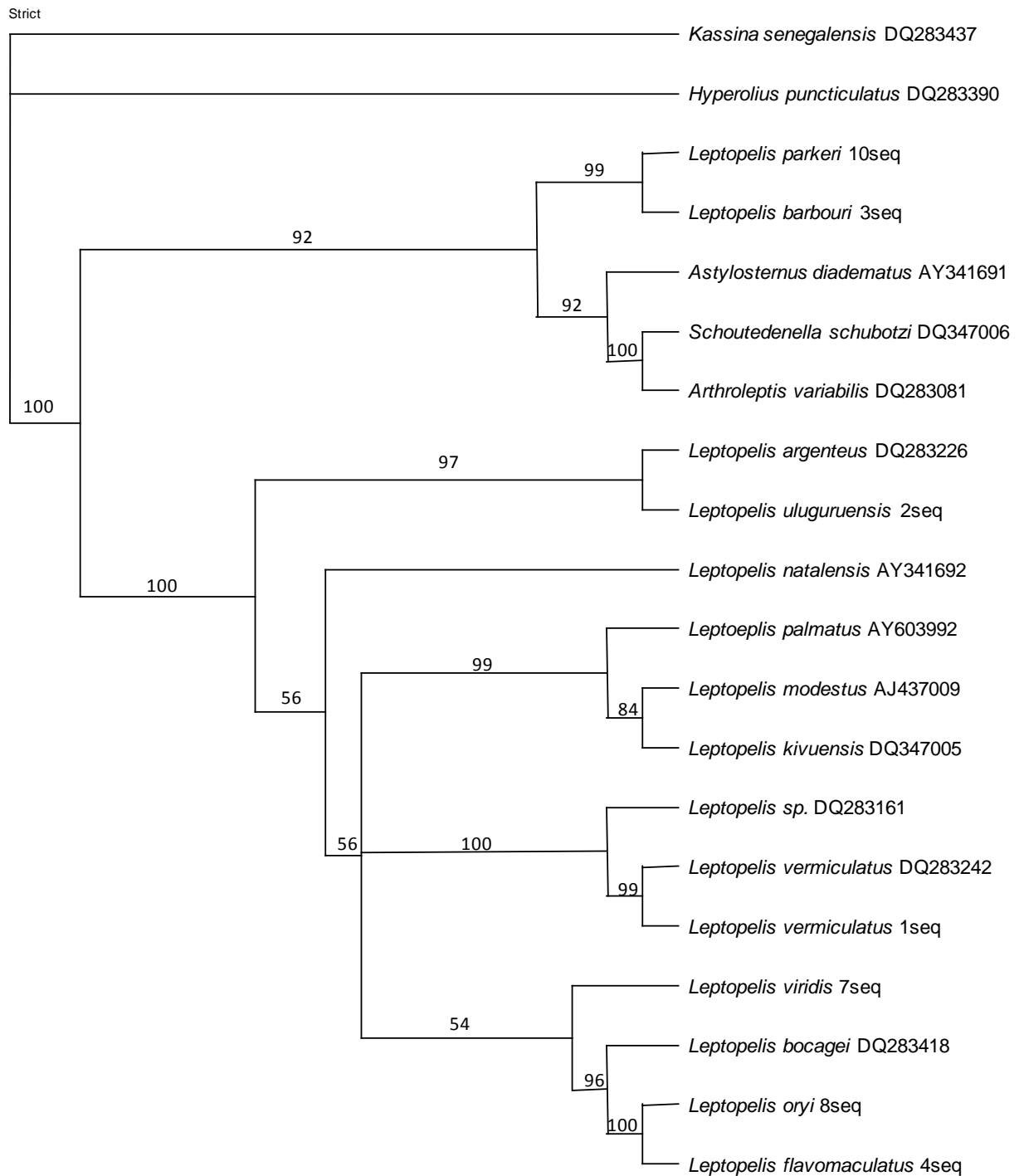
Schoutedenella schubotzi, *Arthroleptis variabilis*, *Astylosternus diadematus*), druhou tvoří zbytek druhů rodu *Leptopelis*. Mezi nimi se však nacházejí dva druhy, u kterých se hlasy liší od ostatních (*L. bocagei* – „waabing“ a *L. natalensis* – „quack“).

Bubínek (obr. 9). Původní stav je malý bubínek. Velký bubínek vzniká v rámci leptopelisů pouze jedenkrát. Malý bubínek se nachází u nejbazálnějších druhů (*L. argenteus*, *L. uluguruensis* a *L. natalensis*), dále se dvakrát nezávisle objevuje v jedné skupině u *L. oryi* a u předka dvojice *L. kivuensis* a *L. modestus*. Druhy *L. barbouri* a *L. parkeri* mají bubínek také malý, ale u zástupců větve Arthroleptidae-Astylosternidae se nachází odvozený stav, bubínek velký.

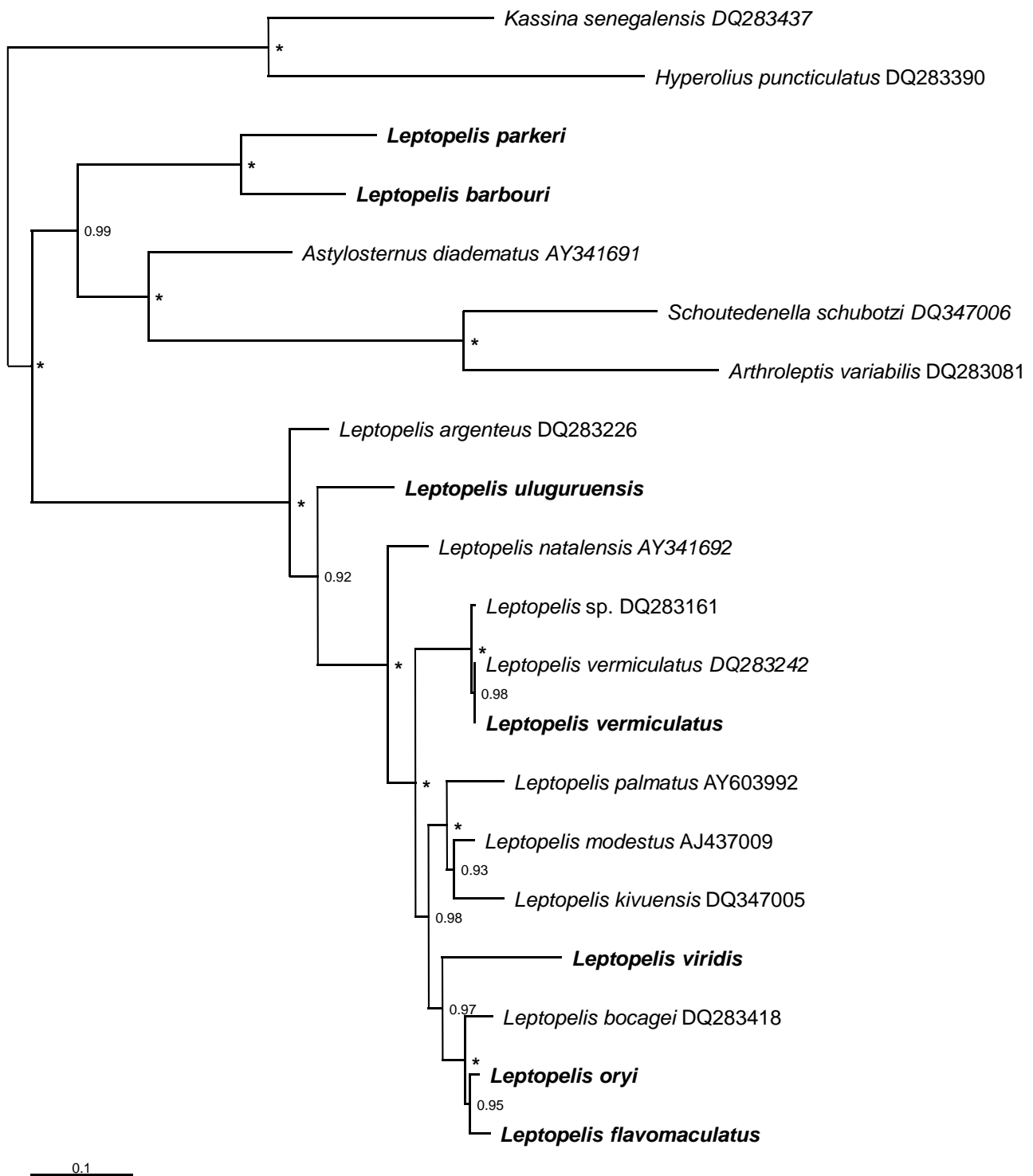
Biotop (obr. 10). Původní biotop společného předka byl pravděpodobně les. Tento stav mají *L. parkeri* a *L. barbouri* společný s větví arthroleptidů. Odvozený stav (savana) se objevuje dvakrát nezávisle, u skupiny druhů *L. viridis*, *L. bocagei* a *L. oryi* a ještě jednou u *L. argenteus*. K jedinému návratu ze savanového biotopu do lesního došlo u *L. flavomaculatus*.



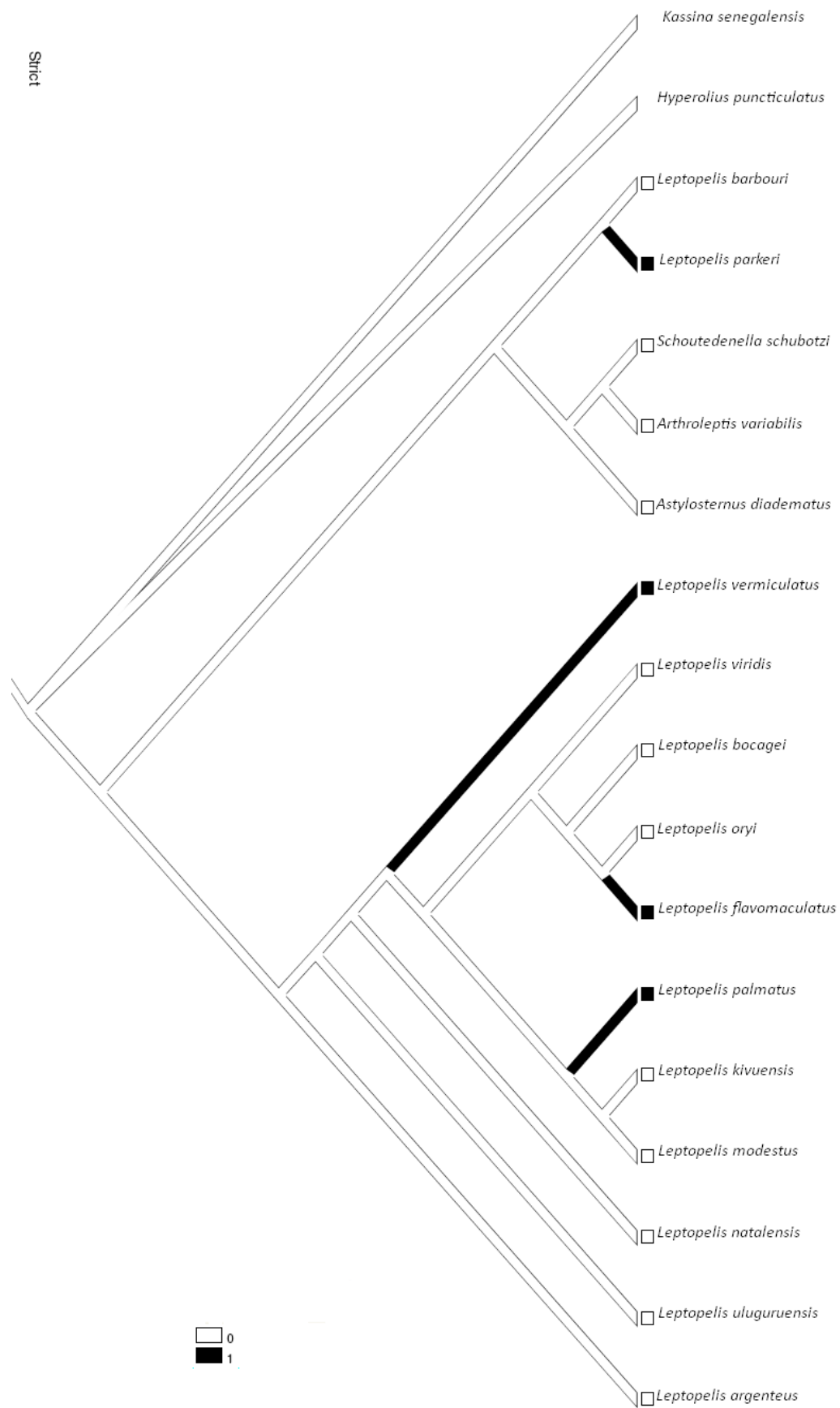
Obr. 3: Maximum parsimony strom (bez indelů) odvozený z nukleotidových sekvencí 16S rRNA za použití programu PAUP* (L=2814; N=2; CI=0.52; RI=0.57). L=délka stromu; N=počet MP stromů; CI=konzistenční index; RI=retenční index.



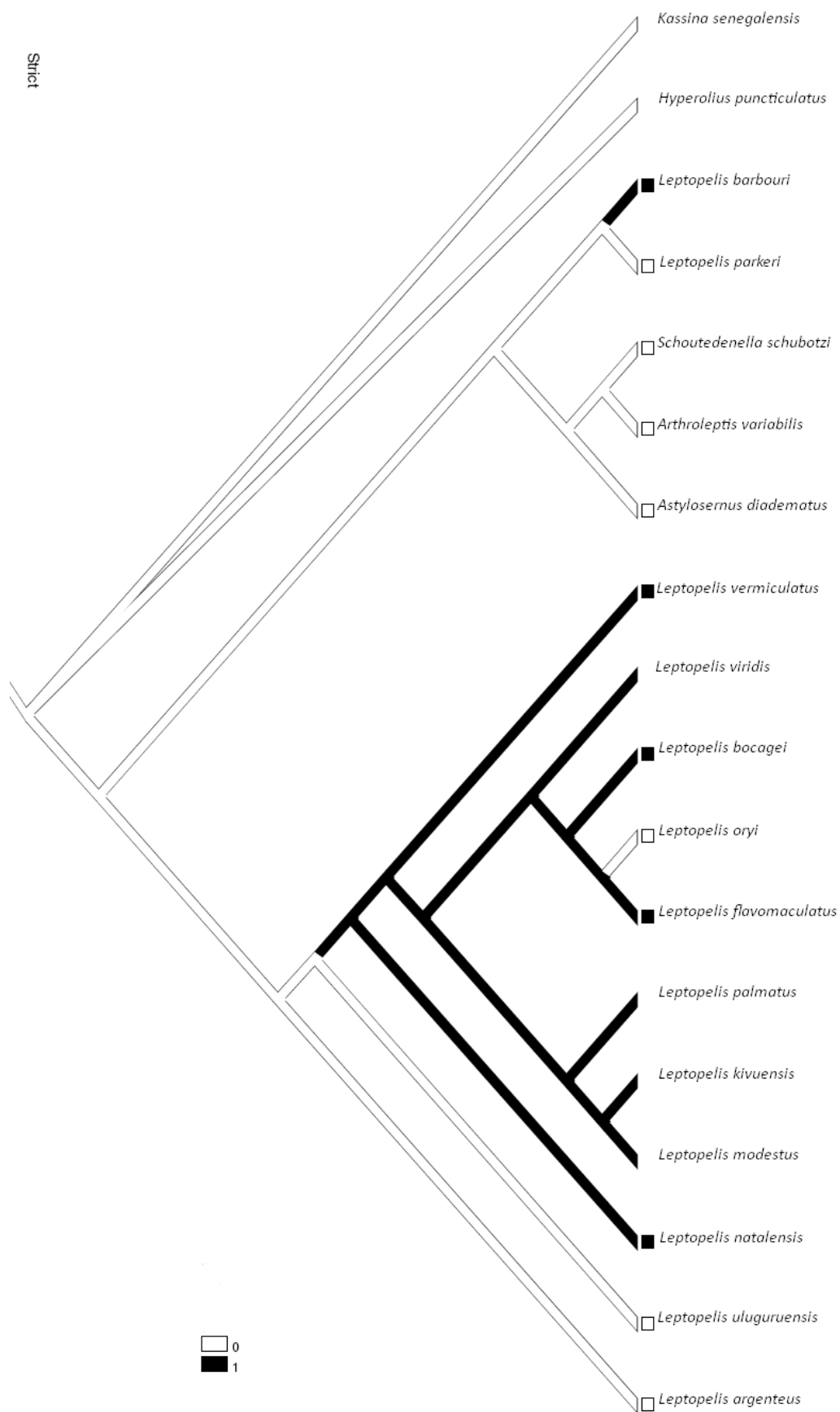
Obr. 4: Maximum parsimony (s indely) odvozený z nukleotidových sekvencí 16S rRNA za použití programu PAUP* (L=3825; N=2; CI=0.56; RI=0.57).



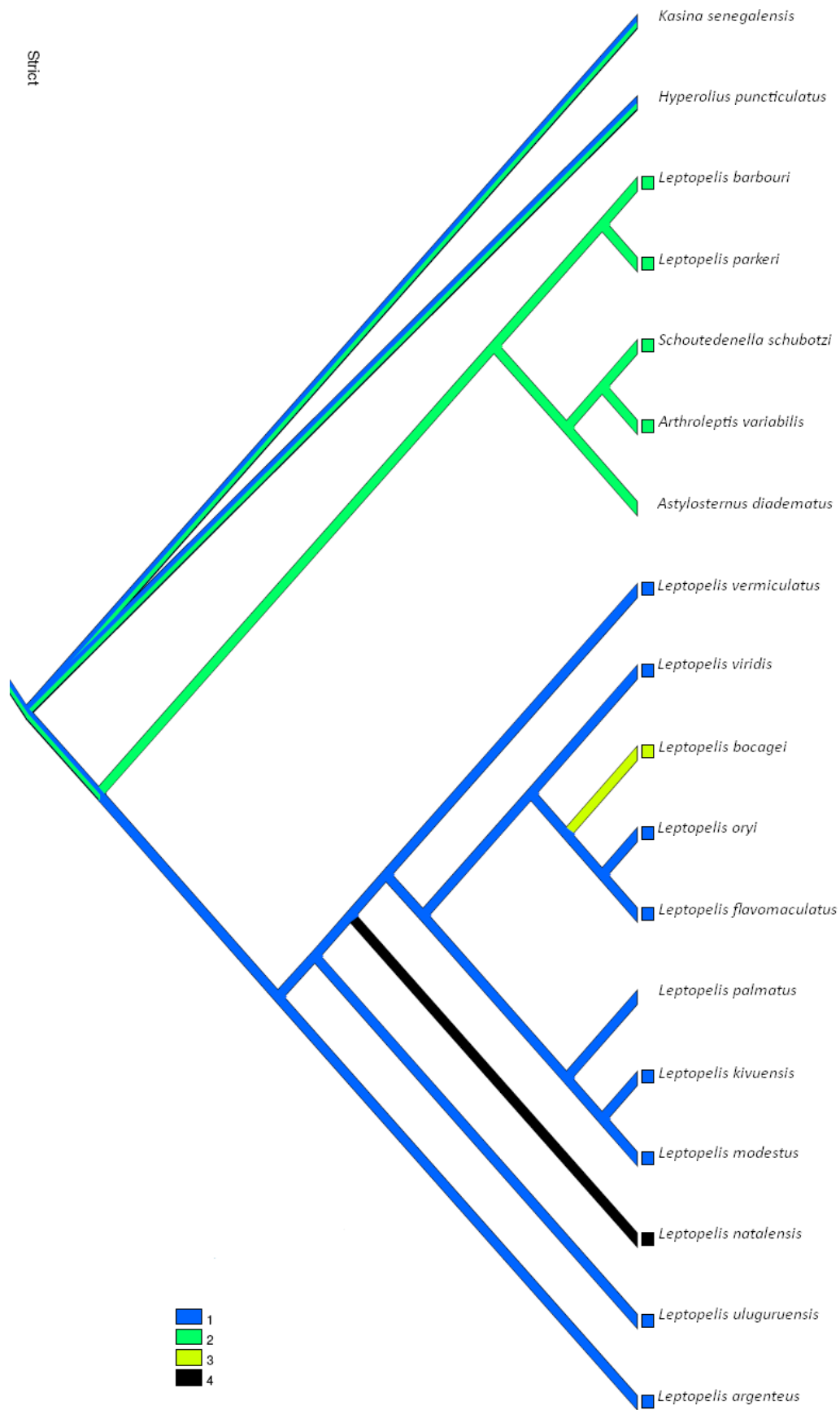
Obr. 5: Bayesian inference strom (bez indelů) odvozený z nukleotidových sekvencí 16S rRNA za použití programu MrBayes (log-likelihood – 13869.38; evoluční model GTR + I + G). Hvězdičky vyznačují posteriorní probabilitu 1.00.



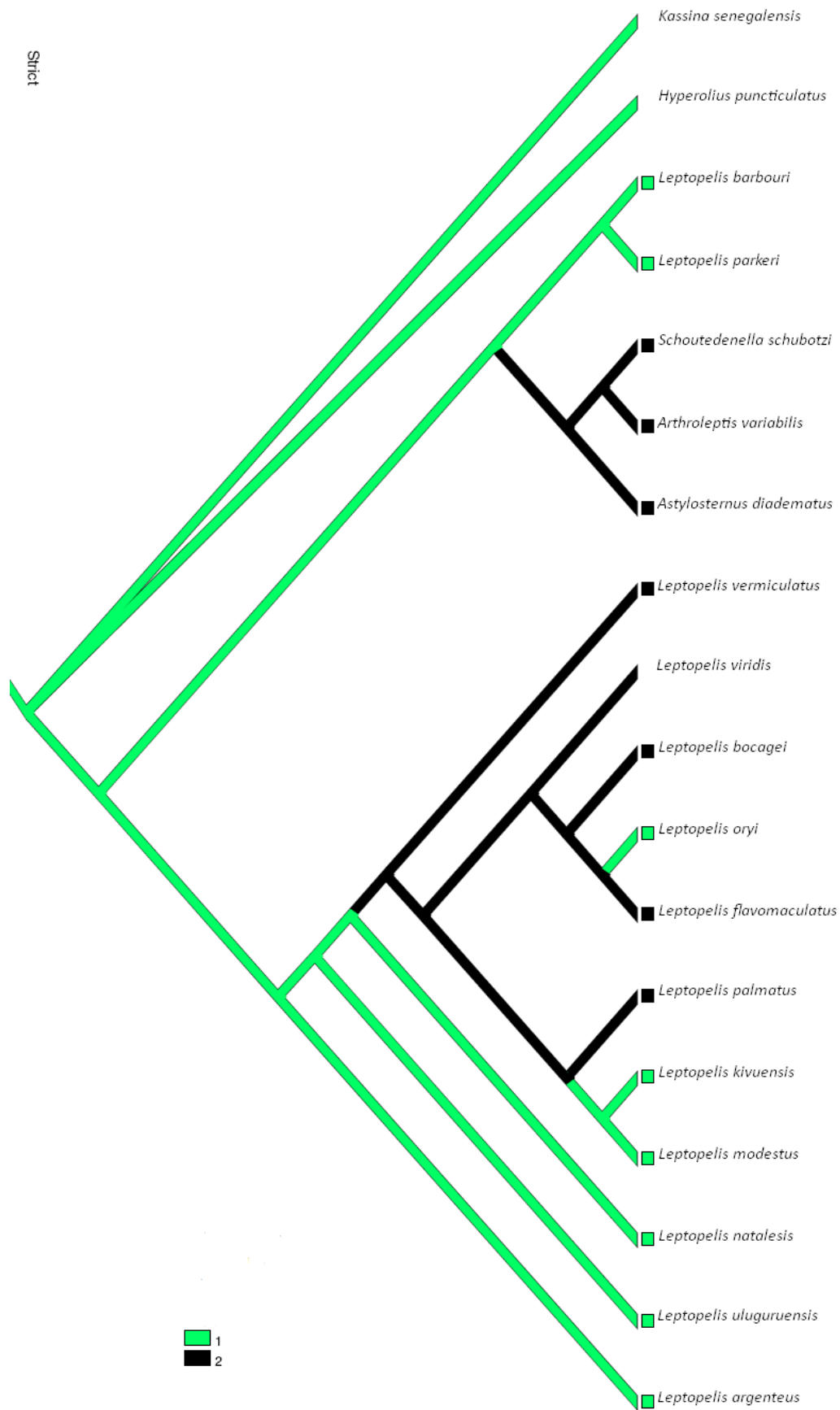
Obr. 6: plovací blány. 0 – redukované, 1 – vyvinuté.



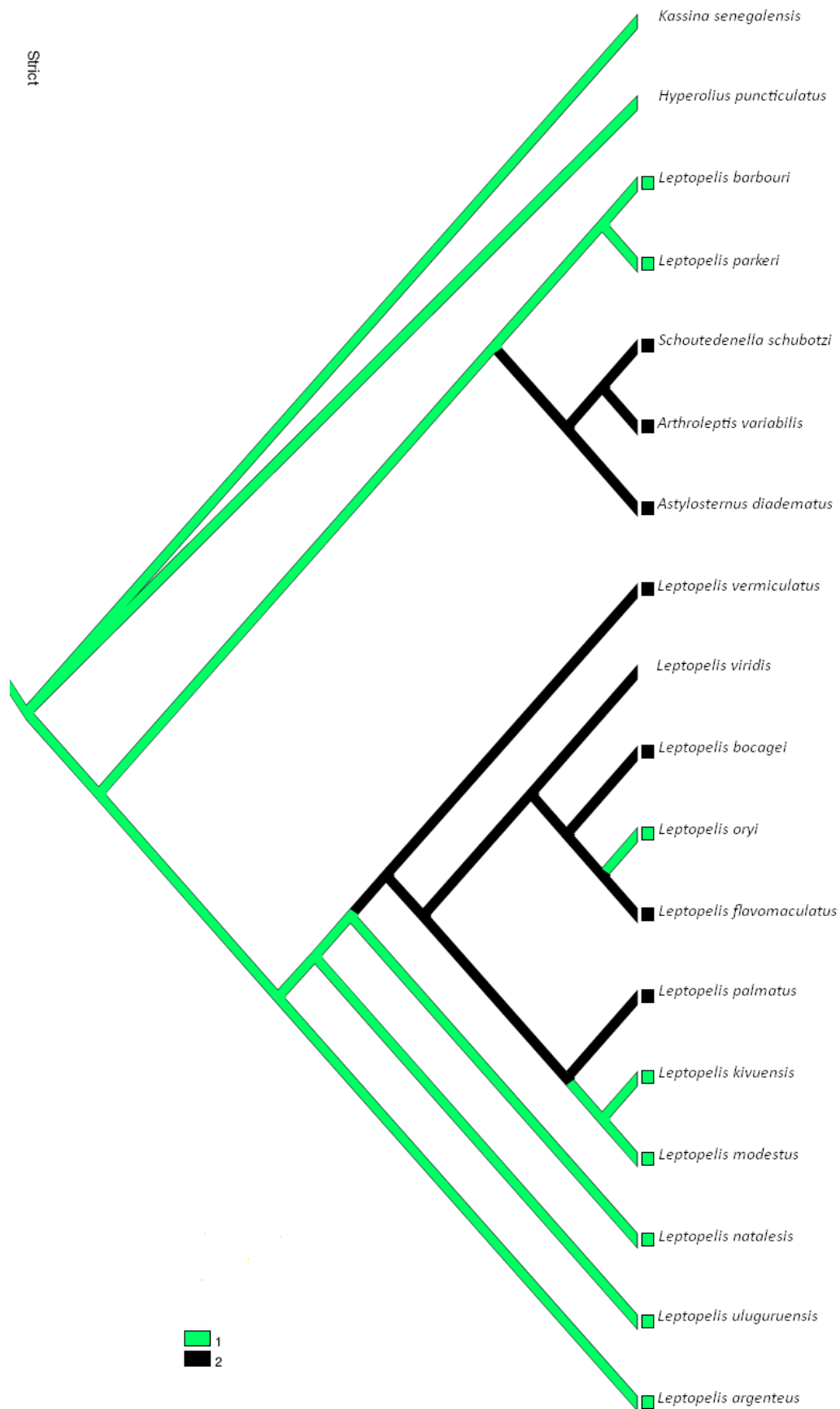
Obr. 7: Pektorální (prsň) žlázy samců. 0 – nepřítomny, 1 – přítomny.



Obr. 8: Hlas. 1 – klapot (clack), 2 – bzukot (buzzing), 3 – waab, 4 – kvákání (quack).



Obr. 9: Bubínek (tympanum). 1 – malý, 2 – velký.



Obr. 10: Biotop. 1 – les, 2 – savanna.

5. Diskuze

5.1. Postavení rodu *Leptopelis*

Dosavadní práce zahrnující analýzy rodu *Leptopelis* se zabývají především jeho postavením v rámci čeledi Hyperoliidae, popř. Arthroleptidae a Astylosternidae. Najednou bylo analyzováno nejvíce pět druhů (Vences a kol. 2003a: 16S rRNA *L. bocagei*, *L. breviostris*, *L. modestus*, *L. mossambicus*, *L. natalensis*; 12S rRNA: *L. argenteus*, *L. concolor*, *L. modestus*, *L. natalensis*, *L. vermiculatus*), dále pak čtyři (Frost a kol. 2006: *L. argenteus*, *L. bocagei*, *L. vermiculatus*, *Leptopelis* sp.) a méně (viz níže). Doposud nikdy nebyly zkoumány vnitřní vztahy v rámci tohoto rodu. V této práci bylo analyzováno celkem 13 druhů rodu *Leptopelis*. Takové množství doposud nebylo použito v žádné jiné analýze. Tento projekt zahrnul analýzu sedmi druhů (*L. argenteus*, *L. bocagei*, *L. kivuensis*, *L. modestus*, *L. natalensis*, *L. palmatus*, *L. vermiculatus*, *L. sp.*), jejichž sekvence získané z databáze GenBank byly vhodné, a šesti nově osekvenovaných druhů (*L. barbouri*, *L. flavomaculatus*, *L. oryi*, *L. parkeri*, *L. uluguruensis*, *L. viridis* a navíc *L. vermiculatus* pro srovnání), které budou tímto přístupné v GenBanku. Osekvenování dosud neanalyzovaných druhů může sloužit jako podklad pro další hlubší poznání této skupiny.

Výsledky této práce potvrdily dřívější zjištění, že rod *Leptopelis* nepatří do čeledi Hyperoliidae, ale je příbuzný Arthroleptidae (Emerson a kol. 2000; Van der Meijden a kol. 2004), v těchto pracích však nebyl zahrnut žádný zástupce Astylosternidae. V dalších pracích se potvrdila příbuznost s Arthroleptidae, ale vyšlo najevo, že rod *Leptopelis* je v rámci Arthroleptidae sesterskou skupinou Astylosterninae (v tomto případě interpretované jako podčeď) (Vences 2003a, 2003b; Bossuyt a kol. 2006; van der Meijden a kol. 2007). V publikaci Frosta a kol. (2006, fig. 62) však rod *Leptopelis* vystupuje jako sesterská skupina k Arthroleptidae-Astylosternidae. Jejich zjištění odpovídá výsledkům této práce, kde je část parafyletického rodu *Leptopelis* (viz níže) sesterskou skupinou Athroleptidae-Astylosternidae a celá tato linie je sesterskou vůči zbytku leptopelisů.

Kvůli celkové podobnosti byly tyto tři skupiny (Astylosternidae, Arthroleptidae a Hyperoliidae) mnoha autory spojeny a zase rozděleny (Dubois 1981; Laurent 1984; Dubois 1987 “1985“, 1992; Frost 2006). Od ostatních příslušníků Ranidae je podle Laurenta (1986) odlišuje (1) chrupavčité metasternum bez kostěného styletu; (2) nesrostlé druhý carpale; (3)

nesrostlý třetí distální tarsale; (4) poslední články prstů zpravidla zahnuté; (5) vertikální zornička (u většiny hyperoliidů horizontální, ačkoliv je vertikální u některých rodů: *Afrivalus*, *Callixalus*, *Kassina*, *Kassinula*, *Paracassina*, *Phlyctimantis* a *Tachycnemis*, Drewes and Wilkinson 2004; Frost a kol. 2006); (6) a chybějící nebo chabě vyvinutý metatarsální hrbolek. Žádný z těchto znaků není prokazatelně synapomorfie (Frost a kol. 2006). Vences a kol. (2003a) navrhli na základě důkazů analýzy mitochondriální DNA, že Leptopelinae je buď uložena mezi parafyletickými Astylosternidae nebo parafyletickými Arthroleptidae, ale své poznatky nevyjádřili v taxonomii (Frost a kol. 2006).

5.2. Vnitřní vztahy rodu *Leptopelis*.

Nejpřekvapivějším výsledkem analýzy jsou vnitřní vztahy v rámci rodu *Leptopelis*. Výsledky této práce nasvědčují tomu, že rod *Leptopelis* je parafyletickým taxonem. *L. barbouri* a *L. parkeri* jsou mnohem příbuznější skupině Astylosternidae-Arthroleptidae než ostatním analyzovaným leptopelisům. Tento výsledek je zcela nový, ani jeden z dvojice druhů *L. barbouri* a *L. parkeri* dosud nebyl součástí žádné fylogenetické analýzy. Otázkou je, jak by vypadalo postavení těchto druhů v analýze zahrnující vyšší počet zástupců astylosternidů a arthroleptidů nebo jen jiné zástupce. Důležité je také zvýšit počet znaků v analýze (tj. dodělat celý gen a případně přidat další, vhodné by byly jaderné), zde se pracovalo jen z částí 16S rRNA.

Jediným společným morfologickým znakem těchto dvou druhů „leptopelisů“ a čeledi Astylosternidae-Arthroleptidae, který byl nalezen, je hlas. Tento znak jednoznačně potvrdil příbuznost druhů *L. barbouri* a *L. parkeri* s linií Arthroleptidae-Astylosternidae. Tyto dva druhy jsou však málo poznané a proto je nesnadné navrhnout možné synapomorfie.

Na základě těchto výsledků by měla pokračovat snaha o nalezení podpory pro oddělení obou linií na morfologickém a biologickém základu (např.: tvar omosterna, způsob rozmnožování a vývoje larev, přítomnost či nepřítomnost pektorálních žláz, počet chromozomů, atd.)

5.3 Leptopelinae sensu stricto (tedy bez *L. barbouri* a *L. parkeri*).

Rod *Leptopelis* byl považován za monofyletickou skupinu. Tato práce však přináší důkaz o jeho parafylii, neboť *L. barbouri* a *L. parkeri* vycházejí jako sesterská skupina Arthroleptidae-Astylosternidae. Vzhledem k tomu, že nejvyšší zahrnutý počet v jedné práci je pět druhů, nejsou výsledky zas tak překvapivé.

Analýza provedená Vencesem a kol. (2003a) na základě sekvencí 16S rRNA molekuly potvrzuje postavení *L. modestus* a *L. bocagei*, které se v mé analýze ve všech třech stromech umístili v sesterských skupinách, a *L. natalensis* jako nejbazálnější z použitých druhů. Analýza ze stejné práce na základě 12S rRNA se shoduje s BI i MP s indely stromy, od MP bez indelů se liší v postavení *L. argenteus* a *L. natalensis* v jedné linii přiřčené jako sousední větev k větvi s *L. vermiculatus*.

V publikaci Frosta a kol. (2006) spojuje analýza *L. vermiculatus* s *L. sp.* stejně jako ve všech třech mých analýzách, s MP s indely a BI se shoduje také postavení *L. argenteus* a *L. bocagei*. Jen v MP bez indelů je *L. argenteus* postaven mezi *L. bocagei* a *L. vermiculatus* + *L. sp.*

Uspořádání stromů fylogenetických analýz naznačují členění jednotlivých druhů do podskupin, ale k vynesení konkrétních závěrů je potřeba provést analýzu mnohem většího počtu taxonů.

Co se týče společných znaků jednotlivých druhů, objevují se rozdílné interpretace stejných druhů různými autory, zejména v případě hlasu. V rámci rodu *Leptopelis* se dva druhy (*L. bocagei* a *L. natalensis*) odlišují od ostatních analyzovaných druhů (alespoň v popisu jejich hlasu v literatuře; hlas *L. natalensis* charakterizuje Schiøtz (1999) jako „quack“ někdy s předcházejícím „buzzing“; Pickersgill (2007) udává podobný údaj, že hlas je kombinace „buzzů“ a „clacků“. Schiøtz (1999) popisuje hlas *L. bocagei* jako „waab“, Channing a Howell (2006) tento hlas popisuje jako „kwaak“. U příslušníků skupiny, do které *L. bocagei* náleží, se nacházejí také nesrovnalosti v popisu hlasu. Zejména u *L. flavomaculatus*, kdy Schiøtz (1999) udává „clack“, Channing a Howell (2006) udávají „buzzing“ a „clack“ a Pickersgill (2007) „meow“. Rozdílnost hlasů u *L. bocagei* může být dána jednak subjektivním posouzením každého z autorů a jednak různými lokalitami původu pozorovaných jedinců, protože tento druh má relativně velký areál výskytu, může být ovlivněn odlišnými sousedními druhy žab).

5.4. Nový rod pro *Leptopelis barbouri* a *L. parkeri*? – výhled

Výsledky této analýzy vedou k jednoznačnému závěru, že rod *Leptopelis* je parafyletický. Genetická vzdálenost druhů *L. barbouri* a *L. parkeri* a ostatních druhů rodu *Leptopelis* není menší než 20%. Je tedy zjevné, že pro tyto dva druhy bude třeba s nejvyšší pravděpodobností vytvořit nový rod. V současnosti analýza pokračuje snahou sehnat další druhy obou linií (Arne Schiøtz - Museum Copenhagen, Mark-Oliver Rödel – Universität Würzburg) a snahou o nalezení morfologických a biologických apomorfii jednotlivých linií.

6. Závěr

Cílem této práce bylo proniknout do problematiky fylogenetických vztahů rodu *Leptopelis* s příbuznými skupinami a v rámci rodu.

Na základě molekulární analýzy založené na sekvencích 16S ribozomální RNA, byly definovány tyto závěry:

- 1) Rod *Leptopelis* nepatří do čeledi Hyperoliidae, ale je blíže příbuzný se skupinou Arthroleptidae-Astylosternidae.
- 2) Jedinec *L. sp.* (DQ283161) je příslušníkem druhu *L. vermiculatus*.
- 3) Druhy *L. barbouri* a *L. parkeri* jsou příbuznější se skupinou Arthroleptidae-Astylosternidae, než s ostatními příslušníky rodu *Leptopelis*.
- 4) Genetická vzdálenost obou linií opravňuje k vytvoření nového samostatného rodu pro druhy *L. barbouri* a *L. parkeri*.

7. Literatura

- Amiet J.-L. 1978.** A propos d'*Hyperolius platyceps*, *H. kuligae* et *H. adametzi*. *Annales de la Faculté des Sciences du Cameroun* 25: 221–256.
- Backwell P.R.Y. 1988.** Functional partitioning in the two-part call of the Leaf-Folding Frog, *Afrixalus brachycnemis*. *Herpetologica* 44: 1-7.
- Bossuyt F., Brown R.M., Hillis D.M., Cannatella D.C. and Milinkovitch M.C. 2006.** Phylogeny and biogeography of a cosmopolitan frog radiation: late Cretaceous diversification resulted in continent-scale endemism in the family Ranidae. *Systematic Biology* 55 (4): 579-594.
- Burton T.C. 1996.** Adaptation and evolution in the hand muscles of Australo-Papuan hylid frogs (Anura: Hylidae: Pelodryadinae). *Australian Journal of Zoology* 44: 611–623.
- Burton T.C. 1998.** Are the distal extensor muscles of the fingers of anuran an adaptation to arboreality? *Journal of Herpetology* 32: 611-617.
- Channing A. and Howell K.M. 2006.** *Amphibians of East Africa*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Drewes R.C. 1984.** A phylogenetic analysis of the Hyperoliidae (Anura): treefrogs of Africa, Madagascar, and the Seychelles Islands. *Occasional Papers of the California Academy of Science* 139: 1–70.
- Drewes R.C. and Wilkinson J.A. 2004.** The California Academy of Sciences Gulf of Guinea Expedition (2001) I. The Taxonomic Status of the Genus *Nesionixalus* Perret, 1976 (Anura: Hyperoliidae), Treefrogs of São Tomé and Príncipe, with Comments on the Genus *Hyperolius*. *Proceedings of the California Academy of Sciences* Volume 55, No. 20, pp. 395–407.
- Dubois A. 1981.** Liste des genres et sousgenres nominaux de Ranoidea (Amphibiens Anoures) du monde, avec identification de leurs espèces-types: conséquences nomenclaturales. *Monitore Zoologico Italiano. Nuova Serie, Supplemento*. 15, No. 13: 225-284.
- Dubois A. 1987 “1985”.** Miscellanea taxinomica batrachologica (I). *Alytes* 5: 7–95.

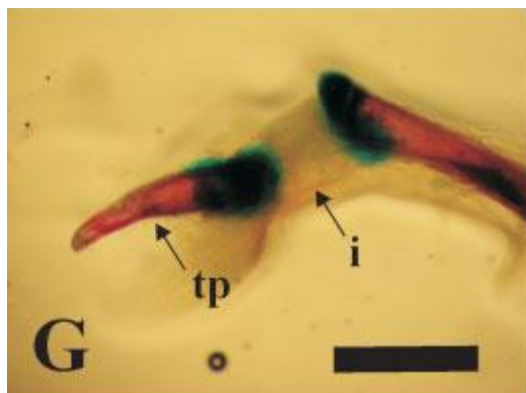
- Dubois A. 1992.** Notes sur la classification des Ranidae (Amphibiens Anoures). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* 61: 305–352.
- Emerson S.B. and Diehl D. 1980.** Toe pad morphology and mechanisms of sticking in frogs. *Biological Journal of the Linnean Society* 13: 199–216.
- Emerson S.B., Richards C.M., Drewes R.C. and Kjer K.M. 2000.** On the relationships among ranoid frogs: a review of the evidence. *Herpetologica* 56: 209–230.
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B, De Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy Ch.J., Campbell J.A., Blotto B.L., Moler P., Drewes R.C., Nussbaum R. A., Lynch J.D., Green D.M. and Wheeler W. C. 2006.** The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. no. 297.
- Frost D.R. 2007.** *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.1 (10 October, 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.)
- Günther A. 1858.** *Catalogue of the Batrachia Salientia in the collection of the British Museum*. Brit. Mus., London, XVI+160 pp., 12 pls.
- Hanna G. and Barnes W.J.P. 1991.** Adhesion and detachment of the toe pads of tree frogs. *Journal of Experimental Biology* 155: 103–125.
- Largen M.J. and Dowsett-Lemaire F. 1991.** Amphibians (Anura) from the Kouilou river basin, République du Congo. *Tarauco Research Report* 4: 145–168.
- Laurent R.F. 1984.** La phylogénese des Ranoidea et le cladisme. *Alytes* 3: 97–111.
- Laurent R.F. 1986.** *Sous classe des lissamphibiens (Lissamphibia)*. In P. Grassé and M. Delsol (editors), *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie*, vol. 14. Batraciens, fasc. 1-B: 594–797. Paris: Masson.
- Liem S.S. 1970.** The morphology, systematics, and evolution of the old world treefrogs (Rhacophoridae and Hyperoliidae). *Fieldiana* 57: 1–145.

- Lötters S., Rödel M.-O. and Burger M. 2005.** A new large treefrog from north-western Gabon (Hyperoliidae: *Leptopelis*). *Herpetological journal*, Vol. 15: 149-152.
- Manzano A.S., Fabrezi M., and Vences M. 2007.** Intercalary Elements, Treefrogs, and the Early Differentiation of a Complex System in the Neobatrachia. *The Anatomical record* 290: 1551–1567.
- Mc Allister W. and Channing A. 1983.** Comparison of toe pads of some southern African climbing frogs. *S. Afr. Tydskr. Dierk.* 18: 110–114.
- Noble G.K. 1931.** *The biology of the amphibians*. New York: McGraw-Hill. vii1577 p.
- Odierna G., Aprea G., Andreone F., Böhme W., Vences M. 2007,** Cytosystematics of hyperoliid frogs: Phylogeny of *Heterixalus*, low karyotypic variability in hyperoliines and separate phylogenetic position of *Leptopelis*. *Italian Journal of Zoology* 74: 71–81.
- Paukstis G.L. and Brown L.E. 1987.** Evolution of the intercalary cartilage in Chorus frogs, genus *Pseudacris* (Salientia: Hylidae). *Brimleyana* 13:55–61.
- Paukstis G.L. Brown L.E. 1991.** Evolutionary trends in the morphology of the intercalary phalanx of anuran amphibians. *Canadian Journal Zoology* 69: 1297-1301.
- Posada, D., Crandall, C.A., 1998.** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Pickersgill M. 2007.** *Frog Search: Results of Expeditions to Southern and Eastern Africa from 1993-1999*. Edition Chimaira, Frankfurt am Main.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Rödel M.-O. 2000.** Herpetofauna of West Africa, *Vol. I Amphibians of the West African Savanna*. Chimaira. 332 pp.
- Schiøtz A. 1999.** *Treefrogs of Africa*. Frankfurt/Main: Chimaira.
- Scott E. 2005.** A phylogeny of ranid frogs (Anura: Ranoidea: Ranidae), based on a simultaneous analysis of morphological and molecular data. *Cladistics* 21: 507–574.

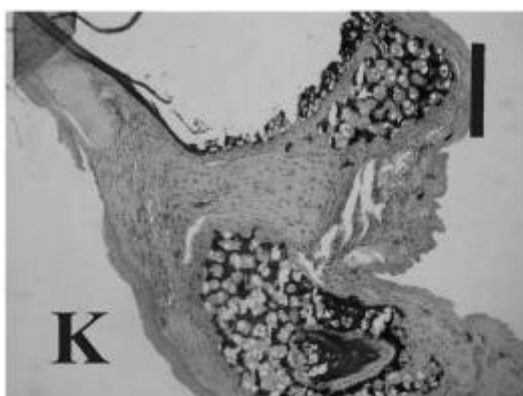
- Swofford, D.L., 2002.** PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- van der Meijden A., Vences M. and Meyer A. 2004.** Novel phylogenetic relationships of the enigmatic brevicipitine and scaphiophrynine toads as revealed by sequences from the nuclear Rag-1 gene, *Proceedings - Royal Society of London. Biological sciences* vol. 271, pp. S378-S381.
- van der Meijden A., Vences M., Hoegg S., Boistel R., Channing A. and Meyer A. 2007.** Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) and a discussion of competing hypothesis concerning their biogeographical origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(3): 1017–1030.
- Vences M., Kosuch J., Glaw F., Böhme W. & Veith M. 2003a.** Molecular phylogeny of hyperoliid treefrogs: biogeographic origin of Malagasy and Seychellean taxa and reanalyses of familial paraphyly. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* 41: 205–215.
- Vences M., Vieites D.R., Glaw F., Brinkmann H., Kosuch J., Veith M. and Meyer A. 2003b.** Multiple overseas dispersal in amphibians. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 2435–2442.
- Wheeler W.C., Gatesy J. and DeSalle R. 1995.** Elision: A method for accomodating multiple molecular sequence alignments with alignment-ambiguous sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 1-9.
- Wilkinson J.A. and Drewes R.C. 2000.** Character assessment, genus level boundaries, and phylogenetic analyses of the family Rhacophoridae: A review and present day status. *Contemporary Herpetology* 2:1-24.

8. Přílohy

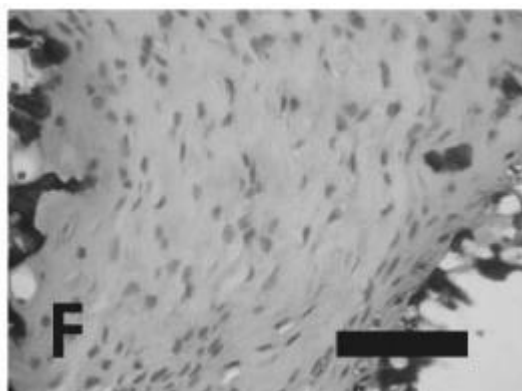
Příloha 1: Struktura vmezeřených prstových elementů.



Obr. 11: *Leptopelis christyi*, vmezeřený prstový element. i, vmezeřený prstový element (intercalary element); tp, poslední článek (terminal phalanx). Měřítko = 1 mm. (Manzano a kol. 2007).



Obr. 12: *Leptopelis christyi*, histologický řez vmezeřeným prstovým elementem (Manzano a kol. 2007).



Obr. 13: *Leptopelis christyi* pojivová tkáň (Manzano a kol. 2007).

Příloha 2: Tabulka sledovaných znaků u druhů rodu *Leptopelis*. Plovací blány: 0 – redukované, 1 – vyvinuté; pektorální žlázy samců: 0 – nepřítomny, 1 – přítomny; hlas: 1 – klapot (clack), 2 – bzukot (buzzing), 3 – waab, 4 – kvákání (quack); biotop: 1 – les, 2 – savanna; tympanum (bubínek). 1 – malý, 2 – velký.

Druh	Plovací blány	Pektorální žlázy samců	Hlas	Tympanum	Biotop
<i>Leptopelis argenteus</i>	0	0	1	1	2
<i>Leptopelis barbouri</i>	0	1	2	1	1
<i>Leptopelis bocagei</i>	0	1	3	2	2
<i>Leptopelis flavomaculatus</i>	1	1	1	2	1
<i>Leptopelis kivuensis</i>	0	1	1	1	1
<i>Leptopelis modestus</i>	0	1	1	1	1
<i>Leptopelis natalensis</i>	0	1	4	1	1
<i>Leptopelis oryi</i>	0	0	1	1	2
<i>Leptopelis palmatus</i>	1	1	1	2	1
<i>Leptopelis parkeri</i>	1	0	2	1	1
<i>Leptopelis uluguruensis</i>	0	0	1	1	1
<i>Leptopelis vermiculatus</i>	1	1	1	2	1
<i>Leptopelis viridis</i>	0	1	1	2	2