

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Larvální vývoj pipy malé (*Pipa parva*)

Vedoucí bakalářské práce: doc. Mgr. Michal Berec, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Lucie Berdychová

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie BERDYCHOVÁ**
Osobní číslo: **Z16128**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Larvální vývoj pipy malé (*Pipa parva*)**
Zadávající katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracování dosavadních údajů o larválním vývoji žab
2. Založení odchovného zařízení pro pipu malou
3. Sledování morfologických a časových aspektů vývoje larev pipy malé ve standardizovaných podmínkách
4. Vyhodnocení výsledků
5. Srovnání vlastních výsledků s informacemi o larválním vývoji žab čeledi Pipidae z literárních zdrojů

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 30

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

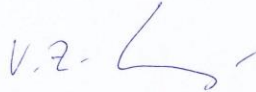
Sokol, O. M. (1977). The free swimming *Pipa* larvae, with a review of pipid larvae and pipid phylogeny (Anura: Pipidae). *Journal of Morphology*, 154(3), 357-425. Rabb, G. B., & Snedigar, R. (1960). Observations on breeding and development of the Surinam toad, *Pipa pipa*. *Copeia*, 1960(1), 40-44. Maglia, A. M., Pugener, L. A., & Trueb, L. (2001). Comparative development of anurans: using phylogeny to understand ontogeny. *American Zoologist*, 41(3), 538-551. Fernandes, T. L., Antoniazzi, M. M., Sasso-Cerri, E., Egami, M. I., Lima, C., Rodrigues, M. T., & Jared, C. (2011). Carrying progeny on the back: reproduction in the Brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. *South American Journal of Herpetology*, 6(3), 161-176.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Michal Berec, Ph.D.


Katedra biologických disciplin

Datum zadání bakalářské práce: 2. března 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2019


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Budejovická 1501, 370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 2. března 2018

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 zemědělskou fakultou - 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.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Michal Berecovi, Ph.D. za trpělivost a pomoc při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala Jiřímu Doxanskému za zapůjčení dospělých jedinců pipy malé pro můj experiment. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat přátelům a rodině za podporu při psaní této práce, ale i v průběhu studia.

Abstrakt

Tato práce vznikla za účelem pozorování časových a morfologických aspektů larválního vývoje druhu pipy malé (*Pipa parva*). Přestože je tento druh zajímavý z hlediska jeho rozmnožování, a to konkrétně unikátním rozmnožovacím módem a parentální péčí, samotná dynamika larválního vývoje však nebyla u tohoto druhu dosud zkoumána. Tento fakt se tedy stal hlavním důvodem výběru pipy malé pro mou studii. Larvy byly chovány ve stejných podmínkách a rozděleny dle data narození do 4 krabiček. Sledováním dílčích aspektů vývoje bylo zjištěno, že jednotlivé larvy se vyvíjí pod kůží samice po dobu 24 dní a průměrně se z jedné snůšky vylíhne 19 larev. Dále, že larvy ihned po vykulení dosahují průměrné délky 14,1 mm a nacházejí se v 49. – 50. vývojové fázi. Začátku metamorfózy dosahují larvy průměrně v 82. den života a v tuto dobu měří v průměru 49,8 mm. Po metamorfóze dosahují jedinci průměrné velikosti 16,7 mm. Jedinci dokončují metamorfózu průměrně 100. den života. Statistickým testováním pak bylo zjištěno, že celkové množství chovaných larev nemá vliv na jejich počáteční velikost, nicméně ale ovlivňuje rychlost vývoje. Literární přehled byl tvořen pro rozmnožování a larvální vývoj žab. Tato práce by tedy mohla pomoci při chovu a odchovu jedinců pipy malé (*Pipa parva*).

Klíčová slova: žáby, rozmnožování, larvální vývoj, *Pipa parva*

Abstract

This thesis was created for the purpose to observing the time and morphological aspects of *Pipa parva* larval development. Despite the fact that this species is very interesting because of breeding, concretely with its unique reproductive mode and parental care the dynamics of larval development wasn't observe yet. This fact became the main cause why I choosed *Pipa parva* for my study. The larvae was kept in the same conditions and divided in 4 boxes. By monitoring partial aspect of larvae development was observed, that larvae was developed under skin of female's back for 24 days and average number of larvae is 19. The larvae after their hatch measures 14,1 mm long and its in 49. – 50. phase of larvae development. The metamorphosis starts at 82. day and the larvae at this time measure average 49,8 mm. After methamorphosis the average lenght is 16,7 mm. The end of the methamorphosis of every individual is avarage at 100th day of the live of larvae. It was found by statistics method that overall amount of larvae has not effect on their size after hatch but it has effect for developmment speed. Literary rewiew was written for breeding of frogs and for their larval development. This thesis might help with breeding *Pipa parva*.

Key words: frogs, breeding, larval development, *Pipa parva*

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární rešerše	10
2.1. Rozmnožovací módy žab	10
2.2. Rodičovská péče	11
2.2.1. Rodičovská péče v Pipidae.....	11
2.3. Rozmnožovací chování.....	12
2.4. Larvální vývoj	13
2.5. Další druhy s mobilní parentální péčí	14
3. Metodika	17
3.1. Materiál	17
3.2. Založení odchovného zařízení.....	17
3.2.1. Experiment	18
3.2.2. Měření larev	18
3.2.3. Skupiny pulců.....	19
3.2.4. Vývojová tabulka.....	19
3.3. Statistické vyhodnocení	22
4. Výsledky	23
4.1. Velikost snůšky	23
4.2. Délka vývoje pod kůží samice.....	23
4.3. Průběh vývoje.....	24
5. Diskuse.....	30
6. Závěr	33
7. Zdroje.....	34

1. Úvod

Čeď pipovitých zahrnuje celkem pět rodů (*Hymenochirus*, *Pipa*, *Pseudhymenochirus*, *Silurana* a *Xenopus*) obývajících území Afriky a Jižní Ameriky (Frost, 2011). Všechny tyto rody jsou výhradně vodní (Maglia *et al.*, 2001) a mají tedy značné adaptace pro život ve vodě. Jejich tělo je výrazně dorzoventrálně zploštělé a na zadních nohou se vyskytují mohutné plovací blány. Oči mají velice malé a dorzálně umístěné. U většiny rodů z této čeledi chybí oční víčko. V celé čeledi pipovitých dále chybí jazyk a pro přijímání potravy využívají hydro-branchiální „pumpu“ (Cannatella & Trueb, 1988) a přední končetiny. Nejzajímavější adaptací je v této čeledi ale naprosto unikátní rozmnožovací mód a s tím související péče o potomstvo, který můžeme pozorovat u rodu *Pipa*.

U rodu *Pipa* můžeme pozorovat speciální typ mobilní péče o potomstvo, kdy samice uchovává vajíčka v kožní řase na zádech. Stejně jako u ostatních typů rodičovské péče slouží tento mobilní typ péče na ochranu vajíček. V případě vodních žab pravděpodobně zejména jako ochrana před predátory. (Fernandes *et al.*, 2011). Je překvapující, že přes dlouhou známost zvláštností rozmnožování pip byla dosud věnována pozornost jen několika málo druhům.

Cílem mé práce je přiblížit časové a morfologické aspekty larválního vývoje, z reprodukčního hlediska dosud nezkoumaného druhu pipy malé (*Pipa parva*), která má unikátní rozmnožovací mód a péči o potomstvo.

2. Literární rešerše

2.1. Rozmnožovací módy žab

U žab můžeme pozorovat největší diverzitu rozmnožovacích módů. Většina z těchto módů se odehrává ve vodě, ale jsou zde i výjimky. V případě těchto výjimek se jedná buď o částečné, nebo plně terestrické rozmnožovací módy. Ty pak najdeme spíše v tropických oblastech, kde je vyšší vzdušná vlhkost. Z tohoto důvodu nedochází k vysoušení vajíček, což je důležité, protože vajíčka žab vyžadují ke svému vývoji vlhko (Vitt & Caldwell, 2014).

Rozmnožovací módy žab jsou tedy zpravidla děleny do několika kategorií (3). Rozhodující při tomto rozdělení je místo, kde jednotlivé druhy kladou svá vajíčka a dále, kde se samotná snůška vyvíjí. Tyto kategorie se vnitřně dále dělí a umožňují tím více specifikovat daný rozmnožovací mód (Crump, 2015; Vitt & Caldwell, 2014). Vzhledem k obsáhlosti těchto kategorií jsem se rozhodla jen pro zjednodušený přehled dělený pouze na základní kategorie a podkategorie.

První z kategorií rozmnožovacích módů zahrnuje druhy, u kterých se vývoj vajíček uskutečňuje ve vodě. Dále se tato kategorie dělí následovně:

- A – druhy kladoucí svá vajíčka do vody
 - B – vajíčka jsou kladena do bublinového pěnového hnízda
 - C – vajíčka jsou kladena do pěnového hnízda
 - D – vajíčka se vyvíjejí pod kůží samice
- (Vitt & Caldwell, 2014; Wells, 2007).

Ve druhé kategorii rozmnožovacích módů můžeme nalézt druhy s preferencí kladení vajíček na souš. A to například do hlíny, na břehy či na stromy nebo listy. Dělení na další podkategorie je tedy následovné:

- E – vajíčka jsou kladena na zem, kameny či do dř
 - F – vajíčka jsou kladena na stromy
 - G – vajíčka jsou kladena do pěnového hnízda umístěného na zemi či na stromě
 - H – vajíčka jsou přenášena dospělými jedinci
- (Vitt & Caldwell, 2014; Wells, 2007).

Poslední, třetí skupinu, zahrnují druhy, které jsou schopny zadržet svá vajíčka ve vaječnicích. Jejich vývoj tedy probíhá tam (Vitt & Caldwell, 2014).

2.2. Rodičovská péče

Rodičovskou péči o potomstvo můžeme pozorovat napříč celou živočišnou říší. Lze ji definovat jako jakoukoli pomoc nebo péči rodičů o své potomky, která pomáhá znásobit jejich šanci na přežití (Trivers, 1972). Konkrétně u žab tato péče zahrnuje jak starost o snůšku, její okysličování a ošetřování či obranu před nepřáteli, tak transport vajíček či larev na jiné místo. V neposlední řadě také krmení larev (Duellman & Trueb, 1986).

Celkově lze péči o potomstvo pozorovat u malého množství druhů žab. Jedná se o hodnotu kolem 10 % napříč všemi druhy žab (Duellman & Trueb, 1986). Někteří autoři dokonce uvádějí hodnotu ještě menší, a to kolem 6 % (Vitt & Caldwell, 2014).

Způsobů péče rodičů o potomstvo existuje nepřeborné množství. Celkem rozeznáváme 12 kategorií péče o potomstvo. Toto rozdělení závisí na místě, kde je jednotlivá snůška nakladena. Dále místo, kde dochází k rodičovské péči, a to například ve hnízdě či přímo na rodiči. Dalším aspektem, ke kterému se přihlíží při zařazování je místo, kde se vyvíjí larvy. Posledním aspektem je pak pohlaví rodiče, který se stará o mláďata (Wells, 2007).

2.2.1. Rodičovská péče v Pipidae

V čeledi Pipidae můžeme pozorovat speciální typ mobilní rodičovské péče o potomstvo. Rod *Pipa* si vyvinul unikátní způsob transportu vajíček pod kůži (Duellman & Trueb, 1986). U některých druhů (*P. carvalhoi*) byl zaznamenán výskyt v oblastech s dlouhými periodami sucha. Jedinci je pak přečkávali zahrabaní ve vlhké hlíně u krajů vodních ploch (Weygoldt, 1976). V tomto případě je tento typ parentální péče důležitý pro zabránění vysušení vajec. Dále usnadňuje migraci nových jedinců z jedné nádrže do druhé, což napomáhá i šíření genů (Fernandes *et al.*, 2011). Vedle ochrany vajíček umožňuje umístění pod kůži i samotnou péči o ně. Díky velkému výskytu cév v okolí zahnížděných vajíček je umožněno značné prokrvení této oblasti (Fernandes *et al.*, 2011). Z tohoto důvodu je zajištěno rovnoměrné okysličování celé snůšky.

Čeď Pipidae lze rozdělit z hlediska rozmnožovacích módů na dvě skupiny. Rody pocházející ze starého světa kladou vejce přímo do vody, kde larvy po vylíhnutí dokončují svůj vývoj (Fernandes *et al.*, 2011). Do druhé skupiny lze zařadit rod *Pipa*. U tohoto rodu jsou vajíčka deponována do kožní řasy na zádech samice, kde se vyvíjejí a opouštějí ji buď jako larvy, nebo jako metamorfované žáby (*Pipa pipa*) (Rabb and Rabb, 1960).

Většina pipovitých se rozmnožuje kontinuálně (Sughrue, 1969; Weygoldt, 1976), ale výjimku tvoří *Pipa pipa*. Její rozmnožovací cyklus proběhne pouze jednou za rok (Rabb & Snedigar, 1960).

2.3. Rozmnožovací chování

Samci pipovitých, stejně jako samci zástupců jiných čeledí žab, mezi sebou bojují o samice. U čeledi pipovitých však navíc dochází k větší komunikaci mezi jednotlivci. A to v podobě různých klapavých a praskavých zvuků, a dále zvuků připomínajících klikání. (Rabb & Rabb, 1963). Tyto zvuky samci používají i při komunikaci se samicemi (Rabb & Snedigar, 1960). Zatímco při soubojích jsou tyto zvuky buď v podobě samotného „kliknutí“ či jejich velice rychlém sledu (Rabb & Rabb, 1963), u námluv se jedná o dobu 4 vteřin v časovém intervalu 10-20 vteřin (Rabb & Snedigar, 1960).

Signál, kdy je samice připravena k vypuštění svých vajíček, představuje její kloaka. Je oteklá, načervenalá a získává tvar jakéhosi kanálu. V této době dochází k amplexu (Fernandes *et al.*, 2011; Duellman and Trueb, 1986).

Během rozmnožování si rody *Pipa*, *Hymenochirus* a *Pseudohymenochirus* vyvinuli speciální komplex dvoření (Fernandes *et al.*, 2011). Tento komplex se skládá z podvodního tance, při kterém pár spojený v amplexu opakuje akrobatické obraty a zároveň plave ode dna vzhůru a zpět (Rabb & Rabb, 1963; Duellman & Trueb, 1994). U rodu *Pipa* dochází při podvodním tanci k oplodnění a uložení vajíček pod kůži. Při klesání uvolňuje samice vajíčka samečkovi pod břicho. Samec zároveň uvolní přední nohy a umožní tak umístění vajec mezi ním a zády samice. Samec pak zatlačuje vajíčka do naběhlé kůže samice (Fernandes *et al.*, 2011). Zduření kůže na zádech samice je patrné již 3 hodiny od začátku amplexu (Rabb & Rabb, 1963).

2.4. Larvální vývoj

K zapouzdření vajec pod kůži dochází za 24 hodin od deponace samcem. Zde se vyvíjejí až do podoby larev či žab. (Fernandes *et al.*, 2011). Tato doba se u jednotlivých druhů liší. Například larvy *Pipa carvalhoi* se pod kůží vyvíjí po dobu 14-21 dní (Fernandes *et al.*, 2011) zatímco u *Pipa parva* je to po dobu 30 dní. (Sughrue, 1969). U druhu *Pipa pipa* je délka vývoje v rozmezí 76-136 dnů (Rabb & Snedigar, 1960). Tato doba se zde odvíjí od kompletního vývoje až po metamorfózu pod kůží samice a je tedy i výrazně delší než u ostatních druhů z rodu *Pipa*. Odlišná je i velikost vajíček. U *P. carvalhoi*, *P. myersi* a *P. parva* (Fernandes *et. al.* 2011; Trueb & Cannatella, 1986), které mají larvy dokončující svůj vývoj ve vodě, jsou vajíčka malé velikosti (Garda *et al.* 2006). Naproti tomu vajíčka druhů s úplným vývojem larev pod kůží samice, *P. arrabali*, *P. pipa* a *P. snethlageae* (Trueb & Cannatella, 1986; Garda *et al.*, 2006; Wells, 2010) jsou daleko větší a disponují daleko větším podílem žloutku.

Během období zapouzdřování vajec dochází ke dramatickým změnám ve struktuře kůže samice. Ta se stává daleko ohebnější a poddajnější. To usnadňuje zahrnutí vajec a zajišťuje tak i lepší vývoj embryí. Na těchto změnách se podílejí i biochemické signály (Fernandes *et al.*, 2011).

Po uplynutí doby vývoje v těle samice dochází k vykolení jednotlivých larev. Larvy se ihned po narození nacházejí v 50. fázi vývoje (Nieuwkoop & Faber, 1994; Sokol, 1977) a dosahují délky 11–12 milimetrů (Sokol, 1977). Svůj vývoj dále dokončují v tůních či rybnících.

Vzhledem k tomu, že zde byl zatím probíráán pouze vývoj vajíček pod kůží samice, je nutné nastínit i vývoj u rodů, které kladou vajíčka přímo do vody, případně je lepí na rostliny. Jedná se tedy o například o rod *Xenopus*. Zde tedy dochází, jak už bylo řečeno v předchozí kapitole, k oplodnění vajíček při podvodním tanci. Nicméně nedochází k jejich deponaci do kožní řasy na zádech samice. Pár, spojený v amplexu, za sebou tedy zanechává jakousi „cestu“ z vajíček, která se dále volně vyvíjejí ve vodě (Wu & Genhart, 1991). Metamorfóza samotných larev začíná v rozmezí 2-3 měsíců od naklazení snůšky (Wu & Genhart, 1991).

Larvy pipovitých jsou býložravé a mají vyvinutý speciální filtrační aparát pro filtrování potravy z vodního sloupce. Jednotlivé filtrační aparáty se však mezi rody

liší. Extrémní odlišnosti ve filtračním aparátu lze pozorovat mezi rody *Xenopus* a *Pipa*. Tyto odlišnosti jsou patrně dány konkurencí mezi jednotlivými larvami (Sokol, 1977).

U rodu *Pipa* je filtrační aparát částečně zredukován. Touto redukcí je umožněna filtrace částic o velikosti 20 a více mikronů, které jsou daleko větší než filtrační póry. Chybí zde speciální tkáň nacházející se v hltanu (Wassersug & Rosenberg, 1979; Sokol 1977). Tato tkáň má za úkol zachytávat částičky potravy ve své sliznici a funguje tedy jako „past“ (Wassersug & Rosenberg, 1979). Jako hlavní orgán na získávání potravy zde tedy slouží celý epitel filtračního aparátu, který díky své pevnosti funguje jako síto (Sokol, 1977).

Larvy rodu *Xenopus* využívají filtraci mikročástic. Dochází tedy k využití částečně zredukovaných branchiálních „pastí“. Dále zde došlo k redukcii přední filtrační chlopně (Sokol, 1977).

Výjimku z celé čeledi pipovitých zaujímá rod *Hymenochirus*. Larvy z tohoto rodu jsou dravé. Postrádají tedy celý filtrační aparát a mají odlišný tvar ústního otvoru uzpůsobený pro příjem živé potravy (Sokol, 1977).

2.5. Další druhy s mobilní parentální péčí

Vedle rodu *Pipa* existují i další rody s mobilní parentální péčí o potomstvo. Prvním z těchto rodů, je rod *Alytes* z čeledi Discoglossidae. Vajíčka u tohoto rodu jsou umístěna na jedné delší šňůře. Po jejich oplodnění si je samec namotává na zadní končetiny (Duellman & Trueb, 1986). Takto vajíčka nosí na svých zadních končetinách po dobu jednoho měsíce (Wells, 2007). Najednou je schopen nosit až 3 šňůšky a někteří samci dokonce nosí až 100 vajíček (Wells, 2007). Vajíčka také příležitostně namáčí v různých tůních, aby zabránil jejich vysušení. V případě, že jsou vajíčka připravena k líhnutí, posadí se samec do vody, a umožní tak bezpečné vylíhnutí pulců (Boulenger 1912; Lopez-Jurado, Caballero, & DosSantos Freitas 1979; Crespo 1982; Duellman & Trueb, 1986; König & Schlüter 1991; Márquez & Verrell 1991; Márquez 1992).

Mezi druhy s rozhodně nejbizarnější parentální péčí se řadí *Rheobatrachus silus* a *Rheobatrachus vitellinus* (Wells, 2007). Samice zde zkonzumuje svá vajíčka, která se dále vyvíjí v žaludku. Larvální vývoj se také uskutečňuje v žaludku samice (Corben *et al.*, 1974; McDonald & Tyler 1984; Leong *et al.*, 1986). Po skončení celkového

vývoje se metamorfované žabky dostávají na svět ústním otvorem samice (Tyler & Carter 1981). Oba druhy, jak *Rheobatrachus silus*, tak *Rheobatrachus vitellinus*, jsou dnes s největší pravděpodobností vyhynulé.

Nejvíce charakteristickou skupinou, hned vedle čeledi Pipidae, co se týče přesunu vajíček, je čeleď Hemiphractidae (Duellman, 2015; Wells, 2007). V celé této čeledi nosí vajíčka na svých zádech samice. Nicméně způsoby přenosu a struktura vaků na vajíčka u jednotlivých rodů z této čeledi je odlišná (Wells, 2007). Co se týče embryí napříč čeledí Hemiphractidae, tak mají značné adaptace pro pobyt v zádočných vacích. Vyvinula si speciální žebra zvonovitého tvaru, která umožňují zvětšení plochy na výměnu plynů. V několika případech dokonce obklopují celé embryo ve vajíčku (Duellman, 2015).

Celou čeleď Hemiphractidae můžeme rozdělit z hlediska toho, jaké aspekty rodičovské péče mají jednotlivé rody společné (Wells, 2007).

První skupina zahrnuje celkem tři rody. Jedná se o žáby s terestrickými rozmnožovacími mody. Společným znakem této skupiny jsou velká vajíčka, která vozí samice na zádech. Tato vajíčka jsou naprosto nechráněná a nejsou tedy umístěna v žádných vacích (Duellman 1970; Trueb 1974; Duellman & Hoogmoed 1984; Jungfer & Boehme 1991; Crump 1995). Na zádech samice patrně drží díky hlenu, který samice produkuje v oviduktech (Pino, 1980; Weygolt & Carvalho e Silva, 1991).

Konkrétními rody v první skupině jsou:

- *Cryptobatrachus*
- *Hemiphractus*
- *Stefania*

U všech z těchto rodů z první skupiny dochází k přímému vývoji vajíček, a tedy k vykulení metamorfovaných jedinců (Wells, 2007). V rodu *Stefania* navíc potomci po vykulení zůstávají na zádech matky a dochází tedy k pokračování parentální péče (Gorzula *et al.*, 1983; Jungfer & Boehme 1991)

Druhá skupina zahrnuje rod s rozmnožovacím modelem, který se odehrává na stromech. Jedná se o rod *Flexonotus* (Wells, 2007). V tomto rodu jsou vajíčka přenášena v dorzálním vaku s otevíráním uprostřed (Duellman & Gray, 1983). Výjimku tvoří *Flexonotus goeldii* a *Flexonotus ohausi*. U těchto druhů nejsou vajíčka umístěna

v žádných vacích, nýbrž v jakési kožní ohrádce (Del Pino 1980; Weygoldt & Carvalho e Silva 1991).

Přestože společným znakem rodu *Flexonotus* je přenášení vajíček ve vacích, u jednotlivých druhů můžeme pozorovat různé odlišnosti ve struktuře těchto vaků. Například druh *Flexonotus fissilis* má vaky, které jsou uprostřed spojené lepivým sekretem. Naproti tomu druhy *Flexonotus pygmaeus* a *Flexonotus Fitzgeraldi* disponují vaky, které jsou z hlediska jejich struktury nejdokonalejší. Jsou totiž zcela uzavřené a bez jakéhokoli viditelného spoje (Wells, 2007).

Do poslední skupiny se řadí rod *Gastrotheca*. Jedná se o skupinu zahrnující druhy s terestrickým či rozmnožovacím modem, co se odehrává na stromech (Duellman & Fritts 1972; Duellman 1974; Duellman & Hillis 1987). Stejně jako u rodu *Flexonotus* (Duellman & Maness 1980) nebo *Pipa*, samec zamačkává vajíčka do zad samice. Vajíčka druhů z rodu *Gastrotheca* jsou zcela uzavřené ve vacích. Tyto vaky navíc mají pouze malý otvor umístěný v zadní části (Wells, 2007). Další specifickou vlastností těchto vaků je výrazné prokrvení, které usnadňuje okysličování vajíček (del Pinto, 1980; Duellman, 2015).

Téměř polovina druhů z rodu *Gastrotheca* má přímý vývoj vajíček. V případě druhé poloviny druhů se z vajíček vyvíjí larvy (Fitzgerald *et al.*, 1979; Wassersug & Duellman 1984; Duellman 2015). V těchto případech pak samice převáží své vylíhnuté larvy do různých louží či paždí listů bromélií (Duellman & Maness, 1980).

Se samotným převážením larev na zádech rodičů je nejčastěji spojovaná čeleď Dendrobatidae. Zde můžeme pozorovat přenášení larev na zádech samce. Navíc u této čeledi lze jako u jediné pozorovat krmení larev rodiči (Duellman & Trueb, 1986).

3. Metodika

3.1. Materiál

Dospělí jedinci pipy malé byli zapůjčeni ze Zoologické a botanické zahrady města Plzně a dále od vedoucího mé bakalářské práce, docenta Michala Berece. Nejdříve bylo zapůjčeno 6 jedinců, z toho 5 samic a 1 samec. V průběhu pokusu však došlo k úmrtí samce. Byl tedy nahrazen jiným, rovněž vypůjčeným samcem. Celkem tedy bylo na pokus zapůjčeno 7 jedinců, z toho 5 samic a 2 samci.

Chov probíhal v malých skleněných akváriích a plastových boxech, kdy každý dospělý jedinec byl umístěn odděleně v samostatné nádrži. K přesunům mezi nádržemi docházelo pouze v době, kdy bylo vyžadováno rozmnožování daných jedinců. V těchto případech pak byla samice přesunuta do nádrže k samci a po úspěšném rozmnožení, a následném zahnízdění vajec, opět oddělena.

Do chovných nádrží s dospělými jedinci jsem neumísťovala žádné technické vybavení jako filtraci či osvětlení. Rovněž jsem zde neumísťovala žádný substrát. Jediným prvkem v nádržích s dospělci byla měchýřka jávská (*Vesicularia dubyana*). Výměnu vody v těchto nádržích jsem prováděla podle potřeby, minimálně však jednou do týdne.

Krmení dospělých jedinců probíhalo jedenkrát za 2-3 dny. Jako krmení jsem zvolila mražené patentky, kdy každý jedinec dostal při krmení jednu kostičku.

Sběr larev pro účely pozorování aspektů vývoje probíhal kontinuálně po dobu prováděného pokusu.

Larvy byly krmeny ráno a večer rozpuštěnými spirulinovými tabletami Spirulina waffers od firmy Dajana. Na každé krmení byla rozpouštěna 1 tableta v horké vodě, a to pro snadnější rozpuštění. Pro skupinu 10 larev byl dávkován roztok o objemu 24 ml. Roztok jsem podávala stříkačkou přímo do odchovné nádrže.

3.2. Založení odchovného zařízení

Samice dospělého jedince byla po zahnízdění vajec pod kůži přesunuta do samostatné nádrže, kde byla ponechána až do vykolení larev. Tato nádrž měla objem 7 litrů. Z důvodu minimalizace konzumace narozených larev dospělými jedinci byla tato nádrž hustě osázena měchýřkou jávskou (*Vesicularia dubyana*). Z důvodu snadnějšího udržování čistoty vody nebyl použit žádný substrát. Výměna vody v nádržích byla

prováděna jednou za týden, a to za pomoci obyčejné hadice. Byla zde využita klasická kohoutková voda, kterou jsem nechala celý den odstavenou v zakryté nádobě.

Po vykulení byly larvy přesunuty do odchovných nádrží. Ty zde pak byly odchovávány v plastových boxech o objemu 3,5 litru. V těchto odchovných zařízeních jsem chovala skupiny maximálně po 10 jedincích. Z důvodu lepšího udržování čistoty jsem do nádrží nedávala žádný substrát ani rostliny. Výměna vody byla prováděna jednou za 2-3 dny v závislosti na znečištění jednotlivých nádrží. Byla zde použita voda studniční, kterou jsem vozila každý týden v kanystrech z poděvourské nebo plaské studny. Kohoutkovou vodu jsem v odchovných nádržích nepoužívala z důvodu vysoké mortality larev v této vodě. Teplota vody byla v rozmezí 22 – 25 °C. K osvětlení jednotlivých boxů bylo použito pouze denní světlo.

Po metamorfóze jednotlivých larev byli tito jedinci odebráni z odchovných boxů a přesunuti do společné nádrže.

3.2.1. Experiment

Pokus byl schválen Ministerstvem životního prostředí pod jednacím číslem 75681/2017-MZE-17214.

3.2.2. Měření larev

Měření larev bylo prováděno zezáčátku v kratších časových intervalech (3-4 dny) z důvodu předpokládaného rychlejšího vývoje. S postupem času se tento interval snížil na jedno měření týdně. Měření bylo prováděno s jednotlivými skupinkami pulců rozdělených dle data narození. Tato měření byla prováděna vždy v jednom konkrétním dnu.

Pomůcky, které jsem ke svému měření využívala byly: Petriho miska, miska, teploměr, lupa, sítko, fotoaparát mobilního telefonu, zářivka a milimetrový papír

Nejprve jsem postupně každého jedince z dané skupiny odlovila. Dále jsem ho přemístila do předem připravené Petriho misky s vodou. Petriho misku i s larvou jsem poté umístila na milimetrový papír pod rozsvícenou zářivku. U takto umístěného jedince jsem pozorovala jeho délku, a to od hlavy až k ocasu, a určila v jaké fázi vývoje se nachází. V případě určování fáze vývoje jsem se řídila dle vývojové tabulky sestavené pro druh *Xenopus laevis* (Nieuwkoop & Faber, 1994). Naměřené informace

jsem si dále zaznamenala a doplnila pořizovanou fotografií z mobilního telefonu, která sloužila k lepší přehlednosti.

Po změření jsem larvu, umístěnou v Petriho misce s vodou, vyjmula a dala do jiné nádoby. Jednalo se o malou plastovou nádobu s objemem nejvýše 0,5 l. Do této nádoby jsem pak umisťovala všechny již změřené larvy, aby nedošlo k případnému smíšení s ještě nezměřenými jedinci. Po změření celé skupinky jsem všechny larvy umístila zpět do odchovného boxu. Stejným způsobem jsem pak postupovala i s dalšími skupinami larev.

Vedle samotného měření délky těla a určování vývojové fáze dle tabulky, jsem zaznamenávala i teplotu vody z odchovného boxu. K měření teploty jsem používala obyčejný teploměr.

3.2.3. Skupiny pulců

Jednotlivé skupiny pulců, se kterými jsem pracovala, byly rozděleny dle data narození do 4 krabiček. Celkově šlo o 35 larev.

V první krabičce byli jedinci narozeni dne 16. 7. 2018. Počet larev v této krabičce byl 10 jedinců.

V druhé krabičce se nacházeli jedinci narozeni dne 15. 8. 2018. Počet larev v této krabičce byl 5. Takto nízký počet byl dán malým počtem narozených jedinců v této konkrétní snůšce.

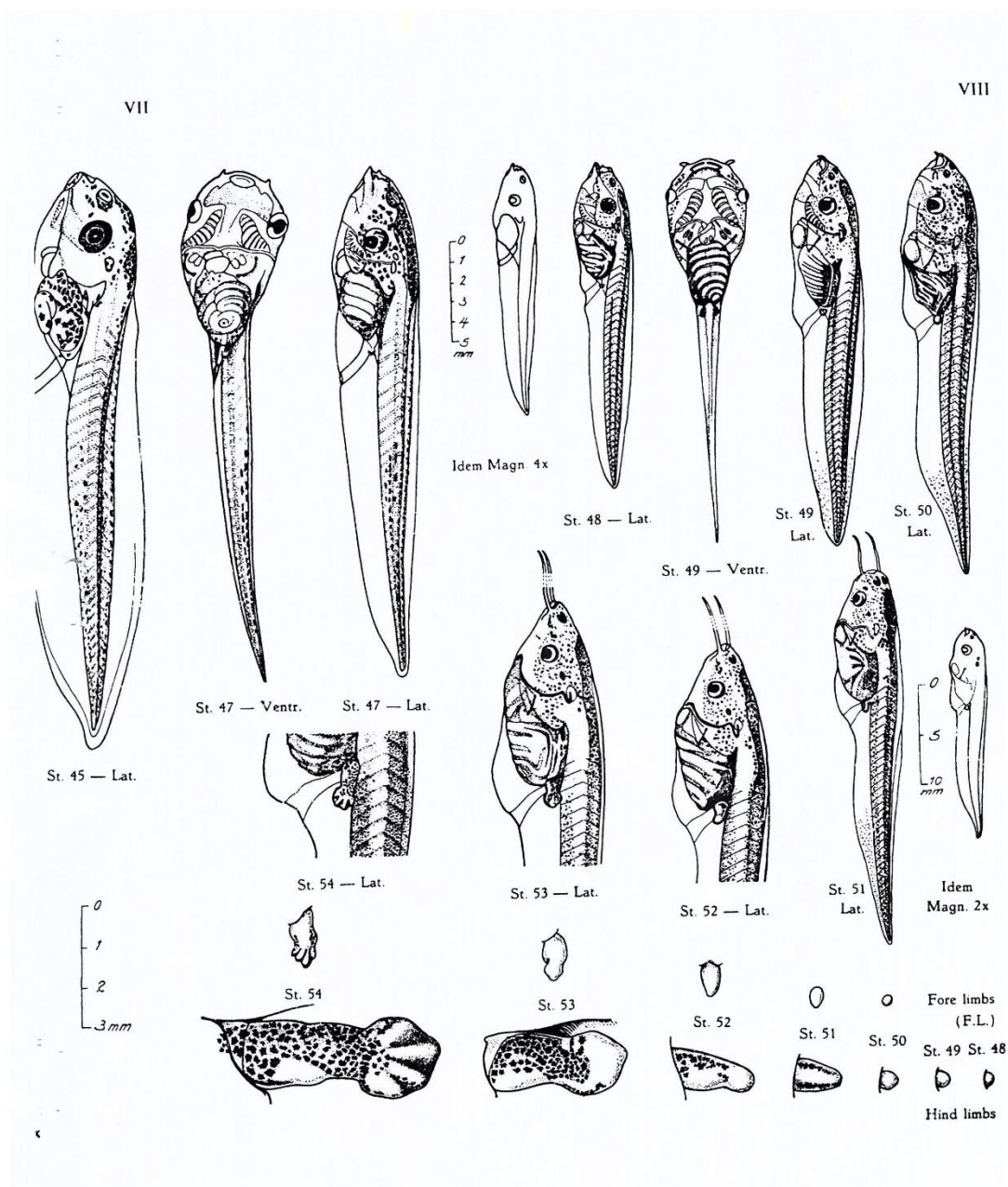
Ve třetí krabičce byly larvy narozené dne 26. 8. 2018. Počet larev v této krabičce byl 10.

V poslední, tedy čtvrté krabičce, se nacházely larvy narozené dne 29. 8. 2018. Jejich počet byl rovněž 10.

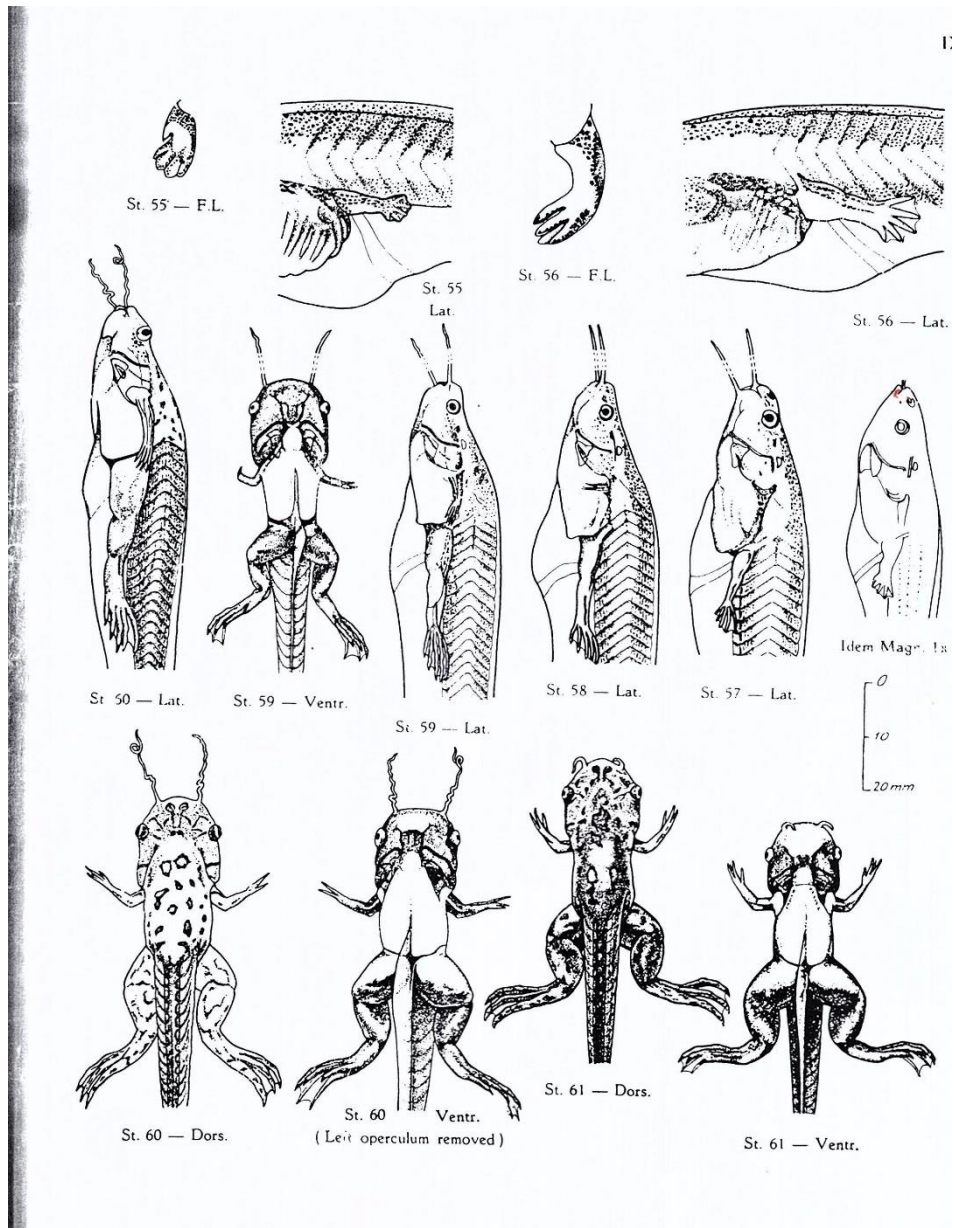
3.2.4. Vývojová tabulka

Jednotlivé fáze vývoje larev jsem určovala dle části vývojové tabulky (Obr. 1–3; Nieuwkoop & Faber, 1994). Tato tabulka byla sestavena pro vodní larvy příbuzného druhu *Xenopus laevis* a při určování jsem se tedy zabývala pouze fázemi od 49. – 66.

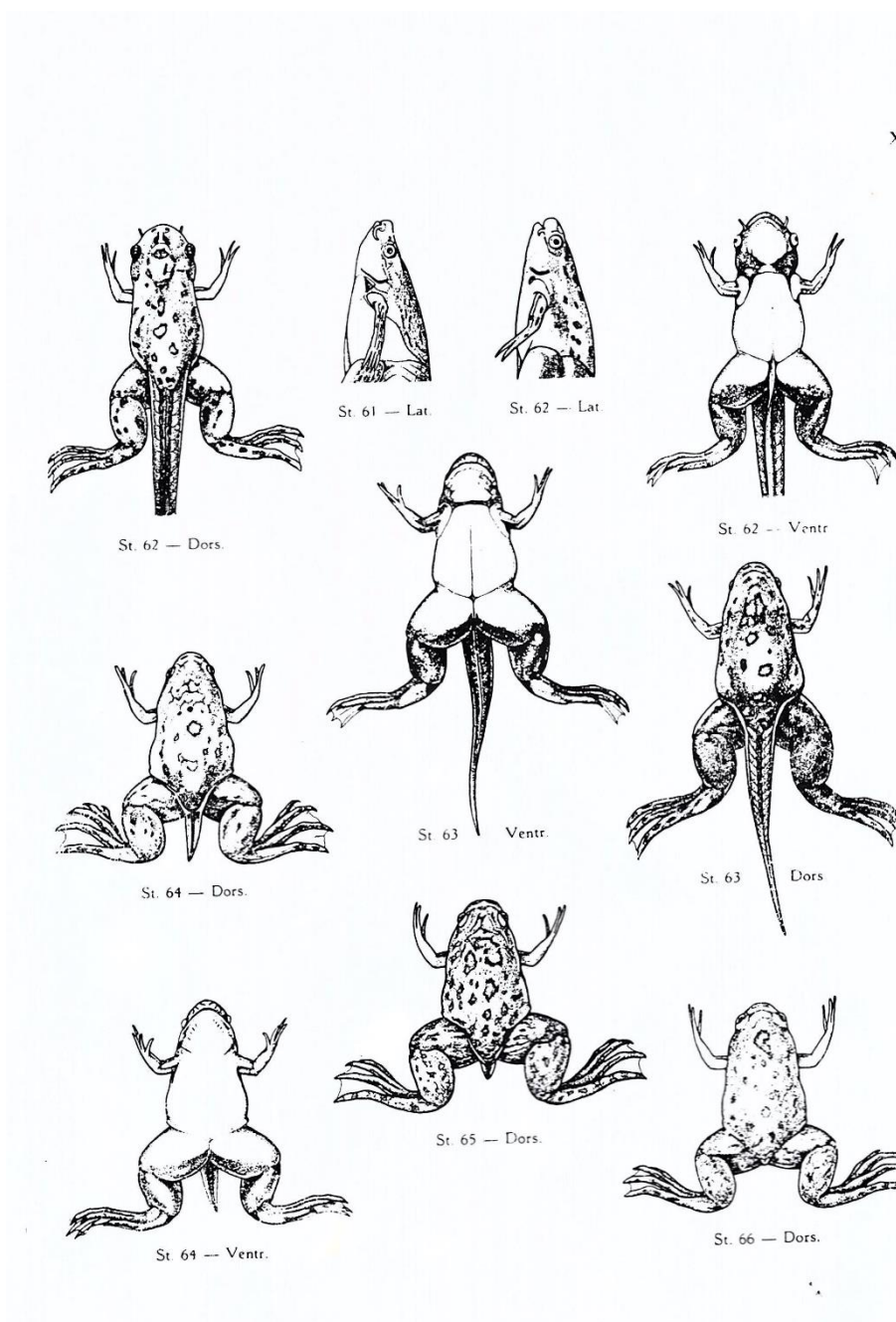
Obr. č. 1: vývojová tabulka pro druh *Xenopus laevis* (Nieuwkoop & Faber, 1994).
 Vývojové fáze 45–54.



Obr. č. 2: vývojová tabulka pro druh *Xenopus laevis* (Nieuwkoop & Faber, 1994).
 Vývojové fáze 55-61.



Obr. č. 3: vývojová tabulka pro druh *Xenopus laevis* (Nieuwkoop & Faber, 1994).
Vývojové fáze 62-66.



3.3. Statistické vyhodnocení

Vliv jednotlivých aspektů vývoje mezi krabičkami s pulci jsem testovala pomocí ANOVY v programu STATISTICA 13. Pro upřesnění výsledků jsem použila Tukeyho post-hoc test. Pro základní část vyhodnocení jsem použila Office excel 365.

4. Výsledky

4.1. Velikost snůšky

Celkem se povedlo zaznamenat množství narozených larev v 11 případech (tab. 1). Průměrný počet jedinců narozených larev je 19,45. Směrodatná odchylka průměru je 19,95.

Tabulka č. 1: velikost snůšky podle počtu narozených larev

Číslo měření	Datum vykuknutí	Počet larev
1.	14. 4. – 15. 4. 2018	7
2.	9. 5. – 10. 5. 2018	12
3.	6.6. – 10. 6. 2018	28
4.	7. 7. 2018	12
5.	13. 7. – 16. 7. 2018	55
6.	15. 8. 2018	7
7.	25. 8. 2018	2
8.	26. 8. – 29. 8. 2018	58
9.	26. 11. 2018	5
10.	27. 12. 2018	5
11.	13. – 14. 2. 2019	23

4.2. Délka vývoje pod kůží samice

Celkem jsem zaznamenala délku vývoje vajíček v kožní řase samice v 9 případech (tab. 2). Průměrná délka vývoje vajíček pod kůží samice je 24 dní. Směrodatná odchylka průměru je 4,33.

Tabulka č. 2: délka vývoje larev pod kůží samice

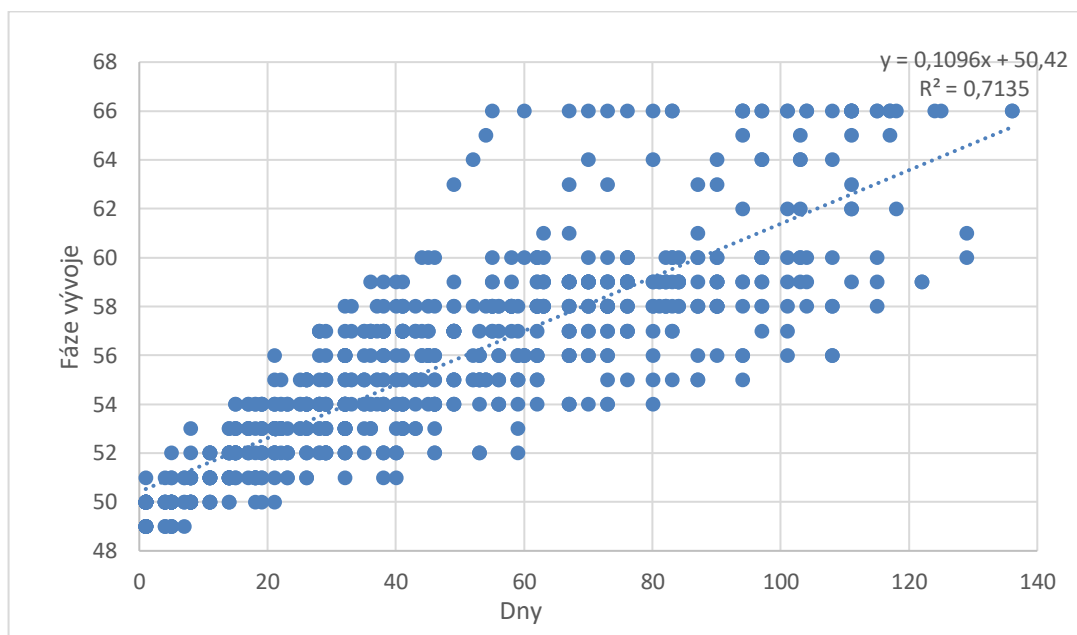
Číslo měření	Datum zahníždění vajíček pod kůží samice	Datum vykulení larev	Délka ve dnech
1.	16. 4. 2018	9. 5. – 10. 5. 2018	23–24
2.	18. 5. 2018	6. 6. – 10. 6. 2018	19-23
3.	12. 6. 2018	13. 7. – 16. 7. 2018	31-34
4.	18. 6. 2018	7. 7. 2018	19
5.	22. 7. 2018	15. 8. 2018	24
6.	4. 8. 2018	26. 8. – 29. 8. 2018	22-25
7.	4. 11. 2018	26. 11. 2018	22
8.	6. 12. 2018	27. 12. 2018	21
9.	15. 1. 2019	13. 2. – 14. 2. 2019	29-30

4.3. Průběh vývoje

Celkem se povedlo zaznamenat závislost délky vývoje larev pipy malé na jednotlivých fázích vývoje do začátku metamorfózy. A to celkem u 35 jedinců. (Graf 1). Larvy se líhnou ve 49. nebo 50. fázi vývoje. Začátku metamorfózy pak dosahují průměrně v 82. den vývoje. Směrodatná odchylka průměru je 20,86.

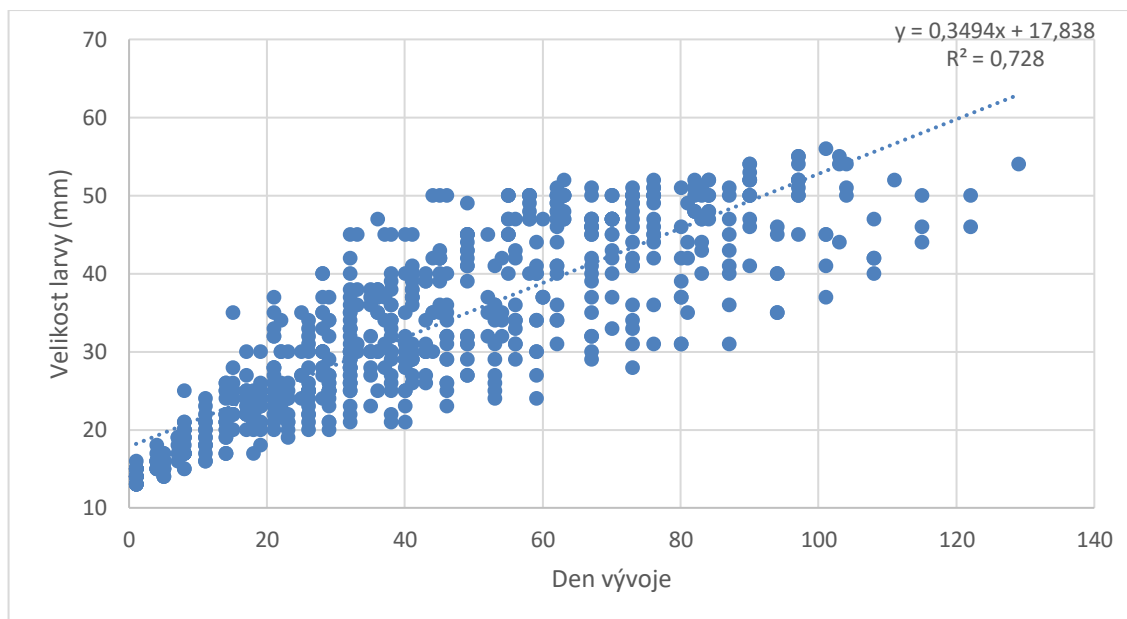
Doba, za kterou se jednotlivé larvy metamorfovaly, se velmi lišila (Graf 1). Nejrychleji dokončila larva svou metamorfózu 55. den od svého narození. Naproti tomu nejpomaleji dokončila larva svůj vývoj 136. den od svého narození. Průměrně metamorfovaly larvy 100. den od svého narození. Směrodatná odchylka z průměru je 20,1.

Graf č. 1: závislost doby vývoje larev na vývojové fázi (fáze 49–66)



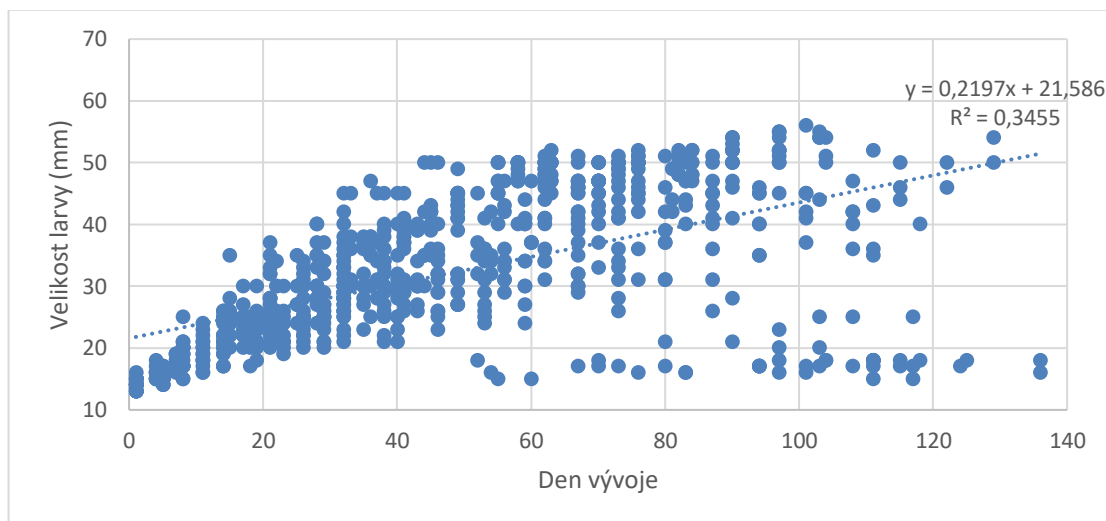
Celkem bylo zaznamenána závislost doby vývoje larev na jejich velikosti u 35 jedinců (Graf 2). Velikost larev při jejich vykulení činí průměrně 14,1 mm. Směrodatná odchylka z průměru je 0,76. Při začátku metamorfózy (viz graf 1) činí průměrná velikost larev 49,8 mm. Směrodatná odchylka z průměru je 5,02.

Graf č. 2: závislost doby vývoje na velikost larvy (do vývojové fáze 60)



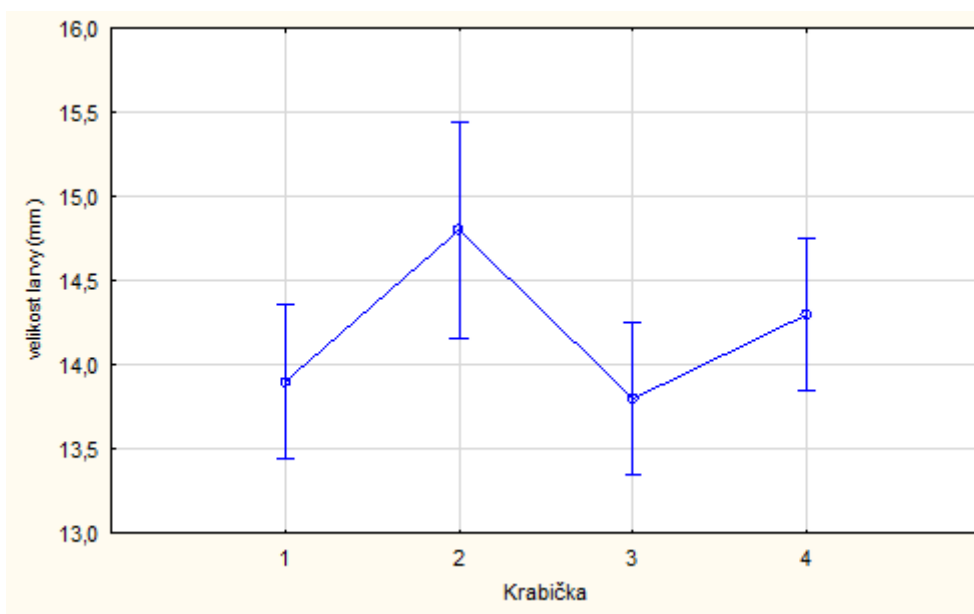
V průběhu metamorfózy larev, tedy průměrně od 82. dne vývoje, docházelo k postupnému zmenšování jednotlivých larev (Graf 3). Na konci metamorfózy měřili jedinci průměrně 16,7 mm. Směrodatná odchylka z průměru je 0,99.

Graf č. 3: závislost doby vývoje na velikosti larvy (od narození do konce metamorfózy)



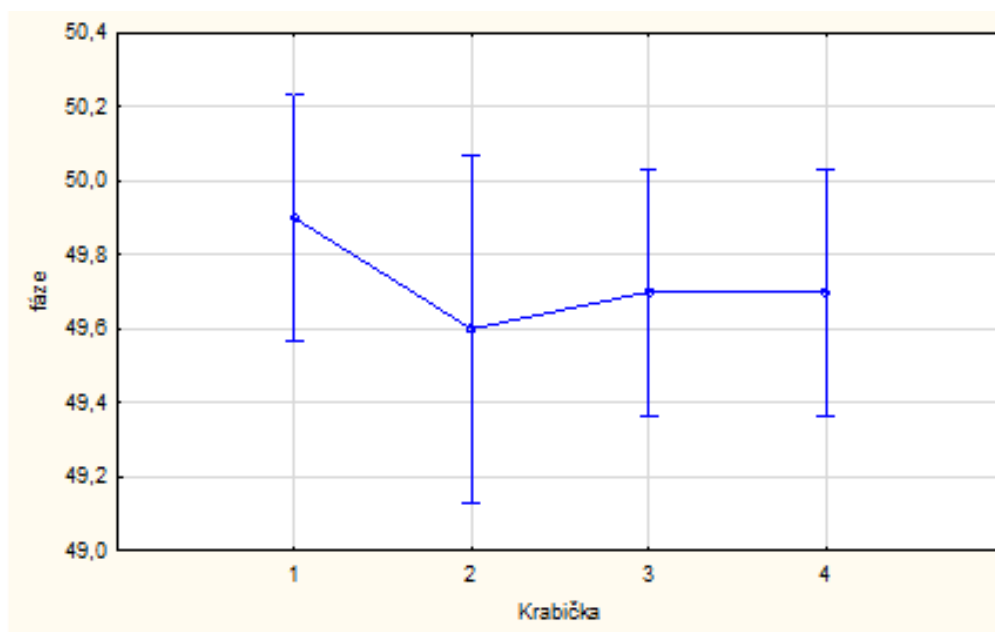
Závislost velikosti larev při narození mezi jednotlivými skupinami larev byla zjišťována celkem u čtyř krabiček s larvami (Graf 4). Bylo zjištěno, že velikost larev při narození se statisticky neliší.

Graf č. 4: závislost velikosti larev při narození mezi jednotlivými skupinami larev



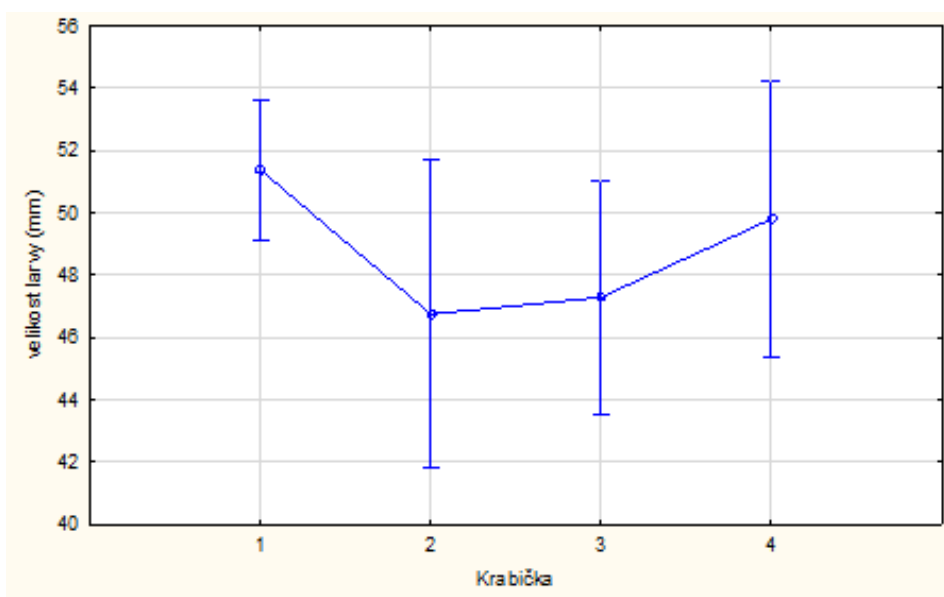
Z hlediska toho, zda se liší vývojová fáze při narození mezi jednotlivými skupinami larev, bylo zjištěno, že se fáze vývoje jednotlivých u krabiček statisticky neliší (Graf 5). A to i přestože mají larvy v krabičce č. 1 v průměru vyšší vývojovou fázi.

Graf č. 5: závislost fáze vývoje při narození larev mezi jednotlivými skupinami larev



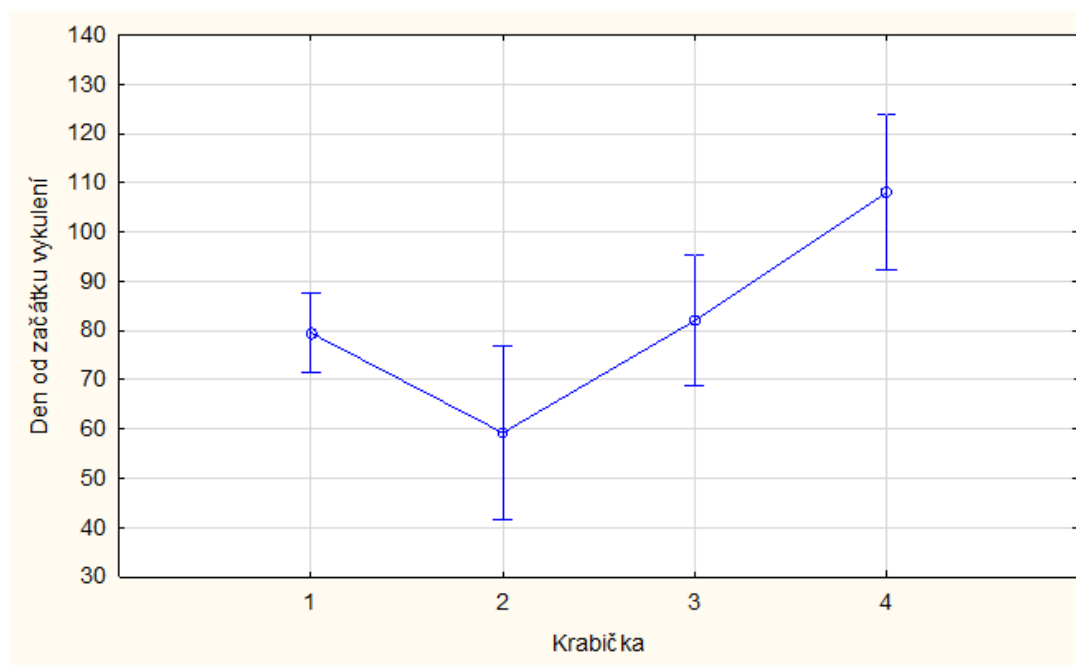
Byla sledována závislost velikosti mezi velikostí ve vývojové fázi 60, a množstvím narozených larev (Graf 6). Přestože lze pozorovat odlišnosti mezi jednotlivými skupinami larev, kdy největší jedinci byli pozorováni v krabíčce číslo jedna, zatímco nejmenší jedinci, při vývojové fázi 60, byli v krabíčkách dva a tři. Ze statistického hlediska jsou tyto rozdíly neprůkazné ($p > 0,05$).

Graf č. 6: závislost velikosti mezi jednotlivými skupinami larev ve vývojové fázi 60



Co se týče závislosti doby vývoje (do vývojové fáze 60) mezi čtyřmi krabičkami s larvami (Graf 7). Kdy průměrná velikost larev u krabičky č. 1 byla 51,4 mm. Směrodatná odchylka z průměru byla 2,6. Průměrná velikost larev u krabičky č. 2 byla 46,8 mm. Směrodatná odchylka z průměru byla 4,72. U poslední, tedy 4. krabičky, byla průměrná velikost larev 49,8 mm. Směrodatná odchylka z průměru byla 5,59. ANOVA prokázala statistický rozdíl mezi krabičkami ($F(3, 31) = 6,2262$), $p = ,00196$). Následný Tukeyho post – hoc test prokázal odlišnost mezi krabičkou č. 4 a krabičkami č. 1 a 2 (Tab. 3).

Graf č. 7: závislost doby vývoje larev do vývojové fáze 60 mezi jednotlivými skupinami larev



Tabulka č. 3: Tukeyho post-hoc test pro závislost doby vývoje larev do vývojové fáze 60 mezi jednotlivými skupinami larev

Krabička	{1}	{2}	{3}	{4}
	79,526	59,250	82,000	108,00
1		0,164548	0,988074	0,013025
2	0,164548		0,174699	0,001233
3	0,988074	0,174699		0,068350
4	0,013025	0,001233	0,068350	

5. Diskuse

Přestože se valná většina autorů zabývá pozorováním naprosto unikátního rozmnožovacího modu u Pipidae, samotnému vývoji larev se pak ve svých pracích věnuje pouze malý počet autorů.

Vajíčka se vyvíjí v kožní řase na zádech samice, u druhu *P. parva*, průměrně po dobu 24 dní. U jiných autorů se tato doba ve větší míře liší. U stejného druhu uvádí SUGHRUE (1969) dobu vývoje vajíček 30 dní. FERNANDES *et al.* (2011) uvádí, že se larvy, u příbuzného druhu *P. carvalhoi*, začínají líhnout po 21 dnech. Naproti tomu WEYGOLDT (1976) tvrdí, že vývoj vajíček v zádech samice trvá v rozmezí od 14. do 28. dne. Tyto odlišnosti mohou být pravděpodobně dány rozdílnými podmínkami v chovu, a to například teplotou. FERNANDES *et al.* (2011) uvádí, že dospělí jedinci byli ve vodě s teplotou od 26 °C – 30 °C. Naproti tomu WEYGOLDT (1976) uvádí, že dospělci *P. carvalhoi* byli chováni za teplotních podmínek 23–26 °C. Tyto podmínky se téměř podobají teplotě při mém odchovu, kdy jsem jedince držela v nádržích s teplotou vody 22 °C – 26 °C.

Samotná doba líhnutí larev *P. parva* trvá v rozmezí od 24 hodin až 3 dny. V jednom případě až 4 dny. Podobné rozmezí uvádí i FERNANDES *et al.* (2011), kde líhnutí jednotlivých larev trvá od 24 hodin až 2 dny. Tyto mírné odlišnosti mohou být zapříčiněny odlišným druhem žab, kdy FERNANDES *et al.* (2011) toto rozmezí uvádí pro druh *P. carvalhoi*.

Počet narozených larev, včetně mrtvých, se pohybuje kolem průměrně 19 larev v jedné snůšce. V jednotlivých snůškách je však tento počet velmi variabilní. O počtu larev ve snůšce se zmiňuje pouze jeden článek. RABB a SNEDIGAR (1960) uvádí, že u *P. pipa* je počet narozených jedinců kolem 19. Do těchto výsledků byly rovněž zahrnuti mrtví jedinci. *P. pipa* je ale druhem, u něhož dochází k metamorfóze v kožní řase na zádech samice, a chybí jí tak (na rozdíl od *P. parva*) stadium volně žijícího a žeroucího pulce.

Larvy *P. parva* se při narození nacházejí v 49. – 50. fázi vývoje. Stejný údaj uvádí i CARVALHO (1939), zde larvy nacházejí v 50. vývojové fázi. Larvy při narození měří 14,1 mm. Tento údaj vyvracejí hned dva autoři. Jak CARVALHO (1939), tak WEYGOLDT (1976) uvádí, že larvy ihned po narození měří 11–12 mm. Tento rozdíl by mohl být zapříčiněn tím, že tyto údaje jsou pro druh *P. carvalhoi*. Velikost dospělců

P. carvalhoi je u samice 51,4 mm a u samce 45,7 mm, zatímco dospělci *P. parva* dosahují velikosti u samice 33,6 mm a velikosti u samce 31,7 mm. FERNANDES *et. al.* uvádí, že *P. carvalhoi* má v porovnání s ostatními druhy pip větší počet vajíček, která jsou celkově daleko menší. Z toho lze usuzovat i celkově menší velikost larev při jejich vykulení.

Při začátku metamorfózy, tedy při dosažení růstové fáze 60, dosahují larvy celkově průměrné délky 49,8 mm. K podobným údajům dospěl i SOKOL (1977). Uvádí, že larvy *P. carvalhoi* dorůstají při dosažení vývojové fáze 60 délky 50-60 mm. Stejný autor rovněž uvádí, že larvy *P. parva* jsou menší a dosahují při začátku metamorfózy celkové délky 40 mm.

Doba, za kterou larvy dosáhnou začátku metamorfózy je průměrně v 82. den od narození. SOKOL (1977) uvádí, že metamorfóza u larev začíná mezi 60.–80. dnem od začátku narození. Tato odchylka může být způsobena odlišným druhem. SOKOL (1977) toto rozmezí uvádí pro *P. carvalhoi*.

Co se týče samotného dokončení vývoje larev, tedy jejich úplné metamorfózy, probíhá tento fenomén značně individuálně. Zatímco některá larva může dokončovat svůj vývoj 55. den od svého narození, u jiné tomu může být až 136. den od svého narození. Na dobu, za kterou larva dokončí svůj vývoj, může mít pravděpodobně vliv potravní kompetice ostatních larev či odlišná velikost těla mezi larvami. Průměrně tedy larvy metamorfují 100. den od svého narození. Délkou vývoje se bohužel ve svých pracích nezabývali žádní autoři, a proto nelze mé výsledky srovnat.

Při procesu metamorfózy dochází k postupnému zmenšování jednotlivých larev. To se děje z důvodu postupného zkracování ocasu a změnám ve struktuře hlavy i těla. Velikost jedince po dokončení procesu metamorfózy činí průměrně 16,7 mm. S podobnými výsledky přichází i RABB a SNEDIGAR (1960). Uvádí, že velikost metamorfovaných jedinců u *P. pipa* je 16 mm u předčasně narozených a 18 mm u životaschopných. Větší délka těla je zde pravděpodobně zapříčiněna větší velikostí druhu *P. pipa*, než je tomu u druhu *P. parva*. Naproti tomu IWASANA a TANAKA (1994) uvádí, že velikost právě vykulených mláďat *P. pipa* je průměrně 15,6 mm. Tato odchylka může být zapříčiněna odlišnými chovnými podmínkami při pozorování.

Na samotnou rychlost vývoje jednotlivých larev má vliv i jejich počet. Čím nižší je hustota larev, tím rychlejší je jejich vývoj. To by mohlo být zapříčiněno vzájemnou

potravní konkurencí mezi jednotlivými larvami. Ačkoli o vlivu hustoty populace larev na jejich růst se zmiňuje několik autorů, například DUELLMAN a TRUEB (1986), na rodu *Pipa* nebyly v tomto směru prováděny žádné výzkumy.

Vývoj larev pipy malé (*P. parva*) v některých zásadních znacích, jako je doba líhnutí, počet vylíhnutých larev, fáze vývoje při vykulení, velikost larev při začátku metamorfózy a velikost jedinců po dokončení metamorfózy odpovídá. Proti příbuzným druhům se však larvy *Pipa parva* později vykuli a jejich velikost je větší. Dále také metamorfují později, než je tomu u příbuzných druhů.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo sledovat časové a morfologické aspekty vývoje larev pipy malé. Jednotlivé larvy se vyvíjely pod kůží samice po dobu 24 dní. Doba samotného líhnutí pak trvala od 24 hodin do 3 dnů. V jednom případě dokonce 4 dny. Průměrně se z jedné snůšky líhlo celkem 19 larev.

Larvy ihned po vykulení dosahují průměrné délky 14,1 mm a nacházejí se v 49. – 50. vývojové fázi. Začátku metamorfózy dosahují larvy průměrně v 82. den života. V tuto dobu měří průměrně 49,8 mm. Po dokončení procesu metamorfózy dosahují jedinci průměrné velikosti 16,7 mm. Jedinci dokončují metamorfózu průměrně 100. den života.

Provedené testování ukázalo, že celkové množství chovaných larev nemá vliv na jejich počáteční velikost, ale ovlivňuje rychlost vývoje.

7. Zdroje

Boulenger. (1912). Observations sur l'accouplement et la ponte de l'Alyte accoucheur, *Alytes obstetricans*. Bull. Class. Sci. Acad. Roy. Belgique 1912:570–79.

Cannatella, D. C., & L. Trueb. (1988). Evolution of pipoid frogs: Intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). Zoological Journal of the Linnean Society 94: 1-38.

Corben, C. J., G. J. Ingram, & M. J. Tyler. (1974). Gastric brooding: unique form of parental care in an Australian frog. Science 186:946–47.

Crespo, E. G. (1982). Contribuição para o conhecimento da biologia dos *Alytes Ibericos*, *Alytes obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *Alytes cisternasii* Bosca, 1879 (Amphibia, Discoglossidae): Ovos, posturas (epocas de reprodução). Arqu. Mus. Bocage, ser. A, 1:453–66.

Crump, M. L. (1995). Parental care. In Amphibian biology. Vol. 2: Social behaviour, ed. H. Heatwole and B. K. Sullivan, 518–67. Chipping Norton, New South Wales, Australia: Surrey Beatty and Sons.

Crump, M. L. (2015). Anuran reproductive modes: evolving perspectives. Journal of Herpetology, 49(1), 1-16).

Del Pino, E. M. (1980). Morphology of the pouch and incubatory integument in marsupial frogs (Hylidae). Copeia 1980:10–17.

Duellman, W. E. (1970). The hylid frogs of middle America. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Monogr. 1. 2 vols. Lawrence, Kansas.

Duellman, W. E.. (1974). A systematic review of the marsupial frogs (Hylidae: *Gastrotheca*) of the Andes of Ecuador. Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas 22:1–27.

Duellman, W. E., & T. H. Fritts. (1972). A taxonomic review of the southern Andean marsupial frogs (Hylidae: *Gastrotheca*). Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas 9:1–37.

- Duellman, W. E., & P. Gray. (1983). Developmental biology and systematics of the egg-brooding hylid frogs, genera *Flectonotus* and *Fritziana*. *Herpetologica* 39:333–59
- Duellman, W. E., & D. N. Hillis. (1987). Marsupial frogs (Anura: Hylidae: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: Resolution of taxonomic problems and phylogenetic relationships. *Herpetologica* 43:141–73.
- Duellman, W. E., & M. S. Hoogmoed. (1984). The taxonomy and phylogenetic relationships of the hylid frog genus *Stefania*. Misc. Publ. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. (75):1–39.
- Duellman, W. E., & S. J. Maness. (1980). The reproductive behavior of some hylid marsupial frogs. *J. Herpetol.* 14:213–22
- Duellman, W. E., & L. Trueb. (1986). *Biology of Amphibians*. New York, U.S.A: McGraw-Hill Book Company.
- Fernandes, T. L., Antoniazzi, M. M., Sasso-Cerri, E., Egami, M. I., Lima, C., Rodrigues, M. T., & Jared, C. (2011). Carrying progeny on the back: reproduction in the Brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. *South American Journal of Herpetology*, 6(3), 161-176.
- Fitzgerald, K. T., L. J. Guillette, Jr., & D. Duvall. (1979). Notes on birth, development and care of *Gastrotheca riobambae* tadpoles in the laboratory (Amphibia, Anura, Hylidae). *J. Herpetol.* 13:457–60.
- Garda, A. A., Biavati, G. M., & Costa, G. C. (2006). Sexual dimorphism, female fertility, and diet of *Pipa arrabali* (Anura, Pipidae) in Serra do Cachimbo, Pará, Brazil, *South Am J Herpetol* 1: 20-24.
- Gorzula, S., J. Morales, & L. Hernandez. (1983). Cuido materno en la rana *Stefania scalae*. *Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle, Caracas* 43:127–28
- Iwasawa H, & Tanaka S. (1994). Notes on the reproduction and growth of the Surinam toad *Pipa pipa*. *Sci. Rept. Niigata Univ. Ser. D (Biol)* 31:1–12.
- Jungfer, K.-H., & W. Boehme. (1991). The backpack strategy of parental care in frogs, with notes on froglet-carrying in *Stefania evansi* (Boulenger, 1904) (Anura: Hylidae: Hemiphractinae). *Rev. Fr. Aquariol.* 18:91–96.

- König, C., & A. Schlüter. (1991). Nachzucht der BalearenGeburtshelferkröte *Alytes muletensis* (Sanchiz et Adrover 1979) im Rahmen eines Artenschutzprogrammes (Amphibia: Discoglossidae). Jh. Ges. Naturkde. Württemberg 146:193–205.
- Leong, A. S.-Y., M. J. Tyler, & D. J. C. Shearman. (1986). Gastric brooding: A new form in a recently discovered Australian frog of the genus *Rheobatrachus*. Aust. J. Zool. 34:205–9.
- Lopez-Jurado, L. F., M. R. Caballero, & L. Dos-Santos Freitas. (1979). Biología de la reproducción de *Alytes cisternasii* Bosca 1879. Doñana Acta Vert. 6:6–17.
- Maglia, A. M., Pugener, L. A., & Trueb, L. (2001). Comparative development of anurans: using phylogeny to understand ontogeny. *American Zoologist*, 41(3), 538–551.
- Márquez, R. (1992). Terrestrial parental care and short breeding seasons: Reproductive phenology of the midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Ecography* 15:279–88.
- Márquez, R., & P. A. Verrell. (1991). The courtship and mating of the Iberian midwife toad *Alytes cisternasii* (Amphibia: Anura: Discoglossidae). *J. Zool., London* 225:125–39.
- McDonald, K. R., & M. J. Tyler. (1984). Evidence of gastric brooding in the Australian leptodactylid frog *Rheobatrachus vitellinus*. *Trans. Roy. Soc. South Australia* 108:226.
- Nieuwkopp, P. D. & J. Faber. (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from fertilized egg till the end of metamorphosis. North Holland, Amsterdam
- Rabb, G. B., & M. S. Rabb. (1960). On the mating and egg-laying behavior of the Surinam Toad, *pipa pipa*, *Copeia* 1960: 271-276.
- Rabb, G. B., & M. S. Rabb. (1963). On the behavior and breeding biology of the African pipid frog *Hymenochirus boettgeri*. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 20: 215-241.

- Rabb, G. B., & Snedigar, R. (1960). Observations on breeding and development of the Surinam toad, *Pipa pipa*. *Copeia*, 1960(1), 40-44.
- Sokol, O. M. (1977). The free swimming *Pipa* larvae, with a review of pipid larvae and pipid phylogeny (Anura: Pipidae). *Journal of Morphology*, 154(3), 357-425.
- Sughrue, Mary. (1969). Underwater acrobats. *Brookfield Banderlog*, 34: 6-10.
- Trivers, R. (1972). Parental investment and sexual selection. In B. Campbell (Ed.), *Sexual selection and the descent of man* (pp. 136-179). Chicago, IL: Aldine-Atherton.
- Trueb, L.. (1974). Systematic relationships of Neotropical horned frogs, genus *Hemiphractus* (Anura: Hylidae). *Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, no. 29:1–60.
- Trueb, Linda & Cannatella, David. (1986). Systematics, morphology, and phylogeny of genus *Pipa* (Anura: Pipidae).. *Herpetologica*. 42. 412-449.
- Tyler, M. J., & D. B. Carter. (1981). Oral birth of the young of the gastric brooding frog *Rheobatrachus silus*. *Anim. Behav.* 29:280–82.
- Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. (2014). *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles: Fourth Edition*. Amsterdam: Elsevier. 157-178.
- Wassersug, R. J., & W. E. Duellman. (1984). Oral structures and their development in egg-brooding hylid frog embryos and larvae: Evolutionary and ecological implications. *J. Morphol.* 182:1–37.
- Wassersug, R. J. & Rosenberg, K. (1979). Surface anatomy of branchial food traps of tadpoles: a comparative study. *J. Morphol* 159:393-425.
- Wells, K.D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Weygolt, P. (1976). Notes on biology and ethology of *Pipa carvalhoi* Mir. Rib. 1937 (Anura, Pipidae). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 40:80-99.
- Weygoldt, P., & S. P. Carvalho e Silva. (1991). Observations on mating, oviposition, egg sac formation and development in the egg-brooding frog, *Fritziana goeldii*. *Amphibia-Reptilia* 12:67–80.

Wu, M. & Gerhart, J. (1991). Raising *Xenopus* in the laboratory. *Methods in Cell Biology*, 36, 3-18.