

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2021

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

eŠVK
PRIF UK
2021

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2021**

Zborník recenzovaných príspevkov

**21. Apríl 2021
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5132-4**

Morfometrická variabilita zelených skokanů (*Pelophylax*, Ranidae) jihozápadního Balkánu

Petr Papežík¹, Maroš Kubala^{2,3}, Daniel Jablonski¹, Simona Papežíková¹, Peter Mikulíček¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; petr.papezik.upol@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Slovenská akadémia vied, Centrum biológie rastlín a biodiverzity, Botanický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Morphometric variability of water frogs (*Pelophylax*, Ranidae) from the southwestern Balkans

The southwestern Balkans is inhabited by three endemic water frog species, *Pelophylax shqipericus*, *P. epeiroticus* and *P. kurtmuelleri*. Although these species are genetically and bioacoustically distinct from each other, their morphological differentiation is less pronounced. In this study, we analyzed morphometric data of 215 individuals in order to evaluate their morphometric variability. Moreover, since *P. kurtmuelleri* is a disputable taxon, we compared it with closely related *P. ridibundus* from Central Europe. The most pronounced morphological differences expressed by the analysis of variance (ANOVA) and the discriminant analysis of the principal components (DAPC) were found between *P. kurtmuelleri* and the two other Balkan species. *Pelophylax kurtmuelleri* and *P. ridibundus*, as well as *P. shqipericus* and *P. epeiroticus* were only slightly differentiated by morphometry, which demonstrates that the morphological characters measured do not reflect the genetic divergence of the species.

Keywords: Amphibia; morphometry; endemism; hybridization; microsatellites

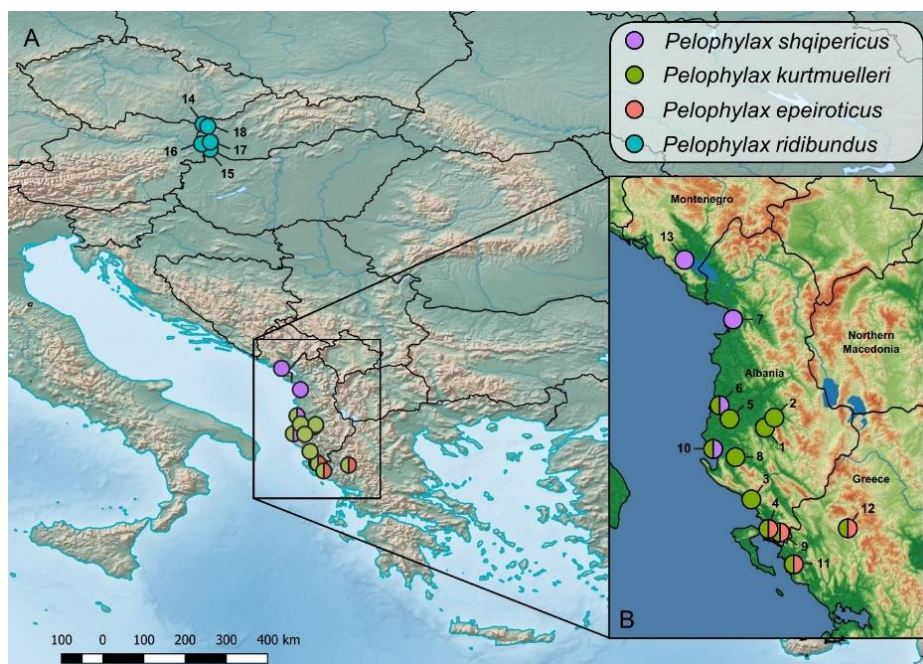
Úvod a formulace cíle

Jihozápadní část Balkánského poloostrova obývají celkem tři endemické druhy zelených skokanů rodu *Pelophylax*. V oblasti Skadarského jezera a adriatického pobřeží Černé Hory i Albánie se vyskytuje druh *P. shqipericus* (Hotz, Uzzell, Günther, Tunner & Heppich, 1987) [1]. *Pelophylax epeiroticus* (Schneider, Sofianidou & Kyriakopoulou-Sklavounou, 1984) byl popsán z jezera Ioannina v Řecku a jeho současný areál zahrnuje jih Albánie a západní Řecko [2]. Posledním z výčtu endemických zelených skokanů je druh *P. kurtmuelleri* (GAYDA, 1940), jehož taxonomický status je však doposud nejasný. Od blízce příbuzného *P. ridibundus* se odlišuje zejména bioakusticky [3] a na základě alozymů [4]. Recentně je tak buď považován za samostatný druh [5] nebo za evoluční linii spadající pod taxon *P. ridibundus* [6]. Vzhledem k největšímu areálu výskytu, který se překrývá s oběma zbylými druhy, se *P. kurtmuelleri* ojedinele kříží jak s *P. epeiroticus*, tak s *P. shqipericus* [1,6]. Naopak, areály posledně zmíněných druhů jsou odděleny asi 60 km dlouhým úsekem pohoří Mali i Kanalit v jižní Albánii a k hybridizaci mezi nimi nedochází [7]. Vzhledem k poměrně jednotvárné morfologii je systematika zelených skokanů často závislá na genetických či bioakustických znacích.

Morfologie a morfometrie však představuje tradiční nástroj používaný nejen taxonomy, ale často jsou zcela klíčové pro terénní biology snažící se o druhové určení přímo při odchytu. Proto bylo naším cílem 1) porovnat morfometrickou variabilitu balkánských endemitů, a 2) morfometrickou variabilitu *P. kurtmuelleri* s blízkce příbuzným druhem *P. ridibundus*.

Materiál a metody

Celkem bylo v letech 2017 až 2019 odchyceno a použito 215 jedinců skokanů ze 13 lokalit v Albánii, Řecku a Černé Hoře (Obr.1). Z tohoto počtu bylo 61 jedinců druhu *P. shqipericus* (37 samců a 24 samic), 51 *P. epeiroticus* (25 samců a 26 samic) a 103 *P. kurtmuelleri* (59 samců a 44 samic). Vzhledem k blízké příbuznosti *P. kurtmuelleri* se skokany *P. ridibundus* ze střední Evropy, bylo pro porovnání rovněž zahrnuto 89 jedinců tohoto druhu původem ze západního Slovenska. Morfometrické rozměry těchto jedinců byly měřeny v letech 1997 až 2009. U každého jedince bylo pomocí digitálního posuvného měřidla změřeno pět morfometrických znaků: délka těla (L), délka stehenní kosti (F), délka holenní kosti (T), délka prvního prstu na zadní končetině (DP), a délka patového hrbolku (CINT).



Obr. 1. Lokality a jejich druhové složení na jihozápadě Balkánu a na Slovensku (A). Vložená mapa (B) ukazuje oblast jihozápadního Balkánu 1 – Berat, 2 – Dushnik, 3 – Qazim Pali, 4 – Ksamil, 5 – Mbrostar, 6 – Divjakë - Karavastë, 7 – Nishaj, 8 – Poçem, 9 – Xare, 10 – Zvěrnec, 11 – Igoumenitsa, 12 – Ioannina, 13 – Virpazar, 14 – Brodské, 15 – Čunovo, 16 – Devín, 17 – Šúr, 18 – Šaštín-Stráže.

Vzorek tkáně (krev či článek prstu) z každého jedince byl odebrán a fixován v 96% etanolu pro následné molekulární analýzy. Balkánské druhy byly určeny na základě

mikrosatelitových znaků, zatímco u skokanů ze Slovenska šlo o kombinaci různých molekulárních znaků a tato zjištění jsou součástí dříve publikovaných prací [8,9].

Celkem pět mikrosatelitových lokusů bylo amplifikováno: Ga1a19 [10], RICA1b5 [11], Rrid013A [12], RICA2a34 a Rrid135A [13].

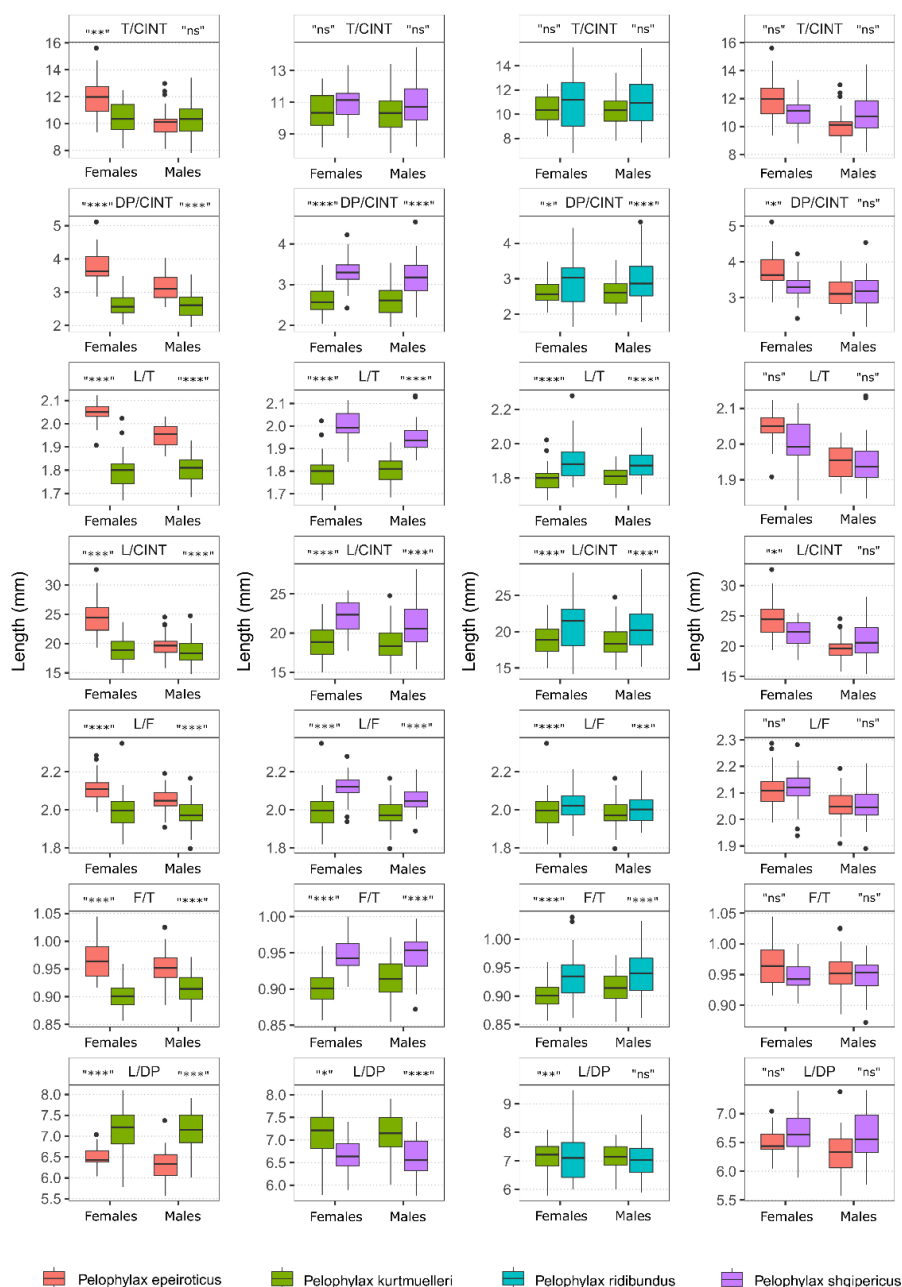
Molekulární druhové určení jedinců bylo realizováno pomocí Bayesovských statistických metod v programu Structure 2.3.4 [14].

Statistická analýza morfometrických znaků byla provedena v prostředí jazyka R [15]. Z naměřených hodnot byly vytvořeny nejdříve poměry (L/F, L/T, L/DP, L/CINT, F/T, T/CINT, DP/CINT), aby byl odstraněn vliv velikosti měřených jedinců [1]. Dvoucestná ANOVA byla použita k testování rozdílů ve vypočtených poměrech mezi druhy a pohlavími. Pokud vyšla ANOVA statisticky významná, Tukeyho HSD post-hoc test byl použit k mnohonásobným párovým porovnáním druhů za pomoci balíčku rstatix [16]. K identifikaci klusterů a vzdáleností v mnohorozměrném prostoru byla použita diskriminační analýza hlavních component (DAPC) implementovaná v balíčku adegenet [17].

Výsledky a diskuze

Program Structure přiřadil jedince do skupin odpovídajících druhům *P. shqipericus*, *P. epeiroticus* and *P. kurtmuelleri*. Navíc, určení druhové příslušnosti v terénu odpovídalo skutečné druhové příslušnosti zjištěné na základě mikrosatelitových znaků. Konečně, podařilo se potvrdit použitelnost morfometrických znaků použitých rovněž v dřívějších studiích [2,3] provedených v oblasti jihozápadního Balkánského poloostrova. Jedinou výjimkou byly poměry s přítomností patového hrbolku, které, při našem vyšším počtu analyzovaných jedinců, vykazovaly vyšší hodnoty.

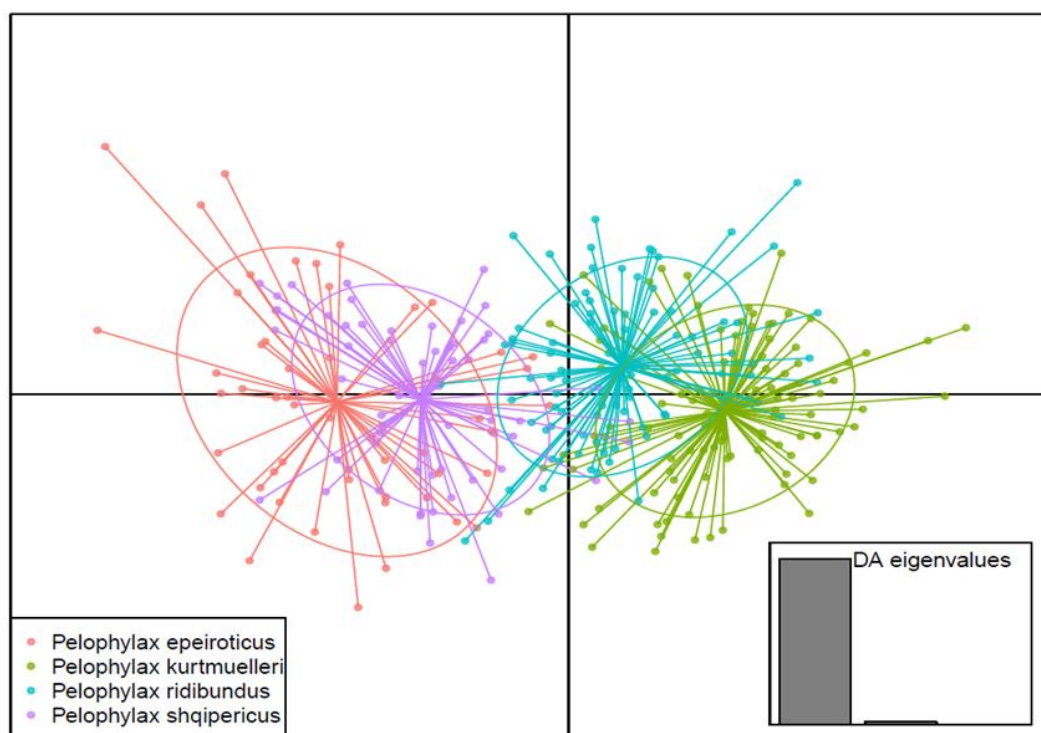
Dle výsledků ANOVA testu se *P. epeiroticus* a *P. kurtmuelleri* lišili v šesti z celkových sedmi morfometrických poměrech u samců a ve všech sedmi u samic (Obr. 2). *Pelophylax shqipericus* a *P. kurtmuelleri* se lišili navzájem v šesti poměrech u obou pohlaví. *Pelophylax kurtmuelleri* a *P. ridibundus* se lišili v šesti poměrech u samců, zatímco pouze ve čtyřech poměrech u samic. Nejméně rozdílnými porovnávanými druhy jsou *P. epeiroticus* a *P. shqipericus*. U samců nebyl ani jeden ze sledovaných poměrů významně odlišný, u samic se pak oba druhy lišily ve dvou poměrech. Mezi morfometrické poměry nejvíce rozdělující porovnávané dvojice patřily L/T, L/CINT, and DP/CINT pro *P. epeiroticus* a *P. kurtmuelleri*, což odpovídá výsledkům [2] a L/T, L/F, F/T and DP/CINT pro *P. shqipericus* and *P. kurtmuelleri*.



Obr. 2. Porovnání morfometrických poměrů mezi třemi druhy skokanů (rod *Pelophylax*) Balkánu a středoevropským *P. ridibundus* * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, * - $p < 0.0005$, ns – statisticky nevýznamné.**

Tři hlavní komponenty byly použity pro DAPC analýzu. První hlavní komponent dosáhla zachycené variability (eigenvalues) 12.7, tvořící 95 % z celkové variability. Zbýlé dva hlavní komponenty (PC2, PC3) dosáhly významně nižších hodnot zachycené variability (0.37 a 0.29). Dohromady všechny tři hlavní komponenty vysvětlovaly 99 % variability. Náplň prvního hlavního komponentu tvořily především indexy L/CINT a T/CINT jako proměnné. U druhého hlavního komponentu to pak byl L/DP poměr jako proměnná, a v případě třetího hlavního komponentu to byl poměr T/CINT.

Diskriminační analýza ukázala poměrně značný překryv všech čtyř druhů (Obr. 3). Centroidy dvojic *P. epeiroticus* a *P. shqipericus*, stejně jako *P. ridibundus* a *P. kurtmuelleri* jsou situovány blízko sebe v rámci mnohorozměrného prostoru. Je však zřejmé, že dvojice *P. epeiroticus* a *P. shqipericus* je v tomto prostoru více vzdálená *P. kurtmuelleri*. Naopak, morfometrická rozdílnost *P. ridibundus* a *P. kurtmuelleri* byla daleko méně zřejmá a oba taxony jsou si na základě použitých znaků podobné.



Obr. 3. Diskriminační analýza hlavních komponentů u tří druhů skokanů (rod *Pelophylax*) Balkánu a středoevropským *P. ridibundus*

Závěr

Analýza morfometrických znaků u tří druhů zelených skokanů endemických pro oblast jihozápadu Balkánského poloostrova prokázala odlišitelnost syntopicky se vyskytujících druhů. Naopak, blízce příbuzné druhy, *P. kurtmuelleri* a *P. ridibundus* vykazují ve zvolených znacích značnou podobnost. A konečně, nejvíce podobné druhy se ukázaly taxony bez vzájemného kontaktu - *P. epeiroticus* a *P. shqipericus*.

Poděkování

Rádi bychom poděkovali A. Javorčíkovi, D. Gruľovi, J. Christophoryové, J. Polákové, L. Cholevovi, M. Benovicsovi, M. Doležálkové - Kašťánkové, M. Hároníkové, M. Meškové a Ž. Živčicové za jejich pomoc během prací v terénu a laboratoři. Tato studie byla podpořena

Agentúrou na podporu výskumu a vývoja projekty APVV-19-0076 a APVV-15-0147, grantem Vedecké grantové agentúry MŠVVaŠ SR a SAV VEGA 1/0286/19, grantem Komenského Univerzity v Bratislave UK/7/2020. Vedecká povolení vydaly Ministerstvo životního prostředí a energetiky České (181012/807/28-3-2019) a Ministerstvo cestovního ruchu a životního prostředí Albánské republiky (No. 480/2019).

Seznam použité literatury

- [1] Plötner J. (2005) Die westpaläarktischen Wasserfrösche: von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld, p. 52
- [2] Schneider H., Sofianidou T. S., Kyriakopoulou-Sklavounou P. (1984) Z. Zool. Syst. Evol. 22(4), p. 349
- [3] Schneider H., Sinsch U., Sofianidou T. S. (1993) Z. Zool. Syst. Evol. 31(1), p. 47
- [4] Sofianidou T. S., Schneider H., Sinsch U. (1994) Alytes 12(3), p. 93
- [5] Plötner J., Baier F., Akin C., et al. (2012) Zoosyst. Evol. 88(2), p. 261
- [6] Lymberakis P., Poulakakis N., Manthalou G., et al. (2007) Mol. Phylogenet. Evol. 44(1), p. 115
- [7] Speybroeck J., Beukema W., Bok B., et al. (2016) Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe. Bloomsbury, London, p. 188
- [8] Mikulíček P., Kautman M., Demovič B., et al. (2014) J. Evolution. Biol. 27(3), p. 628
- [9] Mikulíček P., Kautman M., Kautman J., et al. (2015) J. Zool. Syst. Evol. Res. 53(2), p. 124
- [10] Christiansen D. G. (2009) BMC Evol. Biol. 9(1), p. 135
- [11] Garner T. W. J., Gautschi B., Röthlisberger S., et al. (2000) Mol. Ecol. 9(12), p. 2173
- [12] Hotz H., Uzzell T., Guex G. D., et al. (2001) Zoosyst. Evol. 77(1), p. 43
- [13] Christiansen D., Reyer H. U. (2009) Evolution 63(7), p. 1754
- [14] Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Genetics 155(2), p. 945
- [15] A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [Citované: 21. března 2021] < <https://www.R-project.org/> >
- [16] rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests (version 0.4.0) [Citované: 21. března 2021] <<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>
- [17] adegenet: Exploratory analysis of genetic and genomic data (version 2.1.2) [Citované: 21. března 2021] <<https://CRAN.R-project.org/package=adegenet>>

Študentská vedecká konferencia 2021
Zborník recenzovaných príspevkov

Dátum a miesto konania:	21. apríl 2021 Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta MS TEAMS
Editori:	RNDr. Eva Viglašová, PhD. RNDr. Mária Chovancová, PhD. Mgr. Táňa Sebechlebská, PhD. Mgr. Dagmara Gajanová Členovia odborného výboru
Recenzenti:	RNDr. Eva Viglašová
Grafická úprava:	prvé
Vydanie:	400ks
Náklad:	1035
Rozsah strán:	978-80-223-5132-4
ISBN:	



ISBN 978-80-223-5132-4