

Técnicas multivariadas de morfometria geométrica são capazes de  
discriminar a forma dos crânios de *Trachycephalus atlas*  
Bokermann, 1966 e *Trachycephalus nigromaculatus* Tschudi, 1838  
(Anura, Hylidae)?

**Ana Beatriz Alarcon Comelli**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

Técnicas multivariadas de morfometria geométrica são capazes de  
discriminar a forma dos crânios de *Trachycephalus atlas*  
Bokermann, 1966 e *Trachycephalus nigromaculatus* Tschudi, 1838  
(Anura, Hylidae)?

**Ana Beatriz Alarcon Comelli**

**Prof. Dr. Ivan Sergio Nunes Silva Filho**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista,  
UNESP, para obtenção do título de Mestre no  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade  
de Ambientes Costeiros.

**SÃO VICENTE - SP**

**2020**

C732t

Comelli, Ana Beatriz Alarcon

Técnicas multivariadas de morfometria geométrica são capazes de discriminar a forma dos crânios de *Trachycephalus atlas* Bokermann, 1966 e *Trachycephalus nigromaculatus* Tschudi, 1838 (Anura, Hylidae)? / Ana Beatriz Alarcon Comelli. -- São Vicente, 2020

61 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Ivan Sergio Nunes Silva Filho

1. Morfometria. 2. Cranio. 3. Caracteres sexuais. 4. Análise multivariada. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Câmpus do Litoral Paulista



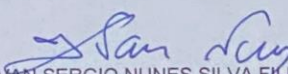
### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Técnicas multivariadas de morfometria geométrica são capazes de discriminar a forma dos crânios de *Trachycephalus atlas* Bokermann, 1966 e *T. nigromaculatus* Tschudi, 1838 (Anura, Hylidae)?

AUTORA: ANA BEATRIZ ALARCON COMELLI

ORIENTADOR: IVAN SERGIO NUNES SILVA FILHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. IVAN SERGIO NUNES SILVA FILHO  
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

(PARTICIPAÇÃO NÃO PRESENCIAL)  
Prof. Dr. OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG  
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

(PARTICIPAÇÃO NÃO PRESENCIAL)  
Prof. Dr. LEANDRO DOS SANTOS LIMA HOHL  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes / UERJ

São Vicente, 19 de março de 2020

Aos meus pais, por todo o amor e oportunidades

Ao meu e sempre meu Felipe, por estar, acreditar, incentivar  
e compartilhar a vida

Aos meus filhos Guilherme e Stella – pessoas incríveis e especiais

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Ivan Nunes que me aceitou como aluna e contribuiu com seu conhecimento e sugestões ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Herpetologia - LHERP, principalmente Guilherme Sichieri, Bruna Lopes e Kátia Rossi pela ajuda com as fotos dos animais. À querida Caroline Parreira pelas conversas e pelo carinho. Em especial ao Pedro Moura, que me auxiliou e ensinou muito a respeito da MG, sempre com paciência e gentileza.

Aos curadores e pesquisadores das coleções da Universidade Federal da Bahia – BA, Universidade Estadual de Feira de Santana - BA, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC Minas e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP, por disponibilizarem os exemplares para a realização desta pesquisa.

Aos professores Otto Bismark Fazzano Gadig e Leandro dos Santos Lima Hohl, os quais fizeram parte das minhas bancas, enriquecendo essa pesquisa com suas sugestões e orientações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros (PPGBAC) do Instituto de Biociências (IB), UNESP / CLP e todos os funcionários do câmpus.

Aos meus colegas do Orquidário Municipal de Santos que, apesar de não estarem diretamente envolvidos, contribuíram com apoio e interesse.

Ao meu marido, amigo, companheiro e TI Felipe, por todas as sugestões, correções, arrumações e “ões” possíveis. Simplesmente por estarmos juntos!

## RESUMO

*Trachycephalus atlas* e *Trachycephalus nigromaculatus* são espécies da família Hylidae, Ordem Anura, que são morfológicamente semelhantes entre si. Apesar de *T. atlas* ser relatada em sua maioria em ambientes do Bioma Caatinga e *T. nigromaculatus* ocorrer em regiões costeiras da Mata Atlântica e interioranas em matas de galeria do Cerrado, ambas foram registradas em ambientes com fitofisionomia vegetal de transição de Mata Atlântica e Caatinga, especialmente no estado da Bahia. Devido à sua semelhança morfológica, não existe uma característica conspícua que ajude na diagnose destas espécies. Suas diferenças aparecem no canto e no girino. Neste estudo examinamos essas duas espécies utilizando a morfometria geométrica para analisar as variações da forma do crânio e determinar se essas variações são diagnósticas, encontrando amparo em dados estatísticos robustos. A morfometria geométrica (MG) tem sido empregada para resolver uma variedade de questões do mais amplo contexto de ecologia e evolução. Foram examinados 160 exemplares de coleções representativas das espécies, perfazendo o maior número possível de localidades registradas. Os crânios dos indivíduos foram fotografados em vista dorsal e lateral e 17 marcos anatômicos (*landmarks*) foram selecionados e digitalizados de acordo com a representatividade em estruturas homólogas da área craniana de todos os exemplares. Para as análises de morfometria geométrica foi utilizado o método de sobreposição de Procrustes com as coordenadas dos marcos para as duas vistas e posteriormente Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Função Discriminante. Os resultados revelaram uma tendência de separação das espécies em ambas vistas, com significância estatística, corroborando os dados da literatura. Quanto ao dimorfismo sexual, somente *T. nigromaculatus* apontou diferença entre os sexos, na vista lateral, sendo que os machos tendem a apresentar alongamento na região posterior do crânio. Os dados comparativos de localidade dos exemplares de *Trachycephalus atlas* mostraram diferenças significativas entre o grupo da série-tipo e demais grupos da espécie, nas duas vistas. Os grupos de *Trachycephalus nigromaculatus* apresentaram diferenças, exceto Rio de Janeiro, que foi semelhante a todos na vista dorsal e com Espírito Santo na vista lateral. A técnica da MG foi efetiva para pontuar o quanto e onde as alterações na forma do crânio diferem entre as espécies desse estudo.

**Palavras-chave:** análise interespecífica, dimorfismo sexual, Hylinae, Lophiohylini, morfologia.

## ABSTRACT

*Trachycephalus atlas* and *Trachycephalus nigromaculatus* are species of the family Hylidae, Order Anura, which are morphologically similar to each other. Although *T. atlas* is mostly reported in environments of the Caatinga Biome and *T. nigromaculatus* occurs in coastal regions of the Atlantic Forest and inlands of Cerrado, both were recorded in environments with transition vegetation phytophysiology of the Atlantic Forest and Caatinga, especially in the state of Bahia. Due to its morphological similarity, there is no conspicuous characteristic that helps in the diagnosis of these species. Their differences appear in the call and the tadpole. In this study we examine these two species using geometric morphometry to analyze variations in the shape of the skull and determine whether these variations are diagnostic, finding support in more robust statistical data. Geometric morphometry (GM) has been used to solve a variety of issues in the broadest context of ecology and evolution. The sample consisted of 160 specimens of representative collections of the species, sampling the largest possible number of registered locations. The skulls of the individuals were photographed in dorsal and lateral views and 17 anatomical landmarks were selected and digitized according to the representativeness in homologous structures of the cranial area of all the specimens. For the analysis of geometric morphometry, the Procrustes superimposition method with the coordinates of the milestones for the two views was used, and later Principal Component Analysis (PCA), Canonical Variables Analysis (CVA) and Discriminant Function. The results revealed a tendency of species separation in both views, with statistical significance, corroborating the literature data. As for sexual dimorphism, only *T. nigromaculatus* showed a difference between the sexes, in the lateral view, with males tending to be elongated in the posterior region of the skull. The comparative data of locality of the specimens of *Trachycephalus atlas* showed significant differences between the group of the type series and other groups of the species, in the two views. The groups of *Trachycephalus nigromaculatus* showed differences, except Rio de Janeiro, which was similar to all in the dorsal view and with Espírito Santo in the lateral view. The MG technique was effective in scoring how much and where changes in the shape of the skull differ between the species in this study.

**Palavras-chave:** interspecific analysis, sexual dimorphism, Hylinae, Lophiohylini, morphology.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Espécies estudadas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 19 |
| Figura 2. Localidades amostradas no estudo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 22 |
| Figura 3. Marcos anatômicos utilizados para análise da morfometria geométrica dos crânios de <i>Trachycephalus</i> sp. ....                                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| Figura 4. Variações da forma para cada Componente Principal, vista dorsal, representação: grade de deformação: A- variação negativa; B- variação positiva. ....                                                                                                                                                                                         | 27 |
| Figura 5. Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista dorsal, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). ....                                                                                                                                                                                                                               | 28 |
| Figura 6. Análise da Função Discriminante da vista dorsal para as espécies: <i>T. atlas</i> (vermelho) e <i>T. nigromaculatus</i> (verde). . ....                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| Figura 7. Variações da forma para cada Componente Principal, vista lateral, representação: grade de deformação: A- variação negativa; B- variação positiva. ....                                                                                                                                                                                        | 30 |
| Figura 8. Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista lateral, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2).....                                                                                                                                                                                                                               | 31 |
| Figura 9. Análise da Função Discriminante da vista lateral para as espécies: <i>T. atlas</i> (vermelho) e <i>T. nigromaculatus</i> (verde). ....                                                                                                                                                                                                        | 32 |
| Figura 10. Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista dorsal, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: <i>T. atlas</i> machos (verde), <i>T. atlas</i> fêmeas (vermelho), <i>T. nigromaculatus</i> machos (roxo) e <i>T. nigromaculatus</i> fêmeas (azul). ....  | 33 |
| Figura 11. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) para a vista dorsal. São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: <i>T. atlas</i> machos (verde), <i>T. atlas</i> fêmeas (vermelho), <i>T. nigromaculatus</i> machos (roxo) e <i>T. nigromaculatus</i> fêmeas (azul). ....                                                   | 34 |
| Figura 12. Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista lateral, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: <i>T. atlas</i> machos (verde), <i>T. atlas</i> fêmeas (vermelho), <i>T. nigromaculatus</i> machos (roxo) e <i>T. nigromaculatus</i> fêmeas (azul). .... | 35 |
| Figura 13. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) para a vista lateral. São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: <i>T. atlas</i> machos (verde), <i>T. atlas</i> fêmeas (vermelho), <i>T. nigromaculatus</i> machos (roxo) e <i>T. nigromaculatus</i> fêmeas (azul). ....                                                  | 36 |
| Figura 14. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidade para <i>Trachycephalus atlas</i> - vista dorsal: b (Bahia); d (desconhecido); g (Sergipe); h (holótipo; Maracás – Bahia); m (Minas Gerais); p (Pernambuco) e t (série- tipo; Maracás - Bahia). ....                                                                                    | 37 |

Figura 15. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidade para *Trachycephalus atlas* - vista lateral: b (Bahia); d (desconhecido); g (Sergipe); h (holótipo; Maracás – Bahia); m (Minas Gerais); p (Pernambuco) e t (série-tipo; Maracás - Bahia). ..... 38

Figura 16. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidades para *Trachycephalus nigromaculatus* - vista dorsal: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro). ..... 39

Figura 17. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidades para *Trachycephalus nigromaculatus* - vista lateral: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro). ..... 40

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Análise da Função Discriminante entre espécies – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P < 0,0001$ .....                                                                                                                                                                            | 29 |
| Tabela 2. Análise da Função Discriminante entre espécies – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P < 0,0001$ .....                                                                                                                                                                           | 32 |
| Tabela 3. Análise da Função Discriminante entre sexo <i>T. atlas</i> – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,1691$ .....                                                                                                                                                                 | 34 |
| Tabela 4. Análise da Função Discriminante entre sexo <i>T. nigromaculatus</i> – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,2067$ .....                                                                                                                                                        | 34 |
| Tabela 5. Análise da Função Discriminante entre sexo <i>T. atlas</i> – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,6694$ .....                                                                                                                                                                | 36 |
| Tabela 6. Análise da Função Discriminante entre sexo <i>T. nigromaculatus</i> – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,0029$ .....                                                                                                                                                       | 36 |
| Tabela 7. Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. atlas</i> – conjunto de dados dorsal. Valores para cada comparativo: t (serie-tipo; Maracás – Bahia); b (Bahia); m (Minas Gerais); d (desconhecido); g (Sergipe) e p (Pernambuco). Entre parênteses o número de exemplares de cada região.....  | 38 |
| Tabela 8. Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. atlas</i> – conjunto de dados lateral. Valores para cada comparativo: t (serie-tipo; Maracás – Bahia); b (Bahia); m (Minas Gerais); d (desconhecido); g (Sergipe) e p (Pernambuco). Entre parênteses o número de exemplares de cada região..... | 39 |
| Tabela 9. Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. nigromaculatus</i> – conjunto de dados dorsal. Valores de P para cada comparativo: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Entre parênteses o número de exemplares de cada região. ....                                              | 40 |
| Tabela 10. Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. nigromaculatus</i> – conjunto de dados lateral. Valores de P para cada comparativo: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Entre parênteses o número de exemplares de cada região. ....                        | 41 |
| Tabela 11. Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. atlas</i> x <i>T. nigromaculatus</i> , fêmeas, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,4064$ . ....                                                                                                             | 41 |
| Tabela 12. Análise da Função Discriminante entre localidades <i>T. atlas</i> x <i>T. nigromaculatus</i> , machos, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de $P: 0,1090$ .....                                                                                                              | 41 |

Tabela 13. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, fêmeas, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,9364.  
..... 42

Tabela 14. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, machos, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,9992..... 42

Tabela 15. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo fêmeas x *T. nigromaculatus* fêmeas, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,0003..... 42

Tabela 16. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo machos x *T. nigromaculatus* machos, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P<0,0001..... 43

Tabela 17. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo fêmeas x *T. nigromaculatus* fêmeas, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,0074..... 43

Tabela 18. Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo machos x *T. nigromaculatus* machos, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P<0,0001..... 43

## SUMÁRIO

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                   | 13 |
| 1.1. Morfologia: uma breve descrição.....                                                             | 13 |
| 1.2. Variação morfológica e morfometria .....                                                         | 14 |
| 1.3 Morfometria geométrica e aplicação no estudo de anuros .....                                      | 15 |
| 1.4. As espécies selecionadas – <i>Trachycephalus atlas</i> e <i>T. nigromaculatus</i> .....          | 16 |
| 2. OBJETIVO.....                                                                                      | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                           | 22 |
| 3.1. A amostra .....                                                                                  | 22 |
| 3.2. Definição e digitalização de marcos anatômicos .....                                             | 23 |
| 3.3. Morfometria geométrica.....                                                                      | 24 |
| 3.3.1. Análise Generalizada de Procrustes ( <i>GPA</i> ).....                                         | 24 |
| 3.3.2. Análise de Componentes Principais ( <i>PCA</i> ).....                                          | 24 |
| 3.3.3. Análise de Variáveis Canônicas ( <i>CVA</i> ) e Função Discriminante.....                      | 25 |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                    | 27 |
| 4.1. Variação da forma do crânio entre as espécies – <i>T. atlas</i> e <i>T. nigromaculatus</i> ..... | 27 |
| 4.2. Variação da forma do crânio entre os sexos – <i>T. atlas</i> e <i>T. nigromaculatus</i> .....    | 33 |
| 4.3. Variação da forma do crânio entre localidades – <i>T. atlas</i> e <i>T. nigromaculatus</i> ..... | 37 |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                                                     | 44 |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                    | 48 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                   | 49 |
| APÊNDICE I - Localidades amostradas com registro de município nas coleções .....                      | 59 |
| APÊNDICE II - Espécies amostradas – Coleção e número de tombo .....                                   | 61 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Morfologia: uma breve descrição

As características morfológicas sempre estiveram no centro das atenções da pesquisa biológica, compreendendo peças importantes para ampla variedade de campos de investigação. A morfologia dos organismos varia em níveis estruturais muito distintos: durante a ontogenia, entre adultos, sexos, populações, entre outros. Várias áreas do conhecimento biológico se baseiam e incluem como questões relevantes as variações das características morfológicas, sendo observado mais significativamente na taxonomia, sistemática, fisiologia, ecologia, biogeografia e biologia evolutiva. (Kaliontzopoulou, 2011).

A classificação taxonômica dos organismos e a compreensão da diversidade biológica foram historicamente baseadas em descrições de formas morfológicas (Adams et al., 2004). Aristóteles (384-322 a.C.) foi provavelmente o primeiro anatomista, tendo dissecado vários organismos, enfatizando o design anatômico. Segundo ele examinando-se a forma, identificavam-se as funções a que ela responde e, que por fim, determinam o seu caráter. Mas a expressão morfologia foi cunhada muito tempo depois, mais precisamente em 1790, pelo naturalista alemão Johan Wolfgang von Goethe, sendo que o termo significa o estudo das formas orgânicas (Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012).

Grandes naturalistas como Georges Cuvier, Charles Darwin e Alfred Wallace buscaram compreender a diversidade fenotípica utilizando evidências morfológicas para propor suas ideias e teorias, relacionando as formas dos organismos à organização e agrupamento dos seres vivos extintos e viventes, relação e adaptação destes com as condições ambientais e capacidade de transmissão de características para os descendentes (Steffoff, 2007; Faria, 2010).

Segundo Wake (2012), o campo das pesquisas morfológicas ainda é consistente e promissor, impulsionado por nova compreensão do valor da mesma e sua inclusão em outras áreas, através de técnicas mais integrativas e interdisciplinares.

## **1.2. Variação morfológica e morfometria**

Morfometria é o estudo quantitativo da forma biológica e, tal quantificação, introduz rigor necessário na descrição e comparação entre morfologias e a aplicação de técnicas morfométricas beneficia, portanto, qualquer campo de pesquisa que dependa da morfologia comparativa (Webster & Sheets, 2010). O campo da morfometria é focado em métodos para a descrição e análise estatística da variação da forma dentro e entre amostras de organismos (Rohlf & Marcus, 1993).

A morfometria teve seu início em trabalhos realizados no século XIX, que através da correlação entre medidas de distâncias em estruturas biológicas, estudavam a variação na forma dos organismos (Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). Pode então ser definida como o estudo da forma e do tamanho, e de como estas duas variáveis se relacionam entre si. Assim, constitui uma ferramenta para entender a relação destas com diversas outras variáveis, como idade, sexo ou relações históricas entre os organismos estudados (Moraes, 2003).

Análises de variação morfológica tipicamente focam em regiões restritas da anatomia com o objetivo de quantificar a variação entre um grupo de espécimes ou espécies, ligando esta variação com diferenças comportamentais ou funcionais. Essa abordagem é fundamental para entender a gama de variação morfológica e ajuda no desenvolvimento de novas hipóteses que podem ser testadas experimentalmente (Terhune et al., 2015). Métodos para avaliar correlações entre fenótipo e ambiente e medir a diferenciação entre as populações, utilizando frequências alélicas fenotípicas e marcadores moleculares, estão se expandindo e sendo combinadas com morfometria para estudar estes fenômenos em estruturas morfológicas complicadas, tais como dentes, mandíbulas e crânios (Lawing & Polly, 2010).

Grande parte das análises morfométricas do século XX foram realizadas pela aplicação de métodos estatísticos a conjuntos de características medidas, que incluíam distâncias lineares e proporções. Denominada morfometria tradicional, esta envolve resumir a morfologia em termos de medidas de comprimento, proporções ou ângulos, que podem ser investigados individualmente, mas que exibem deficiências e limitações nas interpretações biológicas (Webster & Sheets, 2010; Adams et al., 2013). A aquisição de dados sempre foi parte importante da biologia e muito esforço foi gasto para coletar dados sobre os quais basear inferências sistemáticas (Rohlf & Bookstein, 1990).

O desenvolvimento de novas técnicas de processamento digital de imagens permitiu aprofundar estudos morfológicos para casos em que as técnicas usuais não podem ser aplicadas por várias razões (Quinzio et al., 2015). A morfometria geométrica tem sido empregada para resolver uma variedade de questões do mais amplo contexto de ecologia e evolução, pois permite detectar variações sutis, como a assimetria da morfologia de estruturas (Klingenberg et al., 2002; Collyer & Adams, 2013). Esse método tem como objetivo descrever e representar a geometria das formas estudadas, localizando claramente as regiões onde ocorrem as mudanças, sendo mais eficaz na captura de informações sobre a forma dos organismos e resulta em procedimentos estatísticos poderosos para testar as diferenças (Rohlf & Marcus, 1993). A abordagem mais difundida é representar cada espécime pelas posições relativas dos marcos anatômicos (pontos correspondentes biologicamente e que podem ser localizados com precisão) e assim estabelecer correspondência entre todos os espécimes incluídos na análise. A forma é então definida como toda a informação geométrica sobre configuração de pontos de referência (Bookstein, 1986; Klingenberg, 2011).

A consequência mais prática da revolução geométrica decorre do desenvolvimento tecnológico que ocorreu nas últimas décadas: dados digitais, especialmente fotografias de animais no campo ou de espécimes de museu, são fáceis de coletar rapidamente em grandes quantidades (Lawing & Polly, 2010). A análise multivariada sofisticada da morfometria geométrica de tais dados, desenha diagramas evocativos de transformações ou diferenças morfológicas, oferecendo visualização precisa da forma (Webster & Sheets, 2010). Segundo Klingenberg (2013), a combinação de geometria com estatística multivariada, que está no centro da morfometria geométrica, garante que a forma de uma estrutura seja caracterizada completamente e sem redundância. Estas análises levam automaticamente em conta todas as relações espaciais entre os marcos morfológicos ou outras características geométricas incluídas na análise.

### **1.3 Morfometria geométrica e aplicação no estudo de anuros**

Os anuros são encontrados em praticamente todos os ecossistemas terrestres e são os anfíbios mais diversificados (Haddad et al., 2013). Atualmente são conhecidas cerca de 8.083 espécies de anfíbios, sendo a Ordem Anura a mais representativa com 7.128 espécies (Frost, 2019). O Brasil vem mantendo a primeira posição de maior riqueza de anuros, com mais de ~1137 espécies registradas até o momento (Segalla et al., 2019).

O sistema específico de reconhecimento de parceiros em anuros (*specific mate recognition system* - SMRS), que atua fortemente como isolamento reprodutivo, baseia-se principalmente nas características morfológicas e de vocalização. É por isso que tais critérios são usados por pesquisadores para identificação taxonômica. Os dados morfológicos podem ser usados de forma complementar aqueles da biologia reprodutiva, ecologia e genética, num esforço conjunto para definir as unidades que serão o alvo de ações, sejam eles de estudos específicos ou conservação (Lodé & Pagano, 2000).

A utilização da morfometria geométrica nesta última década como ferramenta de pesquisa em anuros está voltada para a resolução de problemas taxonômicos (Baldo et al., 2014; Escoriba & Hassine, 2014; Ben et al., 2014; Acevedo et al., 2016; Yildirim, 2018); padrões de distribuição (Haad et al., 2011; Borzée et al., 2013; Vega-Trejo et al., 2014; Marques & Nomura, 2015; Pezzuti et al., 2016; Tokita et al., 2018); desenvolvimento ontogenético (Garrida & Llorente, 2011; Ponssa & Candioti, 2012; Yildirim & Kaya, 2017); sistemática (Clemente-Carvalho et al., 2011); dimorfismo sexual (Vukov et al., 2018) e assimetrias no crescimento devido à poluentes ambientais (Stepanyan et al., 2011). Além dos resultados dessas pesquisas, esses trabalhos também oferecem informações para aprimorar e caracterizar a implantação da técnica para o grupo, assim como melhorar a obtenção dos dados e padronizar marcos e análises a serem utilizados.

#### **1.4. As espécies selecionadas – *Trachycephalus atlas* e *T. nigromaculatus***

A Ordem Anura é o grupo mais diversificado e abundante de anfíbios vivos, sendo cosmopolita em distribuição e ocorrendo essencialmente em todas as áreas terrestres. Sua diversidade de espécies é maior em florestas tropicais úmidas (McDiarmid, 1994). Dentre as famílias de Anura, Hylidae é a mais representativa e amplamente difundida, composta por sete subfamílias, com 721 espécies, variando de pequeno a grande porte. Habitam uma diversidade de habitat, desde florestas tropicais e temperadas a desertos e ecossistemas montanhosos (Frost, 2019). A maioria é arbórea e apresenta uma diversidade de modos reprodutivos: girinos aquáticos de ovos postos em lagoas, em folhas ou em bromélias, zonas úmidas e buracos em árvores (Haddad et al., 2013).

O gênero *Trachycephalus* Tschudi, 1838 é representado atualmente por 17 espécies (Frost, 2019): *T. atlas* Bokermann, 1966; *T. coriaceus* (Peters, 1867); *T. cunauaru* Gordo et al., 2013; *T. dibernardoi* Kwet & Solé, 2008; *T. hadrocephus* (Duellman & Hoogmoed, 1992); *T. helioi* Nunes et al., 2013; *T. imitatrix* (Miranda-Ribeiro, 1926); *T.*

*jordani* (Stejneger & Test, 1891); *T. lepidus* (Pombal et al., 2003); *T. macrotis* (Andersson, 1945); *T. mambaiensis* Cintra et al., 2009; *T. mesophaeus* (Hensel, 1867); *T. nigromaculatus* Tschudi, 1838; *T. quadrangulum* (Boulenger, 1882); *T. resinifictrix* (Goeldi, 1907) e *T. typhonius* (Linnaeus, 1758).

Segundo revisão apresenta por Faivovich et al. (2005) este gênero é diagnosticado por 37 transformações em proteínas nucleares e mitocondriais e genes ribossômicos. A putativa sinapomorfia refere-se à presença de sacos vocais protuberantes, emparelhados posterior aos ângulos das mandíbulas quando infladas. Espécies de *Trachycephalus* estão distribuídas nas Américas do Norte e Sul e são encontradas em áreas úmidas do México, Norte da Argentina e em todas as regiões do Brasil (Roberto et al., 2011).

*Trachycephalus atlas* foi descrita por Bokermann, 1966, sendo sua localidade tipo a Fazenda Santo Onofre, no município de Maracás, Bahia. A espécie é caracterizada por co-ossificação craniana, tamanho grande (comprimento rostro-cloacal – CRC macho 98 mm; fêmea 107 mm), dorso marrom pálido com grande mancha escura como Y invertido no região central, antebraço e braço com corte transversal escuro, pernas com três faixas transversais escuras, lateralmente anéis pretos com creme amarelo na região central, ventre creme branco, com bolsas vocais pretas (Bokermann, 1966). É uma espécie de vegetação de transição “Agreste” entre a Mata Atlântica úmida e a savana caatinga seca. É frequentemente encontrada em bromélias e reproduz-se em lagoas temporárias em áreas abertas (Caramaschi & Silvano, 2004).

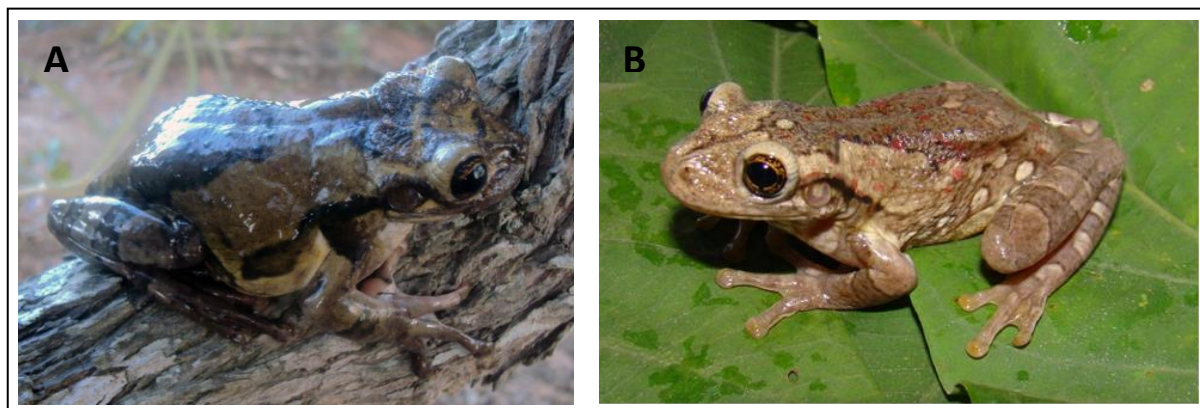
Desde então, alguns registros foram feitos para a espécie, todos situados na região nordeste do Brasil. Borges-Nojosa & Santos (2005) documentaram a espécie para o município de Betânia, Pernambuco, em habitat de floresta da Caatinga, com fitofisionomia de estrato arbóreo denso e aberto com muitos arbustos. Roberto et al. (2011) coletaram 2 indivíduos adultos no município de Jati, Ceará, sendo a primeira ocorrência da espécie no estado. A área está localizada dentro da Caatinga, caracterizado pela vegetação arbustiva espinhosa e floresta seca arbórea com presença de um lago permanente e várias lagoas temporárias. Magalhães et al. (2011) registraram a espécie durante os inventários faunísticos realizados na Hidrelétrica de Xingó, que abrange Sergipe e Alagoas e Reserva Florestal de São João da Mata, na Paraíba, sendo os primeiros registros para esses estados, ampliando em 150 km a distribuição geográfica conhecida. Godim-Silva et al. (2016) observou a presença de adulto em bromélia da zona de vegetação arbustiva no ecossistema

de Restinga, no município de Conde, Bahia. Neta et al. (2018) relatou a espécie novamente na área de caatinga do Ceará, em um levantamento da herpetofauna da Bacia do Rio Salgado.

*Trachycephalus nigromaculatus* foi descrita por Tschudi, 1838, mas sua localidade-tipo permanece indeterminada. Espécie de porte grande (macho CRC 80 mm; fêmea 92 mm), que ocorre em floresta primária e secundária de planície e matagal de Restinga da região sudeste do Brasil, ocupando a área central de bromélias e buracos em tronco de árvores (Dias et al., 2010). Sua distribuição abrange as regiões costeiras dos estados do Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) e interior de Minas Gerais, ao norte de São Domingos, na parte sul de Goiás (Rocha et al., 2010). Foi relatada por Bertha Lutz (1954) para a lista de anuros do Distrito Federal. Em um extenso levantamento realizado no Espírito Santo, foi encontrada em 09 cidades capixabas (Almeida et al., 2011). Foi registrada para o município de Potiguará, Bahia, por Freitas & Lima (2009) e posteriormente para os municípios de Camacan e Boa Nova, em zona de transição entre os biomas de Mata Atlântica e Caatinga (Dias et al, 2010). Recentemente Martins & Assalim (2019) resgataram 02 indivíduos no município de Riacho Frio, região sul do Piauí, em um fragmento florestal de Cerrado.

*Trachycephalus atlas* e *T. nigromaculatus* são espécies morfologicamente semelhantes entre si, inclusive segundo Bokermann (1966). De acordo com a descrição original *T. atlas* não tem manchas vermelhas durante a vida adulta e apresenta placa cefálica posterior mais pronunciada, maior distância inter-orbital e cabeça mais larga e alongada (Figura 1).

Ambas possuem cabeça plana, muito áspera, apresentando co-ossificação craniana com a pele, sendo conhecidas como rãs arborícolas cabeça de casco (*casque-headed tree frog*). Essas características estão geralmente associadas a minimizar a perda de água e proteção contra predadores (Jared et al., 1999).



**Figura 1.** Espécies estudadas: A - *Trachycephalus atlas* (foto: F.A. Juncá), Município de Jeremoabo, BA, Brasil e B - *T. nigromaculatus* (foto: I. Nunes), Município de Caetité, BA, Brasil.

Magalhães et al. (2011) atribuiu a ocorrência de somente a espécie *T. atlas* em regiões semiáridas, em áreas entre a Floresta Atlântica e Caatinga, mas Dias et al. (2010) já relatava a ocorrência de *T. nigromaculatus* na mesma fitofisionomia vegetal de transição. A identificação precisa das espécies é crucial para avaliar as distribuições e a dinâmica populacional, sendo desafiador para espécies com morfologia similar (Borzée et al., 2013).

Anteriormente, as espécies *Trachycephalus atlas* e *Trachycephalus nigromaculatus* apresentavam ocorrência e distribuição alopátrica, mas novos registros, além de ampliar o conhecimento da distribuição de *T. nigromaculatus*, revelaram a presença desta espécie em ambiente completamente novo: áreas de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica (Dias et al., 2010). Ainda segundo estes autores, como *T. nigromaculatus* é um reprodutor explosivo que vive grande parte de sua vida nas copas das árvores, sendo dificilmente encontrado em levantamentos rápidos ou trabalhos em campo de curta duração, presume-se que a espécie é mais amplamente distribuída no Estado da Bahia do que se pensava anteriormente. Assim sendo, a dificuldade na diagnose destas duas espécies, devido a sua similaridade morfológica, representa impedimento para o avanço de estudos taxonômicos e evolutivos.

Segundo Rossa-Feres et al. (2011), a ausência de conhecimento dos processos envolvidos na origem e manutenção da biodiversidade de anfíbios no Brasil é uma lacuna importante a ser preenchida, pois grande parte dos estudos em ecologia de anuros são de cunho descritivo, o que é natural dada a grande diversidade de espécies e o desconhecimento de aspectos básicos de história natural. Além disso, evidenciam a carência no conhecimento de processos que regulam populações e comunidades. A

descoberta de novas espécies é um passo fundamental na tarefa de descrever a biodiversidade, enquanto o passo subsequente igualmente importante é a definição das faixas geográficas desses indivíduos (Clemente-Carvalho et al., 2008).

## 2. OBJETIVO

A fim de tentar contornar quaisquer dificuldades e incertezas inerentes à identificação baseada somente em caracteres morfológicos usuais, foi proposto como objetivo principal desse estudo aferir a eficiência do uso da técnica de morfometria geométrica como ferramenta taxonômica para o estudo de espécies com crânio de derme ossificada no gênero *Trachycephalus*, utilizando as duas espécies alvo deste estudo como modelos.

Entre os objetivos específicos destacamos:

(i) Avaliar se existe discriminação notável na forma do crânio das espécies de *Trachycephalus atlas* e *Trachycephalus nigromaculatus*;

(ii) Avaliar a existência de variação morfológica do crânio entre os sexos nas duas espécies;

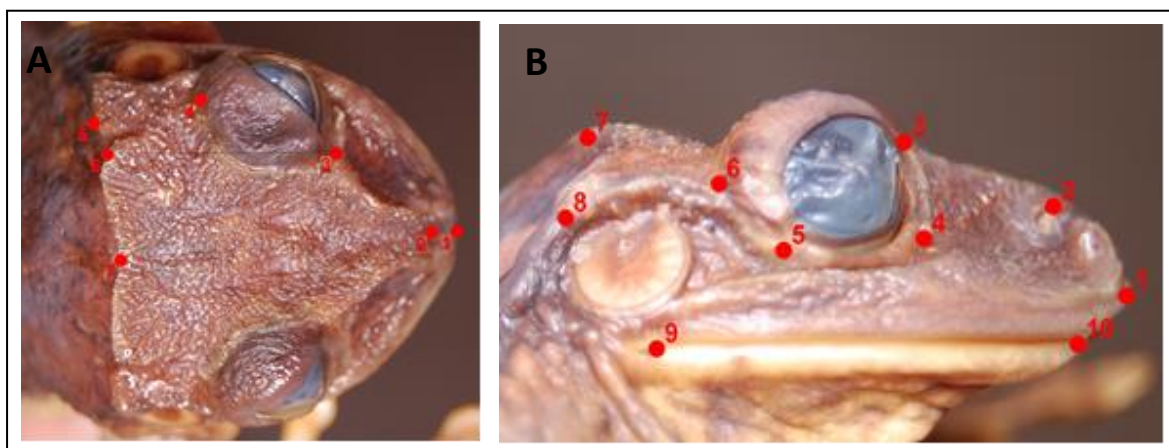
(iii) Avaliar a existência de variação morfológica do crânio entre as regiões geográficas amostradas em ambas espécies.



Cada espécime foi fotografado quatro vezes, sendo duas fotos para cada vista (dorsal e lateral), com câmera digital marca Nikon modelo D3100, utilizando plataforma fotográfica que mantinha a câmera fixada a uma altura padrão (aproximadamente 30 cm), com os objetos colocados a 5 cm de distância da lente objetiva. Uma escala (1 cm) foi utilizada ao lado de cada exemplar, a fim de se considerar as variações no tamanho durante o posicionamento dos marcos anatômicos. Informações sobre o número de tombo, localidade e sexo dos indivíduos foram anotados em uma ficha específica.

### 3.2. Definição e digitalização de marcos anatômicos

Para analisar a variação da forma do crânio foram definidos marcos anatômicos (*landmarks*) a partir de 17 referências anatômicas, sendo 07 (sete) em vista dorsal e 10 (dez) em vista lateral (Figura 3). Estes marcos foram escolhidos com base na certeza da sua localização em todos os exemplares e situaram-se em áreas de articulação entre ossos ou que constituíam seu ápice ou maior curvatura, definidos para apenas um lado do crânio. Desde que o interesse do estudo não seja focado em componentes assimétricos, a utilização de pontos de referência de um único lado de uma estrutura simétrica é reconhecida (Clemente-Carvalho et al., 2011).



**Figura 3.** Marcos anatômicos utilizados para análise da morfometria geométrica dos crânios de *Trachycephalus* sp. **A - Vista dorsal:** 1- extremidade mediana do focinho; 2- articulação anterior do osso nasal; 3- margem posterior da crista do canto rostral; 4- região posterior do olho em contato com o frontoparietal; 5- região posterior do ramo ótico do esquamosal; 6- ponto na extremidade posterior do frontoparietal de uma linha perpendicular imaginária partindo do ponto 3; 7- articulação medial posterior entre os frontoparietais. **B – Vista lateral:** 1- extremidade anterior do focinho; 2- ponto superior da abertura nasal; 3- extremidade superior da crista orbital; 4- extremidade inferior da crista orbital; 5- extremidade anterior do ramo zigomático; 6- articulação anterior entre o ramo zigomático do esquamosal e frontoparietal; 7- borda latero-posterior do frontoparietal; 8- extremidade posterior do ramo ótico do esquamosal; 9- comissura bucal posterior; 10- comissura bucal anterior.

Após a digitalização das imagens, foram criados arquivos do tipo TPS para as imagens de cada vista do crânio utilizando o programa tpsUtil versão 1.78 (Rohlf, 2019). Em seguida, os marcos anatômicos foram digitalizados em cada imagem com o programa tpsDig2 versão 2.31 (Rohlf, 2017). A ordem de introdução dos marcos anatômicos foi a mesma para cada indivíduo, para estabelecer a homologia espacial das estruturas mediante suas coordenadas.

### **3.3. Morfometria geométrica**

Todas as análises foram feitas separadamente para as vistas dorsal e lateral. Para tanto, foi selecionado o programa *MorphoJ* (Klingenberg, 2011), versão atualizada 1.07.

#### **3.3.1. Análise Generalizada de Procrustes (GPA)**

Com o conjunto de dados obtidos foi realizada uma sobreposição pela Análise Generalizada de Procrustes (*GPA* em inglês), para remover quaisquer informações não relacionadas à forma, como tamanho, orientação e posição dos espécimes. Eliminando esses efeitos, as variáveis tornam-se apenas variáveis de forma e podem ser utilizadas para comparar as diferenças com representações gráficas (Adams et al., 2004). Primeiramente os centroides de cada configuração são movidos para a origem por translação, retirando assim o efeito de posição. Numa segunda etapa todas as configurações são escalonadas a um tamanho comum (o chamado tamanho do centroide). Finalmente, as configurações são rotacionadas para minimizar as diferenças entre marcos anatômicos correspondentes (Adams et al., 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). A análise generalizada de Procrustes é feita em relação a uma configuração média, denominada configuração consenso.

#### **3.3.2. Análise de Componentes Principais (PCA)**

Em geral, as análises multivariadas se dividem entre aquelas que consideram amostra total como grupo conceitual único e aquelas que utilizam grupos pré-definidos pelo investigador. As primeiras são úteis para detectar subdivisões do grupo principal e as demais para verificar a estrutura de grupos separados. As análises pertencentes ao primeiro grupo são basicamente exploratórias e permitem visualizar as ordenações dos indivíduos na pesquisa (Jaramillo-O, 2011).

Portanto para determinar de forma geral os eixos principais que explicam a maior parte das variações na forma dos espécimes, será realizada primeiramente a Análise de

Componentes Principais (*PCA* em inglês). A *PCA* é uma rotação do espaço multidimensional, para encontrar os eixos de maior variância da amostra, onde cada componente principal é um eixo linear das variáveis originais. O primeiro componente principal (PC1) é gerado de tal forma que capture a maior variância possível. O segundo componente principal (PC2) é ortogonal ao primeiro (PC1) e captura tanta variância restante quanto possível, e assim sucessivamente (Peres-Neto et al., 1995). O número de componentes principais pode ser igual ao número dos caracteres selecionados, entretanto, somente os 2 ou 3 primeiros deverão ser interpretados em um senso biológico, pois normalmente explicam a maior porcentagem de variação dos dados (Reyment et al., 1981)

### 3.3.3. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Função Discriminante

As Análises de Variáveis Canônicas (três ou mais grupos) caracterizam-se basicamente pela hipótese da existência de grupos que são estabelecidos *a priori*. A partir da definição dos grupos, as análises procuram gerar novos eixos que maximizem a variância existente entre grupos, e minimizem a variância dentro dos grupos (Webster & Sheets, 2010).

A análise de função discriminante corresponde a uma CVA em que se compara apenas 01 (um) par de grupos. Esta técnica de análise multivariada frequentemente é utilizada com o objetivo de diferenciar populações e/ ou classificar objetos em grupos pré-definidos quando a variável dependente é categórica (ex. sexo) e as variáveis independentes são métricas (ex. medida lineares, coordenadas da forma de Procrustes, tamanho do centroide). O objetivo principal é construir um conjunto de discriminantes que podem ser utilizados para descrever ou caracterizar a separação dos grupos utilizando um subconjunto de variáveis, para analisar a contribuição das variáveis originais e avaliar o grau de separação. Dessa forma, foram realizadas análises discriminantes entre espécies (*T. atlas* e *T. nigromaculatus*), sexos (machos e fêmeas) e localidades específicas, com o intuito de se comparar com os resultados obtidos pela CVA.

Para as análises de localidade foi utilizado como referencial o estado brasileiro cujo município estava registrado para o espécime, na respectiva coleção. Os exemplares de *Trachycephalus atlas* foram agrupados em 4 (quatro) estados diferentes: Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Sergipe. Também foi utilizado como grupo os exemplares da série-tipo (parátipos), cujo local é Maracás, município da Bahia (localidade-tipo). O holótipo foi destacado do referido grupo para ilustração, mas como único, não foi usado no processo de

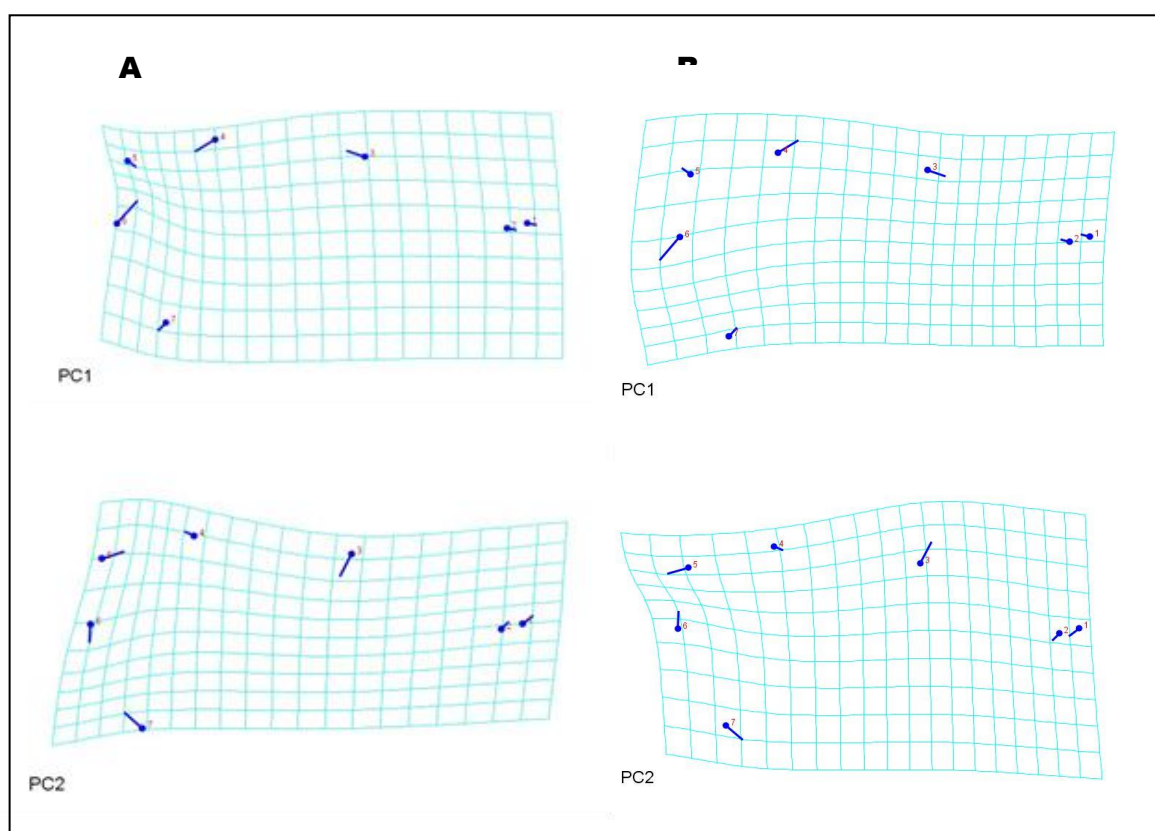
comparação como grupo. Ainda foram incluídos em um grupo separado dois exemplares cuja procedência não foi registrada, totalizando 6 (seis) grupos para comparação. O grupo da série-tipo foi usado como referência da espécie, pois representa o conjunto dos exemplares nos quais o autor baseou a descrição da espécie. As análises da Função Discriminante foram realizadas comparando a série-tipo com os demais grupos, garantindo assim a representação para a espécie.

## 4. RESULTADOS

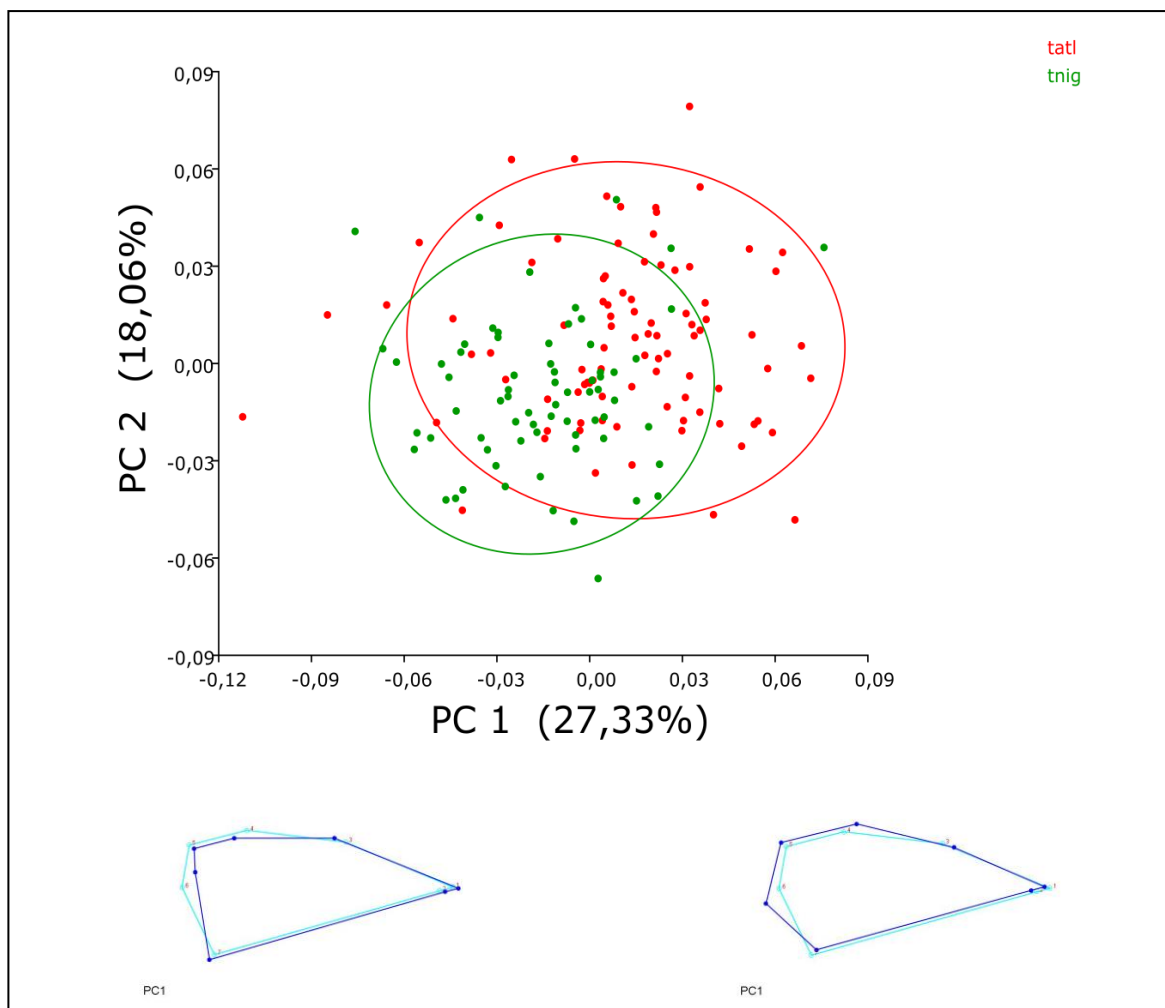
### 4.1. Variação da forma do crânio entre as espécies – *T. atlas* e *T. nigromaculatus*

#### 4.1.1 Vista Dorsal

Foram incluídos na análise todos os 160 exemplares, visto que a análise de “outliers” mostrou um resultado próximo ao esperado em ambas vistas. Após a superimposição Procrustes, a Análise de Componentes Principais (PCA), baseada na matriz de covariância, apresentou variância de 45,39% para a vista dorsal nos dois primeiros componentes, sendo 27,33% para o primeiro (PC1) e 18,06%, o segundo (PC2). A variação da forma (positiva e negativa) associada aos dois primeiros componentes está demonstrada na Figura 4. O PC1 que configura o alongamento posterior do frontoparietal apresentou tendência a separação das espécies (Figura 5).

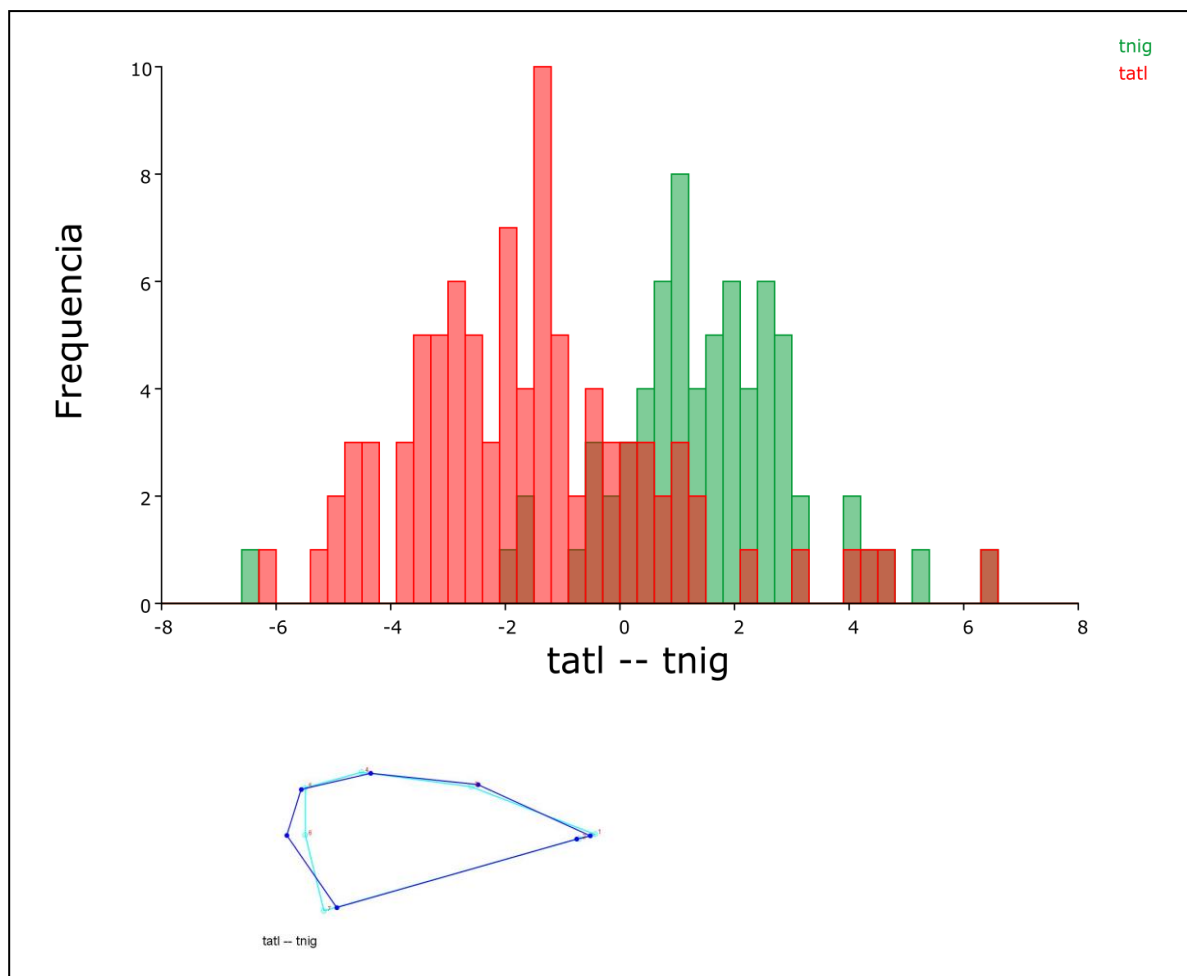


**Figura 4.** Variações da forma para cada Componente Principal, vista dorsal, representação: grade de deformação: **A**- variação negativa; **B**- variação positiva.



**Figura 5.** Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista dorsal, no espaço reduzido de dois eixos (PC1  $\times$  PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada espécie: *T. atlas* (vermelho) e *T. nigromaculatus* (verde). Embaixo do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades do eixo (azul escuro).

A análise da Função Discriminante para os dados da vista dorsal reforçou a possibilidade da separação das espécies, com demonstração da significância estatística (Tabela 1). O resultado encontrado corroborou com os dados encontrados na PCA referentes ao PC1, demonstrando que *T. atlas* tende a apresentar uma forma alongada de cabeça (Figura 6).



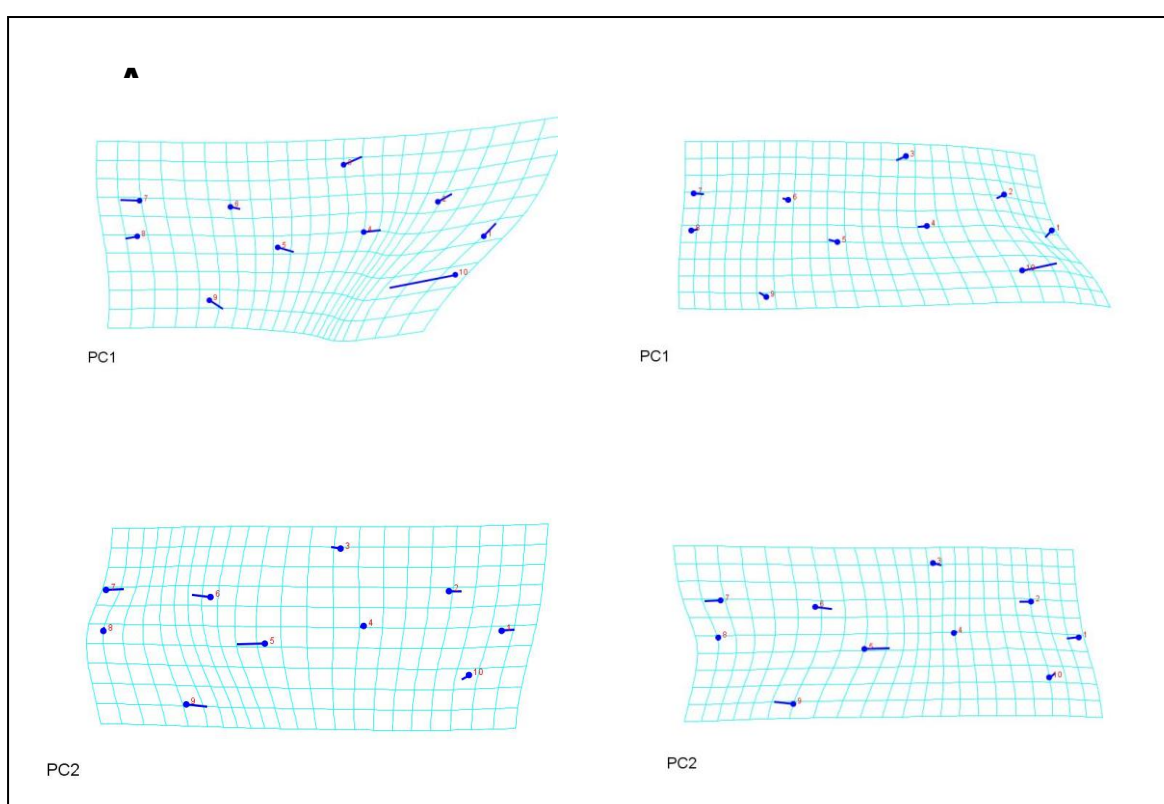
**Figura 6.** Análise da Função Discriminante da vista dorsal para as espécies: *T. atlas* (vermelho) e *T. nigromaculatus* (verde). Embaixo do gráfico são mostradas as variações da forma: em azul escuro *T. atlas* e em azul claro *T. nigromaculatus*.

**Tabela 1.** Análise da Função Discriminante entre espécies – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de  $P < 0,0001$ .

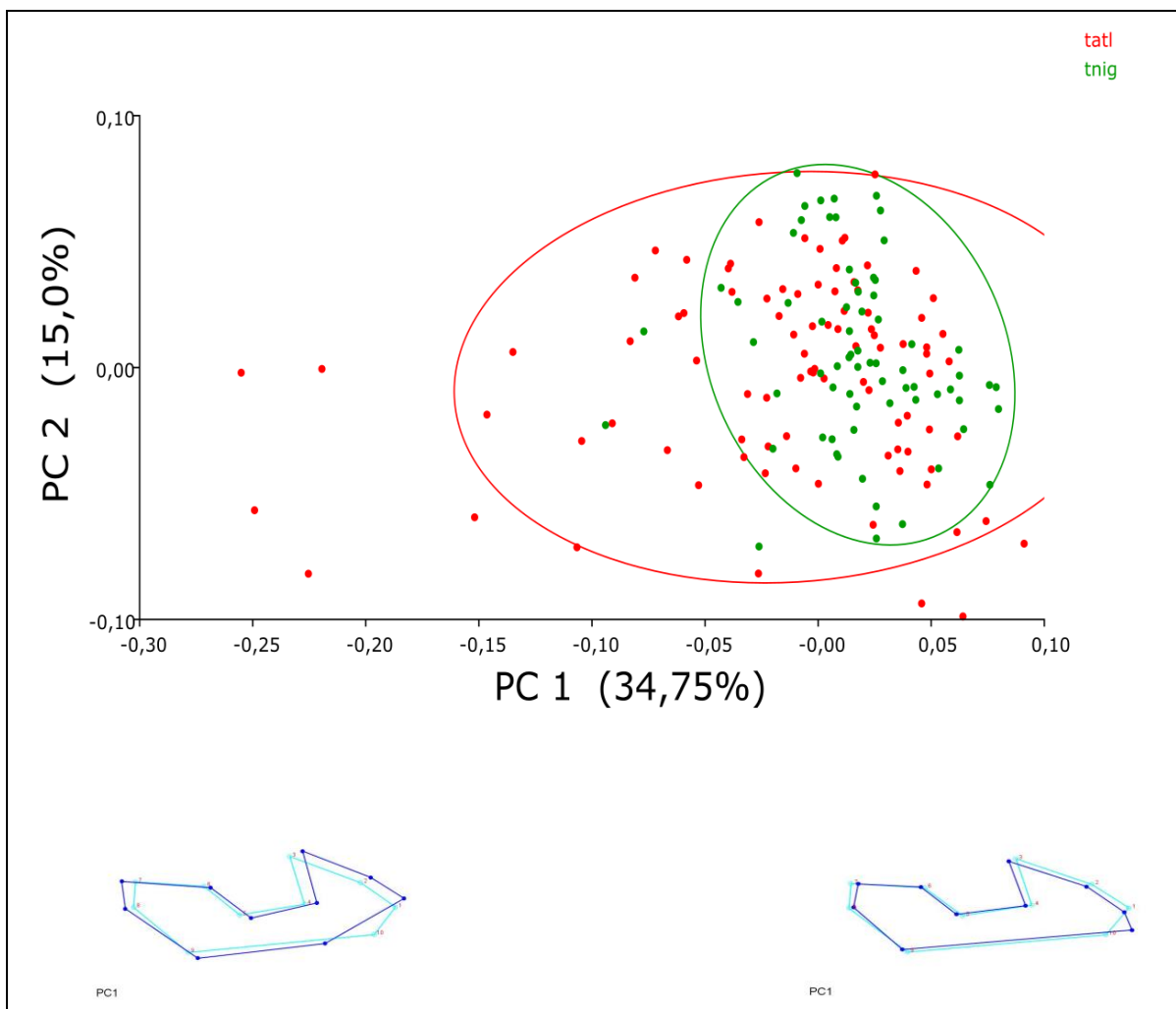
|      | tatl        | tnig        | Total     |
|------|-------------|-------------|-----------|
| tatl | 72 (79,12%) | 19 (20,87%) | 91 (100%) |
| tnig | 10 (14,49%) | 59 (85,50%) | 69 (100%) |

#### 4.1.2 Vista Lateral

Para a vista lateral os valores encontrados nos dois primeiros componentes representaram 49,75%, sendo: 34,75% (PC1) e 15,00% (PC2). A variação da forma (positiva e negativa) associada aos dois primeiros componentes está demonstrada na Figura 7. A variação positiva do PC1 que está relacionado com a inclinação e alongamento do focinho agrupou os exemplares de *T. nigromaculatus*, mostrando tendência à separação da espécie (Figura 8).

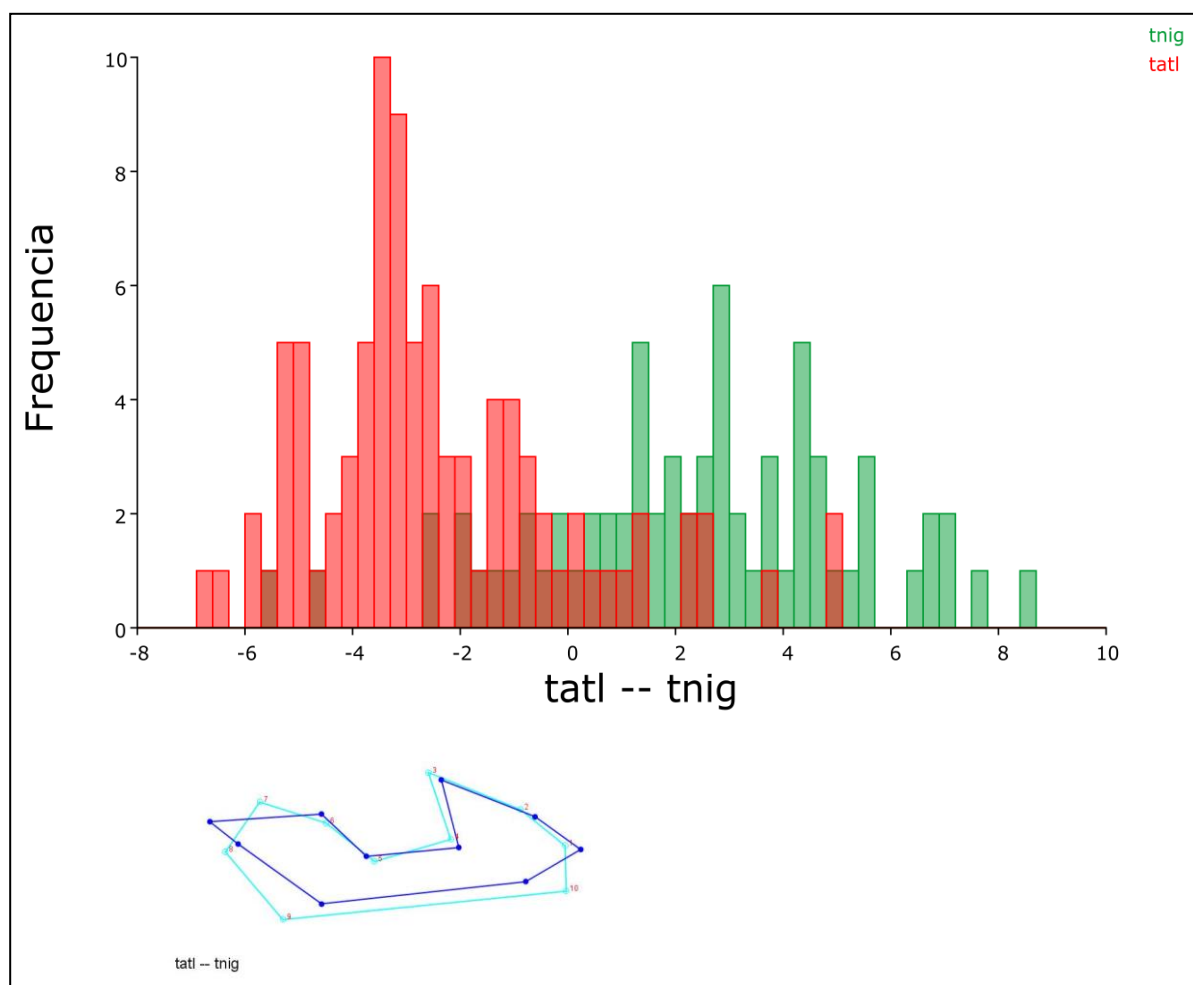


**Figura 7.** Variações da forma para cada Componente Principal, vista lateral, representação: grade de deformação: **A**- variação negativa; **B**- variação positiva.



**Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista lateral, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada espécie: *T. atlas* (vermelho) e *T. nigromaculatus* (verde). Embaixo do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades do eixo (azul escuro).

Para a vista lateral, a análise da Função Discriminante revelou também uma separação das espécies, referente ao alongamento do focinho, sugerindo que *T. atlas* possui a linha crista orbital / narina mais inclinada que *T. nigromaculatus* (Figura 9). A tabela 2 mostra os resultados da validação cruzada, validando a significância estatística dos dados encontrados.



**Figura 9.** Análise da Função Discriminante da vista lateral para as espécies: *T. atlas* (vermelho) e *T. nigromaculatus* (verde). Embaixo do gráfico são mostradas as variações da forma: em azul escuro *T. atlas* e em azul claro *T. nigromaculatus*.

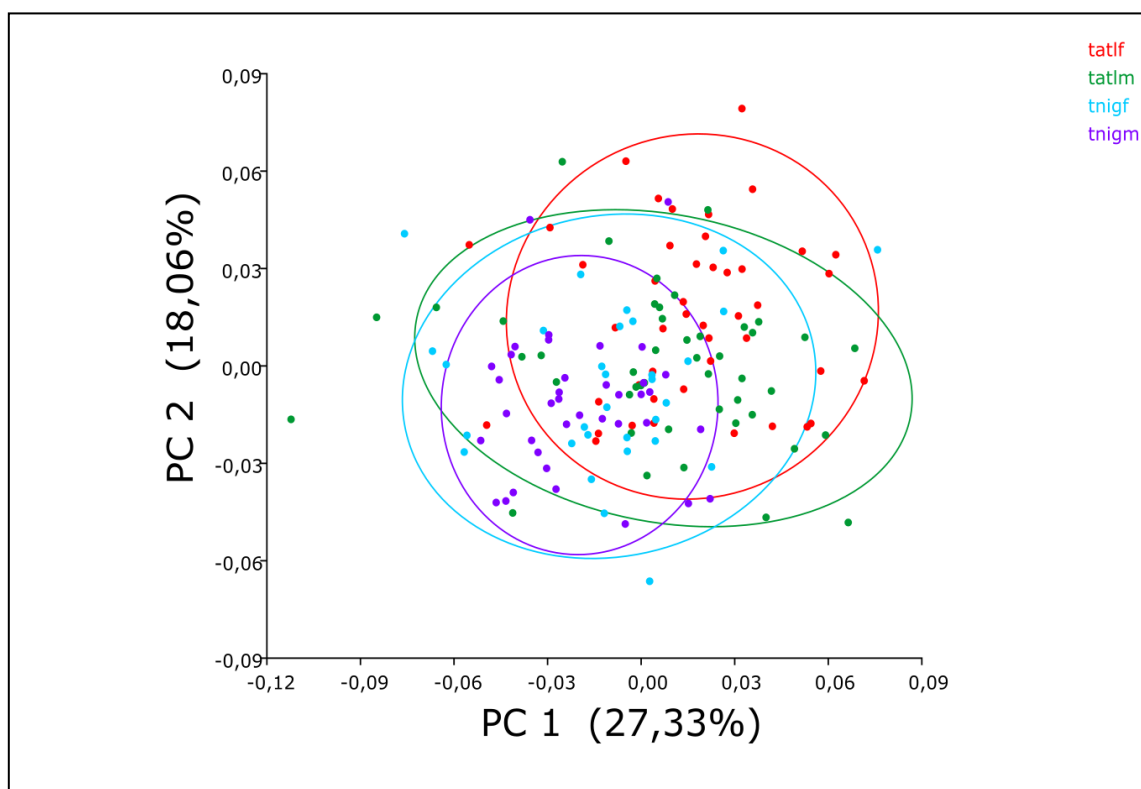
**Tabela 2.** Análise da Função Discriminante entre espécies – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de  $P < 0,0001$ .

|      | tatl        | tnig        | Total     |
|------|-------------|-------------|-----------|
| tatl | 77 (84,61%) | 14 (15,38%) | 91 (100%) |
| tnig | 14 (20,28%) | 55 (79,71%) | 69 (100%) |

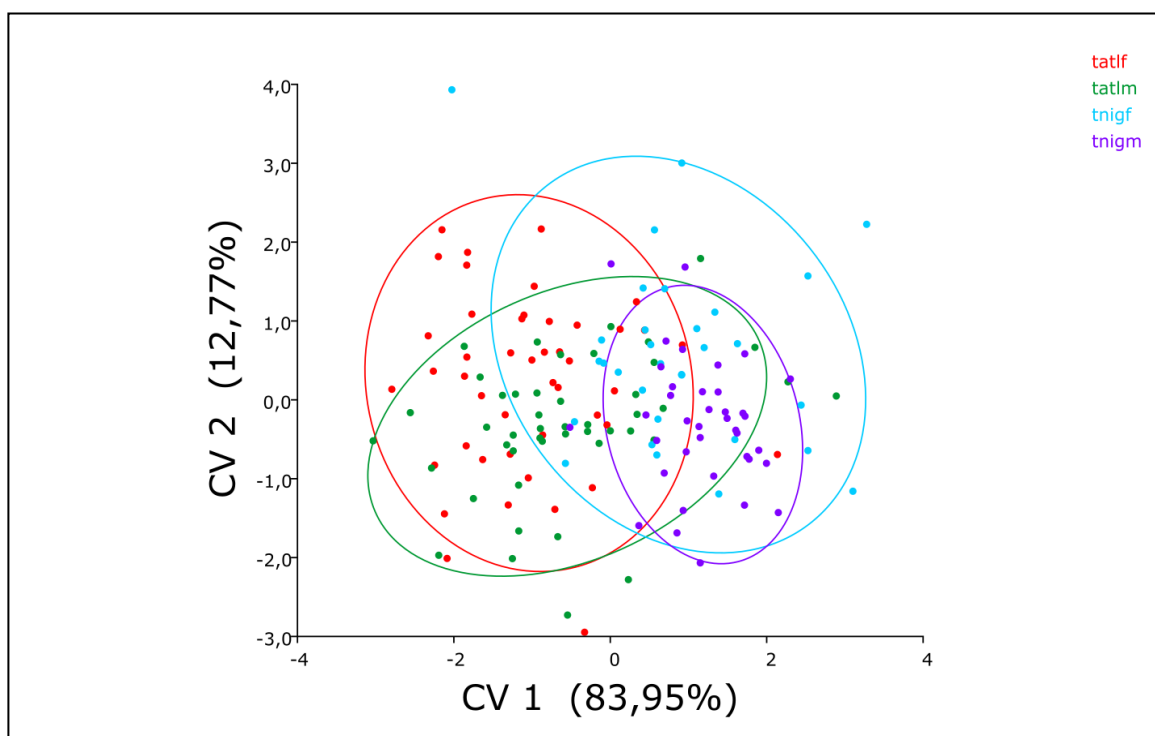
## 4.2. Variação da forma do crânio entre os sexos – *T. atlas* e *T. nigromaculatus*

### 4.2.1 Vista Dorsal

Para as análises foram considerados os seguintes grupos: *T. atlas* fêmea, *T. atlas* macho, *T. nigromaculatus* fêmea e *T. nigromaculatus* macho.



**Figura 10.** Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista dorsal, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: *T. atlas* machos (verde), *T. atlas* fêmeas (vermelho), *T. nigromaculatus* machos (roxo) e *T. nigromaculatus* fêmeas (azul).



**Figura 11.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) para a vista dorsal. São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: *T. atlas* machos (verde), *T. atlas* fêmeas (vermelho), *T. nigromaculatus* machos (roxo) e *T. nigromaculatus* fêmeas (azul).

**Tabela 3.** Análise da Função Discriminante entre sexo *T. atlas* – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,1691.

|        | Fêmeas      | Machos      | Total     |
|--------|-------------|-------------|-----------|
| Fêmeas | 23 (51,11%) | 22 (48,88%) | 45 (100%) |
| Machos | 20 (43,47%) | 26 (56,52%) | 46 (100%) |

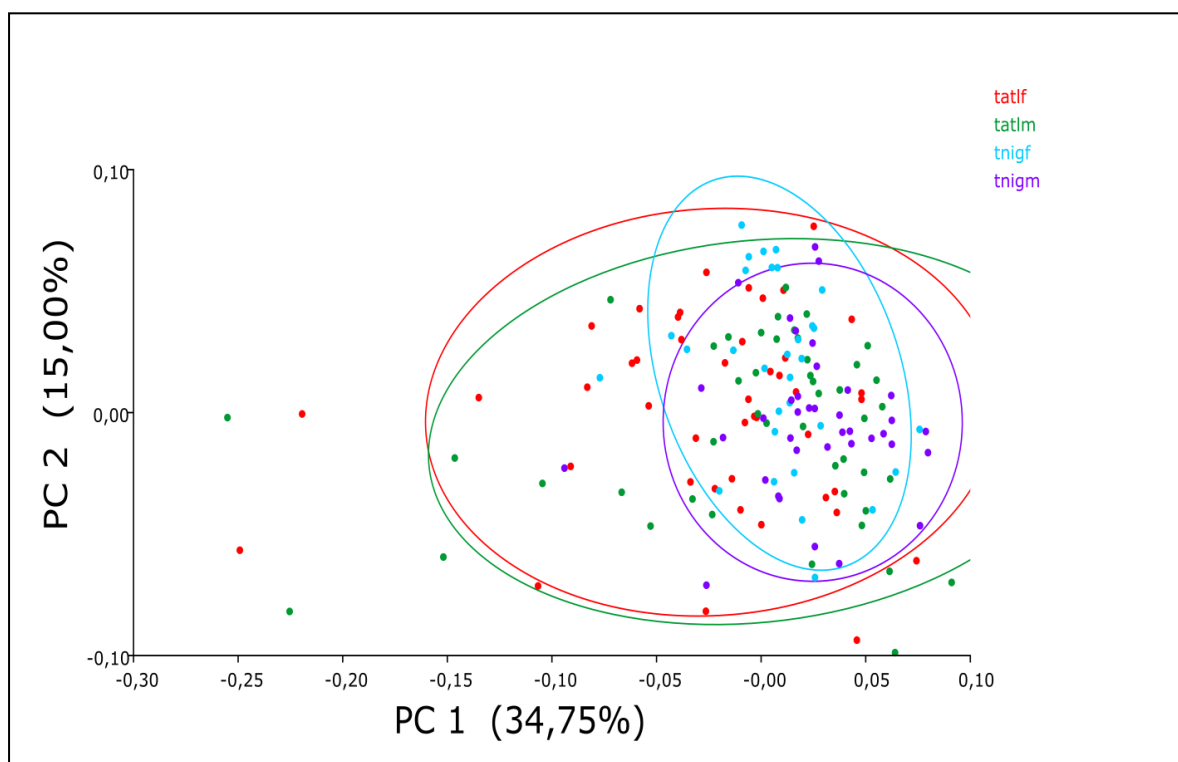
**Tabela 4.** Análise da Função Discriminante entre sexo *T. nigromaculatus* – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,2067.

|        | Fêmeas      | Machos      | Total     |
|--------|-------------|-------------|-----------|
| Fêmeas | 17 (54,83%) | 14 (45,16%) | 31 (100%) |
| Machos | 15 (39,47%) | 23 (60,52%) | 38 (100%) |

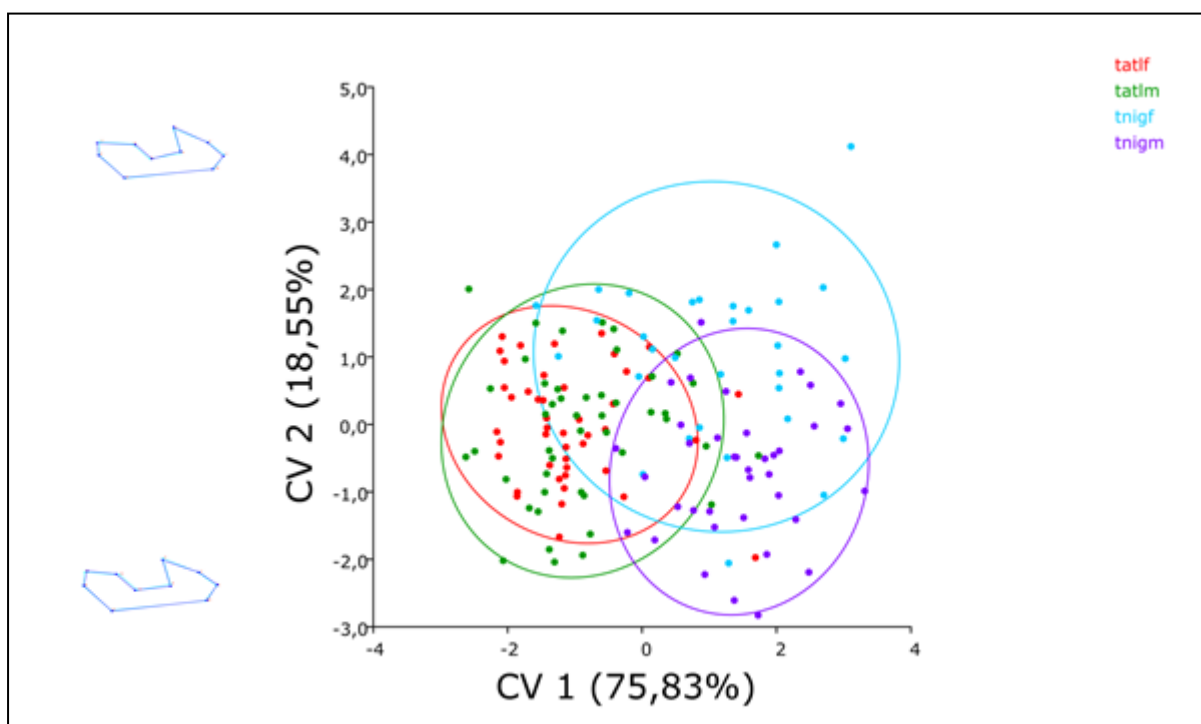
Nenhuma das espécies apresentou diferença significativa entre os sexos para a vista dorsal. O valor de P encontrado para ambas, através da análise da Função Discriminante, foi indicativo para a confirmar a ausência de dimorfismo sexual na morfologia dorsal do crânio.

#### 4.2.2 Vista Lateral

Para as análises foram utilizados os mesmos grupos anteriores: *T. atlas* fêmea, *T. atlas* macho, *T. nigromaculatus* fêmea e *T. nigromaculatus* macho.



**Figura 12.** Análise de Componentes Principais (PCA) para a vista lateral, no espaço reduzido de dois eixos (PC1 × PC2). São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: *T. atlas* machos (verde), *T. atlas* fêmeas (vermelho), *T. nigromaculatus* machos (roxo) e *T. nigromaculatus* fêmeas (azul).



**Figura 13.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) para a vista lateral. São mostradas as elipses de 90% de confiança para cada grupo analisado: *T. atlas* machos (verde), *T. atlas* fêmeas (vermelho), *T. nigromaculatus* machos (roxo) e *T. nigromaculatus* fêmeas (azul). Ao lado do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades do eixo (azul escuro).

**Tabela 5.** Análise da Função Discriminante entre sexo *T. atlas* – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,6694.

|        | Fêmeas      | Machos      | Total     |
|--------|-------------|-------------|-----------|
| Fêmeas | 21 (46,66%) | 24 (53,33%) | 45 (100%) |
| Machos | 23 (50%)    | 23 (50%)    | 46 (100%) |

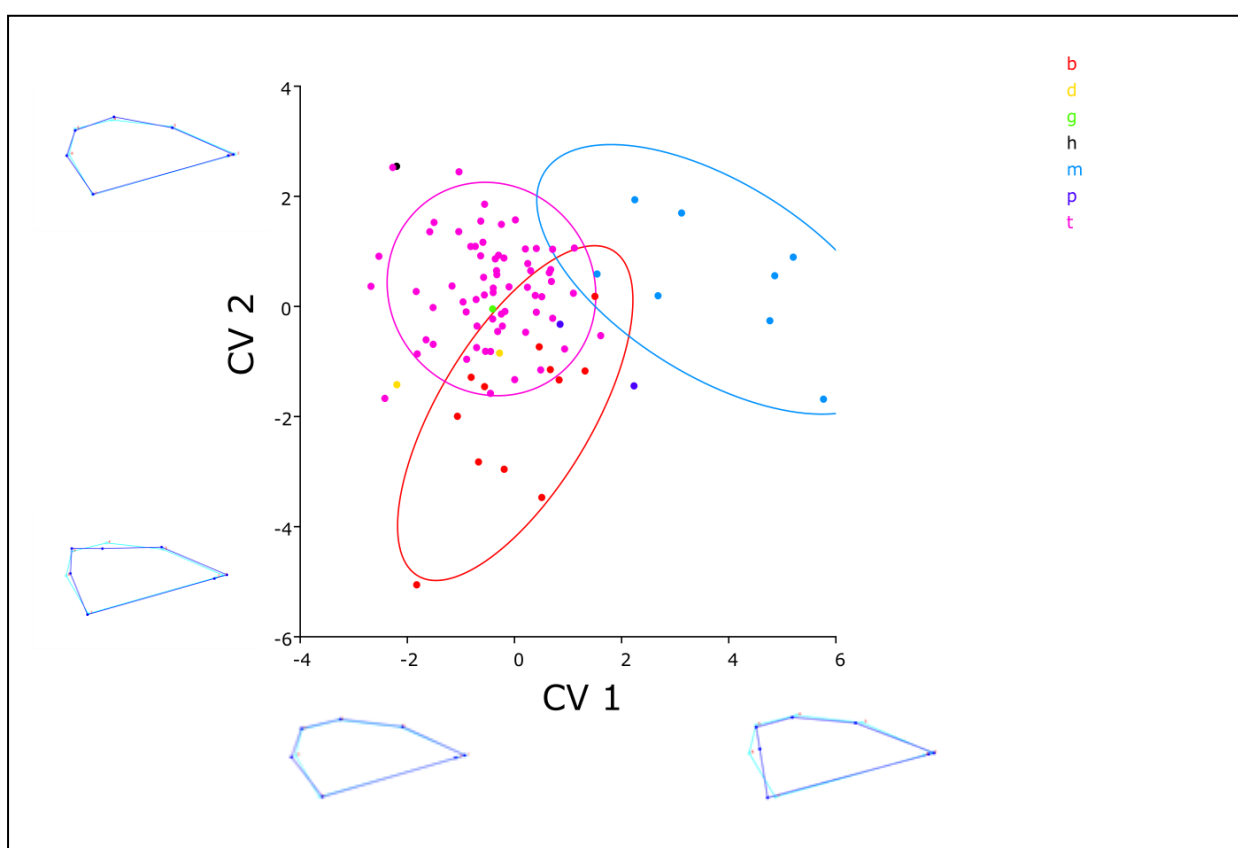
**Tabela 6.** Análise da Função Discriminante entre sexo *T. nigromaculatus* – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,0029.

|        | Fêmeas      | Machos      | Total     |
|--------|-------------|-------------|-----------|
| Fêmeas | 21 (67,74%) | 10 (32,25%) | 31 (100%) |
| Machos | 14 (36,84%) | 24 (63,15%) | 38 (100%) |

A Figura 13 mostra uma discreta separação dos sexos em *T. nigromaculatus*, para o eixo do CV2. Observa-se que os machos tendem a apresentar um deslocamento do marco 7, tornando a silhueta mais alongada na área posterior. Essa diferença é corroborada com a análise da Função Discriminante (Tabela 6).

#### 4.3. Variação da forma do crânio entre localidades – *T. atlas* e *T. nigromaculatus*

##### 4.3.1 Análise dos dados de localidade de *T. atlas*



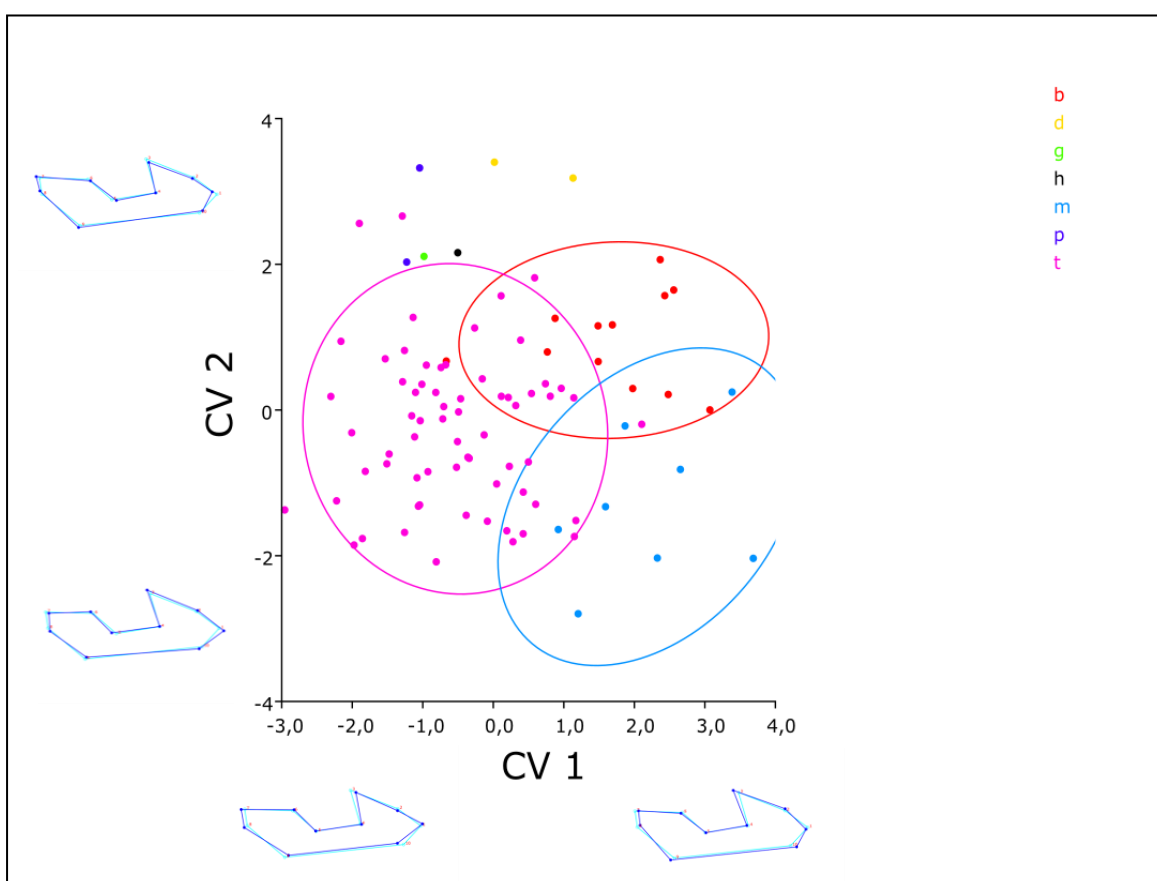
**Figura 14.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidade para *Trachycephalus atlas* - vista dorsal: b (Bahia); d (desconhecido); g (Sergipe); h (holótipo; Maracás – Bahia); m (Minas Gerais); p (Pernambuco) e t (série- tipo; Maracás - Bahia). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro).

**Tabela 7.** Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* – conjunto de dados dorsal. Valores para cada comparativo: t (serie-tipo; Maracás – Bahia); b (Bahia); m (Minas Gerais); d (desconhecido); g (Sergipe) e p (Pernambuco). Entre parênteses o número de exemplares de cada região.

|               | <b>b (12)</b> | <b>m (8)</b> | <b>d (2)</b> | <b>g (1)</b> | <b>p (2)</b> |
|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>t (66)</b> | <0.0001       | <0.0001      | 0.0974       | 0.9453       | 0.0203       |

A análise mostrou que os valores de P, na comparação do grupo da série-tipo com os demais, apresenta diferença estatística na forma do crânio, em vista dorsal, com os grupos do próprio estado da Bahia, assim como Minas Gerais e Pernambuco (Tabela 7).

Para a vista lateral de *T. atlas* foi realizado o mesmo procedimento e mesmos grupos de análise (Figura 15).



**Figura 15.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidade para *Trachycephalus atlas* - vista lateral: b (Bahia); d (desconhecido); g (Sergipe); h (holótipo; Maracás – Bahia); m (Minas Gerais); p (Pernambuco) e t (série-tipo; Maracás - Bahia). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro).

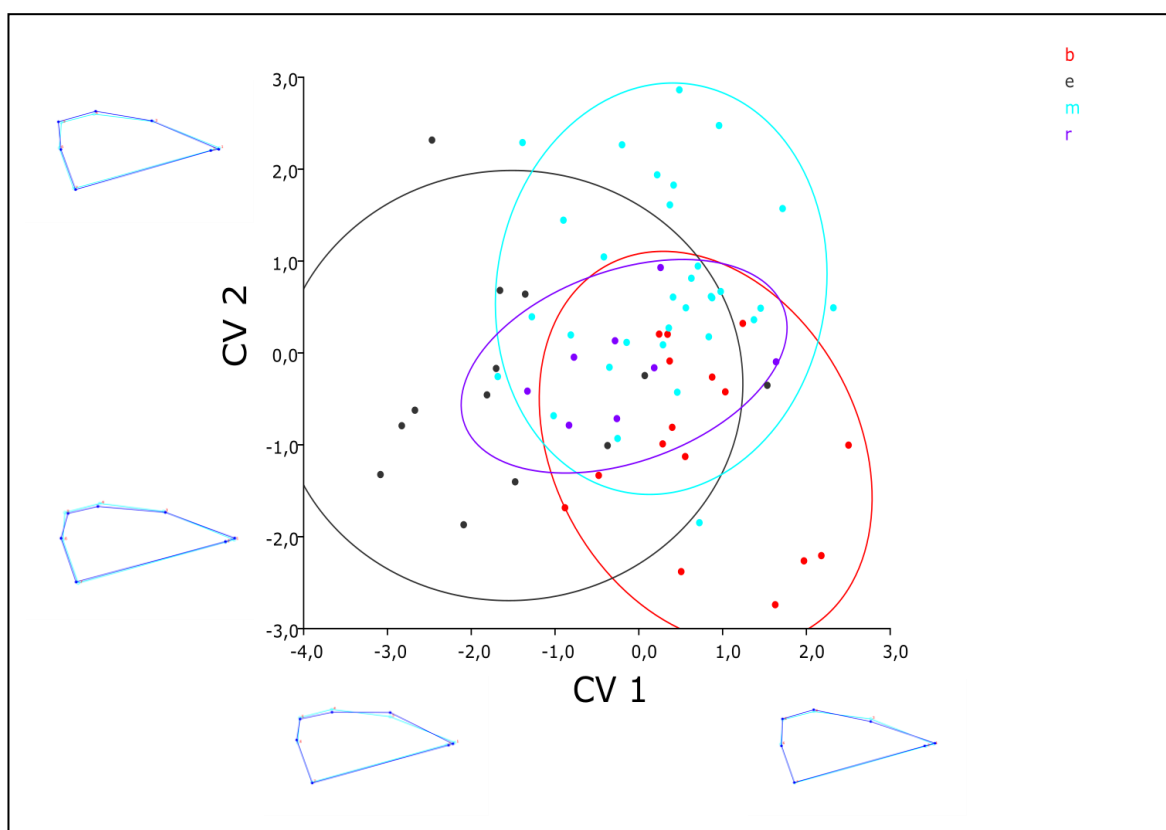
**Tabela 8.** Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* – conjunto de dados lateral. Valores para cada comparativo: t (serie-tipo; Maracás – Bahia); b (Bahia); m (Minas Gerais); d (desconhecido); g (Sergipe) e p (Pernambuco). Entre parênteses o número de exemplares de cada região.

|               | <b>b (12)</b> | <b>m (8)</b> | <b>d (2)</b> | <b>g (1)</b> | <b>p (2)</b> |
|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>t (66)</b> | 0.0001        | 0.0002       | 0.0811       | 0.2564       | 0.0365       |

Os resultados da vista lateral foram semelhantes ao da vista dorsal, indicando uma diferença estatística do grupo da série-tipo com os grupos da Bahia, Minas Gerais e Pernambuco. Deve-se levar em consideração que a possível semelhança com os dois outros grupos (Sergipe e Desconhecido) pode estar distorcida, devido ao número muito reduzido de exemplares (Tabela 8).

#### 4.3.1 Análise dos dados de localidade de *T. nigromaculatus*

Os exemplares de *Trachycephalus nigromaculatus* foram agrupados em 4 (quatro) estados diferentes: Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (Figura 16).



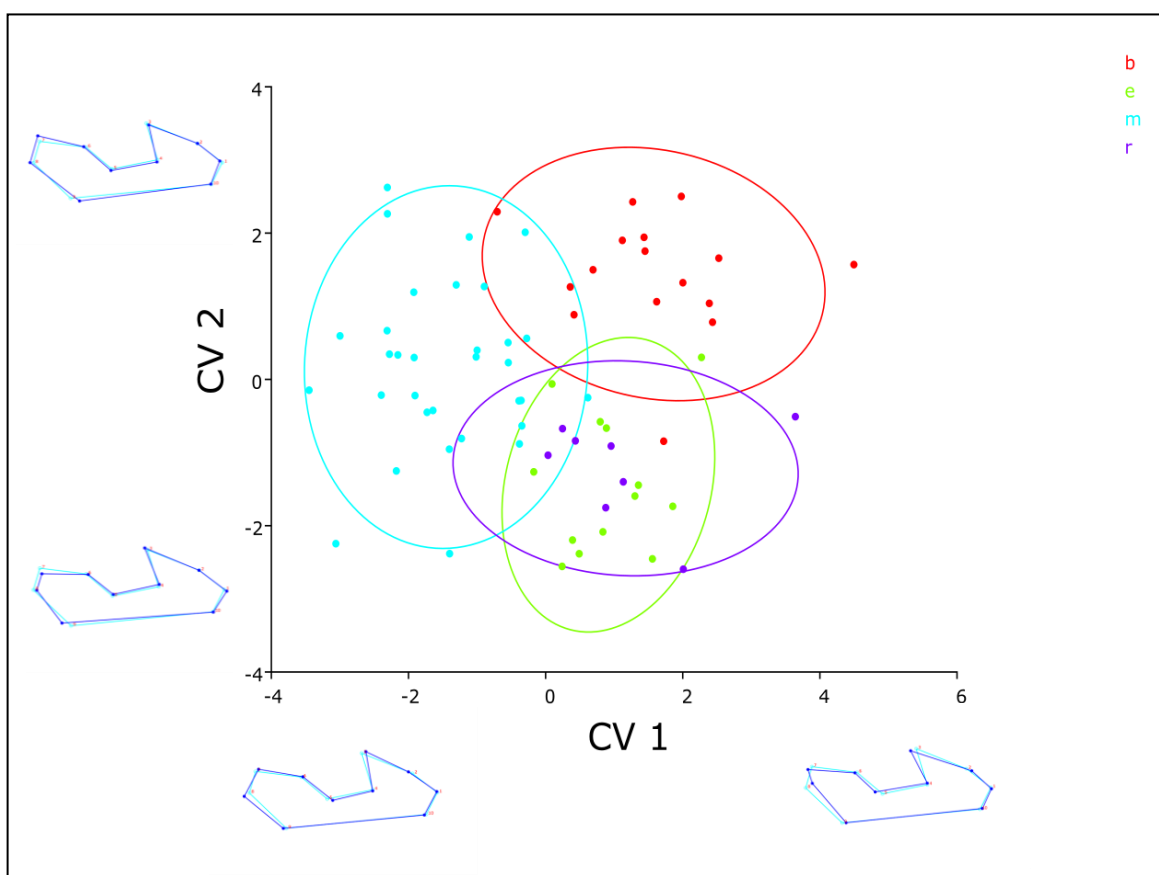
**Figura 16.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidades para *Trachycephalus nigromaculatus* - vista dorsal: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro).

**Tabela 9.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. nigromaculatus* – conjunto de dados dorsal. Valores de P para cada comparativo: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Entre parênteses o número de exemplares de cada região.

|               | <b>b (16)</b> | <b>e (13)</b> | <b>m (32)</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>e (13)</b> | 0.039         |               |               |
| <b>m (32)</b> | 0.0029        | 0.011         |               |
| <b>r (8)</b>  | 0.3454        | 0.5564        | 0.4462        |

Apenas o grupo do Rio de Janeiro apresentou semelhança na forma do crânio com os demais grupos. As análises seguintes para a vista dorsal indicaram uma diferença significativa entre os exemplares de *T. nigromaculatus* entre os outros estados avaliados (Tabela 9).

Para a vista lateral de *T. nigromaculatus* foi realizado o mesmo procedimento e mesmos grupos de análise (Figura 17).



**Figura 17.** Análise de Variáveis Canônicas (CVA) entre localidades para *Trachycephalus nigromaculatus* - vista lateral: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Nas margens do gráfico são mostradas as configurações de consenso (azul claro) e as variações na forma próximas às extremidades dos eixos (azul escuro).

**Tabela 10.** Valores de P para a Análise da Função Discriminante entre localidades *T. nigromaculatus* – conjunto de dados lateral. Valores de P para cada comparativo: b (Bahia); e (Espírito Santos); m (Minas Gerais) e r (Rio de Janeiro). Entre parênteses o número de exemplares de cada região.

|               | <b>b (16)</b> | <b>e (13)</b> | <b>m (32)</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>e (13)</b> | 0.0025        |               |               |
| <b>m (32)</b> | <0.0001       | 0.0005        |               |
| <b>r (8)</b>  | 0.0015        | 0.5109        | 0.0038        |

Observa-se que somente os exemplares do Rio de Janeiro e Espírito Santos não apresentam diferença significativa entre si. Os resultados para as demais regiões apontam a existência de diferença entre os exemplares de *T. nigromaculatus* para a vista lateral (Tabela10).

Como o estado da Bahia apresenta a maior intersecção das duas espécies foi realizada uma análise comparativa entre os grupos de *T. atlas* da Bahia com *T. nigromaculatus* da Bahia, em ambas vistas, para fêmeas e machos (Tabelas 11, 12, 13 e 14).

**Tabela 11.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, fêmeas, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,4064.

|             | <b>tatl</b> | <b>tnig</b> | <b>Total</b> |
|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>tatl</b> | 3 (42,85%)  | 4 (57,14%)  | 7 (100%)     |
| <b>tnig</b> | 2 (33,33%)  | 4 (66,66%)  | 6 (100%)     |

**Tabela 12.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, machos, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,1090.

|             | <b>tatl</b> | <b>tnig</b> | <b>Total</b> |
|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>tatl</b> | 4 (80%)     | 1 (20%)     | 5 (100%)     |
| <b>tnig</b> | 5 (50%)     | 5 (50%)     | 10 (100%)    |

**Tabela 13.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, fêmeas, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,9364.

|             | <b>tatl</b> | <b>tnig</b> | <b>Total</b> |
|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>tatl</b> | 5 (71,42%)  | 2 (28,57%)  | 7 (100%)     |
| <b>tnig</b> | 2 (33,33%)  | 4 (66,66%)  | 6 (100%)     |

**Tabela 14.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* x *T. nigromaculatus*, machos, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,9992.

|             | <b>tatl</b> | <b>tnig</b> | <b>Total</b> |
|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>tatl</b> | 3 (60%)     | 2 (40%)     | 5 (100%)     |
| <b>tnig</b> | 1 (10%)     | 9 (90%)     | 10 (100%)    |

Nas análises realizadas não houve diferença entre os grupos da Bahia comparando as espécies. Como os exemplares de *T. atlas* referentes à série-tipo estão incluídos em outro grupo e, também são provenientes do mesmo estado, foi realizada uma nova análise utilizando este grupo com o grupo de *T. nigromaculatus* da Bahia (fêmeas e machos). Os resultados encontrados mostram diferença entre os dois grupos (Tabelas 15, 16, 17 e 18).

**Tabela 15.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo fêmeas x *T. nigromaculatus* fêmeas, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de P: 0,0003.

|                  | <b>tatl (ST)</b> | <b>tnig (BA)</b> | <b>Total</b> |
|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <b>tatl (ST)</b> | 31 (91,17%)      | 3 (8,82%)        | 34 (100%)    |
| <b>tnig (BA)</b> | 3 (50%)          | 3 (50%)          | 6 (100%)     |

**Tabela 16.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo machos x *T. nigromaculatus* machos, Bahia – conjunto de dados dorsal. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de  $P < 0,0001$ .

|                  | <b>tatl(ST)</b> | <b>tnig (BA)</b> | <b>Total</b> |
|------------------|-----------------|------------------|--------------|
| <b>tatl (ST)</b> | 29 (93,54%)     | 2 (6,45%)        | 31 (100%)    |
| <b>tnig (BA)</b> | 1 (10%)         | 9 (90%)          | 10 (100%)    |

**Tabela 17.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo fêmeas x *T. nigromaculatus* fêmeas, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de  $P: 0,0074$ .

|                  | <b>tatl (ST)</b> | <b>tnig (BA)</b> | <b>Total</b> |
|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <b>tatl (ST)</b> | 30 (88,23%)      | 4 (11,76%)       | 34 (100%)    |
| <b>tnig (BA)</b> | 2 (33,33%)       | 4 (66,66%)       | 6 (100%)     |

**Tabela 18.** Análise da Função Discriminante entre localidades *T. atlas* série-tipo machos x *T. nigromaculatus* machos, Bahia – conjunto de dados lateral. São mostrados dados da validação cruzada. Valor de  $P < 0,0001$ .

|                  | <b>tatl(ST)</b> | <b>tnig (BA)</b> | <b>Total</b> |
|------------------|-----------------|------------------|--------------|
| <b>tatl (ST)</b> | 30 (96,77%)     | 1 (3,22%)        | 31 (100%)    |
| <b>tnig (BA)</b> | 1 (10%)         | 9 (90%)          | 10 (100%)    |

## 5. DISCUSSÃO

Existe uma tendência de segregação para as espécies *Trachycephalus atlas* e *Trachycephalus nigromaculatus* no universo dimensional de suas variáveis morfométricas. O crânio de anuros tem sido amplamente analisado para determinação de táxons, relações filogenéticas, estudos evolutivos, sequência de ossificação, dieta e dimorfismo sexual (Vukov et al., 2018). O gênero *Trachycephalus* é caracterizado por possuir espécies apresentando co-ossificação craniana com a pele, o que possibilitou a utilização dessa área do corpo como recurso para determinação de *landmarks*.

As variações encontradas neste estudo para a vista dorsal do crânio foram: cabeça mais alongada (prolongamento do frontoparietal) e alargamento do crânio na região posterior. Para a vista lateral as variações compreenderam: focinho mais inclinado e alongamento lateral da cabeça. As diferenças encontradas nas análises confirmaram os relatos da literatura sobre a placa cefálica posterior mais pronunciada e cabeça mais alongada para *T. atlas*. (Bokermann 1966, Santos-Silva, 2012). As análises referentes as duas vistas (dorsal e lateral) foram representativas para essa consideração.

As amostras de *Trachycephalus atlas* e *T. nigromaculatus* examinadas aqui, podem ser facilmente classificadas em duas categorias: um exemplo de variabilidade intraespecífica ausente, mas com uma variação interpopulacional presente. Uma dada população animal pode demonstrar graus relativos de variabilidade nos seus caracteres métricos (atributos morfológicos externos). Essa é uma informação relevante, especialmente quando sua forma é considerada um caractere de importância taxonômica (Monteiro et al., 2002). O uso da morfometria geométrica identificou diferenças válidas entre as espécies e um entendimento mais preciso da distribuição da magnitude da variação.

*Trachycephalus atlas* possui dimorfismo sexual com fêmeas maiores que o macho (tamanho aproximado de 10,7 cm e 9,8 cm respectivamente) (Bokermann, 1966; Haddad et al., 2013). Os resultados das análises da morfometria geométrica para a espécie indicaram não haver diferença significativa, referente a forma do crânio, entre os sexos. *Trachycephalus nigromaculatus* também apresenta diferença quanto o tamanho corporal de machos e fêmeas, com estas apresentando tamanho referencial de 9,2 cm, enquanto os machos aproximadamente 8,0 cm (Haddad et al., 2013). Apesar das análises (CPA e CVA) não apontarem uma notável diferença, quando realizada a Função Discriminante, a

comparação entre os grupos (machos e fêmeas) mostrou diferença significativa na forma do crânio de machos e fêmeas da espécie para a vista lateral, sendo que os machos tendem a apresentar alongamento lateral posterior do crânio. Para a vista dorsal não foi revelada qualquer diferença entre os sexos. Dimorfismo sexual com fêmeas maiores do que machos é relatado em 90% das espécies conhecidas de anuros e as causas desse fenômeno são diversas, destacando-se a capacidade de fêmeas maiores produzir uma maior quantidade de ovos, com tamanhos maiores (Rodrigues et al., 2005; Santana et al.). No entanto, existem outras explicações, como diferenças na idade da primeira reprodução ou na taxa de mortalidade causada por maior pressão de predação em machos maiores ou restrições ao crescimento de machos, devido à demanda de energia ligada à atividade reprodutiva (Prado et al. 2000; Rodrigues et al., 2005).

Para *Trachycephalus nigromaculatus* a comparação entre as localidades apontou que exemplares do Rio de Janeiro não apresentavam diferenças dos grupos dos demais estados (Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia) para a vista dorsal. Entretanto, quando a comparação foi entre esses grupos a diferença teve uma significância estatística, sendo que os espécimes de Minas Gerais apresentaram um crânio mais largo em comparação os espécimes da Bahia. Para a vista lateral todos diferenciaram entre si, exceto os grupos do Rio de Janeiro com Espírito Santo, que mantiveram o padrão original. O grupo de Minas Gerais apresentou crânio mais alongado posteriormente e o da Bahia uma elevação na parte superior posterior do crânio. A distribuição original de *Trachycephalus nigromaculatus* abarca regiões costeiras dos estados do Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) e interior de Minas Gerais, habitando floresta primária e secundária de planície e matagal de Restinga (Dias et al., 2010). Posteriormente foi citada em listas de anuros do Espírito Santo e Distrito Federal (Bertha Lutz, 1954; Almeida et al., 2011). A partir dos anos 2000, foi registrada para alguns estados do Nordeste, principalmente Bahia, em áreas de transição entre a Floresta Atlântica e Caatinga.

A relação de interações complexas às quais a espécie está exposta em seu ambiente pode determinar sua plasticidade fenotípica (Rodrigues et al., 2005). A variedade de ambientes relacionados à *T. nigromaculatus* (floresta de Mata Atlântica, Restinga, Cerrado e Caatinga) pode explicar as diferenças encontradas na forma do crânio entre os exemplares das diversas localidades. A heterogeneidade ambiental é um fator importante que determina a riqueza das espécies para diferentes grupos animais e particularmente para

anfíbios, visto que possibilita um grande número de micro-habitat reprodutores podendo aumentar a riqueza de espécies (Haddad e Prado, 2005; Vasconcelos e Rossa-Feres, 2008).

*Trachycephalus atlas* foi avaliado para indivíduos de procedência dos estados do Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pernambuco e Maracás - Bahia (série-tipo). Quando realizada a comparação entre as localidades e o grupo da série-tipo foram observadas diferenças para a vista dorsal com significância estatística. Enquanto os representantes da série-tipo mantiveram o padrão relatado para a espécie, os indivíduos de Minas Gerais e Pernambuco apresentaram o comprimento do crânio um pouco menor e os da Bahia apresentaram um crânio menos largo que o padrão. Para a vista lateral, a série-tipo permanece com focinho mais longo e inclinado, enquanto os de Minas mostraram um focinho mais achatado e curto, Bahia com aspecto mais achatado e longo e Pernambuco mais longo e curto. O grupo de Sergipe não apresentou diferença para a série-tipo. *Trachycephalus atlas* foi descrita para a Fazenda Santo Onofre, no município de Maracás, Bahia, sendo encontrada em vegetação de transição "agreste" entre a Mata Atlântica úmida e a savana de Caatinga seca. A partir do aumento de levantamentos faunísticos foi observada em outros estados como: Minas Gerais (divisa com Bahia), Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Piauí, sendo mais restrita a região nordeste.

Quando comparados os grupos da Bahia, estado com mais ocorrências das duas espécies, o resultado não mostrou diferença entre os indivíduos, sendo similar para as duas vistas. Mas quando os grupos utilizados foram: série-tipo de *T. atlas* com *T. nigromaculatus* da Bahia, foi observada diferença significativa nas duas vistas. Portanto, segundo as análises, os exemplares de *T. atlas* da série-tipo apresentam diferenças significativas dos outros exemplares vindos da Bahia (tanto *atlas* como *nigromaculatus*). O grupo de *atlas* da Bahia não apresentou diferença do grupo *nigromaculatus* da Bahia.

Portanto, os dados encontrados indicam que o grupo da série-tipo de *T. atlas* apresenta diferença na forma do crânio, com significância estatística para ambas vistas, de todos os outros grupos propostos, exceto do único exemplar de Sergipe e dos 02 exemplares sem procedência registrada.

Trabalhar diferentes bases de dados de forma colaborativa, a chamada taxonomia integrativa, é fundamental para a solução de problemas de delimitação de espécies com complexo histórico taxonômico (Padial et al., 2010). A utilização desse tipo de análise é

essencial para a compreensão das interações entre fenótipo, genótipo e espaços ambientais (Monteiro et al., 2002). Os resultados aqui apresentados corroboram a permanência das duas espécies como válidas, inclusive amparada em seus cantos (Abrunhosa et al., 2001; Santos-Silva et al., 2012) e girinos (Wogel et al., 2000; Barreto et al., 2015).

Metodologicamente, se o tamanho da amostra for pequeno em relação aos pontos de referência, a análise discriminante tende a superestimar a separação entre os grupos ((Klingenberg, 2011). Portanto, seria recomendado a ampliação do número amostral de algumas regiões e o acréscimo de dados moleculares para uma resolução final.

## 6. CONCLUSÕES

- Recursos presentes na morfometria geométrica foram capazes de discriminar e apontar de maneira fundamentada, as diferenças na forma do crânio das espécies do gênero *Trachycephalus* – *T. atlas* e *T. nigromaculatus*.
- As diferenças encontradas nas análises corroboram os relatos da literatura que descrevem a placa cefálica posterior mais pronunciada e cabeça mais alongada para *T. atlas* em comparação com *T. nigromaculatus*.
- As análises de *Trachycephalus atlas* não revelaram diferença significativa entre machos e fêmeas, em nenhuma das vistas examinadas.
- As análises de *Trachycephalus nigromaculatus* indicaram diferença entre os sexos somente para vista lateral, sendo que os machos tendem a apresentar alongamento na região posterior do crânio.
- Os dados comparativos de localidade dos exemplares de *Trachycephalus atlas* do grupo da série-tipo mostraram diferenças estatisticamente significativas no crânio dos demais grupos da espécie nas duas vistas, exceto do exemplar de Sergipe e dos dois indivíduos de procedência não relatada.
- Os dados comparativos de localidade dos exemplares de *Trachycephalus nigromaculatus* indicaram o grupo do Rio de Janeiro semelhante a todos os grupos da espécie na vista dorsal. Já para a vista lateral somente com o grupo do Espírito Santo. Todos os demais grupos apresentaram diferenças significativas.
- O grupo de *T. atlas* da Bahia, destacado da localidade-tipo, não apresentou diferença do grupo de *T. nigromaculatus* do mesmo estado.
- As diferenças encontradas para as localidades de ambas espécies devem ser investigadas com outras bases de dados, em um trabalho integrativo, para definir a distribuição e posição nomenclatural de ambas espécies.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, A.; Lampo, M.; Cipriani, R. 2016. The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. *Zootaxa*, 4103(6): 574-586.
- Adams, D.C.; Rohlf, F.J.; Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the revolution. *Italian Journal of Zoology*, 71(1): 5-16.
- Adams, D.C.; Rohlf, F.J.; Slice, D.E. 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21<sup>st</sup> century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 7-14.
- Almeida, A.de P.; Gasparini, J.L.; Peloso, P.L.V. 2011. Frogs of the state of Espírito Santo, southeastern Brazil - The need for looking at the 'coldspots'. *Check List*, 7(4): 542-560.
- Amphibia Web 2018. AmphibiaWeb: information on amphibian biology and conservation. University of California Berkeley. <http://amphibiaweb.org/> Acesso em: 03/11/2018.
- Baldo, D.; Candiotti, F.V.; Haad, B.; Kolen, F.; Borteiro, C.; Pereyra, M.O.; Zank, C.; Colombo, P.; Bornschein, M.R.; Sisa, F.N.; Brusquetti, F.; Conte, C.E.; Nogueria-Costa, P.; Almeida-Santos, P.; Pie, M.R. 2014. Comparative morphology of pond, stream and phytotelm-dwelling tadpoles of the South American Redbelly Toads (Anura: Bufonidae: Melanophryniscus). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112: 417-441.
- Ben, C.M.P.; Gómez, R.O.; Báez, A.M. 2014. Intraspecific morphological variation and its implications in the taxonomic status of *Bufo pisanoi*, a Pliocene anuran from eastern Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 34(4): 767-773.
- Bokermann, W.C.A. 1966. Una nueva especie de *Trachycephalus* de Bahia, Brasil (Amphibia, Hylidae). *Neotropica*, 12: 120-124.
- Bookstein, F. L. 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science*, 1(2):181-242.
- Borges-Nojosa, D.M. & Arzabe, C. 2005. Diversidade de anfíbios e répteis em áreas prioritárias para a conservação da Caatinga. p 227-241. In: Análise das variações da

biodiversidade do Bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

Borges-Nojosa, D.M. & Santos, E.M. 2005. Herpetofauna da área de Betânia e Floresta, Pernambuco. p 275-290. In: Análise das variações da biodiversidade do Bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

Borzée, A.; Park, S.; Kim, A.; Kim, H.; Jang, Y. 2013. Morphometrics of two sympatric species of tree frogs in Korea: a morphological key for the critically endangered *Hyla suweonensis* in relation to *H. japonica*. *Animal Cells and Systems*, 17(5): 348-356.

Caramaschi, U. & Silvano, D. 2004. *Trachycephalus atlas*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004. Electronic Database accessible at <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 November 2018.

Chakrabarty, P.; Chu, J.; Nahar, L. & Sparks, J. 2010. Geometric morphometrics uncovers a new species of ponyfish (Teleostei: Leiognathidae: Equulites), with comments on the taxonomic status of *Equula berbis* Valenciennes. *Zootaxa*, 2427: 15-24.

Clemente-Carvalho, R.B.G.; Monteiro, L.R.; Bonato, V.; Rocha, H.S.; Pereira, G.R.; Oliveira, D.F.; Lopes, R.T.; Hadad, C.F.B.; Martins, E.G.; Reis, S.F. 2008. Geographic Variation in Cranial Shape in the Pumpkin Toadlet (*Brachycephalus ephippium*): A Geometric Analysis. *Journal of Herpetology*, 42(1): 176–185.

Clemente-Carvalho, R.B.G.; Klaczko, J.; Perez, S.I.; Alves, A.C.R.; Haddad, C.F.B.; Reis, S.F. 2011. Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 79-89.

Collyer, M. & Adams, D.C. 2013. Phenotypic trajectory analysis: Comparison of shape change patterns in evolution and ecology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24: 75–83.

Dias, I.R.; Vilaça, T.R.A.; Silva, J.R.S.; Barbosa, R.S.; Solé, M. 2010. Amphibia, Anura, Hylidae, *Trachycephalus nigromaculatus* Tschudi, 1838: Distribution extension. *Check List*, 6(3): 212-213.

- Elton, S.; Dunn, J.; Cardini, A. 2010. Clines in vervet monkey skull morphology: investigating the effects of allometry on taxonomic variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 823-843.
- Escoriba, D. & Hassine, J.B. 2014. Phenotypic variability in larvae of two species of Mediterranean spadefoot toad: an approach using linear and geometric morphometrics. *African Journal of Herpetology*, 63(2): 152-165.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A.; Wheeler, W.T. 2005. Systematic review of the frog Family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin of the American Museum of Natural History Central, New York, nº 294, 240 p.
- Faria, F.F.A. 2010. Georges Cuvier: história natural em tempos pré-darwinianos. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 17(4): 1031-1034.
- Fornel, R. & Cordeiro-Estrela, P. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Jorge R. Marinho; Luiz U.Hepp; Rodrigo Fornel (Org). *Temas em Biologia. EDIFAPES*. 101-120.
- Freitas M.A. & Lima, T.O. 2009. *Trachycephalus nigromaculatus* (Blackspotted Casque-headed Treefrog). *Herpetological Review* 40(3): 363.
- Frost, D.R. 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference Version 6.0 (19/08/2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garrida, N. & Llorente, G.A. 2011. Chondrocranial ontogeny of *Pelodytes punctatus* (Anura: Pelodytidae). Response to competition: geometric morphometric and allometric change analysis. *Acta Zoologica*, 93: 453-464.
- Gondim-Silva, F.A.T; Andrade, A.R.S.; Abreu, R.O.; Nascimento, J.S.; Correa, G.P.; Menezes, L.; Trevisan, C.C.; Camargo, S.S.; Napoli, F.M. Composition and diversity of anurans in the Restinga of the Conde municipality, northern coast of the state of Bahia, northeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 16(3): e20160157.

- Gordo, M.; Toledo, L.F.; Suárez, P.; Kawashita-Ribeiro, R.A.; Ávila, R.W.; Morais, D.H.; Nunes, I. 2013. A new species of Milk Frog of the genus *Trachycephalus* tschudi (Anura, Hylidae) from the Amazonian rainforest. *Herpetologica*, 69: 466–479.
- Gunz, P. & Mitteroecker, P. 2013. Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix the Italian Journal of Mammalogy*, 24: 103–109.
- Haad B., Candiotti, F.V.; Baldo, D. 2011. Shape variation in lentic and lotic tadpoles of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 46(2): 91-99
- Haddad, C.F.B. & Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3): 207-217.
- Haddad, C.F.B.; Toledo, L.F.; Prado, C.P.A.; Loebmann, D.; Gasparini, J.L.; Sazima, I. 2013. Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia. São Paulo; Anolisbooks, 544p.
- Hair, J.F.; Tatham, R.L.; Anderson, R.E. & Black, W. 1998. Multivariate Data Analysis. 5 ed. Prentice-Hall, New Jersey. 768 p.
- Hamer, A.J. & McDonnell, M.J. 2008. Amphibian ecology and conservation in the urbanizing world: A review. *Biological Conservation*, 141(10): 2432-2449.
- Jaramillo-O, N. 2011. Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo. Instituto de Biología – Universidade de Antioquia, Colombia.
- Jared, C.; Antoniazzi, M.M.; Katchburian, E. Toledo, R.C.; Freymuller, E. 1999. Quelques aspects de l'histoire naturelle de la grenouille casquée arboricole, *Corythomantis greeningi* Boulenger (Hylidae). *Annales des Sciences Naturelles – Zoologie et Biologie Animale* 20(3): 105-115.
- Kaliontzopoulou, A. 2011. Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. *Basic and Applied Herpetology*, 25: 5-32.
- Klingenberg, C.P.; Barluenga M.; Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56: 1909–1920.

- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Klingenberg, C. P. 2013. Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 15-24.
- Klingenberg, C. P. 2013. Cranial integration and modularity: insights into evolution and development from morphometric data. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 43-58.
- Lawing, A.M. & Polly, P.D. 2010. Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology*, 280: 1-7.
- Lodé, T. & Pagano, A. 2000. Variations du chant et de la morphologie des mâles de grenouilles vertes: implications taxinomiques et évolutives. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III – Science de la Vie*, 11(323): 995-1001.
- Lutz, Bertha. 1954. Anfíbios anuros do Distrito Federal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 52(1): 155-216.
- Magalhães, A.J.C.JR.; Barbosa, A.R.; Azevedo, S.M.JR.; Pinho, M.S.; Beltrão, M.G.; Freire, B.C. 2011. Amphibia, Anura, Hylidae, Trachycephalus atlas Bokermann, 1966: Novo registro e comentários sobre a distribuição geográfica. *Revista Nordestina de Zoologia Recife*, 5(2): 53-57.
- Marques, N.S. & Nomura, F. 2015. Where to live? How morphology and evolutionary history predict microhabitat choice by tropical tadpoles. *Biotropica* 47(2): 227-235.
- Martins, R.A. & Assalim, A.M. 2019. First record of Trachycephalus nigromaculatus (Amphibia, Anura, Hylidae) in the state of Piauí, Brazil. *Check List* 15(3): 411-414.
- McDiarmid, Roy W. 1994. Amphibian Diversity and Natural History: An Overview. In: Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians, edited by Heyer, W. Ronald. Smithsonian Institution Press. Page 5-15.

- Mitterocker, P.; Gunz, P.; Bernhard, M.; Schaefer, K.; & Bookstein, F. L. 2004. Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal of Human Evolution*, 46: 679–698.
- Mônico, A.T.; Clemente-Carvalho, R.B.G.; Lopes, S.R.; Peloso, P.L.V. 2017. Anfíbios anuros de brejos e lagoas de São Roque do Canaã, Espírito Santo, Sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57(16): 197-206.
- Moraes, D.A.A. 2003. A morfometria geométrica e a revolução na morfometria: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. *Bioletim*, Ano III, Vol 3.
- Neta, A.F.S.; Silva, M.C.; Ávila, R.W. 2018. Herpetofauna da Bacia Hidrográfica do Rio Salgado, Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 40(1): 23-48.
- Nunes, I.; Kwet, A.; Pombal, J.P. 2012. Taxonomic Revision of the *Scinax alter* Species Complex (Anura: Hylidae). *Copeia*, 2012(3): 554-569.
- Padial, J.M.; Miralles, A.; De la Riva, I.; Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1): 16.
- Pedrosa, I.M.M.C.P; Costa, T.B.; Faria, R.G.; França, F.G.R.; Laranjeiras, D.O.; Oliveira, T.C.S.P.; Palmeira, C.N.S.; Torquato, S.; Mott, T.; Vieira, G.H.C.; Garda, A.A. 2015. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga III: The Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. *Biota Neotropica*, 14(4).
- Peres-Neto, P. R., Valentin, J. L., Fernandez, F. 1995. Tópicos em tratamentos de dados biológicos. Introdução a análises morfométricas. *Oecologia Brasiliensis*, 57-89.
- Peres-Sweeney, B.M.; Rodrigues, F.P.; Melnick, D.J. 2006. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: Métodos de estudos em Biologia da Conservação e manejo da vida silvestre. Ed. Universidade Federal do Paraná. 652p.
- . Pezzuti, T.L.; Fernandes, I.R.; Leite, F.S.F.; Sousa, C.E.; Garcia, P.C.A.; Rossa-Feres, D. 2016. The tadpoles of the neotropical *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae): Ecomorphology and descriptions of two new forms. *Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology*, 261: 22-32.

- Ponssa, M.A. & Candiotti, M.F.V. 2012. Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the *Leptodactylus fuscus* Group (Anura: Leptodactylidae). *Zoomorphology*, 131(4): 349-362.
- Prado, C.P.A.; Uetanabaro, M.; Haddad, C.F.B. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia* 26: 211–221.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E. 2001. *Biologia da Conservação*. 328p.
- Quinzio, S.I.; Goldberg, J.; Cruz, J.C.; Pereyra, M.C.; Fabrezi, M. 2015. La morfología de los Anuros: pasado, presente y futuro de nuestras investigaciones. *Cuad. herpetol.*, 29(1): 51-67.
- Reyment, R.A.; Blackith, R.E.; Campbell, N.A. 1981. *Multivariate morphometrics*. New York: Academic Press, 233p.
- Roberto, I.J.; Ribeiro, S.C.; Bezerra, L.; Carneiro, P.B.M. 2011. Amphibia, Anura, Hylidae, *Trachycephalus* atlas Bokermann, 1966: Distribution extension and geographic distribution map. *Check List*, 7(3): 326-327.
- Rocha, C.F.; Carvalho-e-Silva, S.P.; Sluys M.V. 2010. *Trachycephalus nigromaculatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010. Electronic Database accessible at <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 November 2018.
- Rodrigues, D.J.; Uetanabaro, M.; Lopes, F.S. 2005. Reproductive patterns of *Trachycephalus venulosus* (Laurenti, 1768) and *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) from the Cerrado, Central Brazil. *Journal of Natural History*, 39(35): 3.217-3.226.
- Rodrigues, M. T. 2003. Herpetofauna da Caatinga. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (EDS.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p. 181- 236.
- Rohlf, F.J. & F.L. Bookstein (eds.) 1990. *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Special Publication Number 2. The University of Michigan Museum of Zoology, 380p

- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Tree*, 8(4): 129-132.
- Rohlf, F.J., 2017. Programa tpsDIG2 versão 2.31. Ecology & Evolution and Anthropology, Stony Brook University.
- Rohlf, F.J., 2019. Programa tps Utility versão 1.78. Ecology & Evolution and Anthropology, Stony Brook University.
- Rossa-Feres, D.C.; Sawaya, R.J.; Faivovich, J.; Giovanelli, J.G.R.; Brasileiro, C.A.; Schiesari, L.; Alexandrino, J. e Haddad, C.F.B. 2011. Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil: Conhecimento atual e Perspectivas. *Biota Neotropica*, 11(1a).
- Santana, D.J.; São-Pedro, V.A.; Bernarde, P.S.; Feio, R.N. 2010. Descrição do canto de anúncio e dimorfismo sexual em *Proceratophrys concavitympanum* Giaretta, Bernarde & Kokubum, 2000. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 50(11): 167-174.
- Santos-Silva, C.R.; Ferrari, S.F.; Juncá, F.A. 2012. Acoustic characteristics of the advertisement call of *Trachycephalus atlas* Bokermann, 1966 (Anura:Hylidae). *Zootaxa* 3424(1).
- Segalla, M.V.; Caramaschi, U.; Cruz, C.A.G.; Garcia, P.C.A.; Grant, T.; Haddad, C.F.B.; Santana, D.J.; Toledo, L.F.; Langone, J.A. 2019. Brazilian Amphibians: List of species. *Herpetologia Brasileira* 8(1): 65–96.
- Sidlauskas, B. L.; Mol, J. H. & Vari, R. P. 2011. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriiformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 162: 103-130.
- Silveira, A.L. 2006. Anfíbios do município de João Pinheiro, uma área de cerrado no noroeste de Minas Gerais, Brasil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64(2): 131-139.
- Slice, D. E.; Bookstein, F. L.; Marcus, L. F. & Rohlf, F. J. A Glossary for Geometric Morphometrics. 2009. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>

- Steffoff R. 2007. Charles Darwin: a revolução da evolução. Companhia das Letras. São Paulo. 127p.
- Stepanyan, I.E.; Tsarukyan, A.S; Petrov, Y.P. 2011. Effect of Molybdenum, Chrome and Cadmium Ions on Metamorphosis and Erythrocytes Morphology of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Anura). *Journal of Environmental Science and Technology*, 4: 172-181.
- Terhune, C.E.; Cooke, S.B.; Otárola-Castillo, E. 2015. Form and Function on the Platyrrhine Skull: a Three-Dimensional Analysis of Dental and TMS Morphology. *The Anatomical Record*, 298: 29-47.
- Tokita, M.; Hasegawa, Y.; Yano, W.; Tsuji, H. 2018. Characterization of the Adaptive Morphology of Japanese Stream Toad (*Bufo torrenticola*) Using Geometric Morphometrics. *Zoological Science*, 35(1): 99-108.
- Vasconcelos, T.S. & Rossa-Feres, D.C. 2008. Habitat heterogeneity and use of physical and acoustic space in anuran communities in Southeastern Brazil. *Phyllomedusa*, 7(2): 127-142.
- Verdade, V.K.; Dixo, M.; Curcio, F.F. 2010. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos avançados. São Paulo*, 68: 161-172.
- Vega-Trejo, R., Zúñiga-Vega, J.J. & Langerhans, R.B. 2014. Morphological differentiation among populations of *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) in western Mexico. *Evolutionary Ecology*, 28(1): 69-88.
- Vukov, T.; Krsticic, J.; Petrovic, T.; Kolarov, N.T. 2018. Patterns of cranial sexual dimorphism in the yellow-bellied toad (*Bombina variegata*, Bombinatoridae). *North-Western Journal of Zoology*, 14(1): 44-49.
- Wake, M.H. 2012. Morphology and Herpetology: How and Why They Interact. *Journal of Herpetology*, 46(3): 279-296.
- Webster, M. & Sheets, H.D. 2010. A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. In: Quantitative Methods in Paleobiology, p. 163-188, Paleontological Society Short Course. The paleontological Society.

- Wells, K.D. 2007. The Ecology and Behavior of Amphibians. 1148p. The University of Chicago Press, London.
- Yildirim, E & Kaya, U. 2017. Chondrocranial differences in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae): geometric morphometric comparison with two anuran species. *Turkish Journal of Zoology*, 41: 241-249.
- Yildirim, E. 2018. A Geometric Morphometric Analysis for Ranid Taxonomy: Chondrocranial Shape Variation of Five Ranid Species (Anura: Ranidae). *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46(4): 559–567
- Zelditch, M. L.; Swiderski, D. L.; Sheets, H. D. & Fink, W. L. 2004. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. San Diego, EUA: Elsevier Academic Press.

# **APÊNDICE I - Localidades amostradas com registro de município nas coleções**

## *Trachycephalus atlas*

| Localidade       | Estado                        | Nº amostral |
|------------------|-------------------------------|-------------|
| Maracás          | Bahia – BA                    | <u>68</u>   |
|                  | <b><u>Localidade-tipo</u></b> |             |
| Pedra Azul       | Minas Gerais - MG             | 08          |
| Tacaratu         | Pernambuco - PE               | 02          |
| Caetité          | Bahia - BA                    | 01          |
| Mata de São João | Bahia - BA                    | 02          |
| Morro do Chapéu  | Bahia - BA                    | 01          |
| Santa Inês       | Bahia - BA                    | 01          |
| Pindaí           | Bahia - BA                    | 01          |
| Conde            | Bahia - BA                    | 01          |
| Capela           | Sergipe - BA                  | 01          |

## *Trachycephalus nigromaculatus*

| Localidade           | Estado              | Nº amostral |
|----------------------|---------------------|-------------|
| Jacarepaguá          | Rio de Janeiro - RJ | 03          |
| Viana                | Espírito Santo - ES | 02          |
| Campo Grande         | Rio de Janeiro - RJ | 01          |
| Manguinhos           | Rio de Janeiro - RJ | 01          |
| Sooretama            | Espírito Santo - ES | 01          |
| Guaratiba            | Rio de Janeiro - RJ | 01          |
| Barra da Tijuca      | Rio de Janeiro - RJ | 01          |
| Seropédica           | Rio de Janeiro - RJ | 01          |
| Santa Rita de Cássia | Bahia – BA          | 12          |

|                     |                     |    |
|---------------------|---------------------|----|
| <b>UHE Rosal</b>    | Espírito Santo - ES | 01 |
| <b>Porto Seguro</b> | Bahia - BA          | 01 |
| <b>Potiraguá</b>    | Bahia - BA          | 01 |
| <b>Ibiassucê</b>    | Bahia - BA          | 01 |
| <b>Araçuaí</b>      | Minas Gerais - MG   | 01 |
| <b>Caetité</b>      | Bahia - BA          | 01 |

## APÊNDICE II - Espécies amostradas – Coleção e número de tombo

**Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – *Trachycephalus atlas* – Machos:** 57107; 74304(holótipo); 74622; 74626; 74627; 74637; 74639; 74651; 74661; 74665; 74697; 74730; 74748; 74750; 74751; 74752; 74754; 74755; 74757; 74761; 74764; 74785; 74787; 74792; 74811; 74812; 74814; 74839; 74852; 74872; 74875; 74881; 74882; 121535; 121536; 121537; 121538; 121539; 121540; 121541; 121542. ***Trachycephalus atlas* – Fêmeas:** 57108; 63046; 63047; 74624; 74628; 74634; 74774; 74775; 74776; 74779; 74780; 74781; 74782; 74783; 74786; 74788; 74789; 74793; 74795; 74863; 74864; 74865; 74866; 74868; 74869; 74870; 74871; 74873; 74874; 74876; 74877; 74878; 74879; 74880; 74883; 74884; 74885. ***Trachycephalus nigromaculatus* – Machos:** 32849; 32850; 32851; 32852; 32853; 34138; 121476; 121479; 121481; 139569; 142921. ***Trachycephalus nigromaculatus* – Fêmeas:** 9797; 12617; 12618; 12620; 32848; 32854; 119484; 121480; 141949; 142920.

**Universidade Federal da Bahia - *Trachycephalus atlas* – Machos:** 2414; 2826; 8143; 14087; 15195. ***Trachycephalus atlas* – Fêmeas:** 4184; 6154; 6187; 9779; 10514; 12397. ***Trachycephalus nigromaculatus* – Machos:** 8833; 8834; 8835; 8836; 9233; 9234; 9235; 9236; 9238; 9239; 12364. ***Trachycephalus nigromaculatus* – Fêmeas:** 7389; 7825; 8837; 9018; 9237; 14637.

**Universidade Estadual de Feira de Santana / BA - *Trachycephalus atlas* – Fêmeas:** 221; 2185.

**Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - *Trachycephalus nigromaculatus* – Machos:** 14768; 14767; 17306; 1845; 16686; 9680; 2629; 564; 17279; 7364; 20719; 20506; 14308; 20507; 20508; 20509. ***Trachycephalus nigromaculatus* – Fêmeas:** 17765; 3449; 351; 2628; 3343; 676; 4266; 3970; 1773; 13658; 20720; 19416; 16687; 13657; 14226.