

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu**

William Pinheiro Da Costa

**VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Proceratophrys moratoi* (JIM E
CARAMASCHI. 1980) (AMPHIBIA: ANURA) NO ESTADO DE SÃO
PAULO.**

Botucatu
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro de 2012

William Pinheiro Da Costa

VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Proceratophrys moratoï* (JIM E CARAMASCHI. 1980) (AMPHIBIA: ANURA) NO ESTADO DE SÃO PAULO.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti
Co-orientador: José Carlos Pansonato Alves

BOTUCATU
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Costa, William Pinheiro da.

Varição populacional de *Proceratophrys moratoi* (Jim e Caramaschi, 1980)
(Amphibia: Anura) no estado de São Paulo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: José Carlos Pensonato Alves

Capes: 20402007

1. Anuro. 2. Anfíbio – Identificação. 3. Morfologia (Animais)

Palavras-chave: Anfíbios; Anuros; Caracteres morfológicos; Caracteres
morfométricos, Citogenética.

*Dedico o presente trabalho a meu
professor, orientado e mestre **Jorge Jim** (in memoriam),
exemplo de conduta ética e científica
que cedo partiu deixando saudade,
Muito Obrigado*

AGRADECIMENTOS

Na maioria dos meus trabalhos, costumo dar início aos meus agradecimentos levantando o pensamento aos céus e oferecendo graças a Deus por ter me guiado até aqui e em seguida homenageio meus pais, minha irmã e agora meu cunhado que sempre estiveram do meu lado me fortalecendo e acreditando em mim. Neste trabalho, ainda que a importância destas pessoas só tenha aumentado, focarei meus agradecimentos naqueles que, no decorrer de minha vida, me ensinaram e me proporcionaram a bagagem teórica, prática e pessoal que permitiu chegar a mais esta conquista, e ainda que não ostentem oficialmente o “título”, sempre os levarei como **MEUS PROFESSORES**.

Sendo assim,

Agradeço ao Prof. Dr. Fausto Foresti, que me acolheu em um momento difícil da minha passagem pelo mestrado, na hora em que a sensação de estar perdido quis me abater e ele, entendendo este momento, me “adotou” e assumiu minha orientação. Sou grato a ti PROFESSOR, por ter cruzado minha vida acadêmica. Alguém como o Sr. faz da sua história e conduta, um modelo para jovens aspirantes a pesquisadores como nós, principalmente em um Brasil onde encontramos tantas dificuldades. Nem sempre na vida temos a oportunidade de conhecer aquelas pessoas importantes que fizeram história e que deixarão à posterioridade um belo legado para nosso país, eu, porém, poderei dizer com orgulho que um dia passei pelo seu laboratório, cai de pára-quadras como seu orientado e tive o privilégio de fazer parte de seus muitos alunos. Obrigado!

Agradeço ao Dr. Silvio César de Almeida, aquele que nos últimos anos tem sido meu PROFESSOR. Se hoje sei alguma coisa de anfíbio foi porque aprendi com ele, com sua paciência em explicar, com sua tenacidade em cobrar, com sua preocupação em corrigir meus erros, com sua insistência em sempre me conduzir para frente. Na vida são poucas as pessoas que nos fazem compreender o verdadeiro significado da palavra lealdade, por isso talvez ela esteja caindo em desuso. Essa pessoa me ensinou o que lealdade significa, e além de todo conhecimento, espero poder levar cada palavra de nossas longas conversas e reflexões a cada local pelo qual venha a passar. PROFESSOR Silvio, acredite, sempre me sentirei seu aluno.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Elieth Floret Spirandelli-Cruz, PROFESSORA em simpatia, simplicidade e que demonstrou ter um coração do tamanho do mundo. Sou grato pelas nossas boas horas de papo e pelo material a mim concedido, com a nítida preocupação de contribuir de alguma forma com meu trabalho. PROFESSORA, obrigado por ter contribuído tanto.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Luciana Bolsoni Lourenço, que me forneceu as primeiras ferramentas para iniciar meus estudos em citogenética. Aquela que, em um congresso, simplesmente atendeu ao chamado de um aluno desconhecido e, desde então, sempre esteve pronta a me atender, conversar, a abrir as portas do seu laboratório, enfim, deu de longe um suporte de estimável valia. PROFESSORA, obrigado, pois contigo aprendi algo muito importante, aprendi que contribuir é tão simples como nos dar atenção e ouvidos.

Agradeço ao meu co-orientador e PROFESSOR Dr. José Carlos Pansonato Alves, que me ensinou a ver, interpretar e montar meus primeiros cariótipos. Zeca, contigo aprendi mais que citogenética, aprendi lições de postura e profissionalismo.

Agradeço ao PROFESSOR Renato Devidé, que na função de técnico traz na bagagem a experiência e dedicação que muitos professores deveriam ter neste país. Obrigado por ter me ensinado a misturar tanto pozinho, reagente, e a mexer com uma parafernália de coisas que no final sempre deram resultados.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Miriam Harumi Tsunemi, que me ensinou como a bioestatística faz sentido, que me fez perceber o tanto que o conjunto de um monte de números, medidas, funções e etc., deixam minha cabeça confusa. Obrigado PROFESSORA.

Agradeço também aos PROFESSORES Dr. Cláudio de Oliveira, Dr. Itamar Alves Martins, Dr. Ricardo Cardoso Benine e Dr. Francisco de Assis Ganeo de Mello que em poucas conversas me ensinaram como conduzir melhor meu trabalho.

Aproveito também para agradecer meus PROFESSORES lá do ensino fundamental e médios. PROFESSORES como o Vina (Biologia), Junior (Literatura), Júlio César (História) e Jaime (Física). Ainda que hoje a presença de vocês pareça estar num passado distante, estão inimaginavelmente presentes, ainda constam na minha lista de referências.

Agradeço a Helena, minha PROFESSORA em tantas horas. Independente do tempo e da distância, saiba que estarei sempre presente.

Agradeço a meus amigos (PROFESSORES), que me ensinaram que viver a vida só é bom quando não nos sentimos sozinhos.

Por último e não menos importante, pelo contrário, de forma muito especial quero agradecer a meu PROFESSOR, ORIENTADOR E MESTRE Dr. **JORGE JIM**. Emociono-me com as lembranças de tantas boas conversas, tantas boas instruções e de tão bom exemplo. Toda a base de minha postura científica e tudo aquilo que hoje reconheço como ética acadêmica, devo aos valores que contigo aprendi. Foste mais que um pesquisador que publica, nadaste contra a corrente, valorizando aquilo que por ti era chamado rigor científico. É PROFESSOR **JIM**, vieste com a missão de formar mais que alunos-pesquisadores, mas sim, cientistas-pensadores. Como já disse anteriormente, nem sempre na vida temos a oportunidade de conhecer aquelas pessoas importantes que fizeram história e que deixarão à posterioridade um belo legado para nosso país, eu, porém, poderei dizer com orgulho que um dia passei pelo seu laboratório que fui um dos últimos de seus orientados.



18-08-1942 a 26-06-2011

Se hoje fosse me concedido um único pedido, independente das limitações impostas pela nossa realidade, com certeza eu apenas pediria a oportunidade de aprender um pouquinho mais com o Senhor. **Meu eterno, OBRIGADO!**

Coaxar

*Hoje no brejo ecoa o silêncio,
coaxar nem aqui, nem acolá.
Sinal de respeito...
... ou um som afogado em lágrimas?*

*Período frio e seco?
Na verdade não sei.
Prefiro acreditar que a natureza,
em seu esplendor apenas sente.*

*Sente a partida do historiador,
naturalista; filósofo, professor...
Chamem como quiser,
ainda que o melhor fosse, Sensei...
Mestre.*

*Mestre...
...no mais virtuoso de seu significado.
Condutor no pensamento, na formação...
...Em um mundo de tantos doutores,
e de tão poucos Mestres.*

*Tamanha tristeza justifica o lamento,
que chores então, ó mãe natureza!
Acolhe em seus braços, curioso filho
e que mais um ciclo se feche.*

*A quem de passagem aqui perdura,
convém manter vivo seu legado.
Excedendo os limites do tempo,
consolidando-se pela história.*

*Voltando então ao brejo calado,
Aonde a Lua prata banha o espelho d'água,
Não intimides a voz, pequena Jimii,
Em seu Dale soaras eterno.*

*“O mestre disse a um dos seus alunos: Yu, queres saber em que consiste o conhecimento?
Consiste em ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto de não a conhecer.
Este é o conhecimento...”*

(Confúcio)

RESUMO

Variações populacionais são fatos relativamente frequentes em populações naturais que permitem inferir considerações sobre o caminho evolutivo e a estreita relação dos táxons com o ambiente. Dentre as espécies brasileiras, *Proceratophrys moratoi* (Anura, Cycloramphidae) é considerada endêmica do Estado de São Paulo e, nas últimas décadas, novas populações foram registradas, verificando-se sutis variações. Diante das novas populações e considerando o grau de importância que as mesmas apresentam para a compreensão da espécie, realizou-se neste trabalho um estudo da variação populacional da espécie com base em caracteres morfométricos, morfológicos e citogenéticos. Para tanto foram examinados 52 indivíduos componentes de cinco populações conhecidas de *P. moratoi*. Na comparação entre as populações foram utilizados 81 caracteres morfológicos e 15 morfométricos, somando 96 caracteres distintos. Os dados citogenéticos foram obtidos com o uso de técnicas de citogenética básica pela coloração com Giemsa, localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e localização da heterocromatina constitutiva. Os valores obtidos pela análise dos 15 caracteres morfométricos foram submetidos à Análise de Componentes Principais, resultando em dois componentes (PC1 e PC2) que permitiram contemplar 73% da variabilidade. A Análise dos Fatores Discriminantes foi significativa e permitiu a formação de três agrupamentos, sendo a população de Botucatu aquela que apresentou melhor estruturação e também a que apresentou valores das médias morfométricas menores em relação às amostras das demais localidades. Os caracteres morfológicos foram analisados através de uma matriz comparativa que permitiu identificar caracteres invariáveis, variáveis intra e inter-populacionalmente e fenótipos pontuais. Dos 81 caracteres analisados, 22 mostraram-se invariáveis, nove foram pontuais e 50 variaram dentro e entre as populações. Dos 50 variáveis, 14 se apresentaram como variações regionais ocorrendo exclusivamente em apenas uma população, sendo as localidades Botucatu e Itirapina/Brotas as que mais apresentaram variações deste tipo. As análises citogenéticas mostraram resultados bastante conservados, com os indivíduos de todas as populações apresentando cariótipos formados por 22 cromossomos, com predomínio de cromossomos metacêntricos e um par de submetacêntricos. Para todas as populações, as RONs foram localizadas em posição intersticial de apenas um par de cromossomos metacêntricos (par número 7) e blocos de heterocromatina foram evidenciados na região centromérica de todos os cromossomos. Polimorfismos numéricos e/ou estruturais não

foram encontrados. A análise dos dados obtidos neste estudo permitiu verificar a existência de estruturação regional, principalmente considerando os dados morfológicos e de morfometria. Por outro lado, os dados citogenéticos não evidenciaram a existência de variações entre estas populações, sendo todas as amostras constituídas pela mesma estrutura cariotípica. Tal manutenção pode ser explicada se considerarmos que os caracteres cromossômicos analisados são geralmente conservados em anfíbios e que a aplicação de técnicas moleculares mais resolutivas, como o mapeamento de DNAs repetitivos, poderia trazer significativas informações sobre a microestrutura cariotípica destas populações. Apesar da estruturação encontrada, deve-se ressaltar que o conjunto de informações contidas no presente trabalho indica que, mesmo considerando todas as populações uma mesma entidade taxonômica, as dissimilaridades existentes entre elas as tornam parcelas únicas e, por conseguinte, de inestimável importância para a compreensão dos mecanismos que ajustam os organismos às suas áreas de ocorrência. Permite também vislumbrar quão tênue é a linha que separa variação, sobrevivência e extinção de uma espécie.

Palavra chave: anfíbios, anuros, caracteres morfológicos, caracteres morfométricos, citogenética

ABSTRACT

Population variations are frequent facts in natural populations that permit to infer considerations about evolution trends and the close relationship between the species and the environment. Among Brazilian's species, *Proceratophrys moratoii* (Anuran, Cycloramphidae) is considered endemic in Sao Paulo State and in the last decades new populations have being registered showing such slightly variations. Face the new populations and considering the importance degree they represent for species understanding in this work a study of population variations was performed based on morphometric, morphological and cytogenetic characters. For it 52 individuals were examinaed and distributed into five populations of *P. moratoii*. In the comparison 81 morphological and 15 morphometric characters were used summing 96 distinct characters. The cytogenetic data were gotten using basic cytogenetics (Giemsa coloration, NORs and Heterochromatin regions localization (C-banding).The obtained values through the 15 morphometric characters were submitted under the Principal Components Analysis (PCA) and resulted in two components (PC1 e PC2) that permitted contemplating 73% of variability. The discriminating factors analysis was significant and permitted the three groups formation in which Botucatu's population was the best structured one and also the one that showed smaller morphometric averages related to other locations.The morphological characters were analyzed through comparative matrix that permitted to identify invariable characters, into and inter-populations variations, and punctual phenotypes. From the 81 morphological characters analyzed, 22 were invariable, 9 were punctual and 50 variable inter and into-populations. From the 50 variations, 14 were regional ones occurring only in one population and Botucatu, Itapira and Brotas were the locations that presented more of this type of variations. The cytogenetic analyses demonstrated that all populations presented diploid individuals with $2n=22$ chromosomes and the predominance of meta and a pair of submetacentric types. The NOR was always associated to the same pair of chromosome (7) and the heterochromatin regions (band-C) were associated to the centrometric region. The study permitted to verify the regional structure existence; specially considering the morphology and morphometrics. The fact that the cytogenetics haven't presented apparent variations can be explained considering that analyzed characters are conserved in amphibians so the new molecular cytogenetic tecniques use could lead to new results. In spite of the resulting structure it's important to highlight that the set of contained

information in this current work indicates that although all populations belonging to the same taxonomic entity the existent dissimilarity among them make them into unique parcels so the priceless importance for the different mechanisms that adjust the organism and its survival area understanding. It also permits to wonder how tenue is the line that separates species variation, survive and extinction.

Key words: amphibians, anuran, morphological characters, morphometric characters, cytogenetic

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Espécie *Proceratophrys moratoi*, Jim e Caramaschi (1980), São Carlos, SP.....-3
- Figura 2: Áreas de ocorrência das populações de *Proceratophrys moratoi* no estado de São Paulo.....-9
- Figura 3: Armadilha de interceptação e queda (*pitfall trap*) contendo baldes de 30 L enterrados a altura do solo, Bauru, SP.....-14
- Figura 4: figura 2 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres da cabeça, em vista lateral, utilizados na análise comparativa entre as populações de *Proceratophrys moratoi*.....-15
- Figura 5: Prancha XV, reproduzida por Boulenger (1882) (modificada); Caracteres da cabeça, interior da boca, utilizados na análise comparativa entre as populações de *Proceratophrys moratoi*.....-15
- Figura 6: figura 3 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da palma da mão utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*.....-16
- Figura 7: figura 4 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da planta do pé utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*.....-16
- Figura 8: figura 1 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da região dorsal utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*.....-17
- Figura 9: figura 1 publicada por Freitas et al. 2008 (modificada); medidas morfométricas utilizadas para análises comparativas entre as populações de *Proceratophrys*

moratoi: Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal interno (CCMI), Espessura do calo metatarsal interno (ECMI)-18

Figura 10: Variações morfológicas existentes entre quatro populações de *P. moratoi* no estado de São Paulo, Brasil; Lençóis Paulista (A), São Carlos (B), Bauru (C) e Itirapina (D).....-27

Figura 11: Gráfico de dispersão dos caracteres morfométricos analisados em função dos fatores (PC1 e PC2) obtidos; Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI).....-32

Figura 12: Gráfico gerado em função das discriminantes canônicas com evidente aglomeração de indivíduos oriundos de um mesmo agrupamento; Grupos; 1= Botucatu, 2 São Carlos + Itirapina/Brotas e 3 Bauru + Lençóis Paulista/Avaré.....-33

Figura 13: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μ m.....-35

Figura 14: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de São Carlos, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μm-35

Figura 15: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de Bauru, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μm-36

Figura 16: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de Itirapina, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μm-36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de caracteres que não variaram entre as populações de *Proceratophrys moratoi*.....-24

Tabela 2: Lista de caracteres que ocorreram em indivíduos únicos, fenótipos pontuais, onde os números 1 e 2 indicam o estado do caráter; Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré.....-24

Tabela 3: Lista de caracteres que variaram dentro da população e entre as populações de *Proceratophrys moratoi* onde 0, 1, 2 e 3 representam, de forma crescente, a ocorrência de variações no estado de caráter sendo o estado 0 a mais comum na população, 1 o segundo mais comum e assim sucessivamente (os números não estão associados a derivações dos caracteres no decorrer da história evolutiva); X representa a ocorrência e Y variações fenotípicas exclusivas; Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré.....-25/26

Tabela 4: Caracteres morfológicos analisados entre as populações de *Proceratophrys moratoi*, São Paulo, Brasil. Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI); em vermelho as menores médias encontradas, em azul as maiores médias encontradas.....-28

Tabela 5: Análise de variância entre as populações de *Proceratophrys moratoi*, São Paulo, Brasil. Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP),

Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI); Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré; **ns**= não significativo.....-30

Tabela 6. Peso dos caracteres morfométricos em função dos Componentes Principais gerados (PC1 e PC2); Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI).....-31

Tabela 7: Comparação das médias concebidas por PC1 e PC2, através do teste ANOVA entre as localidades.....-32

Tabela 8 Coeficientes de função padronizada em relação a PC1 e PC2.....-33

Tabela 9 Coeficientes de correlação em relação a PC1 e PC2.....-33

Tabela 10: Análise da eficiência da classificação dos animais pela função discriminante, em amarelo % de acerto por localidade.....-34

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Anfíbios anuros	1
1.2 Família Cycloramphidae	1
1.3 <i>Proceratophrys moratoi</i> (Jim e Caramaschi, 1980)	2
1.4 Aumento da distribuição de <i>Proceratophrys moratoi</i> e consequências	4
1.5 Variação populacional	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Área de estudos e localidades do <i>Proceratophrys moratoi</i>	9
2.1.1 Botucatu.....	10
2.1.2 Estação Ecológica de Itirapina/Brotas.....	10
2.1.3 São Carlos.....	11
2.1.4 Bauru.....	11
2.1.5 Lençóis Paulista/ Avaré.....	12
2.2 Modo de captura	13
2.3 Análise morfológica, morfométrica e citogenética	14
2.3.1 Morfologia.....	14
2.3.2 Morfometria.....	17
2.3.3 Análise citogenética.....	19
2.3.3.1 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.....	19
2.3.3.2 Bandamento-C (região de heterocromatina).....	20
2.3.3.3 Localização das Regiões Organizadoras do nucléolo (RONs), através da Impregnação por nitrato de Prata (AgNO ₃).....	20
3. RESULTADOS	23

3.1 Coleta e ocorrência de <i>Proceratophrys moratoi</i> no estado de São Paulo.....	23
3.2 Análises morfológicas de <i>Proceratophrys moratoi</i>.....	23
3.3 Análises morfométricas de <i>Proceratophrys moratoi</i>.....	27
3.4 Análise citogenética de <i>Proceratophrys moratoi</i>.....	34
4. DISCUSSÃO.....	38
4.1 VARIAÇÃO POPULACIONAL de <i>Proceratophrys moratoi</i> NO ESTADO DE SÃO PAULO....	39
4.1.1 Morfologia.....	39
4.1.2 Morfometria.....	43
4.1.3 Citogenética.....	46
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	54
7. ANEXOS.....	64



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anfíbios anuros

Dentre os anfíbios, o grupo dos anuros é aquele a apresentar o maior número de espécies contando atualmente com 5966 representantes, divididos em 49 famílias (Frost, 2011).

No decorrer de aproximadamente dois séculos de estudos, anfíbios anuros sofreram constantes alterações em suas posições taxonômicas. Tais alocações e realocações se mostraram necessárias à medida que espécies foram descritas e novas ferramentas de classificação passaram a ser utilizadas. Esse processo contínuo teve início com os primeiros naturalistas em suas análises morfológicas, e atualmente conta com o auxílio de diversas áreas da biologia sendo a citogenética, genética molecular e etologia, apenas algumas das ciências que tentam estabelecer uma melhor relação entre os organismos.

O conjunto de informações geradas por diferentes áreas do conhecimento biológico têm proporcionado uma visão refinada das relações inter e intra-específicas dos diferentes táxons, permitindo, portanto, inferir e traçar com uma menor margem de erro a história evolutiva desse grupo.

Em virtude das próprias restrições fisiológicas, parte das famílias de anfíbios se encontra distribuída em ambientes de clima ameno, entre os Trópicos de Capricórnio e de Câncer. O Brasil, por apresentar parte do seu território nesse domínio, ostenta o título de país com a maior riqueza em anfíbios no mundo (877), sendo 849 espécies de anfíbios anuros (SBH, 2011).

Tamanha riqueza se encontra distribuída em 19 famílias (SBH, 2011). Entre elas encontra-se a família Cycloramphidae Bonaparte, 1850, que conta com 105 espécies divididas em duas subfamílias: Alsodinae, Mivart, 1869 e Cycloramphinae, Bonaparte, 1850 (Frost, 2011).

1.2 Família Cycloramphidae

Os primeiros exemplares da família Cycloramphidae foram descritos por Wied-Neuwied (1824) que apresentou um novo gênero, *Ceratophrys*, para acomodar *Ceratophrys varius* [= *Ceratophrys aurita* (Raddi, 1823)] e *Ceratophrys boiei*. Um século após o surgimento

do gênero, Miranda-Ribeiro (1926), ao estudar os anuros brasileiros, reuniu os gêneros, *Ceratophrys*, *Stombus*, *Odontophrynus*, *Zachaenus* e *Proceratophrys* na família Ceratophryidae, Cope, 1863 (Prado e Pombal Jr., 2008).

Ao estudar a família Leptodactylidae, Werner, 1896, Lynch (1971) dividiu a mesma em quatro subfamílias: Ceratophryinae, Elosiinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. Também definiu cinco tribos para a subfamília Telmatobiinae: Telmatobiini, Alsodini, Grypiscini, Eleutherodactylini e Odontophrynini. Neste trabalho, foram posicionados os gêneros *Proceratophrys* e *Odontophrynus* na tribo Odontophrynini ao utilizar, principalmente, caracteres osteológicos.

Em trabalho comparando larvas de *Proceratophrys* e *Odontophrynus* realizado por Peixoto e Cruz (1980), os autores reconheceram larvas com corpo achatado como características de *Proceratophrys*, enquanto larvas de corpo globuloso como características de *Odontophrynus*.

Em 2006 Frost et al., com base nas técnicas moleculares, realizaram ampla revisão na sistemática de anuros e apresentaram reformulações na organização tanto da família Cycloramphide, entre outras, quanto de suas subfamílias e tribos. Os autores inseriram a tribo Odontophrynini na subfamília Alsodinae, onde seus representantes apresentam alto grau de semelhança quanto a características morfológicas e citológicas.

1.3 *Proceratophrys moratoi* (Jim e Caramaschi, 1980)

A espécie *Proceratophrys moratoi* (= *Odontophrynus moratoi*) (figura 1) foi descrita por Jim e Caramaschi em 1980 tendo como localidade tipo o distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP.

Para a descrição, os autores utilizaram 24 machos e duas fêmeas capturados entre 1976 e 1977. Como característica da espécie, se destaca o grande número de rugosidades, o colorido e o pequeno tamanho (machos 27,6 milímetros e fêmeas 35,7 milímetros de comprimento total médio). Atribuição genérica foi justificada pela presença de características osteológicas partilhada com indivíduos do gênero *Odontophrynus* (Jim e Caramaschi, 1980).

Apesar das particularidades encontradas entre a espécie e o gênero *Odontophrynus*, os autores não deixaram de chamar a atenção para características que também poderiam ser atribuídas ao gênero *Proceratophrys*, tal como, rugosidade na

superfície dos dedos e artelhos, ausência de glândulas dorsais e tibiais além de uma série de tubérculos na superfície das mãos e dos pés. Os autores também admitiram que a presença de um esquamosal moderadamente longo, porém sem entrar em contato com a maxila, que seria uma condição intermediária entre esses dois gêneros (Jim e Caramaschi, 1980).



Figura 1: Espécie *Proceratophrys moratoi*, Jim e Caramaschi (1980), São Carlos, SP

Quanto às características ecológicas apontadas na descrição da espécie, os adultos de *P. moratoi* estariam associados a áreas abertas com predomínio de gramíneas, pouca vegetação herbácea e arbustiva, presença ou não de árvores de pequeno porte próximo a pequeno córrego (Jim e Caramaschi, 1980).

O girino da espécie foi descrito por Rossa-Feres e Jim (1996), sendo que as larvas foram coletadas em águas rasas de lento escoamento e em áreas sombreadas por arbustos e árvores. Durante o estágio 37 do seu desenvolvimento, apresentaram comprimento total médio de 31,7 milímetros (28,4 a 35,4 milímetros) e comprimento médio do corpo de 13,3 milímetros (12 a 15 milímetros). O corpo é elíptico em vista dorsal e depresso/globular em vista lateral, apresentando coloração castanho-avermelhada com manchas cinza prateadas.

As características encontradas na descrição do girino aproximaram a espécie ao gênero *Proceratophrys* reacendendo questionamentos quanto ao seu posicionamento neste

gênero. Apesar da relação duvidosa entre gêneros, os autores mantiveram a espécie como *Odontophrynus* evitando reformulações taxonômicas. Ainda assim, os autores alertaram para a necessidade de se intensificar os estudos com análises genéticas para esclarecer a real posição da espécie (Rossa-Feres e Jim, 1996).

Dada a necessidade de estudos genéticos com os representantes da tribo Odontophrynini, Amaro et al. (2009), analisaram parcialmente a sequência de dois genes mitocondriais (16S e Citocromo *b*) e um gene nuclear (Rag-1) de 17 espécies do gênero *Odontophrynus*, *Proceratophrys* e *Macrogenioglottus alipioi*. Os resultados demonstraram uma estreita relação genética de *P. moratoi* com representantes do gênero *Proceratophrys*, redefinindo, portanto, sua posição taxonômica.

1.4 Aumento da distribuição de *Proceratophrys moratoi* e consequências

As primeiras observações naturalísticas sobre *Proceratophrys moratoi* indicavam que a espécie apresentava certa especificidade em relação ao seu habitat de ocorrência. Quando descrita, a espécie ocorria de forma restrita a dois pontos em sua localidade tipo, Rubião Junior, Botucatu, SP, na Chácara Jim (22°53'36,40''S; 48°30'04,60''W, altitude: 760 m) e no Sítio Capão Bonito, (22°53'16,9''S; 48°30'23,7''W, altitude: 890 m). Os mais de 40 anos de estudo realizados por Jorge Jim na região de Botucatu, somados ao trabalho de Rolim (2009), reforçaram esta observação, pois durante todos esses anos não foi registrada nenhuma nova área de ocorrência próxima à localidade tipo.

Proceratophrys moratoi, considerada por tanto tempo como espécie endêmica de Botucatu, perde este *status* quando, em 2008, Brasileiro et al. ampliam sua área de distribuição ao realizarem estudo com anfíbios na Estação Ecológica de Itirapina, SP (22°12'45.20"S; 47°54'48.40"O; altitude: 732 m) (1999-2002). A autora encontrou número expressivo de indivíduos vocalizando em campo sujo, adjacente a matas de galeria. Tal registro foi importante, pois, uma população grande protegida em área de reserva contrastava com a população relativamente pequena de sua localidade tipo e que, nos últimos anos, vinha demonstrando acentuado declínio.

O reduzido número de localidades de ocorrência e o aparente declínio da população em sua localidade tipo contribuíram para o fato da espécie entrar no banco de dados da *Global Amphibian Assessment*, sob a condição de "Criticamente em Perigo" (IUCN, 2004).

Além disso, Haddad (2008) incluiu *Proceratophrys moratoi* na lista de espécies em risco de extinção da fauna brasileira.

Diante da problemática causada pelo possível declínio e/ou desaparecimento da espécie em sua localidade tipo, em que o último indivíduo vocalizando foi registrado em 2001 e o último encontro visual em 2003, Rolim (2009) realizou intenso estudo a fim de analisar o real *status* de conservação da espécie na região de Botucatu. Concluídos dois anos de trabalhos, o autor relata o desaparecimento da espécie e argumenta que esse desaparecimento seria consequência das alterações antrópicas sofridas na sua área de ocupação. Segundo o autor, em se tratando de uma espécie com exigências específicas em relação a sua ocupação ambiental associada a áreas de nascentes de cerrado próximas a matas, as alterações causadas pela ocupação humana desordenada contribuíram de forma significativa para o desaparecimento da espécie. Em contra partida, Rolim (2009) apresentou duas novas áreas de ocorrência, sendo uma no Jardim Botânico Municipal de Bauru, SP (22°20'48.46"S; 49°0'56.73"O; altitude: 550 m) e outra no Residencial Lagoa Dourada, Brotas, SP (22°11'48.10"S; 47°55'16.40"O; altitude: 724 m), ao lado da Estação Ecológica de Itirapina, SP.

No ano seguinte (2010), novos registros vieram com pesquisadores que trabalhavam nos municípios de São Carlos (22°01'00.5" S, 47°56'21.0" W, altitude: 810 m) (Carvalho Jr. et al., 2010), Lençóis Paulista (22° 49' 14.37"S; 48° 53'00.81"W, altitude: 706 m) e Avaré (22° 53'10.30"S; 48° 56'52.51" W, altitude: 666 m) (Maffei, 2010; Maffei et al., 2011). Os relatos descreveram populações pequenas ocorrendo em matrizes de plantação de cana de açúcar (São Carlos) e eucalipto (Lençóis Paulista/Avaré) e, segundo Carvalho Jr. et al. (2010), a presença da espécie em local sob ação antrópica indica que ela pode ser tolerante a determinadas alterações ambientais.

Em virtude da descoberta de novas populações, questionamentos em relação a sua estrutura, dinâmica e o possível grau de isolamento foram, então, levantados. Considera-se que as respostas poderão contribuir para a melhor compreensão do táxon, bem como auxiliar na política de conservação da espécie.

1.5 Variação populacional

A identificação de possíveis variações populacionais em anfíbios tem sido fundamentada com trabalhos que abordam a estrutura genética das populações, cujos

resultados têm sustentado a idéia de que o grupo exibe uma baixa capacidade de dispersão e alta filopátria, (Seppä e Laurila, 1999; Shaffer et al., 2000; Lampert et al., 2003). Este baixo intercâmbio entre populações permitiria o acúmulo de diferenças genéticas, podendo também refletir nas características morfológicas (Blouin e Brown, 2000; Camp et al., 2000; Méndez et al., 2004).

O isolamento geográfico de populações distintas, associado a pressões locais e deriva genética, proporcionariam a manifestação de diferentes fenótipos que, a longo prazo, poderiam conduzir à origem de novas linhagens (Dobzhansky, 1940; Thorpe et al., 1995; Hoekstra et al., 2005; Prohl et al., 2006). Segundo Ohmer (2009), para compreender a relação entre diferenciação fenotípica e divergência genética, a variação deve ser examinada à luz de fatores históricos e geográficos. Lougheed et al. (2006) também assumiram que adaptações ocasionais decorrentes de eventos de vicariância, distância ou mesmo modificações a nível local poderiam influenciar no sucesso reprodutivo dos indivíduos em certas populações, contribuindo para a evolução de fenótipos particulares.

Estudos envolvendo variações têm tradicionalmente focado suas observações nos aspectos morfológicos, comportamentais e genéticos dos indivíduos (Ohmer, 2009). O conjunto de informações sobre estas diferentes vertentes permite inferir o grau de variação entre as populações e quais caminhos evolutivos as mesmas vêm traçando no decorrer de sua história. Estudos demonstraram que a evolução filogenética deixa seus sinais marcados em caracteres comportamentais e morfológicos refletindo, portanto, a possível ordem de divergência entre as linhagens (Queiroz e Wimberger, 1993; Foster e Endler, 1999; Wiens e Penkrot, 2002; Preço et al., 2007).

Do ponto de vista evolutivo, a análise destas variações pode se referir tanto a variações entre populações quanto a variações individuais, podendo estar associadas a diferenças entre indivíduos de uma mesma população (polimorfismos em que qualquer característica física individual, incluindo variação morfológica externa, fisiológica, ou mesmo citológicas e estruturais, tais como o número, o padrão, e/ou forma dos cromossomos) (Mayr, 1971).

Os padrões gerados por variações geográficas apontadas por uma espécie ou por um conjunto delas, permitem gerar hipóteses sobre a adaptação a habitats distintos, a eventos históricos de separação das populações e a isolamento ecológico (e.g Benítez-Díaz, 1993; Pourto et al., 2001; Alexandrino et al., 2005; Arntzen et al., 2007). Tais informações

constituem elementos importantes na compreensão dos processos micro-evolutivos que promovem a diversificação das espécies (Mendez et al., 2004).

Todo o conjunto de possibilidades geradas a partir de estudos de natureza comparativa explorando padrões de variação populacional e realizados à luz de processos evolutivos permitiria compreender como as populações de *P. moratoi* vêm se diversificando, se ajustando e resistindo às diversas alterações em seu habitat.

Sendo assim, o presente trabalho procurou analisar possíveis variações nas populações de *P. moratoi* em diferentes localidades do Estado de São Paulo, com ênfase em análises morfológicas e morfométricas, além de verificar a possível ocorrência de alterações citogenéticas quanto à morfologia dos cromossomos, distribuição da heterocromatina constitutiva e localização das regiões organizadora de nucléolos (RONs). Ao verificar a existência de variações, proceder à análise das diferenças encontradas, identificando características que permitam verificar se as mesmas se encontram em nível de espécie. Os resultados visam também levantar questionamentos e hipóteses sobre quais fatores ambientais e/ou históricos estariam associados à origem destas variações.



Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudos e localidades do *Proceratophrys morato*

O estudo com *Proceratophrys morato* foi conduzido de forma direcionada nas seis localidades onde foi identificada a ocorrência da espécie no Estado de São Paulo (Figura 2).

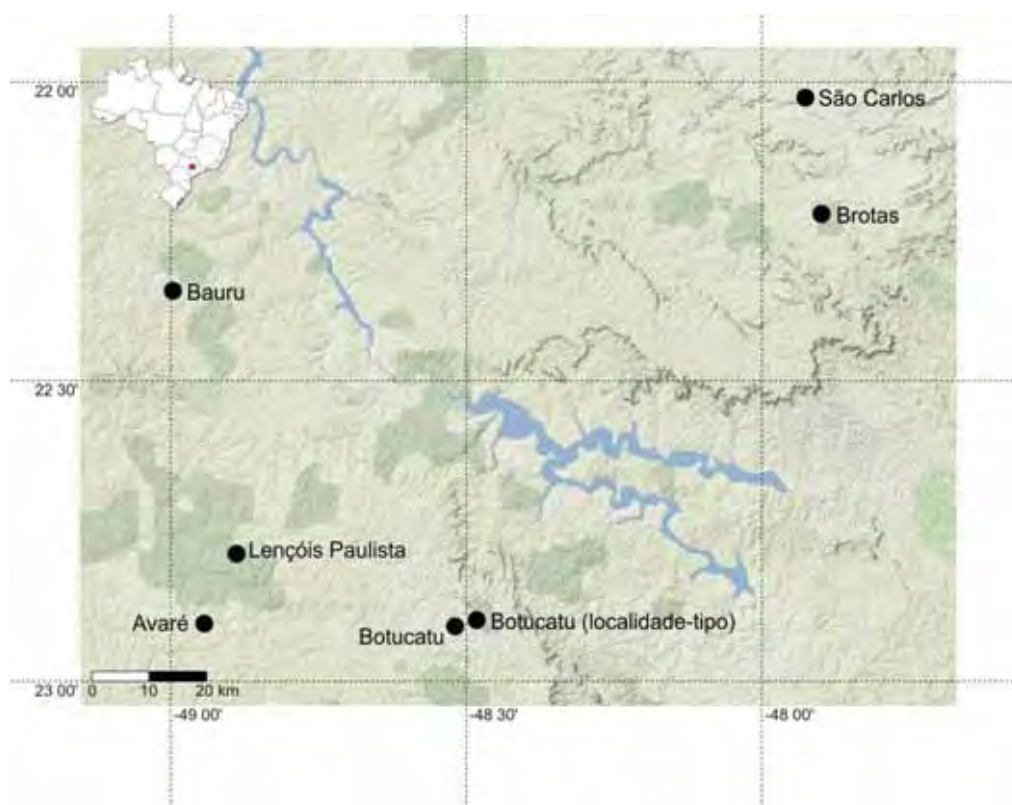


Figura 2: Áreas de ocorrência das populações de *Proceratophrys morato* no estado de São Paulo

A área de ocorrência da espécie se encontra principalmente inserida em Bioma de Cerrado na região considerada, sendo limitada ao sul pelo município de Botucatu e ao Norte pelo município de São Carlos.

O Bioma de Cerrado no Estado de São Paulo está representado atualmente por poucos fragmentos de cobertura original, constituindo áreas disjuntas. Desses fragmentos, menos de 10% encontram-se protegidos na forma de unidades de conservação,

caracterizando, portanto, que no estado o bioma sofre ameaça de total degradação (Cavassan, 2002).

De acordo com o Inventário Florestal do Estado de São Paulo, apresentado por Kronka et al. (1993), dos 3.330.744 ha de cobertura vegetal natural, 283.622 ha correspondem a áreas de cerrado *sensu* amplo. Esse valor corresponde a 8,51% da vegetação nativa remanescente no Estado de São Paulo, cobrindo 1,13% de sua superfície. Esses resquícios concentram-se, sobretudo, nas regiões de Ribeirão Preto, Bauru, São José do Rio Preto e Presidente Prudente, sendo a linha que separa a Depressão Periférica Paulista do Planalto Cristalino Atlântico o limite sudeste de distribuição da maioria dos fragmentos de cerrado.

2.1.1 Botucatu (22°53'36,40''S; 48°30'04,60''W, altitude: 760 m) e (22°53'16,9''S; 48°30'23,7''W, altitude: 890 m)

A localidade tipo, Botucatu, apresenta clima do tipo *Cwa*: Subtropical Úmido, segundo classificação de Köppen. A região encontra-se recoberta por diferentes formações vegetal como mata latifoliada tropical, mata tropical de encostas, mata mesófila semidecídua de encosta e diferentes gradações de cerrado (ENGEA, 1990). Segundo Kronka et al. (1998), a região possui cerca de 4.515 ha de área remanescentes de Cerrado e Cerradão, que acompanham mais ou menos a área da Depressão Periférica.

A população de *P. moratoi* registrada na região, ocorria em área de mata não muito densa, com gramíneas predominando sobre vegetação herbácea e arbustiva, associada a algumas árvores de pequeno porte. O chão, parcialmente coberto por folhas mortas e gravetos, apresentava áreas nuas com terra arenosa granular. O ambiente localizava-se junto a pequeno córrego cuja continuação forma área pantanosa (Jim e Caramasch, 1980).

Os indivíduos vocalizavam espalhados, demonstrando preferência por locais próximos, porém não junto à água (Jim e Caramasch, 1980).

2.1.2 Estação Ecológica de Itirapina/Brotas (22°12'45.20"S; 47°54'48.40"O; altitude: 732 m)/ (22°11'48.10"S; 47°55'16.40"O; altitude: 724 m)

A localidade apresenta clima mesotérmico de inverno seco, com geadas ocasionais entre os meses de Junho e Julho (Brasileiro et al., 2005). A área total da estação é

de aproximadamente 2.430 ha, correspondentes a vegetação natural de Cerrado, incluindo várias fisionomias preservadas, como campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu stricto*, campo úmido e matas de galeria (Gianotti, 1988; Brasileiro et al., 2005).

As observações de campo demonstraram à ocorrência de um elevado número de indivíduos em áreas de gramíneas, próximo a mata de galeria. Próximo ao habitat de ocorrência da espécie verifica-se a presença de corpo d'água formado por pequenos canais de escoamento de água, na parte interna e à borda do fragmento de mata.

Os indivíduos vocalizavam espalhados, na base de gramíneas nativas em solo arenoso. Os dias de maior atividade de vocalização ocorreram em noite de chuva intensa e pós-chuvas, tanto durante a noite quanto o dia.

2.1.3 São Carlos (22°01'00.5" S, 47°56'21.0" W, altitude: 810 m)

O clima da região é do tipo temperado de altitude, apresentando verão chuvoso, de outubro a março e inverno seco, de abril a setembro (Tolentino, 1967).

O ambiente de ocorrência dos indivíduos é caracterizado por um mosaico de terras de cultivos de cana e áreas de regeneração da floresta, com a presença de pequenas ilhas remanescente de vegetação nativa, em uma paisagem rural (Carvalho Jr. et al., 2010).

As observações de campo demonstraram à ocorrência de indivíduos que vocalizavam espalhados na base de touceiras de cana-de-açúcar em solo variando entre Latossolo Vermelho-Amarelado e Latossolo Vermelho-Escuro. Próximo ao habitat de ocorrência da espécie verifica-se a presença de corpo d'água formado por pequeno lago e canal de escoamento de água, com vegetação nativa e taboas ao redor.

O número de indivíduos, em dias de maior atividade de vocalização, chegou a cerca de 40 machos. O período de maior ocorrência foi nas semanas com maior precipitação de chuva, no período da tarde e início da noite.

2.1.4 Bauru (22°20'48.46"S; 49°0'56.73"O; altitude: 550 m)

Em Bauru as coletas foram realizadas no Jardim Botânico Municipal, região centro oeste do Estado de São Paulo. O clima é definido, segundo *Köppen*, como mesotérmico de inverno seco e verão chuvoso (*Cwa*). A localidade é composta por três fitocenoses: cerrado, floresta estacional semidecídua e mata de brejo (Pinheiro, 2000).

Nesta localidade, população de *P. moratoi* ocorre em área de nascente de cerrado, onde existe a formação de pequenas poças com água de constante troca e fundo lodoso sob vegetação herbácea (com predominância de pteridófitas), arbustiva e arbórea. Estas poças deságuam em um pequeno córrego denominado Vargem Limpa, que possui fundo arenoso, com água corrente, margeada externamente por vegetação herbácea, arbustiva e arbórea. Este córrego percorre um vale em área aberta, sendo seu entorno ocupado por cerradão (Rolim 2009).

As observações de campo demonstraram à ocorrência de indivíduos que vocalizavam espalhados, na base de touceiras de grama nativa e pequenos arbustos e pteridófitas. O solo, do tipo arenoso, apresenta coloração escura próxima à camada superficial.

O número de indivíduos, em dias de maior atividade de vocalização, chegou a cerca de 20 machos. O período de maior ocorrência foi nas semanas com maior precipitação de chuva, no período do final da tarde e início da noite.

2.1.5 Lençóis Paulista/ Avaré (22° 49' 14.37"S; 48° 53'00.81"W, altitude: 706 m)/(22° 53'10.30"S; 48° 56'52.51" W, altitude: 666 m)

Os pontos amostrados de ocorrência de *P. moratoi*, se encontram dentro de um bloco de fazendas de propriedade da Duratex Florestal S.A. que maneja plantios de eucalipto (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*). Essas fazendas abrangem os municípios de Lençóis Paulista, Avaré e Borebi, localizado na região centro-oeste do Estado de São Paulo (Maffei, 2010). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é *Cwa*, clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno. De acordo com o Mapa de Vegetação do Brasil (IBGE 2004) e Ab'Saber (1977) a área é considerada de formação de cerrado, porém com a presença de formações florestais (Floresta Estacional Semidecidual). Em relação aos solos, predomina o Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa e em algumas partes ocorre o Latossolo Vermelho Escuro (Maffei, 2010).

Foram encontrados indivíduos sobre o solo, vocalizando na base de *Brachiaria sp.*, em área de solo compactado. Os machos foram visualizados em área aberta, próxima a uma estrada abandonada entre um talhão de eucalipto (*E. saligna*) e uma fonte. Os indivíduos vocalizavam a cerca de 20 m de uma área úmida sem acúmulo de água (Maffei, 2010).

2.2 Modo de captura

O período de coleta de dados transcorreu de outubro de 2009 a fevereiro de 2010 e de coleta de indivíduos entre outubro de 2010 e fevereiro de 2011. As coletas tinham início por volta das 16h se estendendo até as 23h.

As coletas seguiram as especificações e exigências do IBAMA sendo autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO – mediante documento N° 22419-2 emitido em 12/07/2010. As coletas realizadas na Estação Ecológica de Itirapina, além da autorização do SISBIO, também foram permitidas mediante Carta COTEC n°91/2011 D98/10 C e *PROCESSO SMA* N° 260108-011.573/2010 – Secretária do Meio Ambiente, SP – seguindo as normas do regimento interno da estação sob administração do Instituto Florestal.

Os anfíbios foram localizados pelos métodos de busca visual ativa (*visual encounters surveys*) como proposto por Crump e Scott Jr. (1994), zoofonia (*audio strip transects*) (Zimmerman, 1994) e amostragens nos sítios reprodutivos (*surveys at breeding sites*) (Scott Jr. e Woodward, 1994), com auxílio de lanterna de mão.

Em todas as localidades foram utilizadas armadilhas de interceptação e queda (*pitfall trap*) (Cechin e Martins 2000). Para tanto foram instalados linhas retas contendo baldes de 30L enterrados a altura do solo de dez em dez metros, intercalados por cercas guias onde os indivíduos, ao se depararem com a cerca, eram conduzidos até caírem nos baldes. Todas as linhas eram retiradas assim que o número permitido de indivíduos era coletado (figura 3).



Figura 3: Armadilha de interceptação e queda (*pitfall trap*) contendo baldes de 30 L enterrados a altura do solo, Bauru, SP

2.3 Análise morfológica, morfométrica e citogenética

2.3.1 Morfologia

Para que possíveis padrões geográficos de variação da morfologia externa fossem detectados, analisou-se visualmente 81 caracteres da espécie *Proceratophrys moratoii*. Foi selecionado um único indivíduo, entre os parátipos, que serviu como base de comparação dos caracteres analisados, para os indivíduos do estudo. Essa conduta foi adotada na tentativa de se evitar possíveis erros comparativos.

Este método permitiu verificar quais caracteres externos (figuras 4, 5 e 6) eram informativos para a separação entre as populações e quais representavam apenas variação intra-populacional. A relação dos caracteres externos considerados consta no Anexo I.

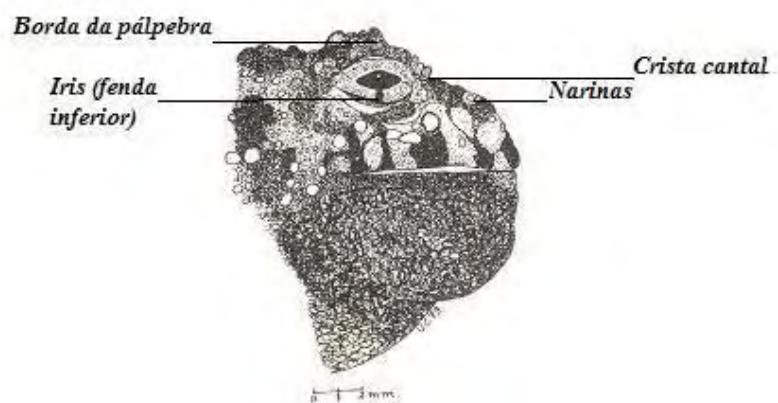


Figura 4: figura 2 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres da cabeça, em vista lateral, utilizados na análise comparativa entre as populações de *Proceratophrys moratoi*

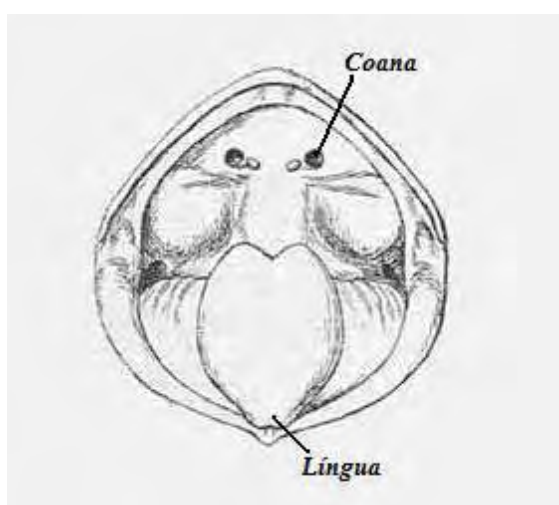


Figura 5: Prancha XV, reproduzida por Boulenger (1882) (modificada); Caracteres da cabeça, interior da boca, utilizados na análise comparativa entre as populações de *Proceratophrys moratoi*

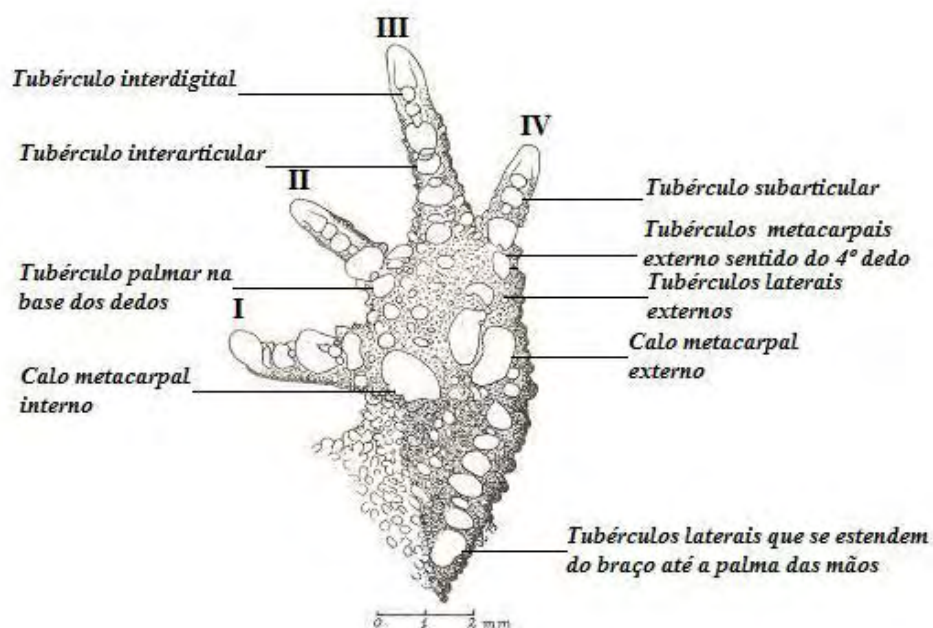


Figura 6: figura 3 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da palma da mão utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*

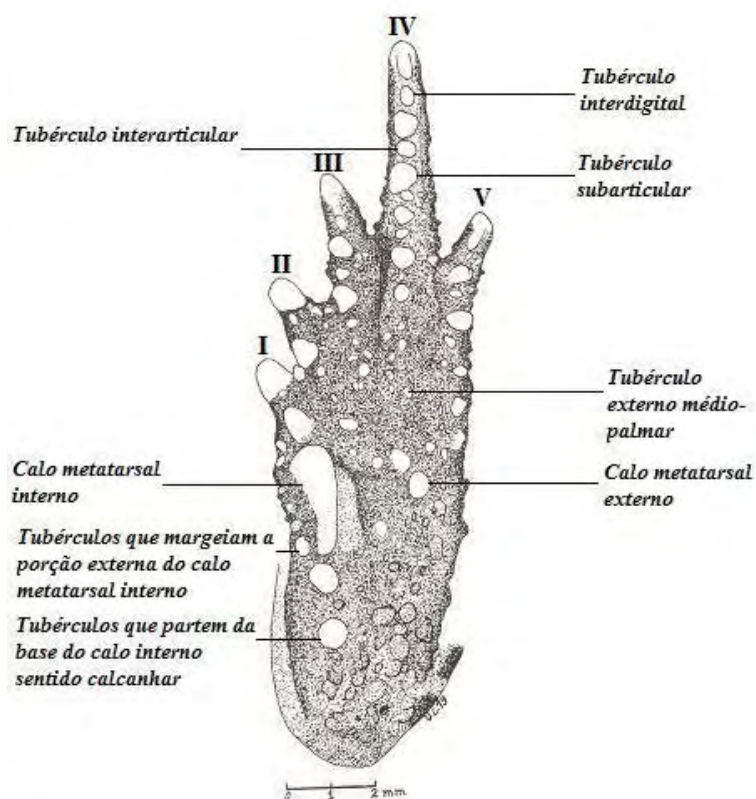


Figura 7: figura 4 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da planta do pé utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*

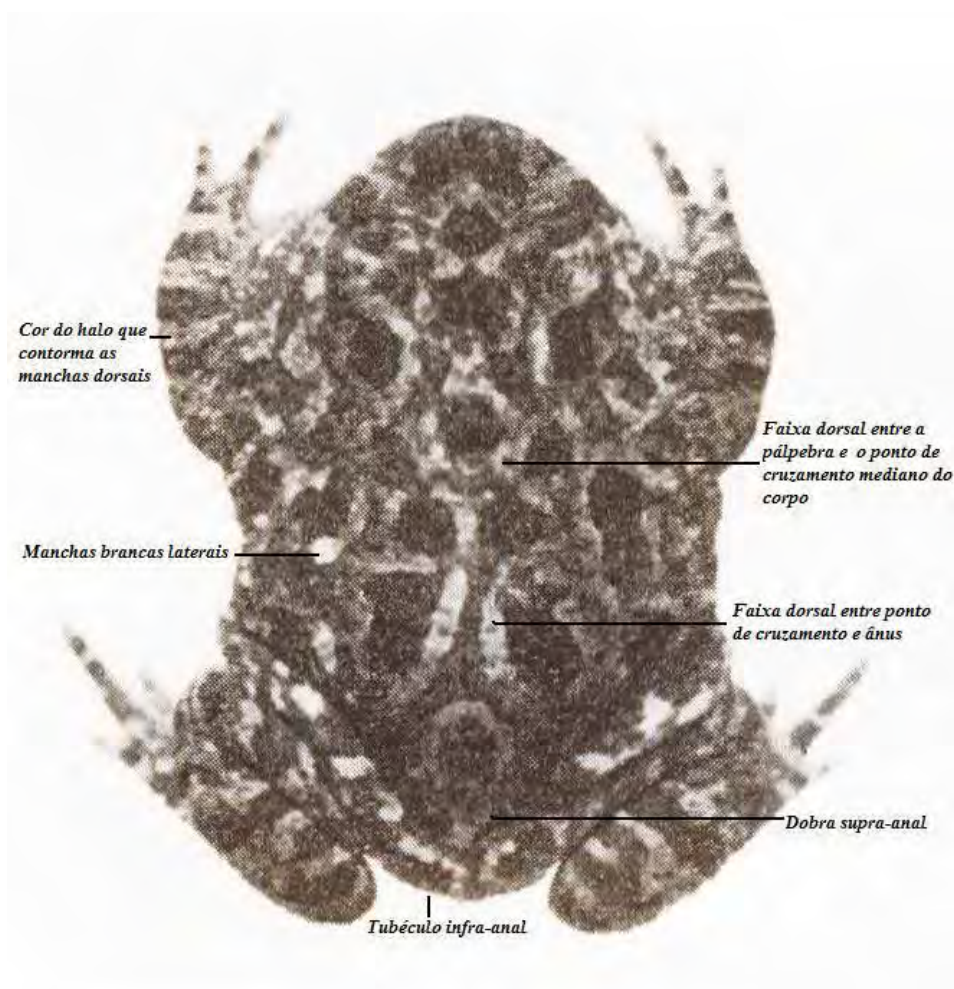


Figura 8: figura 1 publicada por Jim e Caramaschi 1980 (modificada); Caracteres externos da região dorsal utilizados na análise comparativa entre as populações *Proceratophrys moratoi*

2.3.2 Morfometria

Os dados morfométricos foram obtidos com paquímetro digital (Mitutoyo) com precisão 0,001mm. As medidas foram obtidas sempre em linha reta partindo da extremidade de cada estrutura.

Ao todo foram realizadas 15 medidas morfométricas, sendo essas as seguintes: Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal interno (CCMI) e Espessura do calo metatarsal interno (ECMI) (figura 9).

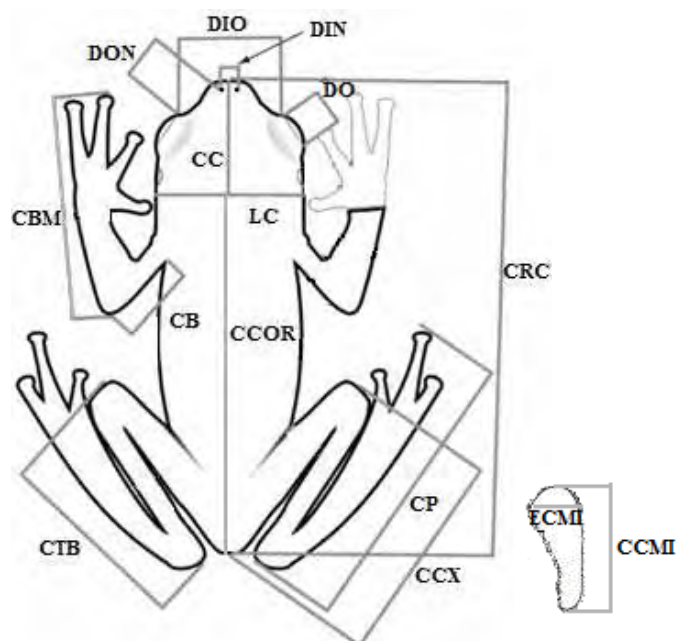


Figura 9: figura 1 publicada por Freitas et al. 2008 (modificada); medidas morfométricas utilizadas para análises comparativas entre as populações de *Proceratophrys moratoi*: Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal interno (CCMI) e Espessura do calo metatarsal interno (ECMI)

A média do valor de cada carácter morfométrico dos indivíduos separados segundo suas respectivas populações de origem foi submetida ao teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade e homocedasticidade das amostras.

Para verificar a existência de diferenças significativas nos dados morfométricos entre as populações, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA), posteriormente aplicando o teste *Tukey*.

Os 15 caracteres morfométricos foram submetidos à análise de Componentes Principais para identificar aqueles com maior correlação entre si e determinar medidas independentes que refletem a mesma informação dos caracteres originais. Para tanto,

foram formados três agrupamentos regionais: um composto por Botucatu (n amostral de 17 indivíduos), o segundo agrupamento formado pelas populações de Itirapina/Brotas e São Carlos (n amostral de 19 indivíduos) e o terceiro pelas populações de Bauru e Lençóis/Avaré (n amostral de 14 indivíduos). De 52 indivíduos amostrados, essa análise contemplou os dados obtidos de 50, sendo dois desconsiderados.

Entre os três agrupamentos, realizou-se uma comparação das médias concebidas pelas variáveis geradas (PCs) através do teste ANOVA. Conduziu-se uma análise discriminante para verificar se os fatores gerados eram eficientes em distinguir os agrupamentos regionais, para tanto, foi aplicado o teste lambda de Wilks com valor de significância $<0,001$ e os resultados foram plotados num gráfico em função das discriminantes canônicas.

Os testes foram realizados utilizando os programas SPSS Statistics 17.0 e BioEstat 5.0.

2.3.3 Análises citogenéticas

As análises citogenéticas empregadas no estudo de variação populacional em amostras de *Proceratophrys moratoi* seguiram padrões convencionais de comparação envolvendo aspectos relacionados ao número e morfologia dos cromossomos, localização das Regiões Heterocromáticas e das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).

2.3.3.1 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de preparações de suspensão do epitélio intestinal segundo Schmid (1978), com poucas modificações. O tratamento consiste em:

1. Injetar intraperitonealmente solução aquosa de colchicina a 1% (0,01 mL por grama de peso do animal).
2. Depois de 2 horas, os indivíduos foram anestesiados em benzocaina 3% e, após 15 – 30 minutos eram sacrificados com narcose. Foi realizada uma incisão lateral próximo na região do abdômen, de onde sacou-se o intestino para efetuar a remoção de sua porção anterior.
3. O intestino era aberto com o auxílio de uma tesoura e lavado em água destilada.
4. O material era transferido para uma placa de Petri contendo solução de citrato de sódio 0,9%.

5. Depois de 30-40 minutos, o material era transferido para outra placa de Petri contendo metanol e ácido acético na proporção de 3:1.
6. Era realizada raspagem vigorosa do epitélio intestinal com o auxílio de uma haste plástica, com cuidado para que o restante do intestino não se rompesse.
7. A suspensão de células era recolhida em um tubo e homogeneizada com pipeta Pasteur (siliconizada ou de plástico) e descartado o restante do intestino.
8. A suspensão de células era deixada 10 minutos no fixador.
9. A suspensão de células era centrifugada a 800rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 5mL de fixador. Este item era repetido para lavagem e fixação do material.
10. A suspensão celular era processada, com a confecção das lâminas ou armazenada em freezer.

2.3.3.2 Bandamento-C (região de heterocromatina)

Para a identificação das regiões de heterocromatina, aplicou-se a técnica descrita por Sumner (1972), com modificações, que consiste na ação sequencial de ácido, base e solução salina sobre o material cromossômico. Para tanto:

1. Deixar a lâmina submersa em HCl 0,2 N por 25 minutos, a temperatura ambiente.
2. Lavar com água destilada, a temperatura ambiente.
3. Incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60° C, por 8 a 16 segundos.
4. Lavar rapidamente em HCl 1 N, a 60° C, por alguns segundos.
5. Incubar a lâmina em 2xSSC, a 60° C, por 25 minutos.
6. Lavar com água destilada à temperatura ambiente.
7. Corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

2.3.3.3 Localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), através da Impregnação por nitrato de Prata (AgNO₃)

Para a caracterização das regiões responsáveis pela organização dos nucléolos (RONs), aplicou-se a técnica descrita por Howell e Black (1980), com modificações, que consiste na reação entre a Prata metálica e proteínas acíclicas que compõe a região das RONs. Para tanto foram utilizadas duas soluções:

- **Solução A (solução coloidal reveladora):** 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- **Solução B (solução de nitrato de Prata):** 1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

Para a coloração das RONS:

1. Hidrolisar o material por 3 min em HCl 1N a 60°C.
2. Secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula.
3. Deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3), a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar.
4. Corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos.
5. Deixar secar ao ar.



Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Coleta e ocorrência de *Proceratophrys moratoi* no estado de São Paulo

Durante o estudo foram coletados indivíduos em quatro das cinco localidades que apresentam populações de *Proceratophrys moratoi*. Um total de sete indivíduos foram coletados por localidade, tanto em Itirapina, Bauru quanto São Carlos, um indivíduo em Lençóis Paulista e nenhum indivíduo em Botucatu. Para atingir o número mínimo de dez indivíduos, foram acrescentados ao estudo indivíduos anteriormente depositados na Coleção Jorge Jim, atualmente parte integrante da Coleção de Herpetologia do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

No total foram analisados 52 indivíduos sendo 17 de Botucatu, 10 de Brotas/Itirapina, 10 de São Carlos, 10 de Bauru e cinco de Lençóis Paulista/Avaré.

3.2 Análises morfológicas de *Proceratophrys moratoi*

As análises morfométricas foram realizadas nas diferentes amostras e, dos 81 caracteres analisados, 22 não apresentaram variações (tabela 1), nove apresentaram variação em um único indivíduo em sua respectiva população (tabela 2) e 50 variaram tanto dentro da população como entre as populações (tabela 3).

Entre os 50 caracteres que variaram, as diferenças ocorreram dentro de uma população e se repetiram nas demais populações. Para seis caracteres, o máximo de fenótipos obtidos foi quatro, sendo que vinte e um caracteres apresentaram dois fenótipos e 23 apresentaram três (Tabela 3).

Algumas variações fenotípicas apresentaram ocorrência exclusiva em determinada população (Tabela 2) e os fenótipos frequentes em uma população foram tratados como variações regionais. Entre os 50 caracteres que variaram 14 apresentaram variações regionais. A população de Botucatu foi a que apresentou o maior número deste tipo de variação, com um total de cinco fenótipos específicos. As populações de Bauru e Itirapina/Brotas apresentaram quatro e São Carlos uma. A população representada por Lençóis/Avaré não apresentou variação regional perceptível.

Os fenótipos que ocorreram em apenas um indivíduo de todos os analisados, foram tratados como fenótipos pontuais. Em relação a esse tipo de variação, a população de

Botucatu e Itirapina/Brotas foram aquelas que apresentaram mais fenótipos pontuais, num total de cinco variações, enquanto a população de Bauru apresentou duas e as de São Carlos e Lençóis/Avaré apresentaram apenas uma variação (Tabela 2). Três fenótipos pontuais apareceram em apenas um indivíduo, porém o mesmo fenótipo se repetiu em outro indivíduo de população distinta.

Tabela 1: Lista de caracteres que não variaram entre as populações de *Proceratophrys moratoi* analisadas.

Caracteres que não variaram	
Pé	
Calo metacarpal interno ¹	
Tubérculo palmar na base do 3º dedo ¹	
Tubérculo palmar na base do 3º dedo ³	
Tubérculo palmar na base do 2º dedo	
Tubérculo palmar na base do 2º dedo	
Tubérculo palmar na base do 2º dedo	
Tubérculo palmar na base do 1º dedo	
Tubérculo palmar na base do 1º dedo.	
Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo ¹	
Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo ²	
Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos	
Mão	
Calo metatarsal interno ¹	
Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo	
Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo	
Primeiro tubérculo subarticular do 3º dedo	
Segundo tubérculo subarticular do 3º dedo	
Primeiro tubérculo subarticular do 4º dedo.	
Tubérculo interarticular do 4º dedo (entre o 1º e 2º subarticular)	
Primeiro tubérculo subarticular do 5º dedo	
Segundo tubérculo subarticular do 5º dedo	
Cabeça	
Coanas ¹ (em relação ao tamanho das narinas)	
Faixa dorsal entre a pálpebra e o ponto de cruzamento na região mediana do corpo	

Tabela 2: Lista de caracteres que ocorreram em indivíduos únicos, fenótipos pontuais, onde os números 1 e 2 indicam o estado do caráter; Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré

Caracteres que ocorreram em indivíduos únicos	Bt	It	Sc	Br	LA
Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo ²	1				
Segundo Tubérculo subarticular do 1º dedo	1				
Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo ¹			1		
Segundo tubérculo subarticular do 2º dedo	1	2			
Tubérculo interarticular do 3º dedo:	2	1			1
Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo (Forma)	1	1			
Calo metatarsal externo ¹		1			
Calo metatarsal externo ²		1		1	
Linha de tubérculos cônicos laterais				1	

Tabela 3: Lista de caracteres que variaram dentro da população e entre as populações de *Proceratophrys moratoi*, em que 0, 1, 2 e 3 representam, de forma crescente, a ocorrência de variações no estado de caráter sendo o estado 0 o mais comum na população, 1 o segundo mais comum e assim sucessivamente (os números não estão associados a derivações dos caracteres no decorrer da história evolutiva); X representa a ocorrência e Y variações fenotípicas exclusivas; Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré.

Caracteres que variaram	Bt			It			Sc			Br			LA					
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2			
Calo metacarpal externo ¹	X	X			X	X			X	X	Y		X	X		X	X	
Calo metacarpal externo ²	X	X				X	X		X	X	X		X	X			X	
Calo metacarpal externo ³ forma	X	X	X		X	X	X		X	X	X		X	X			X	
Calo metacarpal interno ² – Forma:	X	X			X	X			X	X			X				X	X
Calo metacarpal interno ³ :	X	X			X	X			X	X			X	X			X	X
Número de tubérculos que saem do calo metacarpal externo no sentido do 4º dedo:	X	X			X		Y		X				X	X			X	
Forma dos tubérculos que saem do calo metacarpal externo no sentido do 4º dedo:	X				X	X			X	X			X	X			X	
Tubérculo palmar na base do 3º dedo ² :	X				X				X	X			X	X			X	
Tubérculo palmar na base do 1º dedo ²	X	X			X	X			X	X			X	X			X	X
Tubérculo interdigital (Ponta do dedo até 1º subarticular) do 1º dedo	X	X			X	X	Y		X	X			X	X			X	
Tubérculo interdigital do 2º dedo:	Y	X	X		X	X			X				X				X	
Primeiro tubérculo subarticular do 3º dedo:	X	X	X		X	X			X	X			X	X			X	X
Segundo tubérculo subarticular do 3º dedo:	X	X			X				X				X				X	X
Tubérculo interdigital (ponta do dedo e 2º subarticular) do 3º dedo:	X				X	X			X				X	X			X	
Primeiro tubérculo subarticular do 4º dedo:	X	X			X	X			X	X			X	X			X	X
Segundo tubérculo subarticular do 4º dedo:	X	X			X	X			X				X				X	
Tubérculo interarticular do 4º dedo:	X	X			X	X			X	X			X	X			X	
Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo:	X	X			X	X			X				X				X	
Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo - Número:	X	X	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X
Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos – Número:	X	X	X		X	X			X	X			X	X	X		X	X
Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos – Tamanho:	X	X	X		X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X
Calo metatarsal interno ² :	X				X				X				X	Y			X	
Tubérculo interdigital do 1º dedo (entre o primeiro tubérculo interarticular e ponta do dedo):	X	X			X	X			X				X	X	X		X	X
Tubérculo interdigital do 2º dedo (entre a ponta do dedo e subarticular)	X	X	X		X	X			X	X			X	X	X		X	X
Tubérculo interdigital do 3º dedo (entre a ponta do dedo e 2º subarticular)	X	X	X		X	X			X	X			X	X	X		X	X

Tabela 3: Lista de caracteres que variaram dentro da população e entre as populações de *Proceratophrys moratoi*, em que 0, 1, 2 e 3 representam, de forma crescente, a ocorrência de variações no estado de caráter sendo o estado 0 o mais comum na população, 1 o segundo mais comum e assim sucessivamente (os números não estão associados a derivações dos caracteres no decorrer da história evolutiva); X representa a ocorrência e Y variações fenotípicas exclusivas; Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré

(Continuação)					
Tubérculo interarticular do 3º dedo (entre o 1º e 2º subarticular)	X X X	X X X	X X	X X X	X
Segundo tubérculo subarticular do 4º dedo	X	X X	X X	X X	X X
Tubérculo interarticular do 4º dedo (entre o 2º e 3º subarticular)	X X Y	X	X X	X X	X X
Tubérculo interdígital do 4º dedo (ponta do dedo e 3º subarticular) ¹	X X X	X X	X X X	X X	X X
Tubérculo interdígital do 4º dedo (ponta do dedo e 3º subarticular) ²	X X X	X X	X X	X X	X
Terceiro tubérculo subarticular do 4º dedos	X	X X	X	X X	X
Tubérculo interarticular do 5º dedo (entre o 1º e 2º subarticular):	X X X	X X	X X X	X X	X X
Tubérculo interdígital do 5º dedo (ponta do dedo e 2º subarticular):	X X X	X X X	X	X X X	X
Tubérculo externo médio-palmar (posição mediana da planta do pé)	X X	X X	X	X X	X
Número de tubérculos que partem da base do calo interno sentido calcanhar	X X X	X X	Y X X	X X	X X
Tubérculos que partem da base do calo interno sentido calcanhar	X X Y	X X	X X X	X X	X X
Tubérculos que margeiam a porção externa do calo metatarsal interno:	X Y X	X	X	X X	X
Forma das narinas	X X	X X	X X	X X	X X
Crista cantal ¹	X X	X	X X	X X	X
Crista cantal ²	X	X	X X	X X	X
Borda da pálpebra	X	X X	X X	X X	X X
Forma da língua	X	X X	X X	X	X
Coanas ²	X	X X	X	X X	X
Manchas brancas laterais presentes na inserção braço/tórax	X X X	X X	X X X	X X	X
Faixa dorsal entre o ponto de cruzamento e o ânus	X	X	X X	X X Y	X
Dobra supra-anal	X X X	X X	X X X	X X X	X X
Tubérculo infra-anal	X Y	X	X	X	X
Cor do halo que contorna as manchas	X	X Y	X	X X Y	X
Cor do ventre	X	X X	X X	Y	X
Iris	X	X	X X	X X	X X

As populações apresentaram poucas variações exclusivas. As variações mais frequentes foram vistas em relação aos calos, tubérculos e coloração. A coloração foi o padrão que mais se destacou em relação aos demais caracteres, sendo bem distinta entre os indivíduos de São Carlos e principalmente Bauru (figura 10).

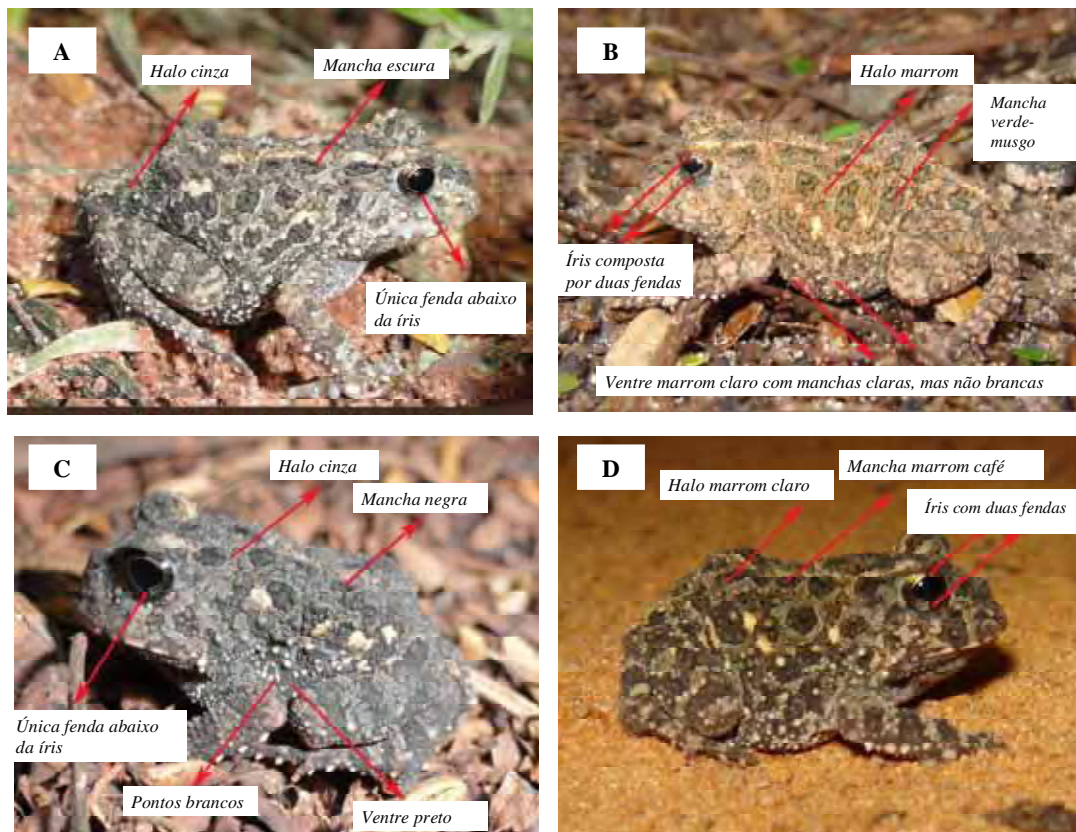


Figura 10: Variações morfológicas existentes entre quatro populações de *P. moratoi* no estado de São Paulo, Brasil; Lençóis Paulista (A), São Carlos (B), Bauru (C) e Itirapina (D). Fotos Costa, W. P.

3.3 Análises morfométricas de *Proceratophrys moratoi*

Foram analisados 15 caracteres morfométricos de cada um dos 52 indivíduos estudados, salvo dois indivíduos que tiveram medidas comprometidas pelo seu estado de fixação. Com base nos teste de normalidade verificou-se que em cada população, todos os caracteres morfométricos seguiram uma distribuição normal, suprimindo a necessidade de transformações matemáticas que atestem a normalidade.

Tabela 4: Caracteres morfológicos analisados entre as populações de *Proceratophrys moratoj*, São Paulo, Brasil. Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI); em vermelho as menores médias encontradas, em azul as maiores médias encontradas

Características	Localidades														
	Botucatu (n=17)			Itirapina (n=10)			São Carlos (n=10)			Bauru (n=10)			Avaré/ L. Paulista (n=5)		
	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão
CRC	32,47-23,98	26,50	2,20	34,40-27,55	29,96	2,11	32,35-25,59	28,59	1,33	29,42-24,35	27,59	1,61	35,6-25,26	31,60	4,30
LC	13,44-10,79	11,60	0,64	14,21-11,12	13,13	0,92	14,64-11,05	12,66	0,65	12,96-11,06	12,33	0,67	13,39-10,75	12,70	1,10
CC	12,36-9,75	10,73	0,59	12,98-11,21	12,30	0,53	13,53-10,51	11,86	0,52	11,98-10,51	11,41	0,50	12,51-10,63	12,02	0,79
CCOR	24,37-17,60	19,49	1,79	26,53-19,67	22,42	1,93	23,37-18,91	21,13	1,01	22,07-18,65	20,35	1,15	28,28-18,29	24,05	3,83
DIN	2,81-1,90	2,15	0,22	3,43-1,76	2,63	0,44	2,80-2,06	2,39	0,31	2,71-2,10	2,33	0,18	2,55-2,05	2,37	0,19
DON	3,44-2,94	3,10	0,15	3,70-2,97	3,26	0,25	3,82-2,89	3,26	0,20	3,05-2,67	2,93	0,11	3,34-2,78	3,17	0,23
DO	3,97-2,73	3,35	0,32	4,24-3,28	3,84	0,26	4,21-3,54	3,75	0,23	4,02-3,31	3,66	0,24	3,72-3,25	3,54	0,19
DIO	6,34-4,78	5,49	0,37	6,56-5,14	6,04	0,43	6,67-5,43	5,97	0,30	5,94-5,40	5,63	0,16	6,43-5,43	5,86	0,37
CCX	12,98-8,35	10,73	1,08	13,21-10,80	12,23	0,78	13,56-10,97	11,89	0,52	11,98-10,09	11,35	0,57	12,24-10,88	11,66	0,61
CTB	11,71-9,02	10,26	0,69	12,06-9,15	11,24	0,82	12,04-9,86	10,87	0,41	10,83-9,69	10,37	0,44	11,11-9,79	10,48	0,56
CP	17,87-13,72	15,00	1,05	18,42-15,07	16,95	1,25	20,00-14,90	16,60	0,79	16,75-14,19	15,61	0,89	17,65-14,74	16,36	1,20
CB	12,50-8,28	10,16	1,03	12,28-9,73	11,36	0,79	12,87-10,66	11,46	0,41	11,37-9,30	10,23	0,57	12,01-10,05	10,97	0,96
CBM	14,49-11,88	12,89	0,78	15,63-13,25	14,77	0,83	15,18-13,15	14,03	0,58	14,41-12,44	13,71	0,71	14,80-13,12	14,11	0,80
CCMI	2,81-1,96	2,31	0,22	2,91-2,48	2,67	0,13	3,10-2,38	2,63	0,12	2,61-2,23	2,38	0,13	2,67-2,02	2,38	0,28
ECMI	1,21-0,79	0,94	0,14	1,05-0,70	0,90	0,13	1,30-0,72	0,89	0,08	0,86-0,61	0,71	0,07	1,00-0,74	0,90	0,11

As médias morfométricas de cada carácter foram comparadas. Nessa comparação verificou-se que, em 13 das 15 medidas, os indivíduos da população de Botucatu apresentaram médias menores que as demais localidades, enquanto que Itirapina/Brotas apresentou a população com médias maiores, 11 de 15 (tabela 4).

A Análise de Variância (ANOVA) demonstrou em maior número, variação significativa entre populações de Botucatu – Itirapina/Brotas (13 de 15, onde $p \leq 0,05$); Botucatu – São Carlos (9 de 15 onde $p \leq 0,05$), e um menor número de variação significativa entre populações de Botucatu – Bauru (2 de 15 onde $p \leq 0,05$); Itirapina/Brotas – São Carlos não apresentou variação significativa (tabela 5). Nos casos de Itirapina/Brotas e São Carlos, não foram verificadas variações significativas em relação às populações de Lençóis Paulista/Avaré.

A análise de Componentes Principais permitiu reduzir de 15 caracteres para dois componentes principais (fatores) ortogonais, sendo o primeiro componente (PC1) responsável por explicar 52% da variabilidade total entre as populações e o segundo componente (PC2) respondendo por 21%. A análise de ambos os componentes contemplou 73% da variabilidade encontrada.

Os 15 caracteres analisados contribuíram com pesos distintos na resultante de cada componente. Para PC1, 13 apresentaram valores significativos, sendo LC (largura da cabeça) aquele com maior peso no componente. Para PC2, quatro medidas contribuíram e destas, DON (distância olho/narinas) foi a que apresentou maior peso. Com a análise de Componentes Principais foi possível verificar a comunalidade de cada variável, ou seja, a relação de cada variável com todas as demais. Dez variáveis apresentaram comunalidade superior a 0,80, demonstrando o alto grau de dependência entre elas, uma vez que quanto mais próximo de 1,0 esteja o valor obtido, maior o grau de dependência a ser considerado (Tabela 6). Os valores abaixo de 0,50 foram suprimidos para auxiliar na visualização dos resultados.

Tabela 5: Análise de variância entre as populações de *Proceratophrys moratoii*, São Paulo, Brasil. Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI); Bt= Botucatu, It= Itirapina/Brotas, Sc= São Carlos, Br= Bauru, LA= Lençóis Paulista/Avaré; *ns*= não significativo

	F	Bt-It (Q=; p ≤ 0,05)	Bt-Sc (Q=; p ≤ 0,05)	Bt-Br (Q=; p ≤ 0,05)	Bt-LA (Q=; p ≤ 0,05)	It-Sc (Q=; p ≤ 0,05)	It-Br (Q=; p ≤ 0,05)	It-LA (Q=; p ≤ 0,05)	Sc-Br (Q=; p ≤ 0,05)	Sc-LA (Q=; p ≤ 0,05)	Br-LA (Q=; p ≤ 0,05)
CRC	6.9596	5.42, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	6.25, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	4.56, <0.05
LC	6.7165	6.78, <0.01	4.76, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CC	12.8438	9.11, <0.01	6.57, <0.01	<i>ns</i>	5.85, <0.01	<i>ns</i>	4.61, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CCOR	75.938	5.46, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	6.67, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	5.03, <0.01
DIN	4.7225	6.07, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DON	4.6212	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	5.13, <0.01	<i>ns</i>	5.21, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DO	6.9174	6.58, <0.01	5.40, <0.01	4.25, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DIO	5.2541	5.50, <0.01	4.72, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CCX	5.8661	6.24, <0.01	4.81, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CTB	4.2535	5.28, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	4.20, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CP	5.9823	6.04, <0.01	4.96, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CU	6.2876	5.10, <0.01	5.51, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	4.30, <0.05	<i>ns</i>	4.66, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CABM	10.7429	8.89, <0.01	5.35, <0.01	<i>ns</i>	4.16, <0.05	<i>ns</i>	4.47, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CCMI	7.6179	6.35, <0.01	5.70, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	4.74, <0.05	<i>ns</i>	4.09, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
LCMI	5.1449	<i>ns</i>	<i>ns</i>	6.22, <0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	4.42, <0.05	<i>ns</i>	4.37, <0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Tabela 6: Peso dos caracteres morfométricos em função dos Componentes Principais gerados (PC1 e PC2); Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI)

	<i>Pesos</i>		<i>Comunalidade</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	
LC	.895		.937
CC	.881		.940
CBM	.866		.898
CP	.821		.905
DO	.820		.728
CCX	.802		.860
CRC	.790		.952
CTB	.761		.846
DIO	.732		.841
CCOR	.724		.914
CCMI	.674	.510	.812
DIN	.659		.713
CB	.584	.553	.742
DON		.826	.706
ECMI		.516	.419

De acordo com os dados de comunalidade, e com os valores obtidos para cada uma das variáveis em função do fator 1 e fator 2 (PC1 e PC2), pode-se observar uma relação entre os caracteres morfométricos e os fatores obtidos (figura 11).

A comparação das médias concebidas por PC1 e PC2 com a aplicação do teste ANOVA indicou diferença significativa entre os componentes (Tabela 7). A análise discriminante baseada no teste lambda de Wilks, foi significativa (<0.001) indicando que os dois fatores foram eficientes em discriminar os três agrupamentos. O agrupamento das localidades foi considerado devido ao número distinto e pequeno das observações em determinados pontos. Logo, foram gerados três agrupamentos: 1= Botucatu, 2= São Carlos e Itirapina/Brotas e 3= Bauru e Lençóis Paulista/Avaré. No gráfico gerado em função das discriminantes canônicas verificaram-se grupos centrais com aglomerados regionais compostos por indivíduos oriundos de um mesmo agrupamento, sendo a população de Botucatu melhor evidenciada (Figura 12).

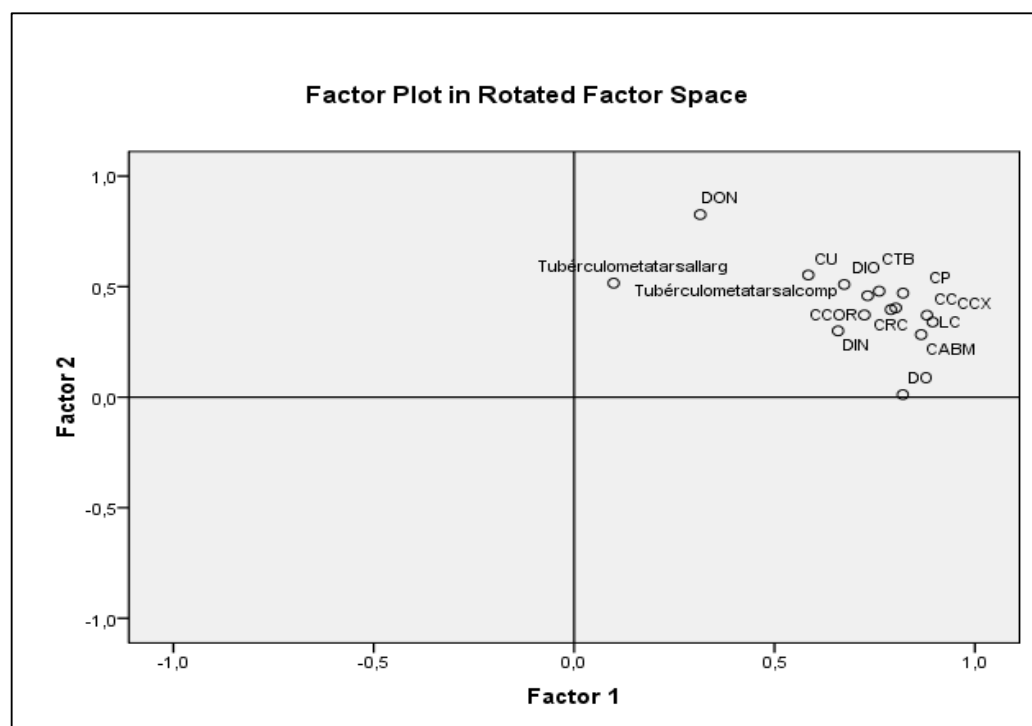


Figura 11: Gráfico de dispersão dos caracteres morfométricos analisados em função dos fatores (PC1 e PC2) obtidos; Comprimento rostro cloacal (CRC), Largura da cabeça (LC), Comprimento da cabeça (CC), Comprimento do corpo, (CCOR), Distância inter-nasal (DIN), Distância olho-nasal (DON), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-ocular (DIO), Comprimento da coxa (CCX), Comprimento da tíbia (CTB), Comprimento do pé (CP), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço + mão (CBM), Comprimento do calo metatarsal (CCMI), Espessura do calo metatarsal (ECMI)

Tabela 7: Comparação das médias concebidas por PC1 e PC2, através do teste ANOVA entre as localidades

	Locais	N	Média	Desv. Pad	Erro Padrão	IC para a média		Mínimo	Máximo	p-valor Anova
						LI	LS			
A-R factor score 1	1	17	-1.0	0.7	0.2	-1.3	-0.6	-2.1	0.8	<0.001
	2	19	0.6	0.8	0.2	0.3	1.0	-1.1	1.8	
	3	14	0.3	0.7	0.2	0.0	0.7	-0.9	1.2	
	Total	50	0.0	1.0	0.1	-0.3	0.3	-2.1	1.8	
A-R factor score 2	1	17	0.2	0.7	0.2	-0.1	0.6	-0.8	1.6	<0.001
	2	19	0.4	1.1	0.2	-0.1	0.9	-1.4	3.0	
	3	14	-0.8	0.7	0.2	-1.2	-0.4	-1.7	0.7	
	Total	50	0.0	1.0	0.1	-0.3	0.3	-1.7	3.0	

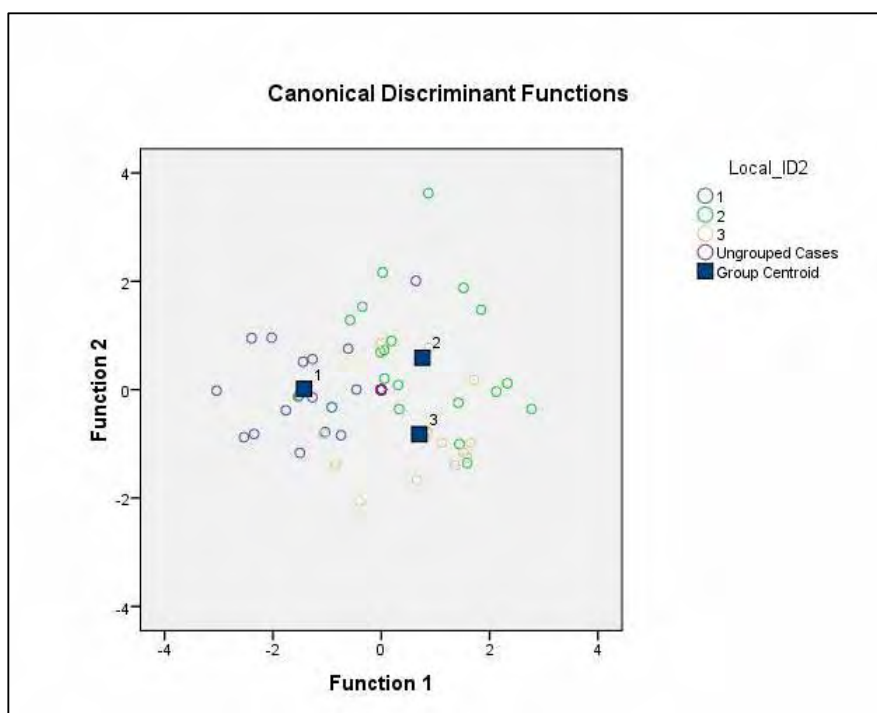


Figura 12: Gráfico gerado em função das discriminantes canônicas com evidente aglomeração de indivíduos oriundos de um mesmo agrupamento; Grupos; 1= Botucatu, 2 São Carlos + Itirapina/Brotas e 3 Bauru + Lençóis Paulista/Avaré

Em relação ao coeficiente de função padronizada e de correlação, PC1 apresentou maior peso na função 1, enquanto PC2 foi mais representativo na função 2 (tabela 8-9). O coeficiente de correlação apresenta as correlações entre cada fator e a função discriminante (tabela 9), indicando a representatividade de cada fator em cada função obtida.

Tabela 8: Coeficientes de função padronizada em relação a PC1 e PC2

	Função	
	1	2
A-R factor score 1	,991*	.157
A-R factor score 2	-.273	,974*

Tabela 9: Coeficientes de correlação em relação a PC1 e PC2

	Função	
	1	2
A-R factor score 1	,970*	.242
A-R factor score 2	-.157	,988*

Na análise para demonstrar a eficiência da classificação dos indivíduos segundo a função discriminante, verificou-se que 75% dos indivíduos foram classificados corretamente, independentes do agrupamento (tabela 10).

Tabela 10: Análise da eficiência da classificação dos animais pela função discriminante, em amarelo % de acerto por localidade

		Predito				Total
		Local	1	2	3	
Original	Count	1	16	1	0	17
		2	1	14	5	20
		3	2	4	9	15
		Ungrouped cases	0	21	0	21
	%	1	94.1	5.9	.0	100.0
		2	5.0	70.0	25.0	100.0
		3	13.3	26.7	60.0	100.0
		Ungrouped cases	.0	100.0	.0	100.0

3.4 Análises citogenéticas de *Proceratophrys moratoi*

A análise citogenética realizada revelou a ocorrência de significativa conservação na estrutura cariotípica, na localização das RONS e na distribuição da heterocromatina constitutiva nas diferentes populações de *Proceratophrys moratoi* estudadas.

Todas as amostras apresentaram cariótipo com número diplóide de 22 cromossomos, constituídos por 20 cromossomos metacêntricos e 2 submetacêntricos (Figuras 13, 14, 15, 16). Do mesmo modo, a aplicação de técnicas rotineiras de bandamento cromossômico não revelaram diferenças de localização e expressão dos marcadores nos cariótipos. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, revelado pelo bandamento C, identificou a presença de segmentos repetitivos banda-C positivos localizados em posição centromérica de todos os cromossomos (Figuras 13, 14, 15, 16) e as regiões organizadoras de nucléolos, identificadas pela impregnação com nitrato de Prata, foram localizadas em posição intersticial nos braços longos do par cromossômico número 7 (Figuras 13, 14, 15, 16).

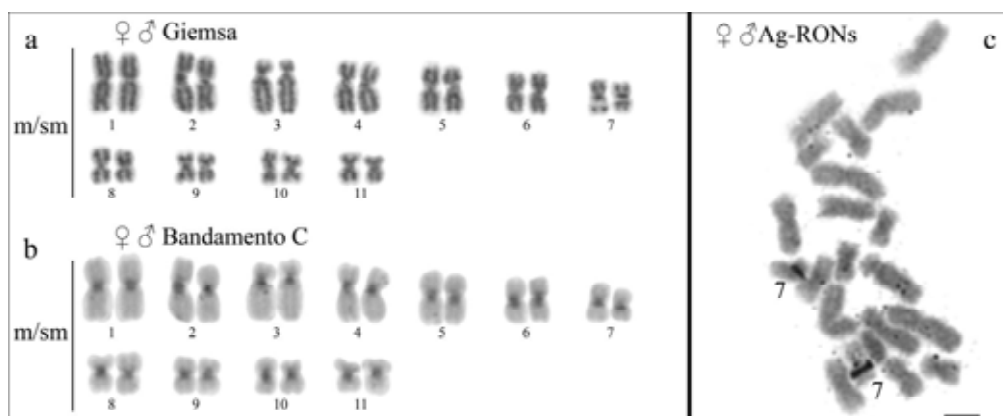


Figura 13: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μ m.

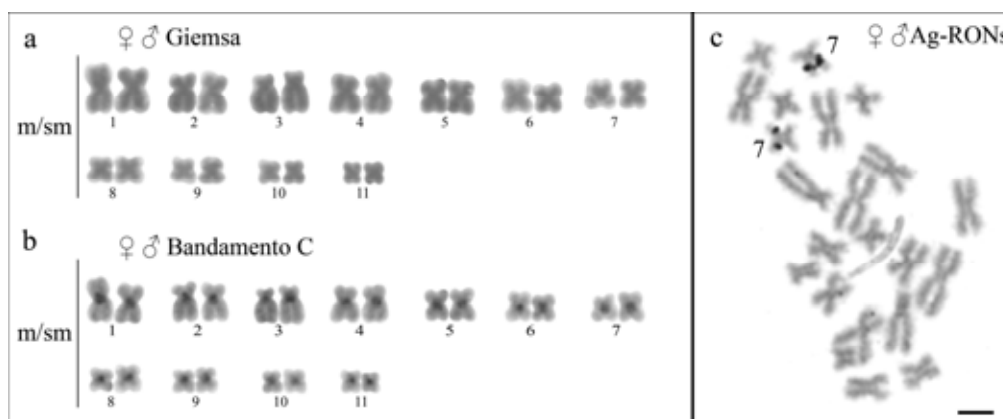


Figura 14: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de São Carlos, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μ m.

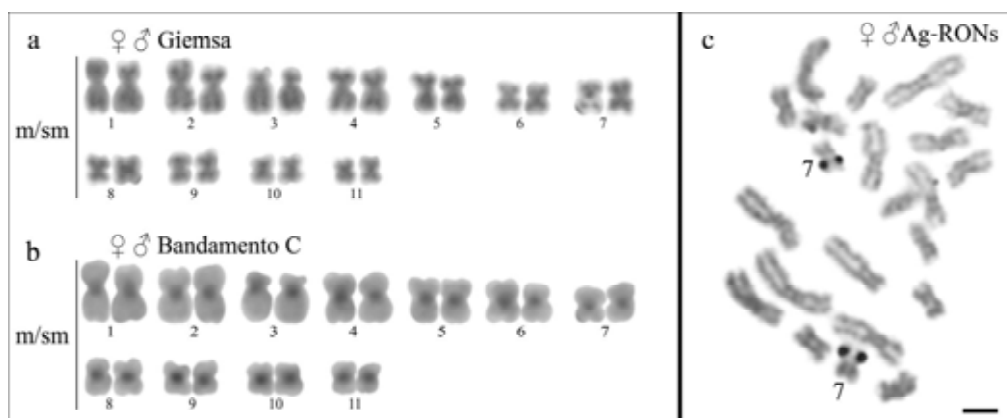


Figura 15: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de, Bauru, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento-C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μ m.

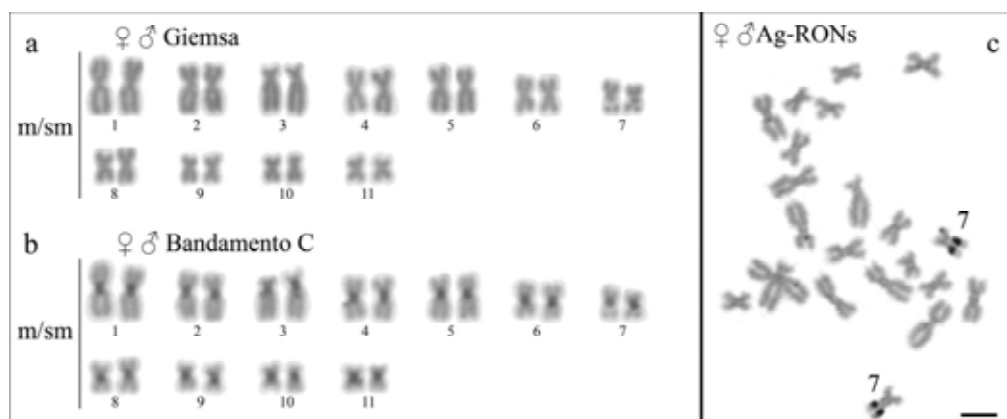


Figura 16: Cariótipos de exemplares machos da população de *Proceratophrys moratoi* de Itirapina, São Paulo, Brasil, após coloração convencional por Giemsa (a), bandamento C (b) e cromossomos portadores das RONS (c). A barra equivale a 5 μ m.

Não foram observados polimorfismos cromossômicos numéricos ou estruturais, assim como não foi observada nenhuma variação cromossômica relacionada ao sexo.



Discussão

4. DISCUSSÃO

Os estudos sobre os organismos e suas relações determinadas por variações geográficas, começando com os trabalhos realizados por Darwin e Wallace, têm sido uma das mais importantes abordagens na compreensão de eventos evolutivos. Entende-se geralmente evolução como um processo gradual, uma vez que as diferenças entre as populações variam desde incomensuravelmente pequenas, passando por vários graus de diferenciação entre as populações, até distintos níveis comportamentais, cromossômicos e de desenvolvimento, que são característicos de diferentes espécies (Futuyma, 1986).

Níveis de variação entre populações são de difícil classificação, principalmente porque, em certos casos, as diferenças são sutis e a percepção do processo denota tempo e experiência do observador.

Analisando os processos que permitem o surgimento de variações, as características ambientais, o isolamento geográfico e a seleção sexual, são apontados como os principais indutores. A forma como esses fatores agem sobre as populações, tanto separados quanto em conjunto, pode determinar o maior ou menor grau de diferenciação entre as mesmas (Freeman e Herron, 2009).

No presente trabalho foi possível verificar a existência de variação tanto intra-populacional quanto inter-populacional. Nas populações de *Proceratophrys moratoi* analisadas as variações foram encontradas nas características do tamanho do corpo, padrão de coloração e variações particulares e exclusivas de alguns caracteres. Dos fatores que mais podem ter contribuído para as variações encontradas nas populações dos organismos desta espécie de anfíbio, as características do ambiente e o possível isolamento geográfico são os mais prováveis. Sobre a atuação da seleção sexual, nada plausível foi verificado.

Quanto à determinação de espécies, verificaram-se poucas particularidades específicas nas populações neste estudo, não dando suporte para diagnoses que possibilitem tratar uma ou outra como espécie distinta. Segundo Futuyma (1986), populações não podem ser consideradas espécies válidas apenas por estarem aparentemente isoladas; caso sejam muito semelhantes entre si, presume-se que sejam potencialmente capazes de intercruzarem; logo, seriam compatíveis com o Conceito Biológico de Espécie proposto por Mayr (1942). Diante do fato de haver mais semelhanças do que divergências entre as populações analisadas, aceita-se, portanto, que se tratam de uma mesma espécie.

4.1 VARIAÇÃO POPULACIONAL DE *Proceratophrys moratoi* NO ESTADO DE SÃO PAULO

4.1.1 Morfologia

A morfologia, assim como a genética e o comportamento, faz parte de um dos três eixos nos quais, tradicionalmente, ficam focados estudos de variação. Embora nem sempre os três parâmetros modifiquem na mesma taxa e direção (Marroig e Cheverud, 2001; Wiens e Penkrot, 2002), os padrões de co-variação entre esses fatores, permitem demonstrar qual a contribuição do fluxo gênico, dos eventos de vicariância e das adaptações locais à condição temporal e espacial (Lu e Bernatchez, 1999; McKay e Latta, 2002; Thorpe e Stenson, 2003; Gübitz, Thorpe e Malhotra, 2005; Nosil e Crespi, 2006). Ao longo da história evolutiva, acredita-se que o conjunto dessas interações promove o surgimento de novas espécies. Essas espécies, à medida que ampliam sua área de ocupação, se sujeitam a novas interações que permitem a ocorrência de variações populacionais. E tais variações, quanto mais acentuadas, podem justificar o surgimento de novas espécies, gêneros, famílias, e assim sucessivamente, até atingir os planos mais abrangentes da classificação taxonômica.

No gênero *Proceratophrys* as diferenças entre espécies, de forma bem geral, podem ser dadas pela observação das características da cabeça. Esta simples comparação pode subdividir o gênero em três grupos: (i) *Proceratophrys boiei*, que apresenta como característica marcante o apêndice palpebral desenvolvido (revisão Prado e Pombal Jr., 2008); (ii) *Proceratophrys bigibbosa*, que apresenta uma protuberância (inchaço) pós-ocular (revisão Kwet e Faivovich 2001) e (iii) *Proceratophrys cristiceps*, proposto para agrupar as espécies que não apresentam apêndices palpebrais nem protuberância pós-ocular, grupo este no qual *Proceratophrys moratoi* está inserido (Martins e Giaretta, 2011).

Para as espécies relacionadas no mesmo grupo de *Proceratophrys moratoi*, como é o caso de *Proceratophrys cururu* e *Proceratophrys concavitympanum*, por exemplo, os caracteres diagnósticos espécie-específicos levam em consideração variações como tubérculos dorsais, tubérculos palpebrais (ex. em relação aos tubérculos palpebrais, *P. concavitympanum* difere de *P. cururu* por apresentar verrugas palpebrais maiores e menores), forma do focinho (ex. *Proceratophrys cristiceps* e *Proceratophrys goyana* têm focinho vertical de perfil enquanto *Proceratophrys concavitympanum* apresenta focinho obtuso), aspectos da crista dorsal, (Eterovick e Sazima, 1998; Giaretta et al., 2000), entre outros.

No presente trabalho, nenhuma variação neste nível foi encontrada entre as populações de *Proceratophrys moratoi* e as análises revelaram poucas divergências regionais quanto aos caracteres morfológicos estruturais analisados, tais como calos, olhos e tubérculos. O aspecto morfológico que mais discriminou os indivíduos e suas populações foi o padrão de coloração.

Jim e Caramaschi (1980) caracterizam a espécie apenas como de tamanho pequeno, grande rugosidade e colorido, não deixando claros os caracteres diagnósticos de *Proceratophrys moratoi*. Os principais detalhes específicos foram apontados na descrição do holótipo e, com base nessa comparação verificou-se que as variações não foram substanciais, sendo que a ausência de autapomorfias evidentes não permitiu o reconhecimento de espécies distintas nas populações estudadas. Segundo Jim e Caramaschi (1980), poucas são as variações entre os exemplares, a não ser detalhes de tamanho e de colorido, basicamente o que é reportado no presente trabalho.

Como apontado anteriormente, as variações foram mais frequentes em relação a calos, tubérculos e coloração. Prado e Pombal Jr. (2008), em um estudo sobre caracterização taxonômica das espécies de *Proceratophrys* com apêndices palpebrais analisaram 13 espécies e, em suas considerações sobre variação populacional, verificaram que alterações nesses caracteres são comuns para o gênero; logo, não podem ser consideradas como caracteres diagnósticos para a determinação de espécies.

Observando o baixo número de caracteres estruturais exclusivos de uma única população e verificando-se que os demais caracteres são encontrados em todas as populações, variando apenas em relação à sua frequência, duas propostas explicativas poderiam ser consideradas: (i) que existe algum fluxo gênico entre as populações aparentemente isoladas; (ii) as pressões seletivas locais não tem atuado diretamente sobre os caracteres, ou tem permitido a manutenção seletiva dos polimorfismos, como observado por Ohmer et al., (2009) para *Dendropsophus ebraccatus*.

Vários estudos buscam compreender variações entre populações e o polimorfismo nas espécies (e.g. Vieira et al., 2008; Ohmer et al., 2009). Entretanto, a identificação de polimorfismo nos indivíduos requer cuidados e sua definição deve ser clara (Vieira et al., 2008). Polimorfismo é uma variação dentro da espécie que é independente da ontogenia e do sexo do animal, assumindo-se portanto que a variação é de origem genética e hereditária (Wiens, 1999). Neste contexto, a baixa capacidade de dispersão em relação a

outros grupos de vertebrados, diferenciação em pequenas escalas espaciais e a alta fidelidade dos indivíduos a determinados sítios de reprodução em nível regional faz dos anuros um taxa ideal para estudos espaciais de divergência de caracteres (Newman e Squire, 2001; Beebee, 2005; Loughheed et al, 2006).

Ao realizarem um exame detalhado da variação morfológica de *Proceratophrys cristiceps*, Vieira et al. (2008) verificaram a presença de dois morfotipos (amarelo e comum) entre as populações. Características particulares tanto estruturais quanto na coloração, provaram a existência de uma estimável variação entre indivíduos de diferentes localidades. Os autores chegam a considerar que as variações encontradas ultrapassam as normalmente conhecidas como padrão geral da cor, porém, apoiados nas semelhanças morfológicas e em análises de alometria do desenvolvimento total do corpo, sugerem que se tratam da mesma espécie, mas com reconhecidos morfotipos, que refletem a ação de flutuações ambientais ou genéticas ao longo do tempo. As variações encontradas entre as populações de *Proceratophrys moratoi* foram menos discrepantes que as encontradas para *Proceratophrys cristiceps* (Vieira et al. 2008), porém as diferenças que às discriminaram possivelmente também sejam reflexo de flutuações ambientais ou genéticas ao longo do tempo.

Neste estudo, tanto a população de São Carlos quanto a de Bauru apresentaram indivíduos com coloração característica e com um padrão comum a todos os representantes da população. O fenótipo com coloração variando de amarelo com manchas em tons escuros a vermelho-telha no dorso e com manchas escuras mais esverdeadas, de tom verde musgo foi característico de todos os exemplares de São Carlos, sendo que nesta localidade nenhum indivíduo de tonalidade escura foi encontrado. Por outro lado, na população de Bauru, todos os espécimes apresentaram uma coloração cinza-escura, com manchas pretas de aspecto aveludado e nenhum indivíduo de coloração clara foi coletado. Em Itirapina/Brotas, verificou-se uma variação entre o padrão de coloração dos indivíduos muito maior que nas demais localidades, sendo encontrados exemplares com cores tanto do “tipo” Bauru, quanto do “tipo” São Carlos.

O polimorfismo relacionado ao padrão de coloração parece ser um evento comum em anuros tropicais. Os mecanismos que permitem sua ocorrência na natureza ainda não puderam ser claramente explicados segundo Wells (2007), pois grande parte do pensamento em torno dessa problemática tem sido simplista e muitas das propostas de seleção estão em desacordo com as conclusões extraídas dos estudos teóricos de genética

populacional. Aos olhos de alguns pesquisadores, o polimorfismo se dá pela relação dos indivíduos e seu habitat (ação temporal e espacial), tendo como agente seletivo o processo de predação diferencial (Wells, 2007).

Apesar da dificuldade para verificar a ação da predação diferencial nos trabalhos de campo, estudos de laboratório têm testado a taxa de predação em função do padrão de coloração e constatou-se que os predadores atacaram com menos frequência os indivíduos que apresentaram coloração críptica, ou seja, indivíduos que apresentavam um padrão de coloração semelhante ao substrato (Tordoff, 1980; Morey, 1990). Estudos dessa natureza indicam que a presença de um padrão de coloração críptico favorece certos indivíduos no ambiente e que, após algumas gerações, o reflexo pode ser a homogeneização de populações locais em consequência da predação diferencial que atua como agente seletivo. Por não distinguir de forma correta a presa e o substrato, o predador desiste da caçada ou acaba consumindo apenas aqueles que apresentam cores não crípticas (Cott, 1940; Punzalan, Rodd e Hughes, 2005).

Para anuros terrícolas, como é o caso dos integrantes do gênero *Proceratophrys*, o tipo de solo e a matéria orgânica que o recobre podem ser responsáveis pelo padrão de coloração observado nas espécies. A correlação entre cor do substrato e a frequência de alguns morfotipos já foi relatada nos estudos de Nevo (1973) e a idéia de seu valor adaptativo pode ser aplicada para organismos de outros grupos. Chama atenção o fato dos padrões de coloração apresentados pelas populações de *Proceratophrys moratoi* de São Carlos e de Bauru serem condizentes com a cor do substrato das localidades. São Carlos apresenta solo de aspecto predominantemente vermelho, sendo os indivíduos frequentemente encontrados na base de moitas de cana. Bauru apresenta um solo arenoso de aspecto claro, quase branco, porém forrado por uma densa vegetação de gramíneas com uma camada de matéria orgânica escura, onde os indivíduos são geralmente encontrados na base de touceiras, vocalizando em um microhabitat com pouca luz. Assim, ainda que de forma empírica, nas duas condições é fácil perceber a congruência entre a cor dos indivíduos e a cor do substrato. Apesar de afirmações concretas carecerem de análises mais refinadas, esta simples mas importante observação pode conduzir às perguntas apropriadas para o esclarecimento de tal proposição.

A variação morfológica da coloração observada nas populações de *Proceratophrys moratoi* provavelmente seria o reflexo da interação entre predador, presa e

substrato. A ocorrência de populações diferenciadas em locais onde o solo apresentou cores distintas, um escuro e outro avermelhado, pode ter favorecido a predominância de determinado morfotipo críptico, segregando de forma evidente as populações de São Carlos e Bauru. Esta divergência, que em um primeiro momento criou expectativas quanto ao nível de especiação que poderia estar ocorrendo entre as populações, lembrando que elas ocorrem em regiões do separadas pelo Rio Tietê, acaba se diluindo depois de analisada a população de Itirapina/Brotas. Nestas localidades, onde a população aparentemente é a maior e mais conservada, foram coletados e analisados indivíduos que apresentavam os mesmos padrões encontrados em São Carlos e em Bauru.

Sendo assim, com base em todos os caracteres observados, entende-se que a variação populacional encontrada é coerente com aquela aceitável dentro da espécie *Proceratophrys moratoi*.

4.1.2 Morfometria

Análises morfométricas são consideradas uma das principais ferramentas para estudos sobre taxonomia e sistemática de diversos grupos animais. Entretanto, quando características métricas são consideradas como atributos morfológicos externos, uma dada população pode demonstrar graus relativos de variabilidade (Vieira et al., 2008).

Assim como visto em diferentes trabalhos (e.g. Ohmer et al., 2009; Vieira et al., 2008; Silva et al., 2008; Trauth et al. 2007), as análises morfométricas entre as populações de *Proceratophrys moratoi* analisadas no presente trabalho apresentaram variações significativas. A maior variabilidade intra-populacional em relação às medidas corporais se deu entre as populações de Botucatu e Itirapina/Brotas. Das 15 medidas utilizadas para análise comparativas entre as duas populações, 13 medidas divergiram de forma significativa, sendo Botucatu aquela a apresentar valores médios menores e Itirapina/Brotas valores médios maiores.

Os resultados apresentados pela Análise de Componentes Principais forneceram a estruturação de um bom suporte estatístico para os dados morfométricos (contemplou 73% da variabilidade), demonstrando, de fato, divergências entre as populações. A função discriminante gerada a partir dos dados permitiu visualizar três agrupamentos distintos, nos quais 75% dos indivíduos foram agrupados corretamente. Verificou-se uma forte correlação dos indivíduos com sua respectiva localidade, podendo ser discriminados os grupos

formados por Botucatu; São Carlos/Itirapina/Brotas e Bauru/Lençóis Paulista/Avaré. Diante deste resultado, nota-se que o tamanho dos indivíduos deve estar sendo influenciado por fatores locais, assim como foram os resultados apresentados pela morfologia.

Em animais ectotérmicos, como é o caso dos anfíbios, sabe-se que o crescimento é indeterminado, sendo muitas vezes influenciados por características do ambiente (revisão em Ashton, 2002; Morrison e Hero, 2003). A plasticidade fenotípica (Camp e Marshall, 2000), seleção mediada por diferenças genéticas (Nuevo, 1971, 1973), ou ambos (Berven, 1982), são aspectos a serem considerados para tentar explicar divergências morfométricas.

Assim, quando se trata do tamanho corporal em anfíbios, vários são os fatores que potencialmente influenciariam no resultado geral observado entre populações. Parâmetros macro-ecológicos como latitude, longitude, vegetação, variações físico-químicas dos corpos d'água utilizados para desenvolvimento dos girinos, entre outros, podem ser apontados como elementos regionais que atuam sobre toda a população. Somados a esses fatores, tem-se também os que determinam o tamanho do corpo do indivíduo, tais como o tempo de desenvolvimento e o tamanho do indivíduo recém metamorfoseado; o crescimento antes e depois da maturidade sexual; a idade em que os indivíduos atingem a maturidade sexual; e a longevidade do indivíduo/espécies (Smith, 1987; Hemelaar, 1988; Semlitsch et al., 1988; Moravec, 1990; Augert e Joly, 1993; Friedl e Klump, 1997; Rosso et al, 2004). Portanto, explicações consistentes para o fenômeno observado nas populações de *Proceratophrys moratoi* só seriam pertinentes caso todo o conjunto fosse analisado.

Tal problemática já chamava atenção de alguns pesquisadores e segundo Endler (1982), evidências robustas que expliquem variações fenotípicas e seu potencial adaptativo perante padrões espaciais só podem ser fornecidas quando várias hipóteses alternativas e suas possíveis conseqüências são consideradas. Trata-se, pois, de um problema direcionado a pesquisadores interessados em analisar as interações entre o organismo e o ambiente, sendo visto como tema central em discussões que envolvem os aspectos ecológicos geradores das variações morfométricas entre populações naturais (Angilletta e Dunham, 2003).

As variações observadas nas populações de *Proceratophrys moratoi* podem proporcionar um bom modelo para esse tipo de estudo, uma vez que cada população encontra-se sob condições regionais distintas. Destas diferenças, o clima de Botucatu pode ser um fator determinante importante desta variação e que reflete, principalmente, no

menor tamanho dos indivíduos da população desta localidade em relação ao das demais áreas de ocorrência.

Estudos têm discutido a relação do tamanho do corpo de anfíbios com variações do gradiente altitudinal e latitudinal. Porém, pelo fato de que tais estudos tomam como base de comparações a Regra de Bergmann (1847; tradução James, 1970), estes geram questionamentos sobre sua aplicabilidade para animais ectotérmicos (revisão em Ashton, 2002). A Regra de Bergmann afirma que, em geral, existe uma tendência de vertebrados endotérmicos apresentarem uma variação intra-específica, segundo a qual animais maiores seriam encontrados em ambientes frios enquanto animais menores seriam freqüentemente encontrados em ambientes mais quentes (Mayr 1956, 1963, Blackburn et al 1999), estando a variação de tamanho relacionada à capacidade de conservação de calor.

Diante dessa problemática, Ashton (2002) realizou uma revisão para tentar verificar se os anfíbios apresentariam padrão semelhante ao proposto por Bergmann. Seu trabalho, que envolveu salamandras e anuros, demonstrou que a Regra de Bergmann fazia sentido quando aplicada aos padrões apresentados para salamandras. No caso dos anuros, apesar de algumas espécies responderem de forma semelhante às salamandras, verificou-se um processo inverso à regra, sendo que para alguns táxons, populações de ambientes mais frios apresentavam indivíduos menores, enquanto populações de ambientes mais quentes apresentavam indivíduos maiores.

Entre as populações de *Proceratophrys moratoi*, variações desse tipo seriam pouco prováveis, pois a altitude e latitude pouco variam entre as localidades amostradas. Entretanto, deve-se considerar uma condição especial que acomete a população de Botucatu, onde o tamanho dos indivíduos é relativamente menor. Segundo Jim (2002), a região de Botucatu abrange uma “ilha” de temperatura mais fria, situada a mais de 800 metros de altitude, com forma de bumerangue. Nesta região, a média anual de temperatura fica em torno de 19,7°C, podendo atingir temperaturas mínimas abaixo de 0°C (ENGEA, 1990).

Rosso et al. (2004), ao realizarem estudo com *Hyla intermedia* também encontram animais menores em climas mais frios e os maiores em climas mais quentes. Segundo os autores, as populações em localidades frias mostraram estruturas etárias mais jovens.

Ainda que uma análise refinada da idade dos exemplares não fosse foco do presente trabalho, a particularidade do clima de Botucatu somada a uma condição limítrofe da distribuição sul da espécie pode ter favorecido indivíduos que tenham atingido precocemente a idade reprodutiva e, como consequência, serem de tamanho menor. Nas demais localidades, onde essa condição especial é inexistente ou pouco expressiva, os indivíduos seguem num crescimento mais próximo de seu ótimo fisiológico, ecológico e comportamental, alcançando maiores proporções corporais. Assim, considera-se que o extenso conjunto de mecanismos associados à variação do tamanho do corpo e evidências de que fatores locais estão atuando de forma seletiva sobre as populações, poderão trazer com maior precisão explicações sobre a variação morfométrica das populações de *Proceratophrys moratoi* no Estado de São Paulo.

Sendo assim, o conjunto de informações contidas no presente trabalho indica que, apesar de todas as populações constituírem uma mesma entidade taxonômica, as dissimilaridades existentes entre elas as tornam parcelas únicas e, portanto, de inestimável importância para a compreensão dos diferentes mecanismos que ajustam o organismo à sua área de ocorrência. Permite também vislumbrar quão tênue é a linha que separa variação, sobrevivência e extinção de uma espécie.

4.1.3 Citogenética

Em muitos grupos de organismos, dados citogenéticos caracterizam-se como uma importante ferramenta para análises taxonômicas, uma vez que permitem a caracterização do cariótipo e a distinção de espécies crípticas, fornecendo informações sobre rearranjos cromossômicos e possibilitando uma melhor compreensão de aspectos evolutivos das espécies (Quinderé, 2007). As análises citogenéticas permitem a distinção de variações entre espécies ou populações, representadas por diferenças no número diplóide, na morfologia cromossômica, na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva e no número e posição das regiões organizadoras de nucléolo (Brito, 2009; Campos, 2010).

Em estudos cromossômicos com anfíbios, a citogenética tem contribuído para uma melhor discriminação de espécies morfologicamente semelhantes, como em representantes de *Osteopilus brunneus* ($2n=34$) e *Osteopilus septentrionalis* ($2n=24$), *Megaelasia massarti* ($2n=28$) e *M. boticariana* ($2n=32$), *Dendropsophus nanus* e *D. sanborni* ($2n=30$), *Paratelmatobius cardosoi* e *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) ($2n=24$), e espécies

de *Epipedobates*, que puderam ser distinguidas após a descrição do número diploide e morfologia cromossômica (e. g. Cole, 1974; Mello et al., 1995; Medeiro et al., 2003; Lourenço et al., 2000, 2003). Tais estudos reforçam a importância do uso da citogenética como uma ferramenta adicional na busca de variações em populações de uma espécie ou entre espécies naturais.

Em representantes da família Cycloramphidae as características citogenéticas variam tanto em virtude da ocorrência de poliploidias, como em *Ceratophrys joazeirensis* com $2n=8x=104$ (Vieira et al., 2006) e em *Odontophrynus americanus* $2n=4x=44$ (e.g. Beçak et al., 1966; Rosset et al., 2006), quanto em relação ao número diploide, que pode variar de $2n=26$ cromossomos, caracterizando-se como o número diploide mais comum na família, até $2n=22$ cromossomos, padrão considerado mais derivado e comum aos membros da tribo Odontophrynine (Campus, 2010). No entanto, existem grupos com padrões cariotípicos mais conservados, como em representantes da família Leptodactylidae, que apresentam, em sua maioria, cariótipo constituído por $2n=22$ cromossomos (Campus, 2010).

No presente trabalho, o número diploide e a estrutura cariotípica encontrada nos espécimes de *Proceratophrys moratoi* são semelhantes ao apresentado pelos representantes de todas as espécies analisadas de *Macrogenioglottus*, *Proceratophrys* e *Odontophrynus* (Beçak et al., 1970; King, 1990; Kuramoto, 1990; Silva et al. 2003; Amaro-Ghilardi, 2005; Ananias et al. 2007). A similaridade citogenética de *P. moratoi* em relação as demais espécies congêneres, *P. appendiculata* e *P. boiei* corrobora a proposta feita por Izecksohn et al. (2005), que as considera como um grupo natural, bem como confirma a proposição de King (1990) na qual é apontada que semelhanças cariotípicas representam uma característica que reflete a estreita relação filogenética entre estas espécies.

Entre os marcadores mais utilizados em análises citogenéticas, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva tem recebido atenção especial, pois esta porção genômica pode apresentar variações até mesmo entre populações próximas, como em *P. boiei* (Ananias et al, 2007), em *Physalaemus cuvieri* (Quinderé, 2007) e em *Engystomops petersi* (Brito, 2009). No presente estudo, as populações de *P. moratoi* apresentaram heterocromatina apenas nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, indicando manutenção no seu padrão de distribuição entre diferentes populações. No entanto, a análise de populações de *P. boiei* (Ananias et al, 2007) revelou a existência de variação interpopulacional quanto a distribuição da heterocromatina,

indicando ainda, a ocorrência de um sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais em algumas populações desta espécie. Somente a análise de mais populações de *P. boiei* e *P. moratoi*, bem como a análise de populações de outras espécies próximas poderão confirmar os mecanismos relacionados com o processo de origem e diferenciação deste sistema sexual ZZ-ZW.

Variações em relação ao número e localização das RONS são eventos comuns em representantes dos anuros (e.g. Batistic, 1989; Lourenço et al 1998; Medeiros, 2000; Quinderé, 2007, Noleto et al. 2011), bem como são comuns os casos de polimorfismos destas regiões, como consequência de possíveis deleções ou amplificação de determinadas regiões do DNA ribossomal (King et al., 1990). No entanto, caracteriza-se como situação mais comum as RONS estarem localizadas em um único par cromossômico, tanto para os grupos com características mais primitivas, como para os grupos mais derivados (Schmid et al., 1990). No presente estudo, todas as populações de *P. moratoi* apresentaram apenas um par de cromossomos com DNAr ativo, localizado intersticialmente nos braços longos do par metacêntrico 7. Estes dados são contrários aos apresentados em *P. boiei* (Ananias, 2007), que possuem RONS nos cromossomos 4 e 8 em diferentes populações.

A localização das RONS em diferentes cromossomos dentro de um mesmo gênero já foi verificada em espécies de *Cycloramphus* (Noleto et al. 2011). Entretanto, essa situação só foi observada em duas espécies, de um total de oito analisadas. Os escassos estudos citogenéticos em representantes do gênero *Proceratophrys* não permitem indicar a real situação quanto à distribuição destas regiões entre as espécies e assim, realizar qualquer inferência sobre os caminhos de diferenciação cariotípica percorridos.

As análises citogenéticas em populações de *P. moratoi* revelam a existência de grande conservação na estrutura cariotípica com a metodologia utilizada e indicam que as amostras analisadas constituem uma mesma entidade taxonômica. Entretanto, somente a análise de indivíduos componentes de mais populações e espécies deste gênero, bem como a realização de novos estudos com outros marcadores cromossômicos e moleculares permitirão uma melhor compreensão dos processos evolutivos relacionados com a manutenção ou diversificação cariotípica deste grupo de anfíbios.



Conclusões

5. CONCLUSÕES

Dentre as espécies brasileiras de anuros, *Proceratophrys moratoi* (Anura, Cycloramphidae) é considerada endêmica do Estado de São Paulo e, nas últimas décadas, novas populações foram registradas. As análises morfológicas realizadas evidenciaram sutis variações entre os indivíduos e entre as populações, indicando a necessidade de estudos para confirmação da espécie. Variações populacionais são fatos relativamente frequentes em populações naturais e constituem uma ferramenta para inferir sobre o caminho evolutivo das espécies e a estreita relação dos táxons com o ambiente.

Neste contexto, o presente trabalho se apresentou como um estudo da variação populacional da espécie, com base em caracteres morfométricos, morfológicos e citogenéticos. As amostras examinadas compreenderam indivíduos componentes de cinco populações de *P. moratoi*, capturados na sua zona de ocorrência em diferentes localidades do Estado de São Paulo. Para comparação das populações foram utilizados 81 caracteres morfológicos e 15 morfométricos, somando 96 caracteres distintos e para a análise citogenética dos exemplares foram aplicadas técnicas de citogenética básica (coloração com Giemsa, localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e localização da heterocromatina constitutiva).

Os valores obtidos pela análise dos 15 caracteres morfométricos foram submetidos à Análise de Componentes Principais, resultando em dois componentes (PC1 e PC2) que permitiram contemplar 73% da variabilidade encontrada. Os caracteres morfológicos foram analisados através de uma matriz comparativa que permitiu identificar caracteres invariáveis e variáveis intra e inter-populacionalmente, além de fenótipos pontuais, sendo que dos 81 caracteres analisados, 22 mostraram-se invariáveis, nove foram

pontuais e 50 variaram dentro e entre as populações. As análises citogenéticas mostraram resultados bastante conservados, com os indivíduos de todas as populações apresentando cariótipos formados por 22 cromossomos, RONS localizadas em posição intersticial de apenas um par de cromossomos metacêntricos (par número 7) e blocos de heterocromatina na região centromérica de todos os cromossomos. A análise dos dados obtidos neste estudo permitiu verificar a existência de estruturação regional, principalmente considerando os dados morfológicos e de morfometria sem, contudo, a ocorrência variações na estrutura cariotípica que pudessem ser detectadas pelas técnicas utilizadas.

Assim, pode ser concluído que:

- As populações de *Proceratophrys moratoi* do Estado de São Paulo apresentam variações tanto intra quanto inter-populacionais.
- As variações populacionais encontradas nas diferentes populações de *P. moratoi* estudadas foram consideradas variações aceitáveis dentro do âmbito da espécie, indicando que ainda que ocorram variações específicas em algumas populações, estas compõem uma única entidade taxonômica.
- As variações morfológicas específicas encontradas dentro das populações foram pouco expressivas, sendo o padrão de coloração o que mais favoreceu a discriminação dos indivíduos, principalmente nas populações de Bauru e de São Carlos. As variações na coloração podem ser o reflexo de pressões locais de seleção, favorecendo indivíduo de coloração críptica.
- A Análise dos Fatores Discriminantes morfométricos mostrou valores significativos, com uma forte correlação dos indivíduos e sua respectiva localidade, permitindo a formação de três agrupamentos nas amostras estudadas, discriminando os grupos formados por Botucatu; São Carlos/Itirapina/Brotas e Bauru/Lençóis Paulista/Avaré.

- Os aspectos morfométricos foram os mais eficientes na discriminação dos indivíduos e das populações. A população de Botucatu foi a que mais diferiu em relação às demais, principalmente quanto à média de tamanho dos indivíduos e tal fato pode ser reflexo das características ambientais locais, que podem favorecer a existência de indivíduos menores em uma condição do seu limiar de ajuste.
- Os padrões citogenéticos observados entre as populações de *P. moratoi* não apresentaram variação, tanto com relação ao número diplóide quanto com relação à morfologia dos cromossomos, bandamento-C e RONS. Sendo estas características importantes nas comparações taxonômicas de muitos grupos de anuros, a inexistência de variações reforça a afirmação de que se trataria de diferentes populações da mesma espécie.
- Apesar da estruturação encontrada, o conjunto de informações contidas no presente trabalho indica que, mesmo considerando todas as populações como componentes de uma mesma entidade taxonômica, as dissimilaridades encontradas as tornam parcelas únicas e, portanto, de importância para a compreensão dos mecanismos que ajustam os organismos às suas áreas de ocorrência.



Referências

6. REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v.52, p.1-22, 1977.
- ALEXANDRINO, J.; FERRAND, N.; ARNTZEN, J.W. Morphological variation in two genetically distinct groups of the Golden Striped Salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). **Contrib. Zool.**, v.74, n.3/4, p.225-234, 2005.
- AMARO-GHILARDI, R.C. **Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura)**. 2005. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2005.
- AMARO, R.C, PAVAN, D.; RODRIGUES, M.T. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim e Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae) **Zootaxa** v.2071, p. 61-68, 2009.
- ANANIAS et al. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v.144, p.206-212, 2007
- ANGILLETTA, M.J.Jr.; DUNHAM, A.E. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. **Am. Nat.**, v.162, p.332-342, 2003.
- ARNTZEN, J.W. et al. Geographical variation in the Golden Striped Salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 and the description of a newly recognized subspecies. **J. nat. hist.**, v.41, p.925-936, 2007.
- ASHTON, K.G. Do amphibians follow Bergmann's rule? **Can. J. Zool.**, v.80, p.708-716, 2002.
- AUGERT, D.; JOLY, P. Plasticity of age at maturity between two neighbouring populations of the common frog (*Rana temporaria*). **Can. J. Zool.**, v.71, p.26-33, 1993.
- BATISTIC, R.F. **Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (anura, Amphibia)**. 1989. 203f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- BEČAK, M.L.; BEČAK, W.; RABELLO, M.N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frogs *Odontophrynus americanus*. **Chromosoma**. v.19, p.188-93, 1966.
- BEČAK, M.L.; BEČAK, W., VIZOTTO, L.D. A diploid population of the polyploidy amphibian *Odontophrynus americanus* and an artificial intraspecific triploid hybrid. **Experientia**, v.26, p.545-546. 1970.
- BEEBEE, T.J.C. Conservation genetics of amphibians. **Heredity**, v.95, p.423-427, 2005.
- BENÍTEZ-DIAZ, H. Geographic variation in coloration and morphology of the acorn woodpecker. **Condor**, v.95, p.63-71, 1993.

BERGMANN, C. Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer. **Grosse. Gott. Stud.** v.1, p.595–708, 1847.

BERVEN, K.A. The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica*. 1 .An experimental analysis of life history traits. **Evolution**, v.36, p.962-983, 1982.

BLACKBURN, T.M.; GASTON, K.J.; LODER, N. Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. **Divers. Distrib.**, v.5, p.165-174, 1999.

BLOUIN M.S.; BROWN, S.T. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. **Oecologia**, v.125, p.358-361, 2000.

BRASILEIRO, C.A. et al. Amphibians of an open Cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotrop**, v.5, n.2, p.95-109, 2005. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN00405022005>

BRASILEIRO, C.A.; MARTINS, I.A.; JIM. J. Amphibia, Anura, Cycloramphidae, *Odontophrynus moratoi*: Distribution extension and advertisement call. **Check List**, v.4 n.4, p.382-385, 2008.

BRITO, C.P.T.A. **Estudo citogenético e das relações fologenéticas de *Engystomops petersi* e *Engystomops sp.* (Anura, Leiuperidae)**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CAMP, C.D.; MARSHALL, J.L. The role of thermal environment in determining the life history of a terrestrial salamander. **Can. j. zool.**, v.78, p.1702-1711, 2000a.

CAMP, D.C.; MARSHALL, J.L.; AUSTIN, R.M.Jr. The evolution of adult body size in black-bellied salamanders (*Desmognathus quadramaculatus* complex). **Can. j. zool.**, v.78, p.1712–1722, 2000b.

CAMPOS, J.R.C. **Constituição cariotípica em leptodactídeos do gênero *Leptodactylus* e em espécies de famílias relacionadas à Leptodactylidae (Amphibia: Anura)**. 2010. 169f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2010

CARVALHO Jr., R.R.; KLEINSORGE, J.M.D; FUSINATTO, L.A. Amphibia, Anura, Cycloramphidae, *Odontophrynus moratoi* Jim e Caramasschi, 1980. Filling gaps. Discovery of a new population in the state of São Paulo, southeastern Brazil. **Check List**, v.6, p.36-37, 2010.

CAVASSAN, O. 2002. O cerrado do estado de São Paulo. In: Klein, A. L. (org.). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, São Paulo. 157p.

CECHIN, S.Z.; MARTINS, M. Eficiência de armadilhas de queda (*pitfall traps*) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. **Ver. bras. Zool.**, v.17, p.729-740, 2000.

COLE, C.J. Chromosome evolution in selected treefrogs including Casque-Headed species (*Pternohyala*, *Priprion*, *Hyla* and *Smilisca*). **Amer. Mus. Nov.** v.2541, p.1-10, 1974.

- COTT, H.B. **Adaptive coloration in animals**. London: Methuen and Co. Ltd. 1940. 550p.
- CRUMP, M.L.; SCOTT Jr. N.J. Visual Encounter Surveys. In: HEYER, W.R. et al. (Orgs.). **Measuring and Monitoring Biological Diversity – Standard Methods for Amphibians**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1994. p. 84-92.
- DOBZHANSKY, T. Speciation as a stage in evolutionary divergence. **Am. Nat.**, v.74,p.312-321, 1940.
- ENDLER, J.A. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. **Am. Zool.**, v.22, p.441-452, 1982.
- ENGEA-AVALIAÇÕES, ESTUDOS DO PATRIMÔNIO E ENGENHARIA LTDA. **Levantamento e análise dos quadros ambientais e proposições físico territoriais de zoneamento ambiental para APA Corumbataí – Botucatu – Tejuapé, Perímetro Botucatu**. São Paulo: SMA, SP/CPLA, vol.2. 1990.
- ETEROVICK, P.C.; SAZIMA, I. New species of *Proceratophrys* (Anura: Leptodactylidae) from southeastern Brazil. **Copeia**, v.1998, n.1, p.159-164, 1998.
- FOSTER, S.A.; ENDLER, J.A. **Geographic variation in behavior: perspectives on evolutionary mechanisms**. New York: Oxford University Press, 1999. 336p.
- FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Análise evolutiva**, 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.
- FREITAS, E.B. et al. Ecological niche and aspects of the natural history of *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae, Phyllomedusinae) in the Cerrado of Central Brazil. **Biota neotrop.**,v.8, n.4, p.101-110, 2008, disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n4/en/abstract?article+bn02108042008>, Acesso em 11 jan. 2012.
- FRIEDL, T.W.P.; KLUMP, M. Some aspects of population biology in the European treefrog, *Hyla arborea*. **Herpetologica** v.53, p.321-330, 1997.
- FROST, D.R. et al. The amphibian tree of life. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.297, p.1-370, 2006.
- FROST, D.R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA. (último acesso em 15/07/2011)
- FUTUYMA, D.J. **Evolutionary Biology**. 2. ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1986. 631p.
- GIANOTTI, E. **Composição florística e estrutura fitossociológica da vegetação de cerrado e mata ciliar da Estação Experimental de Itirapina (SP)**. 1988. 222f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1988.

GIARETTA, A.A.; BERNARDE, P.S.; KOKUBUM, M.N.C. A new species of *proceratophrys* (Anura: Leptodactylidae) from the Amazon rain forest. **J. herpetol.**, v.34, p.173-178, 2000.

GÜBITZ, T.; THORPE, R.S.; MALHOTRA, A. The dynamics of genetic and morphological variation on volcanic islands. **Proc. R. Soc. Lond.. B. Biol. sci.**, v.272, p.751-757, 2005.

HADDAD, C.F.B. 2008. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção. In: ANGELO, B.M. et al. (Orgs.). **Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília,DF: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, 2008. v.II, p.287-295

HEMELAAR, A. Age, growth and other population characteristics of *Bufo bufo* from different latitudes and altitudes. **J. Herpetol.** v.22, p.369-388, 1988.

HOEKSTRA, H.E.; KRENZ, J.G.; NACHMAN, M.W. Local adaptation in the rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*): natural selection and phylogenetic history of populations. **Nature Heredity**, v.94, p.217-228, 2005.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silverstaining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapa de biomas do Brasil**. Escala 1:5.000.000. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 22 jan 2011.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN) **Red List of Threatened Species**. 2011. Version 2011.1. Disponível em www.iucnredlist.org, Acesso em 10 Out. 2011.

IZECKSOHN, E., CARVALHO-E-SILVA, S.P., DEISS, I. O osteocrânio de *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied), *P. appendiculata* (Günther), *P. melanopogon* (Miranda-Robeiro) e *P. laticeps* (Izecksohn e Peixoto) (Anura,Leptodactylidae). **Rev. Bras. Zool.** v.22, p.225-229, 2005.

JAMES, F.C. Geographic size variation in birds and its relationship to climate. **Ecology**, v.51, p.365-390, 1970.

JIM, J.; CARAMASCHI, U. Uma nova espécie de *Odontophrynus* da região de Botucatu, São Paulo, Brasil (Amphibia, Anura). **Rev. bras. biol.**, v.40, n.2, p.357-360, 1980.

JIM, J. 2002. **Distribuição altitudinal e estudo de longa duração de anfíbios da região de Botucatu, estado de São Paulo**. 2002. 343f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

KING, M. CONTRERAS, N. e HONEYCUTT, R.L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) chow by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica**, v.80, p.17-29, 1990.

KRONKA, F.J.M. et al. **Inventário florestal do Estado de São Paulo**. 1993. 200f. Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo, 1993.

KRONKA, F.J.N. et al. **Áreas do domínio do cerrado no Estado de São Paulo**. 1998. Instituto Florestal de São Paulo, Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 1998.

KURAMOTO, M. a list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bul. Fukuoka Uni. Ed.**, v.39, p.83-127, 1990.

KWET, A.; FAIVOVICH, J. *Proceratophrys bigibbosa* species group (Anura, Leptodactylidae), with description of a new species. **Copeia**, v.2001, n.1, p.203-215, 2001.

LAMPERT, K.P. et. al. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara-frog, *Physalaemus pustulosus*. **Mol. ecol.**, v.12, p. 3325-3334, 2003.

LOUGHEED, S.C. et al. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. **Evol. biol.**, v.6,p.23, 2006.

LOURENÇO, L.B; RECCO-PIMENTEL, S.M. e CARDOSO, A.J. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** v.6, p.621-628, 1998.

LOURENÇO, L.B; GARCIA, P.C.A e RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas**, v.133, p.201-209, 2000.

LOURENÇO. L.B., GARCIA, P.C.A., RECCO-PIMENTEL, S.M. Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. **The Italian J of Zoology**, v.70, p.183-190, 2003.

LU, G.; BERNATCHEZ, L. Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*) support for the ecological speciation hypothesis. **Evolution**, v.53, p.1491-1505, 1999.

LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Miscellaneous Publication, Museum of Natural History, University of Kansas**, v.53, p.1-238, 1971.

MAFFEI, F. **Diversidade e uso do hábitat de comunidades de anfíbios anuros em Lençóis Paulista, Estado de São Paulo**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MAFFEI, F.; UBAID, F.K.; JIM. J. Discovery of the fifth population of a threatened and endemic toad of the Brazilian Cerrado, *Proceratophrys moratoi* (Anura, Cycloramphidae). **Herpetology Notes**, v.4, p.095-096, 2011.

MARROIG, G.; CHEVERUD. J. M. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. **Evolution**, v.55, p.2576-2600, 2001.

- MARTINS, L.B.; GIARETTA, A.A. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from central Brazil. **Zootaxa**, v.2880, p.41-50, 2011.
- MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species**, Columbia Press: New York, 1942. 225p.
- MAYR, E. Geographical character gradients and climatic adaptation. **Evolution**, v.10, p.105-108, 1956.
- MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1963. 797p.
- MAYR, E. **Populations, Species and Evolution**. Cambridge Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press, Abridged Ed. Edition. 1971. 472 p.
- McKAY, J.K.; LATTA, R.G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution**, v.17, p.285-291, 2002.
- MEDEIRO, L.R. **Estudo citogenético das espécies *Hyla nana* e *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae)**. 2000. f.77. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- MEDEIROS, L.R., ROSSA-FERES, D.C., RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. **J. Hered.** v.94, p.149-154, 2003.
- MELLO, A.S., GIARETTA, A.A., RECCO-PIMENTEL, S.M. The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). **Cytologia**, v.60, p.49-52, 1995.
- MÉNDEZ, M.A. et al. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). **Rev. chil. hist. nat.**, n.77, p.559-567, 2004.
- MORAVEC, J. Postmetamorphic growth in the European treefrog (*Hyla arborea*). Acta Universitatis Carolinae – **Biologica**, v.34, p.359–370, 1990.
- MOREY, S.R. Microhabitat selection and predation in the pacific treefrog, *Pseudacris regilla*. **J. herpetol.**, v.24, p.292-296, 1990.
- MORRISON, C.; HERO, J.M. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. **J. anim. ecol.**, v.72, p.270-279, 2003.
- NEVO, E. Climatic adaptation in size of the green toad (*Bufo viridis*). **Israel J. Med. Sci.** v.8, p.1010, 1971.
- NEVO, E. Adaptive variation in size of Cricket frogs. **Ecology**, v.54, p.1271-1281, 1973.
- NEWMAN, R.A.; SQUIRE, T. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). **Mol. ecol.**, v.10, p.1087-1100, 2001.

NOLETO et al. Comparative cytogenetics of eight species of *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p.205-215, 2011.

NOSIL, P.; CRESPI, B.J. Experimental evidence that predation promotes divergence in adaptive radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.103, p.9090-9095, 2006.

OHMER, M.E.; ROBERTSON, J.M.; ZAMUDIO, K.R. Discordance in body size, colour pattern, and advertisement call across genetically distinct populations in a Neotropical anuran (*Dendropsophus ebraccatus*). **Biol. J. Linn. Soc.**, v.97, p.298-313, 2009.

PEIXOTO, O.L. e CRUZ, C.A.G. Observações sobre a larva de *Proceratophrys appendiculata* (Günther, 1873) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Rev. bras. biol.**, v.40, n.3, p.491-493, 1980.

PINHEIRO, M.H.O. **Levantamento Florístico e Fitossociológico da Floresta Estacional Semidecidual do Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo**. 2000. 120f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PRADO, G.M.; POMBAL Jr., J.P. Espécies de *Proceratophrys* MirandaRibeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arq. Zool.** v.39 n.1, p.1-85, 2008.

PRICE, J.J.; FRIEDMAN, N.R.; OMLAND, K.E. Song and plumage evolution the new world orioles (*Icterus*) show similar lability and convergence in patterns. **Evolution**, v.61, p.850-863, 2007.

PRÖHL H, et al. Geographic variation of genetic and behavioral traits in northern and southern túngara frogs. **Evolution**, v.60, p.1669-1679, 2006.

PUNZALAN, D.; RODD, F.H.; HUGHES, K.A. Perceptual processes and the maintenance of polymorphism through frequency-dependent predation. **Evol. ecol.**, v.19, p.303-320, 2005.

PUORTO, G. et al. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **J. evol. biol.**, v.14, p.527-538, 2001.

QUEIROZ, A.; WIMBERGER, P.H. The usefulness of behavior for phylogeny estimation: levels of homoplasy in behavioral and morphological characters. **Evolution**, v.47, p.46-60, 1993.

QUINDERÉ, Y.R.S.D. **Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus* do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae)**. 2007. 83f. Tese (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ROLIM, D.C. **Bioecologia de *Odontophrynus moratoi* (AMPHIBIA, ANURA, CYCLORAMPHIDAE)**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.

- ROSSA-FERES, D.C.; JIM, J. Tadpole of *Odontophrynus moratoi* (Anura, Leptodactylidae). **J. herpetol.**, v.30, n.4, p.536-539, 1996.
- ROSSET, S.D., BALDO, D., LANZONE, C., BASSO, N.G. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). **J of Herpetol**, v.40., p.465-477, 2006.
- ROSSO, A.; CASTELLANO, S.; GIACOMA, C. Ecogeographic analysis of morphological and life-history variation in the Italian frog. **Evol. Ecol. Res.**, v.18, p.303-321, 2004.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA (SBH). Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>> Acesso em 03 novembro de 2011.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromossoma**, v.66, p.361-388, 1978.
- SCHMID, M. et al. Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosome and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromossoma**, v.99, p.413-423, 1990
- SCOTT Jr., N.J.; WOODWARD B. Surveys at Breeding Sites. In: HEYER, W.R. et al. (Orgs.). **Measuring and Monitoring Biological Diversity – Standard Methods for Amphibians**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1994. p.118-125.
- SEMLITSCH, R.D.; SCOTT, D.E.; PECHMANN, H.K. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. **Ecology**, v.69, p.184-192, 1988.
- SEPPÄ, P.; LAURILA, A. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. **Heredity**, v.82, p.309-317, 1999.
- SILVA et al. Morphometric and genetic differentiation among populations of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) from central Brazil. **Iheringia, Zool.** v.98, n.4, p.493-500, 2008.
- SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B., KASAHARA, S. Chromosome banding in *Macrogenioglottus alipioi* (Carvalho, 1946) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), with comments on its taxonomic position. **Boll. Mus. Nac. N.S. Zool.** v.499, p.1-9, 2003.
- SHAFFER, H.B. et. al. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite toad, *Bufo canourus* (Anura, Bufonidae) based on single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. **Mol. ecol.**, v.9, p.245-257, 2000.
- SMITH, D.C. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. **Ecology**, v.68, p.344-350, 1987.

- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.** v.75, p.304-306, 1972.
- THORPE, R.S. et al. Relating geographic pattern to phylogenetic process. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. sci.**, v.349, p.61-68, 1995.
- THORPE, R.S.; STENSON, A.G. Phylogeny, parapatry and ecological adaptation of the colour and pattern in the *Anolis roquet* complex on Martinique. **Mol. ecol.**, v.12, p.117-132, 2003.
- TOLENTINO, M. **Estudo crítico sobre o clima da região de São Carlos**. 1967. Concurso de monografias municipais, Prefeitura Municipal de São Carlos, São Carlos, 1967.
- TORDOFF, W.III. Selective predation of gray jays, *Perisoreus canadensis*, upon boreal chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. **Evolution**, v.24, p.1004-1008, 1980.
- TRAUTH, J.B.; JOHNSON, R.L.; TRAUTH, S.E. Conservation implications of a morphometric comparison between the Illinois Chorus Frog (*Pseudacris streckeri illinoensis*) and Strecker's Chorus Frog (*P. s. streckeri*) (Anura: Hylidae) from Arkansas, Illinois, Missouri, Oklahoma, and Texas. **Zootaxa**, v.1589, p.23-32, 2007.
- VIEIRA, K.S., SILVA, A.P.Z., ARZABE, C. Cranial morphology and karyotypic analysis of *Ceratophrys joareirensis* (Anura Ceratophryidae, Ceratophryinae): taxonomic considerations. **Zootaxa**, v.1320, p.57-68, 2006
- VIEIRA et al., An Examination of Morphometric Variations in a Neotropical Toad Population (*Proceratophrys cristiceps*, Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **PLoS ONE**, v.3, Iss.12, p.3934, 2008.
- WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**, 2007. The University of Chicago, Chicago. 2007. 1148p.
- WIENS, J.J. Polymorphism in systematics and comparative biology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.30, p.327-362, 1999.
- WIENS, J.J.; PENKROT, T.A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). **Syst. Biol.**, v.51, p.69-91, 2002.
- ZIMMERMAN, B.L. Audio strip transects. In: HEYER, W.R. et al., (Orgs.). **Measuring and monitoring biological diversity - standard methods for Amphibians**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1994, p.92-96.



Anexo

7. ANEXO

CARACTERES UTILIZADOS PARA *Proceratophrys moratoi*

MÃO ESQUERDA

Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos: acuminados.

Tubérculo palmar na base do 1º dedo¹: presente.

Tubérculo palmar na base do 1º dedo²: abaulado (0), levemente achatado (1).

Tubérculo palmar na base do 1º dedo³: menor que o 1º subarticular.

Tubérculo interdigital (Ponta do dedo até 1º subarticular) do 1º dedo: presente e partido, sendo a porção basal > que a porção distal (0), presente e contínuo (1), presente e partido, sendo a porção basal = a porção distal (2).

Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo¹: achatado.

Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo²: fortemente voltado para a porção interna da mão visível em vista dorsal (0), levemente voltado para a porção interna da mão não visível em vista dorsal (1).

Segundo tubérculo subarticular do 1º dedo: presente e evidente (0), presente e reduzido (1).

Tubérculo palmar na base do 2º dedo¹: presente.

Tubérculo palmar na base do 2º dedo²: abaulado.

Tubérculo palmar na base do 2º dedo³: menor que o 1º subarticular.

Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo¹: achatado (0), levemente achatado (1).

Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo²: levemente voltado para a porção interna da mão.

Segundo tubérculo subarticular do 2º dedo: ausente (0), presente e evidente (1), presente e reduzido (2).

Tubérculo interdigital do 2º dedo: presente e partido, sendo a porção basal > que a porção distal (0), presente e partido, sendo a porção basal = a porção distal (1), presente e contínuo (2).

Tubérculo palmar na base do 3º dedo¹: presente.

Tubérculo palmar na base do 3º dedo²: abaulado (0), levemente achatado (1).

Tubérculo palmar na base do 3º dedo³: menor que o 1º subarticular.

Tubérculo interarticular do 3º dedo: presente e contínuo (0), presente e partido lateralmente (1), presente e partido, sendo a porção basal < que a porção distal (2).

Primeiro tubérculo subarticular do 3º dedo: levemente achatado (0), achatado (1), abaulado (2).

Segundo tubérculo subarticular do 3º dedo: levemente achatado (0), abaulado (1).

Tubérculo interdigital (ponta do dedo e 2º subarticular) do 3º dedo: presente e bipartido (0), presente e contínuo (1).

Primeiro tubérculo subarticular do 4º dedo: achatado (0), abaulado (1).

Segundo tubérculo subarticular do 4º dedo: abaulado (0), achatado (1).

Tubérculo interarticular do 4º dedo: ausente (0), presente (1).

Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo: ausente (1), presente (0).

Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo - Número: três (0), mais de três (1), dois (2), um (3).

Tubérculos laterais externos que seguem em linha com o 4º dedo - Forma: acuminado (0), abaulado (1).

Número de tubérculos que saem do calo metacarpal externo no sentido do 4º dedo: dois (0), um (1), mais de dois (2).

Calo metacarpal externo¹: fortemente sulcado (0), partido (1), levemente sulcado (2).

Calo metacarpal externo²: porção interna < porção externa (0), porção interna = porção externa (1), porção interna > porção externa (2).

Calo metacarpal externo³ – **Forma**: coração partido de lado (0), coração partido ao meio (1), dente (2).

Calo metacarpal interno¹: saliente.

Calo metacarpal interno² – **Forma**: oval (0), semicircular (1).

Calo metacarpal interno³: mais estreito que comprido (0), tão largo quanto comprido (1).

Forma dos tubérculos que saem do calo metacarpal externo no sentido do 4º dedo: abaulado (0), irregulares (1).

Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos – Número: mais de seis (0), seis (1), quatro (2), cinco (3).

Fileira de tubérculos laterais que se estendem do braço até a palma das mãos – Tamanho: número de tubérculos grandes > que o de tubérculos pequenos (0), número de tubérculos grandes = que o de tubérculos pequenos (1), número de tubérculos grandes < que o de tubérculos pequenos (2), todos do mesmo tamanho (3).

PÉ DIREITO

Calo metatarsal interno¹: forma de meia lança.

Primeiro tubérculo subarticular do 1º dedo: abaulado.

Tubérculo interdigital do 1º dedo (entre o primeiro tubérculo interarticular e ponta do dedo): ausente (0), presente e pouco evidente (1), presente e evidente (2).

Primeiro tubérculo subarticular do 2º dedo: abaulado.

Tubérculo interdigital do 2º dedo (entre a ponta do dedo e subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Primeiro tubérculo subarticular do 3º dedo: abaulado.

Tubérculo interdigital do 3º dedo (entre a ponta do dedo e 2º subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Tubérculo interarticular do 3º dedo (entre o 1º e 2º subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Segundo tubérculo subarticular do 3º dedo: abaulado.

Primeiro tubérculo subarticular do 4º dedo: abaulado.

Segundo tubérculo subarticular do 4º dedo: achatado (0), abaulado (1).

Terceiro tubérculo subarticular do 4º dedos: abaulado (0), levemente achatado (1).

Tubérculo interarticular do 4º dedo (entre o 1º e 2º subarticular): presente e pelo menos um evidente.

Tubérculo interarticular do 4º dedo (entre o 2º e 3º subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Tubérculo interdigital do 4º dedo (ponta do dedo e 3º subarticular)¹: presente e contínuo (0), presente e dividido (1), ausente (2).

Tubérculo interdigital do 4º dedo (ponta do dedo e 3º subarticular)²: presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Primeiro tubérculo subarticular do 5º dedo: abaulado.

Segundo tubérculo subarticular do 5º dedo: abaulado.

Tubérculo interarticular do 5º dedo (entre o 1º e 2º subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Tubérculo interdigital do 5º dedo (ponta do dedo e 2º subarticular): presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Calo metatarsal externo¹: abaulado (0), ausente (1).

Calo metatarsal externo²: muito evidente (0), pouco evidente (1).

Calo metatarsal interno²: grosso (0), laminar (1).

Linha de Tubérculos cônicos laterais: apenas linhas espalhadas evidentes (0), três linhas espalhadas evidentes (1).

Tubérculo externo médio-palmar (posição mediana da planta do pé): presente e pouco evidente (0), indeterminado (1), presente e evidente (2).

Número de tubérculos que partem da base do calo interno sentido calcanhar: três (0), quatro (1), dois (2), cinco (3).

Tubérculos que partem da base do calo interno sentido calcanhar: todos do mesmo tamanho (0), número de tubérculos grandes > que o número de tubérculos pequenos (1), número de tubérculos grandes = que o número de tubérculos pequenos (2), número de tubérculos grandes < que o número de tubérculos pequenos (3).

Tubérculos que margeiam a porção externa do calo metatarsal interno: presente e evidente (0), presente e pouco evidente (1), ausente (2).

CABEÇA

Forma das narinas: elíptica/ fendida (0). oval/circular (1).

Coanas²: elípticas (0), circulares (1).

Coanas¹(em relação ao tamanho das narinas): grande.

Crista cantal¹: evidente (0), pouco evidente (1).

Crista cantal²: ondulada (0), lisa (1).

Borda da pálpebra: fortemente ondulada (0), levemente ondulada (1).

Iris: ausência de fenda superior e inferior (0), fenda superior e inferior (1), apenas fenda inferior (2).

Forma da língua: semi-circular (0), lanceolada (1).

DORSO

Manchas brancas laterais presentes na inserção braço/ tórax: presente e marcada (0), presente e pouco marcada (1), ausente (2).

Faixa dorsal entre a pálpebra e o ponto de cruzamento na região mediana do corpo: em forma de cálice .

Faixa dorsal entre o ponto de cruzamento e o ânus: em forma de balão (♦)(0), em forma de Λ (1), difusa (2).

Dobra supra-anal: presente e pouco evidente (0), presente e evidente (1), ausente (2).

Tubérculo infra-anal: par presente e pouco evidente (0), par presente e muito evidente (1).

Cor do halo que contorna as manchas: marrom mais claro (0), cinza (1), branco (2), indistinto (3).

Cor do ventre: manchas marrons em fundo pardacento (0), manchas claras em fundo preto (1), manchas marrom em fundo branco (2).