

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de **19/03/2021**.

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

Ana Beatriz Alarcon Comelli

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

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

Ana Beatriz Alarcon Comelli

Prof. Dr. Ivan Sergio Nunes Silva Filho

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

SÃO VICENTE - SP

2020

C732t

Comelli, Ana Beatriz Alarcon

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

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

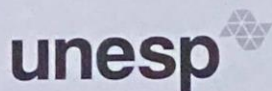
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Ivan Sergio Nunes Silva Filho

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus do Litoral Paulista



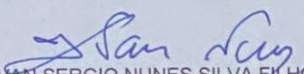
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ANA BEATRIZ ALARCON COMELLI

ORIENTADOR: IVAN SERGIO NUNES SILVA FILHO

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


Prof. Dr. IVAN SERGIO NUNES SILVA FILHO

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

(PARTICIPAÇÃO NÃO PRESENCIAL)

Prof. Dr. OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

(PARTICIPAÇÃO NÃO PRESENCIAL)

Prof. Dr. LEANDRO DOS SANTOS LIMA HOHL

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes / UERJ

São Vicente, 19 de março de 2020

Aos meus pais, por todo o amor e oportunidades

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

Aos meus filhos Guilherme e Stella – pessoas incríveis e especiais

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Morfologia: uma breve descrição

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

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

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

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

1.2. Variação morfológica e morfometria

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

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

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

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

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

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

1.3 Morfometria geométrica e aplicação no estudo de anuros

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

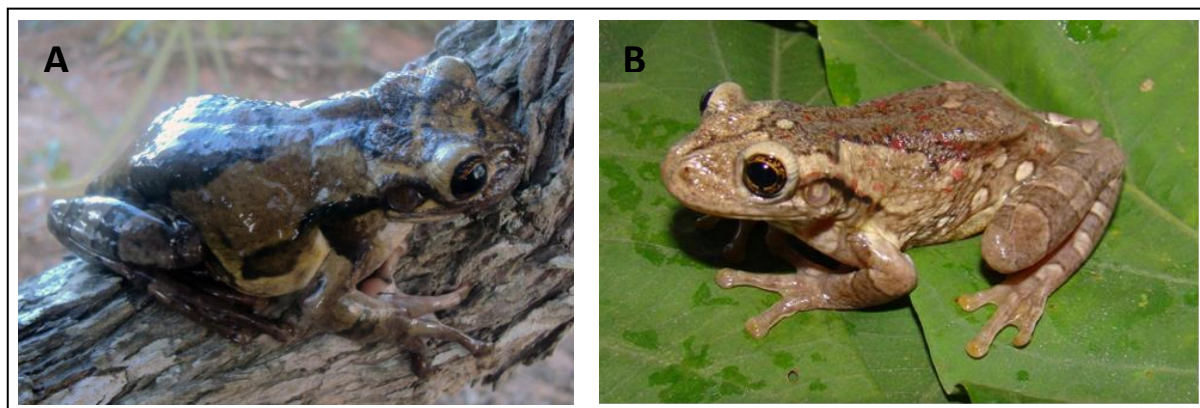


Figura 1. Espécies estudadas: A - *Trachycephalus atlas* (foto: F.A. Juncá), Município de Jeremoabo, BA, Brasil e B - *T. nigromaculatus* (foto: I. Nunes), Município de Caetité, BA, Brasil.

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

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

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

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

6. CONCLUSÕES

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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