



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)

Paulo Henrique Silva

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Câmpus de São José do Rio Preto, SP



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Paulo Henrique Silva

Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr.,
Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)

São José do Rio Preto
2017

Paulo Henrique Silva

Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr.,
Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Animal, junto ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Animal do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES (Processo:)/FAPESP
(Processo: 2013/50741-07)

Orientador: Prof.º Dr. Itamar Alves Martins

São José do Rio Preto
2017

Silva, Paulo Henrique.

Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae) / Paulo Henrique Silva. -- São José do Rio Preto, 2017
71 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Itamar Alves Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Anuro. 3. Morfologia (Animais) 4. Morfometria. 5. Bioacústica. 6. Animais – Sons. 7. Taxonomia. I. Martins, Itamar Alves. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 597.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Paulo Henrique Silva

Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr.,
Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof.º Dr. Itamar Alves Martins
UNITAU / Taubaté, SP.
(Orientador)

Prof.º Dr. Rodrigo Lingnau
UTFPR / Francisco Beltrão, PR.

Prof.º Dr. Délio Pontes Baeta Costa
UNESP/ Rio Claro, SP.

Suplentes

Dra. Thais Helena Condez
UNESP/ Rio Claro, SP.

Prof.º Dr. Fernando Rodrigues da Silva
UFSCAR / Sorocaba, SP.

São José do Rio Preto
17 de Março de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof.º Dr. Itamar Alves Martins, um profissional de excelência, um professor humano e uma pessoa cheia de alegrias. Serei sempre grato por ter me recebido, pela oportunidade dada, e todo incentivo e prestividade que demonstrou ao nortear este trabalho. Além de, todo suporte que tem contribuído com a minha formação profissional, pessoal e intelectual. Não posso deixar de agradecer acima de tudo a amizade que por ele tenho.

A Dra. Mariana Lúcio Lyra, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências de Rio Claro (UNESP), pela disponibilidade, atenção e grandes contribuições para o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Prof.º Dr. Rodrigo Lingnau (UTFPR) e sua família, por terem me recebido e acolhido em sua residência durante minhas primeiras campanhas de campo, em Francisco Beltrão, PR, e por toda demonstração de carinho, atenção, incentivo e disponibilidade que tiveram comigo, além de compartilharem um pouco de suas experiências de vida e o conforto do seu lar.

As professoras Dra. Denise C. Rossa-Feres (UNESP/S. J. do Rio Preto) e Dra. Cynthia P. A. Prado (UNESP/Jaboticabal) por terem me orientado e me incentivado a encarar a carreira acadêmica em Herpetologia. Sou muito grato a vocês!

Aos meus familiares, meus pais, Severino e Neusa, minhas irmãs, Alessandra e Vanessa, pois mesmo estando longe estiveram sempre presentes.

A minha grande amiga e meu grande amor, Talita Roberto Aleixo de Almeida (Idaí), companheira no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias. Eh nois Amor!

Aos meus grandes amigos Lucas Borges de Souza Arruda (Punha) e Leandro de Almeida Ímero (Pigão) que moraram comigo durante esses anos, pelo respeito, muita amizade, risadas e cervejadas, as quais ficarão marcadas para sempre. Em especial, agradeço ao Lucas B. S. Arruda por toda ajuda oferecida em minhas camanhas de campo, a qual sem ela teria sido muito mais difícil, por todas ideias e discussões que contribuíram muito para elaboração da versão final deste trabalho. Valeu mesmo rapaziada! Eh nois!!!

Ao meu grande amigo Luiz Carlos Rodrigues da Silva (Preto) e sua família por sempre me receberem bem no conforto do seu lar. Em especial, quero agradecer ao Luiz Carlos por ter me ajudado em campo durante as campanhas nos Cânios Brasileiros do Rio Grande do Sul, ajuda a qual foi imprescindível para realização deste trabalho. Valeu ai mano! Eh nois!!!

Aos meus amigos do Laboratório de Zoologia da UNITAU: Lucas Rodrigo (Portuga), Maysa Toledo (Interrada), Tainá Gouvea, Eduardo Teixeira (Du), Daniel Lima, Máyra Konishi, Aline Silva, Gabriel Basso, que me ajudaram em diversas situações importantes, como por exemplo a realização dos nossos churrascos. Valeu muito galera!

Aos meus amigos professores (Marcelo Perrenoud, Éder Brito, Sam Watoniki, Lucas Ribeiro, Flávio Ribeiro, Thiago e Dafne, Maurício Aleixo, Fernanda Morais, Rafaela, Telma, Matheus, João Guilherme e muitos outros), e a todos os outros funcionários (Karina, Kellen, Andressa, Bruna, Deise, Val, Fernanda, Thais, Gomes, Elaine, Bete, Adilson, Marcela, Mônica, Sr. Jorge, Adilson, Sr. Francisco, do Colégio Anglo Taubaté, pela amizade, fraternidade, e por toda alegria e perseverança que pudemos compartilhar.

A direção (Daniela Torino, Mônica Y. K. Gonçalves, Alexandre Spano, Prof.º Spano) e a coordenação (Karla Ingrid Leite, Mariana de Paula Evangelista, Guilherme Menezes, Cássio V. de Souza) do Colégio Anglo Taubaté pelas oportunidades confiadas e concedidas, as quais tiveram fundamentais importâncias em minha formação pessoal, intelectual, e principalmente, profissional. Agradeço muito a vocês por tudo!

A toda a galera do Programa de Pós-graduação Biologia Animal que pude construir e contemplar novas amizades: Marcela Brasil, Lara Melchior, Thales Portillo, Silara Batista, Pakito, Tafarel, Fernando Carnimeo, além de muitos outros que conheci durante as disciplinas. Muito obrigado galera!

Aos meus grandes amigos e irmãos da República Grão de Boi (UNESP/Botucatu), pois a convivência com vocês foi a essência necessária para me tornar o que sou hoje. Valeu rapaziada!!!!

A minha turma de graduação XLIII de Biologia (UNESP/Botucatu) por todos os momentos que vivemos juntos nesses últimos anos, dessa forma pude amadurecer mais e compreender melhor o sentido de amizade e respeito. Agradeço a todos!!!

A minha família SDF, Bom Clima, Guarulhos, meus grandes irmãos! Estaremos sempre juntos!

A todos os professores, professoras, outros profissionais e alunos de pós-graduação (UNESP/Botucatu, UNESP/Rio Claro, UNESP/S. J. do Rio Preto, UNICAMP, UFRGS, UFSC, UTFPR) dos quais tive o prazer de ser conhecer ou, simplesmente, ter longas e construtivas conversas. Todos vocês foram importantes para a construção de minha percepção sobre o mundo como Biólogo.

A UNESP/São José do Rio Preto pela oportunidade de estudar em um dos Institutos de excelência em pesquisa do Brasil, a qual sou muito grato pela minha formação acadêmica, social e profissional que tenho hoje.

A Secretaria de Pós-graduação do programa de Biologia Animal (UNESP/S. J. do Rio Preto) por todo suporte técnico e burocrático dado a nós alunos durante as atividades acadêmicas.

Aos Órgãos públicos competentes a responsabilidade ambiental (IBAMA, COTEC e IAP), os quais me concederam a licença de autorização para atividades de campo.

Ao IBB da UNITAU/Taubaté pela disponibilidade de sua infraestrutura para realização desta pesquisa.

A CAPES e a FAPESP, pelo financiamento e credibilidade dada a este trabalho.

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

RESUMO

Scinax perereca foi descrita originalmente no município de Ribeirão Branco, localizado na região sudoeste do Estado de São Paulo. Suas populações ocupam uma extensa distribuição geográfica, desde o sul do Estado de São Paulo ao norte do Rio Grande do Sul, no Brasil, em regiões florestadas de Mata Atlântica. Esta espécie é morfológicamente semelhante às espécies *S. hayii* e *S. dolloi*, dentre as quais exibem grandes conflitos taxonômicos. Informações de diversas naturezas, como morfologia, morfometria, bioacústica do canto de anúncio e sequências moleculares, foram utilizadas para investigar a identidade taxonômica das populações de *S. perereca*. As análises de similaridades das sequências moleculares do gene COI mostrou um clado monofilético bem suportado entre as três espécies. O clado *S. perereca* está fortemente estruturado por dois subclados principais: clado *perereca* A e clado *perereca* B. O clado *perereca* A agrupa as populações da localidade-tipo, Ribeirão Branco, SP, e as populações da região leste do Estado do Paraná. O clado *perereca* B inclui as populações de todo Estado de Santa Catarina e do norte do Rio Grande do Sul. As populações do Alto do Paranapanema, do Vale do Ribeira e do litoral norte do Estado de São Paulo mostram claramente estar mais próximas de *S. hayii*. *S. perereca* pode ser distinguida claramente de *S. dolloi* por meio das sequências moleculares do COI e das informações bioacústicas do canto de anúncio. Talvez as populações identificadas como *S. aff. perereca* do Estado de Minas Gerais podem na verdade representar a extensão geográfica de populações de *S. dolloi*. As análises morfológicas, morfométricas e bioacústicas de *S. perereca* corroboram com os resultados das análises moleculares. As variações morfológicas, morfométricas, bioacústicas e moleculares indicam que esta espécie tem uma estrutura populacional bem definida ao longo de sua distribuição. No Estado de São Paulo, sua distribuição geográfica está restrita à localidade-tipo, Ribeirão Branco, SP.

Palavras-chave: Anfíbios. Taxonomia. Morfologia. Morfometria. Bioacústica. COI.

ABSTRACT

Scinax perereca was originally described in Ribeirão Branco city, located in the southwest region of São Paulo State in Brazil. Their populations occupy an extensive geographic distribution, from the South of São Paulo State to the North of Rio Grande do Sul, in Brazil, in forested regions of Atlantic Forest. This species is morphologically similar to *S. hayii* and *S. dolloi* species, among them there are great taxonomic conflicts. Information of various natures, such as morphology, morphometry, advertisement call, and molecular sequences, were used to assess the taxonomy of *S. perereca* population. The analysis of similarities of the molecular sequences of the gene COI showed a monophyletic clade well supported among the three species. The clade *S. perereca* is strongly structured by two major subclades: clade *perereca* A and clade *perereca* B. Clade *perereca* A puts the following population in a group locality-type: Ribeirão Branco, SP, and the populations of the Eastern region of Paraná State. Clade *perereca* B includes the populations of all Santa Catarina State and the North of Rio Grande do Sul. The populations of Alto do Paranapanema, Vale do Ribeira and the Northern coast of São Paulo clearly show to be closer to *S. hayii*. *Scinax perereca* can be clearly distinguished from *S. dolloi* through the molecular sequences of the COI and also by advertisement call. Maybe the populations identified as *S. aff. perereca* in the State of Minas Gerais may actually represent the geographic extension of *S. dolloi* populations. Morphological, morphometric and bioacoustics analyses of *S. perereca* corroborate the results of molecular analyses. The morphological, morphometric, advertisement call and molecular variations indicate that this species has a well-defined population structure throughout their distribution. In State of São Paulo, its geographical distribution is restricted to locality-type, Ribeirão Branco, SP.

Key words: Amphibians. Taxonomy. Morphology. Morphometric. Bioacoustics. COI.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Morfologia: o limite da diversidade críptica	12
1.2 Bioacústica: ferramenta para conhecer a diversidade da anurofauna	14
1.3 Marcador Molecular: o DNA Mitocondrial e a diversidade críptica	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODO	19
3.1 Modelo Animal	19
3.2 Áreas de amostragem das populações	20
3.3 Marcador molecular: extração, amplificação e sequenciamento do COI	21
3.4 Morfologia	23
3.5 Morfometria	26
3.6 Bioacústica	27
3.7 Coleções Científicas	28
3.8 Distribuição Geográfica	29
3.9 Análises Estatísticas	29
3.9.1 Alinhamento das sequências do COI e análises de similaridade	29
3.9.2 Coeficiente de Variação (CV)	29
3.9.3 Análise de Componentes Principais (PCA)	30
3.9.4 Análises morfológicas	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Alinhamentos e análises de similaridades das sequências do COI	31
4.2 Análises morfométricas e bioacústicas	33
4.3 Análises morfológicas	36
4.4 Distribuição geográfica	38
4.5 Considerações sobre a espécie	39
5. DISCUSSÃO	48
5.1 Clado <i>perereca</i> A: populações de <i>S. perereca</i> de São Paulo (localidade-tipo) e do Paraná	48
5.2 Clado <i>perereca</i> B: populações de <i>S. perereca</i> de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul	50
5.3 Clado <i>hayii</i> : populações de <i>S. perereca</i> de São Paulo (litoral norte, Alto do Paranapanema e Vale do Ribeira)	51
6. COMENTÁRIOS TAXONÔMICOS	54
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE 1	67
APÊNDICE 2	68

1. INTRODUÇÃO

O naturalista alemão Johann Georg Wagler, tinha um especial interesse por estudos relacionados a ornitologia e herpetologia, e em 1830, publicou uma extensa classificação de vertebrados, na qual listou e forneceu a diagnose de diversos táxons, inclusive de anfíbios (VANZOLINI, 1977). Nesta obra, Wagler propôs o gênero *Scinax* para realocar três espécies de hilídeos (*Hyla*). Ele sugeriu esse nome (gr. *skinakos*, ágil ou rápido) para o gênero por refletir a habilidade de salto bem desenvolvida nos indivíduos deste grupo (KÖHLER & BÖHME, 1996; CARAMASCHI, 2004). Décadas depois, Günther (1858) sinonimizou muitas espécies de hilídeos, inclusive o gênero *Scinax*, em *Hyla* Laurenti, 1758, o qual foi formalizado posteriormente como grupo de espécies *Hyla rubra* (DUNN, 1933; LÉON, 1969; COCHRAN & GOIN, 1970; DUELLMAN, 1970). Desde então, *Scinax* permaneceu sem uso por mais de 100 anos, sendo revalidado apenas no final do século XX por Duellman & Wiens (1992). Ainda na metade deste século, muitos pesquisadores (LUTZ, 1951, 1973; COCHRAN, 1952, 1955; BOKERMANN, 1964, 1967; LÉON, 1969; COCHRAN & GOIN, 1970; DUELLMAN, 1970a, 1972; CARDOSO & SAZIMA, 1980; CARDOSO & HADDAD, 1982; PEIXOTO, 1986; ANDRADE & CARDOSO, 1987; HADDAD & POMBAL Jr., 1987; PEIXOTO, 1987; POMBAL Jr. & GORDO, 1991; POMBAL Jr. *et al.*, 1995a; POMBAL Jr. & BASTOS, 1996) descreveram novas espécies para o grupo *Hyla rubra* (*sensu* Léon, 1969), propuseram, definiram e reconheceram diversos novos grupos fenéticos para organiza-las. No entanto, Almeida & Cardoso (1985), Pombal Jr. *et al.* (1995b) e Faivovich (2002) sugeriram que esses grupos fenéticos poderiam representar no mínimo dois gêneros taxonômicos.

Os resultados da análise filogenética proposta por Faivovich (2002) demonstraram que as espécies do gênero *Scinax* estão organizadas em dois grandes clados, nomeados clado *Scinax catharinae*, endêmico da Mata Atlântica e clado *Scinax ruber*, amplamente distribuído na região neotropical. Poucos anos mais tarde, um progresso considerável na revisão taxonômica e filogenética da família Hylidae, realizada por Faivovich *et al.* (2005), confirmaram esse mesmo padrão filogenético para as espécies de *Scinax* e reconheceram alguns grupos de espécies dentro de cada clado, modelo o qual tem sido amplamente adotado por muitos outros pesquisadores (FROST *et al.* 2006; WIENS *et al.* 2010). A história taxonômica do gênero *Scinax* apresenta uma trajetória bastante complexa em virtude do grande número de espécies incluídas, da

semelhança morfológica compartilhada entre várias formas do grupo e pela carência de informações bioacústicas de muitas espécies (POMBAL Jr. *et al.*, 2005b).

Recentemente, a nova revisão taxonômica e filogenética da família Hylidae apresentada por Duellman *et al.* (2016) parece estar mais próximo do consenso sobre a posição filogenética e a composição taxonômica do gênero *Scinax*, a qual propõe sua divisão em mais dois outros gêneros e a validação de sua própria subfamília Scinaxinae. *Oloolygon* Fitzinger, 1843 é um gênero revalidado e eleito para realocar as espécies do clado *Scinax catharinae* (*sensu* Faivovich, 2002); *Julianus* Duellman, Marion & Hedges, 2016 é um novo gênero proposto para realocar as espécies do clado *Scinax ruber* que estavam incluídas no grupo *Scinax uruguayus* (*sensu* Faivovich *et al.* 2005); *Scinax* Wagler, 1830 é mantido para acomodar todas as outras espécies do clado *Scinax ruber* (*sensu* Faivovich *et al.* 2005). *Scinax* é o táxon mais especioso desta nova subfamília, com 69 espécies incluídas, com uma extensa distribuição geográfica ao longo do continente americano, desde o México a Argentina e o Uruguai, incluindo as Ilhas do Caribe, Trinidad, Tobago e Santa Lucia (NUNES *et al.*, 2012; DUELLMAN *et al.*, 2016; FROST, 2017).

A espécie *Scinax hayii* foi descrita no município de Petrópolis, RJ, por Barbour em 1909, e considerado inicialmente, como membro do grupo *Hyla rubra* (LÉON, 1969; DUELLMAN, 1970; LUTZ, 1973; DUELLMAN & WIENS, 1992), e em seguida, associado ao clado *Scinax ruber*, como indicado pelas análises cladísticas de Faivovich (2002) e Faivovich *et al.* 2005. Sua distribuição geográfica se estende ao longo da Serra do Mar, desde o Estado do Espírito Santo até o Estado de Santa Catarina (FROST, 2017). A espécie *Scinax dolloi* foi descrita, originalmente, por Werner em 1903, o qual não esclareceu a localidade de origem dos espécimes coletados, e permaneceu desconhecida até recentemente. Caramaschi (2013) revalidou sua localidade-tipo, como Vila de Maringá, na Serra da Mantiqueira, município de Itatiaia, RJ, divisa com o Estado de Minas Gerais. Não há registros de qualquer outra população conhecida de *Scinax dolloi*. Somente na década anterior, que Faivovich *et al.* 2005 validaram este táxon como membro do gênero *Scinax*.

Os pesquisadores Pombal Jr., Haddad & Kasahara (1995) descreveram a espécie *Scinax perereca* no Sul do Estado de São Paulo, e o indicaram como membro do grupo *Scinax ruber*, que por conseguinte, incluído no clado *Scinax ruber* (*sensu* Faivovich, 2002). A partir daí, diversos pesquisadores (GARCIA & VINCIPROVA, 1998; BERNARDE & ANJOS, 1999; KWET & DI-BERNARDO, 1999; CONTE &

MACHADO, 2005; KWET *et al.* 2010; HADDAD *et al.* 2013; FROST, 2017) passaram a considerar as populações de *Scinax hayii*, distribuídas do Sul do Estado de São Paulo ao Norte do Estado do Rio Grande do Sul, como *Scinax perereca*, devido ao padrão de manchas e semelhanças morfológicas compartilhadas entre as espécies. No início da década seguinte, Pombal Jr. & Gordo (2004) registraram a ocorrência desta espécie no município de Eldorado, SP, localizado no Vale do Ribeira, e também na Estação Ecológica Juréia-Itatins, município de Iguape, SP. Frost (2017) cita que *Scinax perereca* é conhecida em poucas localidades dos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul, no Nordeste de Misiones na Província da Argentina, e indica provável ocorrência no Sudeste do Paraguai. No entanto, essa convenção adotada para a distribuição atual de *Scinax perereca* não teve suporte de um estudo taxonômico comparativo entre as populações conhecidas. Com isso, o conhecimento sobre a identidade taxonômica das populações de *Scinax perereca* e suas manchas de distribuição geográfica ainda são muito deficientes.

Haddad & Sazima (1992) e Ribeiro *et al.* (2005) comentaram que o padrão de coloração das populações de *Scinax hayii*, distribuídas pelo Sudeste e Sul do Brasil, do Espírito Santo a Santa Catarina, na Serra do Mar e da Mantiqueira, é bastante polimórfico, e declararam que pode haver mais de uma espécie sendo denominada pelo mesmo nome. E ainda, Faivovich *et al.* 2005 apontaram que *Scinax dolloi* é morfológicamente mais próximo de *Scinax hayii* e *Scinax perereca*, e acrescentam que seus *status* taxonômicos precisam ser investigados. Na validação da localidade-tipo de *Scinax dolloi*, Caramaschi (2013) também mencionou que *Scinax dolloi*, *Scinax hayii* e *Scinax perereca* apresentam morfologias bastante semelhantes.

Dessa forma, acreditamos que entre as populações de *Scinax perereca* possam existir mais espécies ainda não descritas. Sua biologia e vocalização (canto de anúncio) estão descritos apenas na publicação original. Dessa maneira, é imprescindível ampliar nosso conhecimento sobre sua distribuição geográfica para conhecermos o limite de sua variação populacional e definir seu devido *status* taxonômico. Portanto, fica evidente a importância da natureza desse estudo, o qual visa melhorar nossa compreensão sobre a diversidade de espécies crípticas da Mata Atlântica.

1.1 Morfologia: o limite da diversidade críptica

Os estudos taxonômicos e filogenéticos com anfíbios anuros tradicionalmente consistiam apenas na observação e descrição morfológica de estruturas em órgãos ou

em sistemas de órgãos de indivíduos adultos e/ou larvas, por meio de formas, tamanhos, localização e coloração (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Cope (1865) e Noble (1922) usaram diversos caracteres vertebrais para definir suas maiores classificações de anfíbios anuros. Atualmente, a morfologia ainda é o principal método utilizado para descrever e caracterizar novas espécies de anuros (DUELLMAN, 2001; PUGLIESE *et al.* 2009; POMBAL Jr. *et al.* 2011; NUNES *et al.* 2012). Duellman & Trueb (1994) indicam que a morfologia das populações de uma espécie representa suas observáveis adaptações ao ambiente local. Com isso, as informações morfológicas fornecem premissas importantes sobre quais interpretações são adequadas quanto a história evolutiva da forma, seu significado funcional, desenvolvimento ontogenético, comportamento ou apenas variação.

A atividade para descrever novas espécies exige uma fundamentação teórica sobre o conceito de espécie. Na definição de De Queiroz (2007), espécie é uma unidade evolutiva separada de outras linhagens, feneticamente distinta, monofilética, isolada reprodutivamente e ecologicamente divergente. Do ponto de vista operacional, existem diversos métodos para delimitar espécies (*e.g.* AVISE & BALL, 1990; AVISE, 2000; SITES & MARSHALL, 2003; DE QUEIROZ, 2007; POMBAL Jr. *et al.* 2011; NUNES *et al.* 2012). Davis & Nixon (1992) propuseram um método bastante viável e teoricamente bem suportado. Esses pesquisadores argumentam que é necessário identificar uma combinação exclusiva de caracteres (apomorfias) para reconhecer uma linhagem evolutivamente isolada (sem fluxo gênico) das demais.

Diversos estudos (Angulo & Reichle, 2008; Angulo *et al.* 2003; Ron *et al.* 2006) apontam que trabalhos concentrados somente em morfologia contribuem para a formação de grupos ou complexos de espécies, uma vez que não fornecem informações suficientes para encontrar diferenças significantes em grupos de espécies crípticas. Duas ou mais espécies tratadas como apenas uma, devido a similaridade morfológica, são definidas como espécies crípticas (PFENNINGER & SCHWENK, 2007), resultantes de um processo de especiação tão recente que os caracteres morfológicos, que seriam usados para diagnóstico, ainda não divergiram o suficiente (BICKFORD *et al.* 2007).

Heyer & Reid (2003) apontam que a formação de complexos de espécies é um problema comum a espécies com ampla distribuição geográfica, como foi e ainda é o caso de muitas espécies do gênero *Scinax* (COCHRAN, 1955; LÉON, 1969; DUELLMAN, 1970, 1972; LUTZ, 1973; ANDRADE & CARDOSO, 1987; PEIXOTO, 1987; POMBAL Jr. & GORDO, 1991; DUELLMAN & WIENS, 1992; POMBAL Jr. *et*

al., 1995a; POMBAL Jr. & BASTOS, 1996; DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH, 2002; FAIVOVICH *et al.* 2005; DUELLMAN *et al.* 2016). Análises filogenéticas baseadas somente em características morfológicas podem resultar em árvores com baixa resolução, reforçando a ideia de que a evolução morfológica nos anfíbios anuros é frequentemente críptica e bastante conservada (CHEK *et al.* 2001; AUSTIN *et al.* 2002; STUART *et al.* 2006).

Sob a perspectiva da emergente taxonomia integrativa, muitos pesquisadores (DAYRAT, 2005; FAIVOVICH *et al.* 2005; GRANT *et al.*, 2006; PADIAL *et al.*, 2009) ressaltam a importância do uso combinado de evidências biológicas, como morfologia, bioacústica, moleculares, que podem facilitar o reconhecimento de complexos de espécies composto por espécies crípticas (PADIAL & DE LA RIVA, 2009; PADIAL *et al.* 2010; FUNK *et al.* 2011).

1.2 Bioacústica: ferramenta para conhecer a diversidade da anurofauna

As vocalizações dos anfíbios anuros, também conhecidas como cantos, são características bem evidentes do seu comportamento reprodutivo, emitidas quase exclusivamente por machos, que provavelmente tiveram origem no início da história evolutiva do grupo (WELLS, 2007). Essas razões chamaram a atenção de muitos pesquisadores interessados no estudo sobre a bioacústica das vocalizações dos anfíbios anuros (TOLEDO *et al.* 2014). Bogert (1960) foi o primeiro pesquisador a propor um sistema de classificação para os cantos dos anfíbios anuros. Ele reconheceu funções biológicas e ecológicas dos cantos e os classificou em seis categorias, as quais foram modificadas, posteriormente, por Littlejohn (1977) e Wells (1977), e seguida por muitos pesquisadores (DUELLMAN & TRUEB, 1994; GERHARDT, 1994; RYAN, 2001; GERHARDT & HUBER, 2002; NARINS *et al.* 2007; WELLS, 2007).

O canto de anúncio dos anfíbios anuros (“*advertisement call*” “*sensu*” WELLS, 1977), definido como “canto funcional” (VIELLIARD, 1987), é importante para o reconhecimento intraespecífico na atração de fêmeas e também para promover espaçamento entre machos, sendo um mecanismo de isolamento reprodutivo pré-zigótico relevante entre as espécies (DUELLMAN & TRUEB, 1994; GERHARDT, 1994; WELLS, 2007; TOLEDO *et al.* 2014). A estrutura acústica deste canto é a mais estudada entre as vocalizações dos anfíbios anuros (DUELLMAN & TRUEB, 1994, RYAN, 2001; NARINS *et al.* 2007; WELLS, 2007), cujas informações espectrais

(frequências) e temporais (periódicas) são pertinentes para o reconhecimento específico (COCROFT & RYAN, 1995; RYAN, 2001; WELLS, 2007).

Diante disso, as informações acústicas do canto de anúncio podem ser utilizadas como caracteres em estudos taxonômicos (BOGERT, 1960; BOKERMANN 1962, 1966, 1967; HEYER, 1990; POMBAL Jr. *et al.*, 1995a,b; DE LA RIVA *et al.* 1995, 1996a,b; POMBAL Jr. & BASTOS, 2003; WEBER *et al.* 2005; NUNES *et al.* 2012). Muitos estudos sugerem que os caracteres deste de canto contribuem muito para delimitar espécies morfologicamente crípticas (HEYER *et al.* 1996; HADDAD & POMBAL, 1998; KWET & ÂNGULO, 2002; ÂNGULO & ICOCHEA, 2003; ÂNGULO *et al.* 2003; ALMEIDA & ÂNGULO, 2006; KWET, 2007; ÂNGULO & REICHLE, 2008; PADIAL *et al.* 2009).

Os estudos de bioacústica foram importantes para elucidar a composição taxonômica e relações filogenéticas das espécies do gênero *Scinax* (*sensu* Faivovich *et al.* 2005). Duellman & Wiens, (1992), quando revalidaram este gênero, reconheceram sete grupos fenéticos de espécies: *S. catharinae*, *S. perpusillus*, *S. rizibilis*, *S. rostrata*, *S. ruber*, *S. staufferi* e *S. x-signatus*. Posteriormente, os grupos *rizibilis* e *x-signatus* foram sinonimizados por Pombal Jr. *et al.* 1995a, b, respectivamente, nos grupos *S. catharine* e *S. ruber*, em função de similaridades morfológicas e bioacústicas. Pombal Jr. *et al.* 1995b ainda apontam grande similaridade na estrutura acústica do canto de anúncio os grupos *S. staufferi* e *S. ruber*. Pombal Jr. *et al.* (1995b) também apresentaram o canto de anúncio de várias espécies de *Scinax* e chamam atenção para dois padrões básicos na estrutura acústica dos cantos, aliados ao tipo de ecologia reprodutiva, e o próprio agrupamento morfológico, e sugerem que dois ou mais gêneros podem estar incluídos em *Scinax*. As recentes revisões taxonômicas baseados em filogenia molecular para as espécies de *Scinax* (FAIVOVICH, 2002; FAIVOVICH *et al.* 2005; DUELLMAN *et al.* 2016) observaram as mesmas afinidades filogenéticas entre os grupos de espécies e confirmaram a existência de mais dois outros gêneros e as dividiram em: *Oloolygon*, *Julianus* e *Scinax*.

Nos últimos anos tem aumentado bastante a descrição dos cantos de anuncio das espécies do gênero *Scinax* (BOKERMANN, 1967; ALMEIDA & CARDOSO, 1985; HADDAD & POMBAL Jr., 1987; HEYER, 1990; POMBAL Jr. *et al.* 1995a,b; POMBAL Jr. & BASTOS, 1996; KWET, 2001; POMBAL Jr. & BASTOS, 2003; CARNEIRO *et al.* 2004; LIMA *et al.* 2004; PUGLIESE *et al.* 2004; NUNES *et al.* 2007; PUGLIESE *et al.* 2009; NUNES & POMBAL Jr. 2010, 2011; NUNES *et al.*

2010, 2012; POMBAL Jr. *et al.* 2010, 2011; JUNCÁ *et al.* 2015) Isso tem demonstrado a importância da bioacústica como ferramenta complementar para descrever e caracterizar as espécies, a qual contribui muito com os estudos de taxonomia e sistemática filogenética de anfíbios anuros.

1.3 Marcador Molecular: o DNA Mitocondrial e a diversidade críptica

Pesquisadores em biodiversidade tem reconhecido que o uso de informações morfológicas e comportamentais para descrever a diversidade da vida têm demonstrado limites para realização de tal tarefa, principalmente na resolução de espécies crípticas (STOECKLE & HEBERT, 2008). O desenvolvimento dos métodos da biologia molecular vem aprimorando os sistemas de identificação taxonômica (AVISE, 2004).

Diversos marcadores moleculares têm sido considerados como recursos bastante efetivos para a diagnose de populações intra e interespecíficas de diversos grupos de organismos, tais como cariótipos (HEYER, 1974; BALDISSERA *et al.* 1993; FRANCISCO *et al.* 2007), genes codificantes de DNA nuclear e mitocondrial (AVISE, 2004; HEBERT *et al.*, 2003a, 2003b, 2004; MARKMANN & TAUTZ, 2005; MONAGHAN *et al.*, 2005; ROE & SPELING, 2007; SMITH *et al.*, 2008a,b), e os *fingerprints* de DNA (TAYLOR *et al.* 1994; WEBER *et al.* 2008). Dentre esses marcadores, um dos mais explorados são genes codificantes do DNA mitocondrial (DNAmit). A vantagem do uso desses genes é apresentar taxas evolutivas 10.000 vezes maior que genes nucleares, e geralmente não há recombinação, sendo altamente conservado. O tamanho pequeno e a existência natural de muitas cópias por células são outras vantagens de utilizar marcadores moleculares do genoma mitocondrial (RUBINOFF, 2006).

Diversos genes dos genomas mitocondrial e nuclear já foram indicados como potenciais marcadores para diagnosticar diversos grupos de animais e plantas (HEBERT, *et al.*, 2003a; MONAGHAN *et al.*, 2005; ROE & SPELING, 2007; RACH *et al.*, 2008; PYRON & WIENS, 2011). Entretanto, o advento de iniciativas para obter um gene padrão para reconhecer espécies, nos últimos anos, permitiu concretizar uma ferramenta eficiente para delimitar uma parcela considerável da biodiversidade conhecida de eucariotos (HEBERT *et al.*, 2003a; BLAXTER, 2004). Esta abordagem genética explora e compara a diversidade entre as sequências de DNAmit para identificar os organismos. Essas sequências podem ser consideradas como um

verdadeiro “código de barras” ou um *DNA barcode*, encontrado no interior de todas as células eucarióticas (STOECKLE & HEBERT, 2008).

O *DNA barcode* é definido como um pequeno segmento padronizado de DNAmít (HEBERT *et al.*, 2003a; BLAXTER, 2004). Para os animais, foi estabelecido como *DNA barcode*, uma pequena região padronizada, com aproximadamente 650 pares de bases (pb), próximo ao terminal 5’ do gene que codifica a subunidade I do complexo proteico da cadeia respiratória *Citocromo c Oxidase* (COI). Essa região é altamente polimórfica entre as espécies e apresenta grande potencial para identificação de diversas espécies de grupos de animais, como artrópodes, peixes, anfíbios, répteis e aves (HEBERT *et al.*, 2003a, 2004; VENCES *et al.*, 2005a,b, 2012; WARD *et al.*, 2005; KERR *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008a; XIA *et al.*, 2012; JEONG *et al.*, 2013), e também para resolução de complexos de espécies crípticas (HEBERT *et al.*, 2003a, 2004; HAJIBABAEI *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006; CRAWFORD *et al.*, 2012).

Brusquetti *et al.* 2014 revelaram a diversidade críptica existente entre as populações de *Scinax fuscomarginatus* combinando informações de morfologia, bioacústica e de sequências dos genes mitocondriais COI e 16S. Este estudo forneceu evidências para descrever uma nova espécie, revalidar uma outra, questionar a validade taxonômica de outras quatro consideradas mais próximas de *S. fuscomarginatus*, e propõem todas como sinônimos desta espécie. As sequências do COI sempre mostraram maiores taxas de divergência genética em comparação as sequências do 16S.

Outros genes mitocondriais também tem contribuído para identificação de novas espécies de *Scinax* e distinguir linhagens crípticas (FOUQUET *et al.* 2006; NOGUEIRA *et al.* 2016). O resultado da filogenia molecular proposta por Fouquet *et al.* 2006 mostrou que a espécie *Scinax ruber*, distribuída na região da Guiana Francesa, representa seis linhagens divergentes. Enquanto, a filogenia molecular resultante do estudo de Nogueira *et al.* 2016 confirmou que os exemplares de *Scinax*, coletados no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Brasil, e morfologicamente similares as espécies do grupo *S. catharinae* (sensu Faivovich *et al.* 2005), representavam uma nova espécie. Estes autores ainda sugerem que é importante ser realizado um estudo comparativo entre essas mesmas espécies, com informações morfológicas e bioacústicas. Por essas razões, muitos pesquisadores defendem a importância de abordagens múltiplas (*e.g.* molecular, morfológica, bioacústica, ecológica) e integrada nos estudos de taxonomia para facilitar a identificação de espécies (DAYRAT, 2005; PADIAL *et al.* 2010; FUNK *et al.* 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Acreditamos que as populações de *Scinax perereca* representam mesmo um complexo de espécies (H_1). Caso contrário, a variação encontrada entre as populações serão somente variações populacionais (H_0). O uso combinado de uma série de informações (morfológicas, bioacústicas e moleculares), que representam evidências de linhagens independentes, são suficientes para entender a condição taxonômica das populações de *Scinax perereca*. Dessa forma, pretendemos aqui definir a identidade taxonômica das populações de *Scinax perereca* e suas possíveis implicações biogeográficas no bioma Mata Atlântica.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a variação interpopulacional dos caracteres morfológicos das populações de *Scinax perereca*.
- Descrever a variação interpopulacional dos caracteres bioacústicos da vocalização de anúncio da espécie.
- Analisar a variação interpopulacional da sequência nucleotídica da região do terminal 5' do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase Subunidade I (DNA barcode)* de *Scinax perereca*.
- Definir a distribuição geográfica de *Scinax perereca* em função das variações de latitude e longitude nos domínios do Bioma Mata Atlântica.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Modelo Animal

A espécie *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995, descrita originalmente no município de Ribeirão Branco, localizado na região Sudoeste do Estado de São Paulo, com indivíduos de tamanho corpóreo médio (machos: 36-41 milímetros, fêmeas 40-46 milímetros). A pele é levemente granulosa, com padrão de coloração dorsal amarelado, amarelo-esverdeado, castanho-escuro ou castanho-dourado. O ventre é amarelado nos machos e brancos nas fêmeas. Presença de manchas amareladas sobre uma área de coloração preta e reticulada na superfície posterior das coxas, uma mancha distinta e escura na superfície interocular com formato triangular e de faixas simétricas longitudinais largas, escuras e curvas na superfície dorsal do corpo e transversais na superfície dorsal dos membros. Há faixas simétricas longitudinais contínuas nas superfícies laterais da cabeça que se estendem das narinas até a região posterior da cintura escapular (Figura 1). Habitam regiões florestadas no domínio da Mata Atlântica do sul e sudeste brasileiro. Durante a estação reprodutiva (meses chuvosos) os machos são observados em atividade de vocalização a noite, em áreas abertas ou bordas de floresta, empoleirados sobre a vegetação próxima aos corpos d'água. A estrutura do canto de anúncio é multipusional (15-26 pulsos) com uma duração média de 250 milissegundos. O cariótipo da espécie indica um conjunto diploide de cromossomos mitóticos em células somáticas ($2n = 24$), cujos cromossomos são observados sob a forma de metacêntricos e submetacêntricos (POMBAL Jr. *et al.* 1995a; KWET *et al.* 2010).



Figura 1. Indivíduo macho adulto de *Scinax perereca*: (a) vista lateral; (b) vista dorsal. (Ribeirão Branco, SP, localidade-tipo; CCLZU 3228). Foto: Lucas B. S. Arruda

3.2 Áreas de amostragem das populações

A análise molecular foi realizada com amostras de tecidos de 33 indivíduos oriundos de 21 localidades geográficas (Figura 2, Tabela 1). Visando conhecer a espécie descrita, foram analisadas amostras de *Scinax perereca* de diversas localidades, inclusive de Ribeirão Branco, São Paulo, localidade-tipo. Amostras de *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (incluindo a localidade-tipo) e *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (incluindo a localidade-tipo) foram selecionadas como grupos externos, conforme as evidências apresentadas nas filogenias de Faivovich (2002) e Faivovich *et al.* (2005). Esses autores indicam que essas duas espécies mostram mais afinidades morfológicas com *Scinax perereca*. Para enraizar a árvore foram selecionadas *Scinax duartei* (Lutz, 1951) e *Scinax granulatus* (Peters, 1871). Algumas amostras identificadas como *Scinax cf. hayii* com semelhanças morfológicas a *S. perereca* também foram incluídas.

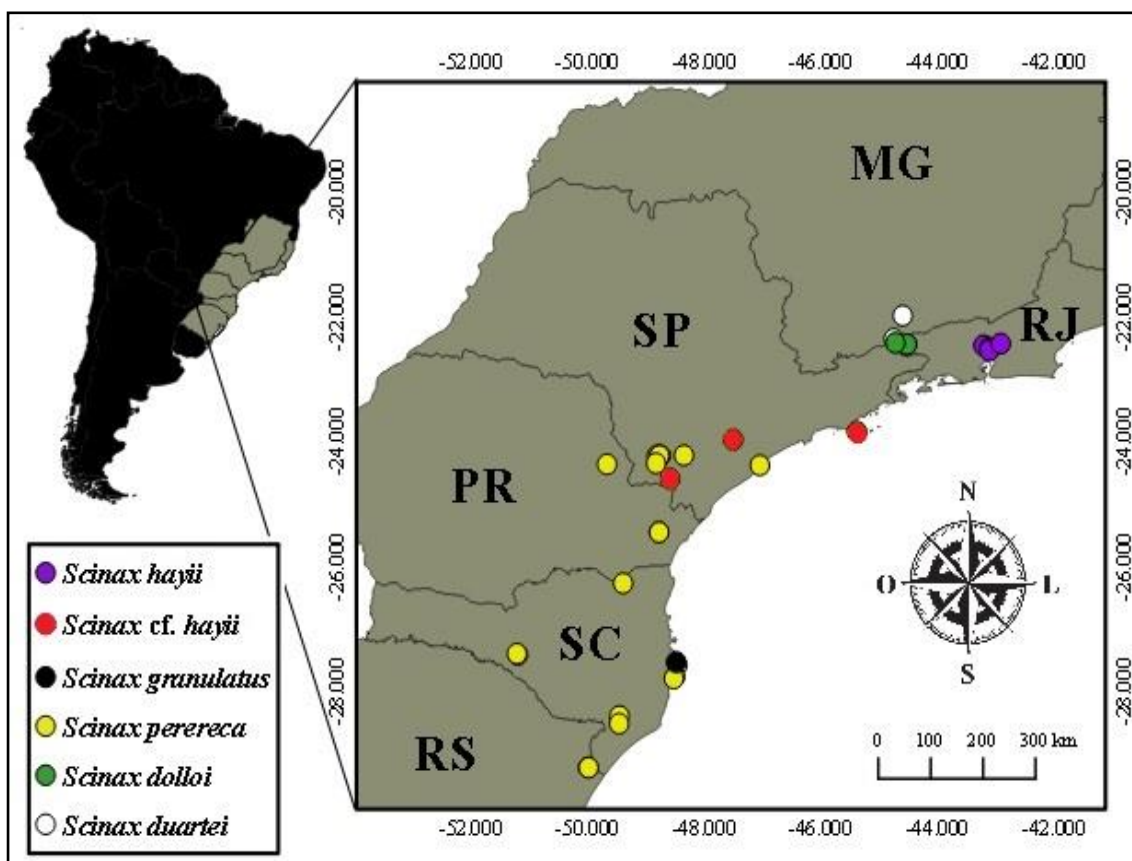


Figura 2. Localidades geográficas das amostras utilizadas para análise molecular do gene COI. Informações mais detalhadas sobre as localidades estão apresentadas na Tabela 1. As cores dos símbolos corresponde aos clados resultantes da análise mitocondrial das espécies de *Scinax* (ver Figura 5). Abreviação dos Estados brasileiros (UF): ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo.

Tabela 1. Amostras de tecidos usados nas análises moleculares. As espécies estão com os nomes identificados originalmente.

Voucher	Espécie	País	UF	Município	Mapa
CFBHT20291	<i>Scinax dolloi</i> *	Brasil	RJ	Alto do Maringá	Verde
CFBHT20292	<i>Scinax dolloi</i> *	Brasil	RJ	Alto do Maringá	Verde
CFBHT00352	<i>Scinax dolloi</i>	Brasil	RJ	Itatiaia	Verde
CFBHT08132	<i>Scinax duartei</i>	Brasil	MG	Airuoca	Branco
CFBHT05495	<i>Scinax duartei</i>	Brasil	MG	Itamonte	Branco
CFBHT20300	<i>Scinax granulatus</i>	Brasil	SC	Florianópolis	Preto
CFBHT04363	<i>Scinax hayii</i> *	Brasil	RJ	Petrópolis	Azul
CFBHT04371	<i>Scinax hayii</i> *	Brasil	RJ	Petrópolis	Azul
CFBHT17896	<i>Scinax hayii</i> *	Brasil	RJ	Petrópolis	Azul
CFBHT04473	<i>Scinax hayii</i>	Brasil	RJ	Teresópolis	Azul
CFBHT15956	<i>Scinax cf. hayii</i>	Brasil	SP	Apiiaí e Iporanga	Vermelho
CFBHT20261	<i>Scinax cf. hayii</i>	Brasil	SP	Ilhabela	Vermelho
CFBHT11677	<i>Scinax cf. hayii</i>	Brasil	SP	Ribeirão Grande	Vermelho
CFBHT05490	<i>Scinax cf. hayii</i>	Brasil	SP	Tapiraí	Vermelho
CFBHT11877	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	PR	Jaguariaíva	Amarelo
CFBHT20249	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	PR	Morretes	Amarelo
CFBHT20250	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	PR	Morretes	Amarelo
CFBHT11686	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Campos Novos	Amarelo
CFBHT11689	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Campos Novos	Amarelo
CFBHT10754	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Florianópolis	Amarelo
CFBHT20276	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Florianópolis	Amarelo
CFBHT20277	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Florianópolis	Amarelo
CFBHT14953	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Lauro Mueller	Amarelo
CFBHT20270	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Praia Grande	Amarelo
CFBHT20271	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Praia Grande	Amarelo
CFBHT12606	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	São Bento do Sul	Amarelo
CFBHT03111	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SC	Treviso	Amarelo
CFBHT00997	<i>Scinax perereca</i> *	Brasil	SP	Ribeirão Branco	Amarelo
CFBHT01469	<i>Scinax perereca</i> *	Brasil	SP	Ribeirão Branco	Amarelo
CFBHT01470	<i>Scinax perereca</i> *	Brasil	SP	Ribeirão Branco	Amarelo
CFBHT16055	<i>Scinax perereca</i> *	Brasil	SP	Ribeirão Branco	Amarelo
CFBHT20268	<i>Scinax perereca</i> *	Brasil	SP	Ribeirão Branco	Amarelo
CFBHT20254	<i>Scinax perereca</i>	Brasil	SP	Peruíbe	Amarelo

*Indica topótipos; CFBH, Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

3.3 Marcador molecular: extração, amplificação e sequenciamento do COI

O DNA genômico total foi extraído de pequenas amostras de tecido muscular esquelético ou hepático, conservadas em etanol absoluto, pelo método de Acetato de Amônio. O protocolo para extração segue Maniatis *et al.* (1982), adaptado por Lyra (*no prelo*): o álcool foi eliminado das amostras com papel absorvente e depois elas foram mantidas em estufa por 10 min; o tecido foi colocado em 250 µl de solução de lise; foi

adicionado 5 µl de Proteinase-K (20mg/ml); os tubos foram invertidos de 10 a 20 vezes e incubados a 55°C overnight ou até que o tecido estivesse completamente diluído (mínimo 4 horas); as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e foi adicionado 250 µl de acetato de amônia (7,5 M); as amostras foram para o Vórtex, e em seguida, encubadas no gelo por 30 minutos; foram centrifugadas por 20 minutos (13.000 rpm, centrífuga; refrigerada, 4°C); o sobrenadante resultante foram transferidos para tubos novos; os tubos foram mantidos no gelo para evitar que o precipitado comece a diluir novamente na solução; foram adicionados 500 µl de isopropanol absoluto e os tubos foram invertidos gentilmente; para ocorrer a precipitação do DNA as amostras foram mantidas a temperatura de -20 °C por 2 horas; foram centrifugadas por 20 minutos (13.000 rpm) e o sobrenadante descartado; foi adicionado 500µl de etanol 70% gelado e os tubos foram invertidos várias vezes para lavar o “pellet” de DNA; as amostras foram centrifugadas por 15 minutos (13.000 rpm); o etanol foi descartado cuidadosamente; os tubos foram invertidos em papel absorvente e o pellet secado em bomba de vácuo por 15 minutos; para ressuspender o DNA foi utilizado 1×TE (50 a 200 µl), mantido a temperatura ambiente por 1 hora e estocado em freezer -20 °C.

Os fragmentos do gene mitocondrial *Citocromo c Oxidase I* (COI) foram amplificados utilizando os primers, direto ANF1 (ACHAAYCAYAAAGAYATYGG) e reverso ANR1 (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT) (LYRA *et al.* no prelo). Os fragmentos foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em um termociclador *Mastercycler – Eppendorf*. Mantivemos as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial do DNA a 95°C (5 min); 35 ciclos consistindo de 94°C (1 min) para a desnaturação, 45°C (1 min) para o anelamento, 72°C (1 min) para inicial extensão das cadeias, 72°C (5 min) para extensão final. O *mix* do volume final (30 µl) do PCR consistiu em: *Taq DNA Polymerase* (0,03 U/µL), *PCR buffer* 1x contendo MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), 1 µl de cada *primer* (direto e reverso) e água deionizada (25 µl).

A extração do DNA total e as reações de amplificação (PCR) dos fragmentos do gene COI foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP. os produtos resultantes da PCR foram enviados a *Macrogen Company* (Coréia do Sul) para purificação e sequenciamento em ambas direções (direto e reverso) dos fragmentos do gene COI.

Os cromatogramas das sequências obtidas do COI foram observados com uso do *software* *Genious V6*. Alinhamos e editamos as sequências de cada fragmento, no *software* *Mafft*, para obter sequências consenso de cada amostra e para verificar se há ambiguidades e códons de parada inesperados (*stop codon*) (THOMPSON, HIGGINS & GIBOSN, 1994).

3.4 Morfologia

As análises morfológica e morfométrica foram realizadas com 253 indivíduos machos de *Scinax perereca*, coletados em campo e obtidos por empréstimos de coleções científicas, oriundos de 49 localidades geográficas (Apêndice 1), incluindo a localidade-tipo, Ribeirão Branco, São Paulo.

Os estados morfológicos de estruturas bem conhecidas em estudos taxonômicos foram descritos por meio da inferência qualitativa (Tabela 2): Textura da Pele dorsal (TPD) e ventral (TPV); formatos de estruturas do crânio: Focinho, vista dorsal (FD) e vista lateral (FL), o Canto Rostral (CR), a Região Loreal (RL); formato de estruturas nos membros (mãos e pés): Calo Nupcial (CN), Tubérculos Metacarvais, interno (TMCI) e externo (TMCE), Metatarsais, interno (TMTI) e externo (TMTE), e Subarticulares (TSM) da Mão e do Pé (TSP); padrão de coloração dorsal (CDC) e ventral (CVC) do corpo e dos membros, a presença de manchas Cefálica (MCF), Torácica (MTR), Lombar (MLB), Axilares (MAX), Inguinais (MIG), Femorais (MFM) e Tibiais (MTB), e a presença de faixas Rostrais (FRT), Radiolnares (FRU), Umerais (FUM), Femorais (FFM), Tibiais (FTB), Palmares (FPM) e Plantares (FPT), em diferentes regiões do corpo e dos membros, segundo a nomenclatura e os modelos propostos por Heyer *et al.* (1990), Napoli (2000) e Duellman (2001).

O sexo dos indivíduos foi determinado por meio da observação de características sexuais secundárias (saco vocal, fendas vocais e calo nupcial). Os indivíduos coletados em campo ainda vivos, e também depois de fixados foram fotografados com uma câmera fotográfica digital *Nikon 5100*.

Tabela 2. Descrição dos estados morfológicos dos caracteres taxonômicos quanto ao formato de estruturas do crânio e dos membros

Caráter	Estados do Caráter	Descrição dos Estados do Caráter
Textura da Pele		
TPD	1 – Lisa	Superfície da pele com poucos grânulos ou ausentes
	2 – Granulosa	Superfície da pele com muitos grânulos
TPV	1 – Lisa	Superfície da pele com poucos grânulos ou ausentes
	2 – Granulosa	Superfície da pele com muitos grânulos
Formato de estruturas no crânio		
FL	1 – Proeminente	Os estados do caráter seguem Duellman, 2001
	2 – Redondo	
FD	1 – Arredondado	Os estados do caráter seguem Heyer <i>et al.</i> 1990
	2 – Subovóide	
CR	1 – Reto	Ângulo da cabeça com o canto anterior para as narinas ou para a ponta do focinho
	2 – Curvo	
RL	1 – Côncava acentuada	Área localizada lateralmente na cabeça entre o canto rostral e os lábios
	2 – Côncava levemente	
Formato de estruturas nos membros		
CN	1 – Evidente e áspero	Calosidade queratinizada sobre a superfície interna do prépolex em machos
	2 – Pouco desenvolvido	
TMCI	1 – Simples e elíptico	Grande tubérculo sobre a superfície ventral das mãos, na base do primeiro dígito
	2 – Simples e arredondado	
TMCE	1 – Simples e ovalado	Pequeno tubérculo sobre a superfície ventral das mãos, na base do quinto dígito
	2 – Bífido	
TSM	1 – Simples e redondos	Tubérculos localizados logo abaixo da articulação das falanges das mãos
	2 – Simples e cônicos	
	3 – Simples, redondos e cônicos	
TMTI	1 – Simples e ovóide	Grande tubérculo sobre a superfície ventral dos pés, na base do primeiro dígito
	2 – Simples e arredondado	
TMTE	1 – Simples e elíptico	Pequeno tubérculo sobre a superfície ventral dos pés, na base do quarto dígito
	2 – Simples e arredondado	
TSP	1 – Simples e redondos	Tubérculos localizados logo abaixo da articulação das falanges dos pés
	2 – Simples e cônicos	
	3 – Simples, redondos e cônicos	
Coloração do corpo		
CDC	1 – Castanho-escuro	Coloração geral do dorso corpóreo e dos membros
	2 – Castanho-claro	
CVC	1 – Creme-escuro	Coloração geral do ventre corpóreo e dos membros
	2 – Amarelo-pálido	

Tabela 2. Continuação

Manchas em regiões do corpo e dos membros		
MCF	1 – Presente	Mancha escura com formato geométrico de triângulo com forma invertida entre as órbitas oculares
	2 – Ausente	
MTR	1 – Presente	Manchas escuras semelhantes ao sinal de pontuação da gramática “) (“ (parênteses) com forma invertida
	2 – Ausente	
MLB	1 – Presente	Mancha escura semelhante a letra “V” com forma invertida.
	2 – Ausente	
MAX	1 – Presente	Manchas escuras reticuladas sobre uma área de coloração esbranquiçada na região das axilas
	2 – Ausente	
MIG	1 – Presente	Manchas esbranquiçadas reticuladas sobre uma área de coloração escura nas regiões ocultas entre a lateral pélvica do corpo e a face anterior da coxa.
	2 – Ausente	
MFM	1 – Presente	Manchas escuras reticuladas sobre uma área de coloração esbranquiçadas.
	2 – Ausente	
MTB	1 – Presente	Manchas escuras reticuladas sobre uma área de coloração esbranquiçadas.
	2 – Ausente	
Faixas em regiões do corpo e membros		
FRT	1 – Presente	Estreita faixa escura que se estende desde a narina até a altura das cinturas escapulares ou do tórax.
	2 – Ausente	
FRU	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral do antebraço.
	2 – Ausente	
FUM	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral do braço.
	2 – Ausente	
FFM	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral da coxa.
	2 – Ausente	
FTB	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral da perna.
	2 – Ausente	
FPM	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral da mão e dos dígitos.
	2 – Ausente	
FPT	1 – Presente	Faixas escuras transversais (uma a três) que se estendem até a lateral do pé e dos dígitos.
	2 – Ausente	

Texturas da pele do corpo: (TPD) dorso, (TPV) ventre. Formatos do focinho: (FD) vista dorsal, (FL) vista lateral. (CR) Formatos do canto rostral. (RL) formatos da região loreal. Formatos de calos e tubérculos: (CN) calo nupcial; (TMCI) tubérculo metacarpal interno; (TMCE) tubérculo metacarpal externo; (TMTI) tubérculo metatarsal interno; (TMTE) tubérculo metatarsal externo; tubérculos subarticulares (TSM) da Mão; (TSP) do Pé. Padrão de coloração: (CDC) dorsal; (CVC) ventral; Manchas: (MCF) cefálica; (MTR) torácica; (MLB) lombar; (MAX) axilares; (MIG) inguinais; (MFM) femorais; (MTB) tibiais. Faixas: (FRT) rostrais; (FRU) radiolunares; (FUM) umerais; (FFM) femorais; (FTB) tibiais; (FPM) palmares; plantares (FPT).

3.5 Morfometria

Os tamanhos de estruturas ósseas e de estruturas não ossificadas, bastante conhecidas em estudos taxonômicos, foram obtidos dos mesmos machos adultos de *Scinax perereca* (Apêndice 1): Comprimento Rostro-Cloacal (CRC), Comprimento do Crânio (CC), Largura do Crânio (LC), Distância Inter-Orbital (DIO), Distância-Olho-Narina (DON), Distância Narina-Focinho (DNF), Distância Inter-Nasal (DIN), Comprimento da Mão (CM), Comprimento Radioulnar (CRU), Comprimento do Úmero (CUM), Comprimento do Fêmur (CF), Comprimento da Tíbia (CT), Comprimento do tarso (Ctar), Comprimento do Pé (CP), e também pelo comprimento de estruturas não ossificadas, como o Diâmetro do tímpano (DT), o Diâmetro Ocular (DO), o Diâmetro do disco do terceiro dígito da mão (Dd3) e o Diâmetro do disco do quarto dígito do pé (Dd4) (Figura 3), conforme são sugeridos por Heyer *et al.* (1990) e Duellman (2001). As medidas foram obtidas com o uso de um paquímetro digital com precisão de 0,1 mm e por meio de uma ocular micrométrica acoplada a um microscópio estereoscópio *Leica MZ6*.

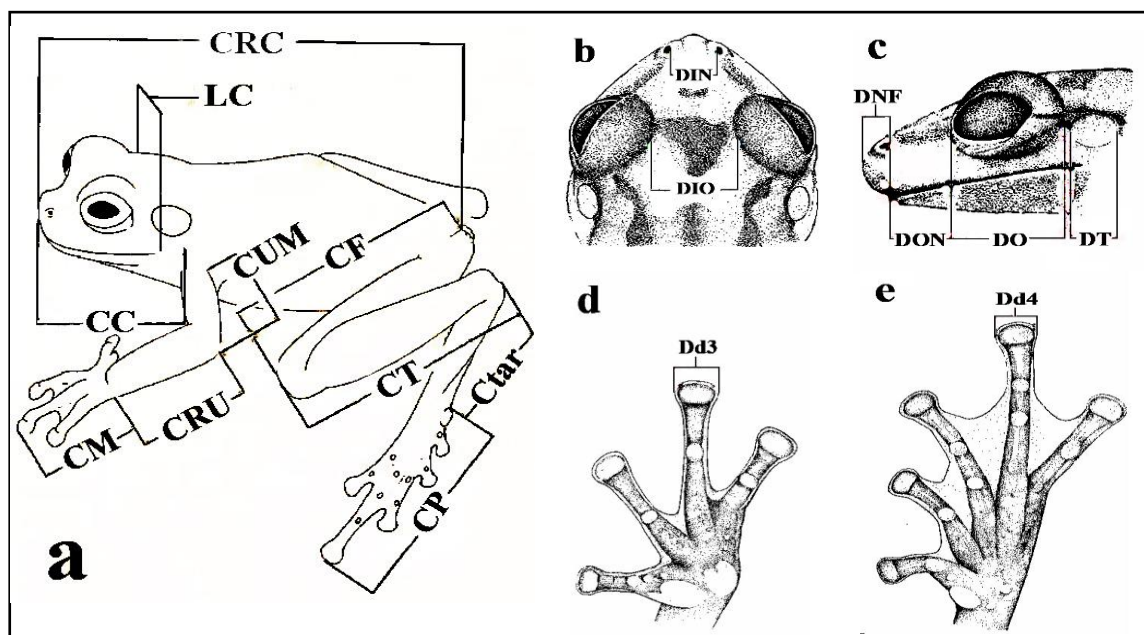


Figura 3. Caracteres morfométricos: (a) Comprimento-Rostro-Cloacal (CRC), Comprimento da Cabeça (CC), Largura da Cabeça (LC), Comprimento do Fêmur (CF), Comprimento da Tíbia (CT), Comprimento do tarso (Ctar), Comprimento do Pé (CP), Comprimento do Úmero (CUM), Comprimento Radioulnar (CRU), Comprimento da Mão (CM), (b) Distância Inter-Nasal (DIN), Distância Inter-Orbital (DIO), (c) Diâmetro do Tímpano (DT), Diâmetro do Olho (DO), Distância-olho-narina (DON), Distância narina-focinho (DNF), (d) Diâmetro do disco do terceiro dedo da mão (Dd3) e o Diâmetro do disco do quarto dedo do pé (Dd4). As figuras são modificadas de Pombal Jr. *et al.* (1995a) e Duellman (2001).

3.6 Bioacústica

Os cantos de anúncio de machos coletados de *Scinax perereca* foram gravados em condições naturais de campo, em diversas localidades (Apêndice 2), com uso de um gravador digital *Tascam DR-100Mk II Linear PCM Recorder* acoplado a um microfone externo *Sennheiser* Semidirecional (ME/66). Pelo menos três minutos da atividade de vocalização de cada indivíduo foi gravada. Convertidas em padrão mono 16 bit e arquivadas no formato *wave*, as gravações estão depositadas na Coleção Sonora Itamar A. Martins. Durante as gravações, a temperatura do ar foi medida com uso de um termômetro de mercúrio com precisão de 0,5°C, durante as atividades de campo.

Os componentes bioacústicos do canto de anúncio de *Scinax perereca* foram descritos; espectrais: Frequência Mínima (FMN), Frequência Máxima (FMX), Frequência Dominante (FD) e Frequência de Modulação (FM); temporais: Número de pulsos por canto (NP), Duração do Canto (DC), Duração dos Pulsos (DP) e Intervalo entre Pulsos (IP), segundo a nomenclatura e os conceitos apresentados por Cocroft & Ryan (1995), Wells (2007) e Tárano (2010). A Tabela 4 mostra uma breve descrição dos caracteres bioacústicos.

Tabela 4. Descrição dos caracteres bioacústicos

Caráter	Descrição do caráter
Componentes Espectrais	
Frequência Mínima	Menor faixa de frequência produzida por um canto
Frequência Máxima	Maior faixa de frequência produzida por um canto
Frequência Dominante	Faixa de frequência que concentra maior intensidade de energia produzida por um canto
Frequência de Modulação	Diferença entre a frequência máxima atingida por um canto e a frequência máxima do seu primeiro pulso
Componentes Temporais	
Número de Pulsos	Quantidade de pulsos produzidos por um canto
Duração do canto	Intervalo de tempo entre o início e o final de um canto
Duração dos Pulsos	Intervalo de tempo entre o início e o final de um pulso
Intervalo entre Pulsos	Intervalo de tempo entre dois pulsos consecutivos de um canto

Quase todos componentes espectrais foram observados e medidos no espectrograma, gráfico o qual relaciona faixas de frequência do canto em função do tempo. A frequência dominante (FD) foi medida no gráfico espectro de potência, que relaciona amplitude (intensidade) em função da frequência. Os componentes temporais foram observados e medidos no oscilograma (*waveform*), gráfico o qual relaciona

amplitude do canto (intensidade) em função do tempo (Figura 4). Os caracteres bioacústicos puderam ser visualizados e quantificados com o uso dos softwares *Raven 1.3* e o *CoolEdit 2000*, com taxa de amostragem de 44.100 Hz, resolução de 16 bit e opções de filtro de 256 e/ou 1024 bandas FFT (*Fast Fourier Transform*).

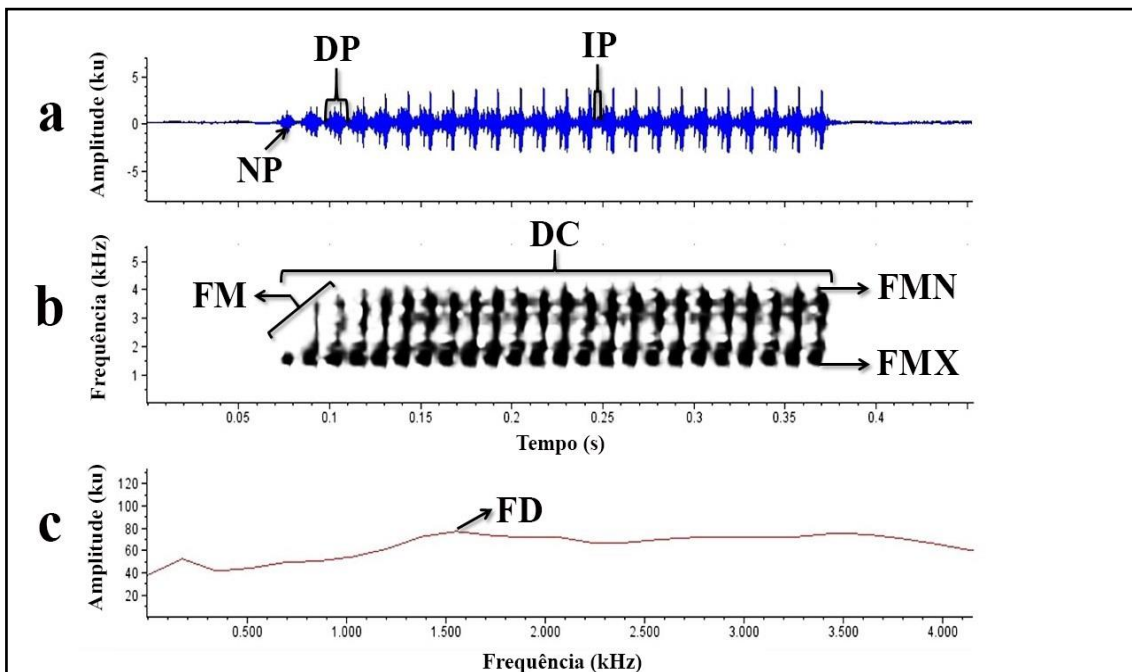


Figura 4. Caracteres bioacústicos: (a) Oscilograma: Número de Pulsos (NP), Duração dos Pulsos (DP) e Intervalo entre Pulsos (IP); (b) Espectrograma: Frequência Mínima (FMN), Frequência Máxima (FMX), Frequência de Modulação (FM), Duração do Canto (DC); (c) Espectro de Potência: Frequência Dominante (FD).

3.7 Coleções Científicas

Os espécimes de *Scinax* utilizados neste estudo estão depositados nas seguintes coleções científicas herpetológicas:

(CCLZU): Coleção Científica de Anfíbios do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté, Taubaté, SP. **Curador:** Prof.^o Dr. Itamar Alves Martins.

(CFBH): Coleção Científica de Anfíbios Célio Fernando Baptista Haddad do Laboratório de Herpetologia da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. **Curador:** Prof.^o Dr. Célio Fernando Baptista Haddad.

(CHUFSC): Coleção Científica do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. **Curador:** Prof.^o Dr. Selvino Neckel de Oliveira.

(DZSJRP): Coleção Científica de Anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP. **Curadora:** Prof.^a Dra. Denise Cerqueira Rossa-Feres.

(MCP): Coleção Científica do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. **Curadora:** Prof.^a Dra. Gláucia Maria Funk Pontes.

(UFRGS): Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. **Curadores:** Prof.^o Dr. Marcio Borges Martins e Prof.^a Dra. Laura Verrastro.

(ZUEC): Coleção de Anfíbios do Museu de História Natural “Prof. Adão José Cardoso” da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. **Curador:** Prof.^o Dr. Luis Felipe de Toledo Ramos Pereira.

3.8 Distribuição Geográfica

A distribuição geográfica de *Scinax perereca* foi determinada por meio das coordenadas geográficas (latitude e longitude) obtidas de cada localidade visitada durante as coletas de campo, e dos registros indicados nas coleções científicas consultadas. Mapas regionais foram elaborados com auxílio do software de geoprocessamento *Quantum GIS (QGIS) 2.14.0*.

3.9 Análises Estatísticas

3.9.1 Alinhamento das sequências do COI e análises de similaridade

A diversidade intra-específica e as divergências inter-específicas entre as sequências nucleotídicas do COI das amostras de *Scinax* (*S. dolloi*, *S. duartei*, *S. granulatus*, *S. hayii* e *S. perereca*) foram calculadas por métodos de distância genética, segundo o modelo evolutivo *Kimura 2 parâmetros* (K2P) (KIMURA, 1980) no programa *Mega 6.0* (TAMURA *et al.* 2007).

Em seguida, os dados gerados foram utilizados para construir a árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987), adotando o modelo K2P e o método de *bootstrap* 1000 para dar suporte aos agrupamentos (FELSENSTEIN, 1985). A identificação correta dos espécimes pôde ser reconhecida apenas pelas amostras que apresentaram um índice de similaridade, em média, superior a 98% ($p < 0,02$) (RUBINOFF, 2006).

3.9.2 Coeficiente de Variação (CV)

Calculamos o coeficiente de variação das amostras de cada caráter morfométrico e bioacústico de *Scinax perereca* para avaliar a condição de variação dos caracteres examinados. Adotamos o modelo proposto por Gerhardt (1991), modificado por Bee *et al.* (2001), para classificarmos os caracteres como *estático* ($CV < 0,05$) ou *dinâmico* ($CV > 0,05$) em função do valor resultante obtido da equação “ $CV = (DP/X) \cdot 100$ ”, na qual CV indica o coeficiente de variação, cujo valor resulta do quociente entre o desvio-padrão (DP) pela média dos dados obtidos de cada caráter. O estado *estático* indica um

que o caráter é pouco variável e bastante conservado, o qual representa grande potencial taxonômico para representar os eixos das análises multivariadas.

3.9.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A proposta da Análise de Componentes Principais (PCA) é reduzir um conjunto de dados com muitas variáveis, a um conjunto menor de variáveis, a partir do conjunto original. Trata-se de um método de análise multivariada, proposta por Pearson (1901) e Hotelling (1933), a qual foi escolhida para explorar a variação os dados dos caracteres morfométricos e bioacústicos sob a forma de uma nuvem de pontos, distribuídos num espaço multidimensional, e orientados por eixos não correlacionados (componentes principais) definidos para cada variável. O centroide dos pontos é definido pela média dos dados de cada caráter. As primeiras componentes (eixos) representam as maiores variâncias (auto-vetores). O eixo principal 1 mostra o caráter taxonômico com maior variância, o eixo principal 2 com a segunda maior variância, e o último a menor. Podemos dizer então, que a PC1 é a direção de maior variação na nuvem multidimensional de pontos, e é a reta que representa a menor distância entre ela e os pontos. Para realização desta análise, utilizamos espécimes coletados em campo e de coleções científicas, e comparamos os agrupamentos de *Scinax perereca* (subclados principais) obtidos das análises mitocondriais conforme suas localidades geográficas. Utilizamos o *software* de análises estatísticas *PAST 3.14 (PAleontological STatistics)* para obter resultados dos testes multivariados.

3.9.4 Análises morfológicas

As análises morfológicas teve caráter mais qualitativo. Calculamos a frequência relativa (FR) dos estados morfológicos de cada caráter presente por meio da razão entre a frequência absoluta (FA) (número de indivíduos observados com o estado morfológico do caráter) e o número de total de observações (NT) (total de indivíduos), para definir possíveis padrões morfológicos entre as populações de *Scinax perereca*. Em seguida, os caracteres morfológicos foram descritos em função dos agrupamentos obtidos das análises moleculares.

4. RESULTADOS

4.1 Alinhamentos e análises de similaridades das sequencias do COI

Os fragmentos sequenciados do gene mitocondrial *Citocromo c Oxidase I* (COI) corresponderam a 636 pb de comprimento. A análise de similaridade das sequências obtidas das espécies de *Scinax* resultou num clado monofilético bem suportado. *Scinax perereca* e as espécies relacionadas (*S. dolloi* e *S. hayii*) juntas formam um grupo monofilético, estruturado por três cladogramas: clado *Scinax dolloi*, clado *Scinax perereca* e clado *Scinax hayii* (Figura 5). Os resultados desta análise indicam bons valores de suporte para estrutura desses três cladogramas.

O clado *S. dolloi* é monofilético pelo agrupamento de espécimes de *S. dolloi*, dois espécimes da localidade-tipo (Alto de Maringá, RJ) e um espécime de outra localidade do Estado do Rio de Janeiro (Itatiaia, RJ) localizadas na Serra da Mantiqueira. O clado *S. dolloi* apresenta maiores afinidades com o clado *S. perereca*, sendo considerados aqui como grupos-irmãos.

O clado *S. perereca* não pode ser considerado monofilético pelo espécime de *S. perereca* do litoral sul do Vale do Ribeira (Peruíbe, SP), Estado de São Paulo, estar incluído no clado *S. hayii*. O clado *S. perereca* é formado pelos espécimes de *S. perereca* da localidade-tipo (Ribeirão Branco, SP) e de diversas localidades dos estados do Paraná e de Santa Catarina. Este clado é bem estruturado por dois subcladogramas principais: clado *perereca* A e clado *perereca* B. O clado *perereca* A forma um grupo monofilético com os espécimes de *S. perereca* da localidade-tipo (Ribeirão Branco, SP), região do Planalto Atlântico no sul do Estado de São Paulo, e de localidades no Estado do Paraná, regiões de planície litorânea (Morretes, PR) e áreas mais elevadas na região norte do Planalto de Curitiba (Jaguaraíva, PR). O clado *perereca* B forma um agrupamento monofilético com espécimes de diversas localidades do Estado de Santa Catarina, desde as planícies litorâneas (Florianópolis, Lauro Mueller, Praia Grande e Treviso, SC) até as regiões de maiores altitudes do Planalto Ocidental (São Bento do Sul, SC) e das Serras Catarinense (Campos Novos, SC). Juntos, o clado *S. dolloi* e o clado *S. perereca* formam o grupo-irmão do clado *S. hayii*.

O clado *S. hayii* agrupa os espécimes de *S. hayii* de áreas localizadas na Serra dos Órgãos, a localidade-tipo (Petrópolis, RJ) e outra localidade da região (Teresópolis, RJ), e os espécimes identificados como *S. cf. hayii* do Alto do Paranapanema (Apiiaí, Iporanga, Ribeirão Grande e Tapiraí, SP) e do litoral norte do Estado (Ilhabela, SP). O

espécime de *S. perereca* incluído neste clado, como mencionados anteriormente, foi considerado aqui neste estudo como *S. cf. hayii*.

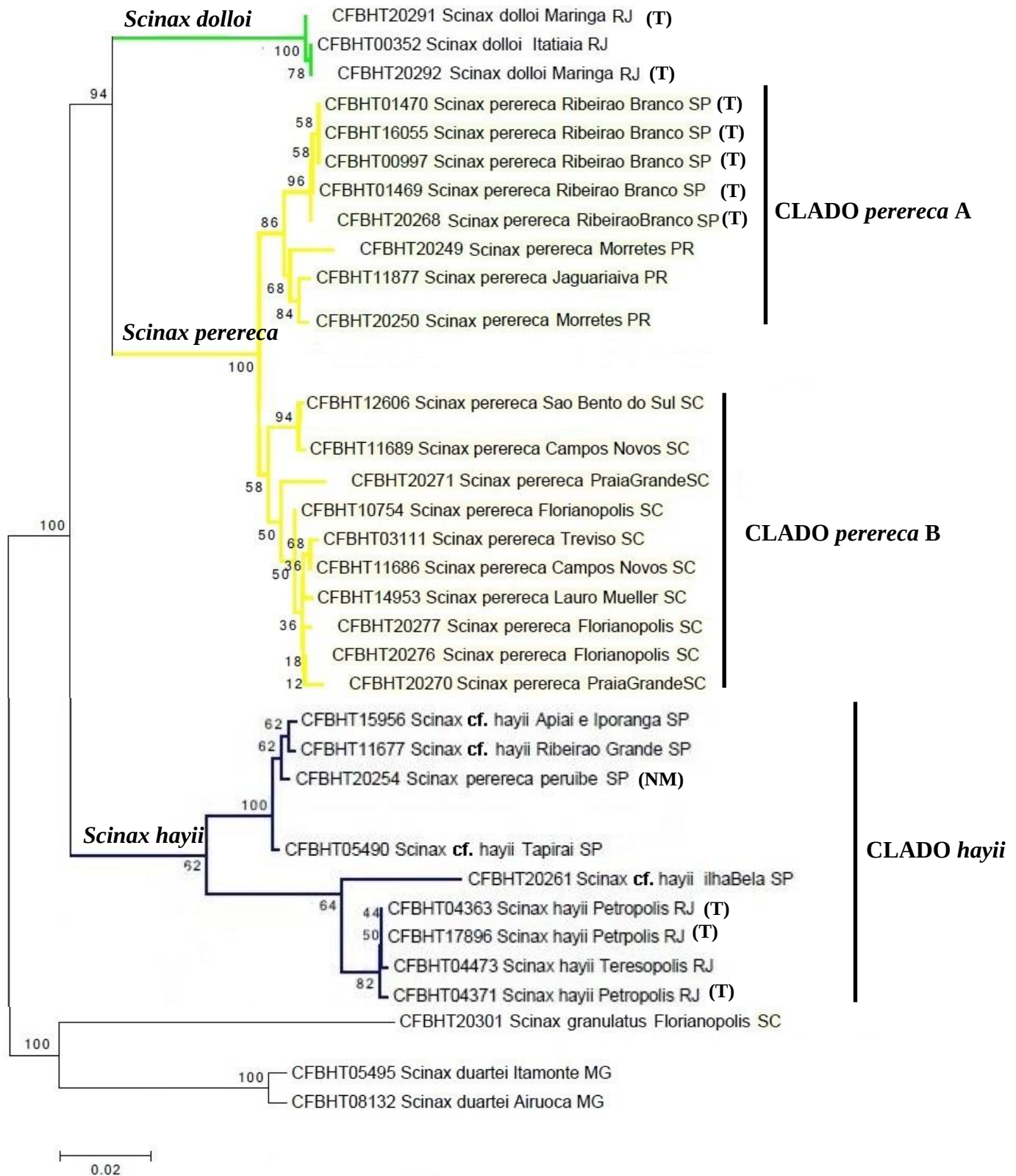


Figura 5. Árvore de similaridade dos fragmentos mitocondriais sequenciados do gene *Citocromo c Oxidase I* (COI) das espécies de *Scinax* (*S. dolloi*, *S. duarte*, *S. granulatus*, *S. hayii*, *S. perereca* e *S. cf. hayii*). Os números próximos aos nós indicam os valores de suporte dos agrupamentos em função do *bootstrap*. (T) indica topótipos. (NM) indica amostras de *Scinax perereca* não-monofiléticas.

4.2 Análises morfométricas e bioacústicas

Os valores das medidas dos caracteres morfométricos e dos bioacústicos dos subclados (clado *perereca* A e clado *perereca* B) do clado *S. perereca* obtidos da análise mitocondrial estão apresentadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os resultados do coeficiente de variação indicaram que os caracteres morfométricos (CRC e CT) e os bioacústicos (FD e NP) apresentam maior potencial para representar os eixos principais das análises multivariadas (PCA).

Tabela 5. Medidas dos caracteres morfométricos dos agrupamentos do clado *Scinax perereca*. Os valores estão apresentados sob a forma de média, desvio-padrão e amplitude de variação. mm: milímetros

Caráter	clado <i>perereca</i> A (n=55)	clado <i>perereca</i> B (n=123)
CRC (mm)	35,4±1,7 (31,9-38,7)	35,75±1,38 (32,2-39,1)
CC (mm)	11,5±0,8 (10,2-15,3)	11,4±0,7 (10,1-16,3)
LC (mm)	9,6±0,5 (8,2-10,9)	9,65±0,88 (8,2-17,6)
CF (mm)	16,4±1,2 (11,8-18,5)	16,45±1,36 (9,5-19)
CT (mm)	18,3±1,1 (15,8-20,3)	18,57±0,95 (15-20,9)
Ctar (mm)	10,3±0,8 (8,6-12,2)	10,36±0,6 (9-12)
CP (mm)	15,2±1,2 (11,6-18,3)	15,51±1,04 (9,7-18,3)
CUM (mm)	5,9±0,4 (4,8-6,9)	5,73±0,46 (4,6-7,1)
CRU (mm)	6,6±0,5 (5,6-7,8)	6,51±0,44 (5,3-7,7)
CM (mm)	10,6±0,7 (8,9-12,5)	10,66±0,66 (8,7-12,4)
DT (mm)	2,1±0,2 (1,6-2,7)	2,12±0,25 (1,3-3)
DO (mm)	3,5±0,3 (2,5-4,3)	3,57±0,3 (2,7-4,5)
DON (mm)	3,6±0,4 (3-4,5)	3,58±0,32 (2,8-4,4)
DNF (mm)	1,2±0,2 (0,7-2,1)	1,37±0,45 (0,8-2,7)
DIN (mm)	2,4±0,2 (2-2,7)	2,33±0,26 (1,4-3)
DIO (mm)	4,4±0,4 (3,9-5,5)	4,36±0,35 (3,5-5,4)
Dd3 (mm)	2±0,2 (1,4-2,4)	2,03±0,24 (1,3-2,8)
Dd4 (mm)	1,8±0,2 (1,3-2,2)	1,88±0,28 (1-2,5)

Estruturas ósseas: (CRC) Comprimento-Rostro-Cloacal; (CC) Comprimento da Cabeça; (LC) Largura da Cabeça; (CF) Comprimento do Fêmur; (CT) Comprimento da Tíbia; (Ctar) Comprimento do tarso; (CP) Comprimento do Pé; (CUM) Comprimento do Úmero; (CRU) Comprimento Radioulnar; (CM) Comprimento da Mão; (DON) Distância-olho-narina; (DNF) Distância narina-focinho; (DIN) Distância Inter-Nasal; (DIO) Distância Inter-Orbital. Estruturas não ossificadas: (DT) Diâmetro do Tímpano; (DO) Diâmetro do Olho; (Dd3) Diâmetro do disco do terceiro dedo da mão; (Dd4) Diâmetro do disco do quarto dedo do pé.

Tabela 6. Medidas dos caracteres bioacústicos do canto de anúncio dos subclados (clado *perereca* A e clado *perereca* B) do clado *Scinax perereca*. Os valores estão apresentados sob a forma de média, desvio padrão e amplitude de variação. Hz: Hertz; ms: milissegundos.

Caráter	clado <i>perereca</i> A (n=303)	clado <i>perereca</i> B (n=362)
FMN (Hz)	1491,87±129,6 (1166-1802)	1436,61±75,6 (1378-1602)
FMX (Hz)	4527,31±486 (3604-5671)	4339,2±314,2 (3624-5618)
FD (Hz)	1710,74±127,6 (1514,8-2557)	1586,9±110,9 (1392,9-2388,7)
FM (Hz)	2217,75±504,3 (689-3392)	1927,2±491,1 (742-3604)
DC (ms)	229,61±37,8 (152-329)	281,6±36,2 (183-396)
NP	19,78±2,7 (14-27)	21,5±2,4 (14-29)
DP (ms)	7,2±1,3 (5-11)	8±1,1 (5-11)
IP (ms)	3,7±1,2 (1-6)	4,5±1,3 (1-8)

Componentes espectrais: (FMN) Frequência Mínima; (FMX) Frequência Máxima; (FD) Frequência Dominante; (FM) Frequência de Modulação. Componentes temporais: (DC) Duração do Canto; (NP) Número de Pulsos; (DP) Duração dos Pulsos; (IP) Intervalo entre Pulsos.

As análises de componentes principais (PCA) corroboram com as análises mitocondriais revelando que existe uma estrutura populacional em *Scinax perereca*. Os caracteres morfométricos e os bioacústicos mostraram grande sobreposição entre os subclados (clado *perereca* A e clado *perereca* B) do clado *Scinax perereca*.

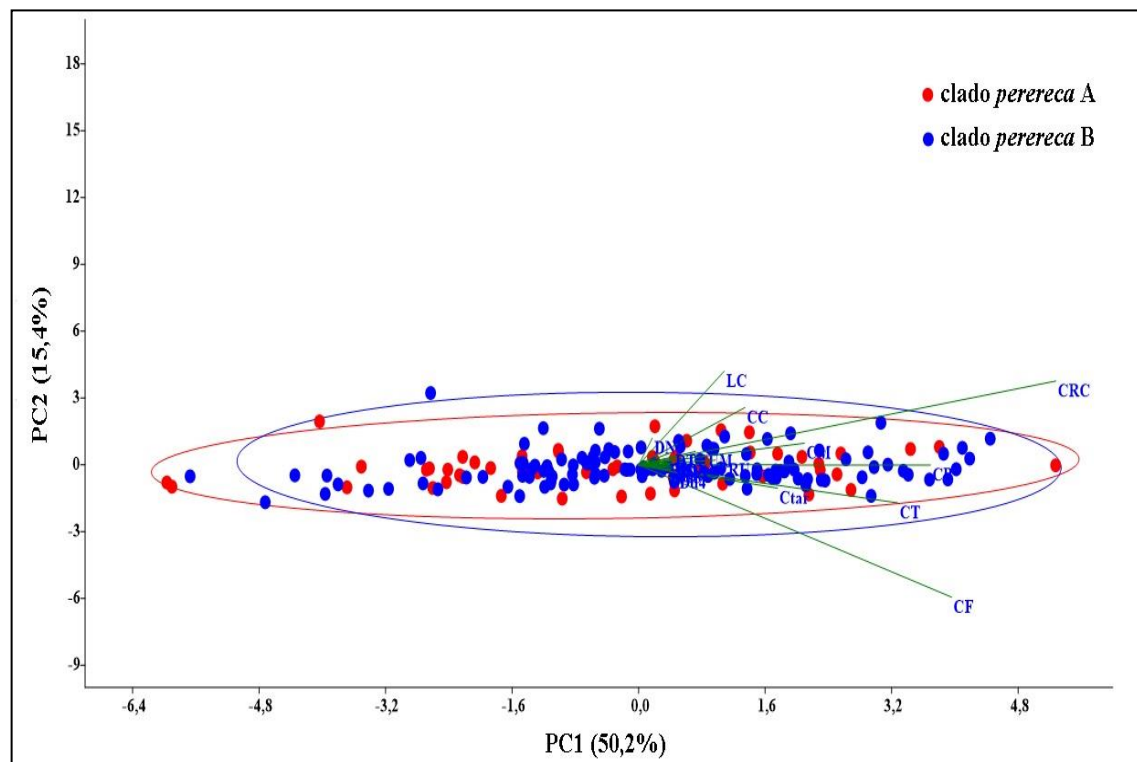


Figura 6. Vetores da análise de componentes principais dos caracteres morfométricos dos subclados de *Scinax perereca*: clado *perereca* A e clado *perereca* B.

Os dois primeiros componentes dos caracteres morfométricos representam em proporção cumulativa 65,6% da variação obtida. O componente principal 1 explica 50,2% da variação morfométrica entre os clados *perereca* A e *perereca* B. As maiores variações observadas na morfometria destes dois clados estão representadas pelos caracteres CRC, CF, CT e CP (Figura 6, Tabela 7).

Tabela 7. Matriz de variância (PCA) dos caracteres morfométricos

Caráter	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
CRC	0,5859	0,4180	-0,6523	0,1558	0,0148	0,0452	-0,0888	0,1078
CC	0,1494	0,2858	0,4436	0,1803	0,3839	0,0958	-0,2811	-0,0942
LC	0,1202	0,4672	0,3668	0,0885	0,3321	-0,1974	0,0996	0,0280
CF	0,4394	-0,6591	0,0081	0,0738	0,5274	-0,0872	0,1133	0,1656
CT	0,3639	-0,1895	0,2340	0,2998	-0,5150	-0,3639	-0,0666	0,0388
Ctar	0,1949	-0,1158	0,1363	0,4002	-0,2076	0,4046	-0,0919	-0,6064
CP	0,4098	-0,0005	0,2108	-0,7734	-0,1597	0,0158	-0,3448	-0,1025
CUM	0,0797	0,0668	0,2339	0,0384	-0,1570	0,4079	0,2005	0,4614
CRU	0,1081	0,0235	0,2121	0,0880	-0,2306	0,2504	0,0627	0,5101
CM	0,2328	0,1081	0,0877	-0,2243	-0,0666	0,0266	0,8068	-0,3030
DT	0,0489	0,0655	0,0087	0,0227	-0,0059	0,0851	0,0623	0,0213
DO	0,0475	0,0247	0,0151	0,0377	-0,0124	0,0704	0,0129	0,0135
DON	0,0499	0,0000	0,1084	0,1011	-0,0568	-0,2354	-0,1419	0,0460
DNF	0,0193	0,1331	0,0578	0,0591	-0,1350	-0,4746	0,0978	0,0194
DIN	0,0419	-0,0073	-0,0220	-0,0374	0,0765	0,1812	-0,0522	-0,0404
DIO	0,0411	0,0190	0,0419	0,0648	0,0903	-0,1970	0,1588	-0,0354
Dd3	0,0481	-0,0144	0,0100	-0,0070	0,0600	0,1563	0,0427	-0,0066
Dd4	0,0546	-0,0393	-0,0137	-0,0294	0,0929	0,1650	0,0044	-0,0245

A variação obtida dos dois primeiros componentes dos caracteres bioacústicos está representada por uma proporção acumulativa de 93,7%. O primeiro componente principal explica 67,7% da variação encontrada entre o clado *perereca* A e o clado *perereca* B. Os caracteres bioacústicos FMX e FM representam as maiores variações encontradas entre estes dois subclados (Figura 7, Tabela 8).

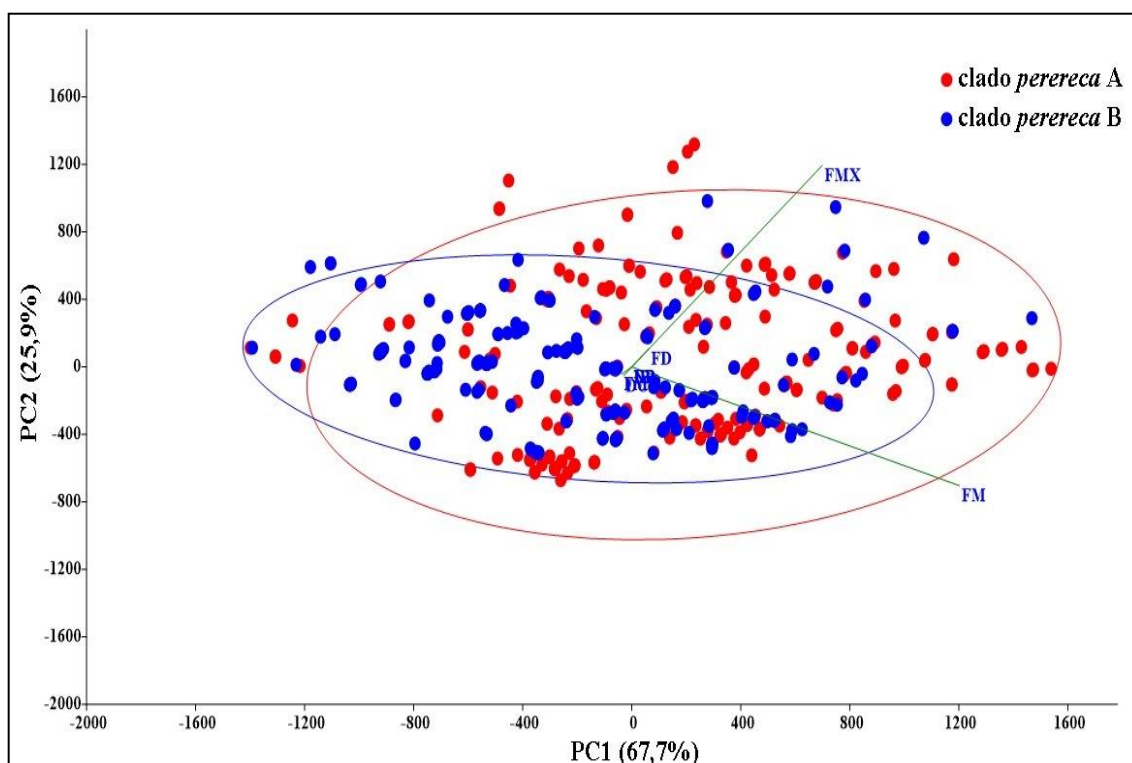


Figura 7. Vetores da análise de componentes principais dos caracteres bioacústicos dos subclados de *Scinax perereca*: clado *perereca* A e clado *perereca* B.

Tabela 8. Matriz de variância (PCA) dos caracteres bioacústicos

Caráter	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
FMN	-0,0266	-0,0307	0,5675	0,8191	0,0732	0,0005	-0,0060	-0,0007
FMX	0,5020	0,8582	-0,0566	0,0846	0,0340	0,0011	-0,0005	0,0001
FD	0,0448	0,0777	0,8078	-0,5673	0,1328	0,0001	-0,0026	0,0000
FM	0,8631	-0,5051	0,0048	0,0058	0,0000	-0,0001	-0,0001	-0,0001
NP	-0,0010	-0,0019	-0,0043	0,0042	0,0625	-0,0960	0,8730	0,4740
DC	-0,0213	-0,0377	-0,1487	0,0124	0,9858	0,0087	-0,0505	-0,0369
DP	0,0000	0,0001	-0,0031	-0,0007	0,0077	-0,6544	-0,4155	0,6317
IP	-0,0005	-0,0011	-0,0018	-0,0008	0,0031	0,7500	-0,2503	0,6123

4.3 Análises morfológicas

A análise qualitativa dos caracteres morfológicos mostrou pouca variação na frequência dos estados de cada caráter observado entre os espécimes dos subclados de *S. perereca*, clado *perereca* A e clado *perereca* B, corroborando a estrutura populacional de *Scinax perereca* indicado pelas análises mitocondriais e dos componentes principais (Figuras 8 e 9).

As frequências relativas dos estados morfológicos em relação ao formato de estruturas do crânio (FD, FL, CR, RL) e dos membros (CN, TMCI, TMCE, TMTI, TMTE) é bastante semelhante entre estes dois subclados. Os estados morfológicos dos

caracteres TSM e TSP apresentam frequências relativas mais variáveis entre o clado *perereca* A e o clado *perereca* B. Os espécimes do clado *perereca* A podem ser distinguidos dos espécimes do clado *perereca* B pela coloração corpórea dorsal e das manchas presentes em regiões ocultas do corpo (MAX, MIG, MFM e MTB).

A coloração corpórea dos espécimes do clado *perereca* A varia entre tons de castanhos-claros, castanhos-escuros ou castanhos-dourados, e as regiões ocultas do corpo apresentam manchas pretas reticuladas sobre uma área de coloração amarela. Os espécimes do clado *perereca* B apresentam coloração que varia entre castanho-claro, castanho-dourado ou castanho-amarelado, com manchas reticuladas nas regiões ocultas do corpo que podem variar entre marrom-claro e marrom-escuro sobre uma área de coloração preta ou dourada. A presença de numerosos pontos pequenos e castanho-escuros distribuídos por todo revestimento dorsal é bastante peculiar nos espécimes do clado *perereca* B. A presença das faixas em diferentes regiões do corpo (FRT, FRU, FUM, FFM, FTB, FPM e FPT) é bem mais frequente nos espécimes do clado *perereca* A.

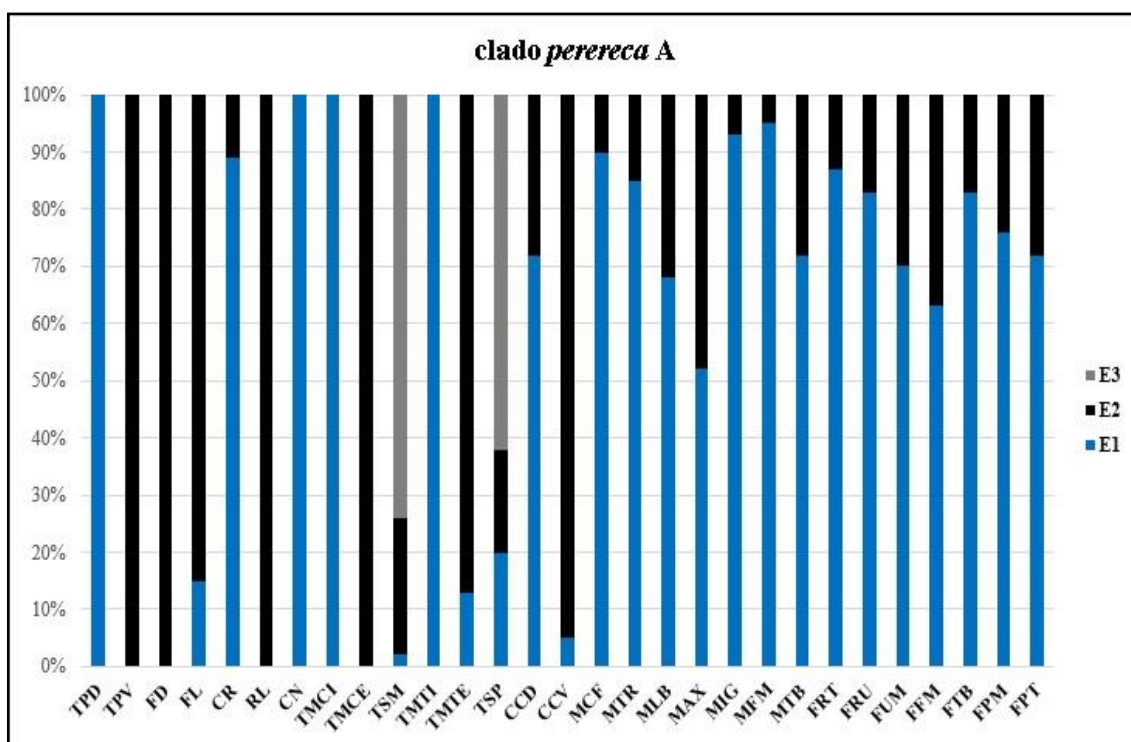


Figura 8. Frequência relativa (%) dos estados (cores) morfológicos de cada caráter (colunas) do espécimes do clado *perereca* A. Valores da legenda representam o estado morfológico dos caracteres definido previamente. (E1): estado morfológico 1; (E2) estado morfológico 2; (E3): estado morfológico 3.

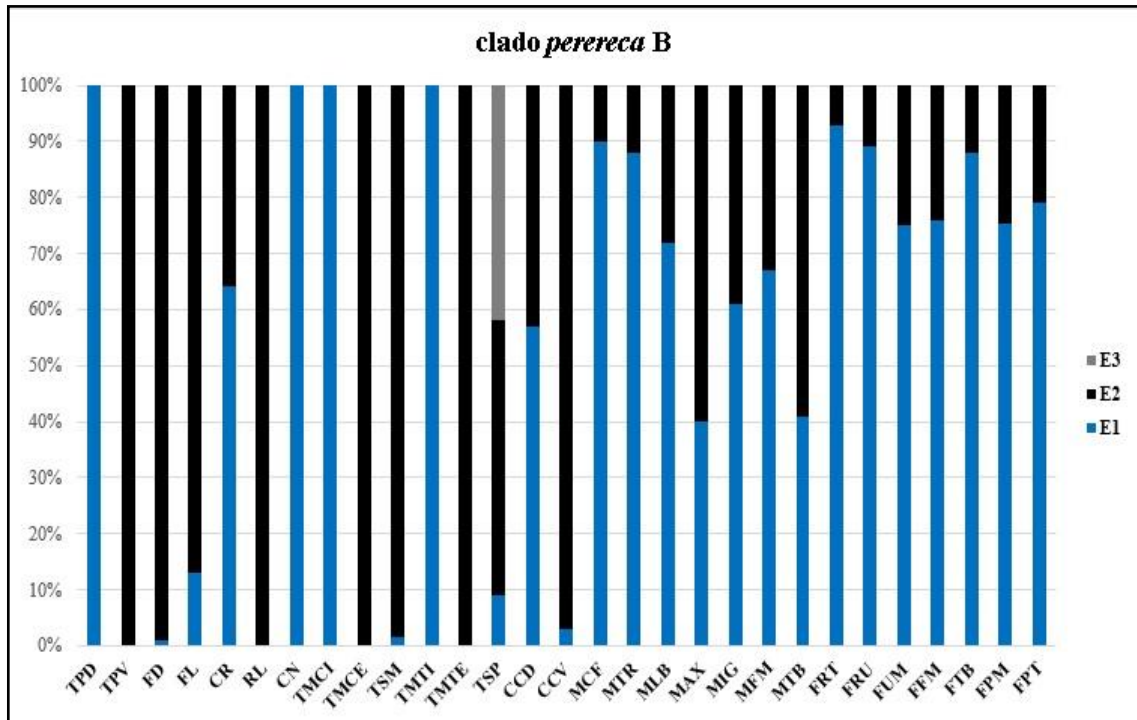


Figura 9. Frequência relativa (%) dos estados (cores) morfológicos de cada caráter (colunas) do espécimes do clado *perereca* B. Valores da legenda representam o estado morfológico dos caracteres definido previamente. (E1): estado morfológico 1; (E2) estado morfológico 2; (E3): estado morfológico 3.

4.4 Distribuição geográfica

Os resultados das análises mitocondriais sustentadas pelas análises qualitativas e dos componentes principais sugerem que a distribuição geográfica de *Scinax perereca* está restrita a região de planalto da localidade-tipo (Ribeirão Branco, SP) no Estado de São Paulo, áreas de planície litorânea e planalto da região leste do Estado do Paraná, e áreas que se estendem desde as planície litorâneas até os planaltos interiores da região oeste do Estado Santa Catarina, além de áreas concentradas em regiões ao norte do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 10).

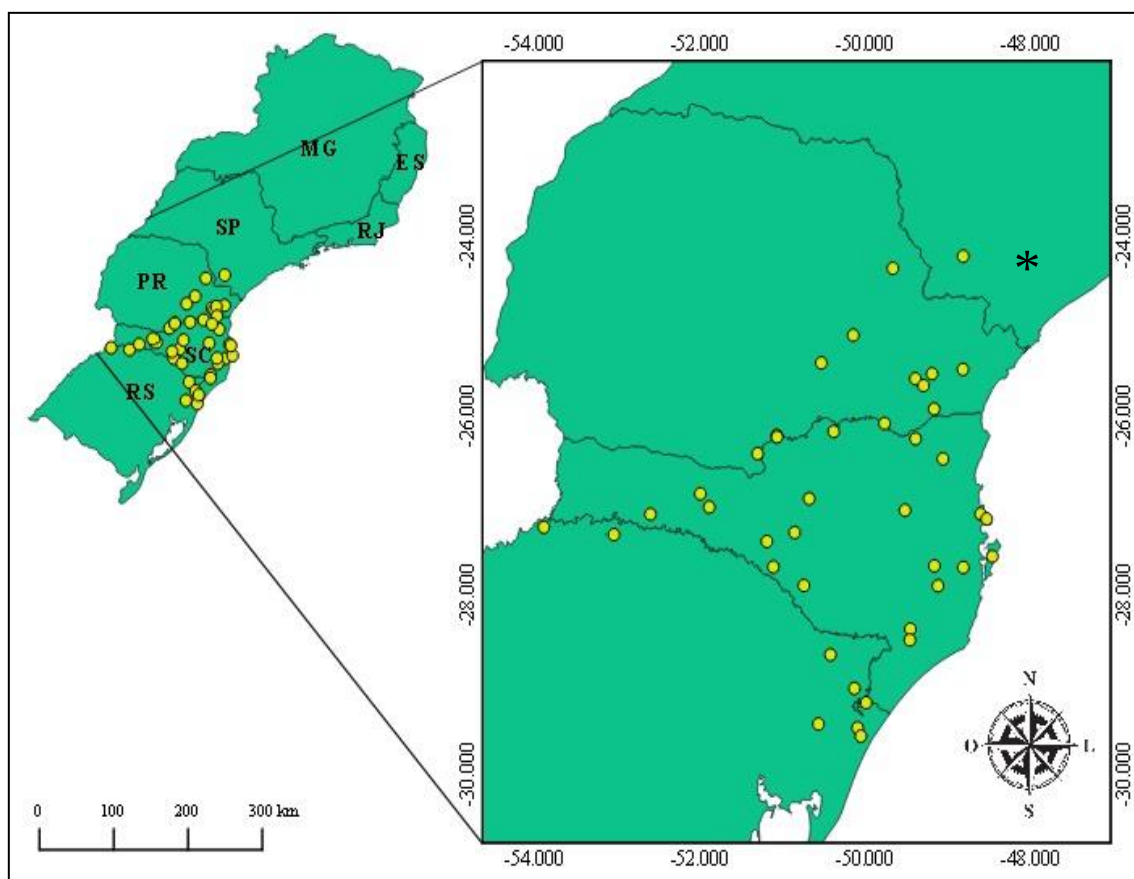


Figura 10. Distribuição geográfica de *Scinax perereca*. Abreviação dos Estados brasileiros (UF): (ES) Espírito Santo; (MG) Minas Gerais; (PR) Paraná; (RJ) Rio de Janeiro; (RS) Rio Grande do Sul; (SP) São Paulo. *Indica localidade-tipo (Ribeirão Branco, SP).

4.5 Considerações sobre a espécie

Scinax perereca Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995

Redescrição (Figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16)

- **Etimologia:** o epíteto específico “perereca” refere-se a uma palavra de origem Tupi. Este nome é frequentemente usado pelos brasileiros para designar espécies de hilídeos, principalmente espécies do antigo grupo de espécies *Scinax ruber*.

- **Holótipo:** BRASIL, SÃO PAULO, Município de Ribeirão Branco, Fazendinha São Luís (aproximadamente 24°13'S; 48°46'W; 800m), macho adulto em bom estado de conservação (ZUEC 9179), coletado por Pombal Jr. & Haddad em 7-11/XII/1992.

- **Parátipos:** machos adultos coletados juntos com o holótipo (MNRJ 16601-01; MUZUSP 69637-39; ZUEC: 9181-9187).

- **Diagnose:** *Scinax perereca* é distinguido de outras espécies do gênero pela seguinte combinação de caracteres: (1) tamanho corpóreo médio (machos CRC 31,9-38,7 mm); (2) cabeça mais comprida que larga; (3) focinho subovóide em vista dorsal; (4) focinho redondo em vista lateral; (5) região loreal levemente côncava; (6) canto rostral reto; (7) mosaico de manchas pretas reticuladas sobre uma área de coloração amarela na lateral

das regiões inguinais, nas faces anterior e posterior das coxas, e nas axilas. (8) mancha cefálica localizada entre as órbitas oculares com formato triangular invertido; (9) manchas torácicas semelhantes ao formato de parênteses invertidos “)” (“ou com a forma da letra “W” do alfabeto; (10) mancha lombar semelhante a letra “V” do alfabeto e com formato invertido; (11) laterais da cabeça com uma faixa rostral, longitudinal que se estende das narinas até a região posterior das cinturas escapulares; (12) braços, antebraços, mãos, coxas, pernas, pés e dos dígitos com uma a três faixas dorsais e transversas que se estendem até a região lateral.

Descrição da Localidade-tipo

- **Morfologia:** (1) textura da pele lisa na região ventral da gula e em todo revestimento dorsal, com poucos grânulos glandulares; (2) região ventral do abdômen bastante granulosa; (3) focinho subovóide em vista dorsal; (4) focinho redondo em vista lateral; (5) região loreal levemente côncava; (6) canto rostral reto ou curvo; (7) calo nupcial esbranquiçado, áspero e bastante desenvolvido; (8) tubérculo metacarpal interno simples e elíptico; (9) tubérculo metacarpal externo bifido; (10) tubérculo metatarsal interno simples e ovóide; (11) tubérculo metatarsal externo simples e arredondado; (12) tubérculos subarticulares das mãos e dos pés simples, redondos e cônicos (Figura 11).

- **Coloração em vida:** (1) dorso do corpo e dos membros castanho-escuro ou castanho-claro, levemente pigmentado por pequenos pontos e manchas castanho-escuros; (2) ventre do abdômen do corpo e dos membros imaculado e amarelado (machos), com a região gular levemente rosada; (3) mosaico de manchas reticuladas pretas, largas e bem definidas, sobre uma área de coloração amarela nas faces posteriores das coxas, anteriores das pernas, nas regiões inguinais e nas axilas; (4) mancha cefálica castanho-claro ou castanho-escuro localizada entre as órbitas oculares com formato triangular invertido; (5) manchas torácicas castanho-claros ou castanho-escuros semelhantes ao formato de parênteses invertidos “)” (“ou com a forma da letra “W” do alfabeto; (10) mancha lombar castanho-claro ou castanho-escuro semelhante a letra “V” do alfabeto e com formato invertido; (11) faixas rostrais longitudinais castanho-claro ou castanho-escuro nas laterais da cabeça, que se estendem das narinas até a região posterior das cinturas escapulares; (12) dorso dos braços, antebraços, mãos, coxas, pernas, pés e dos dígitos com uma ou três faixas transversas castanho-claro ou castanho-escuro que se estendem até a região lateral de cada membro (Figura 12).

- **Morfometria:** (1) tamanho corpóreo de porte médio (CRC 32,7-42,0 mm); (2) cabeça mais comprida (CC 10,5-15,3 mm) em relação a sua largura (LC 9,0-11,1 mm); (3) tíbias (CT 17,0-22,4 mm) com comprimentos maiores que os fêmures (CF 15,4-19,4 mm); (4) pés (11,6-18,5 mm) com comprimento maior que os tarsos (Ctar 9,3-12,2 mm); (5) mãos (CM 8,9-12,8 mm) com comprimentos maiores que o úmero (CUM 5,1-6,9 mm) e a radioulna (CRU 5,6-7,8 mm); (6) diâmetro dos olhos (DO 2,5-4,4 mm) maior que dos tímpanos (DT 2,0-2,7 mm); (7) distância entre os olhos e as narinas (DON 3,1-4,8 mm) maior que entre as narinas e o focinho (DNF 0,8-1,7 mm); (8) distância entre as orbitas oculares (DIO 3,7-5,0 mm) maior que entre as narinas (DIN 2,0-3,0 mm); (9) diâmetros dos discos adesivos, tanto do dígito 3 da mão (Dd3 1,5-2,5 mm) quanto do dígito 4 do pé (Dd4 1,5-2,5 mm) do mesmo tamanho.

- **Bioacústica (canto de anúncio):** (1) uma única nota multipulsionada (NP 14-26); (2) duração do canto variável (DC 159-329 ms); (3) tempo de duração dos pulsos e o

intervalo entre eles variável (DP 5-11 ms; IP 2-6 ms); (4) amplitude das frequências do canto variável (FMN 1166-1484 Hz; FMX 3604-5671 Hz); (5) frequência dominante ocupa uma faixa bem definida (FD 1514,8-1777,7 Hz); (6) estrutura do canto modulada de forma ascendente (FM 1431-2809 Hz). (7) não há estrutura harmônica (Figura 13).

Variação populacional

- **Coloração dos espécimes fixados:** (1) dorso do corpo e dos membros castanho-escuro ou castanho-claro, as vezes, pigmentado por poucos ou numerosos pequenos pontos castanho-escuros; (2) ventre do abdômen do corpo, dos membros e da região gular imaculados, creme escuro ou amarelo-pálido (machos); (3) mosaico de manchas reticuladas castanho-escutas, sobre uma área de coloração esbranquiçada ou amarelo-pálido nas faces posteriores das coxas, anteriores das pernas, nas regiões inguinais e nas axilas; (5) manchas cefálica, torácica, lombar castanho-claros ou castanho-escuros; (8) faixas nas laterais da cabeça e no dorso dos membros castanho-claros ou castanho-escuros (Figura 14).

- **Morfologia:** (1) textura da pele lisa na região ventral da gula e em todo revestimento dorsal, com poucos grânulos glandulares; (2) região ventral do abdômen granulosa; (3) focinho subovóide ou arredondado em vista dorsal; (4) focinho redondo ou proeminente em vista lateral; (5) região loreal levemente côncava; (6) canto rostral reto ou curvo; (7) calo nupcial esbranquiçado, áspero e bastante desenvolvido; (8) tubérculo metacarpal interno simples e elíptico; (9) tubérculo metacarpal externo bífido; (10) tubérculo metatarsal interno simples e ovóide; (11) tubérculo metatarsal externo simples e arredondado; (12) tubérculos subarticulares das mãos e dos pés simples, redondos e cônicos, ou somente cônicos (Figura 14).

- **Coloração em vida:** (1) dorso do corpo e dos membros castanho-escuro, castanho-claro, castanho-dourado, castanho-esverdeado ou amarelado, as vezes, pigmentado por poucos ou numerosos pequenos pontos castanhos-escuros; (2) ventre do abdômen do corpo e dos membros imaculado e amarelado (machos), com a região gular levemente rosada ou amarelada; (3) presença ou ausência de um mosaico de manchas nas faces posteriores das coxas, anteriores das pernas, nas regiões inguinais e nas axilas; (4) mosaico de manchas reticuladas pretas, castanho-claros ou castanho-escuros, sobre uma área de coloração amarela, dourada, castanho-claro, castanho-dourado, castanho-esverdeado ou preta nas faces posteriores das coxas, anteriores das pernas, nas regiões inguinais e nas axilas; (5) presença ou ausência de mancha cefálica castanho-claro ou castanho-escuro localizada entre as órbitas oculares com formato triangular invertido; (6) presença ou ausência de manchas torácicas castanho-claros ou castanho-escuros semelhantes ao formato de parênteses invertidos “)” (“ou com a forma da letra “W” do alfabeto; (7) presença ou ausência de mancha lombar castanho-claro ou castanho-escuro semelhante a letra “V” do alfabeto e com formato invertido; (8) presença ou ausência de faixas rostrais longitudinais castanho-claro ou castanho-escuro nas laterais da cabeça, que se estendem das narinas até a região posterior das cinturas escapulares; (9) presença ou ausência no dorso dos braços, antebraços, mãos, coxas, pernas, pés e dos dígitos com uma, três ou quatro faixas transversas castanho-claro ou castanho-escuro que se estendem até a região lateral de cada membro (Figura 15).

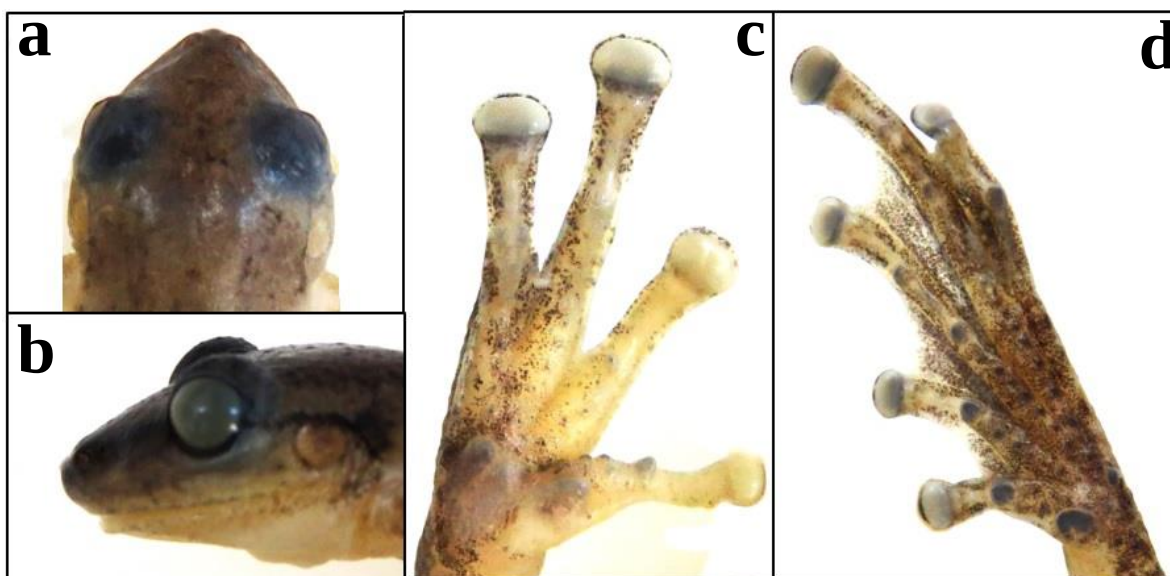
- **Morfometria:** média, desvio-padrão e amplitude de variação. (1) CRC $35,6 \pm 1,5$ (31,9-39,1 mm); (2) CC $11,4 \pm 0,7$ (10,1-16,3 mm); (3) LC $9,6 \pm 0,8$ (8,2-11,8 mm); (4) CF

16,4±1,3 (9,5-19 mm); (5) CT 18,5±1 (15-20,9 mm); (6) Ctar 10,3±0,7 (8,6-12,2 mm); (7) CP 15,4±1,1 (9,7-18,3 mm); (8) CUM 5,8±0,5 (4,6-7,1 mm); (9) CRU 6,5±0,5 (5,3-7,8 mm); (10) CM 10,6±0,7 (8,7-12,5 mm); (11) DT 2,1±0,2 (1,3-3 mm); (12) DO 3,6±0,3 (2,5-4,5 mm); (13) DON 3,6±0,3 (2,8-4,5 mm); (14) DNF 1,3±0,4 (0,7-2,7); (15) DIN 2,4±0,2 (1,4-3 mm); (16) DIO 4,4±0,3 (3,5-5,5 mm); (17) Dd3 2±0,2 (1,3-2,8 mm); (18) Dd4 1,9±0,3 (1-2,5 mm).

- **Bioacústica (canto de anúncio):** média, desvio-padrão e amplitude de variação. (1) FMN 1461,8±107,3 (1166-1802 Hz); (2) FMX 4424,9±412,2 (3604-5671 Hz); (3) FD 1643,3±133,8 (1392,9-2557 Hz); (4) FM 2059,6±517,5 (689-3604 Hz); (5) DC 257,9±45,1 (152-396 ms); NP (6) 20,7±2,7 (14-29); DP (7) 7,6±1,3 (5-11 ms); IP (8) 4,1±1,3 (1-8 ms) (Figura 16).

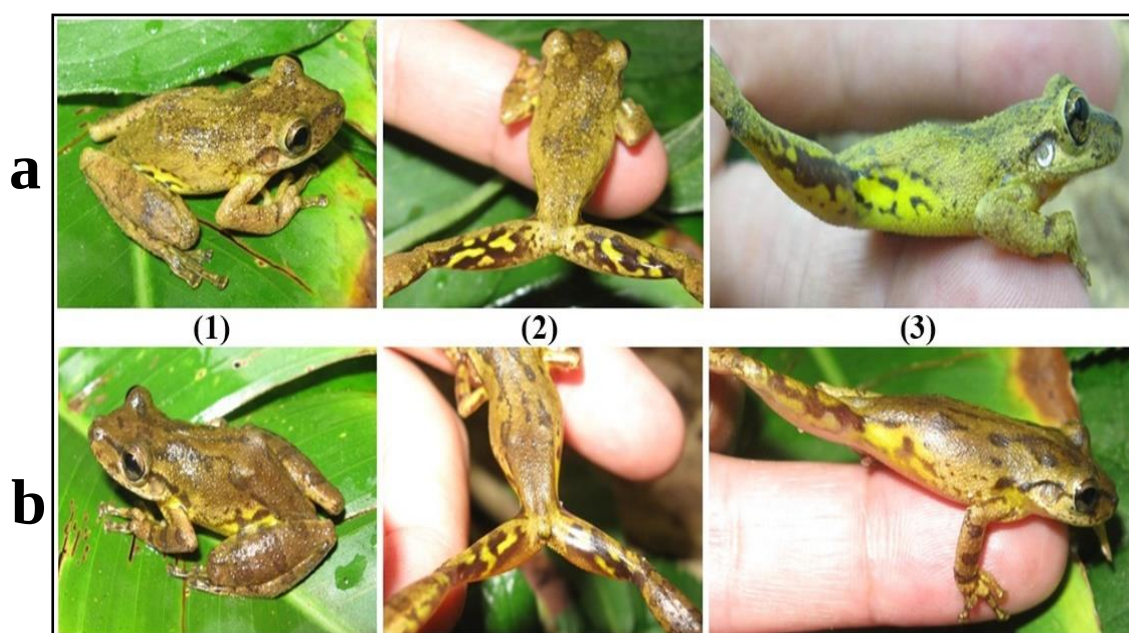
- **Comparação com espécies relacionadas:** Pelo seu tamanho menor (CRC 31,9-39,1 mm) *S. perereca* difere de *S. hayii* (CRC 39-42 mm, LUTZ, 1973; CRC 39-43 mm, HEYER *et al.* 1990; CRC 51 mm, HADDAD *et al.* 2013; CRC 37,5-46 mm, SANTOS, 2015) e *S. dolloi* (34,9 mm, PUGLIESE *et al.* 2009). *S. perereca* apresenta tamanho corpóreo semelhante a *S. granulatus* (CRC 32,1-36,5 mm, Fonte, 2010; CRC 34-39 mm, KWET *et al.* 2010). O canto de anúncio de *S. perereca* (FD 1392,9-2557 Hz, DC 152-396 Hz, NP 14-29) pode ser distinguido de *S. granulatus* por apresentar faixa de frequência dominante, duração do canto e número de pulsos maiores (FD 1124,6-1571,7 Hz, DC 210-290 ms, NP 7-11; CONTE *et al.* 2010; FD 980-1480 Hz, DC 80-260 ms, NP 5-10, KWET, 2001a,b), de *S. hayii* por apresentar faixa de frequência dominante menor (FD 1200-4100 Hz, POMBAL Jr. *et al.* 1995b; FD 1200-2800 Hz, HEYER *et al.* 1990; FD 1149-2102 Hz, SANTOS, 2015) e por apresentar duração do canto e número de pulsos maiores (DC 200-260 ms, NP 3-4, HEYER *et al.* 1990; DC 200 ms, NP 3-4; POMBAL Jr. *et al.* 1995b; DC 163-210 ms, NP 13-19, SANTOS, 2015), e de *S. dolloi* por apresentar faixa de frequência dominante e número de pulsos maiores e por ter duração do canto menor (SANTOS *et al.* no prelo). A coloração corpórea de *S. perereca* (castanho-escuro, castanho-claro, castanho-dourado, castanho-esverdeado, amarelado) difere de *S. granulatus* por apresentar coloração acizentada (KWET, 2001b; KWET *et al.* 2010), e difere de *S. hayii* pela ausência de manchas e faixas no dorso do corpo e dos membros, e nas laterais da cabeça (HEYER *et al.* 1990; SANTOS, 2015) (Figura 17).

- **Distribuição geográfica:** (SP): Ribeirão Branco, localidade-tipo, região de planalto no sul do Estado; (PR): Araucária, Fazenda Rio Grande, Fernandes Pinheiro, General Carneiro, Jaguariaíva, Morretes, Ponta Grossa, Rio Negro, São José dos Pinhais, Tijucas do Sul, União da Vitória, áreas litorâneas e de planalto na região leste do Estado; (SC): Águas Mornas, Anita Garibaldi, Anitápolis, Brunópolis, Campo Belo do Sul, Campos Novos, Canoinhas, Chapecó, Florianópolis, Ibirama, Irani, Itapema, Jaraguá do Sul, Lauro Muller, Lebon Régis, Ponte Serrada, Porto Belo, Porto União, Praia Grande, Rio das Furnas, São Bento do Sul, Treviso, áreas litorâneas e de planalto em diversas regiões do Estado; (RS): Bom Jesus, Cambará do Sul, Derrubadas, Itaiti, Planalto, São Francisco de Paula, Terra de Areia, áreas de planalto na região norte do Estado. Todas as localidades geográficas estão em áreas sob o domínio de Mata Atlântica.



10 mm

Figura 11. Morfologia de *Scinax perereca* (machos), Ribeirão Branco, SP, localidade-tipo. (a) vista dorsal da cabeça (CCLZU 3229); (b) vista lateral da cabeça; (c) vista ventral da mão; (d) vista ventral do pé (CFBH 40134). Foto: Itamar Alves Martins



35 mm

Figura 12. Coloração *in vivo* de *Scinax perereca* (machos), Ribeirão Branco, SP, localidade-tipo: (1) dorso do corpo e dos membros, presença de manchas; (2) mosaico de manchas nas faces posteriores das coxas; (3) mosaico de manchas nas regiões axilar e inguinal. (a) CCLZU 3227; (b) CCLZU 3228. Foto: Itamar Alves Martins

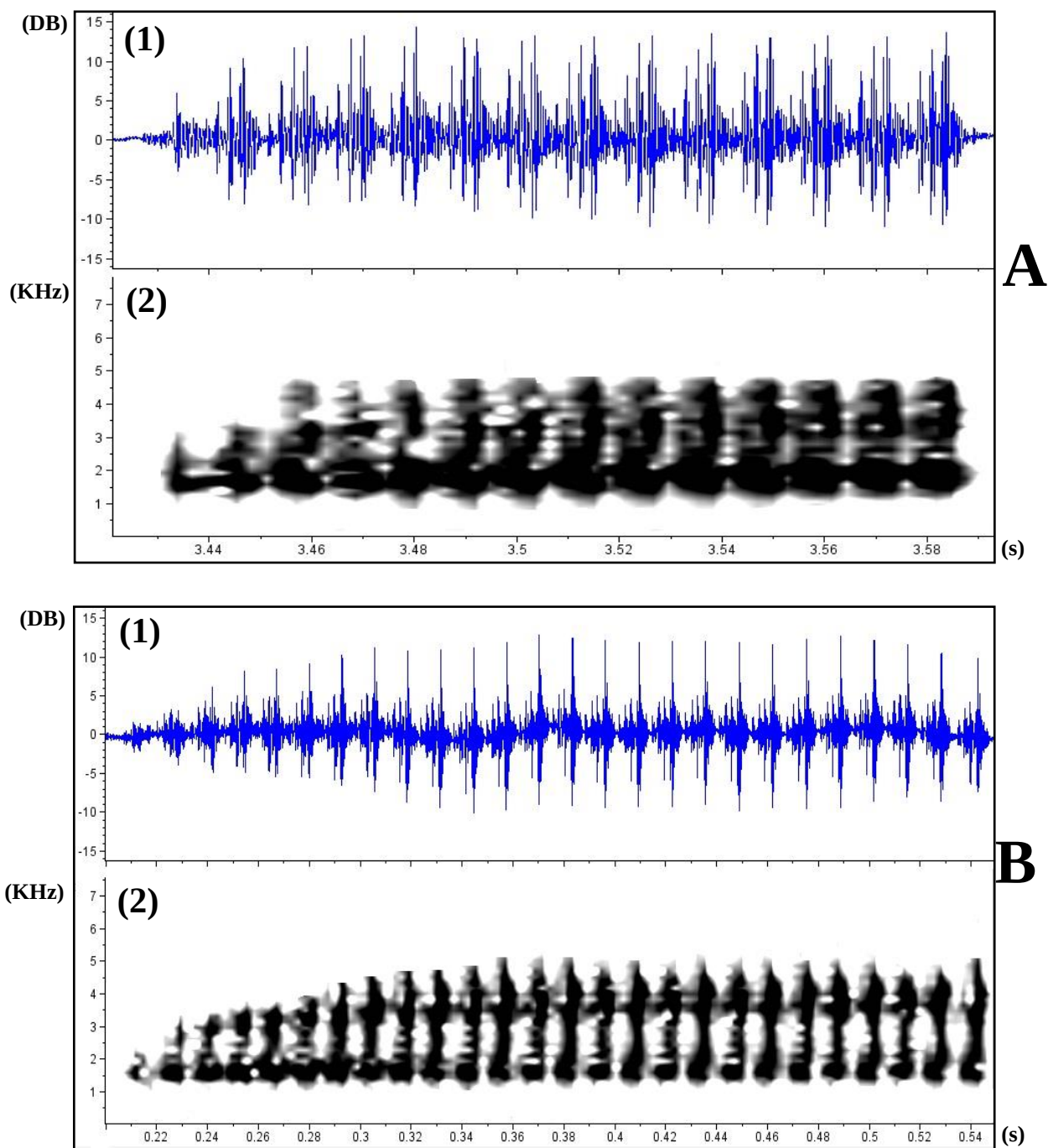


Figura 13. Canto de anúncio de *Scinax perereca* localidade-tipo, Ribeirão Branco, SP, localidade-tipo: (A) CFBH 40133 (CRC 35,4 mm; NP 14); (B) CFBH 40135 (CRC 34,8 mm; NP 26). (1) oscilograma; (2) espectrograma. Data da coleta: 15/XII/2015. Temperatura do ar: 20.°C. (KHz): Kilohertz; (DB): Decibéis; (s): segundos.

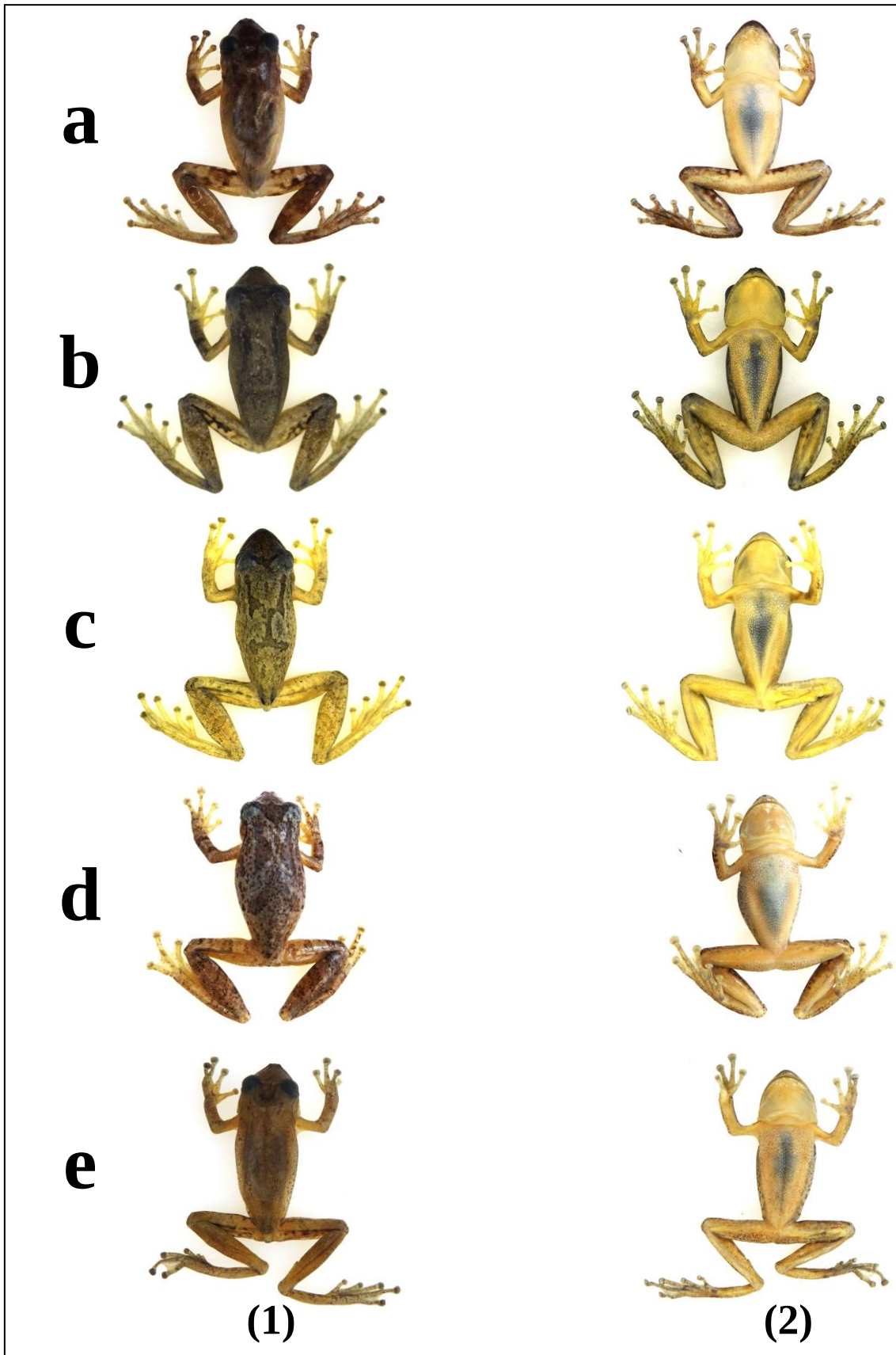
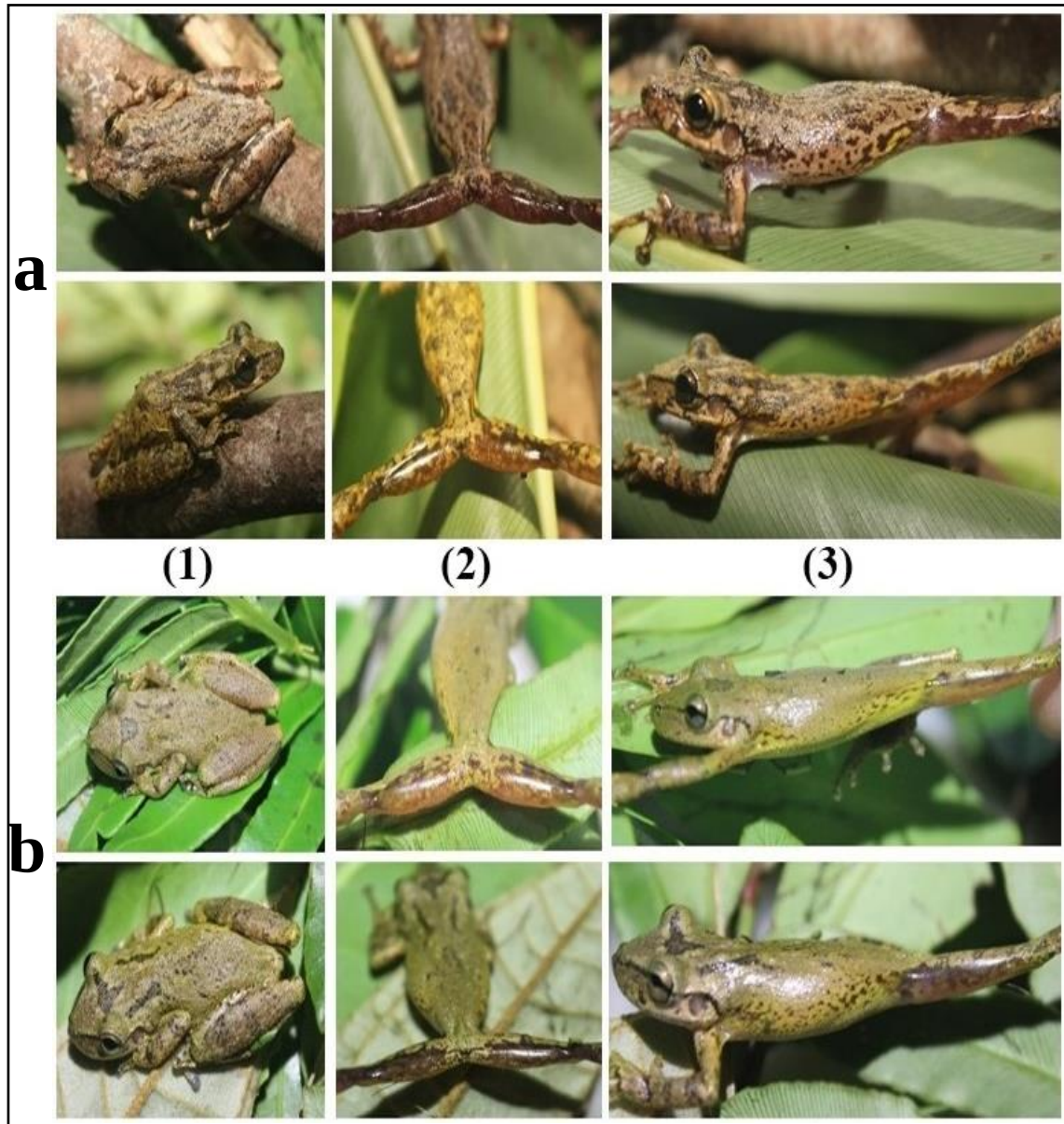


Figura 14. Variação morfológica de *Scinax perereca*: (1) vista dorsal; (2) vista ventral. (a) Ribeirão Branco, SP, localidade-tipo (CCLZU 3224); (b) Morretes, PR (CCLZU 3219); (c) Florianópolis, SC (CFBH 40158); (d) Praia Grande, SC (CCLZU 3281); (e) Cambará do Sul, RS (CFBH 40166). Fotos: Itamar Alves Martins



36 mm

Figura 15. Variação da coloração *in vivo* de *Scinax perereca* (machos): (1) dorso do corpo e dos membros, presença de manchas; (2) mosaico de manchas nas faces posteriores das coxas; (3) mosaico de manchas nas regiões axilar e inguinal. (a): Praia Grande, SC (CFBH 40164); (b): Cambará do Sul (CFBH 40166). Foto: Luis Carlos Rodrigues da Silva

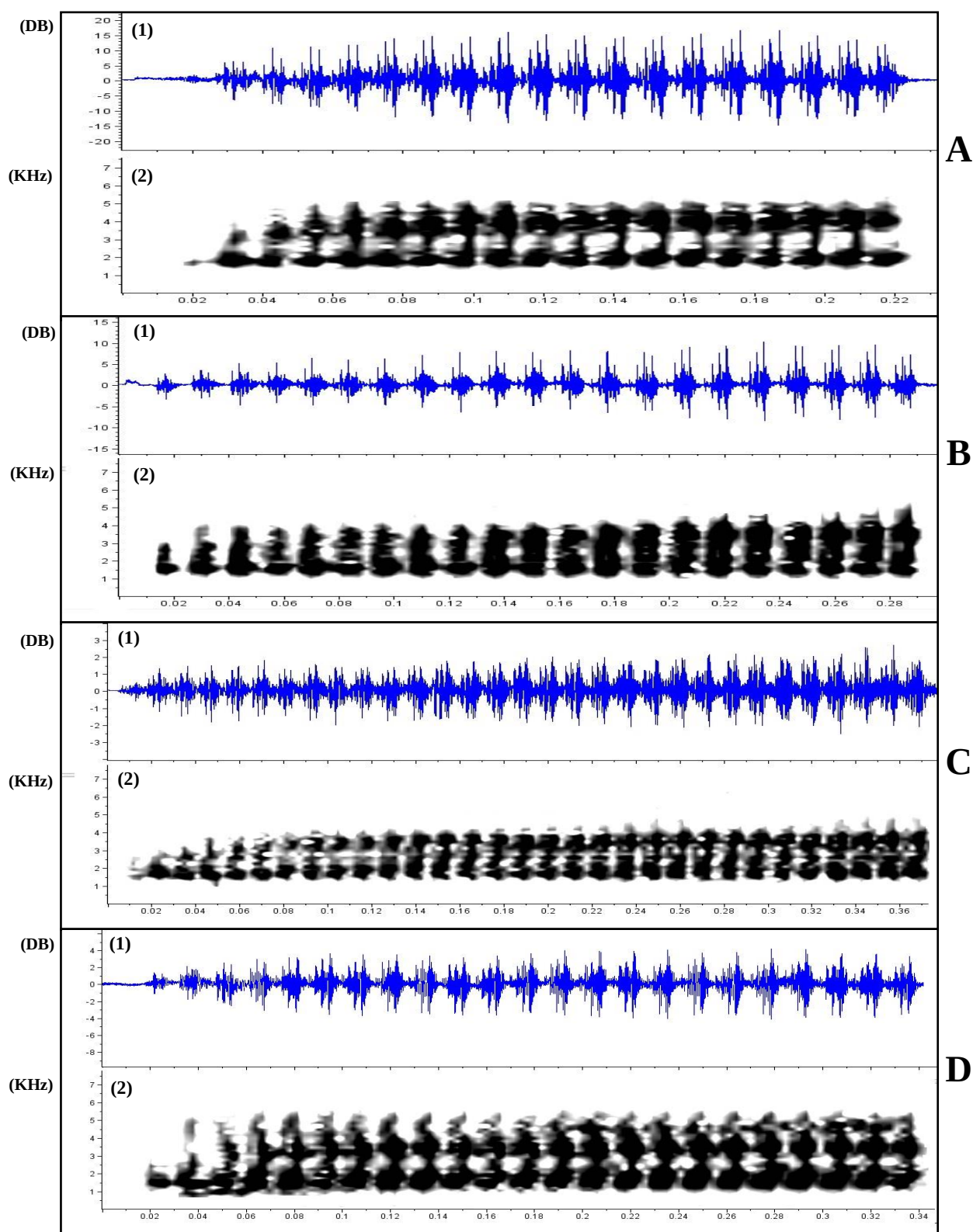


Figura 16. Variação do canto de anúncio de *Scinax perereca*: (A) Morretes, PR, CFBH 40153 (CRC 33,2 mm; NP 19). Data da coleta: 26/XI/2015. Temperatura do ar: 23.°C. (B) Florianópolis, SC, CFBH 40158 (CRC 35,6 mm; NP 22). Data da coleta: 22/XI/2015. Temperatura do ar: 19.°C. (C) Praia Grande, SC, CFBH 40164 (CRC 36,7 mm; NP 27). Data da coleta: 03/II/2016. Temperatura do ar: 19.°C. (D) Cambará do Sul, RS, CFBH 40135 (CRC 35,4 mm; NP 23). Data da coleta: 05/II/2016. Temperatura do ar: 18.°C. (1) oscilograma; (2) espectrograma.

5. DISCUSSÃO

A taxonomia das populações de *Scinax perereca* foi avaliada por meio da combinação de informações morfológicas, morfométricas, bioacústicas e moleculares, e comparada com espécies relacionadas. As análises de similaridade molecular indicam que as populações de *S. perereca* não formam um grupo monofilético, com dois subclados incluídos. Um desses subclados inclui todas as populações de *S. perereca* de Ribeirão Branco (localidade-tipo), sul de São Paulo, Brasil, e de regiões litorâneas e de planaltos no leste do Paraná (clado *perereca* A) num agrupamento monofilético, e o outro inclui as populações litorâneas e de planaltos de Santa Catarina, Brasil, e populações do norte do Rio Grande do Sul, Brasil (clado *perereca* B). Por isso, a estrutura populacional de *S. perereca* observada aqui neste estudo é parcialmente incongruente com a taxonomia aceita atualmente. A topologia dos subclados moleculares de *Scinax perereca* (Figura 5) também é suportado pela morfologia, morfometria e bioacústica (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Na figura do cladograma molecular (Figura 5) observa-se que as populações do litoral, do Alto Paranapanema, e do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, referidas na literatura (BERNARDE & KOKUBUM, 1999; POMBAL Jr. & GORDO, 2004; BEVIER *et al.* 2008; FORTI, 2009; BRASSALOTI *et al.* 2010; MAGRINI & GIARETTA, 2010; ALEGRETTI & FLYNN, 2012) como *S. perereca* mostram claramente estarem fora do clado *S. perereca*, apresentando maior afinidade com o clado *S. hayii*. Com isso, essas populações de *S. perereca* foram aqui consideradas como *Scinax cf. hayii*.

5.1 Clado *perereca* A: populações de *S. perereca* de São Paulo (localidade-tipo) e do Paraná

As análises de similaridades das sequências gênicas do COI de *Scinax perereca* mostraram que o clado *perereca* A apresenta uma estrutura bem suportada por dois subclados, um representado pelas populações de Ribeirão Branco, São Paulo (localidade-tipo), e o outro por populações de diversas localidades da região leste do Paraná, áreas de planalto (Araucária, Fazenda Rio Grande, Fernandes Pinheiro, General Carneiro, Piraí do Sul, Ponta Grossa, Rio Negro, São José dos Pinhais, Tijucas do Sul e União da Vitória, PR), e litorânea (Morretes, PR).

As informações morfológicas, morfométricas e bioacústicas da população de *Scinax perereca* de Ribeirão Branco, SP (localidade-tipo) corroboram com a descrição original da espécie, publicada por Pombal Jr. *et al.* (1995a). A morfometria e a bioacústica da população de *S. perereca* de Ribeirão Branco, SP, revelaram maiores amplitudes de variação entre os caracteres, quando comparada com a descrição original da espécie (POMBAL Jr. *et al.* 1995a), a qual pode estar associada ao maior tamanho amostral utilizado neste trabalho. Pombal Jr. (2010) descreveu o canto de anúncio de *S. perereca* da Serra de Paranapiacaba, na divisa dos municípios de Apiaí e Ribeirão Branco, São Paulo, o qual confere congruência com as informações bioacústicas de Ribeirão Branco, São Paulo, geradas neste estudo.

Ainda na descrição original desta espécie, Pombal Jr. *et al.* (1995a) indicam que o canto de anúncio é multipulsionado com modulação, e apresenta uma aparente estrutura harmônica, a qual não foi observada neste estudo. Pombal Jr. *et al.* (1995b) enfatizam que a estrutura multipulsionada em cantos de anúncio é compartilhada entre as espécies do gênero *Scinax*. Os harmônicos “aparentes”, citados por Pombal Jr. *et al.* (1995a) na descrição original da espécie podem ser na verdade “sidebands”, falsos harmônicos gerados por sons com estrutura multipulsionada (Heyer *et al.* 1990). Pombal Jr. *et al.* (1995b) apontam que diferenças entre os equipamentos de gravação ou na configuração dos *softwares*, utilizados na análise bioacústica, também podem gerar falsos harmônicos.

A ocorrência de populações de *S. perereca* foi registrada pela primeira vez no Paraná poucos anos depois de sua descrição (MACHADO *et al.* 1999). Desde então, diversos trabalhos (BERNARDE & MACHADO, 2000; CONTE & MACHADO, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2006, 2007; TOREZAN, 2006; GAREY & HARTMANN, 2012; SANTOS & CONTE, 2014) registraram a ocorrência de *S. perereca* em outras localidades do leste do Estado, porém muitos carecem de informações taxonômicas da espécie. Garey & Hartmann (2012) forneceram registros fotográficos de *S. perereca*, os quais indicam congruência em relação a coloração e a presença de manchas e faixas, com o observado neste estudo nas populações do Paraná.

FROST (2017) indica a ocorrência de *S. perereca* na região do sudoeste do Estado do Paraná. Toniazzi *et al.* (Ano) ao revisarem a ocorrência da anuraofauna do sudoeste do Paraná, por meio de consulta a literatura e atividades de campo, apontam que *S. perereca* não foi encontrada nos locais indicados durante as visitas. Além disso, também não tivemos sucesso de encontrar *S. perereca* em Francisco Beltrão, PR, região

sudoeste do Paraná, durante as atividades de campo deste estudo. Talvez na literatura pesquisada por Toniazzi *et al.* (2012) pode ter havido equívocos na identificação taxonômica da espécie *S. perereca*.

5.2 Clado *perereca* B: populações de *S. perereca* de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul

As análises de similaridades das sequências gênicas do COI de *Scinax perereca* mostraram que o clado *perereca* B uma mesma estrutura bem suportada por dois subclados, ambos representados por populações de diversas localidades do Estado de Santa Catarina, um agrupa as populações de áreas litorâneas (Florianópolis, Lauro Muller, Praia Grande e Treviso, SC) e o outro inclui as populações de áreas de planalto no interior do Estado (Campos Novos e São Bento do Sul, SC).

As análises morfológicas, morfométricas e bioacústicas obtidas neste estudo corroboram com as informações descritas na literatura para as populações de *S. perereca* dos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (KWET, 2001b; LINGNAU, 2009; FONTE, 2010; KWET *et al.* 2010; LEMA & MARTINS, 2011).

Em um estudo comparativo com espécies de *Scinax*, Fonte (2010), dentre as espécies estudadas, descreve a morfologia, morfometria e a bioacústica de espécimes de *Scinax perereca* coletados em diversas localidades dos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. As descrições morfológicas (forma, coloração, manchas e faixas) e as morfométricas (tamanhos corpóreos) apresentada por este autor corroboram com as descrições feitas no presente estudo das populações destes dois Estados. Lucas & Marocco (2011) indicam a ocorrência de *S. perereca* no Parque Nacional das Araucárias (Ponte Serrada e Passos Maia, SC) no Estado de Santa Catarina sem comentários taxonômicos sobre a espécie. No entanto, fornecem fotografias que conferem o mesmo padrão de coloração, manchas e faixas observadas aqui neste estudo nas populações deste Estado.

Kwet *et al.* (2010) forneceram fotografias e breves comentários sobre as populações de *S. perereca* das Serras Gaúchas, São Francisco de Paula, RS, e indicaram uma amplitude de variação dos tamanhos corpóreos um pouco maior (CRC 36-41 mm) em comparação a este estudo (CRC 31,9-39,1 mm). Uma breve descrição morfológica apresentada por Lima & Martins (2011) para populações do norte do Rio Grande do Sul (Cambará do Sul, Candiota, Derrubadas, São Francisco de Paula e Terra de Areia, RS) confere com as informações deste estudo e a apresentada por Kwet *et al.* (2010). A

variação da coloração corpórea (castanho-claro, castanho-escuro e castanho-dourado) indicada por esses pesquisadores também foi observada aqui entre as populações dos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul.

Poucos trabalhos comentaram ou descreveram o canto de anúncio das populações de *S. perereca* dos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (KWET, 2001b; LINGNAU, 2009; FONTE, 2010). Kwet (2001b) descreveu o canto de anúncio de *S. perereca* em populações do Rio Grande do Sul. Lingnau (2009) apresentou a descrição do canto de anúncio de *S. perereca* da população de Lebon Régis, região sul de Santa Catarina. Fonte (2010) descreveu o canto de anúncio desta espécie de populações do sul de Santa Catarina (Lebon Régis e Florianópolis, SC) e do nordeste do Rio Grande do Sul (São Francisco de Paula e Terra de Areia, RS). A variação do canto de anúncio de *S. perereca* apresentada por estes trabalhos conferem claramente com as descrições bioacústicas, das populações de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, realizadas aqui neste estudo. Apesar de Kwet (2001b) e Lingnau (2009) comentarem sobre as dificuldades taxonômicas em distinguir *S. granulatus* de *S. perereca*, as informações bioacústicas (Frequência Dominante, Duração do Canto e Número de Pulsos) são fundamentais e suficientes para separar estas espécies.

Existem muitos trabalhos indicando a ocorrência de *S. perereca* em ambos os Estados, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GARCIA & VINCIPROVA, 1998; BERNARDE & ANJOS, 1999; LEMA & MARTINS, 2011; LUCAS & MOROCCO, 2011, SAITO, 2013), no entanto, poucos fazem referência sobre quais foram os critérios taxonômicos utilizados para identificação da espécie.

5.3 Clado *hayii*: populações de *S. perereca* de São Paulo (litoral norte, Alto do Paranapanema e Vale do Ribeira)

As análises de similaridades das sequências gênicas do COI mostraram que o clado *hayii* tem estrutura bem suportada por dois subclados, um incluindo as populações de *S. hayii* da Serra dos Órgãos, Petrópolis (localidade-tipo) e Teresópolis, Rio de Janeiro, e populações de *S. cf. hayii* do litoral norte de São Paulo (Ilhabela, SP), enquanto o outro agrupa as populações de *S. cf. hayii* de diversas localidades do Alto do Paranapanema (Apiáí, Guapiara, Iporanga, Piedade, Pilar do Sul, Ribeirão Grande e Tapiraí, SP) e populações de *S. perereca* do Vale do Ribeira (Barra do Turvo, Iguape, Peruíbe, SP). Os resultados destas análises não correspondem com a distribuição atual aceita de *S. perereca* (BERNARDE & KOKUBUM, 1999; POMBAL Jr. & GORDO,

2004; BEVIER *et al.* 2008; FORTI, 2009; BRASSALOTI *et al.* 2010; MAGRINI & GIARETTA, 2010; ALEGRETTI & FLYNN, 2012; FROST, 2017), no Estado de São Paulo. Apesar de Pombal Jr. & Gordo (2004) indicarem a ocorrência e fotografia de *S. perereca* na Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, SP, não fizeram comentários sobre informações taxonômicas da espécie. Os espécimes analisados neste estudo da região litorânea do Vale do Ribeira (Barra do Turvo, Iguape e Peruíbe, SP) por meio da morfologia, da morfometria, da bioacústica e das sequências do COI revelaram que não se trata de *S. perereca*, mas sim um espécie mais aparentada de *S. hayii*. A ocorrência de *S. perereca* no Estado de São Paulo deve ser reconhecida, até o momento, apenas para a localidade-tipo, Ribeirão Branco, São Paulo.

Scinax hayii tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo do Espírito Santo a Santa Catarina, ao longo das Serras do Mar e da Mantiqueira (COCHRAN, 1955; LUTZ, 1973; HEYER, 1990; HADDAD & SAZIMA, 1992; RIBEIRO *et al.* 2005; FROST, 2017). Muitos trabalhos apontam a grande variação existente na morfologia e na morfometria entre as populações desta espécie COCHRAN, 1955; LUTZ, 1973; HEYER, 1990, POMBAL *et al.* 1995a). E os autores Haddad & Sazima, (1992) e Pombal Jr. *et al.* (1995a,b) sugeriram que *S. hayii* pode representar um complexo de espécies. Suas semelhanças morfológicas com *S. perereca* (POMBAL Jr. *et al.* 1995b; FAIVOVICH *et al.* 2005; CARAMASCHI *et al.* 2013) podem ter contribuído com equívocos na literatura para identificação taxonômica destas espécies. Condez *et al.* 2009 se referem as populações de *S. perereca* do Parque Estadual de Jurupará, Tapiraí e Piedade, São Paulo, com tamanhos corpóreos muito maiores (CRC 40-57 mm) que os descritos em Ribeirão Branco, São Paulo (localidade-tipo), como mostrado neste trabalho (CRC 31,9-39,1 mm) e pelos autores Pombal *et al.* (1995a) (CRC 34-38,5 mm). Pode ser que esses autores identificara espécimes de *S. cf. hayii* como *S. perereca* devido a variação do tamanho corporal similar a *S. hayii* (LUTZ, 1973; HEYER *et al.* 1990; SANTOS, 2015), a qual é conhecida nestas regiões (ARAÚJO *et al.* 2013).

Na revisão taxonômica de populações de *S. hayii*, os resultados de Santos (2015) mostraram claramente que esta espécie pode ser diferenciada de *S. perereca* por meio da morfologia, morfometria, e principalmente, pela bioacústica.

Magrini & Giaretta (2010) descreveram o canto de anúncio de *S. perereca* registrados em Ubatuba, SP, cujas descrições da faixa de frequência (950-7050 Hz) e da frequência dominante (FD 1.430-3.990 Hz) mostra grande diferença em comparação com as obtidas neste estudo e por outros autores (POMBAL Jr. *et al.* 1995a; POMBAL

Jr., 2010). Talvez as análises de Magrini & Giaretta (2010) possam ter considerado *sidebands*, o que gerou a tal interpretação. Por outro lado, pode ter ocorrido um equívoco entre os autores na identificação taxonômica da espécie, por apresentar semelhança com as faixas de frequências de *S. hayii* (HEYER *et al.* 1990; SANTOS, 2015).

A duração do canto e o número de pulsos de *S. perereca* apresentada por Magrini & Giaretta (DC 165-250 ms; NP 13-20) também são bem diferentes deste estudo (DC 152-396 ms; NP 14-29) e outros, como Pombal Jr. *et al.* (1995a) (DC 280-350 ms) e Pombal Jr. (2010) (DC 280-370 ms; NP 19-26). Magrini & Giaretta (2010) citam que as análises de Bevier *et al.* (2008), em populações *S. perereca* do Parque Estadual Intervales, Ribeirão Grande, São Paulo, indicam grande similaridade com suas análises quanto a duração do canto. Magrini & Giaretta (2010) também fornecem a fotografia de um indivíduo de *S. perereca*, a qual revela bastante semelhanças com o padrão de coloração das populações de *S. hayii* de Ubatuba, São Paulo, descritas por Santos (2015). Esse autor aponta que as populações de *S. hayii* estudadas de Ubatuba, SP, apresenta diferenças significativas em relação a população da localidade-tipo, Petrópolis, Rio de Janeiro. Recomenda-se que mais populações de *S. hayii* do litoral do Estado de São Paulo sejam estudadas para contribuir com a resolução desses conflitos de identidade taxonômica entre estas espécies.

6. COMENTÁRIOS TAXONÔMICOS

Alguns trabalhos (POMBAL Jr. *et al.* 1995b; FAIVOVICH *et al.* 2005; CARAMASCHI *et al.* 2013) já ressaltaram as semelhanças morfológicas compartilhadas entre as espécies *S. dolloi* e *S. perereca*. Cruz *et al.* 2009 forneceram fotografias e uma breve descrição sobre *Scinax* aff. *perereca* no Parque Estadual do Ibitipoca, Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil. Outras populações de *S. aff. perereca* já foram registradas na região (Canelas & Bertoluci, 2007; Galdino *et al.* 2008; Bertoluci *et al.* 2009; Cruz *et al.* 2009; Pezutti *et al.* 2011; Moura *et al.* 2012; Pirani *et al.* 2013; Pimenta *et al.* 2014). Pimenta *et al.* (2014) descreveram brevemente a morfologia de espécimes de *S. aff. perereca* na Serra do Espinhaço, Alvorada de Minas, Minas Gerais, os quais apresentam tamanhos corpóreos (CRC 32-35 mm) menores que *S. perereca* (POMBAL Jr. *et al.* 1995a; presente estudo).

Scinax dolloi foi considerada *doubtful species* por Lutz (1973) devido a inexistência de espécimes para a identificação. Duellman (2001) aponta que não há nenhuma população natural representada por espécimes coletados em campo. Por isso, as informações biológicas sobre *Scinax dolloi* são bastantes escassas, limitando sua identificação e a validação do seu *status* taxonômico.

Os resultados das análises de similaridades moleculares obtidos neste estudo e da descrição do canto de anúncio de *S. dolloi* da Serra da Mantiqueira, Alto do Maringa, RJ (localidade-tipo) (SANTOS *et al.* no prelo) mostram claramente que *S. perereca* pode ser distinguida desta espécie. Talvez as populações identificadas nos trabalhos a seguir (Canelas & Bertoluci, 2007; Galdino *et al.* 2008; Bertoluci *et al.* 2009; Cruz *et al.* 2009; Pezutti *et al.* 2011; Moura *et al.* 2012; Pirani *et al.* 2013; Pimenta *et al.* 2014), tenham se referido como *S. aff. perereca* os espécimes de localidades do Estado de Minas Gerais, os quais podem representar a extensão geográfica de populações de *S. dolloi*.

As informações geradas nesta pesquisa, até o momento, revelaram caracteres taxonômicos importantes na diagnose da espécie *S. perereca*: comprimento-rostro-cloacal (CRC), frequência dominante (FD), duração do canto (DC), número de pulsos (NP), coloração corpórea (CCD) e das manchas ocultas entre o corpo e os membros (MAX, MFM, MIG, MTB), presença de manchas (MCF, MTR, MLB) e faixas (FRU, FUM, FFM, FTB, FPM, FPT) no dorso do corpo e dos membros, e presença de faixas longitudinais nas laterais da cabeça (FRT).

7. CONCLUSÕES

- As populações de *Scinax perereca* da localidade-tipo, Ribeirão Branco, São Paulo, apresentam tamanho corpóreo médio em comparação as outras populações. O canto de anúncio têm frequências mínima, máxima e dominante mais baixas em relação as outras populações.
- Estruturas morfológicas contribuem pouco para diferenciar as populações desta espécie. As colorações do corpo e das manchas ocultas entre o corpo e os membros mostram ser informações taxonômicas importantes para diferenciar as populações. Existem grandes variações de morfometria, bioacústica e nas sequências moleculares do COI.
- As populações de *S. perereca* classificadas neste estudo como *S. cf. hayii* precisam serem melhor investigadas.
- A distribuição das populações desta espécie no Estado de São Paulo está restrita, até o momento, a localidade-tipo, Ribeirão Branco, SP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRETTI, L. & FLYNN, M.N. 2012. Levantamento secundário do estado atual da herpetofauna na região de Sorocaba, SP. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 5(2):122-134.
- ALMEIDA, A.P. & ÂNGULO, A. 2006. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the state of Espírito Santo, Brazil, with remarks on the systematics of associated populations. *Zootaxa*. 1334: 1-25.
- ALMEIDA, C.G., CARDOSO, A.J. 1985. Variabilidade em medidas dos espermatozoides de *Hyla fuscovaria* (Amphibia, Anura) e seu significado taxonômico. *Rev. Bras. Biol.* (45): 387-391.
- ANDRADE, G.V. & A.J. CARDOSO. 1987. Reconhecimento do grupo rizibilis: descrição de uma nova espécie de *Hyla* (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia*. 3(7): 433-440.
- ÂNGULO, A. & ICOCHEA, J. 2003. *Adenomera* cf. *andreae* (NCN). Vocalization. *Herpetological Review*. 34: 47-48.
- ÂNGULO, A. & REICHLE, S. 2008. Acoustics signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 152: 59-77.
- ÂNGULO, A. CROCOFT, R.B.E. & REICHLE, S. 2003. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetological*. 59(4): 490-504.
- ARAUJO, C.O., MATSUKUMA, C.K. & AMEIDA-SANTOS, S.M. Composição taxonômica e distribuição de anuros no Alto e Médio Paranapanema, Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*. 13(3):241-258.
- AUSTIN, J.D., LOUGHEED, S.C., TANNER, K., CHEK, A.A., BOGART, J.P. & BOAG, P.T. 2002. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 134: 335-346.
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- AVISE, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2ª ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- AVISE, J.C. & BALL, M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7: 45-67.
- BALDISSERA-Jr., F.A., OLIVEIRA, P.S.L. & KASAHARA, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* speies (Amphibia: Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Re. Brasil. Genet.* 16(2): 335-345.
- BEE, M.A., KOZICH, C.E., BLACKWELL, K.J. & GERHARDT, H. 2001. Individual variation in advertisement calls of territorial male Green Frogs, *Rana clamitans*: implications for individual discrimination. *Ethology*. (107): 65-84.
- BERNARDE, P.S. & ANJOS, L. 1999. Distribuição especial e temporal da anurofauna no Parque Estadual Mata dos Godoy, Lodrina, Paraná, Brasil (Amphibia: Anura) *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool.* (12): 127-140.
- BERNARDE, P.S. & KOKUBUM, M.N.C. 1999. Anurofauna do município de Guararapes, Estado de São Paulo, Brasil (Amphibia: Anura). *Acta Biologica Leopoldensia* 21(1): 89-97.

- BERNARDE, P.S. & MACHADO, R.A. 2000. Riqueza de espécies, ambientes de reprodução e temporada de vocalização da anurofauna em Três Barras do Paraná, Brasil (Amphibia: Anura). *Cuad. Herpetol.* 14(2): 93-104.
- BERTOLUCI, J., CANELAS, M.A.S., EISEMBERG, C.C., PALMUTI, C.F.S. & MONTIGELLI, G.G. 2009. Herpetofauna da Estação Ambiental de Peti um fragment de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*. 9(1): 147-155.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K. INGRAM, K.K. & DAS, I. 2007. Cryptics species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22: 148-155.
- BLAXTER, M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (359): 669–679.
- BOGERT, C.M. 1960. The influence of song on the behavior of amphibians and reptiles. *In: Lanyon, W.E. & Tavolga, W.N. (eds.). Animals Sounds and Communication. American Institute of Biological Sciences, Washington, DC.* 137-320.
- BOKERMANN, W.C.A. 1962. Notas sobre três espécies de *Physalaemus* (Amphibia, Salientia, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro*. 34(4): 563-568.
- BOKERMANN, W.C.A. 1964. Uma nova espécie de “*Hyla*” da serra do mar em São Paulo. *Rev. Bras. Biol.* 24(4): 429–434.
- BOKERMANN, W.C.A. 1966. Dos nuevas espécies de *Physalaemus* de Espiritu Santo, Brasil. (Amphibia, Leptodactylidae). *Physis, Buenos Aires*. 26(71): 193-202.
- BOKERMANN, W.C.A. 1967. Dos nuevas especies de *Hyla* del grupo *catharinae*. *Neotropica*. 13(41): 61–66.
- BRASSALOTI, R.A. ROSSA-FERES, D.C. & BERTOLUCI, J. 2010. Anurofauna da Floresta Semidecidual da Estação Ecológica dos Caeteus, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*. (10)1: 1-17.
- BRUSQUETTI, F., JANSEN, M., BARRIO-AMORÓS, C., SEGALLA, M. & HADDAD, C.F.B. 2014. Taxonomic review of *Scinax fuscomarginatus* (Lutz, 1925) and related species (Anura: Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 171: 783-821.
- CANELAS, M.A.S. & BERTOLUCI, J. 2007. Anurans of the Serra do Caraça, Southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. *Iheringia, Série Zoologia*. 97(1): 21-26.
- CARAMASCHI, U. 2004. The Gender of the Genus *Scinax* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Herpetological Review*. (35): 27-31.
- CARAMASCHI, U. 2013. The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae). *Zootaxa, Magnolia Press*. (2): 299-300.
- CARNEIRO, M.C.L., MAGALHÃES, P.S. & JUNCÁ, F.A. 2004. Descrição do girino e vocalização de *Scinax pachycrus* (Miranda-Ribeiro, 1937) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*. 62(3): 241-246.
- CHEK, A.A., LOUGHEED, S.C., BOGART, J.P., BOAG, P.T. 2001. Perception and history:molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* Anura: Hylidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18: 370–385.
- COCHRAN, D.M. 1952. Two brazilian frogs: *Hyla werneri*, n. nom., and *Hyla similis*, n. sp.. *J. Washington Acad. Sci.* 42(2): 50–53.
- COCHRAN, D.M. 1955. Frogs of southeastern Brazil. *Bull. U.S. Natl. Mus.* (206): 1–423.

- COCHRAN, D.M., & GOIN, C.J. 1970. Frogs of Colombia. United States National Museum Bulletin. (288): 1-655.
- COCROFT, R.B. & RYAN, M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*. (49): 283-303.
- CONDEZ, T.H., SAWAYA, R.J. & DIXO, M. 2009. Herpetofauna dos remanescentes de Mata Atlântica da região de Tapiraí e Piedade, SP, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*. (9)1:1-29.
- CONTE, C.E. & MACHADO, R.A. 2005. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia: Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22(4): 940-948.
- CONTE, C.E. & ROSSA-FERES, D.C. 2006. Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 23(1):162-175.
- CONTE, C.E. & ROSSA-FERES, D.C. 2007. Riqueza e distribuição espaçotemporal de anuros em um remanescente de Floresta de Araucária no sudeste do Paraná. *Rev. Bras. Zool.* 24(4):1025-1037.
- COPE, E.D. 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia Salientia, *Nat. Hist. Ver.* 5:97-120.
- CRAWFORD, A.J., CRUZ, C., GRIFFITH, E., ROSS, H., IBÁÑEZ, R., LIPS, K.R., DRISKELL, A.C., BERMINGHAM, E. & CRUMP, P. 2012. DNA barcoding applied to *ex situ* tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Mol. Ecol. Resources*. (12): 1-14.
- CRUMP, M.L. & SCOTT Jr. N.J. 1994. Visual Encounter Surveys. In HEYER, W.R., DONNELLY, M.A., McDIARMID, R.W., HAYEK, L.C. & FOSTER, M.S. (Eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity - Standard Methods for Amphibians*. Washington D.C, Smithsonian Institution Press, 364p.
- CRUZ, C.A.G., FEIO, R.N. & CARAMASCHI, U. 2009. Anfíbios do Ibitipoca. Belo Horizonte: Bicho do Mato Editora, 132p.
- DAVIS, J.I. & NIXON, K.C. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitations of phylogenetic species. *Systematic Biology*. 41(4):421-435.
- DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85: 407-415.
- DE LA RIVA, I., R. MÁRQUEZ & J. BOSCH. 1995. Advertisement calls of eight bolivian hylids (Amphibia, Anura). *J. Herpetol.*, 29(1): 113-118.
- DE LA RIVA, I., MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. 1996a. The advertisement calls of three South American poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae), with comments on their taxonomy and distribution. *Journal of Natural History*. (30): 1413-1420.
- DE LA RIVA, I., MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. 1996 b. Advertisement calls of microhylid frogs from Bolívia (amphibia, Anura). *Am. Midl. Nat.* (136): 418-422.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concept and species delimitation. *Systematic Biology*. 56(6): 879-886.
- DUELLMAN, W.E. 1970. The hylids frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas (1): 1-753.
- DUELLMAN, W.E. 1972. A review of the neotropical frogs of the *Hyla bogotensis* group. Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas. (11): 1-31.
- DUELLMAN, W.E. 2001. The Hylid Frogs of Middle America. Ithaca, New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1180p.

- DUELLMAN, W.E. & MARION, A.B. & HEDGES, S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). Monograph. Zootaxa, Magnolia Press. 4104(1): 1-9.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. 1994. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill, 670p.
- DUELLMAN, W.E. & WIENS, J.J. 1992. The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas. (151): 1-23.
- DUNN, E.R. 1933. A new *Hyla* from the Panama Canal Zone. Occ. Pap. Boston Soc. Nat. Hist. (8): 61-64.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A. & WHEELER, W.C. 2005. Systematic review of the frog family, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin of the American Museum of Natural History. (294): 1-240.
- FAIVOVICH, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). Cladistics (18): 367-393.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution (39): 783-791.
- FONTE, L.F.M. 2010. Variação morfológica e na estrutura do canto em *Scinax granulatus* (Peters, 1871) (Anura: Hylidae). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 76p.
- FORTI, L.R. 2009. Temporada reprodutiva, micro-habitat e turno de vocalização de anfíbios anuros em lagoa de Floresta Atlântica, no sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Zoociências. 11(1): 89-98.
- FOUQUET, A., VENCES, M., SALDUCCI, M.D., MARTY, C., BLANC, M. & GILLES, A. 2006. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. Molecular Phylogenetics and Evolution, Elsevier. 43: 567-582.
- FRANCISCO, M.R., GIBBS, H.L., GALETTI, M. LUNARDI, V.O. & GALETTI-Jr., P.M. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding Bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic forest. Mol. Ecol. (16): 4908-4918.
- FROST, D. R. 2017. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5. Electronic Database. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: 04 de Janeiro, 2017.
- FROST, D.R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C.F.B., DE SÁ, R.O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S.C., RAXWORTHY, C.J., CAMPBELL, J.A., BLOTTO, B.L., MOLER, P., DREWES, R.C., NUSSBAUM, R.A., LYNCH, J.D., GREEN. D.M. & WHEELER. W.C. 2006. The Amphibian tree of life. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. (297): 1-370.
- FUNK, W.C., CAMINER, M., SANTIAGO R. & RON, S.R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. Proc. R. Soc. B. 279: 1806-1814. GARCIA, P.C.A. & VINCIPROVA, G. 1998. Range extensions of some anuran species for Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, Brazil. Herpetological Review. (29): 117-118.
- GALDINO, C.A.B., CARVALHO Jr., R.R., NORONHA-E-MENEZES, M.A.V. & NASCIMENTO, L.B. 2008. Habitat use by a tree frog species of *Scinax* (Amphibia, Hylidae) at an urban forest fragment from South-eastern Brazil. Iheringia, Série Zoologia. 98(3): 412-415.

- GARCIA, P.C.A. & VINCIPROVA, G. 1998. Range extensions of some anuran species for Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, Brazil. *Herpetological Review*, 29, 117- 118.
- GAREY, M.V. & HARTMANN, M.T. 2012. Anuros da Reserva Natural Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* 12(4): 137-145.
- GERHARDT, H.C. 1991. Female choice in treefrogs: Static and dynamic acoustic criteria. *Anim Behav.* (42):615–636.
- GERHARDT, H.C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Ann. Rev. Syst.* (25): 293-324.
- GERHARDT, H.C. & HUBER, F. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans: common problems and diverse solutions*. The University of Chicago press, Chicago, 531p.
- GRANT, T., FROST, D.R., CALDWELL, J.P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C.F.B., KOK, P.J.R., MEANS, D.B., NOONAN, B.P., SCHARGEL, W.E. & WHEELER, W.C. 2006: Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* (269): 1-262.
- GÜNTHER, G.A. 1858. Catalogue of the batrachia salientia in the collection of the British Museum, 160pp. 12pls.
- HADDAD, C.F.B. & POMBAL Jr., J.P. 1987. *Hyla hiemalis*, nova espécie do grupo *rizibilis* do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Biol.* 47(1/2): 127–132.
- HADDAD, C.F.B. & POMBAL Jr., J.P. 1998. Redescription of *Physalaemus spiniger* (Anura: Leptodactylidae) and description of two new reproductive modes. *Journal of Herpetology*, Lawrence. 32(4): 557-565.
- HADDAD, C.F.B. & SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. p 188-211. In: Morellato, L. P. C. (Org.). *História natural da Serra do Japi. Ecologia e Preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Editora da UNICAMP.
- 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 biológica*. São Paulo: Anolisbooks, 2ed. 544p.
- HAJIBABAEI, M., DeWAARD, J.R., IVANOVA, N.V., RATNASINGHAM, S., DOOH, R.T., KIRK, S.L., MACKIE, P.M. and HEBERT, P.D.N. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (360): 1959–1967.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., SHELLEY, L.B. & WAARD, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (270): 313–321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & WAARD, J. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (270): S96–S99.
- HEBERT, P.D.N., STOECKLE, M.Y., ZEMLAK, T.S. & FRANCIS, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* (2): 1-6.
- HEYER, W. R. 1974. Systematics of the pentadactylus speciels group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). Series: Smithsonian Institution. Smithsonian contributions to zoology, n. 301.
- HEYER, W.R., GARCIA-LOPEZ, J.M. & CARDOSO, A.J. 1996. Advertisement call variation in the *Leptodactylus mystaceus* species complex (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new sibling species. *Amphibia-Reptilia*, Leiden. 17(1): 7-31.

- HEYER, W.R., RAND, A.S., CRUZ, C.A.G., PEIXOTO, O.L. & NELSON, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* (31): 231-410.
- HEYER, W.R. & REID, Y.R. 2003. Does advertisement call variation coincide with genetic variation in the genetically diverse frog taxon currently known as *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Leptodactylidae)? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 75: 39-54.
- HOTELLING, H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into Principal Components. *Journal of Educational Psychology*, 24(6 & 7): 417-441 & 498-520.
- JEONG, T.J., JUN, J., HAN, S., KIM, H.T., OH, K. & KWAK, M. 2013. DNA Barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12055.
- JUNCÁ, F.A., NAPOLI, M.F., NUNES, I., MERCÊS, E.A. & ABREU, R.O. 2015. A new species of the *Scinax ruber* clade (Anura, Hylidae) from the Espinhaço Range, northeastern Brazil. *Herpetologica*. 71(4): 299-309.
- KERR, K.C.R., STOECKLE, M.Y., DOVE, C.J., WEIGT, L.A., FRANCIS, C.F. & HEBERT, P.D.N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Resources*. (7): 535-543.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* (16): 111-120.
- KÖHLER, J. & BÖHME W. 1996. Anuran amphibians from the region of Pre-Cambrian rock outcrops (inselbergs) in northeastern Bolivia, with a note on the gender of *Scinax* Wagler, 1830 (Hylidae). *Revue Française d'Aquariologie et Herpétologie*. (23): 133-140.
- KWET, A. 2001a. Frösche im Brasilianischen Araukarienwald. Anurengemeinschaft des Araukarienwaldes von Rio Grande do Sul: Diversität, Reproduktion und Ressourcenaufteilung. Münster. Natur und Tier Verlag. 192p.
- KWET, A. 2001b. Südbrasilianische Laubfrösche der Gattung *Scinax* mit Bemerkungen zum Geschlecht des Gattungsnamens und zum taxonomischen Status von *Hyla granulata* Peters, 1871. *Salamandra*. 37(4): 211-238.
- KWET, A. 2007. Bioacoustic variation in the genus *Adenomera* in Southern Brazil, with revalidation of *Leptodactylus nanus* Müller, 1922 (Anura: Leptodactylidae). *Mittie Museum für Natarkunde Berlin, Zoologie, Reihe*. 83(Supplement): 56-68.
- KWET, A. & ÂNGULO, A. 2002. A new species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) from the araucaria forest of Rio Grande do Sul (Brazil), with comments on the systematics status of Southern populations of the genus. *Alyhtes*. 20: 28-43.
- KWET, A. & DI-BERNARDO, M. 1999. Pró-mata-anfíbios. *Amphibien. Amphibians*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- KWET, A. & LINGNAU, R. DI-BERNARDO, M. 2010. Pró-mata-anfíbios. *Amphibien. Amphibians*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2ed.148p.
- LEMA, T. & MARTINS, L.A. 2011. Anfíbios do Rio Grande do Sul: catálogo, diagnoses, distribuição, iconografia. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS. 196p.
- LÉON, J.R. 1969. The systematic of the frogs of the *Hyla rubra* group in Middle America. *Museum of Natural History*. (18):505-545.
- LIMA, L.P., BASTOS, R.P. & GIARETTA, A.A. 2004. A new *Scinax* Wagler, 1830 of the *S. rostratus* group from central Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*.
- LINGNAU, R. 2009. Distribuição temporal, atividade reprodutiva e vocalizações em uma assembleia de anfíbios anuros de uma Floresta Ombrófila Mista em Santa

- Catarina, sul do brasil. Porto Alegre. PUCRS, Faculdade de Biociências (Tese de Doutorado), 103p.
- LITTLEJOHN, M.J. 1977. Long range acoustic communication in anurans: an integrated and evolutionary approach. *In*: Taylor, D.H. & Guttman, S.I. (eds.). The reproductive biology of the anurans: contemporary research in major problems. University of Missouri Press, Columbia. 263-294.
- LITTLEJOHN, M.J. 2001. Patterns of differentiation in temporal properties of acoustic signals of anurans. *In*: Ryan, M.J. (Ed.). Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington, 102-120pp.
- LUCAS, E.M. & MAROCCO, J.C. 2011. Anurofauna (Amphibia, Anura) em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biota Neotropica* 11(1): 377-384.
- LUTZ, B. 1951. Nota prévia sobre alguns anfíbios anuros do alto Itatiaia. *O Hospital* 39. (5): 705-707.
- LUTZ, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. Austin. University of Texas Press. 260p.
- JEONG, T.J., JUN, J., HAN, S., KIM, H.T., OH, K. & KWAK, M. 2013. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Mol. Ecol. Resources*. (13): 1-14.
- MACHADO, R.A., BERNARDE, P.S., MORATO, S.A.A. & ANJOS, L. 1999. Análise comparada da riqueza de anuros entre duas áreas com diferentes estados de conservação no Município de Londrina, Paraná, Brasil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.* 16(4): 997-1004.
- MARKMANN, M. & TAUTZ, D. 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (360): 1917-1924.
- MARTINS, I.A. & JIM, J. 2003. Bioacoustic analysis of advertisement call in *Hyla nana* and *Hyla sanborni* in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 63(3): 507-516.
- MARTINS, I.A. & JIM, J. 2004. Advertisement Call of the *Hyla jimi* and *Hyla elianeae* (Anura, Hylidae) in Botucatu Region, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B): 645-654.
- MÁRQUEZ, R., DE LA RIVA, I. & BOSCH, J. 1993. Advertisement call of Bolivian species of *Hyla* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica* 25(4): 426-443.
- MONAGHAM, M.T., BALKE, M., GREGORY, T.R. & VOGLER, A.P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, (275): 237-247.
- MOURA, M.R., MOTTA, A.P., FERNANDES, V.D. & FEIO, R.N. 2012. Herpetofauna da Serra do Brigadeiro, um remanescente de Mata Atlântica em Minas Gerais, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*. 12(1): 1-27.
- NAPOLI, M.F. 2000. Taxonomia, variação morfológica e distribuição geográfica das espécies do grupo de *Hyla circumdata* (Cope, 1870) (Amphibia, Anura: Hylidae). Rio de Janeiro. UFRJ, Museu Nacional (Tese de Doutorado), 208p.
- NARINS, P.M., FENG, S.A., FAY, R.R. & POPPER, A.N. 2007. Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York.
- NOGUEIRA, L., SOLÉ, M., SIQUEIRA, S., AFFONSO, P.R.A.M., STRÜSSMANN, C. & SAMPAIO, I. 2016. Genetic analysis reveals candidate species in the *Scinax catharinae* clade (Amphibia: Anura) from Central Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 39(1): 49-53.

- NUNES, I. & POMBAL Jr., J.P. 2010. A new *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) from the atlantic rain forest of southern state of Bahia, North-eastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 31: 347-353.
- NUNES, I. & POMBAL Jr., J.P. 2011. A new snouted treefrog of the speciose genus *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) from northeastern Brazil. *Herpetologica*. 67(1): 80-88.
- NUNES, I., CARVALHO Jr., R.R. & PEREIRA, E.G. 2010. A new species of *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) from Cerrado of Brazil. *Zootaxa*. 2514: 24-34.
- NUNES, I., SANTIAGO, R.S. & JUNCÁ, F.A. 2007. Advertisement call of four hylid frogs from state of Bahia, northeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae).
- NUNES, I., KWET, A. & POMBAL, J.P. Jr. 2012. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). *Copeia*. (3): 554–569.
- NOBLE, G.K. 1922. The phylogeny of the Salientia. I. The osteology and the thigh musculature; their bearing on classification and phylogeny. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 46:1-87.
- PADIAL, J.M., CASTROVIEJO-FISHER, S., KÖHLER, J., VILÀ, C., CHAPARRO, J.C. & DE LA RIVA I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*. (38): 431-447.
- PADIAL, J.M. & DE LA RIVA, I. 2009. Integrative reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155: 97-122.
- PADIAL, J. M., MIRALLES, A., DE LA RIVA I. & VENCES, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. (7): 1-14.
- PEARSON, K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*. (2):559-572.
- PFENNINGER, M. & SCHWENK, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 121.
- PEIXOTO, O.L. 1986. Espécies bromelígenas do gênero *Ololygon*: o grupo “perpusilla” (Amphibia, Anura, Hylidae). Ph.D. Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- PEIXOTO, O.L. 1987. Caracterização do grupo “perpusilla” e revalidação da posição taxonômica de *Ololygon perpusilla perpusilla* e *Ololygon perpusilla v-signata*. (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio J.* 10(1-2): 37–49.
- PEZZUTI, T.L., LEITE, F.S.F., GARCIA, P.C.A. & PAPROCKI, H. 2011. Chave de identificação interativa para os girinos do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, sudeste do Brasil: uma ferramenta para conservação. In: Pezzuti, T.L. Girinos do Quadrilátero Ferrífero, sudeste Brasil: ecomorfologia e chave de identificação interativa. Belo Horizonte: UFMG (Dissertação de Mestrado), 201p.
- PIMENTA, B., COSTA, D., MURTA-FONSECA, R. & PEZZUTI, T. 2014. Anfíbios: Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim: Minas Gerais. Belo Horizonte: Bicho do Mato, 196p.
- PIRANI, R.M., NASCIMENTO, L.B. & FEIO, R.N. 2013. Anurans in a forest remnant in the transition zone between Cerrado and Atlantic Rain Forest domains in Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85(3): 1093-1104.
- POMBAL Jr., J.P. 2010. O espaço acústico em uma taxocenose de anuros (Amphibia) do sudeste do Brasil. Rio de Janeiro: Arquivos do Museu Nacional 68(1-2)135-144.
- POMBAL Jr., J.P. & BASTOS, R.P. 1996. Nova espécie de *Scinax* Wagler, 1830 do Brasil central (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro, N.S., Zool.* (371): 1–11.

- POMBAL Jr., J.P. & BASTOS, R.P. 2003. Vocalizações de *Scinax perpusillus* (A. Lutz & B. Lutz) e *S. arduous* Peixoto (Anura, Hylidae), com comentários taxonômicos.
- POMBAL Jr., J.P. & GORDO, M. 1991. Duas novas espécies de *Hyla* da floresta atlântica no estado de São Paulo (Amphibia, Anura). Mem. Inst. Butantan. 53(1): 135–144.
- POMBAL Jr., J.P., HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. 1995a. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. Journal of Herpetology. (29): 1–6.
- POMBAL Jr., J.P., BASTOS, R.P. & HADDAD, C.F.B. 1995b. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. Naturalia (20): 213–225.
- POMBAL Jr., J.P., CARVALHO Jr., R.R., CANELAS, M.A.S. & BASTOS, R.P. 2010. A new *Scinax* of the *S. catharinae* group from Cerrado Brazil (Amphibia: Anura: Hylidae). Zoologia. 27(5): 795–802.
- POMBAL Jr., J.P., BILATE, M., GAMBALE, P.G., SIGNORELLI, L. & BASTOS, R.P. 2011. A new miniature treefrog of the *Scinax ruber* clade from the Cerrado of central Brazil (Anura: Hylidae). Herpetologica 67(3): 288–299.
- PUGLIESE, A., POMBAL Jr., J.P. & SAZIMA, I. 2004. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from rocky montane fields of the Serra do Cipó, southeastern Brazil. Zootaxa. 688: 1–15.
- PUGLIESE, A., BAÊTA, D. & POMBAL Jr., J.P. 2009. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from rocky montane fields in southeastern and central Brazil. Zootaxa. 2269: 53–64.
- PYRON, R.A. & WIENS, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Mol. Phylogenet. Evol. (61): 543–583.
- RACH, J., DeSALLE, R., SARKAR, I.N., SCHIERWATER, B. & HADRYN, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. Proc. R. Soc. B. (275): 237–247.
- RIBEIRO, R.S., EGITO, G.T.B.T. & HADDAD, C.F.B. 2005. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. Bioneotropicalia. 5(2): 1–15.
- ROE, A.D. & SPERLING, F.A.H. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. Mol. Phylogenet. Evol. (44): 325–345.
- RON, S.R., SANTOS, J.C. & CANNATELLA, D.C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 39: 392–403.
- RUBINOFF, D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv. Biol. (4): 1026–1033.
- RYAN, M.J. 2001. Anuran communication. Smithsonian Institution Press, Washington, London, 252p.
- SAITO, E.N. 2013. Características ecológicas dos anuros ameaçados de extinção na Floresta Atlântica subtropical do Brasil. Florianópolis: UFSC, Departamento de Ecologia e Zoologia (Dissertação de Mestrado), 88p.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees Mol. Biol. Evol. (4): 406–425.
- SANTOS, L.R. 2015. Análises morfológicas e bioacústicas em populações de *Scinax hayii* (Barbour, 1999) (Anura: Hylidae) ao longo da Mata Atlântica. Dissertação de

- Mestrado. São José do Rio Preto, SP: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 109p.
- SANTOS, E.J. & CONTE, C.E. 2014. Riqueza e distribuição temporal de anuros (Amphibia: Anura) em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista. Porto Alegre, RS: Iheringia, Série Zoologia. 104(3):323-333.
- SITES, J.W. & MARSHALL, J.C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematicbiology. Trends in Ecology and Evolution. 18: 462-470
- SMITH, M.A., POYARKOV, N.A. & HEBERT, P.D.N. 2008a. COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Mol. Ecol. Notes (8): 235–246.
- SMITH, M.A., RODRIGUEZ, J.J., WHITFIELD, J.B., DEANS, A.R., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. 2008b. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (34): 12359-12364.
- SMITH, M.A., WOODLEY, N.E., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (103): 3652-3657
- STOECKLE, M.Y. & HERBERT, P.D.N. 2008. Barcode of Life. Scientific American, INC, 82-88.
- STUART, B.L., INGER, R.F. & VORIS, H.K., 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. Biol. Lett. 2: 470–474.
- TAYLOR, A.C., SHERWIN, W.B. & WAYNE, R.K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. Mol. Ecol. (3): 277-290.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. (24): 1596-1599.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673–4680.
- TOLEDO, L.F. & HADDAD, C.F.B. 2005. Acoustic repertoire and calling site of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae). Journal of Herpetology, 39(3): 455-464.
- TOLEDO, L.F., MARTINS, I.A. BRUSCHI, D.P., PASSOS, M.A., ALEXANDRE, C. & HADDAD, C.F.B. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. ACTA Etol. DOI 10.1007/s10211-014-0194-4
- TONIAZZO, F. LINGNAU, R. & BORELLI, I. 2012. Inventário de anuros ocorrentes no sudoeste do Paraná. SICITE XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia da UTRPR.
- TOREZAN, J.M.D. (org.). 2006. Ecologia do Parque Estadual dos Godoy. Londrina, PR: Itedes. 169p.
- TORMAN, V.B.L., COSTER, R. & RIBOLDI, J. 2012. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. HCPA. 32(2): 227-234.
- VANZOLINI, P.E. 1977. An annotated bibliography of the land and fresh-water Reptiles of South America (1758-1975) Volume I (1758-1900). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 186p.

- VANZOLINI, P.E. 1993. Métodos estatísticos elementares em sistemática zoológica. Editora Hucitec, São Paulo, 130p.
- VENCES, M., NAGY, Z.T., SONET, G. & VERHEYEN, E. 2012. DNA barcoding amphibians and reptiles. Pp.79-107 in Kress, W.J. & Erickson, D.L. (eds.) DNA barcodes: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 858: DOI 10.1007/978-1-61779-591-6_5, ©Springer Science Business Media, LLC.
- VENCES, M., THOMAS, M., van der MEIJDEN, A., CHIARI, Y. & VIEITES, D.R. 2005a. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. (2): 5.
- VENCES, M., THOMAS, M., BONETT, R.M., & VIEITES, D.R. 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc.* (360): 1859-1868.
- VIELLIARD, J.M.E. 1987. A diversidade de sinais e sistemas de comunicação sonora na fauna brasileira. I Seminário Musica Ciência Tecnologia: Acústica Musical, p.145-152
- VOLPATO, G. & BARRETO, R.E. 2011. Estatística sem dor. Botucatu: Best Writing. 64p.
- WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. & HEBERT, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (360): 1847-1857.
- WEBER, L.N., GONZAGA, L.P. & CARVALHO-E-SILVA. 2005. A new species of *Physalaemus* Fitzinger, 1826 from the lowland atlantic forest of Rio de Janeiro State, Brazil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*. 63(4): 677-684.
- WEBER, L.I., HILDEBRAND, A.F., PEDRASSI, G., LEVY, A. & COLARES, E.P. 2008. Microsatellite genotyping from faeces in the Neotropical river otter, *Lontra longicaudis* from the south of Brazil. *Iheringia Sér. Zool.*
- WELLS, K.D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim. Behav.* (25): 666-693.
- WELLS, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago. 1148p.
- WIENS, J.J., KUCZYNSKI, C.A., HUA, X. & MOEN, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (55): 871-882.
- WILL, K.W., MISHLER, B.D. & WHEELER, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* (54): 844-851.
- XIA, Y., GU, H-F., PENG, R., CHEN, Q., ZHENG, Y-C., MURPHY, R. W. & ZENG, X-M. 2012. COI is better the 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia, Caudata: Hynobiidae). *Mol. Ecol. Notes*. (12): 48-56.
- ZIMMERMAN, B.L. 1994. Audio strip transects. In: HEYER, W.R. Measuring and monitoring biological diversity - standard methods for Amphibians. Smithsonian Inst. Press, Washington, 92-96 pp.

APÊNDICE 1
Espécimes analisados de *Scinax perereca*

BRASIL: **SÃO PAULO:** Apiaí e Iporanga (CFBH 25623, 25694, 26720, 26753, 26828, 26829); Barra do Turvo (CFBH 6346); Guapiara (CFBH 13452-53); Iguape (CFBH 19151-53; ZUEC 9756, 9810, 9819, 17367); Ilhabela (CCLZU 3230-35, 3246-48; CFBH 12319, 15238-58, 40136-42); Peruíbe (CCLZU 3237-45; CFBH 40143-48); Piedade (CFBH 23295); Pilar do Sul (CFBH 8350, 8928-29); Ribeirão Branco (CCLZU 3227-29; CFBH 1827-29, 2141, 6837, 8054, 40133-35 topótipos; ZUEC 9179, 9183-87 série-tipo); Tapiraí (CFBH 16551). **PARANÁ:** Araucária (CHUFSC 2459); Fazenda Rio Grande (DZSJRP 8846, 8848, 13309-10, 13517); General Carneiro (DZSJRP 13038, 13090, 13181); Morretes (CCLZU 3219-26; CFBH 40149-53); Pirai do Sul (DZSJRP 14059); Ponta Grossa (DZSJRP 14029, 14043-44, 14074); Rio Negro (DZSJRP 13449); São José dos Pinhais (DZSJRP 6305, 6321, 13435); Tijucas do Sul (DZSJRP 8670-73); União da Vitória (MCP 8512-13). **SANTA CATARINA:** Águas Mornas (MCP 8168-69); Anita Garibaldi (CHUFSC 1380); Anitápolis (CHUFSC 248-50, 1644, 1646); Brunópolis (CHUFSC 1400); Campo Belo do Sul (UFRGS 4112-14); Canoinhas (MCP 8504, 8509); Chapecó (CHUFSC 1651); Florianópolis (CCLZU 3206-18; CFBH 40154-59; CHUFSC 2426-27; MCP 6370, 7677, 7710-11, 8236). Ibirama (UFRGS 4362); Irani (CHUFSC 1444); Itapema (UFRGS 1503); Jaraguá do Sul (MCP 1481); Lebon Régis (9605-06, 9608, 9612-14, 9616, 9623-24, 9626-27, 9630); Ponte Serrada (DZSJRP 13015, 13223-24, 13535-36); Porto Belo (CHUFSC 2832-35, 2864); Porto União (MCP 8510); Praia Grande (CCLZU 3281-84; CFBH 40160-64; CHUFSC 2281); Rio das Furnas (CHUFSC 1198); São Bento do Sul (UFRGS 3480); Tangará (CHUFSC 1360); Vargem Bonita (DZSJRP 13023, 13153, 13307, 13394, 13486, 13489, 13504). **RIO GRANDE DO SUL:** Bom Jesus (UFRGS 3315); Cambará do Sul (CFBH 40166-67; MCP 3326; UFRGS 1844); Derrubadas (MCP 2515, 2525, 3460; UFRGS 2175); Itaiti (UFRGS 2321, 2332, 2390); Planalto (UFRGS 1455); São Francisco de Paula (MCP 2423-24, 2426-31, 3184-85, 3451-52, 3459, 3462, 3474, 3476; UFRGS 2033); Terra de Areia (MCP 3323, 4047; UFRGS 1719, 1752, 1993).

APÊNDICE 2
Cantos de anúncio analisados de *Scinax perereca*

ID Canto	Voucher	País	UF	Município	Data	Temp. Ar
PHS04MO	CCLZU3219	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS05MO	CCLZU3220	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS06MO	CCLZU3221	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS13MO	CCLZU3224	Brasil	PR	Morretes	26/11/2015	23 °C
PHS01MO	CFBH40149	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS02MO	CFBH40150	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS03MO	CFBH40151	Brasil	PR	Morretes	25/11/2015	23 °C
PHS10MO	CFBH40152	Brasil	PR	Morretes	26/11/2015	23 °C
PHS11MO	CFBH40153	Brasil	PR	Morretes	26/11/2015	23 °C
PHS01CS	CFBH40166	Brasil	RS	Cambará do Sul	04/02/2016	17,5 °C
PHS02CS	CFBH40167	Brasil	RS	Cambará do Sul	05/02/2016	18°C
PHS07FP	CCLZU3208	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS08FP	CCLZU3209	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS09FP	CCLZU3210	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS01FP	CFBH40154	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS02FP	CFBH40155	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS03FP	CFBH40156	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS04FP	CFBH40157	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS05FP	CFBH40158	Brasil	SC	Florianópolis	22/11/2015	19°C
PHS01PG	CFBH40160	Brasil	SC	Praia Grande	02/02/2016	20°C
PHS03PG	CFBH40161	Brasil	SC	Praia Grande	02/02/2016	20°C
PHS04PG	CFBH40162	Brasil	SC	Praia Grande	03/02/2016	19°C
PHS05PG	CFBH40163	Brasil	SC	Praia Grande	03/02/2016	19°C
PHS06PG	CFBH40164	Brasil	SC	Praia Grande	03/02/2016	19°C
PHS01IB	CFBH40136	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS02IB	CFBH40137	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS03IB	CFBH40138	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS05IB	CFBH40139	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS04IB	CFBH40140	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS06IB	CFBH40141	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS07IB	CFBH40142	Brasil	SP	Ilhabela	13/01/2016	21°C
PHS07PB	CCLZU3236	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS08PB	CCLZU3237	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS09PB	CCLZU3238	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS10PB	CCLZU3239	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS01PB	CFBH40143	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS02PB	CFBH40144	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS03PB	CFBH40145	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS04PB	CFBH40146	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS05PB	CFBH40147	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS06PB	CFBH40149	Brasil	SP	Peruíbe	11/01/2016	21°C
PHS03RB	CCLZU3227	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C
PHS06RB	CCLZU3228	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C

APÊNDICE 2. Continuação

ID	Voucher	País	UF	Município	Data	Temp. do
PHS04RB	CCLZU3229	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C
PHS05RB	CFBH40133	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C
PHS02RB	CFBH40134	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C
PHS01RB	CFBH40135	Brasil	SP	Ribeirão	15/12/2015	20°C