



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Lucas Rodrigo dos Santos

Estudo do complexo de espécies *Scinax hayii* (Barbour, 1909) e *Scinax dolloi*
(Werner, 1903) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica, Brasil

São José do Rio Preto

2020

Lucas Rodrigo dos Santos

Estudo do complexo de espécies *Scinax hayii* (Barbour, 1909) e *Scinax dolloi*
(Werner, 1903) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica, Brasil

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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

Orientador: Prof. Dr. Itamar Alves Martins

São José do Rio Preto

2020

S237e

Santos, Lucas Rodrigo dos

Estudo do complexo de espécies *Scinax hayii* (Barbour, 1909) e *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica, Brasil / Lucas Rodrigo dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2020

168 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Itamar Alves Martins

1. Anuros. 2. Taxonomia. 3. Morfometria. 4. Bioacústica. 5. Gene COI. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lucas Rodrigo dos Santos

Estudo do complexo de espécies *Scinax hayii* (Barbour, 1909) e *Scinax dolloi*
(Werner, 1903) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica, Brasil

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor 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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Itamar Alves Martins

Departamento de Biologia/ Universidade de Taubaté

Orientador

Prof(a). Dr(a). Délio Pontes Baêta da Costa

Departamento de Vertebrados/Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de
Janeiro

Prof(a). Dr(a). Luciana Barreto Nascimento

Departamento de Ciências Biológicas/Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Prof(a). Dr(a). Renato Neves Feio

Departamento de Biologia Animal/Universidade Federal de Viçosa

Prof(a). Dr(a). Renato Christensen Nali

Departamento de Zoologia/Universidade Federal de Juiz de Fora

Taubaté

30 de abril de 2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Itamar Alves Martins pela minha formação profissional. Por toda sua amizade e atenção nesses 11 anos de convivência no Laboratório de zoologia da Universidade de Taubaté. Agradeço pelas lições de vida, por me animar todas as vezes que o caminho parecia estar difícil e por ser exemplo de pessoa e profissional.

À minha esposa e companheira Tatiana Santos por todo cuidado e carinho; por sempre se fazer presente e compreender minha ausência.

Aos meus pais João e Eliana pelo tempo cedido à minha criação e por acreditarem em mim em todos os momentos.

À professora Dra. Mariana L. Lyra pela recepção, ensinamentos e toda ajuda com as análises moleculares executadas no projeto.

Ao Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté e ao Laboratório de Zoologia por toda estrutura cedida para a realização do projeto.

Aos professores Dr. Valter Cobo e Dra. Cecília Toledo pela contribuição e sugestões no exame de qualificação.

Aos colegas do Laboratório de Zoologia (Guilherme, Nicolas, Leonardo, Juliano, Lu, Maysa, Paulo, Lucas e Du) pela ajuda em coletas, em laboratório e pelas discussões sobre ciências e o cotidiano.

Aos professores Valter Cobo e Marisa Cardoso pelos ensinamentos e convivência no Laboratório de Zoologia da UNITAU.

Ao Ibilce e aos funcionários da Seção de Pós-graduação pela sua eficiência e prontidão para esclarecimentos e ajuda nos trâmites.

À Carol Manzano pelos cantos cedidos de *Scinax* da população da Serra do Japi.

Aos professores Dr. Célio F. B. Haddad, Dr. José P. Pombal Jr. pelo empréstimo de espécimes depositados nas coleções sob seus cuidados.

Ao professor Dr. Tiago S. Soares pela ajuda em campo no Espírito Santo e pelos exemplares cedidos de Santa Teresa.

Aos membros da comissão avaliadora de defesa que aceitaram contribuir para a versão final deste manuscrito.

Ao SISBIO pela licença de coleta concedida nº 55374-(1-5).

À FAPESP pelo fomento cedido ao projeto Número de Processo 2018/00694-6.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A escassez de informações, juntamente com a morfologia conservada, dificulta a caracterização e identificação de complexo de espécies do gênero *Scinax* como em *Scinax hayii* e *Scinax dolloi*. Este estudo utilizou a taxonomia integrativa, usando como base a morfologia, morfometria, bioacústica e análises moleculares do gene COI (DNA *Barcoding*) para investigar e caracterizar variações populacionais entre populações de *S. hayii* e *S. dolloi* amostradas na região sudeste do Brasil, nos domínios da Mata Atlântica, buscando elucidar possíveis problemas taxonômicos e determinar a distribuição de cada espécie. Análises do canto de anúncio em populações de *S. hayii* revela uma variação gradativa entre as populações da Serra do Mar e litoral tendo as populações do litoral paulista, canto distinto dos topótipos e de outras populações da Serra do Mar. As análises morfológicas e morfométricas aliadas ao gene COI, revelam que *S. hayii* possui estruturação geográfica e, apesar de possuir populações polimórficas, esse gene ao longo da distribuição de *S. hayii* tem características conservadas. Semelhanças nos parâmetros bioacústicos e moleculares mostram que a população de Castelo no Espírito Santo é similar a topótipos de *S. dolloi*. Diferenças no canto de anúncio, comprimento rostro-cloacal e no gene COI sugerem que populações localizadas no bloco sul da Serra da Mantiqueira representam uma nova espécie.

Palavras-chave: Scinaxinae; Taxonomia; Bioacústica; Morfometria; Gene COI.

ABSTRACT

Scarce information combined with conserved morphology hinder the characterization and identification of *Scinax* complex species, such as *S. hayii* and *S. dolloi*. We used integrative taxonomy, based on morphology, morphometry, bioacoustics and molecular analyzes (COI gene) in order to investigate and characterize population variations between *S. hayii* and *S. dolloi* populations, sampled in Southeastern Brazil, in the Forest Atlantic domains, seeking to elucidate possible taxonomic problems and also to determine the distribution of both species. Advertisement call analysis in *S. hayii* reveals a gradual variation between Serra do Mar mountains and litoral populations. Coastal populations have different calls compared to topotypes and other populations distributed in the mountains. Morphometric and morphological analyzes combined with COI gene reveal that *S. hayii* has a geographic structure, even having polymorphic populations, COI gene throughout the distribution of *S. hayii* shows conserved characteristics. Similarities in bioacoustic and molecular parameters show that Castelo's population in Espírito Santo state is similar to topotypes of *S. dolloi*. Differences in advertisement call, snout vent length and COI gene suggest that populations in the Southern Serra da Mantiqueira represent a new specie.

Keywords: Scinaxinae; Taxonomy; Bioacoustic; Morphometry; Gene COI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Populações amostradas de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi* utilizadas na análise comparativa do canto de anúncio. Siglas dos estados brasileiros (UF): São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES). Populações amostradas: Castelo (CAS) no Espírito Santo. Na Serra do Mar: Petrópolis (PET) localidade tipo de *Scinax hayii*, Bananal (BAN), São Luiz do Paraitinga (SLP), Mogi das Cruzes (MOG), e São Bernardo do Campo (SBC). Populações litorâneas: Mangaratiba (MAN), Paraty (PAR), Ubatuba (UBA), Ilhabela (ILB) e Peruíbe (PER). Na Serra da Mantiqueira: Maringá (MAR) localidade tipo de *S. dolloi*, Itamonte (ITA), Campos do Jordão (CAJ), Santo Antonio do Pinhal (SAP), Camanducaia (CAM) e Jundiaí (JUN).

32

Figura 2 – Oscilograma (acima) e espectrograma (abaixo) do canto de anúncio de diferentes populações de *Scinax hayii*. Temperatura do ar no momento da gravação: Petrópolis (RJ) 17°C, Bananal (SP) 17°C, São Luiz do Paraitinga (SP) 18°C, Mangaratiba (RJ) 22°C, Paraty (RJ) 23°C, Ubatuba (SP) 28°C, Mogi dasCruzes (SP) 17°C, São Bernarndo do Campo (SP) 17°C, Ilhabela (SP) 21°C, Peruíbe (SP) 21°C, Castelo (ES) 19°C.

37

Figura 3 – Oscilograma (acima) e espectrograma (abaixo) do canto de anúncio de *Scinax dolloi* registrado em diferentes localidades. Temperatura do ar: Maringá (RJ) – localidade tipo – 17°C; Itamonte (MG) 12°C; Campos do Jordão (SP) 17°C; Santo Antônio do Pinhal (SP) 16°C; Camanducaia (MG) 17°C; Jundiaí (SP) 17°C.

38

Figura 4 – Análise de componentes principais utilizando os parâmetros bioacústicos frequência dominante, duração da nota, número de pulsos e taxa de repetição dos pulsos em onze populações de *Scinax hayii*. O componente principal 1 (eixo x) é responsável por 52,9% e o componente 2 (eixo y) 27,5% da variação entre as populações.

40

Figura 5 – Boxplot dos parâmetros acústicos (A) duração da nota (ms), (B) frequência dominante (Hz), (C) número de pulsos por nota e (D) taxa de repetição dos pulsos (pulsos por segundo) em populações de *Scinax hayii*. Box representam 1º e 3º quartis, linha central representa a mediana; linhas verticais representam valores de amplitude (mínimos e máximos) amostrados. Populações litorâneas estão destacadas com asterisco (*).

40

Figura 6 – Análise de componentes principais em populações de *Scinax dolloi* (Maringá, Itatiaia, RJ localidade tipo; Itamonte e Camanducaia no estado de Minas Gerais; Campos do Jordão, Santo Antônio do Pinhal, Jundiaí e Bananal no estado de São Paulo; Castelo, Espírito Santo) utilizando os parâmetros bioacústicos frequência dominante, duração da nota, número de pulsos e taxa de repetição. O componente principal 1 representado no eixo x é responsável por 99,5% da variação encontrada, já o componente 2 (eixo y) representa 0,48% da variação encontrada. 46

Figura 7 – Boxplot dos parâmetros acústicos (A) frequência dominante (Hz= Hertz), (B) duração da nota (ms= milissegundos), (C) número de pulsos por nota e (D) taxa de repetição dos pulsos (pulsos/segundo) em populações de *Scinax dolloi* e *Scinax hayii* de Bananal (SP) e Castelo (ES). Box representam 1º e 3º quartis, linha central representa a mediana; linhas horizontais representam valores de amplitude amostrados (mínimos e máximos). 46

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Distribuição geográfica das populações utilizadas nas análises morfométricas e morfológicas de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi*. Populações amostradas no estado do Espírito Santo (ES): municípios de Castelo (CAS) e Santa Teresa (SAT); no estado do Rio de Janeiro (RJ): municípios Petrópolis (PET), Maringá, Itatiaia, (MAR), Itatiaia, Parque Nacional do Itatiaia parte baixa (IPB), Mangaratiba (MAN) e Paraty (PAR); no estado de Minas Gerais (MG): Itamonte (ITA), Cristina (CRI) e Camanducaia (CAM); no estado de São Paulo: municípios São Luiz do Paraitinga (SLP), Ubatuba (UBA), Ilhabela (ILB), Santa Isabel (SAI), Mogi das Cruzes (MOG), Santo André (SAA), São Bernardo do Campo (SBC), Juquitiba (JUQ), Peruíbe (PER), Queluz (QUE), Piquete (PIQ), Campos do Jordão (CAJ) e Santo Antonio do Pinhal (SAP). 66

Figura 2 – Caracteres morfométricos analisados. (A) vista dorsal, comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cabeça (CC); (B) vista ventral, largura da cabeça (LC), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), comprimento da mão (CM), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), comprimento do fêmur, comprimento da tíbia (CT), comprimento do tarso (CTAR), comprimento do pé (CP) diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4); (C) vista dorsal da cabeça, distância interorbital (DIO), distância inter-nasal

(DIN), distância narina-focinho (DNF); **(D)** vista lateral da cabeça, diâmetro do olho (DO), diâmetro do tímpano (DT), distância olho-narina (DON). Adaptado de Pugliese (2002). 67

Figura 3 – Machos *Scinax hayii* coletados em Petrópolis, Rio de Janeiro (localidade tipo) exemplares CFBH 13935 (A – E; CRC= 42,5 mm) e CCLZU 3179 (G e H; CRC= 41,3 mm). Vista lateral (A), vista ventral da mão (B), vista ventral do pé (C), vista dorsal (D), vista ventral (E), vista dorsal mostrando coloração na face posterior das coxas (F e G), vista lateral do indivíduo (H). De A a F indivíduos fixados; em G e H animal em vida. 75

Figura 4 – Macho de *S. hayii* (CCLZU 3166, CRC= 41,3 mm, fotos A, B, C, E e F) coletado em São Luiz do Paraitinga, São Paulo. Vistas da lateral da cabeça (A), mão (B), pé (C), região lateral e ventral evidenciando as manchas nos flancos (D), vista dorsal (E), ventral (F), vista dorsal evidenciando a face posterior das coxas com manchas típicas de *Scinax* (G) vista lateral do indivíduo (H). Exemplares não coletados nas imagens D, G e H. 80

Figura 5 – Macho de *Scinax hayii* coletado em Mangaratiba, Rio de Janeiro (CCLZU 3466, CRC= 42,1 mm). Vistas da lateral da cabeça (A), mão (B), pé (C), região lateral evidenciando as manchas nos flancos (D), vista dorsal (E), ventral (F), vista dorsal evidenciando a face posterior das coxas com manchas típicas de *Scinax* (G) vista dorsal do indivíduo (H). 81

Figura 6 – Machos de *Scinax hayii* coletados em Mogi das Cruzes, São Paulo, apresentando padrão de coloração dorsal com faixas e manchas (CCLZU 3429, CRC= 35,9 mm; imagens A, B e E; e CCLZU 3430, CRC= 39,4 mm, imagens C e D). Vistas lateral do corpo (A), ventral (B), dorsal (C), face posterior da coxa (D), e vista dorsal (E). 82

Figura 7 – Macho de *Scinax hayii* coletado em São Bernardo do Campo, São Paulo. Indivíduo com padrão de manchas no dorso (CCLZU 3425, CRC= 37,2 mm). Vista lateral (A), ventral (B), dorsal (C e E), face posterior da coxa (D). Imagem D indivíduo não coletado. 83

Figura 8 – Padrões de manchas na superfície dorsal, e na face posterior da coxa registrados em machos de *Scinax hayii*, nas populações de Santa Isabel (A) (da esquerda para a direita: CCLZU 3301, CRC= 36,2 mm; CFBH 40168, CRC= 36,9; CFBH 40169, CRC= 38,3 mm), Santo André (B) (da esquerda para a direita: CFBH 29303, CRC= 37,3 mm; CFBH 29304, CRC= 34,4 mm; CFBH 29308, CRC= 39,1) e Juquitiba (C) (da esquerda para a direita: CCLZU 3314, CRC= 38,4 mm; CCLZU 3317, CRC= 37,8; CCLZU 3318, CRC= 39 mm) no estado de São Paulo. 84

Figura 9 – Padrão de coloração dorsal uniforme e manchas em regiões escondidas (fêmur, tíbias e flancos) em exemplares de *Scinax hayii* coletados na planície litorânea em (A) Paraty, RJ (CCLZU 3407, CRC= 35,7 mm), (B) Ubatuba, SP, (CCLZU 3185, CRC= 38,5 mm), e (C) Ilhabela, SP (CCLZU 3331, CRC= 36,9 mm). 85

Figura 10 – Machos de *Scinax hayii* coletados em Peruíbe, São Paulo (A, B e F CCLZU 3241, CRC= 36,8 mm; C, D e E CCLZU 3239, CRC= 37,9 mm). Vista lateral evidenciando o padrão de coloração dorsal com manchas (A e B), padrão de coloração na região posterior da coxa (C e D), vista ventral (E), vista lateral evidenciando padrão de coloração com manchas na região dos flancos. 86

Figura 11 – Machos *Scinax hayii* registrados em Castelo, Espírito Santo. Vista lateral evidenciando a coloração dos flancos (A), vista lateral superior (B), vista ventral (C), face posterior da coxa evidenciando a ausência do padrão de manchas reticulares típicas de *Scinax* (D, E e F), e vista lateral de espécime apresentando padrão de coloração dorsal com manchas (G). Imagens A, C, F e G exemplar CCLZU 3422 (CRC= 34,3 mm), B e E CCLZU 3419 (CRC= 35,4 mm), em D CCLZU 3421 (CRC= 33,3). 87

Figura 12 – Caracteres selecionados para a análise de componentes principais e seus valores de importância para o componente principal 1. O comprimento rostro-cloacal é o principal parâmetro responsável pela variação populacional em morfometria nas populações de *Scinax hayii* (73% de influência sobre o componente principal 1). 89

Figura 13 – Análise de componentes principais utilizando 6 caracteres morfométricos e 14 populações de *Scinax hayii*. O componente principal 1 é responsável por 86,8% da variação encontrada, já o componente principal 2 (eixo y) corresponde a 5,6%. Os caracteres representados por eixos na figura (biplot) são: (CRC) comprimento rostro-cloacal, (CT) comprimento da tíbia, (CF) comprimento do fêmur, (CP) comprimento do pé, (LC) largura da cabeça e (CC) comprimento da cabeça. 91

Figura 14 – Box e jitter plot utilizando o caractere comprimento rostro-cloacal (CRC) medido em milímetros (mm), em populações de *Scinax hayii*. Box representam o primeiro e terceiro quartil, linha central representa a mediana; linhas verticais representam a amplitude. Pontos representam valores de cada indivíduo amostrado. 92

Figura 15 – Macho de *Scinax dolloi* coletado em Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro (A – E CCLZU 3288, CRC= 35,3 mm; indivíduo não coletado em F; em G CCLZU 3286, CRC= 33,6

mm) . Vistas lateral da cabeça (A), pé (B), mão (C); vistas dorsal (D, F e G) e ventral (E).
Animal fixado de A até E. 101

Figura 16 – Padrões de coloração dorsal em machos de *Scinax dolloi*. Exemplos coletados no Brejo da Lapa, Itamonte, MG. (A) vista dorsal (CFBH 40171, CRC= 38,6 mm), (B) vista lateral evidenciando padrão e coloração e aspecto granular do dorso (CFBH 40173, CRC= 33,9 mm) (C) vista posterior evidenciando padrão de coloração na face posterior do fêmur e flancos; Imagens D – F, espécimes coletados em Cristina, MG. CCLZU 2231, CRC= 34,8 mm (D), CCLZU 2119, CRC= 38,2 mm (E), CCLZU 2956, CRC= 39,4 mm (F); Exemplos coletados em Piquete, CCLZU 2795, CRC= 38 mm (G), CCLZU 2881, CRC= 39,3 mm (H), CCLZU 2882, CRC= 39,6 mm (I). De A a C animais em vida, de D a I animais fixados. 107

Figura 17 – Padrão de coloração dorsal em machos fixados de *Scinax dolloi*. Indivíduos com padrão vestigial para padrão evidente (da esquerda para a direita). Itatiaia (parte baixa): CCLZU 2726, CRC= 39 mm (A), CCLZU 2724, CRC= 37 mm (B), CCLZU 2687, CRC= 34,6 mm (C); Queluz: CCLZU 1328, CRC= 39,7 mm (D), CCLZU 1727, CRC= 39,5 mm (E); Santo Antônio do Pinhal: CCLZU 3181, CRC= 38,5 mm (F), CCLZU 1107, CRC= 37,7 mm (G), CCLZU 3180, CRC= 38,6 mm (H). 108

Figura 18 – Padrão de manchas na superfície dorsal de *Scinax dolloi* de Campos do Jordão (A – C) e Camanducaia (G – I). Padrão de coloração na face posterior da coxa vestigial, ou pouco evidente em Campos do Jordão (D) e Camanducaia (E e F). CCLZU 2334 (fêmea), CRC= 40,2 mm (A), CFBH 40180, CRC= 38,5 mm (B), CCLZU 3310, CRC= 38,6 mm (C), (D) exemplar não coletado; CCLZU 3478, CRC= 36,8 mm (E e H), CCLZU 3473, CRC= 36,4 mm (F e I), CCLZU 3475, CRC= 34 mm (G). Em D, E e F animais em vida. 109

Figura 19 – Importância dos caracteres morfométricos utilizados na análise de componentes principais em populações de *Scinax dolloi* e *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa (Espírito Santo). Caracteres foram selecionados por representarem a maior variação encontrada entre as populações. 112

Figura 20 – Análise de componentes principais em onze populações de *Scinax dolloi*, incluindo *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa, utilizando seis caracteres morfométricos. O eixo x (componente principal 1) explica 78,9% da variação encontrada e o eixo y (componente principal 2) 11,5%. Caracteres representados nos eixos centrais da figura são: Comprimento

rostro-cloacal (CRC), comprimento do pé (CP), comprimento da tíbia (CT), comprimento do fêmur (CF), largura da cabeça (LC) e comprimento do braço (CB). 113

Figura 21 – *Box e jitter plot* utilizando o parâmetro comprimento rostro-cloacal populações de *Scinax dolloi*, incluindo populações de Castelo e Santa Teresa (ES) identificados como *Scinax hayii*. Box representam primeiro e terceiro quartis; linha central representa a mediana; linhas verticais apresentam valores de amplitude; pontos representam valores de cada exemplar mensurado. 114

Figura 22 – Árvore de máxima verossimilhança dos fragmentos mitocondriais sequenciados do gene Citocromo c Oxidase I (COI) de espécies de *Scinax* (*S. dolloi*, *S. duartei*, *S. granulatus*, *S. hayii* e *S. perereca*). Os números próximos aos nós indicam os valores de suporte dos agrupamentos em função do *bootstrap*. (T) indica topótipos. 120

Figura 23 – Distribuição geográfica de *Scinax dolloi*, *Scinax hayii* e *Scinax perereca*, utilizadas na análise molecular do gene COI. Estados brasileiros (UF): ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; PR, Paraná; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul. 122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Parâmetros espectrais e temporais do canto de anúncio de populações de *Scinax hayii*, *Scinax dolloi*. Topótipos estão destacadas. Os resultados são apresentados na forma de amplitude, média seguida de desvio padrão e coeficiente de variação (%). Faixa de frequência (FF), Frequência mínima (FMIN), Frequência máxima (FMAX), Frequência dominante (FD), duração da nota (DN), número de pulsos por nota (NP), duração dos pulsos (DP), intervalo entre pulsos (IEP), taxa de repetição das notas (TRN) e taxa de repetição dos pulsos (TRP). 34

Tabela 2 – Matriz de importância dos parâmetros bioacústicos utilizados na análise de componentes principais de populações de *Scinax hayii*. Componente principal (PC). 42

Tabela 3 – Valores do teste de Dunn utilizado para comparações par a par entre as populações de *Scinax hayii*. Em **A** comparações entre frequência dominante, **B** duração da nota, **C** número de pulsos e **D** taxa de repetição dos pulsos. Valores de p significativo (<0,05) são destacados em cinza. 43

Tabela 4 – Matriz de importância dos parâmetros acústicos utilizados na análise de componentes principais em populações de *Scinax dolloi*, e *S. hayii* de Bananal (SP) e Castelo (ES). Componente principal (PC). 48

Tabela 5 – Valores do teste de Dunn utilizado para comparações par a par entre as populações de *Scinax dolloi*. Em **A** comparações entre frequência dominante, **B** duração da nota, **C** número de pulsos e **D** taxa de repetição dos pulsos. Valores de p significativo (<0,05) são destacados em cinza. 49

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Matriz de importância dos caracteres morfométricos utilizados na análise de componentes principais. (PC) componente principal. (CRC) comprimento rostro-cloacal, (CT) comprimento da tíbia, (CF) comprimento do fêmur, (CP) comprimento do pé, (LC) largura da cabeça e (CC) comprimento da cabeça. 90

Tabela 2 – Medidas morfométricas (em milímetros) de 18 caracteres analisados em populações identificadas como *Scinax hayii*. Os valores são referentes aos machos analisados. Resultados

são apresentados na forma de amplitude e média seguida de desvio padrão. Parâmetros analisados: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), distância interorbital (DIO), distância olho-narina (DON), distância narina-focinho (DNF), distância inter-nasal (DIN), diâmetro do tímpano (DT), comprimento do fêmur (CF), comprimento da tíbia (CT), comprimento do pé (CP), comprimento do tarso (CTAR), comprimento da mão (CM), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4). 93

Tabela 3 – Teste de Dunn utilizando o comprimento rostro-cloacal para comparar 14 populações identificadas como *Scinax hayii*. Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados em cinza. 96

Tabela 4 – Matriz de importância dos utilizados na análise de componentes principais em populações de *S. dolloi* incluindo populações de *S. hayii* do Espírito Santo (Castelo e Santa Teresa). (PC) componente principal. Caracteres: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento do pé (CP), comprimento da tíbia (CT), comprimento do fêmur (CF), largura da cabeça (LC) e comprimento do braço (CB). 111

Tabela 5 – Parâmetros morfométricos de 18 caracteres de nove populações de *Scinax dolloi* na Serra da Mantiqueira. Valores são apresentados em milímetros, na forma de amplitude e média seguida de desvio padrão. Parâmetros analisados: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), distância interorbital (DIO), distância olho-narina (DON), distância narina-focinho (DNF), distância inter-nasal (DIN), diâmetro do tímpano (DT), comprimento do fêmur (CF), comprimento da tíbia (CT), comprimento do pé (CP), comprimento do tarso (CTAR), comprimento da mão (CM), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4). 115

Tabela 6 – Teste de Dunn aplicado entre as populações de *Scinax dolloi* amostradas na Serra da Mantiqueira e populações identificadas como *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa, Espírito Santo, utilizando o parâmetro rostro-cloacal (CRC). Valores de p significativos ($p < 0,05$) são destacados em cinza. 117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
REFERÊNCIAS	23
3 CAPÍTULO 1: VARIAÇÕES POPULACIONAIS NO CANTO DE ANÚNCIO DE <i>SCINAX HAYII</i> (BARBOUR, 1909) E <i>SCINAX DOLLOI</i> (WERNER, 1903)	26
4 RESUMO	26
5 INTRODUÇÃO	27
6 MATERIAL E MÉTODOS	29
6.1 Populações amostradas	29
6.2 Análise de vocalização	30
7 RESULTADOS	33
7.1 Descrição do canto de anúncio de <i>Scinax hayii</i> e <i>Scinax dolloi</i>	33
7.1.1 Comparações bioacústicas em populações de <i>Scinax hayii</i>	39
7.1.2 Comparações bioacústicas em populações de <i>Scinax dolloi</i> na Serra da Mantiqueira	45
8 DISCUSSÃO	51
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - ARQUIVOS SONOROS ANALISADOS	60

9 CAPÍTULO 2: ANÁLISES MORFOMÉTRICAS, MORFOLÓGICAS E MOLECULARES EM POPULAÇÕES DE <i>SCIANX HAYII</i> (BARBOUR, 1909) E <i>SCINAX DOLLOI</i> (WERNER, 1903) (ANURA, HYLIDAE)	61
10 RESUMO	61
11 INTRODUÇÃO	62
12 MATERIAL E MÉTODOS	65
12.1 Análise morfométrica	65
12.2 Análise morfológica	66
12.3 Análise molecular	67
12.4 Análise estatística	69
12.4.1 Morfometria	69
12.4.2 Análise Molecular	70
13 RESULTADOS	71
13.1 Redescrição de <i>Scinax hayii</i>	71
13.1.1 Variações populacionais em <i>Scinax hayii</i>	76
13.1.2 Comparações morfométricas	88
13.2 Redescrição de <i>Scinax dolloi</i>	97
13.2.1 Variações populacionais em <i>Scinax dolloi</i>	102
13.2.2 Comparações morfométricas	110

13.3 Análise Molecular	118
14 DISCUSSÃO	123
15 CONCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS	134
APÊNDICE A – LISTA DE ESPÉCIMES ANALISADOS	139
APÊNDICE B – LISTA DE TECIDOS ANALISADOS DE <i>SCINAX</i>	139
APÊNDICE C – TRABALHOS PÚBLICADOS PROVENIENTES DO PROJETO	145
ANEXO A – GEOMORFOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO	168

1 INTRODUÇÃO

A subfamília Scinaxinae foi proposta por Duellman et al. (2016) e apresenta atualmente 140 espécies (veja FROST, 2020) distribuídas em quatro gêneros. O gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843, possui 50 espécies e foi revalidado para comportar as espécies anteriormente alocadas no grupo *Scinax catharinae* (*sensu* FAIVOVICH, 2002). O gênero *Julianus* apresenta três espécies atualmente, sendo proposto por Duellman, Marion e Hedges (2016) para alocar as espécies do grupo *Scinax uruguayus* que anteriormente estavam alocadas no grupo *Scinax ruber* (*sensu* FAIVOVICH et al., 2005). O gênero *Scinax* Wagler, 1830, é o gênero mais especioso da subfamília Scinaxinae contendo até o presente momento 72 espécies (FROST, 2020). Todas as espécies que estavam até então alocadas no clado *Scinax ruber* de espécies por Faivovich (2002) (exceto grupo *S. uruguayus*) continuaram usando o epíteto genérico *Scinax* (DUELLMAN et al., 2016). O quarto gênero pertencente à família Scinaxinae é o gênero *Sphaenorhynchus* Tschudi, 1838, que é considerado um táxon irmão, mas com baixo valor de suporte (apenas 49%), segundo análise molecular feita por Duellman et al. (2016). Atualmente o gênero *Sphaenorhynchus* apresenta 15 espécies (ARAUJO-VIEIRA et al., 2019; FROST, 2020). Faivovich et al. (2018) discutem a preblemática em reconhecer Scinaxinae como subfamília devido ao baixo valor de suporte (<50%) e suas instáveis relações, propondo a tribo Scinaxini para *Scinax* (incluindo *Julianus* e *Ololygon*) e a tribu Sphaenorhynchini para o gênero *Sphaenorhynchus*.

Apesar de ser o gênero mais especioso, o número de espécies para *Scinax* ainda é subestimado e novas espécies vêm sendo descritas nos últimos anos (*Scinax haddadorum* Araujo-Vieira, Valdujo, e Faivovich, 2016; *Scinax rossaferesae* Conte, Araujo-Vieira, Crivellari, e Berneck, 2016; *Scinax onca* Ferrão, Moravec, Fraga, Pinheiro de Almeida, Kaefer, e Lima, 2017; *Scinax caprarius* Acosta-Galvis, 2018; *Scinax ruberoculatus* Ferrão, Fraga,

Moravec, Kaefer, e Lima, 2018; *Scinax strussmannae* Ferrão, Fraga, Moravec, Kaefer e Lima, 2018; *Scinax tsachila* Ron, Duellman, Caminer e Pazmiño, 2018).

Alguns grupos de espécies do gênero *Scinax* apresentam morfologia conservada sendo comum duas ou mais espécies serem denominados sob apenas um nome (chamadas espécies morfologicamente crípticas) (LUTZ, 1973; NUNES et al., 2012; RON et al., 2018). Estudos taxonômicos envolvendo esses chamados complexos de espécies morfologicamente crípticas têm apresentado sucesso no desmembramento e nominação das novas espécies bem como aumentado a perspectiva sobre o conhecimento da diversidade de espécies de anuros (NUNES et al., 2012; FERRÃO et al., 2017; RON et al., 2018). Todavia, a dificuldade no uso da morfologia para o desmembramento das espécies crípticas, levou a ascensão da taxonomia integrativa (PADIAL et al., 2010). Esta utiliza vários caracteres como o canto, ecologia, comportamento e principalmente análises moleculares, que tem sido a vanguarda em reconhecer novas unidades taxonômicas, usando diferenciação do DNA para identificar novas espécies em unidades morfológicas semelhantes (VENCES et al., 2005; FOUQUET et al., 2007; RON et al., 2018;).

Em 1909 em seu artigo intitulado “Some new South American cold-blooded vertebrates”, o naturalista Thomas Barbour (1884—1946) descreveu uma espécie do gênero *Hyla* nomeando-a como *Hyla hayii* em homenagem a Clarence L. Hay, “um entusiasmado ajudante em muitas excursões de coleta” (em tradução livre). Essa descrição foi baseada em um exemplar (MCZ 2513 Harvard University) coletado em Petrópolis, Rio de Janeiro (localidade tipo) (BARBOUR, 1909).

Segundo Frost (2020) *S. hayii* possui distribuição no sudeste e sul do Brasil ocorrendo na Serra do Mar, do estado do Espírito Santo até o estado de Santa Catarina. A ocorrência da

espécie na Serra da Mantiqueira também é relatada (HADDAD e SAZIMA, 1992; POMBAL et al., 1995, MAGRINI et al., 2011).

Após a descrição da espécie *Scinax perereca* Pombal, Haddad e Kasahara, 1995, na localidade de Ribeirão Branco (região sul do estado de São Paulo), arbitrariamente as populações registradas partindo da localidade tipo de *S. perereca* até a região sul do Brasil passaram a ser referidas como *Scinax perereca*. Fato confirmado posteriormente por Silva (2017) que, em sua dissertação, revisando populações de *S. perereca* confirmou as semelhanças morfológicas, moleculares e bioacústicas das populações da região sul do Brasil em relação à localidade tipo Ribeirão Branco.

Ao longo de sua distribuição, diversas populações de *Scinax hayii* foram registradas e autores começaram a identificar e apontar diferenças existentes em seus caracteres morfológicos, morfométricos e bioacústicos (COCHRAN, 1955; LUTZ, 1973; HEYER et al., 1990; CARDOSO e ANDRADE, 1991; HADDAD e SAZIMA, 1992; POMBAL et al., 1995, MAGRINI et al., 2011; SANTOS e MARTINS, 2017). Devido as variações apontadas Haddad e Sazima (1992), Pombal et al. (1995 a, b) e Santos e Martins (2017) sugerem que *Scinax hayii* representa um complexo de espécies.

Scinax dolloi foi descrita por Werner (1903) baseado em duas fêmeas, estas depositadas no Institut Royal des Sciences Naturelles em Bruxelas na Bélgica (IRSNB 6481). Em sua descrição original a localidade tipo designada por Werner foi “Brazil in unknow location” em tradução livre significa Brasil em uma região desconhecida. Lang (1990) citou dois sintipos de “*Hyla dolloi*” coletados por Van Den Driessche em 30 de julho de 1897, para a localidade de “Haut Maringa Brésil” (Alto Maringá Brasil). Com base nessa informação houve uma interpretação geral assumindo a localidade tipo de *Scinax dolloi* como o Município de Maringá, no estado do Paraná, sul do Brasil. Entretanto o município de Maringá foi criado apenas em

1947, 44 anos após a descrição da espécie (Veja o histórico completo em CARAMASCHI et al., 2013).

Caramaschi et al. (2013) reavaliaram a interpretação da localidade tipo de *S. dolloi*, e designaram a Vila de Maringá, município de Itatiaia, Rio de Janeiro, como a localidade tipo da espécie. Entretanto, a vila de Maringá está localizada na Serra da Mantiqueira na fronteira entre os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Seus territórios permeiam por dois municípios, Itatiaia (Rio de Janeiro) e Bocaina de Minas (Minas Gerais), sendo que neste segundo se localiza as coordenadas geográficas apresentadas por Caramaschi et al. (2013) e designadas como localidade tipo.

Lutz (1973) considerou *S. dolloi* com uma “doubtful species”, devido a inexistência de espécimes coletados para identificação. Duellman (em FROST, 1985, 2020) relata que não há nenhuma população associada a esta espécie devido à falta de exemplares coletados. Baseando-se nos sítipos, Faivovich et al. (2005) relatam que *S. dolloi* é morfologicamente próxima de *S. hayii* e *S. perereca*. Contudo, a falta de espécimes coletados e a escassez de informações biológicas a respeito da espécie tornam a diagnose confusa e o status taxonômico de *Scinax dolloi* incerto.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar e caracterizar as variações morfológicas, morfométricas, bioacústicas e moleculares em diferentes populações de *Scinax hayii* e *S. dolloi* e suas possíveis implicações taxonômicas e ecológicas ao longo da Mata Atlântica, determinando também a distribuição geográfica de cada espécie.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-GALVIS, A. R. Una nueva rana de huesos verdes del género *Scinax* (Anura: Hylidae) asociada a los bosques subandinos de la cuenca del río Magdalena, Colombia. **Biota Colombiana**, n., 19 (Supl. 1) p. 131–159. 2018.
- ARAUJO-VIEIRA, K.; VALDUJO, P. H.; FAIVOVICH, J. A new species of *Scinax* Wagler (Anura: Hylidae) from Mato Grosso, Brazil. **Zootaxa**. n. 4061, p. 261–273. 2016.
- ARAUJO-VIEIRA, K.; BLOTTO, B. L.; CARAMASCHI, U.; HADDAD, C. F. B. H.; FAIVOVICH, J.; GRANT, T. A total evidence analysis of the phylogeny of hatchet-faced treefrogs (Anura: Hylidae: Sphaenorhynchus). **Cladistics**. n. 35, p. 469–486. 2019.
- BARBOUR T. Some new South American cold-blooded vertebrates. **Proceedings of the New England Zoölogical Club**. n. 4, p. 47–52. 1909.
- CARAMASCHI U.; NUNES I.; NASCIMENTO L. B.; CARVALHO R. R. Jr. The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae). **Zootaxa**. n. 3691(2), p. 299–300. 2013.
- CARDOSO A. J.; ANDRADE G. V. Descrição de larvas e biologia de quatro espécies de *Hyla* (Amphibia, Anura). **Revista Brasileira de Biologia**. n. 51(2), p. 391–402. 1991.
- COCHRAN, D. M. Frogs of Southeastern Brazil. **Bulletin of the United States National Museum**. n. 206, 423p. 1955.
- CONTE, C. E.; ARAUJO-VIEIRA, K.; CRIVELLARI, L. B.; BERNECK, B. von M. A new species of *Scinax* Wagler (Anura: Hylidae) from Paraná, southern Brazil . **Zootaxa**. n. 4193, p. 245–265. 2016.
- DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**. n. 4104, p. 1–109. 2016. doi:10.11646/zootaxa.4104.1.1
- FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). **Cladistics**. n. 18, p. 367–393. 2002.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. n. 294, p. 1–240. 2005.
- FAIVOVICH, J.; PEREYRA, M. O.; LUNA, M. C.; HERTZ, A.; BLOTTO, B. L.; VÁSQUEZ-ALMAZÁN, C. R.; MCCRANIE, J. R.; SÁNCHEZ, D. A.; COSTA, D. B. P.; ARAUJO-VIEIRA, K.; KÖHLER, G.; KUBICKI, B.; CAMPBELL, J. A.; FROST, D. R.; WHEELER, W. C.; HADDAD, C. F. B. H. On the Monophyly and Relationships of Several Genera of Hylini (Anura: Hylidae: Hylinae), with Comments on Recent Taxonomic Changes in Hylids. **South American Journal of Herpetology**. n. 13(1), p. 1–32. 2018.
- FERRÃO, M.; MORAVEC, J.; de FRAGA, R.; de ALMEIDA, A. P.; KAEFER, Í. L.; LIMA A. P. A new species of *Scinax* from the Purus-Madeira interfluvium, Brazilian Amazonia (Anura, Hylidae). **ZooKeys**. n. 706, p. 137–162. 2017.

- FERRÃO, M.; de FRAGA R.; MORAVEC, J.; KAEFER, Í. L.; LIMA, A. P. A new species of Amazonian snouted treefrog (Hylidae: *Scinax*) with description of a novel species-habitat association for an aquatic breeding frog. **PeerJ**. n. 6(e: 4321), p. 1–34. 2018 a.
- FERRÃO, M.; MORAVEC, J.; KAEFER, Í. L.; de FRAGA, R.; LIMA, A. P. New species of *Scinax* (Anura: Hylidae) with red-striped eyes from Brazilian Amazonia. **Journal of Herpetology**. n. 52, p. 473–486. 2018.
- FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.D.; MEYER, A.; MARTY, C.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. n. 43, p.567–582 2007.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World**. A Taxonomic and Geographical Reference. Allen Press and Association of Systematics Collections, Lawrence. 1985.
- FROST, D. R. 2020. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database. Accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Scinaxinae>
- HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. 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. 1992. p. 188-211.
- HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O. L.; NELSON, C. E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**. n. 31, p. 231–410, 1990.
- LANG, M. Annotated catalogue of the type-specimens from the herpetological collection of the Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels. Documents de Travail. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique. n. 59, p. 1–36. 1990.
- LUTZ, B. **Brazilian species of Hyla**. University of Texas Press, Austin. 260 pp. 1973.
- MAGRINI, L.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; BÉDA, A. F.; GIARETTA, A. A. Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura:Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. **Zootaxa**. n. 3066, p. 37–51, 2011.
- NUNES, I.; KWET, A.; POMBAL, J. P. Jr. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). **Copeia**, 2012, 3, 554–569. 2012.
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**. n. 7, p. 1–14. 2010.
- POMBAL, J. P. Jr.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. **Journal of Herpetology**. n. 29, p. 1–6. 1995a.
- POMBAL, J. P. Jr.; BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. **Naturalia**. n. 20, p. 213–225. 1995b.
- RON, S. R.; DUELLMAN, W. E.; CAMINER, M. A.; PAZMIÑO, D. Advertisement calls and DNA sequences reveal a new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) on the Pacific lowlands of Ecuador. **PLoS (Public Library of Science) One**. n. 13 (9: e0203169), p. 1–25. 2018.

SANTOS, L. R.; MARTINS I. A. Bioacoustic analysis in *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) at its type locality in Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil. **Zootaxa**. n. 4232, p. 582–584. 2017. doi:10.11646/zootaxa.4232.4.8.

SILVA, P. H. **Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr. Haddad & Kasahara, 1995 (Anura, Hylidae)**. 2017. 71p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. 2017.

VENCES, M.; THOMAS M.; BONETT, R.M.; VIEITES, D.R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society London Ser B**. n. 360, p. 1859–1868. 2005.

WAGLER, J. Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugthiere und Vogel. Ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie. München, Stuttgart and Tübingen: J. G. Cotta. 1830.

WERNER, F. Neue Reptilien und Batrachier aus dem naturhistorischen Museum in Brussel. Nebst bemerkungen über einige andere Arten. **Zoological Anzeiger**. n. 26, p. 246–253. 1903.

3 CAPÍTULO 1

VARIAÇÕES POPULACIONAIS NO CANTO DE ANÚNCIO DE *SCINAX HAYII* (BARBOUR, 1909) E *SCINAX DOLLOI* (WERNER, 1903)

4 RESUMO

Nosso objetivo foi caracterizar e comparar os parâmetros do canto de anúncio de 11 populações de *S. hayii* e seis populações identificadas como *Scinax dolloi*, apontando variações entre populações geograficamente distintas e possíveis unidades acusticamente diferentes. As populações de *Scinax hayii* mostraram uma variação gradual, sendo possível distinguir as populações de regiões de elevadas altitudes, daquelas de planície litorânea que apresentam cantos com maior frequência dominante, taxa de repetição dos pulsos, e menor duração das notas. As populações de *S. dolloi* apresentaram dois grupos acusticamente diferentes pelos parâmetros taxa de repetição dos pulsos e duração da nota, sendo um, formado pelos topotipos (Maringá e Itamonte) incluindo Castelo (ES), e o segundo formado por populações ao sul da Serra da Mantiqueira (Campos do Jordão até Jundiaí). A população de Castelo possui todos os parâmetros comparados do canto semelhantes ao canto dos topótipos. A população de Bananal (Serra da Bocaina) apresenta canto de anúncio semelhante aos amostrados para as populações do bloco sul da Serra da Mantiqueira (Campos do Jordão até Jundiaí).

Palavras-chave: Bioacústica; discriminação acústica; variação geográfica.

5 INTRODUÇÃO

O canto de anúncio apresenta em seus parâmetros espectrais e temporais informações importantes para o reconhecimento específico, também servindo como mecanismo de isolamento reprodutivo (GERHARDT, 1994, MARTINS e JIM, 2004). Por esses motivos, o canto de anúncio em anuros tem sido usado como uma eficaz ferramenta para resolução de problemas taxonômicos e identificação de novas espécies (NUNES et al., 2012; PANSONATO et al., 2014; CONTE et al., 2016).

Populações de espécies de anuros com ampla distribuição geográfica geralmente apresentam variação no canto de anúncio (GERHARDT, 1994; HEYER e REID, 2002; FARIA et al., 2013). Segundo o Modelo de isolamento por distância, proposto por Wright (1943), populações mais próximas apresentam diferenças fenotípicas e genéticas menores em relação às populações mais distantes, criando gradientes em diversos caracteres. Além do isolamento por distância, barreiras físicas, fisiológicas, processos estocásticos, ecologia e pressão seletiva, são outros fatores que, ao longo do tempo, podem levar ao surgimento de novas espécies (BLAIR 1958, LEMMON et al., 2007).

Scinax hayii, foi descrita por Barbour (1909) tendo sua localidade tipo o município de Petrópolis, Rio de Janeiro. Apresenta ampla distribuição geográfica no sudeste do Brasil (FROST, 2020), ocorrendo do Espírito Santo até o estado de Santa Catarina, ocupando ambientes na Serra do Mar e planície litorânea. Silva (2017) relata que populações do sul do estado de São Paulo (partindo de Ribeirão Branco, localidade tipo de *Scinax perereca* Pombal, Haddad e Kasahara, 1995) até o sul do Brasil se tratam de *Scinax perereca*. Cardoso e Andrade (1991), Haddad e Sazima (1992), Pombal et al. (1995) e Magrini et al. (2011) relatam a ocorrência de *Scinax hayii* para a Serra da Mantiqueira, grupo de cadeias montanhosas que se estende pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Entretanto, Santos (2015)

relata que populações identificadas como *S. hayii* localizadas na Serra da Mantiqueira (Campos do Jordão e Santo Antonio do Pinhal) diferem em morfologia, morfometria e no canto de anúncio dos topotipos de *Scinax hayii*.

Caramaschi et al. (2013) reavaliaram a localidade tipo de *S. dolloi*, designando a Vila de Maringá, município de Itatiaia, na região da Serra da Mantiqueira no estado do Rio de Janeiro, como localidade tipo de *S. dolloi*. Populações registradas na Serra da Mantiqueira apresentam morfologia semelhante a descrição de *S. dolloi*, e devido às diferenças registradas por Santos (2015) entre populações de *S. hayii* e da Serra da Mantiqueira, estas últimas passaram a ser identificadas como *S. dolloi*.

O primeiro relato da vocalização de *S. hayii* foi feito por Cochran (1955) utilizando uma onomatopeia (descrito pela autora como um rouco *kraw, kraw, kraw*), para representar o canto produzido por exemplares do Alto da Serra, Paranapiacaba, São Paulo. Em outros estudos, pesquisadores descreveram o canto de *S. hayii* dentro da sua distribuição, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Boracéia, SP, HEYER et al., 1990 ; Poços de Caldas, MG, CARDOSO e ANDRADE 1991; Jundiaí, SP, POMBAL et al., 1995; Atibaia, SP e Itapeva, MG, MAGRINI et al., 2011). Em virtude das variações morfológicas e bioacústicas registradas ao longo de sua distribuição (COCHRAN, 1955; LUTZ, 1973; HEYER et al., 1990; CARDOSO e ANDRADE, 1991), Haddad e Sazima (1992) e Pombal et al. (1995) sugeriram que *Scinax hayii* representasse um complexo de espécies, entretanto, a ausência da descrição do canto de anúncio de exemplares da localidade tipo, dificultavam o estabelecimento de um padrão confiável para a espécie. Santos e Martins (2017) descreveram vocalizações de topotipos de *Scinax hayii*, e baseados nas análises bioacústicas, reforçaram a hipótese de *S. hayii* representar um complexo de espécies.

O objetivo deste estudo foi (i) caracterizar e descrever os parâmetros espectrais e temporais do canto de anúncio de populações de *Scinax hayii* ao longo de sua distribuição geográfica, comparando variações no canto de anúncio; (ii) descrever o canto de anúncio de topótipos de *Scinax dolloi* e comparar com populações distribuídas na Serra da Mantiqueira

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Populações amostradas

As vocalizações de *Scinax hayii* utilizadas são provenientes das seguintes populações: No estado do Rio de Janeiro, municípios de Petrópolis (localidade tipo) (dois indivíduos), Mangaratiba (sete indivíduos) e Paraty (oito indivíduos); no estado de São Paulo, municípios de Bananal (quatro indivíduos), São Luiz do Paraitinga (oito indivíduos), Ubatuba (sete indivíduos), Ilhabela (quatro indivíduos), Mogi das Cruzes (oito indivíduos), São Bernardo do Campo (sete indivíduos) e Peruíbe (cinco indivíduos); no estado do Espírito Santo, município de Castelo (oito indivíduos).

Devido à pouca informação, *Scinax dolloi* atualmente é utilizado apenas para populações da localidade tipo, Vila de Maringá situada entre os municípios de Itatiaia, Rio de Janeiro e Bocaina de Minas, Minas Gerais. Populações da Serra da Mantiqueira, apresentam morfologia semelhante a *S. dolloi* (observações pessoais), como não são semelhantes bioacústica e morfologicamente a *S. hayii* (SANTOS, 2015), neste estudo são comparadas com *S. dolloi* para verificar se pertencem a esta espécie.

Além da localidade tipo de *S. dolloi* (Maringá, RJ), na Serra da Mantiqueira foram amostradas as seguintes populações: no estado de Minas Gerais, municípios de Itamonte (Brejo da Lapa, Parque Nacional do Itatiaia) (três indivíduos) e Camanducaia (no distrito de Monte

Verde) (quatro indivíduos); no estado de São Paulo, municípios de Campos do Jordão (dez indivíduos), Santo Antônio do Pinhal (cinco indivíduos) e Jundiaí, (sete indivíduos).

Todos as populações de *S. hayii* e *S. dolloi* analisadas são apresentadas em um mapa de distribuição (Figura 1).

6.2 Análise de vocalização

Vocalizações foram gravadas em campo utilizando gravadores digitais Marantz PMD-671 ou Tascam Dr100-Mk1 com taxa de amostragem de 44.100 Hz, 16-bit, conectados a microfone direcional Sennheiser K6/ME66. As análises bioacústicas foram realizadas no software Raven 1.4 (Bioacoustics Research Program 2011) com as seguintes configurações: window type Hann, 256 samples, 3 dB filter bandwidth 248 Hz, overlap 50%, Hop size 128 samples, 256 samples DFT size, grid spacing 172 Hz. Todas vocalizações foram analisadas utilizando as mesmas configurações.

Foram analisados 10 parâmetros do canto de anúncio: Faixa de frequência (região entre a frequência mínima e frequência máxima), frequência dominante, duração da nota, número de pulsos por nota, duração do pulso, intervalo entre pulsos, taxa de repetição dos pulsos (calculado pelo número de pulsos dividido pela duração da nota) e taxa de repetição das notas. Terminologia dos parâmetros acústicos está de acordo com Köhler et al. (2017). Voucher das gravações utilizadas podem ser encontradas no APÊNDICE A. Foi utilizado coeficiente de variação interpopulacional, adaptado de Gerhardt (1991), tendo a seguinte definição: <10% parâmetro estático (pouca variação); >10% parâmetro dinâmico (variável).

As análises comparativas foram feitas no programa Past 3.2.6 (Paleontological Statistics) sendo divididas em dois grupos: (i) *Scinax hayii*: populações da Serra do Mar, planície litorânea, população de Bananal, e população Castelo (Espírito Santo) identificadas atualmente como *S. hayii*; e (ii) *Scinax dolloi*: topótipos (Maringá), populações da Serra da

Mantiqueira (Campos do Jordão, Santo Antonio do Pinhal, Camanducaia e Jundiaí), população de Castelo (ES) atualmente identificada como *S. hayii*, e a população de Bananal.

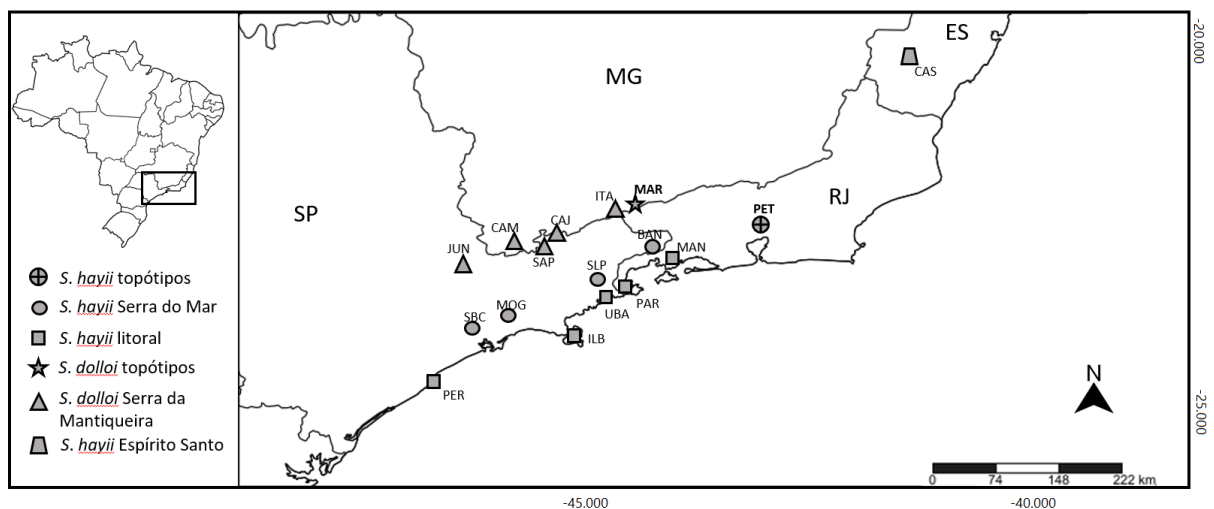
A população de Castelo, Espírito Santo, atualmente identificada como *S. hayii*, por possuir poucos dados sobre sua biologia, foi incluída nas análises comparativas com *S. hayii* e posteriormente com *S. dolloi*, para verificar qual espécie pertence esta população.

A população de Bananal localiza-se na Serra da Bocaina (trecho da Serra do Mar), porém, apresenta grande quantidade de espécies co-ocorrendo nesta e na Serra da Mantiqueira (veja JUARES 2011; GAREY et al., 2014). Portanto, a população de Bananal, além de ser comparada com *S. hayii*, também foi incluída nas análises com *S. dolloi*, e demais populações da Serra da Mantiqueira com a finalidade de verificar se esta população pode ser *S. dolloi* ou não.

Foram realizadas análises de componentes principais para a criação de novas variáveis (componentes principais) e visualização da variação acústica entre as populações. Foi utilizado a opção matriz de correlação por utilizar características mensuradas em diferentes medidas e índice de Jolliffe cut-off de 0,7 (componentes principais com valor menor que 0,7 foram considerados pouco influentes no resultado encontrado). A primeira análise de componentes principais utilizou todos os parâmetros obtidos e identificou os que mais explicam a variação encontrada entre as populações. Posteriormente, foram realizadas novas análises excluindo os parâmetros pouco influentes. A taxa de repetição das notas foi excluída por ser um parâmetro dinâmico e dependente de fatores como temperatura, interação social e densidade populacional (veja KÖHLER et al., 2017). Foi utilizado a representação boxplot, dos parâmetros utilizados na análise de componentes principais, para visualização de como os parâmetros do canto se apresentam nas diferentes populações. A visualização dos gráficos de boxplot permite identificar padrões e sobreposição na amplitude das populações analisadas. Para comparar os

parâmetros acústicos em estatística univariada, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença nas medianas em ao menos uma das populações e, posteriormente, para comparar todas as populações, par a par, foi utilizado o teste de Dunn.

Figura 1 – Populações amostradas de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi* utilizadas na análise comparativa do canto de anúncio. Siglas dos estados brasileiros (UF): São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES). Populações amostradas: Castelo (CAS) no Espírito Santo. Na Serra do Mar: Petrópolis (PET) localidade tipo de *Scinax hayii*, Bananal (BAN), São Luiz do Paraitinga (SLP), Mogi das Cruzes (MOG), e São Bernardo do Campo (SBC). Populações litorâneas: Mangaratiba (MAN), Paraty (PAR), Ubatuba (UBA), Ilhabela (ILB) e Peruíbe (PER). Na Serra da Mantiqueira: Maringá (MAR) localidade tipo de *S. dolloi*, Itamonte (ITA), Campos do Jordão (CAJ), Santo Antonio do Pinhal (SAP), Camanducaia (CAM) e Jundiaí (JUN).



Fonte: elaborado pelo autor.

7 RESULTADOS

7.1 Descrição do canto de anúncio de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi*

O canto de anúncio de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi* consiste de uma nota formada por uma sequência de definidos pulsos. As notas comumente apresentam modulação ascendente, tendo os pulsos iniciais menor faixa de frequência. Os pulsos são separados por curtos intervalos, algumas vezes chegando a serem justapostos. A frequência dominante em algumas populações pode ser encontrada em duas faixas (não concomitantes), na maioria das vezes, é registrada na faixa mais baixa (1ª faixa) (cerca de 70% das notas). A nota é a unidade central do canto de anúncio podendo ser emitida uma única vez, ou em séries compostas por números irregulares e intervalos sem padrão definido. Os resultados das análises (valores dos parâmetros do canto) são apresentados na Tabela 1, na forma de amplitude (mínimo – máximo), média seguida de desvio padrão e coeficiente de variação (%). Espectrogramas e oscilogramas do canto de anúncio das populações de *Scinax hayii* e *S. dolloi* amostradas encontram-se na Figura 2 e Figura 3 respectivamente.

Tabela 1 – Parâmetros espectrais e temporais do canto de anúncio de populações de *Scinax hayii*, *Scinax dolloi*. Topótipos estão destacadas. Os resultados são apresentados na forma de amplitude, média seguida de desvio padrão e coeficiente de variação (%). Faixa de frequência (FF), Frequência mínima (FMIN), Frequência máxima (FMAX), Frequência dominante (FD), duração da nota (DN), número de pulsos por nota (NP), duração dos pulsos (DP), intervalo entre pulsos (IEP), taxa de repetição das notas (TRN) e taxa de repetição dos pulsos (TRP).

Localidade (n=cantos analisados)	FF (Hz)	FMIN (Hz)	FMAX (Hz)	FD (Hz)	DN (ms)	NP	DP (ms)	IEP (ms)	TRN (notas/minuto)	TRP (pulsos/segundo)
<i>Scinax hayii</i> Petrópolis (n=212)	1095 – 4033	1095 – 1227 (1161 ± 27) 2%	3331 – 4033 (3662 ± 125) 3%	1ª 1149 – 2102 (1455 ± 219) 15% 2ª 2956 – 3235 (3124 ± 99) 3%	163 – 310 (263 ± 20) 7%	13 – 19 (16 ± 1) 7%	7 – 16 (13 ± 1,3) 10%	1 – 7 (3 ± 1,3) 45%	15 – 59 (23 ± 11) 49%	0,055–0,068 (0,061±0,001) 2%
<i>Scinax hayii</i> São Luiz do Paraitinga (n=158)	1131 – 4383	876 – 1315 (1131 ± 118) 10%	2542 – 4383 (3597 ± 380) 11%	1ª 1068 – 2195 (1510 ± 247) 16% 2ª 2885 – 2981 (2933 ± 68) 2%	195 – 451 (282 ± 47) 17%	14 – 27 (18 ± 2) 11%	8 – 15 (12 ± 2) 15%	1 – 5 (3 ± 1) 37%	15 – 29 (21 ± 4) 21%	0,059 – 0,076 (0,066 ± 0,006) 10%
<i>Scinax hayii</i> Bananal (n=40)	869 – 4491	869 – 1183 (1019 ± 83) 9%	3658 – 4491 (4033±155) 4%	1842 – 3307 (2910± 710) 23%	200 – 260 (229 ± 26) 11%	14 – 16 (15 ± 1) 9%	8 – 14 (12 ± 2) 15%	2– 6 (4 ± 1) 30%	52– 80 (65 ± 8) 13%	0,064 – 0,067 (0,065 ± 0,002) 4%

Tabela 1 – Continuação.

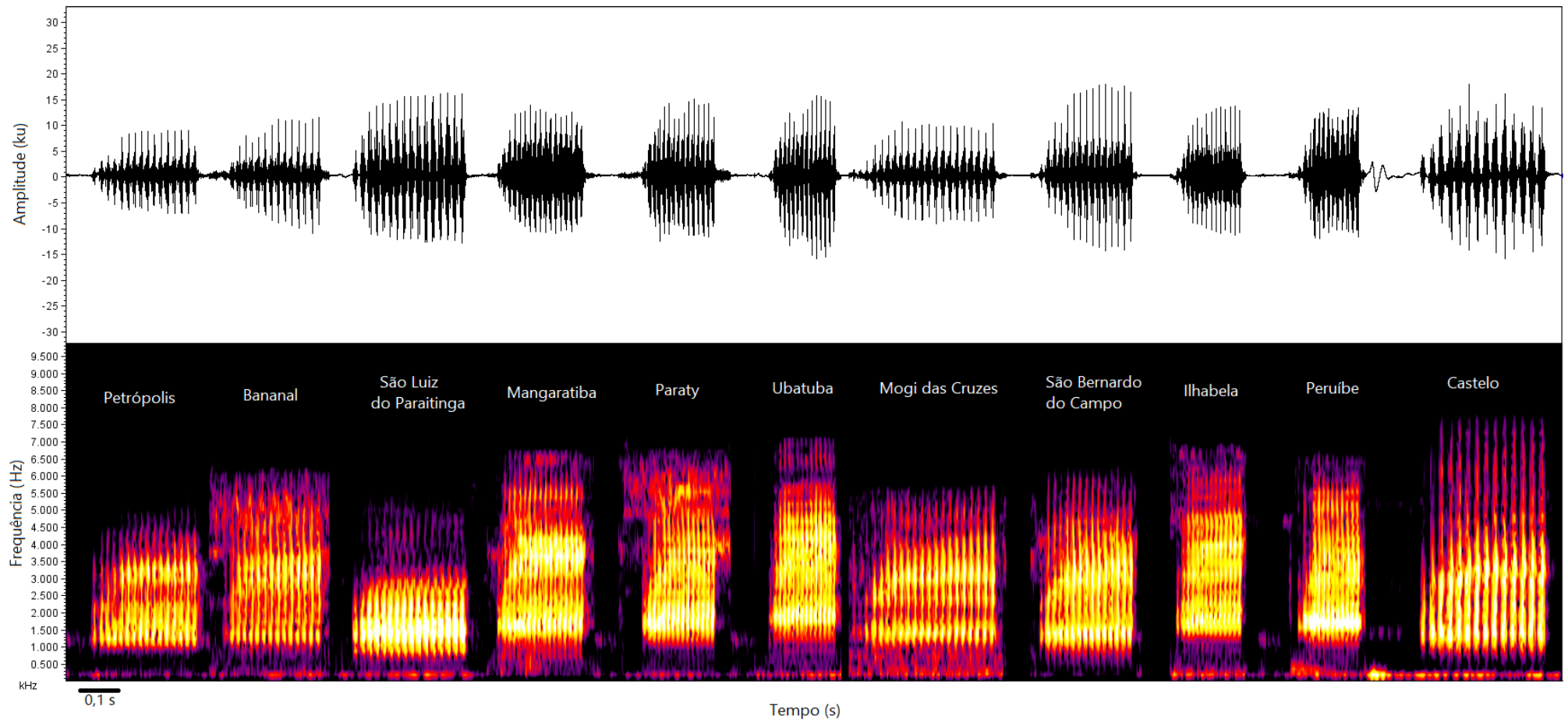
<i>Scinax hayii</i> Mogi das Cruzes (n=80)	897–4392	897–1179 (1046 ± 61) 6%	3454 – 4392 (3931 ± 213) 5%	1378 – 1550 (1400 ± 57) 4%	223 – 373 (306 ± 37) 12%	13 – 22 (18 ± 2) 12%	9 – 14 (11 ± 2) 13%	3 – 9 (5 ± 2) 32%	27 – 48 (33 ± 7) 20%	0,056 – 0,064 (0,059 ± 0,001) 2%
<i>Scinax hayii</i> São Bernardo do Campo (n=70)	818 – 4424	818 – 1042 (969 ± 40) 4%	3309 – 4424 (4082 ± 216) 5%	1378–1550 (1427±79) 6%	196 – 311 (257±26) 10%	14–20 (17±2) 9%	7–16 (12±2) 12%	1–5 (3±1) 27%	7–24 (15±5) 33%	0,063–0,079 (0,067±0,004) 6%
<i>Scinax hayii</i> Mangaratiba (n=70)	1097– 4895	1097–1372 (1225 ± 62) 5%	3926 – 4925 (4337 ± 219) 5%	1378–1727 (1586± 83) 5%	149 –223 (193 19) 9%	12–17 (15±2) 10%	7–14 (11±2) 14%	1–5 (3±1) 44%	15–60 (34±14) 42%	0,071–0,081 (0,077±0,002) 3%
<i>Scinax hayii</i> Paraty (n=80)	1115 – 5301	1115 – 1506 (1337 ± 80) 6%	3968 – 5301 (4658 ± 293) 6%	1608 – 1895 (1724 ± 58) 3%	153 – 258 (201 ± 22) 11%	13 – 21 (17 ± 2) 10%	7 – 15 (10 ± 2) 16%	0 – 5 (2 ± 1) 58%	13 – 30 (20 ± 5) 26%	0,077–0,088 (0,084±0,002) 3%
<i>Scinax hayii</i> Ubatuba (n=90)	1358 – 5786	1358 – 1665 (1576 ± 76) 5%	4427 – 5786 (4894 ± 301) 6%	1 ^a 1657 – 2189 (1801 ± 106) 6% 2 ^a 3172 – 4188 (3388 ± 228) 7%	127 – 192 (158 ± 15) 10%	12 – 17 (14 ± 1) 10%	6 – 11 (8 ± 1) 13%	1 – 4 (2 ± 1) 41%	10 –37 (22 ± 8) 37%	0,087 – 0,092 (0,090 ± 0,001) 2%
<i>Scinax hayii</i> Ilhabela (n=128)	1142 – 5224	1142–1505 (1361± 57) 4%	4371–5524 (4815±195) 4%	1580–1975 (1799 ±107) 6%	144 – 217 (183 ±14) 8%	12–19 (16± 1) 8%	5–12 (8± 2) 22%	0–5 (3± 1) 49%	13–32 (19± 6) 34%	0,081–0,093 (0,087 ±0,001) 2%
<i>Scinax hayii</i> Peruíbe (n=116)	1214 –4759	1214 – 1457 (1318 ± 63) 5%	4176 –4759 (4440 ± 146) 3%	1617 – 1832 (1714 ± 38) 2%	138 –235 (184± 21) 11%	12– 20 (16 ±2) 12%	6 –13 (10 ±2) 17%	0 – 5 (2 ± 1) 53%	18– 35 (27 ±7) 25%	0,081– 0,089 (0,085 ±0,001) 2%
<i>Scinax hayii</i> Castelo (n=80)	905–4869	905 – 1221 (1052 ± 83) 8%	3372 – 4869 (3947 ± 363) 9%	1205 –1378 (1369 ± 38) 3%	196 – 331 (258 ± 35) 13%	12±1,8 (9–15) 14%	15±2 (11–18) 12%	7 ± 2 (3 – 10) 29%	20 –44 (36± 9) 25%	0,47±0,001 (0,044–0,049) 3%

Tabela 1 – Continuação.

<i>Scinax dolloi</i> Maringá (n=115)	836 – 5589	836 – 1188 (1014 ± 73) 7%	3785 – 5589 (4646 ± 414) 9%	1358 – 1448 30)	(1390 ± 2%)	212 – 343 (277 ± 27) 9%	10 – 14 (12 ± 1) 7%	11 – 23 (18 ± 3) 17%	1 – 7 (4 ± 2) 47%	24 – 52 (39 ± 11) 29%	0.038 – 0.051 (0.044 ± 0.003) 8%
				1ª 1011 – 1294 (1159±68) 6%							
<i>Scinax dolloi</i> Itamonte (n=103)	671 – 4601	671 – 910 (789± 67) 9%	3634– 4601 (4062 ±180) 4%	2ª 2522 – 2741 (2605± 66) 3%	251– 420 (345± 43) 13%	10– 15 (13 ±1) 9%	13 –23 (20± 2) 12%	2 –9 (5 ±2) 36%	33– 40 (37± 3) 8%		0,035 –0,041 (0,038 ±0,001) 5%
				1ª 979 – 2542 (1433 ± 418) 29%							
<i>Scinax dolloi</i> Campos do Jordão (n=170)	701 – 4252	701 – 1139 (998 ± 108) 11%	3024 – 4252 (3427 ± 266) 8%	2ª 2518 – 3082 (2853 ± 146) 5%	211 – 447 (299 ± 49) 16%	11 – 21 (15 ± 2) 13%	8 – 23 (15 ± 3) 18%	1 – 10 (4 ± 1) 39%	35 – 70 (50 ± 10) 21%		0,040 – 0,071 (0,52 ± 0,004) 9%
				1ª 1237 – 1895 (1639 ± 318) 19%							
<i>Scinax dolloi</i> Santo Antônio do Pinhal (n=62)	659 – 3991	659 – 1110 (892 ± 135) 15%	3024 – 3991 (3428 ± 256) 8%	2ª 2240 – 3044 (2524 ± 276) 10%	199 – 403 (277 ±46) 17%	12 – 21 (16 ± 2) 12%	7 – 14 (12 ± 1) 12%	3 – 10 (5 ± 1) 26%	36 – 72 (53 ± 11) 21%		0,052 – 0,061 (0,057 ± 0,003) 6%
<i>Scinax dolloi</i> Camanducaia (n=40)	760 – 3970	760 – 991 (872 ± 68) 8%	3022 – 3970 (3580 ± 269) 8%	2584 – 2930 (2831 ± 125) 4%	200 – 390 (303 ± 59) 20%	11 – 18 (14 ± 2) 15%	9 – 19 (14 ± 2) 16%	2 –13 (6 ± 3) 48%	30 – 48 (38 ± 6) 15%		0,041 – 0,055 (0,047 ± 0,004) 9%
<i>Scinax dolloi</i> Jundiá (n=72)	600 – 4966	600 – 1202 (887 ± 118) 13%	3842 – 4966 (4327 ± 249) 6%	1313 – 3750 (2591 ± 920) 36%	154 – 403 (248 ± 54) 22%	12 – 22 (16 ± 2) 15%	8 – 15 (12 ± 2) 15%	2 – 8 (5 ± 2) 29%	18 – 39 (28 ± 7) 26%		0,055 – 0,079 (0,067 ± 0,006) 10%

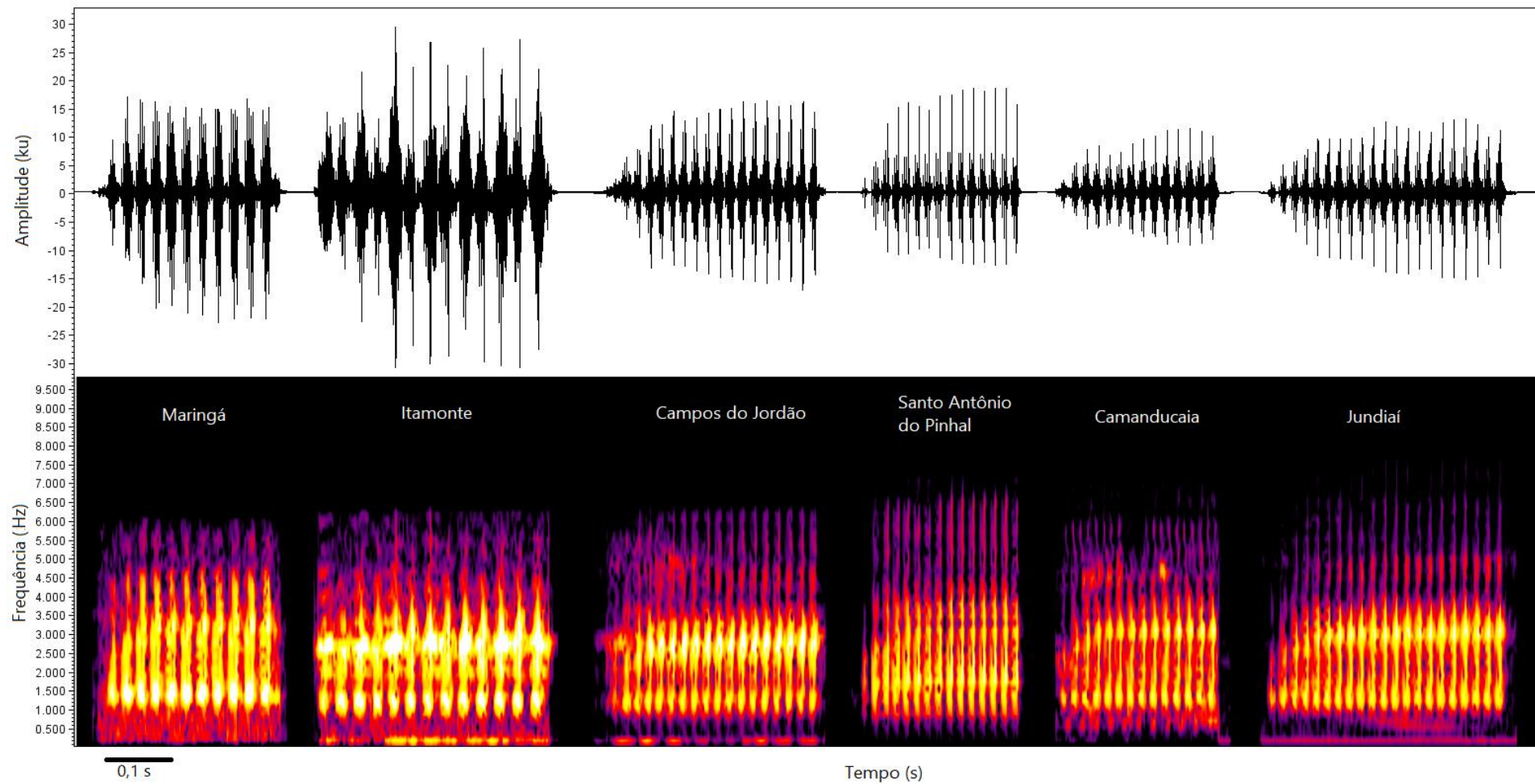
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Oscilograma (acima) e espectrograma (abaixo) do canto de anúncio de diferentes populações de *Scinax hayii*. Temperatura do ar no momento da gravação: Petrópolis (RJ) 17°C, Bananal (SP) 17°C, São Luiz do Paraitinga (SP) 18°C, Mangaratiba (RJ) 22°C, Paraty (RJ) 23°C, Ubatuba (SP) 28°C, Mogi dasCruzes (SP) 17°C, São Bernarndo do Campo (SP) 17°C, Ilhabela (SP) 21°C, Peruíbe (SP) 21°C, Castelo (ES) 19°C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Oscilograma (acima) e espectrograma (abaixo) do canto de anúncio de *Scinax dolloi* registrado em diferentes localidades. Temperatura do ar: Maringá (RJ) – localidade tipo – 17°C; Itamonte (MG) 12°C; Campos do Jordão (SP) 17°C; Santo Antônio do Pinhal (SP) 16°C; Camanducaia (MG) 17°C; Jundiaí (SP) 17°C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.1.1 Comparações bioacústicas em populações de *Scinax hayii*

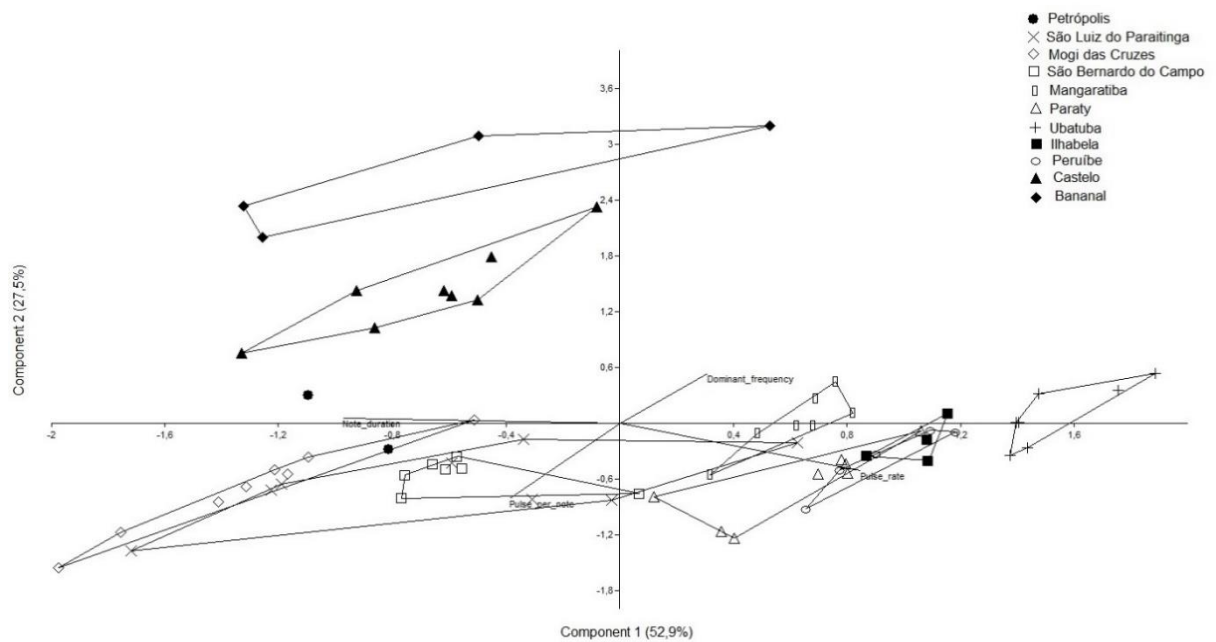
Foi realizada uma análise de componentes principais (ACP) utilizando frequência dominante, duração da nota, número de pulsos por nota e taxa de repetição dos pulsos para comparar as populações. Os parâmetros frequência mínima, frequência máxima, duração dos pulsos e intervalo entre pulsos foram excluídos desta análise pois apresentaram índice de Jolliffe cut-off menor que 0,7. Os dois principais componentes somados explicam 80,4% da variação entre as populações. O componente principal 1(eixo x) representa 52,9% da variação encontrada, e o componente principal 2 (eixo y) foi responsável por 27,5% (Figura 4). No componente principal 1 a frequência dominante é o principal parâmetro acústico responsável pela variação encontrada entre as populações (*correlation*= 0,9989), seguida da duração da nota (- 0,3681), taxa de repetição dos pulsos de pulsos (0,3298) e o número de pulsos (-0,1185). Valores de importância “*loadings*” dos parâmetros utilizados e sua importância em cada componente principal da análise encontram-se na Tabela 2.

O uso do boxplot (Figura 5) como estatística descritiva para os parâmetros utilizados na análise de componentes principais permitiu visualizar como a amplitude de valores de cada parâmetro estão apresentados nas diferentes populações, revelando um gradiente entre as populações da Serra do Mar e a planície litorânea.

As populações da porção norte da Serra do Mar (Petrópolis e São Luiz do Paraitinga) apresentam maior duração da nota, menor frequência dominante, e menor taxa de repetição dos pulsos em relação as populações localizadas ao sul da Serra do Mar e também em comparação com as populações registradas na planície litorânea (do sul do Rio de Janeiro ao Sul do estado de São Paulo) (Figura 5).

As populações de Castelo, Espírito Santo e Bananal, São Paulo apresentaram maior divergência acústica entre as populações de *Scinax hayii* amostradas, evidenciados principalmente na frequência dominante e taxa de repetição dos pulsos (Figura 5A e D).

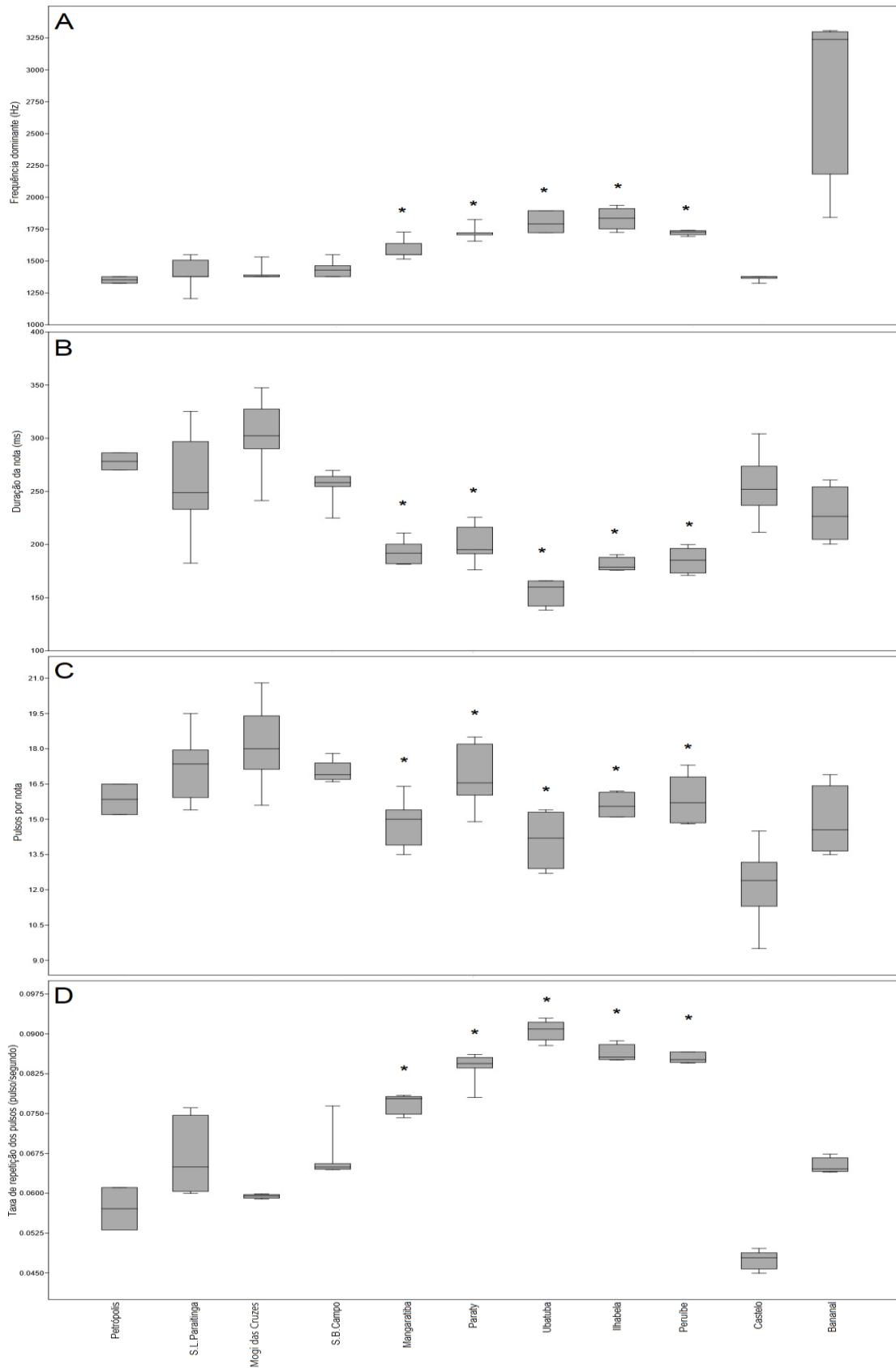
Figura 4 – Análise de componentes principais utilizando os parâmetros bioacústicos frequência dominante, duração da nota, número de pulsos e taxa de repetição dos pulsos em onze populações de *Scinax hayii*. O componente principal 1 (eixo x) é responsável por 52,9% e o componente 2 (eixo y) 27,5% da variação entre as populações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5. Boxplot dos parâmetros acústicos (A) duração da nota (ms), (B) frequência dominante (Hz), (C) número de pulsos por nota e (D) taxa de repetição dos pulsos (pulsos por segundo) em populações de *Scinax hayii*. Box representam 1º e 3º quartis, linha central

representa a mediana; linhas verticais representam valores de amplitude (mínimos e máximos) amostrados. Populações litorâneas estão destacadas com asterisco (*).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Matriz de importância dos parâmetros bioacústicos utilizados na análise de componentes principais de populações de *Scinax hayii*. Componente principal (PC).

Parâmetros	PC1	PC2	PC3	PC4
Frequência dominante	0,9989	-0,005541	1,79E-06	1,53E-12
Duração da nota	-0,3681	-0,9298	0,00078	1,65E-08
Pulsos por nota	-0,1185	-0,4881	-0,8647	-5,68E-06
Taxa de repetição dos pulsos	0,3298	0,7241	-0,5747	0,1915

O teste de Kruskal-Wallis realizado para comparar os parâmetros nas diferentes populações revela que em todos os parâmetros analisados ao menos uma das populações possui diferença significativa em suas medianas (Frequência dominante $H=57,35$ e $p=0,000$; duração da nota $H=55,13$ e $p=0,000$; número de pulsos $H=48,28$ e $p=0,000$; taxa de repetição dos pulsos $H=63,54$ e $p=0,000$). O teste de Dun comparando a populações par a par mostra que as populações da Serra do Mar diferem significativamente em quase todas as populações da planície litorânea na frequência dominante, duração da nota e taxa de repetição dos pulsos. Valores do teste de Dunn aplicados para comparar as populações são apresentados na Tabela 3 A–D.

Tabela 3 – Valores do teste de Dunn utilizado para comparações par a par entre as populações de *Scinax hayii*. Em **A** comparações entre frequência dominante, **B** duração da nota, **C** número de pulsos e **D** taxa de repetição dos pulsos. Valores de p significativo (<0,05) são destacados em cinza.

A	Petrópolis	S. L. do Paraitinga	Mogi das Cruzes	S. B. do Campo	Mangaratiba	Paraty	Ubatuba	Ilhabela	Peruíbe	Castelo	Bananal
Petrópolis											
S. L. do Paraitinga	0,5425										
Mogi das Cruzes	0,5318	0,9795									
S. B. do Campo	0,3495	0,6036	0,6211								
Mangaratiba	0,06556	0,05454	0,05774	0,1742							
Paraty	0,01327	0,003149	0,003421	0,01962	0,3522						
Ubatuba	2,19E-03	0,000136	0,000151	0,001418	0,06691	0,336					
Ilhabela	0,003028	0,000657	0,00071	0,003734	0,08167	0,3193	0,8583				
Peruíbe	0,01304	0,005122	0,005491	0,02342	0,3048	0,8341	0,518	0,4647			
Castelo	0,8296	0,5335	0,5168	0,2624	0,0116	0,00035	1,00E-05	9,03E-05	0,000822		
Bananal	0,000765	7,10E-05	7,75E-05	0,000555	0,02178	0,1183	0,4644	0,624	0,2121	7,42E-06	

B	Petrópolis	S. L. do Paraitinga	Mogi das Cruzes	S. B. do Campo	Mangaratiba	Paraty	Ubatuba	Ilhabela	Peruíbe	Castelo	Bananal
Petrópolis											
S. L. do Paraitinga	0,554										
Mogi das Cruzes	0,743	0,146									
S. B. do Campo	0,6234	0,8862	0,2071								
Mangaratiba	0,03384	0,01715	0,000152	0,01443							
Paraty	0,05298	0,03367	0,000346	0,02816	0,7402						
Ubatuba	0,001161	3,65E-05	3,15E-08	3,54E-05	0,09112	0,03785					
Ilhabela	0,01418	0,006838	9,95E-05	0,00577	0,5001	0,3319	0,4434				
Peruíbe	0,01932	0,008988	0,000101	0,007585	0,6623	0,4535	0,2689	0,8035			
Castelo	0,5757	0,9597	0,1605	0,9249	0,015	0,02966	2,95E-05	0,006034	0,007887		
Bananal	0,3	0,4827	0,05888	0,4214	0,1997	0,3019	0,006467	0,08285	0,1142	0,4573	

Tabela 3 – continuação.

C	Petrópolis	S. L. do Paraitinga	Mogi das Cruzes	S. B. do Campo	Mangaratiba	Paraty	Ubatuba	Ilhabela	Peruíbe	Castelo	Bananal
Petrópolis											
S. L. do Paraitinga	0,3155										
Mogi das Cruzes	0,139	0,4518									
S. B. do Campo	0,327	0,9882	0,4582								
Mangaratiba	0,4585	0,007325	0,000653	0,009818							
Paraty	0,4741	0,6489	0,2272	0,6708	0,02497						
Ubatuba	0,2745	0,001254	7,71E-05	0,001875	0,598	0,00533					
Ilhabela	0,8323	0,1106	0,02713	0,122	0,512	0,2211	0,269				
Peruíbe	0,9398	0,1329	0,03056	0,147	0,3644	0,2698	0,165	0,8579			
Castelo	0,07067	8,79E-06	2,02E-07	1,87E-05	0,1068	6,61E-05	0,2855	0,04194	0,01659		
Bananal	0,5445	0,03133	0,005654	0,03652	0,9116	0,07489	0,5751	0,6292	0,4914	0,1398	

D	Petrópolis	S. L. do Paraitinga	Mogi das Cruzes	S. B. do Campo	Mangaratiba	Paraty	Ubatuba	Ilhabela	Peruíbe	Castelo	Bananal
Petrópolis											
S. L. do Paraitinga	0,3967										
Mogi das Cruzes	0,9236	0,1357									
S. B. do Campo	0,3676	0,9194	0,123								
Mangaratiba	0,1128	0,2452	0,00923	0,3043							
Paraty	0,02516	0,02781	0,000223	0,04296	0,3355						
Ubatuba	0,001662	0,000348	5,21E-07	0,000764	0,01937	0,1466					
Ilhabela	0,01477	0,01859	0,000355	0,02669	0,1803	0,5772	0,513				
Peruíbe	0,01668	0,01941	0,000266	0,02879	0,2118	0,6832	0,3757	0,8712			
Castelo	0,5018	0,0163	0,3627	0,01544	0,000496	4,18E-06	3,68E-09	1,60E-05	8,82E-06		
Bananal	0,5019	0,8851	0,283	0,8222	0,271	0,05229	0,001969	0,0305	0,03414	0,06924	

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.1.2 Comparações bioacústicas em populações de *Scinax dolloi* na Serra da Mantiqueira

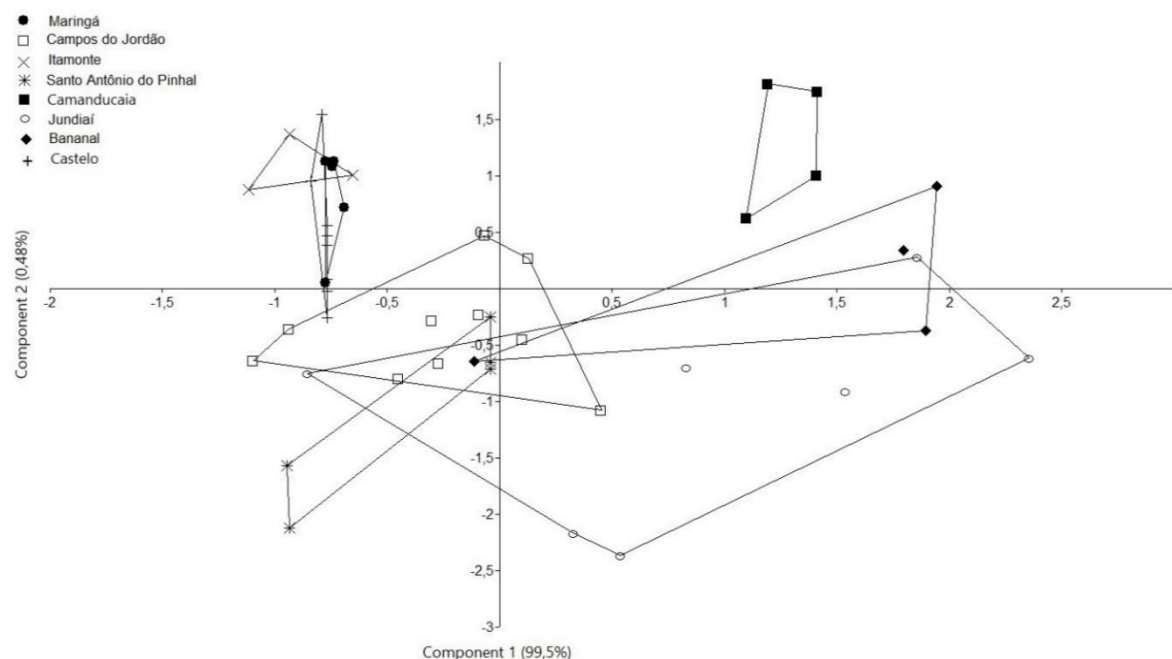
Os parâmetros utilizados para a realização da análise de componentes principais foram: frequência dominante (FD), duração da nota (DN), número de pulsos (NP) e taxa de repetição dos pulsos (PR). A frequência mínima e frequência máxima, apesar de algumas vezes representarem caracteres estáticos (veja Tabela 1), foram excluídas das análises devido pouca influência nas comparações (valor abaixo de 0,7 no índice Jolliffe cut-off). O componente principal 1 (eixo x) representa 99,5% da variação encontrada entre as populações de *Scinax dolloi* amostradas na Serra da Mantiqueira, *S. hayii* Bananal (Serra da Bocaina) e *S. hayii* Castelo (Espírito Santo) (Figura 6). Sendo o parâmetro frequência dominante o mais influente (*correlation* = 0,9999). O componente principal 2 (eixo y) é responsável por 0,48% da variação sendo a duração da nota o parâmetro com maior influência para esse componente (*correlation* = 0,975). Valores de importância dos parâmetros acústicos em cada componente principal são amostrados na Tabela 4.

O uso do boxplot revela forte sobreposição entre as populações estudadas na Serra da Mantiqueira em relação a duração da nota. Analisando a frequência dominante, nota-se a formação de dois grupos com valores aproximados: um incluindo os topotipos (Maringá), e exemplares de Itamonte, Castelo, Campos do Jordão e Santo Antônio do Pinhal; outro incluindo populações de Jundiaí e Camanducaia, juntamente com Bananal (este localizado na Serra da Bocaina) (Figura 7A). A população de Jundiaí e Bananal apresentaram valores próximos nos parâmetros do canto de anúncio analisados.

Além disso, em relação a populações distribuídas de norte a sul, as populações mais próximas apresentam maior semelhança nos parâmetros do canto, Maringá (localidade tipo) juntamente com Castelo, na região norte, e Jundiaí na porção sul, constituindo-se pontos opostos de uma clina com parâmetros bioacústicos divergentes (Figura 6 e Figura 7). A

população de Bananal, localizada na Serra da Bocaina apresentou sobreposição nos parâmetros do canto em relação aos valores amostrados para as populações da Serra da Mantiqueira.

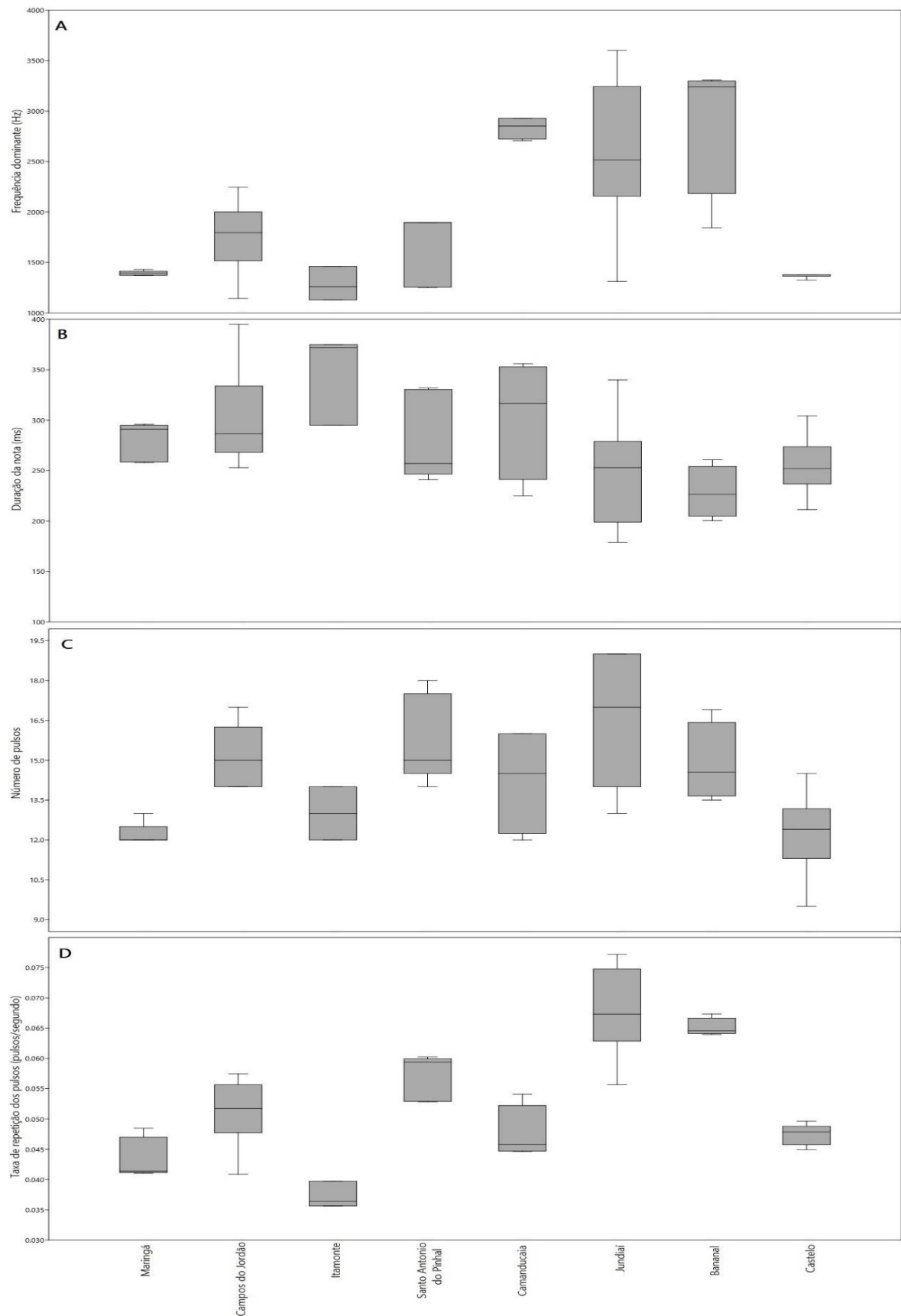
Figura 6 – Análise de componentes principais em populações de *Scinax dolloi* (Maringá, Itatiaia, RJ localidade tipo; Itamonte e Camanducaia no estado de Minas Gerais; Campos do Jordão, Santo Antônio do Pinhal, Jundiaí e Bananal no estado de São Paulo; Castelo, Espírito Santo) utilizando os parâmetros bioacústicos frequência dominante, duração da nota, número de pulsos e taxa de repetição. O componente principal 1 representado no eixo x é responsável por 99,5% da variação encontrada, já o componente 2 (eixo y) representa 0,48% da variação encontrada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Boxplot dos parâmetros acústicos (A) frequência dominante (Hz= Hertz), (B) duração da nota (ms= milissegundos), (C) número de pulsos por nota e (D) taxa de repetição dos pulsos (pulsos/segundo) em populações de *Scinax dolloi* e *Scinax hayii* de Bananal (SP) e

Castelo (ES). Box representam 1º e 3º quartis, linha central representa a mediana; linhas horizontais representam valores de amplitude amostrados (mínimos e máximos).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Matriz de importância dos parâmetros acústicos utilizados na análise de componentes principais em populações de *Scinax dolloi*, e *S. hayii* de Bananal (SP) e Castelo (ES). Componente principal (PC).

	PC1	PC2	PC3	PC4
Frequência dominante	0.9999	0.0010913	-3,82E-03	-4,43E-08
duração da nota	-0.2195	0.97561	-0.00069139	7,70E-06
pulsos por nota	0.42376	0.47941	0.7685	-3,45E-02
taxa de repetição dos pulsos	0.60508	-0.51841	0.56162	0.22296

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de Kruskal-Wallis realizado mostra que há diferença significativa nos parâmetros acústicos comparados em pelo menos uma das populações estudadas (Frequência dominante $H= 19,73$ e $p= 0,006$; duração da nota $H= 17,46$ e $p=0,01463$; pulsos por nota $H= 26,54$ e $p=0,0003$; taxa de repetição dos pulsos $H=36,03$ e $p= 7,15E-03$). O teste de Dunn para a frequência dominante revela diferença significativa entre as populações de Maringá, Itamonte, Castelo e Santo Antônio do Pinhal para as populações de Camanducaia, Jundiaí, Bananal. Os cantos amostrados para Santo Antônio do Pinhal diferem significativamente dos topositos de *S. dolloi* (Maringá e Itamonte) no número de pulsos por nota e na taxa de repetição dos pulsos (Veja tabela 5C e D). A população de Campos do Jordão apresentou diferença significativa em relação a população de Maringá no número de pulsos por nota, e em relação a taxa de repetição dos pulsos amostrados para a população de Itamonte (Veja Tabela 5C e D). A população de Bananal (localizada na Serra da Bocaina) possui maior semelhança com a população de Jundiaí não apresentando diferença significativa em nenhum dos parâmetros acústicos comparados. A população de Castelo, ES, não apresenta diferenças significativas com *S. dolloi* de Maringá em nenhum dos parâmetros acústicos analisados. Valores do teste de Dunn para comparações pareadas entre as populações amostradas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores do teste de Dunn utilizado para comparações par a par entre as populações de *Scinax dolloi*. Em **A** comparações entre frequência dominante, **B** duração da nota, **C** número de pulsos e **D** taxa de repetição dos pulsos. Valores de p significativo (<0,05) são destacados em cinza.

A	Maringá	C._do_Jordão	Itamonte	S._A._Pinhal	Camanducaia	Jundiaí	Bananal	Castelo
Maringá								
C._do_Jordão	0.5208							
Itamonte	0.2508	0.0792						
S._A._Pinhal	0.987	0.5086	0.2564					
Camanducaia	0.03947	0.08145	0.004918	0.03804				
Jundiaí	0.0448	0.09487	0.005041	0.04292	0.6947			
Bananal	0.04787	0.09869	0.006055	0.04619	0.9398	0.7601		
Castelo	0.8166	0.298	0.2896	0.8309	0.01278	0.009615	0.01637	

B	Maringá	C. do Jordão	Itamonte	S. A. Pinhal	Camanducaia	Jundiaí	Bananal	Castelo
Maringá								
C. do Jordão	0.5864							
Itamonte	0.1781	0.2977						
S. A. Pinhal	0.7062	0.3274	0.09429					
Camanducaia	0.7432	0.8948	0.3173	0.4946				
Jundiaí	0.1638	0.02387	0.00914	0.3245	0.09864			
Bananal	0.05126	0.006647	0.002702	0.111	0.03077	0.4322		
Castelo	0.189	0.02732	0.0105	0.3706	0.1137	0.8977	0.3615	

Tabela 5 – continuação.

C	Maringá	C. do Jordão	Itamonte	S. A. Pinhal	Camanducaia	Jundiaí	Bananal	Castelo
Maringá								
C. do Jordão	0.001597							
Itamonte	0.5031	0.05963						
S. A. Pinhal	0.00245	0.7326	0.0507					
Camanducaia	0.08991	0.3176	0.3957	0.2459				
Jundiaí	0.0003725	0.4713	0.02082	0.7744	0.1311			
Bananal	0.02335	0.7255	0.1765	0.5562	0.5875	0.3693		
Castelo	0.6271	0.002206	0.7541	0.004039	0.1599	0.0004806	0.04216	

D	Maringá	C. do Jordão	Itamonte	S. A. Pinhal	Camanducaia	Jundiaí	Bananal	Castelo
Maringá								
C. do Jordão	0.07932							
Itamonte	0.4262	0.01914						
S. A. Pinhal	0.01023	0.2261	0.002531					
Camanducaia	0.5267	0.3646	0.1879	0.07377				
Jundiaí	7,77E-02	0.006052	2,73E-02	0.2389	0.002578			
Bananal	0.0007965	0.02936	0.00021	0.3509	0.009842	0.9189		
Castelo	0.3724	0.34	0.1075	0.05035	0.8911	0.0004863	0.004458	

Fonte: Elaborado pelo autor.

8 DISCUSSÃO

Wright (1943) propôs um modelo de isolamento por distância, em que o aumento da distância entre as populações resulta em maior variação interpopulacional genética e fenotípica. Variações populacionais podem resultar de processos estocásticos que afetam a imigração e o fluxo gênico entre as populações (HUTCHINSON e TEMPLETON, 1999). Contudo, eventos históricos podem gerar barreiras geográficas, tal como montanhas e rios, levando ao isolamento de populações, fenômeno conhecido como “vicariant splitting” (GASCON, 1996; TODA et al., 1998).

Nossos resultados revelam que existe variação latitudinal no canto de anúncio, entretanto a maior variação é altitudinal, onde populações do litoral apresentam canto diferente em relação aos amostrados para a Serra do Mar. Populações de *Scinax hayii* da Serra do Mar e planície apresentam um sistema gradual em que a frequência dominante e taxa de repetição dos pulsos aumentam seus valores com o aumento da latitude. A duração da nota apresenta situação contrária diminuindo seus valores de acordo com a mudança geográfica.

As diferenças no canto de anúncio das populações do litoral em relação a Serra do Mar podem ser reflexo da adaptação ao ambiente, temperatura, que é maior em baixas altitudes e também ao tamanho corporal como ocorre em outras espécies (DUELLMAN e TRUEB, 1986; WELLS, 2007). Apesar da divergência no canto de anúncio, a geografia parece favorecer o fluxo gênico entre algumas das populações de serra e baixada. O litoral sul do Rio de Janeiro é a região onde a Serra do Mar mais se aproxima do oceano, e isso é mostrado na população de Mangaratiba que dentre as espécies analisadas do litoral é a que conserva mais semelhanças com as populações da Serra do Mar, não possuindo diferença significativa na frequência dominante em comparação com as populações de serra. As populações no litoral de São Paulo apresentam valores mais extremos diferindo das populações localizadas nas altitudes da serra.

Em comparação com topótipos de *Scinax dolloi*, a população de *S. hayii*, de Castelo, não apresentou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros do canto comparados. Em comparação com espécimes de Itamonte, MG, os cantos de Castelo diferem significativamente apenas na duração da nota. A população de Castelo apresenta semelhança nos parâmetros frequência dominante e duração da nota com as populações da Serra do Mar de *S. hayii*. Contudo, há diferenças significativas no número de pulsos e na taxa de repetição dos pulsos que difere a população de Castelo de praticamente todas as populações de *S. hayii* amostradas (Veja tabela 3C e D). Faria et al. (2013) relata que o número de pulsos foi o principal parâmetro responsável pela variação encontrada para diferentes populações de *Scinax squauirostris*. O número de pulsos e taxa de repetição dos pulsos diferem a população de Castelo das populações da Serra do Mar e, em comparação com as populações do litoral, difere quanto a frequência dominante e duração da nota. Assim consideramos que a população de Castelo possa ser considerada uma unidade acústica distinta de *Scinax hayii*, mas semelhante a *Scinax dolloi*.

Populações de *S. dolloi* também apresentam padrão de variação gradual nos caracteres acústicos. Populações consideradas como topotipos (Maringá e Itamonte, Brejo da Lapa, ambas na região de Itatiaia) apresentam vocalização semelhante, assim como a população de Castelo. As populações em direção sul apresentam variação gradual, com a população de Campos do Jordão apresentando valores mais próximos aos topótipos e Jundiá com valores mais distintos.

O padrão de clina também foi verificado por Hasegawa et al. (1999) para *Glandirana rugosa* (Temminck e Schlegel, 1838). Os autores verificaram que populações do norte do Japão apresentavam cantos de anúncio com menor duração e menor número de pulsos, sendo que estes parâmetros elevavam seus valores gradualmente nas populações amostradas ao sul. Os parâmetros taxa de repetição dos pulsos e frequência dominante não apresentaram variação significativa ao longo da distribuição para esta espécie. Assim Hasegawa et al. (1999) assumiram que parâmetros com grande variação refletem a consequência da distância entre as

populações, e também adaptação a fatores ambientais não identificados. A frequência dominante foi o parâmetro menos variável sendo uma característica conservada entre todas as populações. Nossos resultados para *S. dolloi* mostram que a duração da nota é o parâmetro que se encontra mais conservado entre as populações da Mantiqueira. Para as populações de *Scinax hayii* todos os parâmetros analisados têm mostrado diferenças significativas entre várias das populações amostradas. Embora alguns parâmetros ainda não tenham diferenças significativas, os caracteres acústicos revelam que existe variação em todos os parâmetros entre as populações. Diferenças significativas na frequência dominante, duração da nota e taxa de repetição dos pulsos sugerem a diferenciação entre populações da Serra do Mar com a planície litorânea.

A ocorrência de espécies consideradas típicas da Serra da Mantiqueira na Serra da Bocaina parece ser comum. Mesmo que divididas geograficamente, algumas espécies com ocorrência na Serra da Mantiqueira têm sido registradas na Serra da Bocaina (veja JUARES, 2011 e GAREY et al., 2014). A população de Bananal quando comparada com as populações de *S. hayii* da Serra do Mar apresentou semelhança na duração da nota e taxa de repetição dos pulsos, porém diferiu significativamente na frequência dominante e número de pulso por nota (veja Tabela 3). Em comparação com populações da Serra da Mantiqueira, os parâmetros analisados não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação a população de *S. dolloi* de Jundiaí. Portanto, a população de Bananal com base em análises bioacústicas pode ser tratar de uma população de *Scinax dolloi* ocorrendo fora dos domínios da Serra da Mantiqueira. Análises moleculares e morfológicas poderiam ajudar a elucidar essa problemática analisando se o padrão encontrado no canto se repete para o DNA.

Mudanças nos parâmetros ao longo da distribuição geográfica refletem adaptações ao ambiente, pressões seletivas locais e seleção sexual (MÁRQUEZ e BOSCH, 1997; GERHARDT, 2013; WILKINS et al., 2013). Essas mudanças são comuns, entretanto é preciso

testar receptores para avaliar se as variações são ainda reconhecíveis para a espécie, ou causou um deslocamento que afeta o reconhecimento específico (GERHARDT 2013).

Gerhardt (1991) propõe que caracteres que são estereotipados e sofrem pouca variação (entre machos ou entre estações reprodutivas) são chamados de estáticos, e promovem o reconhecimento específico, ao passo que caracteres que sofrem grande variação em séries de cantos, entre machos ou estações são chamados de dinâmicos e promovem a atratividade afetando o sucesso reprodutivo de machos.

O dinamismo dos caracteres pode ser testado em indivíduos ao longo do tempo (mesmo indivíduo em dias diferentes), entre indivíduos e também entre populações. Neste estudo o coeficiente de variação intra-populacional mostrou que alguns caracteres podem apresentar padrão dinâmico em algumas populações e estático em outras como a duração do canto, o número de pulsos e a frequência dominante. Entretanto, eles se mostraram bons caracteres para a comparação entre populações. Apesar de se mostrarem variáveis entre indivíduos da mesma população (coeficiente de variação $>10\%$) possuem valores estatisticamente diferentes entre populações.

A taxa de repetição dos pulsos é o parâmetro que apresenta coeficiente de variação estático em todas as populações analisadas. Para a comparação entre populações de *Scinax hayii* e também de *Scinax dolloi* é um parâmetro essencial. Este apresenta características conservadas entre os indivíduos da mesma população (baixo coeficiente de variação intra-populacional), e pela sua divergência, explica a variação encontrada entre as populações. Partindo do princípio proposto por Popov e Shuvalov (1977) e Gerhardt (1991) sobre a dinâmica de caracteres, a taxa de repetição de pulsos é um dos principais parâmetros que promove o reconhecimento específico para *Scinax hayii* e *Scinax dolloi*. Portanto, a utilização desse parâmetro para

comparação com outras espécies filogeneticamente próximas a *S. hayii* e *S. dolloi*, pode ajudar a elucidar questões de ordem taxonômica (KHÖLER et al., 2017).

A frequência dominante em populações de *Scinax hayii* e *S. dolloi* pode ser encontrada em duas regiões da nota não concomitantemente (veja MAGRINI et al., 2011; SANTOS e MARTINS 2017). Até o presente momento não ficou claro o motivo de um mesmo indivíduo colocar a maior energia do canto em diferentes regiões da nota. Uma hipótese é que essa estratégia poderia ser resposta de interação entre indivíduos e densidade populacional (WELLS, 2007). Contudo, esta foi refutada devido ao padrão de duas faixas ocorrer em alta e baixa densidade. Nas gravações de campo efetuadas em Petrópolis, apenas dois indivíduos interagindo, emitiram cantos com a frequência dominante ocorrendo na maioria das vezes na primeira faixa, e outras vezes, na segunda faixa. Em outras gravações onde indivíduos estavam em coros com maior densidade (como as realizadas em Mogi das Cruzes, São Bernardo e Paraty), a frequência dominante foi registrada em apenas uma região (1ª faixa). Uma segunda hipótese é que os machos das espécies de *Scinax*, registrados neste estudo, alternam a região onde colocam a maior energia do canto como uma forma de aumentar a atratividade do seu canto para fêmeas. Nossos resultados de coeficiente de variação, indicam a frequência dominante como um parâmetro dinâmico que reflete a qualidade dos machos, bem como seu tamanho, e sofre seleção de fêmeas que procuram cantos atrativos selecionando valores extremos em comparação à média populacional (GERHARDT, 1991; MÁRQUEZ e BOSCH, 1997; GERHARDT, 2013). Seria conveniente para machos alterarem sua frequência dominante em resposta às fêmeas aumentado sua atratividade. Todavia todas essas afirmações ainda têm viés especulativo e outros testes (como os de playback) são necessários para entender a função dos parâmetros acústicos na comunicação intraespecífica e interespecífica.

Análises bioacústicas realizadas em diferentes populações de *S. hayii* e *S. dolloi* revelam que o canto é um fenótipo variável, que sofre modificações ao longo da distribuição geográfica

da espécie. Populações mais próximas geralmente apresentam características semelhantes, ao passo que populações mais distantes sofrem efeito de isolamento por distância, além de provavelmente sofrerem adaptações ao meio abiótico e seleção sexual intra e interespecífica, causando deslocamento de alguns parâmetros do canto (como ocorre nas populações da planície litorânea).

Os caracteres utilizados para a comparação das populações de *S. hayii* e *S. dolloi* são importantes para entender um pouco mais da história evolutiva dessas espécies bem como serem utilizados para identificação e diferenciação de táxons. As populações de *S. hayii* e *S. dolloi* necessitam de uma análise integrativa utilizando mais caracteres para avaliar se a variação acústica encontrada é refletida da mesma forma em outros caracteres como a morfologia e o DNA, representando unidades taxonômicas distintas.

REFERÊNCIAS

- BLAIR, W. F. Mating Call in the Speciation of Anuran Amphibians. **The American Naturalist**. n. 92, (862) p. 27–51, 1958.
- CARAMASCHI, U.; NUNES, I., NASCIMENTO, L. B.; CARVALHO Jr.; R. R. The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae). **Zootaxa**. n. 3691 (2), p. 299–300, 2013.
- CARDOSO, A. J.; ANDRADE, G. V. Descrição de larvas e biologia de quatro espécies de *Hyla* (Amphibia, Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, ano 51, n. 2, p. 391 – 402, 1991.
- COCHRAN, D. M. Frogs of Southeastern Brazil. **Bulletin of the United States National Museum**. 206: 423p. 1955.
- CONTE, C. E.; ARAUJO-VIEIRA, K.; CRIVELLARI, L. B.; BERNECK B. M. A new species of *Scinax* Wagler (Anura: Hylidae) from Paraná, southern Brazil. **Zootaxa**. n. 4193, p. 245–265, 2016.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p. 1986.
- FARIA, D. C. C.; SIGNORELLI, L.; MORAIS, A. R.; BASTOS, R. P.; MACIEL, N. M. Geographic structure and acoustic variation in populations of *Scinax squalirostris* (A. Lutz, 1925) (Anura: Hylidae) **North-Western Journal of Zoology**. n. 9 (2): art.131514, 2013.
- FROMMOLT, K. H. Sidebands – facts and artifacts. **Bioacoustics**. n. 10, p. 219–224, 1999.
<https://doi.org/10.1080/09524622.1999.9753432>
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database. Accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Scinaxinae>. 2020.
- GAREY, M. V.; PROVETE, D. B.; MARTINS, I. A.; HADDAD C. F. B.; ROSSA-FERES, D. C. Anurans from the Serra da Bocaina National Park and surrounding buffer area, southeastern Brazil. **Check List**. n. 10(2), p. 308–316, 2014.
- GASCON, C. Amphibian litter fauna and river barriers in flooded and non-flooded Amazonian rain forests. **Biotropica**. n. 28, p. 136–140, 1996.
- GERHARDT, H. C. Female choice in treefrogs: Static and Dynamic Acoustic Criteria. **Animal Behaviour**, 42:615–636, 1991.
- GERHARDT, H. C. The evolution of vocalization in frogs and toads. **Annual Review Ecology and Systematics**. n. 25, p. 213–234, 1994.
- GERHARDT, H. C. Geographic variation in acoustic communication: reproductive character displacement and speciation. **Evolutionary Ecology Research**. n.15, p. 605–632, 2013.
- HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. 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. 1992. p. 188–211.

- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics. 2001.
- HASEGAWA Y.; UEDA, H.; SUMIDA M. Clinal geographic variation in the advertisement call of the wrinkled frog, *Rana rugosa*. **Herpetologica**, n. 55(3), p. 318-324, 1999.
- HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO, O. L.; NELSON, C. E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, n. 31, p. 231-410, 1990.
- HEYER, W. R.; REID, Y. R. 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**, n. 75(1), p. 39-54, 2002.
- HUTCHISON, D. W.; TEMPLETON, A. R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution**, n. 53, p. 1898-1914, 1999.
- JUARES, A. M. **Diversidade de anuros da Serra da Mantiqueira, na região do Pico dos Marins**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2011.
- KÖHLER J.; JANSEN M.; RODRÍGUEZ A.; KOK P.J.R.; TOLEDO L.F.; EMMERICH M.; GLAW F.; HADDAD C.F.B.; RÖDEL M.; VENCES M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, n. 4251, p. 1-124, 2017. doi:10.11646/zootaxa.4251.1.1.
- LEMMON, E. M.; LEMMON, A. R.; CANNATELLA, D. C. 2007. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). **Evolution**, n. 61(9), p. 2086-2103, 2007.
- LEMMON, E. M. Diversification of conspecific signals in sympatry: geographic overlap drives multidimensional reproductive character displacement in frogs. **Evolution**, n. 63(5), p. 1155-1170, 2009.
- LUTZ, B. **Brazilian species of Hyla**. University of Texas Press, Austin. 260 pp. 1973.
- MAGRINI, L.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; BÉDA, A. F.; GIARETTA, A. A. Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura:Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. **Zootaxa**, n. 3066, p. 37-51, 2011.
- MÁQUEZ, R.; BOSCH, J. Male advertisement call and female preference in sympatric and allopatric midwife toads. **Animal Behaviour**, n. 54, p. 1333-1345, 1997.
- MARTINS, I. A.; JIM, J. Advertisement Call of the *Hyla jimi* and *Hyla elianeae* (Anura, Hylidae) in Botucatu Region, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, n. 64(3B), p. 645-654, 2004.
- NUNES, I.; KWET, A.; POMBAL, J. P. Jr. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). **Copeia**, 2012, 3, 554-569, 2012.
- PANSONATO, A.; MUDREK, J. R.; SIMIONI, F.; MARTINS, I. A.; STRÜSSMANN, C. Geographical Variation in Morphological and Bioacoustic Traits of *Pseudopaludicola mystacalis* (Cope, 1887) and a Reassessment of the Taxonomic Status of *Pseudopaludicola serrana* Toledo, 2010 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae). **Advances in Zoology**, 2014. doi.org/10.1155/2014/563165.

POMBAL, J. P. JR.; BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. **Naturalia** n. 20, p. 213–225, 1995.

POPOV, A. V.; SHUVALOV, V. F. Phonotactic behavior of crickets. **Journal Comparative Physiology**. n. 119, p. 111–126, 1977.

SANTOS, L. R. **Análises morfológicas e bioacústicas em populações de *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica**. 2015. 106f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

SANTOS, L. R.; MARTINS, I. A. Bioacoustic analysis in *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) at its type locality in Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil. **Zootaxa**. n. 4232, p. 582–584, 2017.

SILVA, P. H. **Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)**. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2017.

TODA, M.; NISHIDA, M.; MATSUI, M.; LUE, K. Y.; OTA, H. Genetic variation in the Indian rice frog, *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura), in Taiwan, as revealed by allozyme data. **Herpetologica**. n. 54, p. 73–82, 1998.

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. The University of Chicago Press, Chicago. 1148 p. 2007.

WILKINS, M. R.; SEDDON, N.; SAFRAN, R. J. Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. **Trends in Ecology and Evolution**. n. 28(3), p. 156–166, 2013.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**. n. 28, p. 114–138, 1943.

APÊNDICE A - ARQUIVOS SONOROS ANALISADOS

Coleção acústica Itamar Alves Martins (CAIAM)

BRASIL, **MINAS GERAIS**: Camanducaia (pasta: *Scinax* aff. *hayii* Monte Verde MG 17°C, arquivos: 0001– 0015); Itamonte (pasta: Coleta PN Itatiaia 29 Out 2015 12°C, arquivos: 1001– 1008; 0001*Scinax* cf. *dolloi* – 0003 *Scinax* cf. *dolloi*). **RIO DE JANEIRO**: Itatiaia (pasta: *S. dolloi* Maringa, RJ 20 e 21 Jan 2016 17g, arquivos: 1001 *Scinax dolloi* – 1028 *Scinax dolloi*; DR-100_0183 – DR-100_0223); Petrópolis (pasta: *S. hayii* Petropolis RJ 12 Dez 2013, arquivos: 0001 – 0016); Mangaratiba (pasta: Coleta Mangaratiba 4 e 5 Dez 2018 22°C, arquivos: 0001– 0005; 00032, 00033, 00037, 00039, 00040 – 00047; 181204_0030, 181204_0031, 181204_0034 – 181204_0036, 181204_0038, 181204_0040 – 181204_0042, 181204_0045, 181204_0046); Paraty (pasta: coleta Paraty Jan 2018 23°C, arquivos: 0001 – 0026). **SÃO PAULO**: Bananal (pasta: Bananal, arquivos: 0001 – 0006, 0009, 0010); Mogi das Cruzes (pasta: *Scinax* aff. *hayii* Mogi das Cruzes 17°C mono, arquivos 0001 – 0020); Campos do Jordão (pasta: Coleta *Scinax* sp Nov 2014 17g, arquivos: 0001– 0009; pasta: Campos do Jordão 2006, arquivos: 0002 – 0008); Ilhabela (pasta: 13 janeiro 2016 Ilha Bela 21°C, arquivos: 0001– 0022); São Luiz do Paratinga (pasta: *S. hayii* SLP 18 fev 2014 18° C, arquivos: *Scinax hayii* 1 – *Scinax hayii* 7; pasta: cantos *Scinax hayii*, slp 4,dez 2013, arquivos: DR-100_0035 4 de dezembro S. L. Paraitinga – DR-100_0040 4 de dezembro S. L. Paraitinga; pasta: cantos *Scinax hayii* 2 jan 14 21°C, arquivos: *Scinax* aff. *hayii* (1) – *Scinax* aff. *hayii* (3); pasta: Cantos *Scinax hayii* SLP 22 jan 2014 19°C, arquivos: individuo 1 – individuo 7); Santo Antônio do Pinhal (pasta: Cantos *Scinax hayii* Sto do Pinhal 7 Nov 2013 16g, arquivos: DR-100_0009 – DR-100_0019); Ubatuba (pasta: *S. hayii* Ubatuba 19 mar 2014, arquivos: 0001 – 0024); São Bernardo do Campo (pasta: cantos S B do Campo 6 Nov 2018 17°C mono, arquivos: 01 – 024); Peruíbe (pasta: 11 janeiro 2016 Jureia Peruíbe 21°C, arquivos: 0001 – 0032); Jundiaí (pasta: *S. hayii* Serra do Japi Carol Manzano, arquivos: 001 – 008). **ESPÍRITO SANTO**: Castelo (pasta: *S. hayii* PEFEG Castelo ES 15 Jan 2018 19°C mono, arquivos: 0001 – 0021).

9 CAPÍTULO 2

ANÁLISES MORFOMÉTRICAS, MORFOLÓGICAS E MOLECULARES EM POPULAÇÕES DE *SCIAX HAYII* (BARBOUR, 1909) E *SCINAX DOLLOI* (WERNER, 1903) (ANURA, HYLIDAE)

10 RESUMO

O gênero *Scinax* apresenta espécies com morfologia conservada dificultando a taxonomia e identificação de complexo de espécies. Aqui nós descrevemos e comparamos parâmetros morfológicos e morfométricos de populações identificadas como *S. hayii* e *S. dolloi*. Realizamos também análise molecular do gene COI para investigar variações intra e interespecíficas, identificando possíveis novas unidades taxonômicas. *Scinax hayii* apresenta estruturação geográfica em seu DNA podendo ser dividida em três subclados pela sua morfologia e gene COI. A distribuição de *S. hayii* é registrada desde o Espírito Santo até o sul do estado de São Paulo em ambientes de serra e planície litorânea. As populações identificadas como *S. dolloi* podem ser divididas em duas unidades taxonômicas distintas pelo tamanho corporal, gene COI e canto de anúncio. *Scinax dolloi* até então considerada restrita à sua localidade tipo apresenta populações com ocorrência nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo.

Palavras-chave: Biodiversidade; Taxonomia; DNA barcode.

11 INTRODUÇÃO

A sistemática é um ramo da ciência que estuda os seres vivos colocando-os em um sistema classificatório coerente e prático (NELSON, 1970; VANZOLINI, 1993). A parte analítica da sistemática é chamada de taxonomia e de acordo com a categoria taxonômica envolvida podemos dividi-la em macro e micro-taxonomia. A micro-taxonomia lida com as espécies e suas categorias infra específicas, dentre elas, as populações (MAYR e ASHLOCK, 1991).

Na taxonomia de anfíbios anuros, o uso da morfometria e morfologia é tradicional e sempre se mostrou eficiente para a diagnose de espécies e grupos, sendo atualmente ainda um dos principais métodos utilizados (DUELLMAN e TRUEB, 1986; DUELLMAN, 2001; NUNES et al., 2012; MÂNGIA et al., 2014). As características morfológicas de uma espécie representam suas adaptações ao ambiente e sua história evolutiva fornecendo informações que podem ser utilizadas na caracterização de populações (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

O principal conceito de espécie que predominou por um longo período de tempo, classificava os organismos como base em diferentes características morfológicas (DARWIN, 2006). Com a evolução do conhecimento criaram-se novos conceitos de delimitação de espécies (veja SITES e MARSHALL, 2004; ALEIXO, 2007) e a morfologia mostrou nem sempre ser capaz de fornecer informações suficientes para desmembramento de alguns grupos de espécies morfológicamente crípticas (ANGULO et al., 2003; RON et al., 2006), pois estas apresentam caracteres conservados que dificulta sua diagnose, sendo muitas vezes indistinguíveis morfológicamente (BICKFORD et al., 2007).

O uso de análises moleculares e a bioacústica têm sido efetivos em estudos sistemáticos revelando a existência de espécies crípticas (FOUQUET et al., 2007; FARIA et al., 2013; FERRÃO et al., 2017; RON et al., 2018). O desenvolvimento da biologia molecular tem

aprimorado os sistemas de identificação taxonômica, onde diversos marcadores moleculares são utilizados para a diagnose de grupos (HEYER et al., 1974; AVISE, 2004; FAIVOVICH et al., 2005; FOUQUET et al., 2007; DUELLMAN et al., 2016).

Apesar do declínio mundial das populações de anfíbios (STUART et al., 2004), o número de descrições de espécies de anfíbios tem aumentado nos últimos anos, mostrando que estes organismos representam um grupo com grande potencial de descrição de novas espécies (NUNES et al., 2012; MÂNGIA et al., 2014, FERRÃO et al., 2016; RON et al., 2018).

Morfologia conservada, escassez de dados para comparação e relações filogenéticas instáveis toram o gênero *Scinax* um grupo enigmático de difícil classificação (FAIVOVICH, 2002; FAIVOVICH et al., 2005; DUELLMAN et al., 2016; FAIVOVICH et al., 2018). Apesar disso, a diversidade de espécies na subfamília Scinaxinae ainda é subestimada e novas vem sendo descritas nos últimos anos (*Sphaenorhynchus cammaeus*, Roberto, Araujo-Vieira, Carvalho-e-Silva, e Ávila, 2017; *Scinax onca* Ferrão, Moravec, Fraga, Pinheiro de Almeida, Kaefer, e Lima, 2017; *Scinax caprarius* Acosta-Galvis, 2018; *Scinax ruberoculatus* Ferrão, Fraga, Moravec, Kaefer, e Lima, 2018; *Scinax strussmannae* Ferrão, Moravec, Kaefer, Fraga, e Lima, 2018; *Scinax tsachila* Ron, Duellman, Caminer, e Pazmiño, 2018; *Ololygon goya* Andrade, Santos, Rocha, Pombal, e Vaz-Silva, 2018 *Ololygon garibaldiae* (Lourenço, Lingnau, Haddad, e Faivovich, 2019); *Julianus fontanarrosai* (Baldo, Araujo-Vieira, Cardozo, Borteiro, Leal, Pereyra, Kolenc, Lyra, Garcia, Haddad, e Faivovich, 2019).

Scinax hayii foi descrita por Barbour (1909), fundamentado em exemplares coletados em Petrópolis, Rio de Janeiro. Sua descrição baseou-se apenas em indivíduos machos, utilizando proporções entre estruturas da cabeça, tamanhos dos membros em relação ao corpo e caracterização da pele juntamente coloração. Suas medidas foram subjetivas e não

forneeceram informações suficientes para estabelecer padrões de tamanho. Isso gerou dúvidas para a verdadeira caracterização e padronização da espécie.

Barbour (1909), na descrição original de *S. hayii*, e Heyer et al. (1990), amostrando a população de Boracéia, afirmam que *S. hayii* apresenta padrão de coloração na superfície dorsal uniforme. Lutz (1973) relata que diferentes populações apresentam variação no padrão de coloração dorsal e tamanho ao longo da distribuição de *S. hayii*. Cochran (1955) aponta diferenças nos padrões de coloração dorsal e presença de manchas na população de Paranapiacaba, São Paulo. Devido às variações registradas, Haddad e Sazima (1992) e Pombal et al. (1995) sugerem que possam haver mais espécies sob o nome de *S. hayii*. Como a morfologia é conservada em muitas espécies do gênero *Scinax*, o uso de uma taxonomia integrativa, combinando análises de caracteres como a morfologia, a bioacústica e a biologia molecular podem resolver a problemática taxonômica como já visto para outras espécies do gênero (NUNES et al., 2012; FERRÃO et al., 2016; FERRÃO et al., 2017; RON et al., 2018).

Scinax dolloi foi descrita por Werner (1903), baseado em duas fêmeas, com sua localidade tipo sendo designada apenas como Brasil. Caramaschi et al. (2013) reavaliaram a interpretação da localidade tipo de *S. dolloi*, e designaram a Vila de Maringá, município de Itatiaia, Rio de Janeiro, como a localidade tipo da espécie.

A descrição original (Werner, 1903) apresenta poucos detalhes e carência de dados morfométricos, para melhor caracterização da espécie. Além disso, a descrição de machos é inexistente. Comparando a morfologia externa, Faivovich et al. (2005) relata que *S. dolloi* é próxima de *S. hayii* e *S. pererca*. Falta a descrição detalhada dos caracteres morfológicos e morfométricos de *S. dolloi* para estabelecer o padrão da espécie e comparar com as demais populações da Serra da Mantiqueira. Visto que, depois da reavaliação de sua localidade tipo feita por Caramaschi et al. (2013), e as diferenças morfológicas e bioacústicas apontadas por

Santos (2015) entre populações da Serra da Mantiqueira e topótipos de *Scinax hayii*, estas provavelmente se tratam de populações de *S. dolloi*.

Nossos objetivos foram: (i) realizar a descrição morfológica e morfométrica de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi* apontando suas variações interpopulacionais; (ii) verificar a variação interpopulacional de dados moleculares do gene COI de *Scinax hayii* e *S. dolloi*; e (iii) definir a distribuição geográfica de cada espécie, apontando possíveis novas unidades taxonômicas.

12 MATERIAL E MÉTODOS

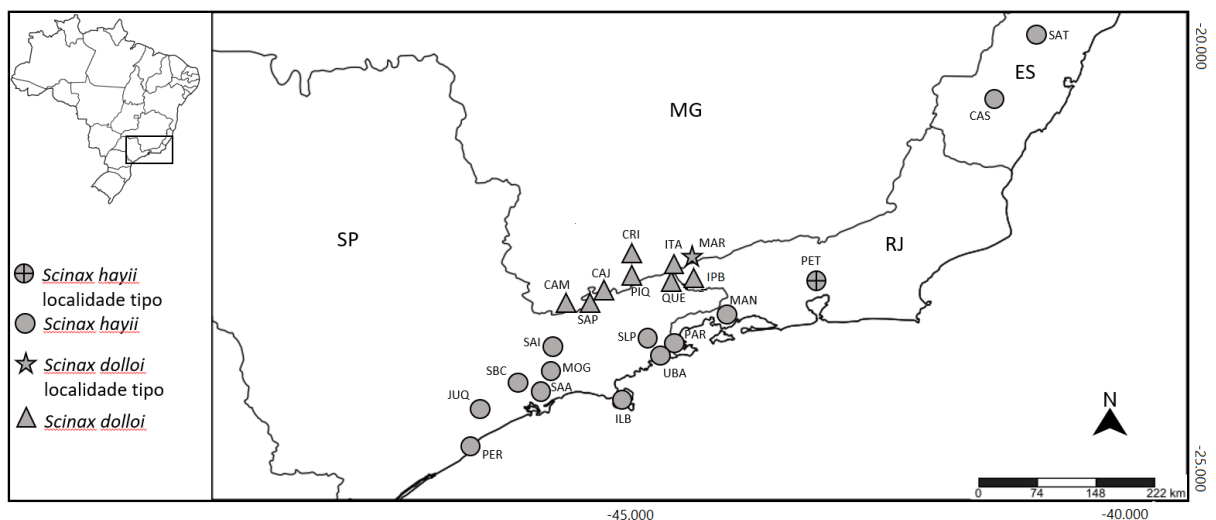
12.1 Análise morfométrica

Foram realizadas coletas em campo nas estações reprodutivas (período de setembro a fevereiro) entre os anos de 2016 e 2019 para a obtenção de indivíduos de ambas espécies. Os exemplares coletados foram depositados na Coleção Científica do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté (CCLZU) e na Coleção de anfíbios CFBH (Coleção de anfíbios Célio F. B. Haddad, UNESP, Rio Claro, SP). Também foram utilizados exemplares anteriormente já depositados nas coleções científicas: MNRJ (Museu Nacional do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ), CFBH (Coleção Científica Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP), e Coleção Científica do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté (CCLZU), totalizando 356 indivíduos (326 machos e 30 fêmeas), distribuídos entre os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Veja Figura 1, APÊNDICE A).

Foram analisados dezoito caracteres morfométricos seguindo Duellman (2001) e Heyer et al. (1990), sendo: CRC (comprimento rostro-cloacal), CC (comprimento da cabeça), LC (largura da cabeça), CM (comprimento da mão), CB (comprimento do braço), CAB (comprimento do antebraço), CF (comprimento do fêmur), CT (comprimento da tíbia), CTAR (comprimento do tarso), e CP (comprimento do pé), mensurados com paquímetro digital

precisão de 0,01 mm; DO (diâmetro do olho), DIO (distância interorbital), DON (distância olho-narina), DNF (distância narina-focinho), DIN (distância inter-nasal), DT (diâmetro do tímpano), DD3 (diâmetro do disco do terceiro dedo da mão) e DD4 (diâmetro do disco do quarto dedo do pé), medidos com ocular micrométrica em microscópio estereoscópico Leica MZ6 (Figura 2).

Figura 1 – Distribuição geográfica das populações utilizadas nas análises morfométricas e morfológicas de *Scinax hayii* e *Scinax dolloi*. Populações amostradas no estado do Espírito Santo (ES): municípios de Castelo (CAS) e Santa Teresa (SAT); no estado do Rio de Janeiro (RJ): municípios Petrópolis (PET), Maringá, Itatiaia, (MAR), Itatiaia, Parque Nacional do Itatiaia parte baixa (IPB), Mangaratiba (MAN) e Paraty (PAR); no estado de Minas Gerais (MG): Itamonte (ITA), Cristina (CRI) e Camanducaia (CAM); no estado de São Paulo: municípios São Luiz do Paraitinga (SLP), Ubatuba (UBA), Ilhabela (ILB), Santa Isabel (SAI), Mogi das Cruzes (MOG), Santo André (SAA), São Bernardo do Campo (SBC), Juquitiba (JUQ), Peruíbe (PER), Queluz (QUE), Piquete (PIQ), Campos do Jordão (CAJ) e Santo Antonio do Pinhal (SAP).



Fonte: Elaborado pelo autor.

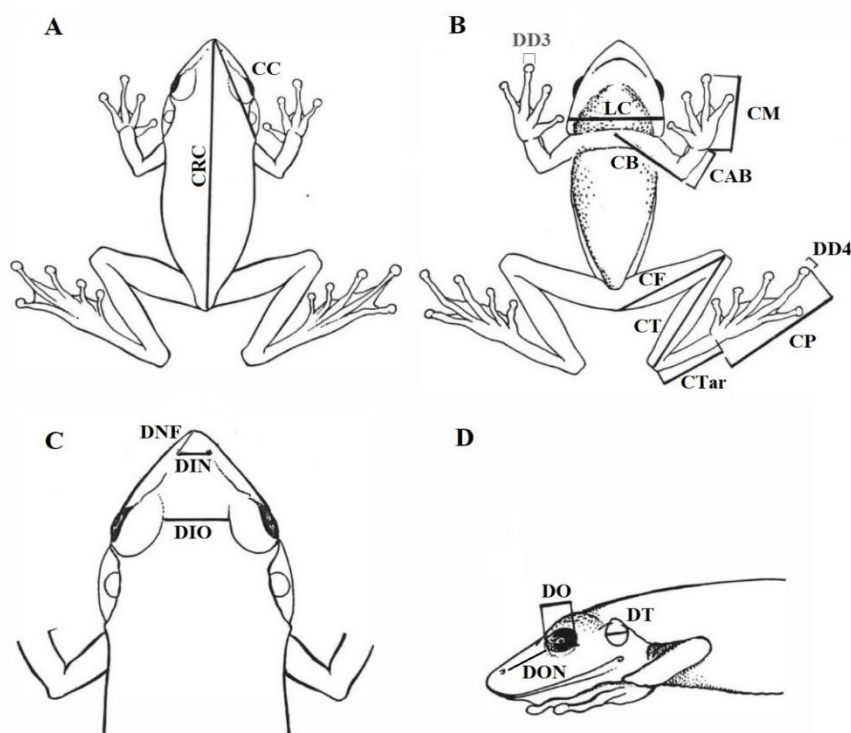
12.2 Análise morfológica

A análise morfológica consistiu na verificação qualitativa de formas do corpo, textura da pele, padrões de coloração presença de manchas entre as populações de *S. hayii* e *S. dolloi*.

A terminologia utilizada para a classificação quanto ao formato da cabeça em vista dorsal e lateral, e fórmula plantar seguiu Heyer et al. (1990). Para forma dos calos das mãos e pés, língua e saco vocal, a terminologia utilizada está de acordo com Duellman (1970).

Para o padrão de coloração foi verificada a presença de faixas e/ou manchas, na região da cabeça, dorso, ventre, flancos (região axilar e inguinal) e região dorsal dos membros. Também foi verificada a presença de padrão de manchas amarelas em fundo preto em regiões ocultas (quando em repouso) nos flancos entre a região axilar e inguinal; região anterior e posterior da coxa e região anterior da tíbia (padrão típico encontrado em algumas espécies de *Scinax*). As observações foram feitas em exemplares em vida e fixados.

Figura 2 – Caracteres morfométricos analisados. (A) vista dorsal, comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cabeça (CC); (B) vista ventral, largura da cabeça (LC), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), comprimento da mão (CM), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), comprimento do fêmur, comprimento da tíbia (CT), comprimento do tarso (CTAR), comprimento do pé (CP) diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4); (C) vista dorsal da cabeça, distância interorbital (DIO), distância inter-nasal (DIN), distância entre o nariz e o olho (DNE); (D) vista lateral da cabeça, distância do olho ao nariz (DON), distância do olho ao tímpano (DO), distância do tímpano ao olho (DT).



(DIN), distância narina-focinho (DNF); (**D**) vista lateral da cabeça, diâmetro do olho (DO), diâmetro do tímpano (DT), distância olho-narina (DON). Adaptado de Pugliese (2002).

12.3 Análise molecular

A extração do DNA e as reações de amplificação (PCR) dos fragmentos do gene Citocromo c Oxidase I (COI) foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP.

O DNA foi extraído de exemplares coletados em campo e também de tecidos já depositados em coleção científica (coleção CFBHT, UNESP, Rio Claro). Foram extraídas pequenas amostras de tecido muscular ou hepático que, posteriormente, foram conservados em etanol absoluto. O protocolo para extração de DNA segue Maniatis et al. (1982) e Lyra et al. (2016).

Os fragmentos de DNA mitocondrial do gene Citocromo c Oxidase I (COI) foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em um termociclador Mastercycler – Eppendorf. Foram utilizados os primers, direto ANF1 (ACHAAYCAYAAAGAYATYGG) e reverso ANR1 (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT) (LYRA *et al.* 2017). As condições de temperatura para amplificação foram: desnaturação inicial do DNA 95°C (5 min); 35 ciclos consistindo em 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). O material resultante das PCRs foi enviado para purificação e sequenciamento dos fragmentos do gene Citocromo c Oxidase I (COI).

Os cromatogramas das sequências obtidas do COI foram observados com uso do software Geneious V6. Alinhamento, edição e limpeza das sequências de cada fragmento foram feitas no software Mafft (KATO, 2013), para obter sequências consenso de cada amostra e para verificar ambiguidades e códons de parada inesperados (*stop codon*) (THOMPSON et al., 1994).

Foram também incluídos na análise amostras de *Scinax perereca* reanalisados de Silva (2017). Faivovich et al. (2005) relatam que *S. dolloi* forma um grupo morfologicamente próximo de *S. hayii* e *S. perereca*. Portanto, utilizar amostra das três espécies nas análises moleculares, permite verificar melhor as relações filogenéticas entre estas.

Como grupo externo, foram utilizados na análise exemplares de *Scinax duartei* e *Scinax granulatus*. Número de voucher e localidade dos tecidos utilizados nas análises estão elencados no APÊNDICE B.

12.4 Análises estatísticas

12.4.1 Morfometria

Para comparar as populações foi utilizado o método multivariado de análise de componentes principais (ACP). O método consiste em reduzir um conjunto de dados com muitas variáveis a partir do conjunto original, para um conjunto menor como novas variáveis (chamadas componente principal, CP) utilizando apenas as variáveis que melhor explicam a variação dos dados.

Primeiramente, foi realizada a ACP com todos exemplares medidos, utilizando os 18 caracteres morfométricos mensurados, e determinado quais os caracteres que melhor explicavam a variação entre as populações. Com isso, foram selecionados os seis caracteres que

melhor explicam a variação entre as populações de *Scinax hayii* (Figura 12) e também para as populações de *Scinax dolloi* (Figura 19) que foram utilizados na análise final.

Também foi utilizado o método de *Boxplot* e *jitter* para a visualização e comparação da distribuição dos valores do CRC (comprimento rostro-cloacal) entre as populações amostradas (*S. hayii*, Figura 14; *S. dolloi*, Figura 21). Posteriormente, os valores das medianas encontradas para o comprimento rostro-cloacal das populações foi comparado par a par pelo teste de Dunn.

12.4.2 Análises Moleculares

Para as inferências filogenéticas foi utliziada uma matriz utilizando o gene COI de 115 exemplares de *Scinax* para a análise e construção da árvore, utilizando o método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood estimation- MLE*) e o método de bootstrap 1000 para dar suporte aos agrupamentos. Árvores foram feitas utilizando o programa FhyML (GUINDON et al., 2010).

Para identificar linhagens diferentes em nossa árvore foram utilizados o suporte do nó e o comprimento da ramificação. A diversidade intra-específica e as divergências inter-específicas entre as sequências nucleotídicas do gene COI amostrados para as populações de *Scinax* foram calculadas pelo método de distância-p. A identificação dos espécimes pôde ser reconhecida apenas pelas amostras que apresentaram valor de suporte, em média, superior a 95%. Número de voucher e localidade dos exemplares cujos tecidos foram utilizados nas análises estão elencados no APÊNDICE B.

13 RESULTADOS

13.1 Redescrição de *Scinax hayii*

As descrições morfológicas e morfométricas foram efetuadas utilizando-se 37 machos e oito fêmeas de *Scinax hayii* coletados em Petrópolis, Rio de Janeiro, localidade tipo da espécie, com o intuito de melhorar a caracterização morfológica e identificação taxonômica desta espécie.

Scinax hayii apresenta corpo robusto de tamanho moderado (CRC machos: 37,5 – 46 mm; fêmeas: 44,8 – 51,8 $48 \pm 2,5$ mm), estreitando na região do sacro. O comprimento rostro-cloacal das fêmeas foi significativamente maior do que machos ($t=-7,4017$ $p=0,0000$), demonstrando que a espécie apresenta dimorfismo sexual em relação ao tamanho corporal. Descrições a seguir são fundamentadas em indivíduos machos. Valores de morfometria de fêmeas são apresentados na Tabela 2.

Apresentam Cabeça mais longa do que larga (CC 13,4 – 16,8 mm; LC 11,9 – 15,5 mm) com a largura correspondendo a 91,8% do comprimento da cabeça, e esse representando 35,4% do CRC. Cabeça em vista dorsal variando entre arredondado e subovoide, em perfil apresenta formato variando entre protruso e arredondado (Figura 3A, D e E). Narina posicionada dorso lateralmente com forma entre elíptico a semielíptico.

Canthus rostralis reto, levemente marcado, com a região loreal ligeiramente côncava (Figura 3 A H). Olhos proeminentes (DO 2,8 – 4,4 mm), diâmetro do olho correspondendo a 87,7% da distância entre o olho e a narina (DON 3,1 - 5,5 mm). Distância interorbital 14,9% mais larga que a distância entre o olho e a narina (DIO 4,2 – 5,5 mm; DON 3,1 – 5,5 mm). Tímpano distinto possuindo forma arredondada, correspondendo a 60,9% do diâmetro do olho (DT 1,8 – 2,8 mm) (Figura 3A e H). Prega supra timpânica evidente indo do canto posterior do

olho até o ombro. Uma massa glandular é encontrada no canto posterior do tímpano terminando na região posterior do lábio superior (Figura 3A e H).

Língua larga, arredondada, fendas vocais elípticas, localizadas na região posterior do assoalho bucal. Dentes vomerianos localizados entre as coanas, na parte posterior, organizados em dois grupos transversais bem próximos.

Saco vocal único, subgular, bem desenvolvido, prega peitoral presente. Braços finos correspondendo a 17,4% do tamanho do corpo (CB 6,04 – 9,2 mm). Antebraços moderadamente robustos e seu comprimento corresponde a 19,2% do tamanho do corpo (CAB 6,75 – 9,9 mm). Dedos das mãos com membranas interdigitais pobremente desenvolvidas na base (Figura 3B). Calo nupcial evidente e áspero de coloração creme ou esbranquiçada (Figura 3B, D, E e H) Comprimento relativo dos dedos correspondendo a $I < II \leq IV < III$. Disco dos dedos das mãos largos (DD3 1,8 – 2,7 mm), possuindo forma entre arredondado e elíptico, mais largos do que longos, correspondendo a 62,6% do diâmetro do olho. Tubérculo metacarpal interno único, longo e elíptico; tubérculo metacarpal externo bífido na base dos dedos III e IV. Tubérculos subarticulares redondos, tubérculos supranumerários pequenos e redondos. Em machos há uma prega glandular na parte externa da mão que se inicia no tubérculo metacarpal externo se estendendo até a terceira falange do dedo IV (Figura 3 B). Nas fêmeas essa prega glandular se inicia no tubérculo metacarpal externo indo até o tubérculo subarticular distal do dedo IV.

Pernas moderadamente robustas com o comprimento da coxa correspondendo a 46,4% do tamanho corporal (CF 16,8 – 21,75 mm) e o comprimento da tíbia representando 51,2% do tamanho do comprimento rostro-cloacal (CT 18,8 – 24,2 mm). Dedos dos pés finos e longos (Figura 3C– E). Comprimento relativo dos artelhos, $I < II < V \approx III < IV$, membranas interdigitais bem desenvolvidas; fórmula plantar $I\ 2 - 2+ II\ 1 - 2+ III\ 1 - 2+ IV\ 2+ - 1\ V$.

Diâmetro do disco do dedo IV do pé correspondendo a 64,7% do diâmetro do olho (DD4 1,7 – 2,5 mm) apresentando forma arredondada a elíptica. Tubérculo metatarsal interno redondo; tubérculo metatarsal externo arredondado pouco desenvolvido; tubérculos subarticulares redondos; tubérculos supranumerários pequenos redondos e cônicos. Prega glandular presente iniciando na região do calo metatarsal externo estendendo até o segundo tubérculo subarticular do dedo IV (Figura 3C).

Pele dorsal lisa com grânulos glandulares espalhados (Figura 3D, F e H). Nas articulações de fêmur-tíbia e tíbia-tarso há presença de grânulos. Pele do ventre e superfície ventral da coxa apresentando grânulos glandulares (Figura 3E).

Em vida apresentam coloração amarelo oliváceo, algumas vezes podendo variar entre amarelo e marrom. A coloração dorsal do tronco é uniforme, na região dos membros a coloração assemelha-se ao dorso, membranas interdigitais apresentam a mesma coloração dos membros, porém em vida são quase transparentes. São desprovidos de faixas ou manchas na região da cabeça, dorso e superfície dorsal dos membros (Figura 3H).

Na região ventral apresentam coloração que pode variar de verde limão a amarelo ou branco. Região gular e região peitoral com pele lisa levemente pigmentada por pequenos pontos de melanóforos (Figura 3E). Aspecto ventral imaculado com gula amarela nos machos e branca nas fêmeas. Ventre amarelado opaco com pintas marrom, que algumas vezes, se estendem até o peito, flancos e superfície ventral das coxas (Figura 3E). Na margem da mandíbula há diminuição gradativa da coloração formando uma linha branca (Figura 3A e H). O tarso apresenta a região ventral com coloração semelhante ao tronco.

Tímpano apresenta coloração marrom vívido. A íris possui coloração dourada brilhante com uma faixa preta atravessando a região longitudinal do olho, passando pela pupila (Figura 3 H).

A região posterior da coxa apresenta manchas reticulares amarelas em um fundo preto. As manchas amareladas formam frequentemente manchas circulares, mosaicos, algumas vezes elipses e faixas irregulares, ou dispostas de forma alongada horizontalmente. Esse padrão também se estende para a região anterior oculta da tíbia. Nos flancos, na região inguinal também aparecem o padrão de manchas reticulares amarelas em um fundo preto, esse padrão se estende para a região anterior da coxa (Figura 3F e G). Essas regiões que possuem esse padrão de coloração, ficam em regiões escondidas quando em repouso. A região dos flancos – entre a região axilar e inguinal – possui coloração amarela desprovida de faixas, manchas ou pontos. A região inguinal oculta sob as coxas possui coloração amarela formando machas reticulares, longitudinais ou irregulares contornados por preto. A região axilar é caracterizada por uma área verde amarelada que se estende para o braço, podendo ou não apresentar manchas reticulares pretas (Figura 3F e G).

Em exemplares fixados, o dorso apresenta coloração variando entre o castanho escuro e o castanho claro, a cor dos membros se assemelha a coloração dorsal (Figura 3D).

Em vista ventral, os exemplares possuem coloração creme por toda superfície. A região ventral dos membros possui pigmentação moderada, entretanto, o tarso é bastante pigmentado se assemelhando com a coloração do tronco, castanho escuro. Mãos, pés e membranas interdigitais dos pés também apresentam pontos com pigmentação moderada, castanho escuro (Figura 3E).

O padrão de manchas pretas na região posterior das coxas, tíbias, flancos (inguinal) e axilas ganham coloração cinza escuro ou preto, geralmente fosco, com as pintas amarelas adquirindo coloração esbranquiçada.

Os tímpanos adquirem coloração variando de castanho claro a bege. A íris adquire coloração preta (Figura 3A).

Figura 3 – Machos *Scinax hayii* coletados em Petrópolis, Rio de Janeiro (localidade tipo) exemplares CFBH 13935 (A – E; CRC= 42,5 mm) e CCLZU 3179 (G e H; CRC= 41,3 mm). Vista lateral (A), vista ventral da mão (B), vista ventral do pé (C), vista dorsal (D), vista ventral (E), vista dorsal mostrando coloração na face posterior das coxas (F e G), vista lateral do indivíduo (H). De A a F indivíduos fixados; em G e H animal em vida.



Fonte: Elaborado pelo autor.

13.1.1 Variações populacionais em *Scinax hayii*

Variações no tamanho dos indivíduos ao longo da distribuição podem ser visualizados na Tabela 2. Populações localizadas ao sul da distribuição de *Scinax hayii* tendem a ter menor tamanho corporal, exceto a população de Castelo, Espírito Santo (população amostrada na extremidade norte da distribuição), que apresentou o menor tamanho corporal dentre todas amostradas. Em geral, os caracteres morfológicos são bem conservados entre as populações de *Scinax hayii* podendo ser apontadas, principalmente, variação nos padrões de coloração dorsal e regiões escondidas quando em repouso.

Exemplares de São Luiz (n=33 indivíduos analisados) e Mangaratiba (n= 10) apresentam morfologia externa semelhante aos topótipos (Figura 4A–H e Figura 5A–H). Essas três populações apresentam o padrão corporal com maior robustez, dorso com coloração uniforme sem faixas ou manchas em qualquer região (Figura 4E, G e H; Figura 5E, G e H). Apresentam padrão de manchas em regiões escondidas quando em repouso (fêmur-tíbia, anterior do fêmur-flancos) bem evidente com círculos, mosaicos e padrões de manchas irregulares (Figura 4D, E e G; Figura 5D–H). A população de Mogi das Cruzes (n= 12 indivíduos) , no geral, apresenta padrão uniforme semelhante aos topótipos. Entretanto, alguns indivíduos apresentam padrões de manchas na superfície dorsal contendo: faixa do focinho contornando *canthus rostralis* e tímpano até a cintura escapular (Figura 6A– E). Alguns apresentam três faixas no antebraço e três ou mais faixas transversais na tíbia e tarso. Podem apresentar mancha irregular na região interorbital (foi registrado uma forma elíptica ou semelhante a uma gota com bordas irregulares). Também podem apresentar pequenas linhas pretas (algumas vezes castanho escuro) ou pintas formando linhas descontínuas na região dorsal, na altura da cintura escapular. Alguns indivíduos apresentam pintas brancas glandulares na superfície dorsal. Manchas em regiões escondidas são evidentes; apresentam manchas pretas

na lateral (flanco) fortemente pigmentada unindo as manchas axilares com as manchas da região lateral inguinal (Figura 6A). Apresentam *canthus rostralis* reto pouco côncavo.

A população de São Bernardo do Campo (n= 10 indivíduos) apresenta o padrão de coloração uniforme como o mais comum nos espécimes. Dois indivíduos apresentam padrão de coloração possuindo manchas. Estes apresentaram faixa preta do focinho até os ombros; mancha em “V” ou triângulo invertido na região interorbital; mancha pequena com formato de parênteses invertidos no dorso “)” (“e também algumas manchas pequenas de formatos irregulares espalhadas pelo dorso. Três faixas cortam o antebraço, e também tíbia e tarso (Figura 7A, C e E). Ventre pigmentado (Figura 7B). Manchas em regiões escondidas em alguns são pouco evidentes, na maioria apresenta formas irregulares ou circulares (Figura 7A e D).

A população de Santa Isabel (n= 4 indivíduos) apresenta padrão de coloração dorsal uniforme, semelhante aos topótipos com manchas em regiões escondidas (Figura 8A). Apenas um indivíduo coletado apresentou pequenos pontos pigmentados espalhados por todo o dorso e ventre, também apresentou faixa contornando a prega supra timpânica.

Os espécimes coletados em Santo André (n= 14 indivíduos) apresentam de maneira geral o padrão de coloração uniforme na superfície dorsal. Três exemplares apresentaram padrão de manchas em sua coloração possuindo, mancha em forma de W na região interorbital, mancha irregular com formato de parênteses invertidos no dorso “)” (“e algumas manchas irregulares, algumas vezes com formato de vírgula e pintas espalhadas no dorso. Apresentam três manchas no antebraço, três manchas cortando a tíbia e o tarso (Figura 8B). Na superfície dorsal dois exemplares apresentaram grande quantidade de pontos brancos espalhados; o ventre é claro com algumas pintas pretas na região do peito.

Na população de Jquitiba (n= 4 indivíduos) um dos exemplares coletados apresentou mancha vestigial castanho na região do dorso (duas linhas finas na região dorsal), pequenas

pintas fracamente pigmentadas de preto, e mancha vestigial castanho no *canthus rostralis* (Figura 8C).

Exemplares da planície litorânea coletados em Paraty (n= 15 indivíduos) (Figura 9A), Ubatuba (n= 43 indivíduos) (Figura 9B), Ilhabela (n= 16 indivíduos) (Figura 9C) apresentam apenas o padrão de coloração dorsal uniforme. Manchas em regiões escondidas quando em repouso (fêmur, tíbias e flancos) são evidentes, com cores vívidas semelhante aos topótipos (Figura 3 e Figura 9). Tamanho corporal é menor em relação aos topótipos apresentando também corpo esguio. Ventre claro, alguns machos apresentam pouca pigmentação na região peitoral.

A população de Peruíbe (n= 16 indivíduos) apresenta indivíduos com padrão de coloração dorsal uniforme, porém a maioria dos indivíduos registrados apresenta padrão de coloração dorsal manchado. Manchas e pintas apresentam coloração preta ou castanho escuro. Possuem triângulo invertido na região interorbital, duas faixas largas no dorso, manchas irregulares e pequenos pintas espalhadas por todo dorso e região lateral. Membros apresentam faixas e manchas irregulares em número variado. Apresentam faixa do focinho até a região posterior do ombro e outras manchas espalhadas pela cabeça (Figura 10A–D e F). Ventre e região gular apresentam grande quantidade de pintas pretas e castanho escuro espalhados (Figura 10E). Pele do dorso possui grande quantidade de pontos granulares. Manchas em regiões escondidas (fêmur, tíbias e flancos) podem ser evidentes apresentando várias manchas, ou pouco evidente apresentando pequenos pontos de coloração amarela (Figura 10B e D).

Indivíduos da população de Castelo, Espírito Santo (população localizada ao norte da distribuição da espécie) (n=7 indivíduos), possuem padrão de coloração dorsal variando entre liso, poucas manchas, pintas pretas espalhadas pelo dorso, e padrão rajado cobrindo toda superfície dorsal (Figura 11B e G). Possuem faixa de coloração preta ou castanho escuro

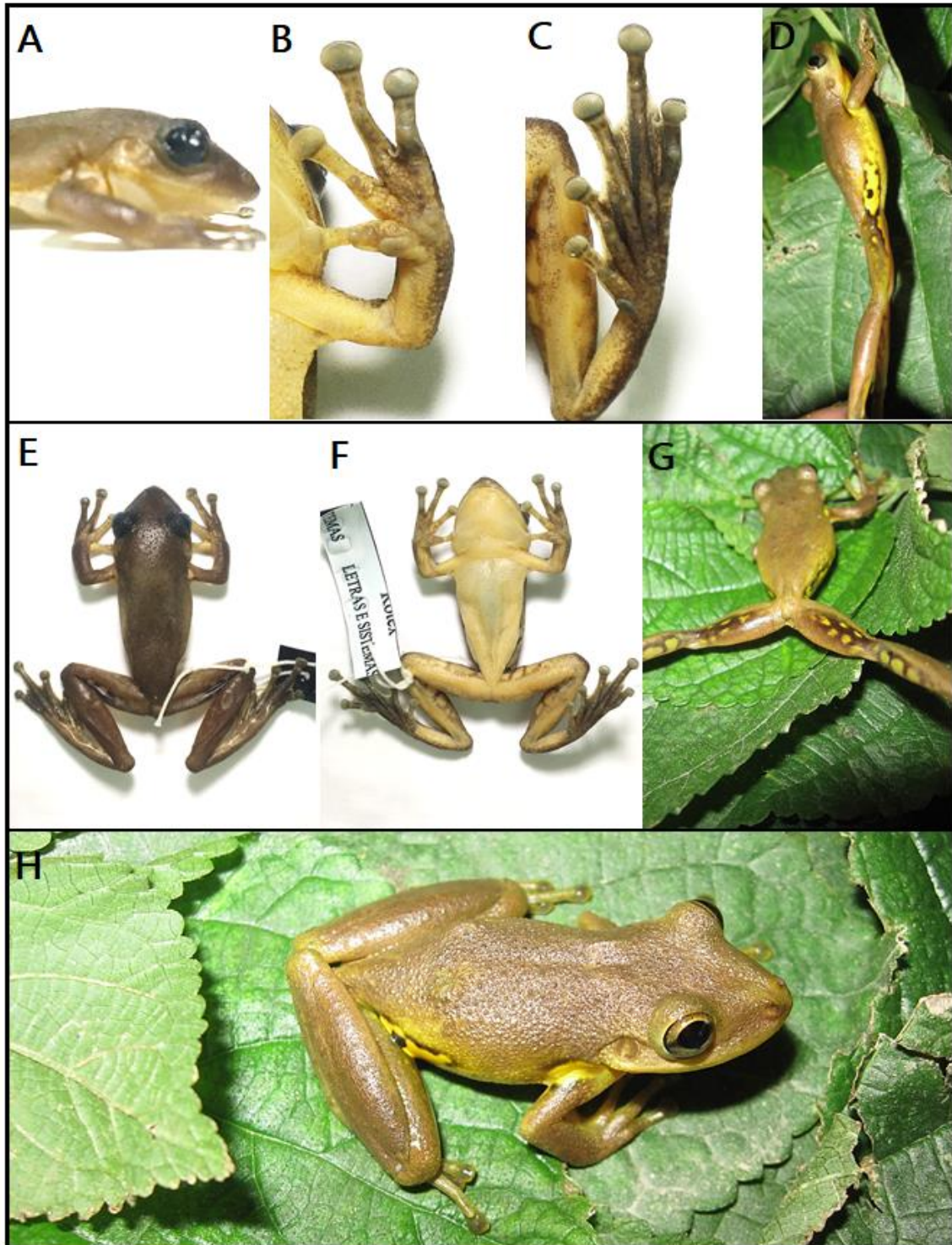
começando atrás do olho, contornando o tímpano e terminando pouco depois da região da axila; alguns indivíduos também possuem mancha marcando o *canthus rostralis*. Apresentam faixas de coloração preta ou castanho escuro nos membros (incluindo mãos, pés e membranas pigmentadas), estas podem ter formato de faixas transversais ou formatos irregulares, algumas vezes elipses. Alguns indivíduos apresentam padrão rajado por toda superfície dorsal (Figura 11G). Também é presente espécimes com mancha no dorso em forma de parênteses invertidos “)” (“ e manchas pequenas de formatos irregulares. Ventre amarelo apresentando pele glandular; a região ventral das coxas apresenta grande quantidade de grânulos glandulares (Figura 11C). A superfície dorsal pode apresentar pontos glandulares espalhados pela superfície, em alguns pontos a pele apresenta coloração bronze. Regiões lateral, inguinal e axilar apresentam coloração amarelada sem manchas reticulares. O padrão de manchas amarelas em fundo preto, típico de *Scinax*, é ausente em exemplares desta população (Figura 11D, E e F). Na região posterior das coxas, ao invés do padrão de manchas, apresentam coloração uniforme variando entre bege, castanho claro e castanho escuro (Figura 11D, E e F). A íris possui coloração variando entre dourado e acinzentado, algumas vezes acobreado (Figura 11A e G).

Figura 4 – Macho de *S. hayii* (CCLZU 3166, CRC= 41,3 mm, fotos A, B, C, E e F) coletado em São Luiz do Paraitinga, São Paulo. Vistas da lateral da cabeça (A), mão (B), pé (C), região lateral e ventral evidenciando as manchas nos flancos (D), vista dorsal (E), ventral (F), vista dorsal evidenciando a face posterior das coxas com manchas típicas de *Scinax* (G) vista lateral do indivíduo (H). Exemplares não coletados nas imagens D, G e H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Macho de *Scinax hayii* coletado em Mangaratiba, Rio de Janeiro (CCLZU 3466, CRC= 42,1 mm). Vistas da lateral da cabeça (A), mão (B), pé (C), região lateral evidenciando as manchas nos flancos (D), vista dorsal (E), ventral (F), vista dorsal evidenciando a face posterior das coxas com manchas típicas de *Scinax* (G) vista dorsal do indivíduo (H).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Machos de *Scinax hayii* coletados em Mogi das Cruzes, São Paulo, apresentando padrão de coloração dorsal com faixas e manchas (CCLZU 3429, CRC= 35,9 mm; imagens A, B e E; e CCLZU 3430, CRC= 39,4 mm, imagens C e D). Vistas lateral do corpo (A), ventral (B), dorsal (C), face posterior da coxa (D), e vista dorsal (E).



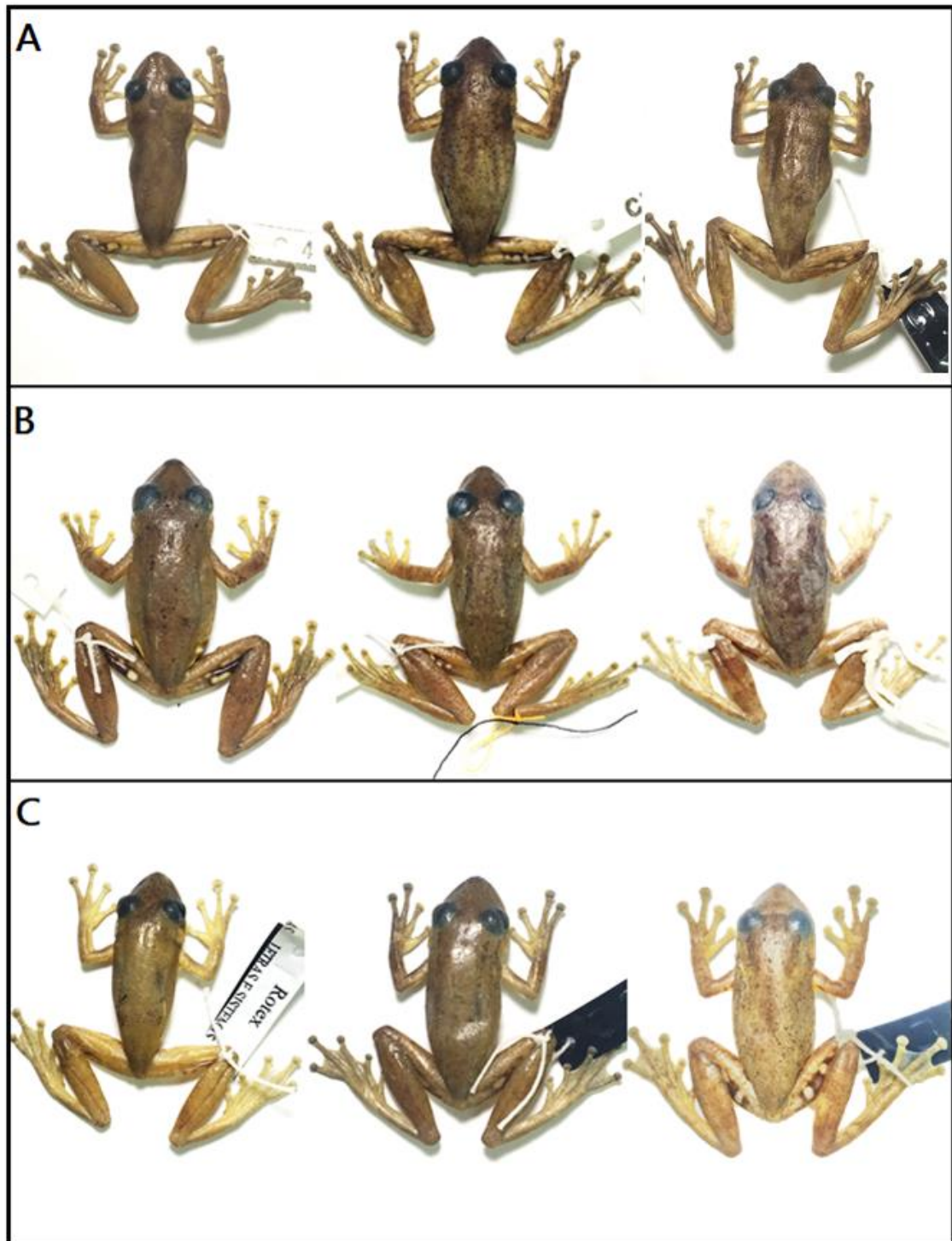
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Macho de *Scinax hayii* coletado em São Bernardo do Campo, São Paulo. Indivíduo com padrão de manchas no dorso (CCLZU 3425, CRC= 37,2 mm). Vista lateral (A), ventral (B), dorsal (C e E), face posterior da coxa (D). Imagem D indivíduo não coletado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Padrões de manchas na superfície dorsal, e na face posterior da coxa registrados em machos de *Scinax hayii*, nas populações de Santa Isabel (A) (da esquerda para a direita: CCLZU 3301, CRC= 36,2 mm; CFBH 40168, CRC= 36,9; CFBH 40169, CRC= 38,3 mm), Santo André (B) (da esquerda para a direita: CFBH 29303, CRC= 37,3 mm; CFBH 29304, CRC= 34,4 mm; CFBH 29308, CRC= 39,1) e Juquitiba (C) (da esquerda para a direita: CCLZU 3314, CRC= 8,4 mm; CCLZU 3317, CRC= 37,8; CCLZU 3318, CRC= 39 mm) no estado de São Paulo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Padrão de coloração dorsal uniforme e manchas em regiões escondidas (fêmur, tíbias e flancos) em exemplares de *Scinax hayii* coletados na planície litorânea em (A) Paraty, RJ (CCLZU 3407, CRC= 35,7 mm), (B) Ubatuba, SP, (CCLZU 3185, CRC= 38,5 mm), e (C) Ilhabela, SP (CCLZU 3331, CRC= 36,9 mm).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Machos de *Scinax hayii* coletados em Peruíbe, São Paulo (A, B e F CCLZU 3241, CRC= 36,8 mm; C, D e E CCLZU 3239, CRC= 37,9 mm). Vista lateral evidenciando o padrão de coloração dorsal com manchas (A e B), padrão de coloração na região posterior da coxa (C e D), vista ventral (E), vista lateral evidenciando padrão de coloração com manchas na região dos flancos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Machos *Scinax hayii* registrados em Castelo, Espírito Santo. Vista lateral evidenciando a coloração dos flancos (A), vista lateral superior (B), vista ventral (C), face posterior da coxa evidenciando a ausência do padrão de manchas reticulares típicas de *Scinax* (D, E e F), e vista lateral de espécime apresentando padrão de coloração dorsal com manchas (G). Imagens A, C, F e G exemplar CCLZU 3422 (CRC= 34,3 mm), B e E CCLZU 3419 (CRC= 35,4 mm), em D CCLZU 3421 (CRC= 33,3).



Fonte: Elaborado pelo autor.

13.1.2 Comparações morfométricas

Os principais caracteres que diferenciam as populações de *S. hayii* foram: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da tíbia (CT), comprimento do fêmur (CF), comprimento do pé (CP), largura da cabeça (LC) e comprimento da cabeça (CC) (Figura 12).

O componente principal 1 (eixo X) é responsável por 86,8% da variação morfométrica encontrada. O parâmetro comprimento rostro-cloacal foi o que mais influenciou o componente principal, 1 tendo importância de -0,73 (veja Figura 12 e Tabela 1). O componente principal 2 (eixo y) explica 5,6% da variação e foi influenciado principalmente pela largura da cabeça (-0,71) e comprimento da cabeça (-0,45). Valores de importância dos caracteres são apresentados na Tabela 1.

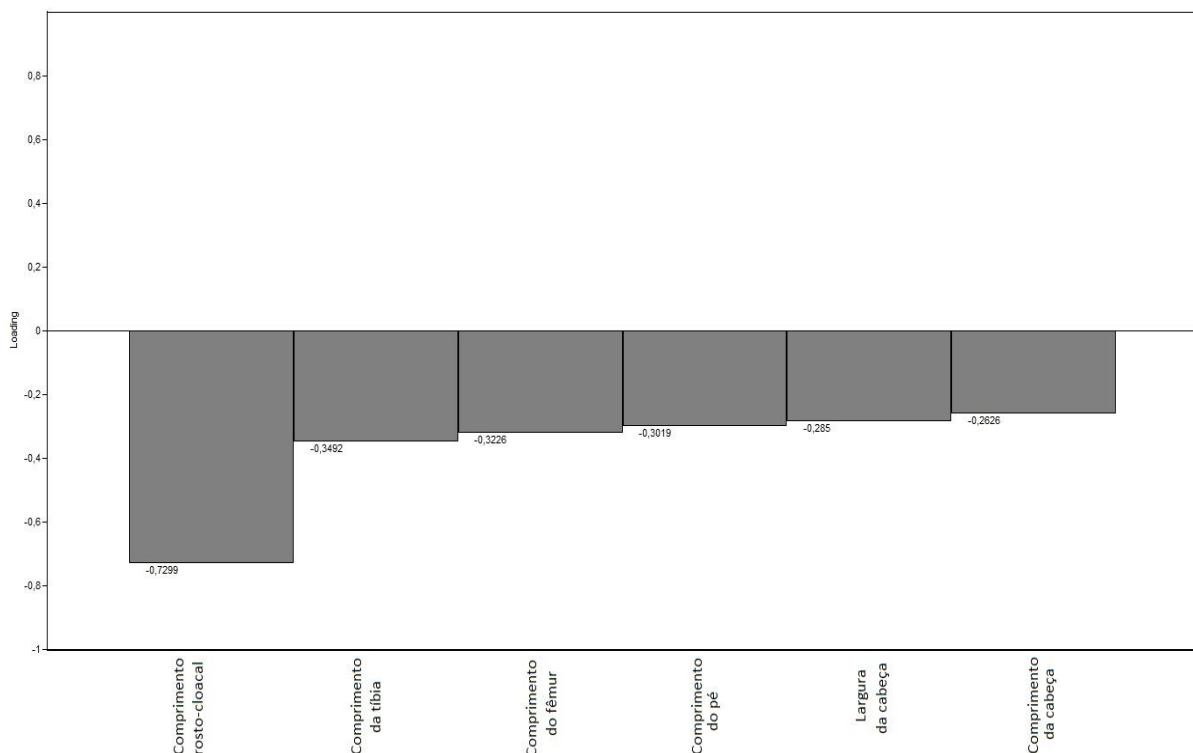
A análise de componentes principais (Figura 13) revela variação populacional em relação ao tamanho dos indivíduos. Na extremidade direita encontram-se a população de Petrópolis (topótipos), São Luiz do Paraitinga e Mangaratiba, que representam populações com maior tamanho corporal (Tabela 2 e Figura 13). Em oposição, encontram-se as populações do Espírito Santo (Castelo e Santa Teresa) apresentando menor tamanho corporal. Em relação ao eixo y as populações de Ilhabela e Peruíbe, juntamente com populações de Castelo e Santa Teresa apresentam menor comprimento e largura da cabeça (Veja Tabela 2 e Figura 13).

Foi construído um gráfico *box* e *jitter plot* utilizando comprimento rostro-cloacal por ser a medida que melhor explica a variação populacional (Figura 14). O *box* e *jitter plot* mostra que existe uma clina em relação ao tamanho, havendo uma diminuição do tamanho corporal, no sentido populações no norte da Serra do Mar (Petrópolis e São Luiz do Paraitinga) em direção ao sul do estado de São Paulo, tornando-se menores. O mesmo acontece para as populações localizadas na planície litorânea. Mangaratiba é a população que apresenta maior semelhança em relação ao tamanho corporal com os topótipos. Entretanto, os valores de mediana das

populações da planície litorânea são menores em comparação ao bloco norte da Serra do Mar (Petrópolis e São Luiz do Paraitinga) (Figura 14). As populações de Castelo e Santa Teresa possuem menor tamanho corporal refletido também em menores medianas quando comparados aos demais grupos.

O teste de Dunn realizado, revela que a população de Petrópolis e São Luiz do Paraitinga diferem significativamente ($p < 0,05$) de todas as populações (exceto da população de Juquitiba) (Veja Tabela 3). A população de Castelo (ES) também apresentou valores estatisticamente diferentes entre todas populações, exceto São Bernardo do Campo, Ilhabela e Santa Teresa (esta última população mais próxima de Castelo) (Tabela 3). Os valores do teste de Dunn entre todas populações são apresentados na Tabela 3.

Figura 12 – Caracteres selecionados para a análise de componentes principais e seus valores de importância para o componente principal 1. O comprimento rostro-cloacal é o principal parâmetro responsável pela variação populacional em morfometria nas populações de *Scinax hayii* (73% de influência sobre o componente principal 1).



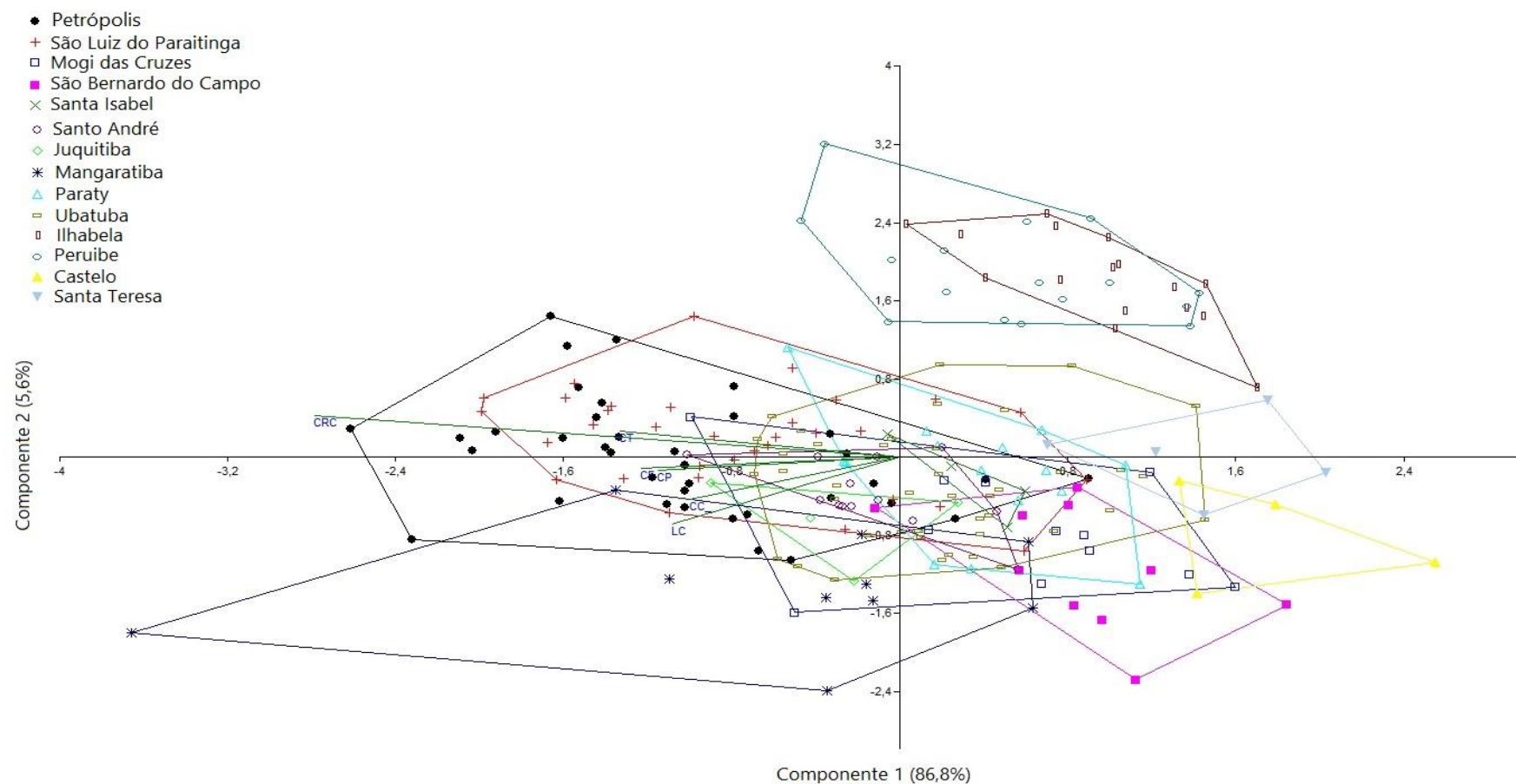
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 – Matriz de importância dos caracteres morfométricos utilizados na análise de componentes principais. (PC) componente principal. (CRC) comprimento rostro-cloacal, (CT) comprimento da tíbia, (CF) comprimento do fêmur, (CP) comprimento do pé, (LC) largura da cabeça e (CC) comprimento da cabeça.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6
CRC	-0,7299	0,4284	-0,5277	0,02873	-0,0637	-0,01801
CT	-0,3492	0,2682	0,6138	-0,2188	0,5323	0,3134
CF	-0,3226	-0,1273	0,41	-0,432	-0,7086	-0,1516
CP	-0,3019	-0,1487	0,3619	0,853	-0,1218	-0,1155
LC	-0,285	-0,7097	-0,2097	-0,0484	0,03568	0,6062
CC	-0,2626	-0,45	-0,04144	-0,1864	0,4409	-0,7055

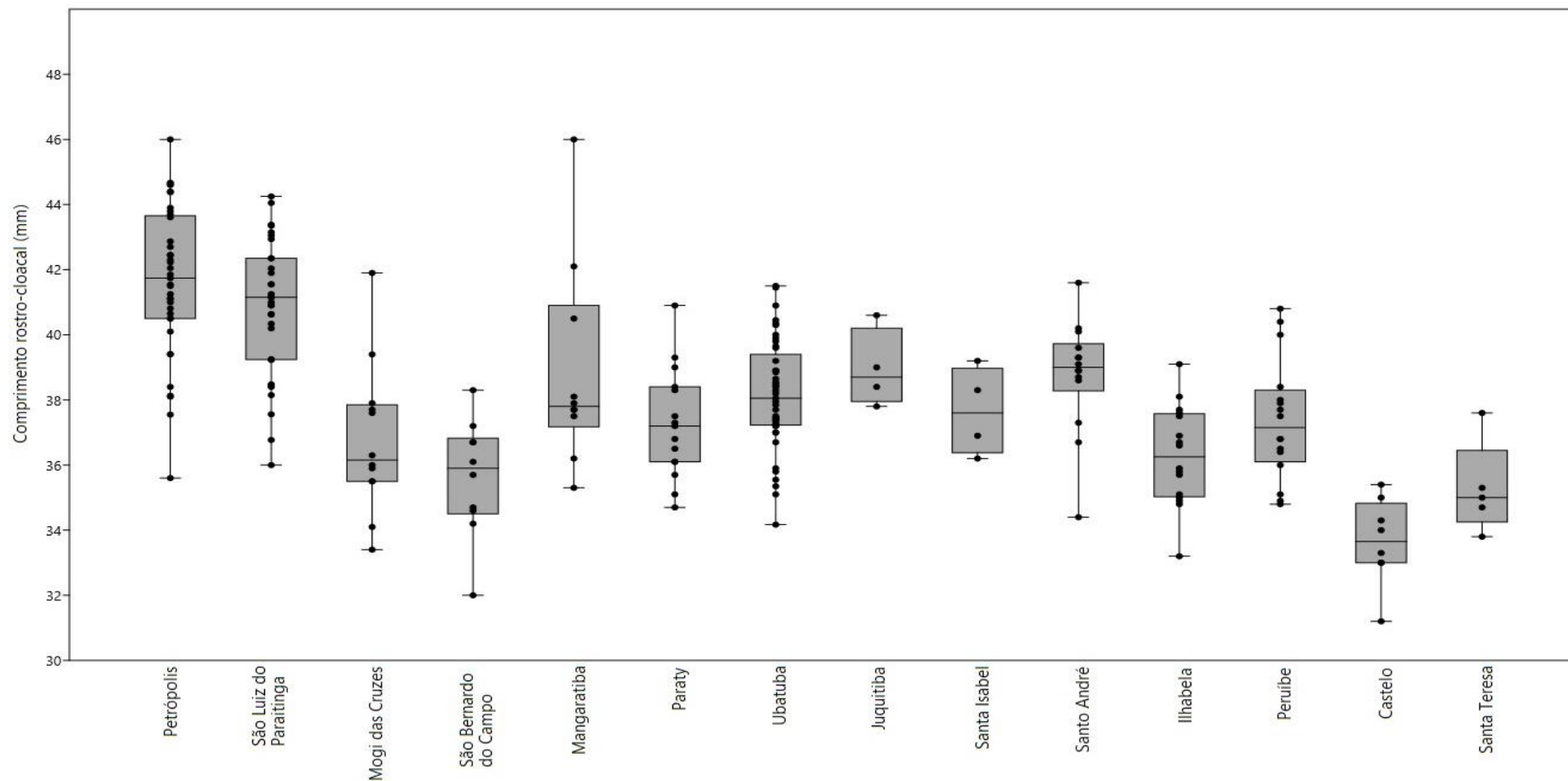
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Análise de componentes principais utilizando 6 caracteres morfométricos e 14 populações de *Scinax hayii*. O componente principal 1 é responsável por 86,8% da variação encontrada, já o componente principal 2 (eixo y) corresponde a 5,6%. Os caracteres representados por eixos na figura (biplot) são: (CRC) comprimento rostro-cloacal, (CT) comprimento da tíbia, (CF) comprimento do fêmur, (CP) comprimento do pé, (LC) largura da cabeça e (CC) comprimento da cabeça.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Box e jitter plot utilizando o caractere comprimento rostro-cloacal (CRC) medido em milímetros (mm), em populações de *Scinax hayii*. Box representam o primeiro e terceiro quartil, linha central representa a mediana; linhas verticais representam a amplitude. Pontos representam valores de cada indivíduo amostrado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Medidas morfométricas (em milímetros) de 18 caracteres analisados em populações identificadas como *Scinax hayii*. Os valores são referentes aos machos analisados. Resultados são apresentados na forma de amplitude e média seguida de desvio padrão. Parâmetros analisados: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), distância interorbital (DIO), distância olho-narina (DON), distância narina-focinho (DNF), distância inter-nasal (DIN), diâmetro do tímpano (DT), comprimento do fêmur (CF), comprimento da tíbia (CT), comprimento do pé (CP), comprimento do tarso (CTAR), comprimento da mão (CM), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4).

	Petrópolis n=37	Petrópolis (fêmeas) n=8	S. L. Paraitinga n=33	Mogi das Cruzes n=12	S. B. do Campo n=10
CRC	35,6 – 46 (41,6±2,3)	44,8 – 51,8 (48,4±2,5)	36 – 44,3 (40,8±2,1)	33,4 – 41,9 (36,8±2,3)	32 – 38,3 (35,6±1,8)
CC	12,8 – 16,8 (14,8±0,8)	16,2 – 18,4 (17,3±0,8)	12,5 – 15,8 (14,3±0,8)	13 – 15,2 (13,6±0,7)	12,7 – 14 (13,4±0,4)
LC	11,2 – 15,5 (13,6±0,8)	15,2 – 17,4 (16,1±0,7)	12 – 14,7 (13,2±0,7)	11,4 – 13,9 (12,3±0,7)	11 – 13,1 (12,1±0,6)
DO	2,8 – 4,7 (3,7±0,5)	3,2 – 4,7 (4±0,5)	2,8 – 4,2 (3,5±0,4)	3,1 – 4,4 (3,9±0,4)	3,5 – 4,5 (4,1±0,3)
DIO	4,2 – 5,9 (4,7±0,4)	4,6 – 6,6 (5,4±0,6)	3,8 – 5,1 (4,5±0,3)	4,3 – 5 (4,6±0,2)	4,2 – 5 (4,5±0,2)
DON	3,1 – 5,5 (4,0±0,5)	4,4 – 5,1 (4,8±0,3)	3,2 – 5,2 (4,3±0,5)	3 – 4,3 (3,4±0,4)	2 – 4 (3,2±0,6)
DNF	1,2 – 2,6 (1,6±0,2)	1,6 – 2,3 (1,9±0,2)	1,3 – 2,1 (1,7±0,2)	1,3 – 1,8 (1,5±0,2)	0,9 – 1,9 (1,3±0,4)
DIN	2,5 – 3,3 (2,9±0,2)	3 – 4 (3,4±0,3)	2,2 – 3,2 (2,9±0,2)	2,6 – 3,2 (2,8±0,2)	2,5 – 3 (2,7±0,2)
DT	1,8 – 2,8 (2,2±0,2)	2,4 – 3 (2,7±0,2)	1,8 – 2,6 (2,2±0,2)	2,1 – 2,6 (2,3±0,2)	2 – 2,2 (2,1±0,1)
CF	16,8 – 21,8 (19,3±1)	19,8 – 23,2 (22±1,3)	15,9 – 21,2 (19±1,2)	15,4 – 18,8 (17,2±1)	16,1 – 19,1 (17,2±0,9)
CT	18,8 – 24,2 (21,3±1,2)	23 – 26,5 (25±1,3)	18,7 – 23 (21,2±1,2)	18 – 20,8 (19,2±0,9)	17,9 – 20,3 (18,6±0,7)
CP	14,1 – 20,3 (18±1,1)	19,8 – 22,6 (21,2±1)	15,6 – 19,3 (17,7±1)	14,7 – 18,5 (16,3±1,1)	15,1 – 17,1 (16,1±0,6)
Ctar	9,9 – 12,8 (11,3±0,8)	11,7 – 13,9 (13±0,8)	9,3 – 12,9 (11,2±0,9)	9,1 – 11 (10,2±0,5)	9,7 – 11 (10,4±0,5)
CM	10,3 – 14,9 (12±0,9)	13,1 – 15,8 (14,4±1)	10,6 – 13,4 (12,3±0,7)	10,1 – 12,4 (11,2±0,8)	9,8 – 12,6 (11,1±0,8)
CB	5,3 – 9,2 (7,3±0,8)	7,5 – 10 (8,7±0,9)	6,2 – 8,9 (7,5±0,7)	5,1 – 7,3 (6,4±0,6)	5,7 – 7,3 (6,5±0,4)
CaB	6 – 10,1 (8,2±0,9)	8,3 – 10,6 (9,5±0,8)	6,8 – 9 (7,9±0,6)	7,1 – 8,4 (7,5±0,4)	7 – 7,9 (7,5±0,3)
Dd3	1,8 – 2,7 (2,2±0,2)	2,2 – 3,3 (2,8±0,3)	1,6 – 3 (2,2±0,4)	2 – 2,5 (2,2±0,1)	1,8 – 2,4 (2,1±0,2)
Dd4	1,6 – 2,5 (2,2±0,2)	2,2 – 3,1 (2,6±0,3)	1,5 – 2,7 (2,2±0,3)	1,8 – 3,1 (2,1±0,3)	1,7 – 2,3 (2±0,2)

Tabela 2 – Continuação.

	Juquitiba n=4	Santa Isabel n=4	Santo André n=14	Mangaratiba n=10	Paraty n=15
	37,8 – 40,6	36,2 – 39,2	34,4 – 41,6	35,3 – 46	34,7 – 40
CRC	(39±1,2)	(37,7±1,4)	(38,8±1,7)	(39±3,3)	(37,3±1,7)
	13,5 – 14,8	12,7 – 13,3	13 – 15	13,1 – 18,2	12,6 – 14,2
CC	(14,3±0,6)	(13,1±0,3)	(14±0,5)	(15±1,4)	(13,4±0,5)
	12,3 – 13,2	12,1 – 12,6	11,7 – 13,9	12,2 – 16,8	11,1 – 13
LC	(13±0,4)	(12,3±0,2)	(12±0,5)	(13,5±1,3)	(12±0,5)
	3,5 – 3,9	3,4 – 3,6	3,1 – 4,1	3,2 – 5	3,6 – 4,5
DO	(3,8±0,2)	(3,5±0,1)	(3,6±0,3)	(4,4±0,5)	(3,9±0,3)
	4,5 – 5,4	4,1 – 4,5	3,8 – 5,1	4,3 – 6,5	4 – 4,5
DIO	(4,9±0,4)	(4,3±0,2)	(4,2±0,4)	(5±0,6)	(4,3±0,2)
	3,7 – 4,6	3,3 – 4,1	3,2 – 4,6	3,2 – 5,2	2,9 – 4
DON	(4,1±0,4)	(3,7±0,4)	(3,9±0,3)	(4±0,5)	(3,4±0,4)
	1,5 – 1,7	1,5 – 1,9	1,4 – 2	0,5 – 1,9	1,3 – 1,8
DNF	(1,6±0,1)	(1,7±0,2)	(1,6±0,2)	(1,2±0,4)	(1,5±0,1)
	2,5 – 3	2,3 – 2,7	2,5 – 3,2	2,6 – 3,4	2,6 – 3,2
DIN	(2,8±0,2)	(2,6±0,2)	(2,9±0,2)	(2,8±0,3)	(2,9±0,2)
	2 – 2,5	2,3 – 2,5	2 – 2,7	1,9 – 2,7	1,9 – 2,3
DT	(2,4±0,2)	(2,4±0,1)	(2,3±0,2)	(2,2±0,3)	(2,1±0,1)
	17,6 – 20	17,4 – 18,4	16,5 – 19,1	17,7 – 24,3	16,2 – 18,8
CF	(18,9±1,1)	(17,9±0,5)	(17,9±0,8)	(19,6±1,8)	(17,8±0,7)
	19 – 21,4	18,7 – 19,8	17,7 – 29,3	19,5 – 27	20,6 – 18,4
CT	(20,4±1,1)	(19,2±0,6)	(20,3±2,7)	(21,4±2,1)	(19,7±0,6)
	17 – 18	16,5 – 17,1	14,8 – 18,1	16,3 – 22,5	15,2 – 17,8
CP	(17,6±0,5)	(16,9±0,3)	(16,6±0,7)	(18,4±1,7)	(16,6±0,7)
	11 – 11,4	10,1 – 10,4	9,3 – 11,8	10,3 – 13,9	9,2 – 11,9
Ctar	(11,2±0,2)	(10,2±0,2)	(10,7±0,8)	(12,2±1)	(10,6±0,8)
	11,8 – 12,1	10,9 – 11,6	9,7 – 12,2	11,4 – 14,5	10,5 – 12,4
CM	(11,9±0,1)	(11,3±0,3)	(11,2±0,6)	(12,5±0,9)	(11,4±0,5)
	6 – 6,5	6,2 – 7,4	6 – 7,5	5,8 – 9,2	5,8 – 7,5
CB	(6,2±0,2)	(6,8±0,5)	(6,9±0,4)	(7,4 ±0,9)	(6,8±0,5)
	7,5 – 8,5	7,4 – 7,7	6,8 – 8,4	7 – 10,7	6,8 – 8,8
CAB	(8,1±0,4)	(7,5±0,1)	(7,8±0,5)	(8,3±1)	(7,8±0,5)
	1,9 – 2,4	2 – 2,5	1,6 – 2,5	2,1 – 2,5	1,9 – 2,5
Dd3	(2,1±0,2)	(2,3±0,2)	(2,1±0,2)	(2,4±0,1)	(2,2±0,2)
	1,8 – 2,3	1,9 – 2,5	1,2 – 2,4	2 – 2,4	1,9 – 2,3
Dd4	(2,1±0,2)	(2,2±0,3)	(2±0,3)	(2,1±0,1)	(2,1±0,1)

Tabela 2 – Continuação.

	Ubatuba n=45	Ilhabela n=16	Peruíbe n=16	Castelo n=7	Santa Teresa n=5
	34,2 – 41,5	33,2 – 39,1	34,8 – 40,8	31,2 – 35,4	33,8 – 37,6
CRC	(38,1±1,7)	(36,3±1,5)	(34,7±1,9)	(33,6±1,8)	(35,3±1,4)
	11,2 – 15	11,2 – 12,6	11,4 – 13,5	11,6 – 12,7	11,8 – 13
CC	(13,7±0,7)	(12±0,3)	(12,4±0,6)	(12,1±0,5)	(12,4±0,6)
	10,8 – 13,9	9,4 – 10,6	9,4 – 11	10,3 – 11,9	10 – 12
LC	(12,5±0,7)	(9,9±0,3)	(10,2±0,5)	(11,1±0,7)	(11±0,8)
	2,8 – 4,3	3,5 – 4,1	3,4 – 4,5	3,5 – 3,6	3 – 3,7
DO	(3,5±0,4)	(3,8±0,2)	(3,8±0,3)	(3,6±0,1)	(3,4±0,3)
	4 – 5	4 – 4,7	4,1 – 5,2	3,7 – 4,3	3,6 – 4,1
DIO	(4,5±0,3)	(4,4±0,2)	(4,8±0,3)	(4,1±0,3)	(3,9±0,2)
	2,8 – 4,6	3,2 – 4,2	3,3 – 4,5	2 – 3,2	3,1 – 3,5
DON	(3,6±0,4)	(3,7±0,3)	(3,9±0,3)	(2,6±0,6)	(3,3±0,2)
	1,2 – 1,9	0,7 – 1,3	1,1 – 1,4	1 – 1,7	1,1 – 1,5
DNF	(1,5±0,1)	(1,2±0,2)	(1,3±0,1)	(1,4±0,3)	(1,2±0,2)
	2,1 – 3,7	2,2 – 2,8	2,3 – 2,7	2,1 – 2,7	2,1 – 2,5
DIN	(2,7±0,3)	(2,6±0,2)	(2,6±0,1)	(2,5±0,3)	(2,4±0,2)
	1,6 – 2,4	1,6 – 2,1	1,8 – 2,3	2 – 2,3	2 – 2,1
DT	(2±0,2)	(1,9±0,1)	(2,1±0,1)	(2,1±0,1)	(2,1±0,1)
	16 – 20,3	15,9 – 18	15,9 – 19	15,1 – 16,7	14,5 – 16,9
CF	(18,2±1)	(16,9±0,7)	(17,5±0,8)	(16,2±0,8)	(15,7±0,9)
	17,7 – 21,9	18,3 – 21	18,8 – 21,8	16 – 17,3	16,4 – 18,2
CT	(20±1)	(19,7±0,8)	(20,3±1)	(17±0,6)	(17,3±0,9)
	15 – 18	14,3 – 17,2	15,1 – 17,9	13,9 – 15,2	13,9 – 15,5
CP	(16,7±0,8)	(15,7±0,8)	(16,3±0,9)	(14,8±0,6)	(14,8±0,6)
	8,7 – 11,6	10,1 – 12,7	9,8 – 12,2	8,7 – 9,5	8,5 – 11,1
Ctar	(10,4±0,6)	(10,8±0,7)	(11,2±0,6)	(9,3±0,4)	(9,6 ±1)
	10 – 12,6	10,1 – 12,4	10,6 – 12,3	9,9 – 10,6	10,4 – 11,2
CM	(11,3±0,7)	(11,1±0,7)	(11,1±0,4)	(10,3±0,3)	(10,8±0,4)
	5,1 – 7,6	5,4 – 7	5,6 – 7	5,1 – 6,7	5,5 – 5,8
CB	(6,4±0,6)	(6,1±0,4)	(6,3±0,4)	(6,1±0,7)	(5,7±0,1)
	5,7 – 7,9	6,1 – 7,3	6,4 – 8	6,7 – 7,3	6,5 – 7,5
CaB	(6,9±0,5)	(6,7±0,4)	(7,1±0,4)	(7±0,3)	(7±0,4)
	1,4 – 2,6	1,9 – 2,3	1,8 – 2,5	1,8 – 2,2	1,8 – 2,3
Dd3	(2,3±0,2)	(2,1±0,1)	(2,2±0,2)	(2±0,2)	(2,1±0,2)
	1,6 – 2,6	1,7 – 2,2	1,7 – 2,2	1,6 – 2	1,8 – 2
Dd4	(2,2±0,2)	(2±0,1)	(2±0,2)	(1,8±0,2)	(1,9±0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Teste de Dunn utilizando o comprimento rostro-cloacal para comparar 14 populações identificadas como *Scinax hayii*. Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados em cinza.

	Petrópolis	S. L. Paraitinga	Mogi das Cruzes	S. B. do Campo	Mangaratiba	Paraty	Ubatuba	Juquitiba	Sta. Isabel	Santo André	Ilhabela	Peruíbe	Castelo	Santa Teresa
Petrópolis														
S.L. Paraitinga	0,4162													
Mogi das Cruzes	4,33E-07	1,07E-05												
S.B. do Campo	3,55E-09	1,23E-07	0,3206											
Mangaratiba	0,005088	0,02597	0,112	0,01342										
Paraty	6,34E-07	1,95E-05	0,6902	0,1557	0,1975									
Ubatuba	2,03E-07	2,89E-05	0,1057	0,006524	0,6581	0,2129								
Juquitiba	0,1428	0,2761	0,116	0,02426	0,701	0,1807	0,4642							
Sta. Isabel	0,01061	0,02982	0,5629	0,1993	0,5582	0,7496	0,7133	0,4172						
Santo André	0,006857	0,04042	0,03477	0,002421	0,717	0,06883	0,3192	0,8918	0,3812					
Ilhabela	2,43E-10	2,41E-08	0,5724	0,6029	0,02624	0,3033	0,01088	0,04452	0,3256	0,004258				
Peruíbe	7,29E-07	2,38E-05	0,6065	0,1228	0,2302	0,9062	0,2584	0,2035	0,806	0,0833	0,2436			
Castelo	2,44E-11	9,82E-10	0,0428	0,2925	0,000715	0,01372	0,000157	0,002772	0,03986	7,50E-05	0,1016	0,009612		
Santa Teresa	2,15E-06	1,71E-05	0,2765	0,7786	0,02146	0,1554	0,01908	0,02666	0,1734	0,006811	0,4778	0,1299	0,5447	

Fonte: Elaborado pelo autor.

13.2 Redescritção de *Scinax dolloi*

A descrição foi feita utilizando 15 machos e uma fêmea de *S. dolloi* coletados na Vila de Maringá, entre os municípios de Itatiaia, Rio de Janeiro e Bocaina de Minas, Minas Gerais (localidade tipo de *Scinax dolloi*). Proporções foram realizadas com base no valor das médias dos caracteres.

Scinax dolloi apresenta tamanho médio (CRC 33,2 – 36,2 mm), sendo que a única fêmea registrada apresentou tamanho maior do que os machos (36,9 mm). Cabeça em vista dorsal apresenta formato entre subovoide e arredondado; em vista lateral, possui formato arredondado, às vezes com a borda da maxila, na região do focinho chegando a ser protuberante (Figura 15A e D). A cabeça é mais comprida do que larga (CC 11,8 – 13,3 mm; LC 10,5 – 12,1 mm) representando 36,1% do comprimento rostro-cloacal; narinas em posição dorso-lateral com formato elíptico; o focinho fica em média $1,5 \pm 0,2$ mm de distância da narina e apresenta formato arredondado, com a porção terminal levemente pontiaguda (Figura 15A e G). A língua é arredondada; as fendas vocais se encontram no assoalho bucal na parte posterior. Os dentes vomerianos localizam-se entre as coanas se ordenando em duas filas transversais tendo entre 5 e 7 cristas.

Olhos são proeminentes (DO 2,9 – 4 mm), em vida apresentam pupila preta circular com íris de coloração dourada; a distância do olho até a narina (DON 3,1 – 3,9 mm) corresponde a 97,1% do diâmetro do olho. A distância entre as narinas (DIN 2,2 – 2,8 mm) corresponde a 55,5% da distância entre as órbitas (DIO 3,6 – 4,2 mm). *Canthus rostralis* é reto, marcado com a região loreal levemente côncava. Tímpano distinto, apresentando forma arredondada e coloração marrom. Seu diâmetro (DT 1,8 – 2,4 mm) representa 62,9% do diâmetro do olho. Apresenta prega supra timpânica que se inicia na região posterior do olho se estendendo até a região dos ombros; atrás do tímpano há uma massa de tecido glandular (Figura 15G).

Os membros são esguios, com os braços correspondendo a 19% do comprimento rostro-cloacal (CB 5,9 – 7,2 mm) e 91% do tamanho do antebraço. Antebraços são ligeiramente mais robustos (CAB 6,2 – 7,9 mm). Apresenta pequena membrana axilar pregueada da região da axila até a metade do braço. O comprimento da mão representa 85,7% do comprimento da cabeça (CM 10,1 – 11,4 mm). Dedos são longos e esguios, apresentam os seguintes comprimentos relativos: $I < II < IV < III$. Os discos adesivos são grandes e arredondados sendo mais largos do que longos; o disco adesivo do dedo III da mão corresponde a 90,9% do tamanho do tímpano (DD3 1,6 – 2,2 mm) (Figura 15C). Machos apresentam calo nupcial evidente com coloração creme, na região interna dos polegares, deixando-os com forma robusta; em fêmeas essa região não se modifica e os polegares são finos (Figura 15C e D). O tubérculo metacarpal interno é único apresentando forma elíptica, algumas vezes apresenta extremidade aguda. Em alguns indivíduos, o calo metarpal é pouco evidente. O calo metacarpal externo na base do dedo IV apresenta forma bífida. Tubérculos subarticulares são redondos, a linha dos dedos apresenta tubérculos dispostos em fileiras longitudinais; tubérculos supranumerários são pequenos e redondos (Figura 15C). Machos e fêmeas apresentam uma prega glandular que se inicia no tubérculo metacarpal se estendendo na borda da mão até a base do dedo IV. As membranas interdigitais são pouco desenvolvidas entre os dedos I e II das mãos. Entre os dedos II, III e IV a membrana se apresenta na seguinte fórmula: II 2- – 3 III 3 – 2- IV.

O comprimento do fêmur (CF 15,5 – 17,6 mm) corresponde a 92,2% do comprimento da tíbia. A tíbia apresenta comprimento representando 51,7% do CRC (CT 16,8 – 19,4 mm). O comprimento do tarso corresponde a 59,8% do tamanho do pé (Ctar 8,9 – 11,3 mm; CP 15 – 17,4 mm). Artelhos são finos e longos apresentando a proporção $I < II < V \leq III < IV$. As membranas interdigitais são bem desenvolvidas contendo a seguinte fórmula plantar: em machos I2 – 2II1- – 2III1- – 2-IV2- – 1V; fêmea I2 – 2-II1 – 2-III1- – 2-IV2- – 1-V. Disco adesivo do dedo 4 arredondado (DD4 1,6 – 2,2 mm) correspondendo a 86,4% do diâmetro do

tímpano. Tubérculo metatarsal interno arredondado às vezes elíptico; tubérculo metatarsal externo pouco desenvolvido com formato de arredondado a elíptico, algumas vezes inexistente. Tubérculos subarticulares são redondos, tubérculos supranumerários apresentam forma arredondada. Apresenta prega glandular do calo metatarsal externo até a base do dedo V (Figura 15B).

Em vista dorsal, machos e fêmeas apresentam pele com textura lisa. Em alguns indivíduos há presença de grânulos glandulares espalhados pela região do dorso (Figura 15D e G). Na superfície ventral a pele apresenta textura granular (Figura 15E). Machos possuem saco vocal simples e mediano, apresentando pele lisa. Na região peitoral há uma prega. O apêndice anal é apontado ventralmente acima da linha das coxas.

Em vida, machos e fêmeas apresentam coloração entre amarelo oliváceo e marrom na superfície dorsal. Na superfície ventral a cor varia entre creme e amarelo opaco. Nos flancos, regiões das coxas e axilas geralmente apresentam coloração amarelada. Espécimes geralmente apresentam padrão de coloração dorsal com diversas faixas, manchas e pontos marrom escuro ou preto na superfície dorsal. Possuem uma fina faixa preta ou marrom escuro na região da cabeça que se inicia no focinho segue o *canthus rostralis*, linha do olho, contorna a prega supra timpânica e termina no ombro; na região interorbital há uma mancha preta ou marrom escuro que varia entre as formas de V, M, W, Λ. Na base posterior da mancha interorbital há duas faixas longitudinais que podem apresentar extensões variadas nos indivíduos da população, geralmente terminam na altura das axilas ou da vertebra sacral. Na região dorsal e lateral podem apresentar também pequenas pintas ou manchas de coloração preta ou marrom escuro espalhadas (Figura 15G).

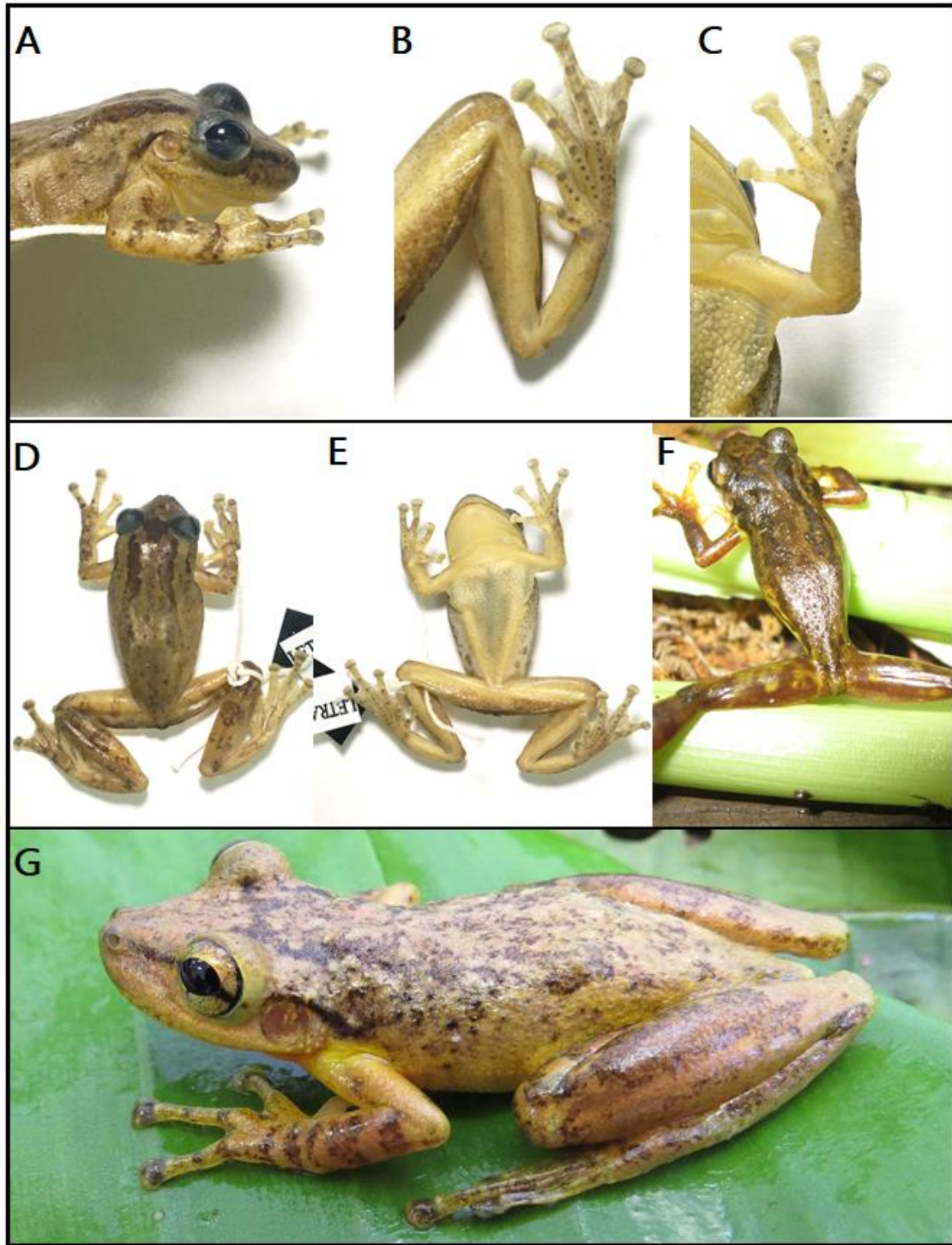
Na superfície dorsal membros peitorais possuem faixas de coloração marrom cortando os membros, estas geralmente podem ir do disco digital, mão, braços e são mais evidentes no

antebraço. O número de faixas é variável com espécimes apresentando de três a oito faixas marrom dos dedos até o braço. Na superfície dorsal das pernas, apresentam três faixas de coloração marrom atravessando fêmur, tíbia e tarso. Na região dos pés e dedos apresentam pequenas pintas algumas vezes formando faixas escuras que atravessam a linha dos dedos (Figura 15G). A superfície ventral apresenta grandes quantidades de pintas marrons. As membranas interdigitais possuem pontos pretos, que também estão espalhados nas mãos e pés. Nas fêmeas aparece uma maior quantidade de pigmentação na região gular e no peito. Em machos a pele da região gular e peitoral não apresenta pintas pigmentadas. Pintas e pequenas manchas marrom também podem estar espalhados entre as linhas que separam a região dorsal e ventral, e também na região dos flancos (Figura 15E).

Manchas reticulares nas regiões ocultas, entre tíbia e fêmur, típicas do grupo *Scinax ruber* (Duellman, 1970) são praticamente ausentes em *S. dolloi*. A maioria dos indivíduos possui nessa região coloração, bege, marrom, ou mesmo amarelo pálido sem apresentar manchas reticulares (Figura 15F). Na região entre a face anterior do fêmur e os flancos formam-se manchas amarelas com diferentes formas irregulares em fundo preto. Na região das axilas também apresentam coloração amarelo vívido se estendendo algumas vezes até a massa glandular abaixo do tímpano.

Quando os exemplares estão fixados, a pele do dorso apresenta coloração entre o bege e o castanho escuro. A superfície ventral adquire coloração creme, com a região dos flancos ficando esbranquiçada (Figura 15E). As manchas dos flancos adquirem coloração marrom escuro ou acinzentado. Faixas dorsais adquirem coloração marrom escuro algumas vezes preto. Manchas e pintas na superfície ventral ficam com coloração variando entre o castanho claro e o escuro. O tímpano adquire coloração bege e a íris preta (Figura 15A).

Figura 15 – Macho de *Scinax dolloi* coletado em Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro (A – E CCLZU 3288, CRC= 35,3 mm; indivíduo não coletado em F; em G CCLZU 3286, CRC= 33,6 mm) . Vistas lateral da cabeça (A), pé (B), mão (C); vistas dorsal (D, F e G) e ventral (E). Animal fixado de A até E.



Fonte: Elaborado pelo autor.

13.2.1 Variações populacionais em *Scinax dolloi*

Dentre as populações analisadas, os topótipos de *S. dolloi* são os que apresentam menor tamanho corporal. Apresentando valores semelhantes em comparação com as populações de Castelo (n= 7 indivíduos) e Santa Teresa (n= 5 indivíduos), Espírito Santo. Valores morfométricos medidos em populações amostradas neste estudo podem ser vistas e comparadas na Tabela 2 e Tabela 5. Populações de *Scinax dolloi* e apresentam caracteres morfológicos conservados ao longo de sua distribuição. Variações mais evidentes são encontradas no tamanho corporal, padrão de coloração em superfície dorsal e padrão de coloração em regiões ocultas quando em repouso.

Exemplares de Itamonte, Brejo da Lapa (n= 8 indivíduos), Parque Nacional do Itatiaia, em sua maioria, possuem padrão de coloração dorsal com manchas. Machas e faixas espalhadas pela superfície dorsal sempre apresentam coloração variando entre marrom escuro e preto. Exemplares comumente possuem faixa na cabeça do focinho até a cintura escapular, triângulo invertido na região interorbital e duas faixas longas na forma de “) (“ também possuindo outras faixas de tamanho menor no dorso. Há três faixas no antebraço, mão, fêmur, tíbia e tarso. Alguns exemplares possuem padrão quase uniforme, possuindo manchas vestigiais marrom (de fraca coloração) no dorso, contudo a mancha que se estende do focinho ao ombro é sempre presente. Pele do dorso em alguns indivíduos possui aspecto granular (Figura 16B). Em regiões escondidas (posterior do fêmur, flanco inguinal) indivíduos podem não apresentar padrão de coloração ou ter apenas manchas vestigiais (como os topótipos), e alguns exemplares podem apresentar padrão de manchas circulares, mosaicos ou manchas irregulares evidentes de coloração amarela vívida em fundo preto (Figura 16A – C).

Exemplares da população de Cristina (Minas Gerais) (n= 10 indivíduos), apresentam variação no padrão de manchas na superfície dorsal. Alguns exemplares possuem mancha do

focinho até a cintura escapular, triângulo invertido na região interorbital, duas grandes faixas de coloração marrom escuro no dorso, formando o formato da letra Y na área circundada; três faixas no antebraço e pernas. Podem ocorrer três faixas vestigiais de coloração marrom nos antebraços e pernas (Figura 16D e E). Outros exemplares possuem padrão muito manchado, manchas pelo dorso circundam uma área clara que forma um Y ou X; na região lateral do dorso, flancos e em todos os membros possuem padrão tigrado (possuindo faixas pretas ou marrom escuro), essas faixas podem se estender para as regiões escondidas dando um padrão tigrado, com faixas ou manchas irregulares em regiões escondidas (Figura 16F). Em regiões escondidas, manchas são pouco evidentes ou apresentam pequenas manchas em forma de pequenos círculos, barras e pequenas manchas irregulares de coloração preta.

A população de Piquete (n= 9 indivíduos) apresenta maior tamanho em relação aos topótipos. Indivíduos possuem padrão de coloração com muitas manchas de coloração preta na superfície dorsal. Alguns exemplares possuem duas faixas em formato de parênteses invertidos no dorso e pequenas manchas irregulares espalhadas de coloração preta ou marrom. No antebraço possuem três faixas, na mão possuem duas faixas de coloração marrom escuro; no fêmur, tíbia e tarso possuem três faixas vestigiais de coloração marrom (Figura 16G – I). A cabeça possui faixa do focinho até a cintura escapular. Alguns indivíduos possuem coloração dorsal marrom possuindo faixa na cabeça (focinho até o ombro), triângulo invertido na região interorbital, duas manchas longas se estendendo pelo dorso, todas de coloração preta. A área circundada na região dorsal apresenta formato semelhante a letra Y ou X. Tíbia, fêmur, e tarso possuem de três a quatro faixas largas que podem se estender até os pés e artelhos, possuindo coloração preta. Padrão de coloração em regiões ocultas quando em repouso, podem ter coloração pouco evidente ou apresentar manchas amarelas de formato irregular, mosaico ou barras em fundo preto (Figura 16G – I).

Indivíduos das populações de Itatiaia, Rio de Janeiro (Figura 17A – C) (n= 4 indivíduos) e Queluz (Figura 17D e E) (n= 2 indivíduos), dentre as populações registradas, são as que se localizam em menores altitudes na transição entre a Serra da Mantiqueira e o Vale do Paraíba. Os espécimes registrados nessas populações apresentam padrão de coloração dorsal com poucas manchas, alguns tendo manchas vestigiais marrom de pequeno tamanho ou fraca pigmentação (Veja figura 17 A – E). Uma faixa partindo do focinho passando pelo *conthus rostralis*, tímpano e terminando nos ombros é sempre presente, possuindo coloração marrom escuro ou preta. Um exemplar de Queluz apresentou duas faixas no dorso de coloração fraca (pouco visíveis), três faixas de cor marrom no antebraço e na tíbia (Figura 17D). Exemplares de Itatiaia, Rio de Janeiro, localizados na chamada Parte baixa, não apresentaram quaisquer manchas nos membros. Pontos pigmentados estão espalhados pelo dorso. Padrão de coloração em regiões escondidas pode ser ausente, vestigial, ou como o registrado em um exemplar, possuindo pequenas manchas irregulares amarelas em fundo preto (Figura 17 A – C).

Espécimes de São Antônio do Pinhal (n= 16 indivíduos) podem apresentar padrão com manchas vestigiais pelo dorso (Figura 17F), ou padrões bem manchados sendo o mais comum duas faixas espessas no dorso com formato de parênteses invertidos “)” (“ seguido de duas faixas do mesmo formato, de tamanho menor, na altura da cintura pélvica (Figura 17G e H). Pequenos pontos pigmentados e linhas irregulares são espalhados pelo dorso e região lateral. Apresentam de três a cinco faixas no antebraço, fêmur e tíbias; no tarso possuem pequenas manchas irregulares. Faixa lateral da cabeça indo do focinho até a cintura escapular é sempre presente (Figura 17F – H). Padrão de manchas em regiões escondidas (posterior do fêmur, flanco inguinal) é pouco evidente em alguns exemplares. Nos exemplares em que as manchas são evidentes, o padrão mais comum é de círculos amarelos envoltos por preto.

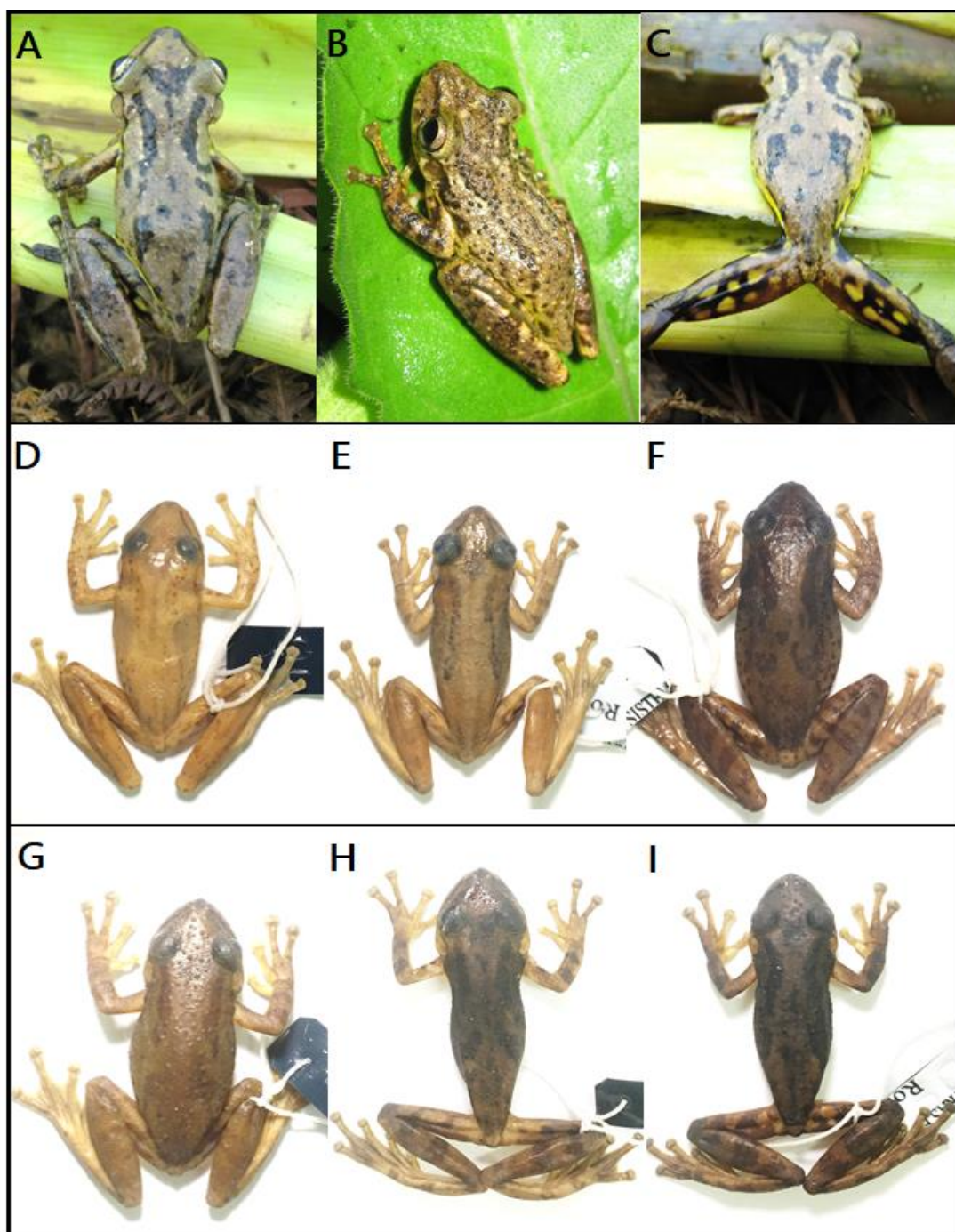
Exemplares da população de Campos do Jordão (n= 27 indivíduos) possuem pele dorsal com grande quantidade de grânulos glandulares espalhados pela superfície. Exemplares podem

apresentar padrão de coloração dorsal variável desde indivíduos com poucas manchas vestigiais de coloração marrom, até indivíduos com padrão com muitas manchas de coloração marrom ou preta (Figura 18A – C). Faixa localizada lateralmente do focinho até o ombro, e triângulo invertido na região interorbital estão presentes em todos os exemplares. Na face posterior das coxas há grande variação, alguns exemplares não possuem padrão de coloração (a coloração no local é castanho claro ou castanho escuro), outros exemplares possuem padrão pouco evidente com pequenas manchas irregulares de coloração amarela pouco vívida, a minoria dos exemplares apresenta padrão evidente com grandes círculos amarelos e mosaicos de coloração amarela em fundo preto (Figura 18D). Possuem três faixas no antebraço, fêmur, tíbia e tarso; algumas vezes essas faixas têm formato elíptico de cor marrom escuro ou preta (Figura 18A – C).

Dentre os exemplares analisados de Camanducaia (n= 10 indivíduos), dois indivíduos apresentaram padrão de coloração dorsal com poucas manchas de coloração marrom (quase vestigiais) (Figura 18G). Estes apresentaram faixa se iniciando no focinho indo até a parte posterior da axila; duas faixas dorsais em formato de parênteses invertidos, mancha de formato irregular na região interorbital (geralmente forma de V ou M); o antebraço apresenta uma faixa vestigial de coloração marrom, a tíbia apresenta três faixas vestigiais de mesma coloração. Não apresentam padrão de manchas em regiões escondidas, no lugar delas possuem apenas a cor castanho claro (Figura 18E e F). Os demais exemplares (oito) apresentaram padrão de coloração dorsal com variações entre pouco ou muito rajado. Apresentam diversas manchas de coloração preta ou marrom escuro, em diferentes tamanhos espalhados por toda a superfície dorsal do corpo. Manchas tradicionais (focinho-ombro, dorsal, interorbital, braços e pernas) estão sempre presentes, demais manchas cobrem grande parte da superfície dorsal indo até os flancos (Figura 18G – I). Padrões de manchas amarelas em fundo preto, em regiões ocultas podem ser pouco evidentes; alguns exemplares apresentaram padrão evidente possuindo padrão composto de

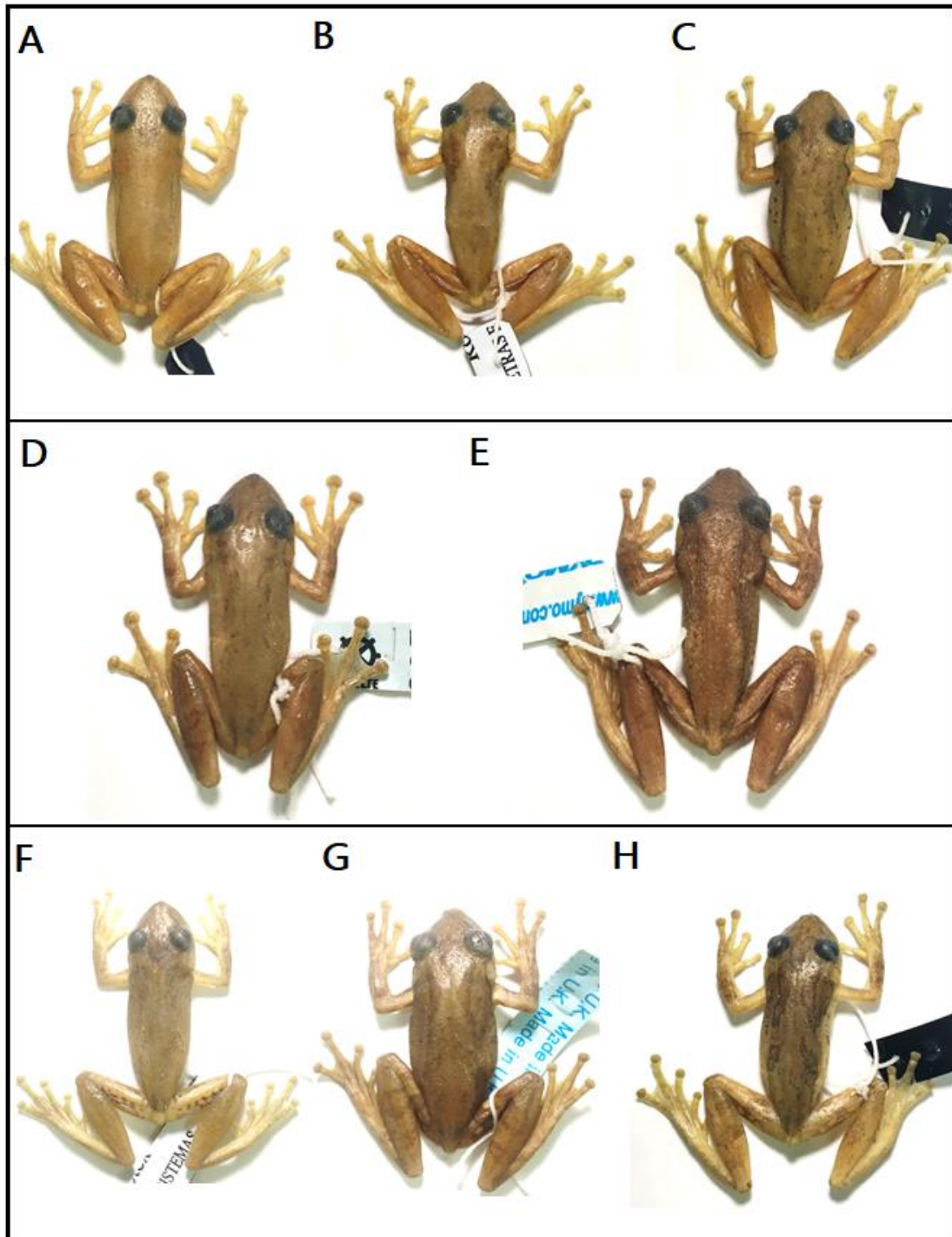
círculos, barras ou manchas irregulares amarelas circundadas por marrom escuro ou preto. Na superfície ventral, machos em sua maioria, apresentam peito sem pigmentação. Contudo, um exemplar foi registrado possuindo pontos pigmentados nessa região. Alguns machos possuem grandes pontos pigmentados na mandíbula.

Figura 16 – Padrões de coloração dorsal em machos de *Scinax dolloi*. Exemplos coletados no Brejo da Lapa, Itamonte, MG. (A) vista dorsal (CFBH 40171, CRC= 38,6 mm), (B) vista lateral evidenciando padrão e coloração e aspecto granular do dorso (CFBH 40173, CRC= 33,9 mm) (C) vista posterior evidenciando padrão de coloração na face posterior do fêmur e flancos; Imagens D – F, espécimes coletados em Cristina, MG. CCLZU 2231, CRC= 34,8 mm (D), CCLZU 2119, CRC= 38,2 mm (E), CCLZU 2956, CRC= 39,4 mm (F); Exemplos coletados em Piquete, CCLZU 2795, CRC= 38 mm (G), CCLZU 2881, CRC= 39,3 mm (H), CCLZU 2882, CRC= 39,6 mm (I). De A a C animais em vida, de D a I animais fixados.



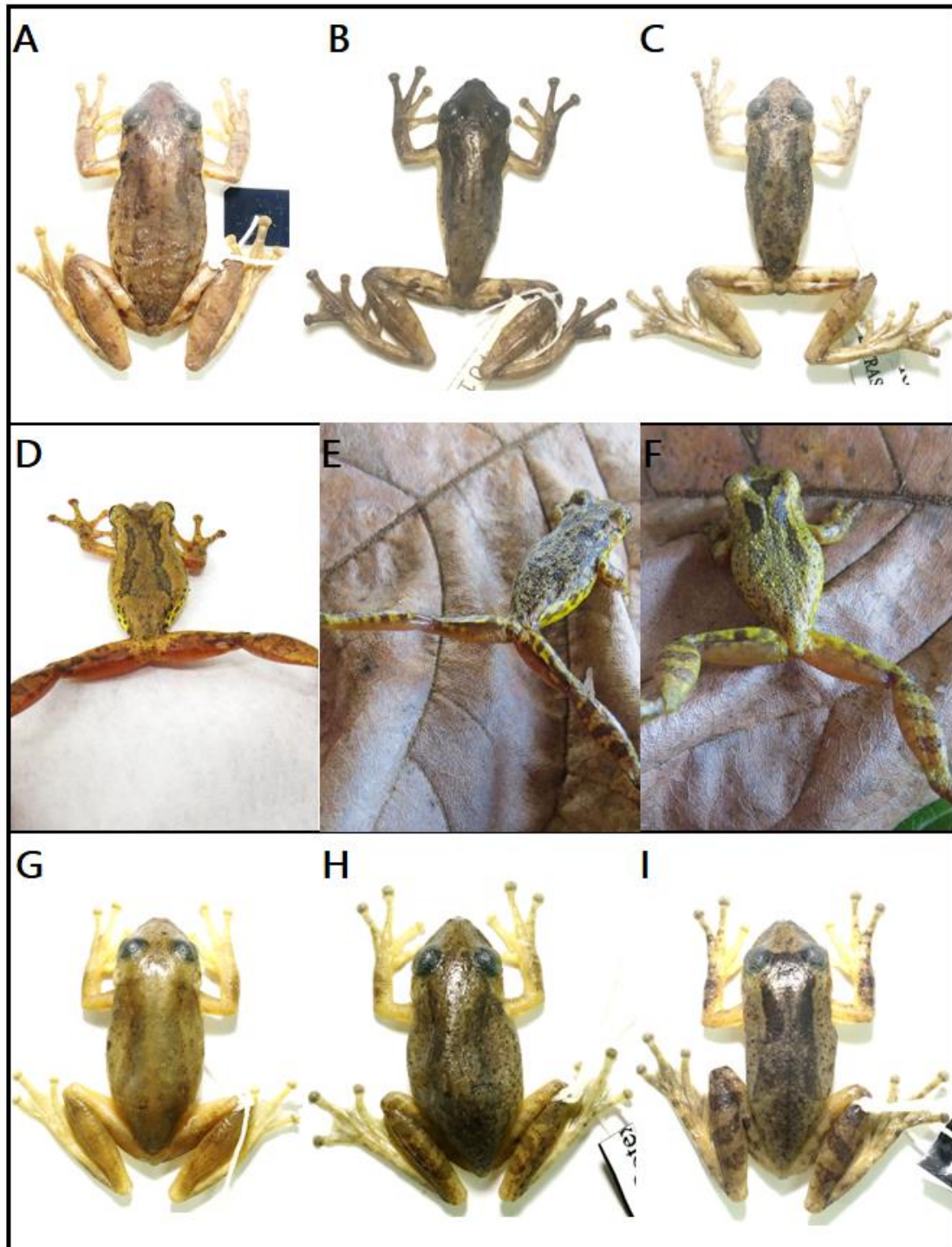
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Padrão de coloração dorsal em machos fixados de *Scinax dolloi*. Indivíduos com padrão vestigial para padrão evidente (da esquerda para a direita). Itatiaia (parte baixa): CCLZU 2726, CRC= 39 mm (A), CCLZU 2724, CRC= 37 mm (B), CCLZU 2687, CRC= 34,6 mm (C); Queluz: CCLZU 1328, CRC= 39,7 mm (D), CCLZU 1727, CRC= 39,5 mm (E); Santo Antônio do Pinhal: CCLZU 3181, CRC= 38,5 mm (F), CCLZU 1107, CRC= 37,7 mm (G), CCLZU 3180, CRC= 38,6 mm (H).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Padrão de manchas na superfície dorsal de *Scinax dolloi* de Campos do Jordão (A – C) e Camanducaia (G – I). Padrão de coloração na face posterior da coxa vestigial, ou pouco evidente em Campos do Jordão (D) e Camanducaia (E e F). CCLZU 2334 (fêmea), CRC= 40,2 mm (A), CFBH 40180, CRC= 38,5 mm (B), CCLZU 3310, CRC= 38,6 mm (C), (D) exemplar não coletado; CCLZU 3478, CRC= 36,8 mm (E e H), CCLZU3473, CRC= 36,4 mm (F e I), CCLZU 3475, CRC= 34 mm (G). Em D, E e F animais em vida.



Fonte: Elaborado pelo autor.

13.2.2 Comparações morfométricas

Nas análises morfométricas comparativas, também foram incluídas as populações de *Scinax hayii* do Espírito Santo (Castelo e Santa Teresa) para verificar a possibilidade dessas populações se tratarem de *S. dolloi*. Os caracteres utilizados na análise de componentes principais que melhor explicam a variação populacional em *Scinax dolloi* são: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento do pé (CP), comprimento da tíbia (CT), comprimento do fêmur (CF), largura da cabeça (LC) e comprimento do braço (CB), respectivamente (Veja Figura 19 e Tabela 4). O componente principal 1, representado pelo eixo X, corresponde a 78,9% da variação encontrada entre populações de *S. dolloi*. O principal caractere na construção do componente principal 1 foi o comprimento rostro-cloacal (valor de *loading* 0,80). O componente principal 2 (eixo y) representa 11,5% da variação encontrada. Os principais caracteres influenciadores na construção do componente principal 2 foram o comprimento rostro-cloacal (-0,57) e o comprimento do fêmur (0,50). Valores de importância de todos caracteres utilizados na análise são apresentados na Tabela 4.

O eixo x pode ser tomado com indicador de tamanho, na extremidade direita encontra-se a população de Campos do Jordão e Queluz que apresentaram a maior média populacional em CRC, seguido de Piquete Cristina (Figura 20). Em contrapartida, a população de Maringá, localidade tipo de *Scinax dolloi*, e as populações de Castelo e Santa Teresa apresentam a população com menor tamanho corporal registrado neste estudo (Figura 20, Tabela 2 e Tabela 5).

O gráfico de *box e jitter plot* mostra que dentre as populações os topotipos de *S. dolloi* apresentam o menor tamanho corporal, tendo a população de Castelo e Santa Teresa valores mais aproximados. Apesar de Queluz possuir a maior mediana entre as populações, a população de Campos do Jordão apresenta a maior amplitude, seguido de Cristina e Piquete (Figura 21).

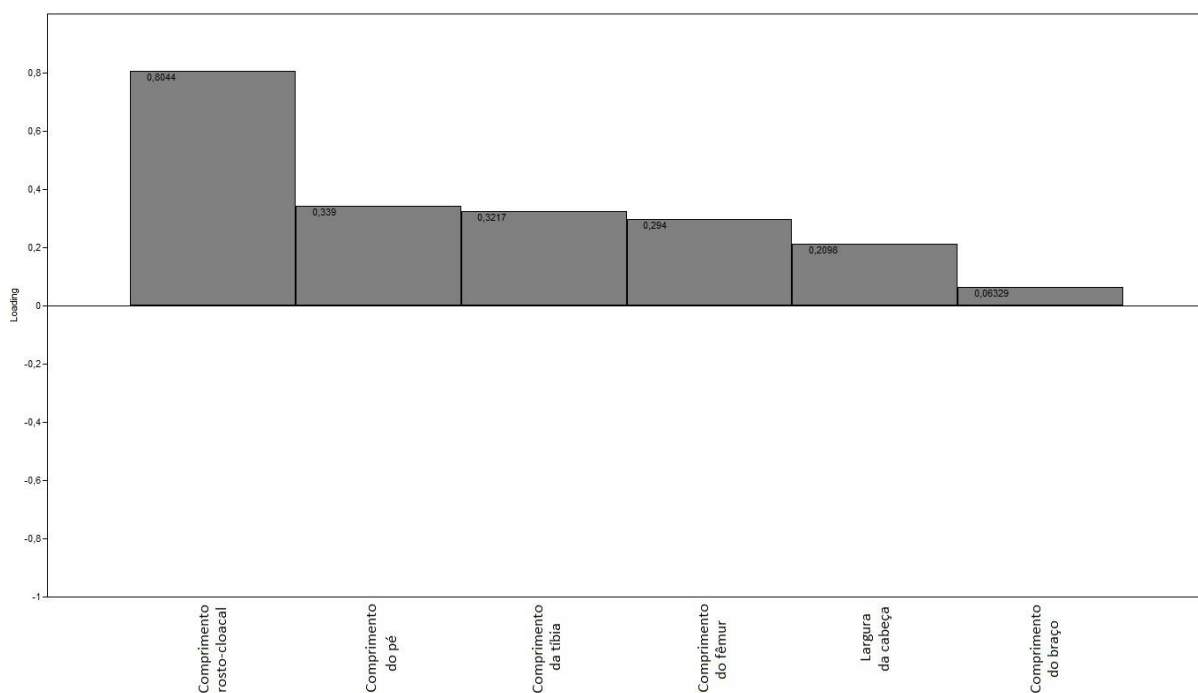
O teste de Dunn aplicado entre as populações para comparar o comprimento rostro-cloacal revela que há diferença estatística significativa entre a população de Maringá e todas as populações exceto Itatiaia (parte baixa), Monte Verde, Castelo e Santa teresa (Veja Tabela 6). A população de Monte Verde diferiu significativamente de todas populações exceto Maringá, Itamonte e Itatiaia. Todos os valores do teste de Dunn realizado entre as populações são apresentados na Tabela 6.

Tabela 4 – Matriz de importância dos utilizados na análise de componentes principais em populações de *S. dolloi* incluindo populações de *S. hayii* do Espírito Santo (Castelo e Santa Teresa). (PC) componente principal. Caracteres: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento do pé (CP), comprimento da tibia (CT), comprimento do fêmur (CF), largura da cabeça (LC) e comprimento do braço (CB).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6
CRC	0,8044	-0,571	0,1003	-0,09004	0,05671	0,074
CP	0,339	0,3122	-0,3399	0,7898	0,2187	-0,02194
CT	0,3217	0,4942	-0,1233	-0,233	-0,4963	0,58
CF	0,294	0,4998	-0,03585	-0,5013	0,5528	-0,3249
LC	0,2098	0,1533	0,1274	0,05546	-0,6194	-0,7277
CB	0,06329	0,2428	0,9174	0,2439	0,1157	0,1501

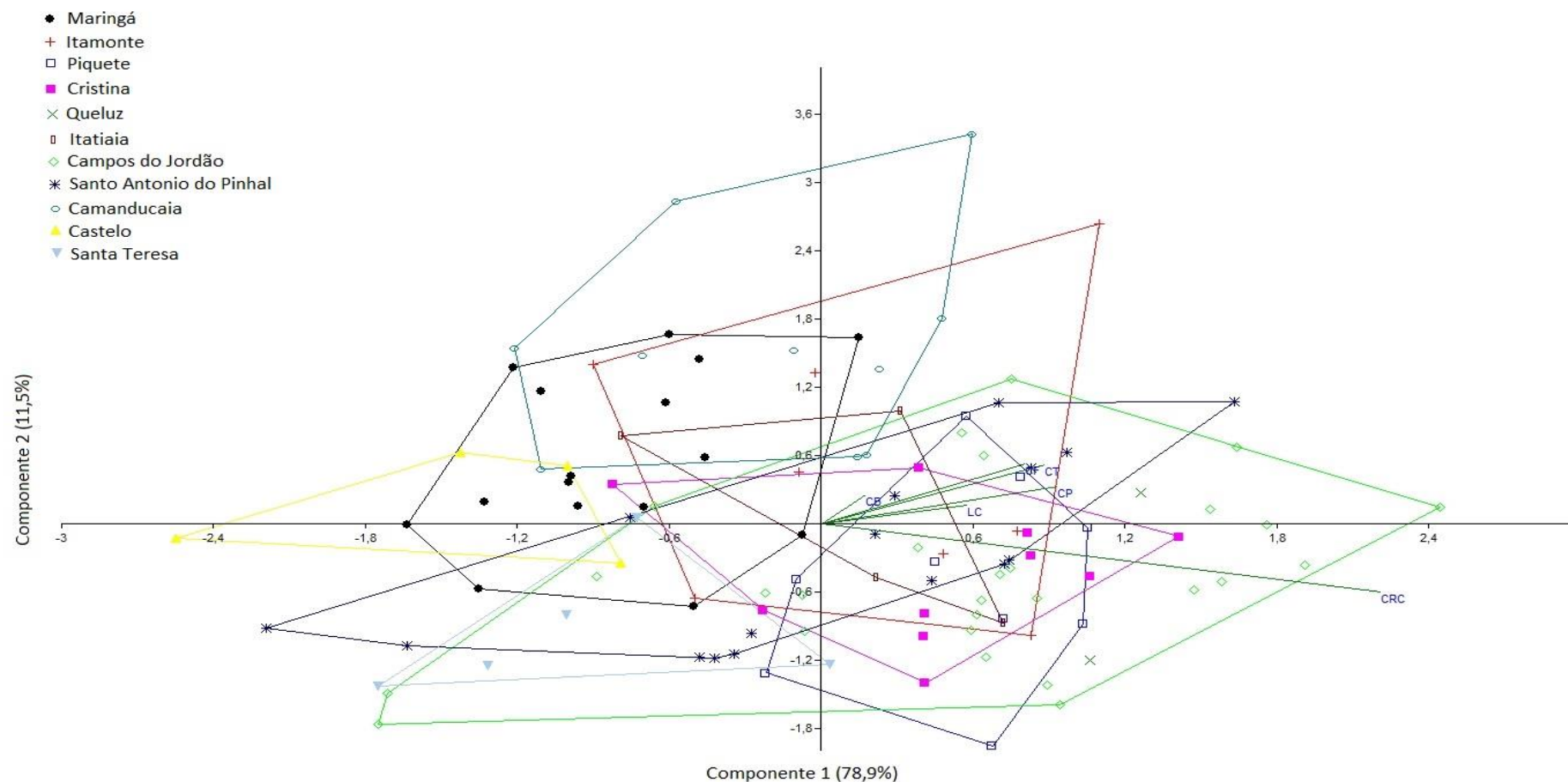
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Importância dos caracteres morfométricos utilizados na análise de componentes principais em populações de *Scinax doloii* e *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa (Espírito Santo). Caracteres foram selecionados por representarem a maior variação encontrada entre as populações.



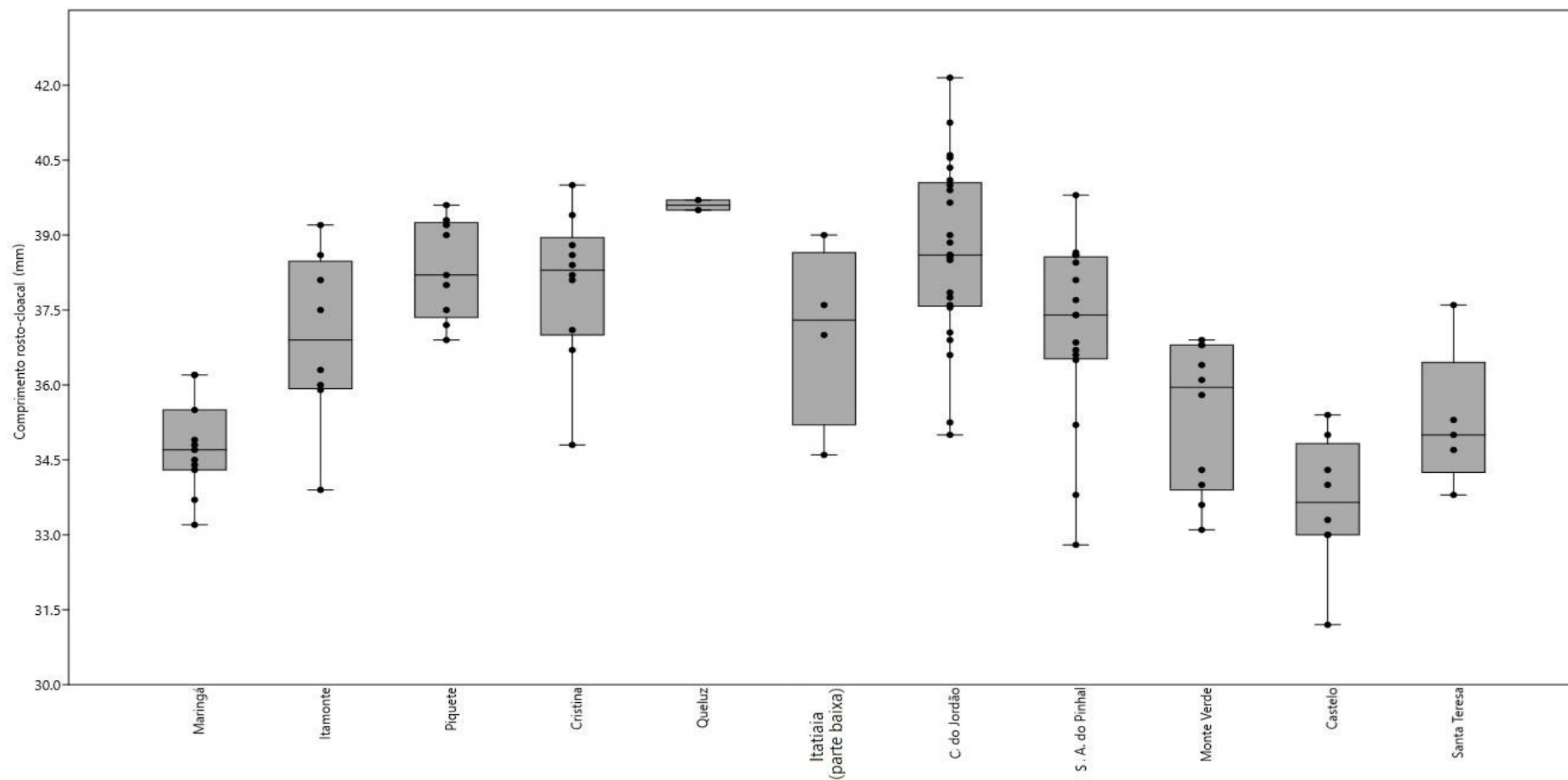
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Análise de componentes principais em onze populações de *Scinax dolloi*, incluindo *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa, utilizando seis caracteres morfométricos. O eixo x (componente principal 1) explica 78,9% da variação encontrada e o eixo y (componente principal 2) 11,5%. Caracteres representados nos eixos centrais da figura são: Comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento do pé (CP), comprimento da tíbia (CT), comprimento do fêmur (CF), largura da cabeça (LC) e comprimento do braço (CB).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – *Box e jitter plot* utilizando o parâmetro comprimento rostro-cloacal populações de *Scinax dolloi*, incluindo populações de Castelo e Santa Teresa (ES) identificados como *Scinax hayii*. Box representam primeiro e terceiro quartis; linha central representa a mediana; linhas verticais apresentam valores de amplitude; pontos representam valores de cada exemplar mensurado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Parâmetros morfométricos de 18 caracteres de nove populações de *Scinax dolloi* na Serra da Mantiqueira. Valores são apresentados em milímetros, na forma de amplitude e média seguida de desvio padrão. Parâmetros analisados: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), distância interorbital (DIO), distância olho-narina (DON), distância narina-focinho (DNF), distância inter-nasal (DIN), diâmetro do tímpano (DT), comprimento do fêmur (CF), comprimento da tíbia (CT), comprimento do pé (CP), comprimento do tarso (CTAR), comprimento da mão (CM), comprimento do braço (CB), comprimento do antebraço (CAB), diâmetro do disco adesivo do dedo 3 da mão (DD3), diâmetro do disco adesivo do dedo 4 do pé (DD4).

Caractere medido (mm)	Maringá n=10	Itamonte n=8	Queluz n=2	Piquete n=9	Cristina n=10
CRC	33,2 – 36,2 (34,8±0,9)	33,9 – 39,2 (36,9±1,7)	39,5 – 39,7 (39,6±0,1)	36,9 – 39,6 (38,3±1)	34,8 – 40 (38±1,5)
CC	11,8 – 13,3 (12,6±0,5)	11,6 – 13,9 (12,6±0,7)	13,5 – 13,7 (13,6±0,1)	12,2 – 13,8 (12,9±0,6)	11,8 – 13,2 (12,5±0,4)
LC	10,5 – 12,1 (11,4±0,5)	10,8 – 12,7 (12±0,7)	12,4 – 12,7 (12,6±0,2)	11,4 – 12,9 (12,2±0,5)	11,3 – 12,7 (12±0,4)
DO	2,9 – 4 (3,5±0,4)	3,3 – 3,5 (3,4 ±0,1)	3,7 – 3,7 (3,7±0)	3 – 4 (3,5±0,3)	3 – 3,8 (3,4±0,3)
DIO	3,6 – 4,2 (4±0,2)	3,7 – 4,6 (4,2 ±0,3)	4,5 – 4,5 (4,5±0)	3,7 – 4,5 (4,1±0,2)	3,4 – 4,1 (3,8±0,2)
DON	3,1 – 3,9 (3,4±0,2)	2,9 – 4 (3,3±0,3)	3,9 – 3,9 (3,9±0)	3,2 – 4,1 (3,7±0,3)	3 – 4 (3,3±0,3)
DNF	1,2 – 1,7 (1,5±0,2)	1,3 – 1,8 (1,5±0,2)	1,4 – 1,4 (1,4±0)	1,4 – 2,1 (1,7±0,2)	1,3 – 1,6 (1,5±0,1)
DIN	2,2 – 2,8 (2,5±0,2)	2,4 – 3,1 (2,8±0,2)	2,5 – 2,8 (2,7±0,2)	2,5 – 2,8 (2,6±0,1)	2,3 – 2,7 (2,5±0,1)
DT	1,8 – 2,4 (2,2±0,2)	2,2 – 2,5 (2,4±0,2)	2,1 – 2,5 (2,3±0,3)	2,2 – 2,8 (2,5±0,2)	2 – 2,5 (2,3±0,1)
CF	15,5 – 17,6 (16,6±0,8)	15,6 – 19,2 (17,5±1)	17,1 – 18,5 (17,8±1)	14,4 – 18,2 (17±1,1)	16,7 – 18,6 (17,2±0,6)
CT	16,8 – 19,4 (18±0,8)	18,1 – 20,7 (18,8±0,8)	18,5 – 19,9 (19,2±1)	17 – 19,2 (17±1,1)	17,3 – 19,4 (18,4±0,8)
CP	15 – 17,4 (15,9±0,8)	15,9 – 18,8 (16,7±0,9)	16,7 – 17,5 (17,1±0,6)	15,3 – 17,5 (16,6±0,7)	15,3 – 18 (16,9±0,8)
Ctar	8,9 – 11,3 (9,7±0,7)	9,4 – 11,8 (10,4±0,9)	8,6 – 10,6 (9,6±1,4)	8,7 – 11 (9,8±0,8)	9,3 – 11,2 (10,1±0,7)
CM	10,1 – 11,4 (10,8±0,4)	10,5 – 12,4 (11,2±0,6)	11,1 – 11,9 (11,5±0,6)	10,3 – 12,7 (11,6±0,8)	10,1 – 12,1 (11,4±0,6)
CB	5,9 – 7,2 (6,6±0,4)	4,5 – 7 (7±0,9)	5,3 – 6,6 (5,8±0,7)	6 – 6,9 (6,4±0,3)	5 – 6,4 (5,6±0,5)
CAB	6,2 – 7,9 (7,2±0,5)	5,8 – 8,4 (7,1±0,7)	7,9 – 8 (8±0,1)	6,8 – 8,5 (7,4±0,6)	6,4 – 8,5 (7,3±0,5)

Dd3	1,6 – 2,2 (2±0,2)	2 – 2,3 (2,2±0,1)	2,3 – 2,6 (2,5±0,2)	1,5 – 2,6 (2,1±0,3)	1,9 – 2,5 (2,2±0,2)
Dd4	1,6 – 2,2 (1,9±0,2)	1,9 – 2,3 (2,1±0,2)	2 – 2,5 (2,3±0,4)	1,6 – 2,3 (2±0,3)	1,9 – 2,5 (2,2±0,2)

Tabela 5 – Continuação.

Caractere medido (mm)	Itatiaia (parte baixa) n=4	Campos do Jordão n=29	Santo Antônio do Pinhal n=16	Camanducaia n=10
CRC	34,6 – 39 (37,1±1,8)	35 – 42,2 (38,5±2)	32,5 – 39,8 (37,1±1,9)	33,1 – 36,9 (35,4±1,5)
CC	12,2 – 13 (12,7±0,4)	10,8 – 14,5 (12,7±0,9)	10,8 – 13,6 (12,5±0,7)	12,7 – 13,5 (13,1±0,2)
LC	11,7 – 12 (11,8±0,2)	9,7 – 13 (12±0,7)	10,3 – 13,3 (11,7±0,9)	11,5 – 12,5 (12,1±0,3)
DO	3,4 – 3,7 (3,6±0,1)	2,5 – 4,6 (3,2±0,5)	2,3 – 3,8 (3,1±0,4)	3,4 – 4,5 (3,8±0,4)
DIO	3,9 – 4,4 (4,1±0,2)	3,7 – 5 (4,1±0,4)	3,3 – 4,4 (3,9±0,3)	3,9 – 4,6 (4,3±0,3)
DON	3,4 – 4,3 (3,9±0,4)	2,4 – 4,3 (3,6±0,5)	2,7 – 4,4 (3,4±0,6)	3 – 4,1 (3,3±0,4)
DNF	1,3 – 1,6 (1,5±0,1)	0,6 – 1,7 (1,3±0,3)	1,3 – 2,1 (1,6±0,3)	0,8 – 1,5 (1,1±0,2)
DIN	2,5 – 2,8 (2,6±0,1)	2,1 – 3 (2,5±0,2)	2,3 – 2,8 (2,5±0,2)	2,3 – 2,7 (2,5±0,1)
DT	2,1 – 2,4 (2,2±0,1)	1,9 – 2,9 (2,4±0,2)	1,9 – 2,5 (2,2±0,2)	2,4 – 2,7 (2,5±0,1)
CF	16,4 – 18 (17,1±0,7)	14,6 – 19,1 (17,3±1)	14,1 – 18,4 (16,8±1,2)	16,2 – 19,3 (17,6±0,8)
CT	17,9 – 19,3 (18,6±0,6)	16,2 – 20,6 (18,6±1,2)	16,1 – 20,2 (18,2±1,3)	17,3 – 20,5 (18,9±0,9)
CP	15,3 – 16,9 (16,2±0,7)	14,2 – 18,8 (16,8±1,1)	14,5 – 18,1 (16,2±1)	15,6 – 18,1 (16,7±1)
Ctar	9,4 – 10,4 (9,8±0,5)	8,4 – 10,6 (9,6±0,6)	8,3 – 10,4 (9,6±0,6)	9,2 – 13 (10,3±1,1)
CM	10,7 – 11,8 (11,2±0,5)	9,5 – 12,7 (11,6±0,7)	9,9 – 12,4 (11,3±0,8)	10,6 – 12,3 (11,7±0,6)
CB	6,1 – 7,3 (6,6±0,5)	4 – 6,9 (5,7±0,6)	5,3 – 7,7 (6,5±0,7)	5,5 – 7,4 (6,6±0,6)
CAB	7 – 7,8 (7,4±0,4)	5,2 – 7,7 (6,3±0,6)	5,7 – 7,3 (6,5±0,5)	7 – 8,3 (7,5±0,4)
Dd3	2,1 – 2,3 (2,1±0,1)	1,7 – 2,5 (2,2±0,2)	1,8 – 2,5 (2,2±0,2)	1,8 – 2,4 (2,2±0,2)
Dd4	1,9 – 2,1 (2,1±0,1)	1,7 – 2,4 (2,1±0,2)	1,8 – 2,4 (2,1±0,2)	1,7 – 2,2 (2±0,2)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Teste de Dunn aplicado entre as populações de *Scinax dolloi* amostradas na Serra da Mantiqueira e populações identificadas como *S. hayii* de Castelo e Santa Teresa, Espírito Santo, utilizando o parâmetro rostro-cloacal (CRC). Valores de p significativos ($p < 0,05$) são destacados em cinza.

	Maringá	Itamonte	Piquete	Cristina	Queluz	Itatiaia (parte baixa)	Campos do Jordão	S. A. do Pinhal	Camanducaia	Castelo	Santa Teresa
Maringá											
Itamonte	0.03558										
Piquete	0.0001849	0.1474									
Cristina	0.0004825	0.2476	0.7352								
Queluz	0.002124	0.07975	0.3835	0.2801							
Itatiaia (parte baixa)	0.06526	0.8705	0.3148	0.4482	0.1378						
Campos do Jordão	7,38E-04	0.04486	0.7754	0.4766	0.4377	0.1843					
S. A. do Pinhal	0.006732	0.8447	0.1373	0.2501	0.08296	0.9786	0.0226				
Camanducaia	0.5834	0.1203	0.001714	0.004051	0.006152	0.1573	3,37E-02	0.04151			
Castelo	0.509	0.01027	4,32E-02	0.000113	0.000737	0.0239	2,40E-04	0.001579			
Santa Teresa	0.6334	0.207	0.01072	0.02063	0.01189	0.2221	0.001739	0.1165	0.9744	0.3225	

Fonte: Elaborado pelo autor.

13.3 Análise Molecular

A análise de máxima verossimilhança das sequências obtidas resultou em um clado monofilético bem suportado. A espécie *Scinax hayii* juntamente com *S. perereca*, *Scinax dolloi* e formam um clado monofilético com alto valor de suporte (0,96) (Figura 22).

As populações de *Scinax hayii* apresentam estruturação genética entre algumas regiões de sua distribuição e podem ser divididas em três grupos (subclados) geneticamente: (i) um clado contendo os topótipos e as populações de Teresópolis, Mangaratiba, Paraty, São Luiz do Paraitinga, Ubatuba, Ilhabela e Santa Isabel; (ii) *Scinax hayii* de Santa Teresa, Espírito Santo, representando a população amostrada mais ao norte da distribuição; e (iii) um subclado contendo as populações de São Bernardo do Campo, Mogi das Cruzes, Biritiba Mirim, Peruíbe, Apiaí, Santos, Iguape e Ribeirão Grande, representando o clado com distribuição na parte sul de ocorrência da espécie. Os três grupos apresentaram alto valor de suporte para este arranjo, mostrando ter variação e estruturação das populações ao longo da distribuição de *Scinax hayii*. Entretanto esses grupos não apresentaram divergência genética suficiente para serem considerados unidades taxonômicas distintas (Figura 22).

Scinax dolloi foi dividida em dois grupos pela análise do gene COI. O primeiro grupo representa um clado monofilético pelo agrupamento de espécimes das populações da localidade tipo, Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro, e as localidades de Vargem Alta e Castelo, ambas no Estado do Espírito Santo. Esse agrupamento apresentou alto valor de suporte (100%).

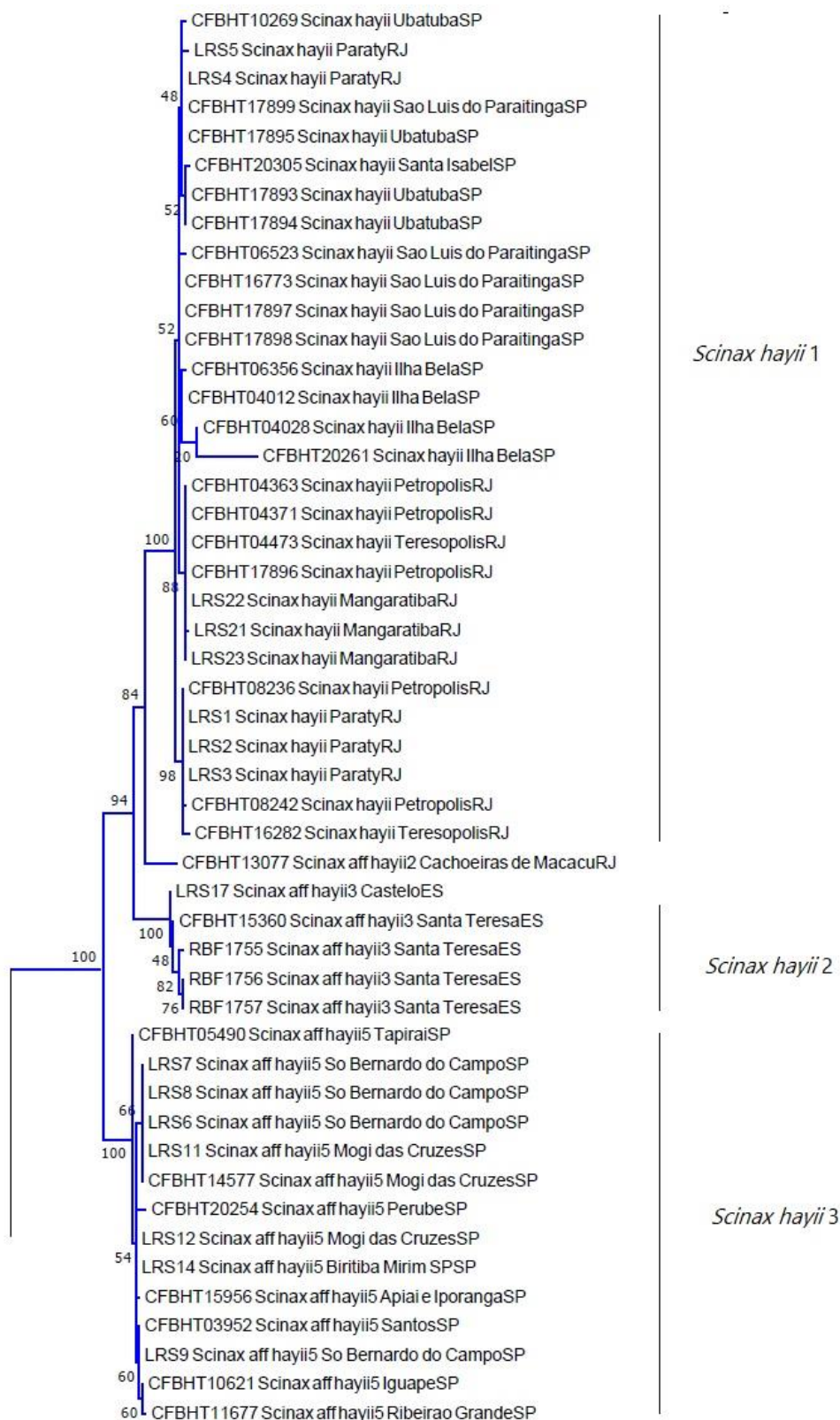
Um outro clado com alto valor de suporte (100% em função *bootstrap*), representa um grupo monofilético próximo a *S. dolloi* composto por espécimes das localidades de Campos do Jordão, Santo Antonio do Pinhal, Piquete e São José do Barreiro (este localizado na Serra da Bocaina) e São José dos Campos no estado de São Paulo; e Itamonte, Cristina e Camanducaia no estado de Minas Gerais. Este grupo é considerado um grupo irmão de *Scinax dolloi*,

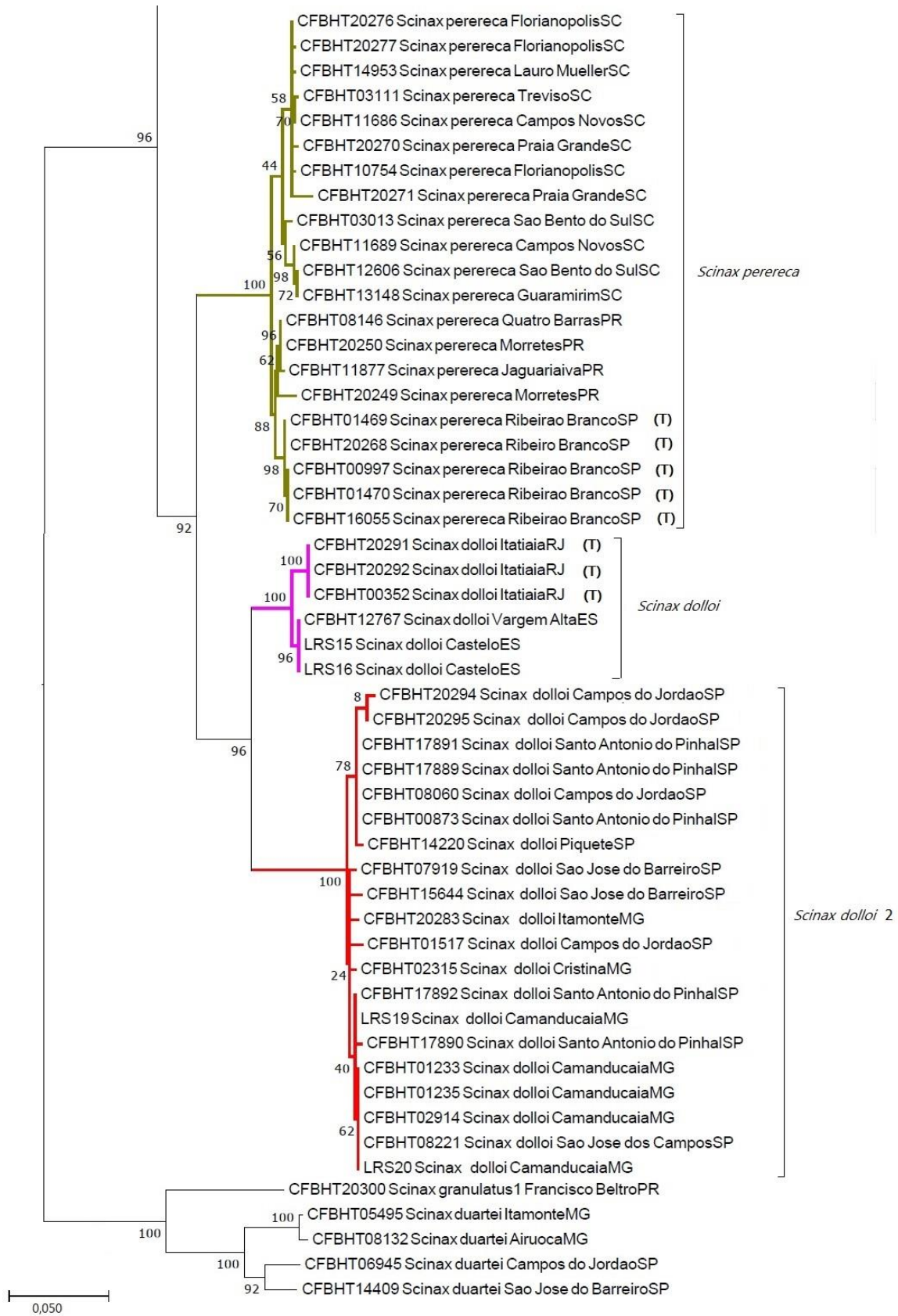
entretanto apresenta divergência com valor de suporte de 96% em função bootstrap, em comparação com tecidos amostrados para exemplares da localidade tipo.

O clado formado por populações de *Scinax perereca* é bem estruturado e pode ser dividido em dois subclados com valor de suporte de 100%: (i) *Scinax perereca* subclado A formado pelas populações de Ribeirão Branco (SP), e localidades do estado do Paraná (Morretes, Quatro Barras e Jaguaraíva); e *Scinax perereca* subclado B formado pelas populações do estado de Santa Catarina (Florianópolis, Lauro Mueller, Praia Grande, Treviso, São Bento do Sul e Campos Novos). Dados de *S. perereca* foram reanalisados de Silva (2017).

Scinax perereca e *Scinax dolloi* apresentam maiores afinidades genéticas entre si (valor de suporte 92%) do que com *Scinax hayii*, sendo consideradas um grupo-irmão. A distribuição geográfica das espécies e suas populações conforme resultado da análise molecular é apresentada na Figura 23.

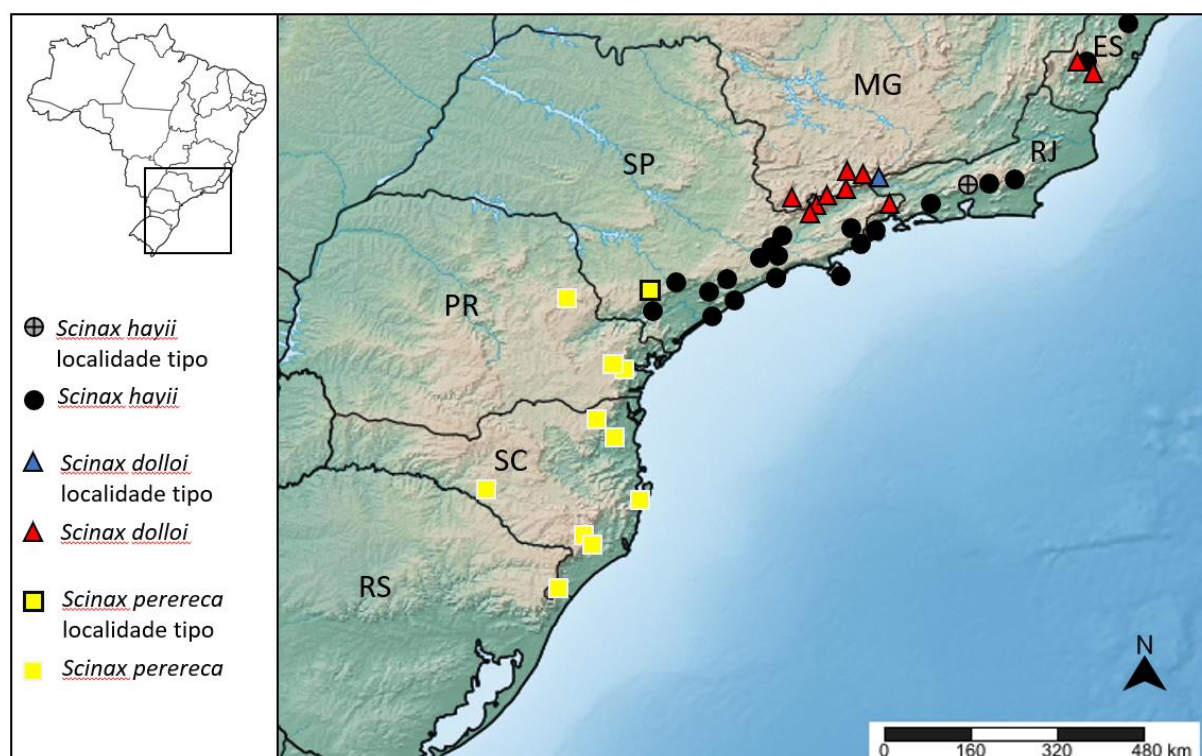
Figura 22 – Árvore de máxima verossimilhança dos fragmentos mitocondriais sequenciados do gene Citocromo c Oxidase I (COI) de espécies de *Scinax* (*S. dolloi*, *S. duartei*, *S. granulatus*, *S. hayii* e *S. perereca*). Os números próximos aos nós indicam os valores de suporte dos agrupamentos em função do *bootstrap*. (T) indica topótipos.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Distribuição geográfica de *Scinax dolloi*, *Scinax hayii* e *Scinax perereca*, utilizadas na análise molecular do gene COI. Estados brasileiros (UF): ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; PR, Paraná; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul.



Fonte: Elaborado pelo autor.

14 DISCUSSÃO

As redescrições feitas neste estudo corroboram com as descrições originais de *Scinax dolloi* e *Scinax hayii* (WERNER, 1903; BARBOUR, 1909). As descrições morfológicas e morfométricas aqui apresentadas fornecem uma maior quantidade de detalhes que ajudam a caracterizar a espécie, servindo como base para comparações com outras populações na extensa distribuição das espécies.

As populações de *S. hayii* apresentam morfologia considerada variável (COCHRAN, 1955; LUTZ, 1973; HEYER et al., 1990). Os dados morfológicos apresentados neste estudo para topótipos de *S. hayii* corroboram em sua maioria com os dados apresentados por Lutz (1973) e Barbour (1909) também para a população de Petrópolis. Pequenas variações são apontadas neste estudo em comparação com a descrição original (BARBOUR, 1909) e para os dados de fêmeas apresentado por Lutz (1973). Isso revela que existem poucas diferenças morfológicas entre machos e fêmeas (mas, fêmeas apresentam maior tamanho corporal).

Lutz (1973) relata que há uma tendência para a diminuição do tamanho corporal das populações localizadas ao sul da distribuição da espécie. Neste estudo populações analisadas de *S. hayii* tendem a ter menor comprimento rostro-cloacal sentido sul, essa variação ocorre de forma gradativa (veja figura 14). Entretanto, a população de Santa Teresa (ES) está localizada na porção norte da distribuição e apresenta menor valor de comprimento rostro-cloacal entre todas as populações analisadas. Este padrão mostra que a diminuição de tamanho pode estar relacionada com outros fatores independentes do aumento da latitude e da altitude, pois algumas populações de serra (Juquitiba e Santa Isabel) possuem tamanho semelhante a populações da planície litorânea (Paraty e Ubatuba).

O padrão de coloração de *Scinax hayii* foi registrado por Barbour (1909) e Lutz (1973) para Petrópolis, e Heyer et al. (1990) para a população de Boracéia, possuindo superfície dorsal

uniforme sem manchas. Cochran (1955) relata, para a população de Paranapiacaba (São Paulo), presença de manchas no dorso e nos membros, mesmo padrão registrado por Lutz (1973) para as populações do sul do Brasil e também para a população da Serra da Bocaina. Lutz (1973) cita ainda que as populações do sul do Brasil diferem das populações do bloco norte da Serra do Mar, por estas últimas apresentarem padrão de coloração uniforme. Nossos dados para o padrão de coloração dorsal concordam com todos os autores citados revelando que *Scinax hayii* é uma espécie que possui populações com indivíduos polimorfos. Devemos com as informações obtidas por Silva (2017) e neste estudo pela análise molecular, excluir as populações do sul do Brasil antes identificadas como *S. hayii*. Atualmente sabemos que as populações no sul do Brasil citadas por Lutz (1973) se tratam de populações de *Scinax perereca*, esta com distribuição do sul do estado de São Paulo até o estado do Rio Grande do Sul (Silva, 2017). Com base neste estudo também é necessário excluir a população da Serra da Bocaina que apresenta, canto de anúncio (Capítulo 1) e DNA mitocondrial (gene COI) diferentes da espécie *S. hayii*. Todavia, nossos dados mostram que as populações do bloco norte da Serra do Mar e litoral (Petrópolis, Teresópolis, São Luiz do Paraitinga, Mangaratiba, Paraty, Ubatuba e Ilhabela) apresentam padrão dorsal uniforme sem presença de manchas. Na porção sul da distribuição geográfica (sul do estado de São Paulo incluindo Peruíbe no litoral) as populações de *S. hayii* apresentam tanto espécimes com padrão dorsal uniforme, quanto espécimes possuindo manchas na cabeça, dorso e membros como os descritos por Cochran (1955) e também neste estudo. A maioria dos indivíduos da população de Santa Teresa (ES) também apresenta faixas e manchas na superfície dorsal.

A árvore construída através da análise do gene COI separa *S. hayii* em três subclados, um contendo populações do bloco norte da Serra do Mar até Santa Isabel (SP) e planície Litorânea do litoral sul do Rio de Janeiro até o Litoral norte de São Paulo; o segundo com indivíduos da população de Santa Teresa (ES); e o terceiro com espécimes de populações da

Serra do Mar no Sul de São Paulo, também incluindo o Litoral sul do estado de São Paulo. Essa divisão coincidentemente reflete igualmente o que foi encontrado para os caracteres morfológicos de padrão de coloração em superfície dorsal, tendo a variação morfológica e molecular apresentando mesmo padrão filogenético ao longo da distribuição da espécie. Esse padrão dividindo grupos morfológicamente entre norte e sul também foi registrado por Marcelino et al. (2009) em populações de *Boana bichoffi* (Hylidae, Cophomantinae). Os autores identificaram polimorfia no padrão de coloração dorsal, em que populações localizadas ao norte da distribuição da espécie (estado de São Paulo) possuíam padrão de manchas no dorso. Em contrapartida, populações registradas nos estados do sul do Brasil possuíam padrão de coloração dorsal uniforme.

A Mata Atlântica compreende ambientes heterogêneos que variam em sua elevação, clima, latitudes e apresentam diferentes graus de conectividade (AB'SABER, 2003). Carnaval (2002) cita que populações de *Scinax nebulosus* na região nordeste do Brasil (em remanescentes da Mata Atlântica e regiões de transição entre Mata Atlântica e Caatinga) apresentam estruturação geográfica, onde populações localizadas na porção norte diferem geneticamente de populações localizadas ao sul, formando dois grupos. As populações apresentam variação de 79,2% entre grupos (norte e sul) quando comparado o gene Citocromo b. A autora cita que a variação intraespecífica encontrada poderia estar refletindo um evento de fragmentação, que criou uma barreira isolando populações (CARNAVAL, 2002). A formação de subclados em *S. hayii* indica que as populações, apesar de ainda terem grande parte do material genético semelhante, apresentam barreiras em sua distribuição que dificultam o fluxo gênico entre populações.

Variações genéticas ao longo da distribuição podem refletir história natural da espécie e suas adaptações às diferentes condições sofridas ao longo da dispersão (CARNAVAL, 2002). Com base nos dados amostrados para as populações de *S. nebulosus* e *Proceratophrys boei*,

Carnaval (2002) sugere que o estabelecimento de barreiras no fluxo gênico não é abrupto, mas representa um processo gradual no qual espécies respondem de acordo com sua ecologia. Da mesma forma, o padrão apresentado por *Scinax hayii* demonstra que, embora não sejam isoladas, existe certa estruturação genética que aponta a ocorrência de barreiras graduais que dificultam o fluxo gênico, ou restrições ecológicas sofridas ao longo de sua distribuição que divide os grupos do bloco norte, bloco sul e Santa Teresa.

As populações de *Scinax hayii* apresentam parâmetros do canto de anúncio variando de forma gradual do sentido norte para o sul (Capítulo 1). Populações amostradas no litoral (exceto Mangaratiba, RJ) apresentam diferenças significativas quando comparadas aos exemplares situados na Serra do Mar (Capítulo 1). Os dados de variação bioacústica não coincidem com a variação encontrada para o DNA mitocondrial e também para a morfologia. O canto de anúncio sofre provavelmente outros tipos de seleção que o tornaram distinto entre diversas populações, principalmente em uma divisão altitudinal. O DNA apresenta diferente variação, causando divisão latitudinal entre os grupos. Ao contrário do padrão encontrado para *S. hayii*, Heyer e Reid (2002) relatam que populações de *Leptodactylus fuscus* apresentam pouca variação bioacústica ao longo da distribuição. Embora apresentem acentuada diferença genética, esta não é acompanhada de diferenças nas vocalizações.

Scinax tigrinus e *S. maracaya* são espécies que ocorrem no estado de Minas Gerais de forma alopátrica e possuem canto de anúncio sem características diagnósticas que possam diferenciar as duas espécies (BANG e GIARETTA, 2016). Isso é esperado, por ocorrerem em alopatria não sofrem essa pressão seletiva, sendo diferenciadas apenas na morfologia pela coloração e textura dorsal, segundo Bang e Giaretta (2016). Em *Scinax hayii* é possível diferenciar populações da Serra do Mar de populações da planície litorânea pelo canto de anúncio (Capítulo 1). Contudo, morfologicamente, as populações conservam características e informações de DNA. Populações em diferentes altitudes sofrem diferentes pressões, como

adaptação à temperatura e, provavelmente a variação no canto de anúncio de *S. hayii* é reflexo do seu sucesso em dispersar por diferentes gradientes latitudinais e altitudinais.

Poucos dados são disponíveis em literatura sobre a biologia e distribuição geográfica de *Scinax dolloi*. A espécie passou décadas sendo considerada uma espécie duvidosa, devido a ausência de exemplares coletados (LUTZ, 1973; FROST, 2020). Mesmo com a reavaliação da localidade tipo, pouco se sabe sobre a espécie e sua distribuição pela Serra da Mantiqueira tem caráter especulativo (SANTOS, 2015).

Em relação ao tamanho corporal as populações de *S. dolloi* são divididas em dois grupos. Maringá e Castelo apresentam os menores tamanhos em comparação com outro grupo formado por Queluz, Itamonte, Piquete, Cristina, Campos do Jordão, Santo Antonio do Pinhal, Itatiaia e Camanducaia. Padrão semelhante foi encontrado na análise molecular, revelando que Maringá e Castelo formam um grupo distinto das outras localidades da Serra da Mantiqueira amostradas. As semelhanças entre as populações de Maringá e Castelo (morfologia, canto de anúncio e gene COI) revelam que *Scinax dolloi* está geograficamente distribuída entre os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo.

Análises comparativas do canto de anúncio corroboram a proximidade das populações de Maringá (RJ) e Castelo (ES) apresentando diferenças com as demais populações amostradas na Serra da Mantiqueira (Capítulo 1). Assim como verificado para *S. hayii*, as populações de *S. dolloi* na Serra da Mantiqueira apresentaram variação gradual. Mas, diferentemente de *Scinax hayii* onde as populações apresentam DNA conservado, as populações de *Scinax dolloi* podem ser diferenciadas pelo tamanho corporal (topótipos possuem menor tamanho corporal), canto de anúncio (capítulo 1) e DNA mitocondrial (gene COI) sugerem que na Serra da Mantiqueira há duas unidades taxonômicas. Exceção à regra ocorre para a população de Itamonte, que mostrou maior proximidade com os exemplares de Maringá quanto ao canto de anúncio

(Capítulo 1), mas geneticamente está agrupada ao bloco sul da Mantiqueira. Quanto a morfometria apresentou mediana semelhante ao bloco sul, porém dois exemplares apresentaram valores de CRC dentro da amplitude de *S. dolloi*. Exemplares utilizados na análise acústica são diferentes dos exemplares utilizados para as análises moleculares. Foram coletados em anos diferentes. Portanto se há duas unidades taxonômicas, e se elas co-ocorrem na localidade de Itamonte, ambas podem ter sido coletadas e classificadas de forma igual resultando em divergências nas análises. Além disso, se elas co-ocorrem não é possível afirmar que são sintópicas, pois coletas foram realizadas em anos distintos.

Diferenças latitudinais, altitudinais e o zoneamento climático podem causar isolamento geográfico aumentando as oportunidades de especiação e acúmulo de diversidade nos trópicos (KOZAK e WIENS, 2007). Segundo a hipótese de Janzen (1967), maior estratificação climática através dos diferentes gradientes altitudinais nos trópicos, poderia exercer pressão seletiva nas espécies com curtas tolerâncias térmicas e fisiológicas. Isso resultaria em espécies próximas, porém adaptadas a diferentes temperaturas e elevações. Habitats em montanhas, separados por planícies, podem servir como refúgio para populações que se tornam isoladas, rastreando habitats adequados em resposta às mudanças climáticas (KOZAK e WIENS, 2007). Contudo, para anuros, Hua e Wiens (2010), ao contrário da hipótese criada por Janzen (1967), demonstraram que não existe evidência de sobreposição ou nicho conservadorismo, mas que espécies irmãs tendem a ter climatização semelhantes.

A formação do Vale do Paraíba, juntamente com o rio Paraíba do Sul, isolou duas cadeias de montanhas, a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira. Pombal e Haddad (1999) relatam que a formação do Vale do Paraíba causou o isolamento de espécies de *Paratelmatobius* (Leptodactylidae, Paratelmatobiinae), sendo que na Serra da Mantiqueira ocorrem *P. mantiqueira* e *P. lutzii* e na Serra do Mar ocorrem *P. cardosoi*, *P. gaigeae* e *paecilogaster*. Mângia *et al.* (2014) também relatam o mesmo padrão de isolamento para espécies de

Proceratophrys, tendo na Serra da Mantiqueira a ocorrência de *P. itamari* e *P. mantiqueira*, e na Serra do Mar *P. melanopogon* e *P. pombali*. *Proceratophrys gladius* está restrito à sua localidade tipo na Serra da Bocaina. As espécies de *Scinax* estudadas apresentam padrão semelhante tendo sido também isoladas pela formação do Vale do Paraíba.

Populações da Serra da Mantiqueira (classificadas com *Scinax dolloi*) estão isoladas de populações de *S. hayii* que ocorrem na Serra do Mar. Todavia, em algum período elas tiveram ligação. O que reforça essa hipótese é a similaridade da população da Serra da Bocaina (no canto de anúncio e no gene COI) com as populações da Serra da Mantiqueira. Essa ocorrência de *Scinax dolloi* na Serra da Bocaina, assim como de outras espécies já registradas com ocorrência na Serra da Bocaina e Serra da Mantiqueira (veja MARTINS e HADDAD, 2010; JUARES, 2011; GAREY et al., 2014) sugerem que em algum momento essas duas cadeias de montanhas foram ligadas. Almeida e Carneiro (1998) relatam que o limite norte da Serra da Bocaina se relaciona com o tectonismo e as falhas do graben (depressão de origem tectônica que fora um vale) do Paraíba, sendo possível que o planalto da Bocaina seja resultado de erosão e abaulamento que causou fossa tectônica. Isso é possível pois a altitude ao norte da Serra da Bocaina fica em torno de 1800 a 2000 metros, mesma altitude que a Serra da Mantiqueira apresenta do outro lado do graben nos maciços de Itatiaia e Passa Quatro (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998).

Outro ponto de co-ocorrência é revelado pela população de Castelo. Na análise molecular do gene COI, três indivíduos apresentaram semelhança com alto valor de suporte (100%) para topótipos de *S. dolloi*. Contudo, um indivíduo apresentou material genético semelhante aos espécimes de *S. hayii* coletados em Santa Teresa (ES) (valor de suporte 100%). Baseado nessa evidência molecular *S. dolloi* e *S. hayii* podem estar co-ocorrendo nessa região do estado do Espírito Santo.

Outra questão que não está clara é a separação entre *S. perereca* e *S. dolloi*. Essas espécies têm parentesco próximo. Entretanto, essas espécies estão isoladas geograficamente e ainda não foi encontrado algum ponto que estabeleça ligação entre as duas. Através do estudo de geoformação das Serras do Mar e Mantiqueira é possível estabelecer hipóteses que levariam a uma ligação dessas espécies.

A serras do Mar e da Mantiqueira surgiram de processos de falhamentos que se iniciaram no período Cretáceo. Esses falhamentos causaram deslocamento vertical dando origem as escarpas típicas dessas cadeias de montanhas (ROSS, 2005). A superfície de aplainamento Japi (um megaplanalto do final do Cretáceo) sofreu deformação por flexuras e falhamentos da superfície no Paleoceno dando origem as bacias tafrogênicas do Sudeste, a Serra da Mantiqueira, e provavelmente a Serra do Mar (ALMEIRA e CARNEIRO, 1998). A região de São Paulo é uma região onde as Serras do Mar e da Mantiqueira são próximas. Nessa região se formou a bacia de São Paulo, uma depressão de depósitos sedimentares, que, juntamente com a bacia de Taubaté, Resende, Volta Redonda, Curitiba e Depressão da Guanabara forma o sistema de *rifts* (depressão alongada) da Serra do Mar. Esse sistema isolou as Serras do Mar e da Mantiqueira (ALMEIDA, 1976; FREITAS, 2007).

Rego (1932) em seu esboço sobre a divisão geomorfológica do estado de São Paulo, esquematiza a região chamada por ele de “Serra de Paranapiacaba e suas ramificações”. Essa serra margeava as “Terras altas de São Paulo” e o Vale do Ribeira conectando a Serra da Mantiqueira ao estado do Paraná. Na divisão geomorfológica do estado de São Paulo feita por Almeida (1964), nota-se que parte da Serra da Mantiqueira circunda a bacia de São Paulo e se conecta com a região chamada “Serrania de São Roque”. Esta se une com o “Planalto de Ibiuna” e o “Planalto Cristalino Ocidental”, chegando até o estado do Paraná margeando a Serra de Paranapanema (Veja ANEXO A). A Serra do Japi, localidade de ocorrência de *Scinax dolloi* faz parte da chamada “Serrania de São Roque”. As localidades de Piedade e Pilar do Sul

(localizadas na região do Planalto Cristalino Ocidental) são localidades próximas à Serra do Japi. Exemplares registrados nessas localidades foram identificados como *S. perereca*. Coincidentemente, a localidade tipo de *S. perereca* (Ribeirão Branco) localiza-se próximo as divisas dos estados de São Paulo e Paraná, região apontada por Almeida (1964) como “Planalto Cristalino Ocidental”.

Exemplares coletados em Apiaí, Iporanga e Ribeirão Grande apresentam material genético (gene COI) semelhante a *S. hayii*. Essas localidades estão localizadas na região da Serra de Paranapanema. Forti (2009) registrou espécimes de *Scinax hayii* e *Scinax perereca* na localidade de São Miguel Arcanjo (SP). Essa região está localizada na divisão entre a Serra de Paranapanema e o Planalto Cristalino Ocidental. É provável que na região que permeia o Planalto Cristalino Ocidental e a Serra de Paranapanema possa haver a co-ocorrência das duas espécies. Entretanto, até o momento, nota-se que *S. perereca* tem distribuição geográfica na face ocidental no Planalto Cristalino Ocidental e *S. hayii* se distribui na face oriental pela Serra do Paranapanema.

15 CONCLUSÃO

Scinax hayii apresenta ampla distribuição do estado do Espírito Santo até o sul do estado de São Paulo ocorrendo em ambientes de planície litorânea e serra.

Scinax hayii apresenta polimorfismo em diferentes populações ao longo de sua distribuição e caracteres morfológicos não são bons parâmetro para comparações entre esse grupo de espécies (*S. hayii*, *S. dolloi* e *S. perereca*).

O canto de anúncio em populações de *S. hayii* é variável. Diferentes populações podem apresentar diferentes padrões de vocalização ao longo da distribuição. As populações da planície litorânea, em especial, possuem diferenças robustas na frequência dominante, taxa de repetição dos pulsos e duração da nota, em comparação com populações localizadas na serra.

Apesar de diferenças no canto e o polimorfismo em suas populações, *S. hayii* apresenta DNA (gene COI) conservado ao longo de sua distribuição geográfica, sendo rejeitado a hipótese que existam outras espécies sob o nome de *S. hayii*.

Populações do bloco sul da Serra da Mantiqueira (Itamonte, Cristina, Piquete, Queluz, Campos do Jordão, Santo Antonio do Pinhal e Camanducaia) antes identificadas como *S. hayii* são geneticamente próximas de *S. dolloi*.

Variações no canto de anúncio, menor tamanho corporal, e diferenças no DNA mitocondrial (gene COI) sugerem a divisão de *S. dolloi* em duas unidades taxonômicas distintas. Logo é necessário comparações com outras espécies de *Scinax* da região para a confirmação e descrição.

Scinax dolloi é uma espécie plena e atualmente registrada para as localidades de Maringá (Itatiaia, RJ e Bocaina de Minas, MG), Castelo e Vargem Alta no Espírito Santo. Contudo,

outras populações podem ser registradas na porção norte da Serra da Mantiqueira até o Espírito Santo.

REFERÊNCIAS

- AB'SÁBER, A.N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial. 160p. 2003.
- ALEIXO, A. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**. n.15, p. 229–242. 2007.
- ALMEIDA, F. F. M. Fundamentos geológicos do relevo paulista. São Paulo: Instituto Geográfico e Geológico, Geologia do Estado de São Paulo, p. 167–263 (Boletim, 41). 1964.
- ALMEIDA, F. F. M. de. The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 48 (supl.), p. 15–26. 1976.
- ALMEIDA, F. F. M.; CARNEIRO, C. D. R. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**. n. 28(2), p. 135–150. 1998.
- ÂNGULO, A.; CROCOFT, R.B.E.; REICHLE, S. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. **Herpetological**. n. 59(4), p. 490–504, 2003.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates. 2004.
- BANG, D.L.; GIARETTA, A.A. Redescription of the advertisement calls of *Scinax tigrinus* and *Scinax maracaya* (Anura: Hylidae) and an evaluation of their differential diagnosis. **Revista Brasileira de Biociências**. n.3, p. 181–186. 2016.
- BARBOUR, T. Some new South American cold-blooded vertebrates. **Proceedings of the New England Zoölogical Club**. Cambridge, Massachusetts 4: 47–52. 1909.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptics species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. n. 22, p. 148–155. 2007.
- CARAMASCHI U.; NUNES I.; NASCIMENTO L.B.; CARVALHO R.R. Jr. The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae). **Zootaxa**. n. 3691(2), p. 299–300. 2013.
- CARNAVAL, A.C.O.Q. Phylogeography of Four Frog Species in Forest Fragments of Northeastern Brazil—A Preliminary Study. **Integrative and Comparative Biology**. n. 42, p. 913–921. 2002.
- COCHRAN, D. M. Frogs of Southeastern Brazil. US. **National Museum Bulletin**. n. 206:16, 423p. 1955.
- DARWIN, C. **A Origem das Espécies**. São Paulo: Martin Claret, 556 p. 2006.
- DUELLMAN, W. E. **The Hylid frogs of Middle America**. Monograph of the Museum of Natural History the University of Kansas, 1, p 1–753. 1970.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p. 1986.

DUELLMAM, W.E. The Hylid Frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. **Ithaca**, 2v., xvi, 1158pp, 92 pls. 2001.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**. n. 4104, p. 1–109. 2016.

FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). **Cladistics**. n. 18, p. 367–393. 2002.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A.; WHEELER, W.C. Systematic review of the frog family, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. n. 294, p. 1–240. 2005.

FAIVOVICH, J.; PEREYRA, M. O.; LUNA, M. C.; HERTZ, A.; BLOTTO, B. L.; VÁSQUEZ-ALMAZÁN, C. R.; MCCRANIE, J. R.; SÁNCHEZ, D. A.; COSTA, D. B. P.; ARAUJO-VIEIRA, K.; KÖHLER, G.; KUBICKI, B.; CAMPBELL, J. A.; FROST, D. R.; WHEELER, W. C.; HADDAD, C. F. B. H. On the Monophyly and Relationships of Several Genera of Hylini (Anura: Hylidae: Hylinae), with Comments on Recent Taxonomic Changes in Hylids. **South American Journal of Herpetology**. n. 13(1), p. 1–32. 2018.

FARIA, D. C. C.; SIGNORELLI, L.; MORAIS, A. R.; BASTOS, R. P.; MACIEL, N. M. Geographic structure and acoustic variation in populations of *Scinax squalirostris* (A. Lutz, 1925) (Anura: Hylidae) **North-Western Journal of Zoology**. n. 9 (2): art.131514, 2013.

FERRÃO, M.; COLATRELI O.; de FRAGA, R.; KAEFER, I. L.; MORAVEC, J.; LIMA, A. P. High Species Richness of *Scinax* Treefrogs (Hylidae) in a Threatened Amazonian Landscape Revealed by an Integrative Approach. **PLoS ONE** 11(11): e0165679, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165679>

FERRÃO, M.; MORAVEC, J.; de FRAGA, R.; de ALMEIDA, A. P.; KAEFER, Í. L.; LIMA, A. P. A new species of *Scinax* from the Purus-Madeira interfluvium, Brazilian Amazonia (Anura, Hylidae). **ZooKeys**. n. 706, p. 137–162, 2017.

FORTI, L. R. Temporada reprodutiva, micro-habitat e turno de vocalização de anfíbios anuros em lagoa de Floresta Atlântica, no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**. n.11(1), p. 89–98. 2009.

FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.D.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Elsevier. n. 43, p. 567–582, 2007.

FREITAS, M. S. **Estratigrafia de Alta Resolução e Geoquímica Orgânica da Formação Tremembé, Terciário da Bacia de Taubaté, na região de Taubaté-Tremembé-SP**. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Análises de Bacias e faixas móveis) Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, Rio de Janeiro. 2007.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database. Accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Scinaxinae>. 2020.

GAREY, M. V.; PROVETE, D. B.; MARTINS, I. A.; HADDAD C. F. B.; ROSSA-FERES, D. C. Anurans from the Serra da Bocaina National Park and surrounding buffer area, southeastern Brazil. **Check List**. n. 10(2), p. 308–316, 2014.

GUINDON S.; DUFAYARD J.F.; LEFORT V.; ANISIMOVA M.; HORDIJK W.; GASCUEL O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**. n. 59(3), p. 307–21. 2010.

HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. 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. p. 188–211, 1992.

HEYER, W. R. Systematics of the pentadactylus speciels group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). Series: Smithsonian Institution. **Smithsonian contributions to zoology**, n. 301. 1974.

HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O. L.; NELSON, C. E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**. n. 31, p. 231–410. 1990.

HEYER, W.R., REID, Y.R. 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**. n. 75, p. 39–54. 2002.

HUA, X.; WIENS, J. J. Latitudinal variation in speciation mechanisms in frogs. **Evolution**. n. 64-2, p. 429–443. 2010.

JANZEN, D. H. Why mountain passes are higher in the tropics. **American Naturalist**. n.101, p. 233–249. 1967.

JUARES, A. M. **Diversidade de anuros da Serra da Mantiqueira, na região do Pico dos Marins**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

KATO, S. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability (outlines version 7). **Molecular Biology and Evolution**. n. 30, p. 772-780. 2013.

KOZAK, K. H.; WIENS, J. J. Climatic zonation drives latitudinal variation in speciation mechanisms. *Proceeding of the Royal Society B*. n. 274, p. 2995–3003. 2007.

LUTZ, B. **Brazilian species of *Hyla***. Un. of Texas Press. 260 p. 1973.

LYRA, M.L.; HADDAD, C.F.B.H.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**. n. 17, p. 966–980. 2016.

MAYR, E.; ASHLOCK, P. D. **Principles of Systematic Zoology**. 2nd edition. Singapore: McGraw-Hill, 1991.

MÂNGIA, S., SANTANA, D. J.; CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda-Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional**. n. 531, p. 1–33. 2014

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p. 1982.

MARCELINO, V. R.; HADDAD, C.F.B.; ALEXANDRINO, J. Geographic distribution and morphological variation of striped and nonstriped populations of the Brazilian Atlantic Forest treefrog *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology**. n. 43, p. 351–361. 2009.

MARTINS I. A.; HADDAD, C. F. B. H. A new species of *Ischnocnema* from highlands of the Atlantic Forest, Southeastern Brazil (Terrarana, Brachycephalidae). **Zootaxa**. n. 2617, p. 55–65. 2010.

NELSON, G. Outline of a theory of comparative biology. **Systematic Zoology**. n. 19, p. 373–384. 1970.

NUNES, I.; KWET, A.; POMBAL J.P. Jr. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). **Copeia**. n. 3, p. 554–569. 2012.

POMBAL, J. P., JR.; BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. **Naturalia**. n. 20, p. 213–225, 1995.

POMBAL, Jr., J. P.; HADDAD, C. F. B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia**. n. 4, p. 1014–1026. 1999.

PUGLIESE, A. **Revisão taxonômica do complexo de espécies de *Scinax duartei* (B. Lutz, 1951) (Anura, Hylidae)**. 2002. 142f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Rio de Janeiro. 2002.

REGO, M. L. F. Notas sobre a geomorfologia de São Paulo e sua gênese. Instituto Astronomico Georífico de São Paulo, São Paulo. 1932.

RON, S. R.; SANTOS, J. C.; CANNATELLA, D. C. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. n. 39, p. 392–403. 2006.

RON, S. R.; DUELLMAN W. E.; CAMINER, M. A.; PAZMIÑO, D. Advertisement calls and DNA sequences reveal a new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) on the Pacific lowlands of Ecuador. **PLoS (Public Library of Science) One**. n. 13 (9: e0203169), p. 1–25. 2018.

ROSS, J. L. S. **Geografia do Brasil**. EDUSP, São Paulo. [S.l: s.n.], 2005.

SANTOS, L. R. **Análises morfológicas e bioacústicas em populações de *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) ao longo da Mata Atlântica**. 2015. 106f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2015.

SILVA, P. H. **Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)**. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2017.

SITES Jr., J. W.; MARSHALL, J.C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. n. 35, p. 199–277. 2004.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**. n. 306, p. 1783–1786. 2004. (doi:10. 1126/science.1103538)

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. n. 22, p. 4673–4680. 1994.

VANZOLINI, P. E. **Métodos estatísticos elementares em sistemática zoológica**. São Paulo, Editora Hucitec. 130p. 1993.

WERNER, F. Neue Reptilien und Batrachier aus dem naturhistorischen Museum in Brussel. Nebst bemerkungen uber einige andere Arten. **Zoological Anzeiger**. n. 26,2 p.46–253. 1903.

APÊNDICE A - LISTA DE EXEMPLARES DE ANALISADOS

Scinax dolloi: BRASIL: **SÃO PAULO**: Santo Antonio do Pinhal (CCLZU 905, 906, 1107, 1108, 1298, 1664, 1665, 1724, 1754, 1755, 1876, 1877, 3180 – 3182, CFBH 17889 – 17892); Campos do Jordão (CCLZU 1666 – 1669, 1780 – 1784, 1764, 1843, 1844, 1899, 2287, 2312 – 2317, 2285, 2286, 2294, 2333, 2334, 2337, 2338, 2341 – 2344, 2641, 2642, 3310, CFBH 40180); Piquete (CCLZU 2795, 2881, 2572, 2573, 2908, 2909, 2858, 2859, 2882); Queluz (CCLZU 1328, 1727); **MINAS GERAIS**: Camanducaia (CCLZU 3373 – 3478, CFBH 44792 – 44794); Itamonte (CCLZU 1222, 1223, 3312, 3313, CFBH 40171 – 40174); Cristina (CCLZU 218, 1645, 1646, 1658 – 1660, 2119, 2956, 2957, 2770); **RIO DE JANEIRO**: Itatiaia (CCLZU 2725, 2687, 2726, 2724; **ESPÍRITO SANTO**: Castelo (CCLZU 3419 – 3421, CFBH 44798 – 44800). *Scinax hayii*: **RIO DE JANEIRO**: Petrópolis (CCLZU 3179; CFBH 137; 138; 10182 – 10186; 13933 – 13935; 17896; 13936; 18819; 18820; MNRJ 32836; 33280; 33699 – 33702; 3142; 39572; 42498; 57577; 59500; 68667 – 68669; 74680; 77190; 86998 – 87011); Mangaratiba (CCLZU 3465 – 3471, CFBH 44795 – 44797); Paraty (CCLZU 3405 – 3414, CFBH 44779 – 44783); **SÃO PAULO**: São Luiz do Paraitinga (CCLZU 3157 – 3178, CFBH 17897 – 17899, 7723, 7724, 10784, 10767, 16085 – 16092); Ubatuba (CCLZU 41 – 46, 118 – 123, 218, 219, 222 – 225, 240 – 245, 332, 342, 378 – 381, 1432, 285, 3183 – 3188, CFBH 1386, 1431, 1433, 1434, 1712, 3944, 3966, 12794, 12797); Mogi das Cruzes (CCLZU 3429 – 3436; CFBH 44788 – 44791); São Bernardo do Campo (CCLZU 3423 – 3428; CFBH 44784 – 44787); Peruíbe (CFBH 40143 – 40148, CCLZU 3236 – 3245); Ilhabela (CFBH 40136 – 40142, CCLZU 3230 – 3235, 3246 – 3248); Juquitiba (CCLZU 3314 – 3317); Santa Isabel (CCLZU 3300, CFBH 40168 – 40169); Santo André (CFBH 28194 – 28198, 28200, 29303 – 29311); **ESPÍRITO SANTO**: Santa Teresa (CFBH 44803 – 44807). *Scinax perereca*: **SÃO PAULO**: Piedade (CFBH 23295); Pilar do Sul (CFBH 8350, 8928-29);

APÊNDICE B - LISTA DE TECIDOS ANÁLISADOS DE SCINAX

Sample ID	Original ID	Catalog. Nº	Município	UF	Latitude	Longitude
CFBHT00352	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH- 5732	Itatiaia	RJ	-22.471	-44.577
CFBHT00873	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH- 7199	Santo Antonio do Pinhal	SP	-22.822	-45.663
CFBHT00997	<i>Scinax perereca</i>	CFBH- 6837	Ribeirao Branco	SP	-24.3404	-48.7366
CFBHT01233	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH7 518	Camanducaia	MG	-22.873	-46.034
CFBHT01235	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH7 520	Camanducaia	MG	-22.873	-46.034
CFBHT01469	<i>Scinax perereca</i>	CFBH 8054	Ribeirao Branco	SP	-24.34	-48.737
CFBHT01470	<i>Scinax perereca</i>	CFBH 8055	Ribeirao Branco	SP	-24.34	-48.737
CFBHT01517	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH- 8316	Campos do Jordao	SP	-22.69	-45.474
CFBHT02315	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH- 9889	Cristina	MG	-22.2198	-45.2571

CFBHT02914	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-11203	Camanducaia	MG	-22.8861	-46.0464
CFBHT03013	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-10985	Sao Bento do Sul	SC	-26.308	-49.317
CFBHT03111	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-10332	Treviso	SC	-28.49	-49.45
CFBHT03952	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-12266	Santos	SP	-23.8801	-46.3049
CFBHT04012	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-12316	Ilha Bela	SP	-23.863	-45.362
CFBHT04028	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-12334	Ilha Bela	SP	-23.863	-45.362
CFBHT04363	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-13936	Petropolis	RJ	-22.482	-43.127
CFBHT04371	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-13934	Petropolis	RJ	-22.482	-43.127
CFBHT04473	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-14032	Teresopolis	RJ	-22.465	-42.997
CFBHT05490	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-16551	Tapirai	SP	-23.9758	-47.5
CFBHT05495	<i>Scinax duartei</i>	CFBH-16692	Itamonte	MG	-22.3595	-44.7353
CFBHT06356	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-15258	Ilha Bela	SP	-23.8628	-45.3616
CFBHT06523	<i>Scinax hayii</i>	CFBHT-06523	Sao Luis do Paraitinga	SP	-23.345	-45.136
CFBHT06945	<i>Scinax duartei</i>	CFBH-16235	Campos do Jordao	SP	-22.69	-45.474
CFBHT07919	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-17521	Sao Jose do Barreiro	SP	-22.719	-44.618
CFBHT08060	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-16244	Campos do Jordao	SP	-22.69	-45.474
CFBHT08132	<i>Scinax duartei</i>	CFBH-18668	Airuoca	MG	-22.0299	-44.6371
CFBHT08146	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-18146	Quatro Barras	PR	-25.3784	-49.085
CFBHT08221	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-4005	Sao Jose dos Campos	SP	-22.9044	-45.957
CFBHT08236	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-10177	Petropolis	RJ	-22.4824	-43.127
CFBHT08242	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-10188	Petropolis	RJ	-22.4824	-43.127
CFBHT10269	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-21944	Ubatuba	SP	-23.3692	-44.833
CFBHT10621	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-22357	Iguape	SP	-24.5523	-47.3358
CFBHT10754	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-22464	Florianopolis	SC	-27.6134	-48.4847
CFBHT11677	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-24247	Ribeirao Grande	SP	-24.1767	-48.3079

CFBHT11686	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-24293	Campos Novos	SC	-27.5825	-51.1899
CFBHT11689	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-24294	Campos Novos	SC	-27.582	-51.19
CFBHT11877	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-24724	Jaguariaiva	PR	-24.2367	-49.7095
CFBHT12606	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-22001	Sao Bento do Sul	SC	-26.3076	-49.317
CFBHT12767	<i>Scinax</i>	CFBH-26967	Vargem Alta	ES	-20.7018	-40.9792
CFBHT13077	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-27418	Cachoeiras de Macacu	RJ	-22.378	-42.555
CFBHT13148	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-27492	Guaramirim	SC	-26.51	-49.0033
CFBHT14220	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-29124	Piquete	SP	-22.573	-45.225
CFBHT14409	<i>Scinax duartei</i>	CFBH-28861	Sao Jose do Barreiro	SP	-22.719	-44.618
CFBHT14485	<i>Scinax hayii</i>	CFBHT-14485	Itatiaia	RJ	-22.471	-44.577
CFBHT14577	<i>Scinax hayii</i>	CFBHT-14577	Mogi das Cruzes	SP	-23.708	-46.041
CFBHT14953	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-30325	Lauro Mueller	SC	-28.3925	-49.5206
CFBHT15360	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-30744	Santa Teresa	ES	-19.9042	-40.5608
CFBHT15644	<i>Scinax dolloi</i>	CFBH-30870	Sao Jose do Barreiro	SP	-22.719	-44.618
CFBHT15956	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-26828	Apiai e Iporanga	SP	-24.5362	-48.6877
CFBHT16055	<i>Scinax perereca</i>	CFBH-30918	Ribeirao Branco	SP	-24.3404	-48.7366
CFBHT16282	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-32565	Teresopolis	RJ	-23.863	-45.362
CFBHT16773	<i>Scinax hayii</i>	CFBH-33480	Sao Luis do Paraitinga	SP	-23.345	-45.136
CFBHT17889	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5929	Santo Antonio do Pinhal	SP	-22.8286	-45.6695
CFBHT17890	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5928	Santo Antonio do Pinhal	SP	-22.8286	-45.6695
CFBHT17891	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5927	Santo Antonio do Pinhal	SP	-22.8286	-45.6695
CFBHT17892	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5926	Santo Antonio do Pinhal	SP	-22.8286	-45.6695
CFBHT17893	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5931	Ubatuba	SP	-23.4528	-45.0471
CFBHT17894	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5933	Ubatuba	SP	-23.4528	-45.0471
CFBHT17895	<i>Scinax aff. hayii</i>	CFBH3-5932	Ubatuba	SP	-23.4528	-45.0471

		CFBH3				
CFBHT17896	<i>Scinax hayii</i>	5930	Petropolis	RJ	-22.544	-42.1519
	<i>Scinax</i> aff.	CFBH3	Sao Luis do			
CFBHT17897	<i>hayii</i>	5934	Paraitinga	SP	-23.3312	-45.2449
	<i>Scinax</i> aff.	CFBH3	Sao Luis do			
CFBHT17898	<i>hayii</i>	5935	Paraitinga	SP	-23.3312	-45.2449
	<i>Scinax</i> aff.	CFBH3	Sao Luis do			
CFBHT17899	<i>hayii</i>	5936	Paraitinga	SP	-23.3312	-45.2449
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20249	<i>perereca</i>	0149	Morretes	PR	-25,478	-48,889
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20250	<i>perereca</i>	0150	Morretes	PR	-25,478	-48,889
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20254	<i>perereca</i>	0143	Peruíbe	SP	-24,201	-47,085
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20255	<i>perereca</i>	0144	Peruíbe	SP	-24,201	-47,085
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20260	<i>perereca</i>	0136	Ilha Bela	SP	-23.8628	-45.3616
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20261	<i>perereca</i>	0137	Ilha Bela	SP	-23.8628	-45.3616
	<i>Scinax</i>	CFBH4	Ribeirão			
CFBHT20268	<i>perereca</i>	0134	Branco	SP	-24.3404	-48.7366
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20270	<i>perereca</i>	0160	Praia Grande	SC	-29,1934	-49,9823
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20271	<i>perereca</i>	0161	Praia Grande	SC	-29,1934	-49,9823
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20276	<i>perereca</i>	0154	Florianopolis	SC	-27.6134	-48.4847
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20277	<i>perereca</i>	0155	Florianopolis	SC	-27.6134	-48.4847
		CFBH4				
CFBHT20282	<i>Scinax dolloi</i>	0173	Itamonte	MG	-22.3595	-44.7353
		CFBH4				
CFBHT20283	<i>Scinax dolloi</i>	0171	Itamonte	MG	-22.3595	-44.7353
		CFBH4				
CFBHT20291	<i>Scinax dolloi</i>	0176	Itatiaia	RJ	-22.471	-44.577
		CFBH4				
CFBHT20292	<i>Scinax dolloi</i>	0177	Itatiaia	RJ	-22.471	-44.577
	<i>Scinax</i> cf.	CFBH4	Campos do			
CFBHT20293	<i>hayii</i>	0178	Jordao	SP	-22.69	-45.474
	<i>Scinax</i> cf.	CFBH4	Campos do			
CFBHT20294	<i>hayii</i>	0179	Jordao	SP	-22.69	-45.474
	<i>Scinax</i> cf.	CFBH4	Campos do			
CFBHT20295	<i>hayii</i>	0180	Jordao	SP	-22.69	-45.474
	<i>Scinax</i>	CFBH4	Francisco			
CFBHT20300	<i>granulatus</i>	0193	Beltrão	PR	-26,0697	-53,1037
	<i>Scinax</i>	CFBH4				
CFBHT20301	<i>granulatus</i>	0194	Florianópolis	SC	-27.6134	-48.4847
		CFBH4				
CFBHT20305	<i>Scinax hayii</i>	0168	Santa Isabel	SP	-23,299	-46,257

		CFBH4				
CFBHT20306	<i>Scinax hayii</i>	0169	Santa Isabel	SP	-23,299	-46,257
		CFBH4				
CFBHT20307	<i>Scinax hayii</i>	0170	Santa Isabel	SP	-23,299	-46,257
		CFBH4				
LRS 1	<i>Scinax hayii</i>	4779	Paraty	RJ	-23,1958	-44,734
		CFBH4				
LRS 2	<i>Scinax hayii</i>	4780	Paraty	RJ	-23,1958	-44,734
		CFBH4				
LRS 3	<i>Scinax hayii</i>	4781	Paraty	RJ	-23,1958	-44,734
		CFBH4				
LRS 4	<i>Scinax hayii</i>	4782	Paraty	RJ	-23,1958	-44,734
		CFBH4				
LRS 5	<i>Scinax hayii</i>	4783	Paraty	RJ	-23,1958	-44,734
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	São Bernardo			
LRS 6	<i>hayii</i>	4784	do Campo	SP	-23,742	-46,509
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	São Bernardo			
LRS 7	<i>hayii</i>	4785	do Campo	SP	-23,742	-46,509
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	São Bernardo			
LRS 8	<i>hayii</i>	4786	do Campo	SP	-23,742	-46,509
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	São Bernardo			
LRS 9	<i>hayii</i>	4787	do Campo	SP	-23,742	-46,509
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	Mogi das			
LRS 10	<i>hayii</i>	4788	Cruzes	SP	-23.708	-46.041
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	Mogi das			
LRS 11	<i>hayii</i>	4789	Cruzes	SP	-23.708	-46.041
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	Mogi das			
LRS 12	<i>hayii</i>	4790	Cruzes	SP	-23.708	-46.041
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4	Mogi das			
LRS 13	<i>hayii</i>	4791	Cruzes	SP	-23.708	-46.041
	<i>Scinax cf.</i>	CFBH4	Biritiba			
LRS 14	<i>hayii</i>	4810	Mirim, SP	SP	-23,557	-46,0459
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 15	<i>hayii</i>	4798	Castelo	ES	-20,599	-41,225
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 16	<i>hayii</i>	4799	Castelo	ES	-20,599	-41,225
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 17	<i>hayii</i>	4800	Castelo	ES	-20,599	-41,225
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 18	<i>hayii</i>	4792	Camanducaia	MG	-22.8861	-46.0464
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 19	<i>hayii</i>	4793	Camanducaia	MG	-22.8861	-46.0464
	<i>Scinax aff.</i>	CFBH4				
LRS 20	<i>hayii</i>	4794	Camanducaia	MG	-22.8861	-46.0464
		CFBH4				
LRS 21	<i>Scinax hayii</i>	4795	Mangaratiba	RJ	-22,915	-44,0474
		CFBH4				
LRS 22	<i>Scinax hayii</i>	4796	Mangaratiba	RJ	-22,915	-44,0474
		CFBH4				
LRS 23	<i>Scinax hayii</i>	4797	Mangaratiba	RJ	-22,915	-44,0474

LRS 24	<i>Scinax</i> <i>angrensis</i>	CFBH4 4801	Mangaratiba	RJ	-22,915	-44,0474
LRS 25	<i>Scinax</i> <i>angrensis</i>	CFBH4 4802	Mangaratiba	RJ	-22,915	-44,0474
RBF 1740	<i>Scinax hayii</i>	CFBH4 4807	Santa Teresa	ES	-19.9042	-40.5608
RBF 1755	<i>Scinax hayii</i>	CFBH4 4808	Santa Teresa	ES	-19.9042	-40.5608
RBF 1756	<i>Scinax hayii</i>	CFBH4 4805	Santa Teresa	ES	-19.9042	-40.5608
RBF 1757	<i>Scinax hayii</i>	CFBH4 4804	Santa Teresa	ES	-19.9042	-40.5608

APÊNDICE C - TRABALHOS PÚBLICADOS PROVENIENTES DO PROJETO

Artigo 1

Bioacoustic analysis in *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) at its type locality in Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil

Submetido para: Zootaxa

Fator de impacto: 0.990

Status: publicado em 20/02/2017

Bioacoustic analysis in *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) at its type locality in Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil

LUCAS RODRIGO DOS SANTOS^{1,3} & ITAMAR ALVES MARTINS²

¹Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: lucasportugasantos@gmail.com

²Laboratório de Zoologia – Instituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté – UNITAU, 12030-180 Taubaté, São Paulo, Brazil. E-mail: istama@uol.com.br

³Corresponding author

Scinax hayii was described in 1909 from the municipality of Petrópolis, State of Rio de Janeiro, Brazil. Morphological variation and advertisement calls have been previously reported for other populations across the species distribution (Lutz 1973; Heyer *et al.* 1990; Cardoso & Andrade 1991; Pombal *et al.* 1995; Magrini *et al.* 2011; Abrunhosa *et al.* 2014). However, no information on calls are available from specimens recorded at the type locality, preventing the correct characterization of the species (Magrini *et al.* 2011). Here we describe the advertisement call and a second call type of *S. hayii* from Petrópolis, as a contribution towards a better understanding of the taxonomy of this species.

Two *S. hayii* males were recorded on 11 December 2013 in the Bonfim neighborhood, Petrópolis (22°27'40.4"S, 43°05'58.7" W). Vocalizations were recorded using a Marantz PMD-671 digital recorder (sample rate of 44.100 Hz, 16 bit resolution) connected to a Sennheiser K6/ME66 directional microphone. Bioacoustic analyses were performed in Raven 1.4 (Bioacoustics Research Program 2011). The two recorded specimens were deposited in Coleção CFBH, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil (CFBH 17896) and in Coleção Científica do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brazil (CCLZU 3179).

We analyzed a total of 212 advertisement calls (CCLZU 3179 *n* = 118 calls; CFBH 17896 *n* = 94 calls). The advertisement call consists of a multipulsed note containing 13–19 pulses (average = 16 ± 1 pulses), occupying a frequency range between 1095 and 4033 Hz (Fig. 1A). Pulse duration ranges from 7 to 16 ms (average = 13 ± 1 ms) and the average duration of the silent interval between pulses is 3 ± 1 ms (1–7 ms). Note duration ranges from 163 to 310 ms (average = 263 ± 20 ms). Note repetition rate ranges from 15 to 59 notes per minute (average = 23 ± 11 note/minute). We found two possible regions of the note where most of the sound energy can be concentrated (Figure 1A). In most notes (*n* = 166, 78%), the dominant frequency is located between 1149 and 2102 Hz (average = 1455 ± 220 Hz). However, in some notes (*n* = 46, 22%), the highest concentration of energy occurred between 2956 and 3235 Hz (average = 3124 ± 98 Hz). The initial pulses of the advertisement call have a lower frequency range, forming an ascendant modulation from the first to the third pulse that may, at times, extend to the sixth pulse. Frequency modulation ranges from 877 to 1754 Hz (average = 1282 ± 133 Hz).

A second call type was emitted sporadically, usually at the end of a series of advertisement calls or in between advertisement calls. It consists of the juxtaposition of the pulses that constitute an advertisement call, also showing an upward amplitude modulation, but with shorter duration and emitted at a lower frequency. The second call type can be formed by one (*n* = 15), two (*n* = 2) or three (*n* = 1) notes (Fig. 1B, C, D). This second call type occupies the frequency range between 1183 and 3463 Hz. Dominant frequency is located between 1256 and 2463 Hz (average = 1684 ± 359 Hz). Note duration ranges from 38 to 99 ms (average = 75 ± 17 ms).

Advertisement calls registered in Petrópolis exhibit lower frequency range in relation to those reported from Jundiaí (1000–6400 Hz, Pombal *et al.* 1995) and Atibaia (480–6390 Hz) in the State of São Paulo, and from those reported from Itapeva, Minas Gerais (490–6090 Hz) (Magrini *et al.* 2011). Advertisement calls from Petrópolis share a similar frequency range with populations from Boracéia, São Paulo (1000–4500 Hz) (Heyer *et al.* 1990) and Morro do Ferro, Minas Gerais (1000–4200 Hz) (Cardoso & Andrade 1991). Dominant frequency of specimens in Petrópolis is lower than that reported from calls recorded in Rio das Ostras, in the State of Rio de Janeiro (dominant frequency = 2770–3720 Hz—Abrunhosa, *et al.* 2014) and Jundiaí (1800–4100 Hz—Pombal *et al.* 1995). Note duration overlaps among advertisement calls reported for all *S. hayii* populations (this study 163–310 ms; Boracéia 200–260 ms; Morro do Ferro 250 ms; Jundiaí 190–320 ms; Atibaia average = 206 ± 11 ms; Itapeva average = 240 ± 22 ms; Rio das Ostras 140–360 ms). Number of pulses per note also overlaps among most reported populations (Boracéia 15–20; Morro do Ferro 13–16;

Jundiá 15–20; Atibaia 13–15; Itapeva 13–17), except for calls of the population recorded in Rio das Ostras, which are formed by fewer pulses (5–11 pulses, Abrunhosa *et al.* 2014).

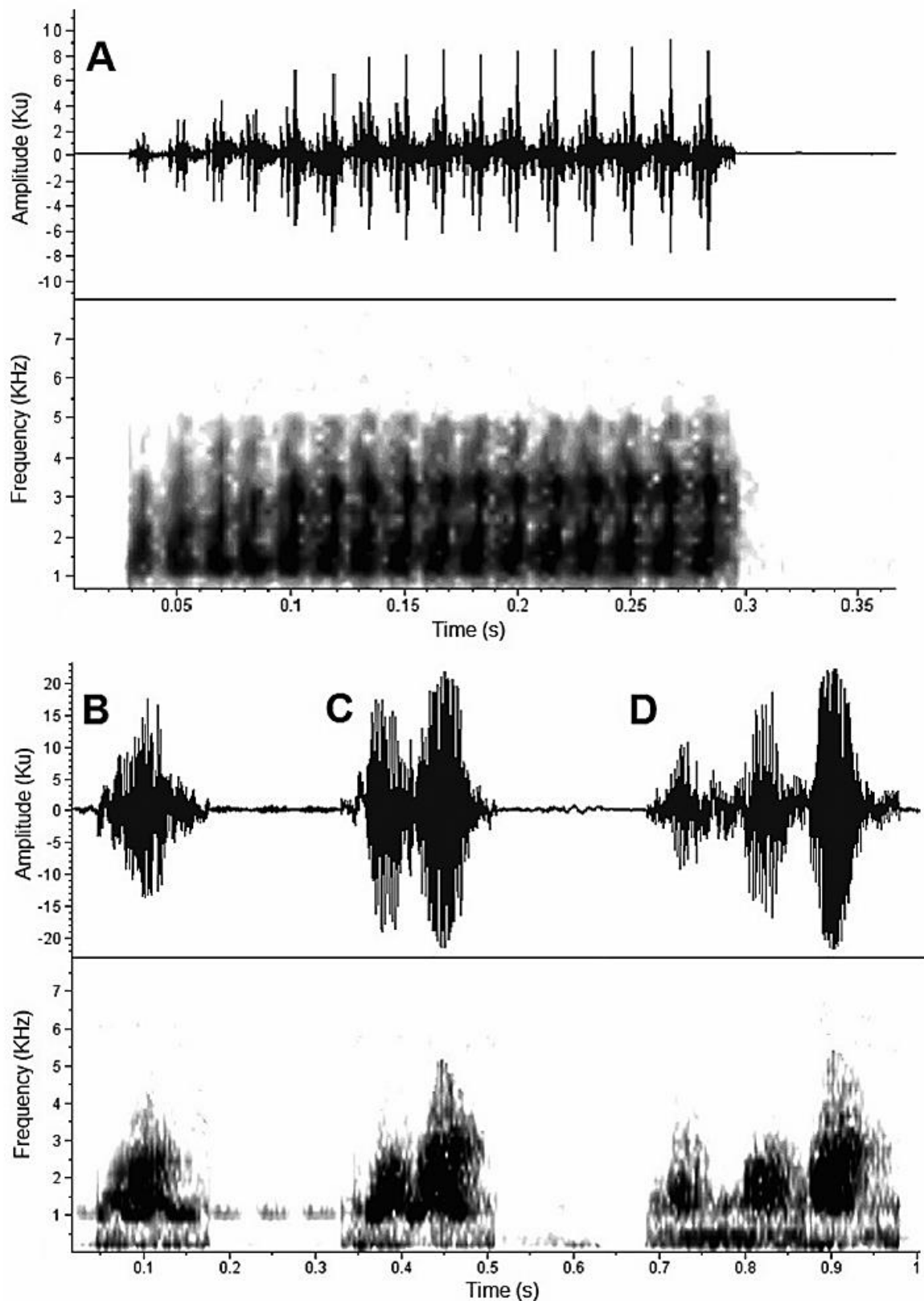


FIGURE 1. Calls of *Scinax hayii* from Petrópolis, Rio de Janeiro (type locality). Oscilograms (upper graphs) and spectrograms (lower graphs) of (A) the advertisement call, and a second call type with (B) one note, (C) two notes and (D) three notes. Air temperature at time of recording was 17°C.

The description of the advertisement call of *S. hayii* from its type locality enables future population differentiation studies and allows the taxonomic identification of this species to be more precise.

We thank ICMBio/SISBio for authorizations (license numbers: 40618-1). For financial support we thank grants # 06/56007-0 and # 2013/50741-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP). LRS thanks CAPES for a scholarship.

References

- Abrunhosa, P.A., Wogel, H. & Pombal, J.P. Jr. (2014) Spatial and temporal organization in three syntopic species of the *Scinax ruber* group (Anura: Hylidae) in the Atlantic rainforest, southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 2014, 1–23.
<https://doi.org/10.1080/00222933.2013.862575>
- Bioacoustics Research Program (2011) Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.4) [Computer software]. The Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY. Available from: <http://www.birds.cornell.edu/raven> (accessed 11 January 2017)
- Cardoso, A.J. & Andrade, G.V. (1991) Descrição de larvas e biologia de quatro espécies de *Hyla* (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Biologia*, 51 (2), 391–402.
- 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.
- Lutz, B. (1973) *Brazilian species of Hyla*. University of Texas Press, Austin, 260 pp.
- Magrini, L., Carvalho-e-Silva, S.P., Bêda, A.F. & Giaretta, A.A. (2011) Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura:Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. *Zootaxa*, 3066, 37–51.
- Pombal, J.P. Jr., Bastos, R.P. & Haddad, C.F.B. (1995) Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. *Naturalia*, 20, 213–225.

Artigo 2

Vocalizations of *Scinax dolloi* (Anura, Hylidae) at Its type locality Vila de Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brazil, including bioacoustics comparisons with morphologically similar species

Submetido para: South American Journal of Herpetology (SAJH)

Fator de impacto: 1.122

Status: aceito para publicação em Outubro de 2018

Vocalizations of *Scinax dolloi* (Anura, Hylidae)

at Its type locality Vila de Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brazil,

including bioacoustics comparisons with morphologically similar species

Lucas Rodrigo dos Santos^{1,*}, Paulo Henrique Silva², Itamar Alves Martins³

^{1,2}*Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.*

³*Laboratório de Zoologia – Instituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté, 12030-180 Taubaté, São Paulo, Brazil*

*Corresponding author. E-mail: lucasportugasantos@gmail.com

Abstract

This study presents the description of the advertisement call and a second call type of *Scinax dolloi*, registered in its type locality, Vila de Maringá, Itatiaia, in the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The advertisement call consists of a multi-pulsed note showing upward modulation in the initial pulses. The second call type is usually issued between advertisement calling notes. The notes of this call consist of a modified version of the advertisement call presenting a juxtaposition of the pulses that form the note in its structure. The pulse rate, number of pulses and note duration are call parameters that best differentiate *S. dolloi*, *S. hayii*, and *S. perereca*. Despite some overlap in the spectral components (frequency range and dominant frequency), the three species present significantly different means. Vocalization description for *S. dolloi* from its type locality amplifies knowledge about this species.

Keywords: Acoustic discrimination; bioacoustics; Scinaxinae; southeastern Brazil; vocalization.

INTRODUCTION

The subfamily Scinaxinae was proposed by Duellman et al. (2016) presenting 132 species distributed in four genera: *Scinax* (71 spp.) with species previously rearranged in the *Scinax ruber* clade by Faivovich (2002).; *Ololygon* (44 spp.) containing species belonging to *S. catharinae* group (Faivovich 2002); The genus *Julianus* (2 spp.) was proposed by Duellman et al. (2016) to allocate species from *Scinax uruguayus* group (*sensu* Faivovich et al. 2005); and *Sphaenorhynchus* (15 spp.) considered as sister taxon but with low support value (49%) in molecular analysis made by Duellman et al. (2016). Despite *Scinax* is the most specious genus, species's number is still underestimated and new species may be described (Fouquete et al., 2007; Ferrão et al., 2016). However, the challenge of describing new species runs counter to deficiency of important character such as morphometry e biacoustics description in old species descriptions for example *S. x-signatus* (Spix, 1824), *S. dolloi* (Werner, 1903), *S. hayii* (Barbour, 1909).

Scinax dolloi was described by Werner (1903) based on two females (deposited in Institut Royal des Sciences Naturelles in Brussels, Belgium, accession number IRSNB 6481). In the original description Werner designate the type locality of *S. dolloi* as Brazil in unknow location. The type locality of *Scinax dolloi* has been quoted as "Brasil or Brazil" by many authors (e.g., Nieden, 1923; Harding, 1983; Bokermann, 1966; Lutz, 1973; Duellman, 1977; Frost, 1985). Lang (1990) cited two syntypes of "*Hyla dolloi*" collected by Van Den Driesse on 30 July 1897. Although the original description is not precise, Lang (1990) designates the type locality as Haut Maringa Brésil (Alto Maringá Brasil). Based on this designation there was a general interpretation the type locality of *S. dolloi* would be the Municipality of Maringá, in the State of Paraná, southern Brazil (see a detailed historic in Caramaschi et al., 2013).

Caramaschi et al. (2013) re-evaluated the interpretation of the type locality for *S. dolloi*, and they designated Vila de Maringá, municipality of Itatiaia, in the State of Rio de Janeiro, located in the Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil, however it's worth pointing out that Vila de Maringá belongs to two municipalities, Itatiaia (Rio de Janeiro) and Bocaina de Minas (state of Minas Gerais), this second is where the geographical coordinates(22°19'S, 44°35'W) are presented by Caramaschi et al. (2013).

Lutz (1973) considered *Scinax dolloi* as a "doubtful species" due to the nonexistence of specimens for identification. William E. Duellman (in Frost, 1985, 2018) reported that there were no natural populations associated to this species due to the absence of collected specimens. Based on the syntypes, Faivovich et al. (2005) designate that *Scinax dolloi* is morphologically close to *S. hayii* (Barbour, 1909) and *S. perereca* Pombal et al., 1995a. However, many species that occurring in the Northeastern to Southeast has its identification associated with the name *S. x-signatus* (Spix, 1824) and this may be happening with *S. dolloi* populations. Nevertheless, biological information for *Scinax dolloi* remains non-existent and descriptions of *S. x-signatus* preclude a correct identification.

Here, we present the first description of the advertisement call and a second call type of *Scinax dolloi* from its type locality, Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro. We aim to contribute to the taxonomy of this species, including bioacoustics comparisons with topotypes of *Scinax hayii* and *Scinax perereca*, which are considered morphologically similar species.

MATERIAL AND METHODS

Five males of *Scinax dolloi* (Figure 1) were recorded and collected between 20 and 21 January 2016 in Vila de Maringá, municipality of Itatiaia, State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil (22°20'20.643"S, 44°34'48.420"W 1200 M a.s.l.). We performed a set of bioacoustic comparisons of *S. dolloi* topotypes and related species. Prior to the comparisons, analyses and call parameters were standardized. The vocalizations of two adult males of *Scinax hayii* were recorded and re-analyzed on 13 December 2013 in Bonfim neighborhood, municipality of Petrópolis, State of Rio de Janeiro (22 ° 27'40.4 "S, 43 ° 05'58.7" W 988 m a.s.l.) [data published in Santos and Martins (2017)]. Also, six adult males of *Scinax perereca* were recorded on 15 December 2013 in municipality of Ribeirão Branco, State of São Paulo (24 ° 13 '11.39 "S, 48 ° 45' 47.35" W 946 m a.s.l.) (type localities for *Scinax hayii* and *S. perereca*, respectively). Vocalizations were recorded using a Marantz PMD-671 digital recorder with a sampling rate of 44,100 Hz, 16-bit resolution, connected to a Sennheiser K6/ME66 directional microphone. The bioacoustic analyses were performed in the Raven 1.4 software (Bioacoustics Research Program 2011) with window type Hann, 256 samples, 3 dB filter bandwidth 248 Hz, overlap of 50 percent, Hop size 128 samples, 256 samples DFT size, grid spacing 172 Hz. All vocalizations of *S. dolloi*, *S. hayii* and *S. perereca* were analyzed with the same preset. We analyzed eight different bioacoustics traits: frequency range (region between minimum

frequency and maximum frequency), dominant frequency (region with the highest energy, obtained with the "Peak frequency" function and power spectrum), note duration, number of pulses, pulse rate, pulse duration, pulse interval, and call rate. The terminologies used for the parameters of vocalizations are in agreement with Martins and Jim (2003) and Köhler et al. (2017).

The specimens of *Scinax dolloi* are registered and deposited in the Scientific Collection of the Laboratory of Zoology at the University of Taubaté (CCLZU), municipality of Taubaté, state of São Paulo, Brazil (CCLZU 3286–3288, 3295 and 3296). The specimens of *Scinax hayii* and *Scinax perereca* used in the comparisons are deposited in the Scientific Collection of the Laboratory of Zoology of the University of Taubaté (CCLZU) and the CFBH Collection UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil (*S. hayii* CCLZU 3179, CFBH 17896; *S. perereca* CCLZU 3277–3279, CFBH 40133–40135). Vocalizations were deposited in Acoustic Collection Itamar Alves Martins (CAIAM) at University of Taubaté (record files in appendix).

We used the multivariate method of discriminant analysis of canonical variables of the acoustic parameters considered "static" (adapted from Gerhardt, 1991) to set the bioacoustic comparison between species. The coefficient of variation (mean/standard deviation x 100) was calculated for all acoustic characters analyzed. When the value of the coefficient presented was less than or equal to 10%, we considered the call character as "static" (acoustic characters with low variation). Above this value, we considered the acoustic character "dynamic" (acoustic characters with considerable variation). Only the characters that presented a "static" pattern for at least two of the three species analyzed were included in the analysis. We excluded the parameters considered "dynamic" for the three species from the analysis, once their considerable variation could "mask" the results, making interpretation difficult. Subsequently, we applied the Student's t-test to compare means of the call parameters among the species used in the multivariate analysis.

RESULTS

Specimens recorded present snout vent length from 33.2 mm to 36.9 mm (average = 34.6 ± 1.5 mm; $n = 5$). The most common call emitted was considered by us as advertisement call of *Scinax dolloi*. Advertisement call consists of a single note formed by a sequence of defined pulses (*sensu* Narins, 2007; Köhler et al., 2017) (Figure 2A). Note presents ascendant modulation from first to third pulse. Initial pulses present lower frequency range and they are

separated by short intervals, sometimes almost juxtaposed. Note is the central unit of the call (approach note-centered *sensu* Köhler et al., 2017). The note may be issued only once or in series with irregular number of notes and intervals. Note duration varies from 212 ms to 343 ms (average = 277 ± 27 ms; $n = 115$) and is composed of 10 to 14 pulses (average = 12 ± 1 ; $n = 115$). Pulse duration varies between 11ms and 23ms (average = 18 ± 3 ms; $n = 200$) and is separated by a range that varies between 1ms and 7ms (average = 3 ± 2 ms; $n = 200$). Frequency range of the advertisement call varies from 836 Hz to 5589 Hz. The dominant frequency ranges from 1,350 Hz to 1,448 Hz (average = $1,390 \pm 30$ Hz; $n = 115$). The advertisement call shows a note repetition rate ranging from 24 note/minute to 52 note/minute (average = 39 ± 11 note/minute) (Table 1).

A second type of call is usually issued at the end of a series of advertisement notes or interleaved with advertisement notes. We observe that these calls were emitted by males when they were close interacting. This call consists of a modified version of the advertisement call, presenting a juxtaposition of the pulses forming a modulated note with a different pitch from the advertisement note, typical for *Scinax* species (Pombal et al., 1995a,b; Magrini and Giaretta 2010; Santos and Martins 2017). The second call type shows a frequency range from 1,038 Hz to 4,721 Hz with the dominant frequency ranging between 1,266 Hz and 2,787 Hz ($2,055 \pm 541$ Hz; $n = 41$). Duration of this second call type ranges from 70ms to 118ms (91 ± 12 ms; $n = 41$) (Figure 2B).

Bioacoustics comparisons with *Scinax hayii* and *Scinax perereca*

To compare quantitatively the advertisement vocalizations of *Scinax dolloi* (Figure 2A), *S. hayii* (Figure 2C), and *S. perereca* (Figure 2D), which are species considered morphologically similar (Faivovich et al., 2005), we selected six variables with static variance (Table 1) for the discriminant analysis: minimum frequency, maximum frequency, dominant frequency, pulse rate, number of pulses and note duration (see all quantitative values of advertisement call for *S. hayii* and *S. perereca* in Table 1). The canonical coefficients of the variables used in the discriminant analysis are shown in Table 2.

The Lambda Wilk's test showed a significant difference between the three sampled groups (Wilk's = 0.004, $F = 1062$, $p = 0.00$). The first axis (x) of the function explains 95.1% of the variation found, while the y axis accounts for 4.9% of the variation between species (Figure 3). Figure 3 shows that the groups are well defined and discriminated mainly by pulse rate,

number of pulses and duration of the call. Spectrum analysis for minimum frequency, maximum frequency and dominant frequency in *S. dolloi*, *S. hayii* and *S. perereca* presents differences in the range of frequencies (Figure 2), however regions between minimum frequency and maximum frequency ranges overlap (see Table 1).

Later, we performed a Student's t-test with the spectrum analysis of call based on a three-parameter model (minimum, maximum and dominant frequency) to compare the mean values of the three species. The Student's t-test between *Scinax dolloi* and *S. hayii* showed a significant difference in the minimum frequency, maximum frequency and dominant frequency (minimum F.: $t = 19.3$, $p = 0.000$; maximum F.: $t = -32.03$, $p = 0.000$; dominant F.: $t = 3.31$, $p = 0.001$).

The difference between *Scinax dolloi* and *S. perereca* was also significant for all the call spectral parameters (maximum F.: $t = 7.65$, $p = 0.00$; minimum F.: $t = -39.28$, $p = 0.000$; dominant F.: $t = -7.88$, $p = 0.000$). The t-test applied to the comparison between *Scinax hayii* and *S. perereca*, showed significant difference in all the three parameters of the spectrum analysis of the call (minimum F.: $t = -33.37$, $p = 0.000$; maximum F.: $t = -20.93$, $p = 0.000$; dominant F.: $t = -7.05$, $p = 0.000$).

DISCUSSION

Gerhardt (1991) proposed that static acoustic characters of anuran advertisement calls bear important information for species-specific recognition, while dynamic call characters convey information about individual quality. Thus, static call characters are hypothetically relevant for taxonomy over those call characters considered dynamic. Köhler et al. (2017) mention that note duration and pulse rate (the number of pulses divided by note duration) are acoustic parameters that show less variation, being reliable acoustic characters for comparison between populations. In this study the parameters pulse rate number of pulses per note and note duration are the call characters that best differentiate *S. dolloi*, *S. hayii*, and *S. perereca*, agreeing with the survey made by Köhler et al. (2017).

Overlap in the frequency range of different species of anurans is probably due to evolutionary and ecological processes that act on them, being evident in morphological characteristics such as body size (Littlejohn, 1977). Related species have common anatomical and physiological factors, resulting sometimes in high similarities in their acoustic traits (Márquez et al., 1993; De La Riva et al., 1994). The spectral parameters of the call (frequency

range and dominant frequency) of the studied species here overlapped, however this probably occurs due to the body size and/or morphological similarity of these species.

In populations of related species occurring in sympatry (syntopic or synchronic) character displacement (*sensu* Blair, 1974) usually occurs to avoid acoustic niche overlap. Nevertheless, related species in allopatric conditions usually have similar characteristics in their calls, and there may be overlap in the call parameters (Duellman and Pyles 1983; Márquez and Bosch 1997; Martins and Jim, 2003, 2004). In this study *Scinax dolloi*, *S. hayii*, and *S. perereca* (they occur in allopatry) overlapped in their calls with respect to spectral parameters. However, the Student's t-test comparing population means of the frequencies showed significant different means between the three species. This corroborates the allopatric scenario for non-divergent acoustic traits in these *Scinax* species.

Scinax dolloi is currently restricted to its type locality (Vila de Maringá, Itatiaia, Rio de Janeiro) and its distribution can possibly extend through Serra da Mantiqueira. Nonetheless, there is little information on the populations and also of similar species for comparison in this area.

Advertisement call of *S. dolloi* has longest note duration formed by smaller pulses per note, diverging from all the populations identified as *S. hayii* sampled in Serra do Mar and Serra da Mantiqueira (further quantitative comparisons in Table 1). Dominant frequency registered for *S. dolloi* is located only in first lower band frequency, it differs from populations of *S. hayii* and *S. perereca* sampled by Magrini and Giaretta (2010), Magrini et al. (2011) and Santos and Martins (2017). Although Pombal et al. (1995 b) did not registered two bands in dominant frequency, values founded are similar to those sampled by Magrini et al. (2011) suggesting that population also has dominant frequency in two bands and thus by similarity in spectral traits these populations can be identified as the same species. Temporal parameters of the advertisement call and dominant frequency located in two bands suggest that populations sampled in the southern portion of the Serra da Mantiqueira (Magrini et al., 2011) have advertisement call more similar to *S. perereca* and *S. hayii* than *S. dolloi* (see Table 1).

Similarities in note structure, spectral and temporal parameters of advertisement founded between *S. hayii* topotypes (Santos and Martins, 2017) and specimens from Boracéia (Heyer et al., 1990) suggest that populations distributed in the Serra do Mar can be identified as *S. hayii* (Table 1). However data about populations from southern region of the Serra do Mar in state of São Paulo do not exist, and these populations are closer to type locality of *S. perereca* than *S. hayii*, so it is possible that in this region both species can be found living in sympatry.

Abrunhosa et al. (2014) described the advertisement call of *S. aff. hayii* to Rio das Ostras (coastal region of Rio de Janeiro state). In spite of the proximity to Petrópolis (type locality of *S. hayii*),

advertisement call sampled for specimens from Rio das Ostras presents higher dominant frequency (located only in one region, this with values close to second higher frequency band), longest note duration and fewer pulses per note in comparison to *S. hayii* topotypes (Santos and Martins, 2017). *Scinax dolloi* differs from *S. aff. hayii* (Abrunhosa et al., 2014) by presenting lower dominant frequency and higher number of pulses per note. Advertisement call of *S. perereca* from Ubatuba (North coast of São Paulo) described by Magrini and Giaretta (2010) overlap in pulses per note, note duration and dominant frequency (first lower band frequency) with *S. hayii* topotypes (see Table 1). Specimens from Ubatuba (Magrini and Giaretta, 2010) differs from *S. aff. hayii* (Abrunhosa et al., 2014) in temporal parameters and by having dominant frequency in two bands. Because of these bioacoustics differences both populations appear to be distinct taxonomic units, however, information about coastal populations in Rio de Janeiro and São Paulo are scarce and further sampling is required to confirm the correct taxonomic position of these populations.

Old descriptions of species with deficient data make it difficult for researchers to correctly identify some species populations. Due to deficiency in the description for *S. x-signatus*, several species have their identification associated to name *S. x-signatus*.

Despite the morphological and bioacoustic similarity between *S. hayii*, *S. perereca* and *S. dolloi*, there is a remote possibility that *S. dolloi* is associated with the name *S. x-signatus* (both species with deficient data in their descriptions), since *Scinax*'s species present complex taxonomy due to characters conservation.

In comparison to *S. dolloi*, population identified as *S. aff. x-signatus* from Rio das Ostras (Abrunhosa et al., 2014) differs by having higher dominant frequency (2520–3380 Hz), smaller note duration (100 to 180 ms) and fewer pulses per note (3 to 4). Advertisement call of *S. cf. x-signatus* sampled by Novaes and Zina (2016) from Contendas do Sincorá (State of Bahia) differs from *S. dolloi*, by presenting lower dominant frequency (980–1030 Hz), smaller note duration (110–170 ms) formed by fewer pulses (7–10). Therefore, bioacoustics analysis allows distinguishing *S. dolloi* from *S. x-signatus*.

Advertisement call of *S. dolloi*, *S. hayii* and *S. perereca* keeps great characters conservation in their structure. The three species have advertisement call with multipulsed notes showing ascendant modulation in the initial pulses. Visually, on selected notes with similar time, *Scinax dolloi*'s note structure has fewer pulses presenting longer duration and interval, *Scinax hayii* presents intermediate values and *S. perereca* has notes with greater number of pulses, these presenting fewer pulse duration, sometimes pulses are almost

juxtaposed (see Figure 2 A, C and D). Dominant Frequency in *S. dolloi* is located only in lower frequency band, in contrast *S. hayii* e *S. perereca* present dominant frequency located in two bands (lower and higher frequency band) (Figure 2 A, C and D). Despite of great characters conservation in note structure and frequencies overlapped, quantitative traits allowed full discrimination between species compared in this study.

Comparative studies of acoustic parameters of different species have been a valuable tool for species identification and resolution of taxonomic problems (De La Riva et al., 1994; Pombal et al., 1995 b; Nunes et al., 2012). Furthermore, vocalization analyses allow us to understand the evolutionary relationships, discuss identification at species level, and evaluate adaptations to different environmental pressures under the light of a phylogeny (Goicochea et al., 2009).

This rule applies to the *Scinax* genus, which shares as standard feature advertisement call composed by multipulsed notes. Besides the similarity in its morphology, already pointed out by Faivovich et al. (2005), the bioacoustic analysis shows resemblance between advertisement calls of *S. dolloi* *S. hayii* and *S. perereca*. This result is presumably due to the preservation (i.e. strong phylogenetic signal; Goicochea et al., 2009) of the acoustic structure in their advertisement calls, throughout the evolutionary history of these species.

Sampling of vocalization and specimens of *Scinax dolloi* in its type locality support the validity of this species. The description of the call contributes to a more precise identification and differentiation of these species, therefore the use of taxonomy involving bioacoustic and molecular analysis may determine the real taxonomic status of these species of *Scinax* and their populations.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank ICMBio/SISBio for specimens collection authorizations (license number: 55374-1). LRS and PHS thanks CAPES for providing scholarships. We are grateful to anonymous reviewers for their valuable suggestions. This work was supported by grants # 06/ 56007-0 and # 2013/50741-7 and partially by #2018/00694-6, provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP).

REFERENCES

Abrunhosa P.A., Wogel, H. & Pombal J.P. Jr. 2014. Spatial and temporal organization in three syntopic species of the *Scinax ruber* group (Anura: Hylidae) in the Atlantic rainforest,

- southeastern Brazil. *Journal of Natural History*. 48:1–23.
doi:10.1080/00222933.2013.862575
- Barbour T. 1909. Some new South American cold-blooded vertebrates. *Proceedings of the New England Zoölogical Club* 4:47–52.
- Bioacoustics Research Program. 2011. RAVEN PRO: Interactive Sound Analysis Software, Version 1.4. Accessible at: <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Blair F., W. 1974. Character Displacement in Frogs. *American Zoologist* 14: 1119–1125.
- Bokermann, W.C.A. 1966. Lista Anotada das Localidades Tipo de Anfíbios Brasileiros. Serviço de Documentação RUSP, São Paulo.
- Caramaschi U., Nunes I., Nascimento L.B., Carvalho R.R. Jr. 2013. The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903) (Anura, Hylidae). *Zootaxa* 3691(2): 299–300.
- Cardoso A.J., Andrade G.V. 1991. Descrição de larvas e biologia de quatro espécies de *Hyla* (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Biologia* 51(2): 391–402.
- De La Riva I., Marquez R., Bosch J. 1994. Advertisement calls of Bolivian species of *Scinax* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bijdragen tot de Dierkunde* 64(2): 75–85.
- Duellman W.E. 1977. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien. Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. *Das Tierreich* 95:1–225.
- Duellman W.E., Pyles R.A. 1983. Acoustic resource portioning in anuran communities. *Copeia* 3:639–649.
- Duellman W.E., Marion A.B., Hedges S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104:1–109.
doi:10.11646/zootaxa.4104.1.1
- Faivovich J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* 18:367–393.
- 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 Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294:1–240.
- Ferrão M., Colatreli O., Fraga R., Kaefer I.L., Moravec J., Lima AP. 2016. High species richness of *Scinax* treefrogs (Hylidae) in a threatened Amazonian Landscape revealed by an integrative approach. *Plos one* 11(11):e0165679 doi:10.1371/journal.pone.0165679.
- Fouquet A., Vences M., Salducci M.D., Meyer A., Marty C., Gilles A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax*

- ruber and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:567–582 DOI 10.1016/j.ympev.2006.12.006.
- Frost D.R. 1985. *Amphibian Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference*. Allen Press and Association of Systematics Collections, Lawrence.
- Frost D.R. 2018. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0. Electronic Database. Accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Scinaxinae>
- Gerhardt H.C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour* 42:615–635.
- Goicochea N., De La Riva I., Padial J.M. 2009. Recovering phylogenetic signal from frog mating calls. *Zoologica Scripta* 39:141–154.
- Harding K.A. 1983. *Catalogue of New World Amphibians*. Pergamon Press, Oxford.
- 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.
- Köhler J., Jansen M., Rodríguez A., Kok P.J.R., Toledo L.F., Emmrich M., Glaw F., Haddad C.F.B., Rödel M., Vences M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251:1–124. doi:10.11646/zootaxa.4251.1.1.
- Lang M. 1990. Annotated catalogue of the type-specimens from the herpetological collection of the Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels. *Documents de Travail. Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 59:1–36.
- Littlejohn M. J. 1977. Long range acoustic communication in anurans: an integrated and evolutionary approach. Pp 263–294. In D. H. Taylor e S. I. Guttman (Eds.) *The reproductive biology of the anurans: Contemporary research in major problems*. University of Missouri Press, Columbia.
- Lutz B. 1973. *Brazilian species of Hyla*. University of Texas Press, Austin.
- Magrini L., Giaretta A.A. 2010. Calls of two Brazilian species of *Scinax* of the *S. ruber* clade (Anura: Hylidae). *Herpetology Notes* 3:121–126.
- Magrini L., Carvalho-e-Silva S.P., Béda A.F., Giaretta A.A. 2011. Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura:Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. *Zootaxa* 3066:37–51.

- Márquez R., De La Riva I., Bosch J. 1993. Advertisement call of Bolivian species of *Hyla* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica* 25:426–443.
- Márquez R., Bosch J. 1997. Male advertisement call and female preference in sympatric and allopatric midwife toads. *Animal Behavior* 54:1333–1345.
- 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* 63:507–516.
- 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* 64:645–654.
- Narins P.M., Fay, R.R., Popper A.N. 2007. Hearing and Sound Communication in Amphibians. Springer, New York.
- Nieden F. 1923. Anura I. Subordo Aglossa und Phaneroglossa, Sectio 1 Arcifera. *Das Tierreich* 46:1–584.
- Novaes G., Zina J. 2016. Advertisement call of *Scinax camposseabrai* (Bokermann, 1968) (Anura: Hylidae), with comments on the call of three species of the *Scinax ruber* clade. *Zootaxa* 40842): 258–266. doi:10.11646/zootaxa.4084.2.5
- Nunes I., Kwet A., Pombal J.P. Jr. 2012. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). *Copeia* 3:554–569.
- Pombal J.P. Jr., 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 J.P. Jr., 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.
- Santos L.R., Martins I.A. 2017. Bioacoustic analysis in *Scinax hayii* (Barbour, 1909) (Anura, Hylidae) at its type locality in Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil. *Zootaxa* 4232:582–584. doi:10.11646/zootaxa.4232.4.8
- Werner F. 1903. Neue Reptilien und Batrachier aus dem naturhistorischen Museum in Brussel. Nebst bemerkungen über einige andere Arten. *Zoological Anzeiger* 26:246–253.

APPENDIX

Analyzed specimens and record files.

Scinax dolloi ($n = 5$): BRAZIL:**Rio de Janeiro**: Itatiaia: Vila de Maringá, CCLZU 3286 and 3288, Record files: CAIAM 189 to 203; CCLZU 3287, Record files: CAIAM 184 to 188; CCLZU 3295, Record files: CAIAM1002 to 1013; CCLZU3296, Record files: CAIAM 1015 to 1027. *Scinax hayii* ($n = 2$): BRAZIL:**Rio de Janeiro**: Petrópolis: Bonfim, CCLZU 3179, Record files: CAIAM S.hayii 1 Petropolis 12 Dez 2013; CFBH 17896, Record files: CAIAM S.hayii 2 Petropolis 12 Dez 2013. *Scinax perereca* ($n = 6$): BRAZIL: **São Paulo**: Ribeirão Branco, CCLZU 3227, Record file: CAIAM PHS03RB; CCLZU 3228, Record file: CAIAM PHS03RB; CCLZU 3229, Record file: CAIAM PHS04RB; CFBH 40133, Record file: CAIAM PHS05RB; CFBH 40134, Record file: CAIAM PHS02; CFBH 40135, Record file: CAIAM PHS01RB.

Table 1. Advertisement call parameters of *Scinax dolloi*, *S. hayii* and *S. perereca* and sampled populations in the literature. The results are presented as the amplitude values (min–max), mean $\pm$ standard deviation and the coefficient of variation (%). 1^a = first/lower frequency band; 2^a = second/higher frequency band.

Species/Reference	Frequency range (Hz)	Minimum frequency (Hz)	Maximum frequency (Hz)	Dominant frequency (Hz)	Note Duration (ms)	Pulses per note	Pulse rate	Pulse duration (ms)	Interval between pulses (ms)	Call rate (note/minute)
<i>Scinax dolloi</i> (n=115 calls)	836–5589	836–1188 (1014 $\pm$ 73) 7%	3785–5589 (4646 $\pm$ 414) 9%	1358–1448 (1390 $\pm$ 30) 2%	212–343 (277 $\pm$ 27) 9%	10–14 (12 $\pm$ 1) 7%	0.038–0.051 (0.044 $\pm$ 0.003) 8%	11–23 (18 $\pm$ 3) 17%	1–7 (4 $\pm$ 2) 47%	24–52 (39 $\pm$ 11) 29%
<i>Scinax perereca</i> (n=133 calls)	1166–5671	1166–1484 (1404 $\pm$ 72) 5%	3604–5671 (4280 $\pm$ 440) 10%	1 ^a 1515–1778 (1617 $\pm$ 53) 3% 2 ^a 3042–3694 (3444 $\pm$ 235) 7%	159–329 (250 $\pm$ 34) 13%	14–26 (20 $\pm$ 2) 10%	0.075–0.090 (0.082 $\pm$ 0.003) 4%	5–11 (8 $\pm$ 1) 13%	1–6 (4 $\pm$ 1) 25%	35–60 (43 $\pm$ 9) 20%
<i>Scinax hayii</i> (n=212 calls) (reanalyzed of Santos & Martins 2017)	1095–4033	1095–1227 (1161 $\pm$ 27) 2%	3331–4033 (3661 $\pm$ 125) 3%	1 ^a 1149–2102 (1455 $\pm$ 220) 14% 2 ^a 2956–3235 (3124 $\pm$ 99) 3%	163–310 (263 $\pm$ 20) 8%	13–19 (16 $\pm$ 1) 6%	0.055–0.068 (0.061 $\pm$ 0.001) 2%	12–19 (13 $\pm$ 1) 8%	1–7 (3 $\pm$ 1) 33%	15–59 (23 $\pm$ 11) 48%
<i>S. hayii</i> Poços de Caldas (Cardoso & Andrade 1991)	1000–4200				250	13–16				53,3 $\pm$ 2,8
<i>S. hayii</i> Boracéia (Heyer et al. 1990)	1000–4500			1200–2800	200–260	15–20				60–70

<i>S. hayii</i> Jundiaí (Pombal et al. 1995)	1000–6400	1800–4100	190–320	15–20	
<i>S. perereca</i> Ribeirão Branco (Pombal et. al. 1995)	800–3900	1300–1600	280–350	21–24	18–50
<i>S. perereca</i> Ubatuba (Magrini & Giaretta 2010)	950–7050	1ª 1431–2310 2ª 2740–3990	165–250	13–20	
<i>S. hayii</i> Atibaia (Magrini et al. 2011)	480–6390	1ª 1170–1920 2ª 2230–3300	206±11	13–15	12
<i>S. hayii</i> Itapeva (Magrini et al. 2011)	490–6090	1ª 1030–2130 2ª 2410–3490	240±22	13–17	39.5
<i>S. aff. hayii</i> Rio das Ostras (Abrunhosa et al. 2014)		2770–3720	140–360	5–11	

Table 2. Canonical coefficients of six bioacoustic variables used in the discriminant function analysis of the *Scinax dolloi*, *Scinax hayii*, and *Scinax perereca* topotypes.

Selected variables	Axis 1	Axis 2
Minimum frequency	0.009847	0.010098
Maximum frequency	0.001041	0.003914
Dominant frequency	6.29E-05	-0.00035
Pulse rate	503.01	-174.81
Note duration	0.034304	-0.0245
Pulses per note	-0.16493	0.33208



Figure 1. Adult male of *Scinax dolloi* (topotype, CCLZU 3286, snout-vent length = 33.6 mm), collected in Vila de Maringá neighborhood, municipality of Itatiaia, State of Rio de Janeiro, 20 January 2016.

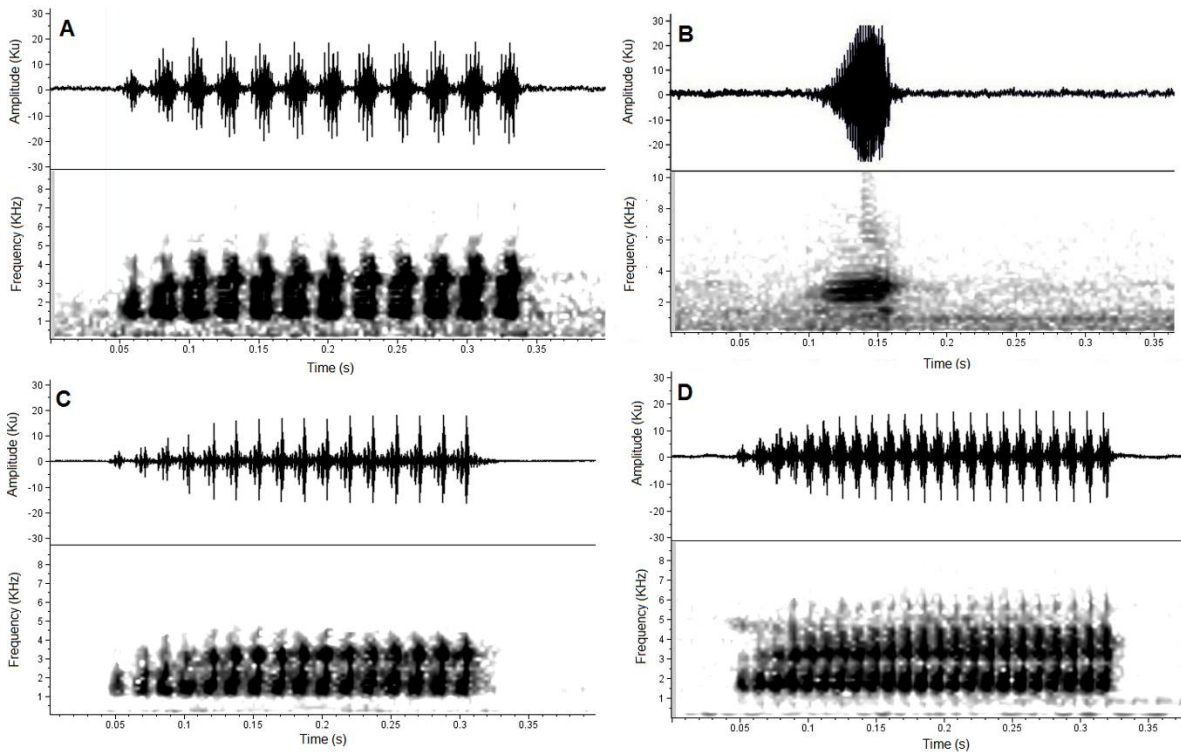


Figure 2. (A) Advertisement call of *Scinax dolloi* from Maringa, Itatiaia, Rio de Janeiro (type locality). Oscillogram (above) and spectrogram (below) of an advertisement call. Air temperature at time of recording: 17°C (archive sound CAIAM 1002 *S. dolloi* Maringa RJ 17°C). (B) second type of call emitted when males of *S. dolloi* were close interacting. (C) Advertisement call of *Scinax hayii* topotype from Petrópolis, Rio de Janeiro. Air temperature at time of recording was 17°C (record file: CAIAM *S. hayii* 1 Petropolis 12 Dez 2013). (D) Advertisement call of *Scinax perereca* topotype, Ribeirão Branco, São Paulo. Air temperature at time of recording was 20°C (Record file: CAIAM PHS03RB).

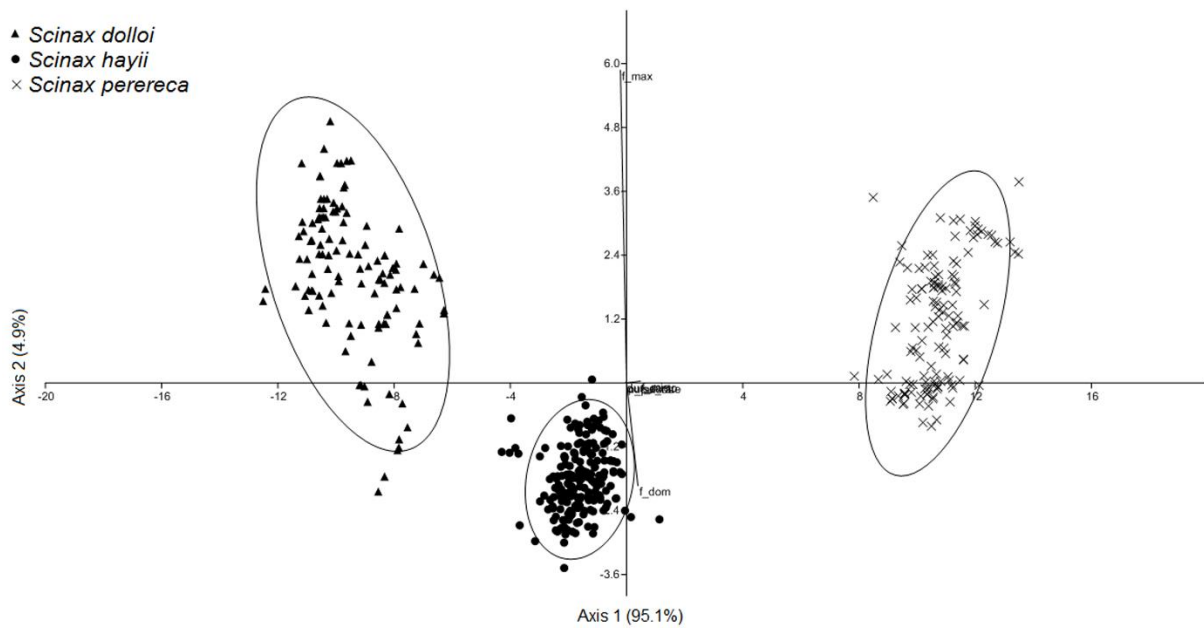
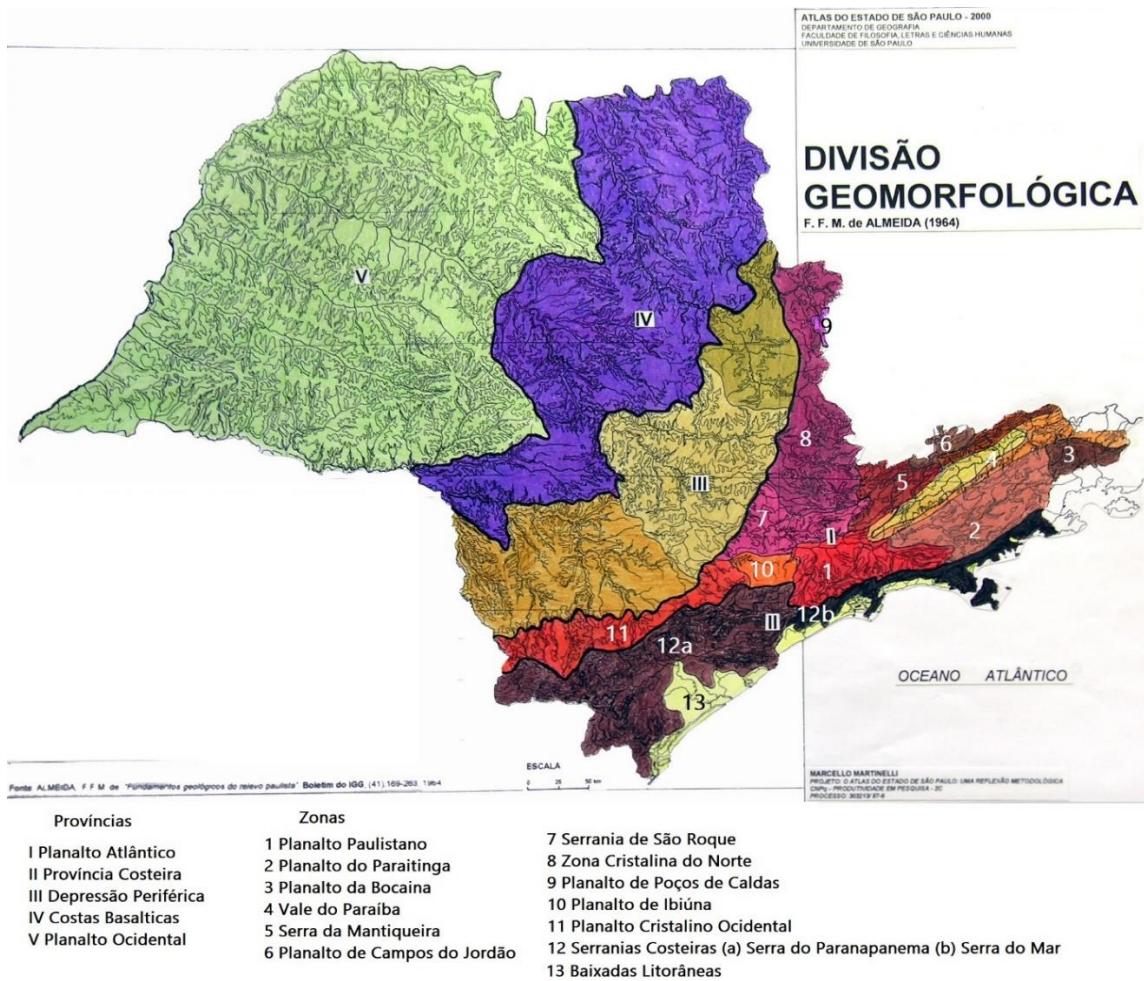


Figure 3. Scatter-plots, on the two discriminant axes (Axis 1 95.1% and Axis 2 4.9%), scores of six bioacoustics characters (minimum frequency, maximum frequency, dominant frequency, note duration, pulses per note and pulse rate) of *Scinax dolloi*, *Scinax hayii* and *Scinax perereca* topotypes.

ANEXO A – GEOMORFOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO



Fonte: Almeida F. F. M 1964. Divisão Geomorfológica do Estado de São Paulo in Marcelo Martinelli Atlas do Estado de São Paulo, Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo. 2000.