

VANESSA ROSSETTO MARCELINO

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E VARIAÇÃO
MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DO ANURO
HYPISBOAS BISCHOFFI (ANURA: HYLIDAE)**

VANESSA ROSSETTO MARCELINO

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E VARIAÇÃO MORFOLÓGICA EM
POPULAÇÕES DO ANURO *HYPSIBOAS BISCHOFFI* (ANURA:
HYLIDAE)

Orientador: JOÃO MIGUEL DE BARROS ALEXANDRINO

Co-orientador: CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção dos
graus de Bacharel e Licenciado.

Rio Claro
2009

597.8 Marcelino, Vanessa Rossetto
M314d Distribuição geográfica e variação morfológica em populações do
 anuro *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae) / Vanessa Rossetto
 Marcelino. - Rio Claro, SP : [s.n.], 2009
 32 f. : il., figs., gráfs., tabs.

 Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado -
 Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
 Biociências de Rio Claro
 Orientador: João Miguel de Barros Alexandrino
 Co-Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad

 1. Anuro. 2. Biogeografia. 3. Morfometria. 4. Diversidade
 morfológica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer às pessoas que, muito além de ajudarem diretamente nesse trabalho, me ajudaram a compreender a ciência como ela é.

Primeiramente, quero agradecer ao João Alexandrino, pela honra de ser orientada por alguém que admiro e estimo, tanto como pesquisador quanto como ser humano. Agradeço pela confiança, paciência, atenção e incentivo em todos os momentos. Agradeço por me ensinar o que é ciência, e por me mostrar que ciência também é arte.

Ao Célio Haddad, por abrir as portas do laboratório desde meu primeiro ano de faculdade, e por toda a atenção e preocupação com o trabalho.

À Olívia Araújo e ao João Gabriel, pela convivência e pelo apoio, e por sempre me darem os conselhos certos na hora certa.

À Maria Tereza Thomé, Juliana Zina, Julián Faivovich, Daniel Loebmann, Luis Giasson, Cynthia Prado, Maria Guimarães, Tuliana Brunes, Augusto Abe, Victor Dill, Felipe Toledo, enfim, a todos do Laboratório de Herpetologia, pela convivência e cooperação. Um agradecimento especial à cafeteira do Laboratório, que me deu ânimo para trabalhar sempre um pouquinho mais.

À minha família e amigos, que me lembram sempre de que há vida além da universidade.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Amostragem	7
3.2 . Análises do Padrão de Coloração	8
3.3. Análises Populacionais Morfométricas	9
4. RESULTADOS	12
5. DISCUSSÃO	14
6. REFERÊNCIAS	18
7. ANEXO I	21

RESUMO

O anuro *Hypsiboas bischoffi* é endêmico do sul e sudeste do Brasil, ocorrendo em áreas de montanha e submontanha da Mata Atlântica. Este trabalho estuda a variação geográfica de traços morfológicos em *Hypsiboas bischoffi*, através da análise da distribuição de duas formas distintas de padrão de coloração (forma listrada e não listrada), a fim de examinar a hipótese de que o padrão de coloração é polimórfico dentro das populações. Adicionalmente, nós descrevemos a variação em diversos traços morfométricos e examinamos sua associação com o padrão de coloração e com gradientes ambientais em toda a distribuição da espécie. Nossos resultados revelam que as duas formas de padrão de coloração são parapátricas, com as formas listradas e não listradas ocorrendo ao norte e ao sul da distribuição da espécie, respectivamente. As duas formas não foram observadas em coocorrência, mas indivíduos não listrados apresentaram padrões um tanto intermediários em localidades próximas à suposta zona de contato entre as duas formas. Análises multivariadas de variação morfométrica mostraram que a variação no tamanho do corpo explica a maior parte da variação observada, mas nem o tamanho do corpo, nem variações morfométricas adicionais estariam associadas com o padrão de coloração ou distância geográfica entre populações. No entanto, o tamanho do corpo parece estar associado com níveis locais de precipitação no verão. O padrão de diferenciação geográfica em *H. bischoffi* é concordante com padrões observados em alguns poucos organismos estudados, codistribuídos na Mata Atlântica.

INTRODUÇÃO

Descobrir os padrões geográficos de variação fenotípica é um caminho para examinar a diversificação de espécies ou populações. Estudos de variação geográfica podem gerar hipóteses sobre adaptação a diferentes habitats, separação histórica e isolamento ecológico (e.g., BENÍTEZ-DIAZ, 1993; PUORTO et al., 2001; ALEXANDRINO et al., 2005; ARNTZEN et al., 2007). Tais estudos são incomuns nos Neotrópicos, onde o número de trabalhos sobre a descrição de novas taxa e suas relações filogenéticas superam grandemente os estudos sobre padrões intraespecíficos de variação geográfica, que podem ajudar a elucidar os processos microevolucionários que promovem a diversificação biológica.

O anuro *Hypsiboas bischoffi* (BOULENGER, 1887) é endêmico da Mata Atlântica, onde habita áreas de montanha e submontanha, em floresta chuvosa e semidecídua. Sua distribuição geográfica conhecida estende-se do estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, no Sudeste e Sul brasileiros. A classificação taxonômica deste anfíbio tem originado alguma controvérsia, devido à variação do padrão de coloração dorsal. Indivíduos das localidades ao norte (*Hypsiboas bischoffi multilineata*, LUTZ, 1973), no estado de São Paulo, possuem múltiplas linhas longitudinais que estão ausentes nos indivíduos das localidades ao sul (*Hypsiboas bischoffi bischoffi*, LUTZ, 1973), nos estados do Paraná até o Rio Grande do Sul (Fig. 1). Essa variação tem sido interpretada tanto como uma variação em uma espécie monotípica (*Hyla bischoffi*, HADDAD E SAZIMA, 1992), como uma variação entre duas subespécies distintas (*Hyla bischoffi bischoffi* e *Hyla bischoffi multilineata*, LUTZ, 1973) ou entre duas espécies distintas (*Hyla multilineata* e *Hyla bischoffi*, LUTZ E LUTZ, 1939; HEYER et al., 1990).

Infelizmente, a amostragem populacional e geográfica insuficiente (e.g. quatro e uma localidades foram amostradas por Lutz, 1973, e por Heyer et al., 1990, respectivamente), impediu o estudo adequado das hipóteses alternativas de polimorfismo dentro de populações coespecíficas *versus* grupos geográficos discretos de populações com padrões de coloração dorsal distintos. Aqui, nós examinamos tais hipóteses através da descrição geográfica e populacional das formas listrada e não listrada de *H. bischoffi*, por toda sua extensão geográfica. Adicionalmente, nós procuramos por paralelos na variação geográfica de uma

variedade de caracteres relativos à forma e ao tamanho do corpo da espécie. Nós explicitamente testamos a relação entre a variação morfológica, padrões de coloração dorsal, distância geográfica entre populações e gradientes ambientais no sul da Mata Atlântica brasileira.

A)



Foto: J. Alexandrino

B)



Foto: L. Giasson

Figura 1. Indivíduos de *Hypiboas bischffi* representando os padrões de coloração dorsal listrado e não listrado: A) indivíduo com padrão de coloração listrado, coletado na localidade 12 (Guapiara-SP); B) indivíduo com padrão de coloração não listrado, coletado na localidade 30 (Anitápolis- SC). Para códigos das localidades, veja tabela 1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem: Indivíduos machos adultos foram obtidos da coleção de anfíbios CFBH, no departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Rio Claro, SP, e coletas de campo adicionais. Foram examinados 286 espécimes de 34 localidades distintas, abrangendo toda a distribuição da espécie (Fig. 2, Tab. 1). Os indivíduos foram coletados durante a estação reprodutiva, entre fevereiro de 2005 e fevereiro de 2007. Os animais coletados foram fixados em uma solução de formol a 10% por uma semana, preservados em uma solução de álcool etílico 70% e depositados na coleção CFBH. A maior parte dos indivíduos disponíveis eram machos (269 de 286), que foram coletados durante o canto de anúncio em seu comportamento reprodutivo.

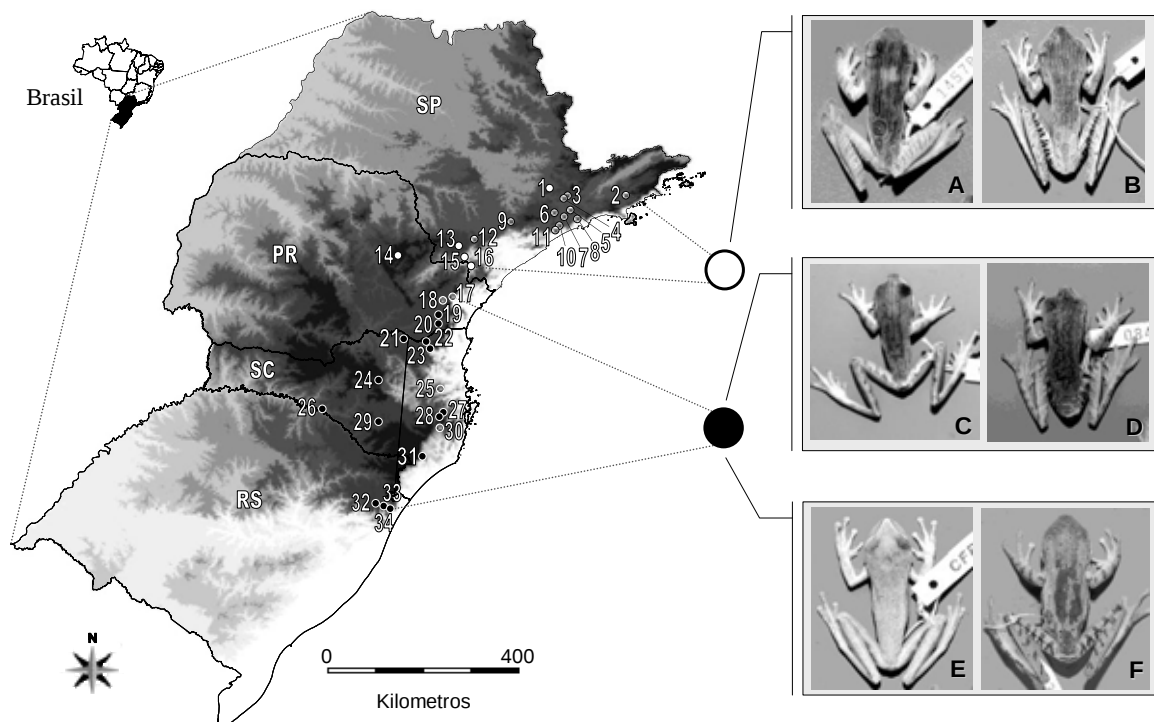


Figura 2. Distribuição geográfica de *Hypsiboas bischoffi* no sul da Mata Atlântica. As localidades amostradas encontram-se numeradas de 1- 34, de acordo com um eixo norte-sul. Pontos brancos e pretos representam localidades com indivíduos listrados e não listrados, respectivamente. Localidades com amostragem < 5 estão marcadas com uma cruz. Ao lado direito encontram-se imagens representando padrões de coloração distintos: (A–B) indivíduos com o padrão listrado das localidades 10 e 15, no estado de São Paulo; (C–D) indivíduos não listrados coletados na localidade 20, no Paraná; (E–F) indivíduos não listrados coletados nas localidades 26 e 28, em Santa Catarina.

Tabela 1. Coordenadas de GPS das 34 localidades amostradas para o anuro *H. bischoffi* (numeradas em um eixo norte-sul). Localidades com tamanho amostral > 5 estão destacadas em negrito.

Localidades	Código	Longitude	Latitude
Jundiaí	1	-46.94395	-23.24967
Natividade da Serra, SP	2	-45.44190	-23.37560
Mairiporã, SP	3	-46.60860	-23.39860
Serra da Cantareira, SP	4	-46.65786	-23.42245
Santo André, SP	5	-46.53830	-23.66390
Itapecerica da Serra, SP	6	-46.84920	-23.71690
São Paulo, SP	7	-46.65242	-23.80865
Cubatão, SP	8	-46.39872	-23.84546
Pilar do Sul, SP	9	-47.69357	-23.89886
Curucutu, São Paulo, SP	10	-46.77446	-23.98822
Itanhaém, SP	11	-46.81837	-24.06059
Guapiara, SP	12	-48.44835	-24.23914
Ribeirão Branco, SP	13	-48.73861	-24.34500
Piraí do Sul, PR	14	-49.95739	-24.53918
Iporanga, SP	15	-48.62787	-24.57792
Barra do Turvo, SP	16	-48.50470	-24.75640
Morretes, PR	17	-48.87606	-25.36338
Piraquara, PR	18	-49.06330	-25.44170
São José dos Pinhais, PR	19	-49.14684	-25.72964
Tijucas do Sul, PR	20	-49.14826	-25.87041
Mafra, SC	21	-49.83327	-26.16793
São Bento do Sul, SC	22	-49.37860	-26.25030
Corupá, SC	23	-49.33680	-26.36455
Santa Cecília, SC	24	-50.35041	-26.99386
Botuverá, SC	25	-49.11480	-27.16404
Campos Novos, SC	26	-51.45786	-27.54602
Angelina, SC	27	-49.05056	-27.61675
Rancho Queimado, SC	28	-49.12464	-27.69843
Lages, SC	29	-50.34335	-27.80837
Anitápolis, SC.	30	-49.12169	-27.90849
Treviso, SC	31	-49.46888	-28.46893
São Francisco de Paula, RS	32	-50.38338	-29.39069
São Francisco Paula II, RS	33	-50.23799	-29.46392
Itatí, RS	34	-50.10908	-29.51208

Análises do Padrão de Coloração: O padrão de coloração dorsal de cada um dos 286 indivíduos foi classificado como pertencente a um dos dois grupos distintos: *listrados*, com linhas longitudinais predominantemente contínuas (veja Fig. 2A–B); e *não listrados*, incluindo padrões com linhas desorganizadas, com linhas escassas e interrompidas, até indivíduos com o dorso completamente cinza e, algumas vezes, manchado (veja Fig. 2C–F).

Análises Populacionais Morfométricas: Apenas indivíduos machos adultos foram utilizados nas análises, devido ao baixo número de fêmeas disponíveis (N=17). Dezesete medidas morfométricas foram tiradas de cada macho adulto (Fig. 3): As medidas foram realizadas com um paquímetro digital (Mitutoyo[®], precisão de 0,01mm), por um dos autores (VRM). Localidades com tamanho amostral ≥ 5 foram incluídas nas análises populacionais multivariadas (N = 235 indivíduos, de 19 localidades, Fig. 2, Tab. 1) Os dados morfométricos foram logaritimizados para reduzir desvios de normalidade e efeitos de distorção causados por relações alométricas. As médias populacionais foram comparadas por Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Todas as medidas apresentaram diferenças significantes entre populações (Wilk's lambda = 0,098, $P < 0,001$; todos os resultados univariados com $P < 0,001$).

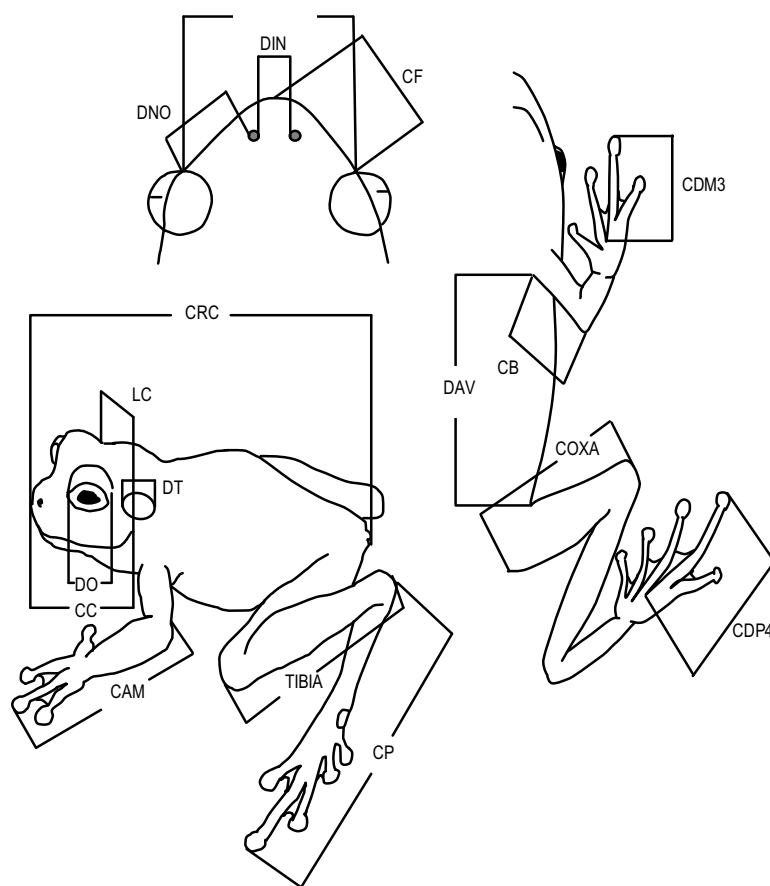


Figura 3. Dezesete medidas morfométricas realizadas em indivíduos de *H. bischoffi*: Comprimento Rostro-Cloacal (CRC); Comprimento da cabeça (CC); Largura da cabeça (LC); Comprimento do focinho (CF); Distância Inter-nasal (DIN); Distância Inter-orbital (DIO); Diâmetro do olho (DO); Distância narina-olho (DNO); Diâmetro do tímpano (DT); Comprimento do braço (CB); Comprimento do antebraço (CAM); Comprimento do 3º dedo da mão (CDM3); Distância axila-virilha (DAV); Comprimento da coxa (COXA); Comprimento da tibia (TIBIA); Comprimento do pé (CP); Comprimento do 4º dedo do pé (CDP4).

As análises morfométricas subsequentes foram realizadas por Análises de Componentes Principais (PCA), com o software Statistica v. 4.5 (STATSOFT, 1993). Após confirmação de que o tamanho explicava a maior parte da variação observada (primeiro eixo explicava 68% da variância, com todas as variáveis correlacionadas negativamente com o eixo na faixa de -0,58 a -0,96), foram usados os resíduos da regressão do log<caractere> pelo logCRC (Comprimento Rostro-Cloacal), daqui em diante diferenciados pelo símbolo # ligado ao nome da variável.

Tabela 2. Coeficientes do primeiro e segundo Componentes Principais (PC) para as dezessete medidas morfométricas de 19 populações de *Hypsiboas bischoffi*.

Variáveis	PC1	PC2
Comprimento rostro-cloacal (CRC)	-0.954	0.030
Comprimento da cabeça (CC)	-0.875	-0.271
Largura da cabeça (LC)	-0.899	-0.003
Comprimento do focinho (CF)	-0.861	0.164
Distância Internasal (DIN)	-0.579	-0.649
Distancia Interorbital (DIO)	-0.871	0.074
Diâmetro do olho (DO)	-0.731	-0.461
Distância narina-olho (DNO)	-0.742	0.328
Diâmetro do tímpano (DT)	-0.579	-0.327
Comprimento do braço (CB)	-0.708	0.231
Comprimento do antebraço (CAM)	-0.945	-0.057
Comprimento do 3º dedo da mão (CDM3)	-0.861	0.255
Distância axila-virilha (DAV)	-0.744	0.147
Comprimento da coxa (COXA)	-0.937	-0.005
Comprimento da tíbia (TIBIA)	-0.857	-0.061
Comprimento do pé (CP)	-0.964	-0.010
Comprimento do 4º dedo do pé (CDP4)	-0.823	0.356
Variância explicada (%)	68.526	7.240
Variância cumulativa (%)	68.526	75.766

As diferenças morfológicas, expressadas por distâncias euclidianas par-a-par entre as médias populacionais (ambas com a média da PCA com os dados brutos e ajustados – #PCA) foram comparadas com a distância geográfica (medidas em mapas 1:100.000), distância ambiental e padrão de coloração, através de testes de Mantel parcial (RT 2.0; MANLY, 1996), com 10.000 randomizações. A distância ambiental entre localidades foi expressa por distâncias euclidianas par-a-par, tanto para as variáveis separadamente, como para as médias ao longo dos eixos sintéticos da PCA, para as seguintes variáveis não-correlacionadas (Pearson $r < 0,70$) que descrevem a altitude e o clima da Mata Atlântica (obtidas através da

base de dados bioclimáticos Worldclim, na resolução espacial de 30 arc-sec; Hijimans et al., 2005): Altitude (Alt), Média da Temperatura Anual (TempAnnRge), Precipitação Anual (AnnPrec), e Precipitação do Trimeste Mais Quente (PrecWarmQt). Nós aplicamos a correção de Bonferroni nos testes com os dados de PCA e #PCA, uma vez que a hipótese nula global de não associação entre a variação morfológica e as variáveis independentes estavam sendo examinadas por múltiplos testes (P -level de $0,05/6 \approx 0,01$). A correção de Bonferroni não foi usada ao se testar hipóteses específicas aninhadas dentro da hipótese nula global (i.e., variáveis dependentes como CRC). Para validar a classificação posterior dos indivíduos em cada população para cada grupo listrado ou não listrado, foi realizada uma Análise Discriminante (DA) com o software Statistica v. 4.5 (STATSOFT, 1993).

Tabela 3. Coeficientes dos quatro primeiros Componentes Principais para dezesseis medidas morfométricas ajustadas (#PC), realizadas em 19 populações de *Hypsiboas bischoffi*.

Variáveis	PC#1	PC#2	PC#3	PC#4
Comprimento da cabeça (CC)	-0.545	-0.513	-0.231	0.138
Largura da cabeça (LC)	-0.531	-0.008	-0.200	0.317
Comprimento do focinho (CF)	-0.545	0.399	-0.470	0.093
Distância Internasal (DIN)	-0.391	-0.643	-0.097	0.059
Distancia Interorbital (DIO)	-0.597	0.247	-0.458	0.017
Diâmetro do olho (DO)	-0.215	-0.639	-0.2119	-0.317
Distância narina-olho (DNO)	-0.379	0.568	-0.470	-0.055
Diâmetro do tímpano (DT)	-0.245	-0.256	-0.271	-0.710
Comprimento do braço (CB)	-0.197	0.237	0.462	-0.411
Comprimento do antebraço (CAM)	-0.728	-0.183	0.315	-0.081
Comprimento do 3º dedo da mão (CDM3)	-0.548	0.483	0.102	-0.261
Distância axila-virilha (DAV)	0.274	0.132	0.457	-0.062
Comprimento da coxa (COXA)	-0.665	-0.079	0.373	0.029
Comprimento da tíbia (TIBIA)	-0.528	-0.197	0.385	0.312
Comprimento do pé (CP)	-0.819	-0.076	0.351	0.023
Comprimento do 4º dedo do pé (CDP4)	-0.394	0.590	0.257	-0.003
Variância explicada (%)	25.786	15.215	11.760	6.791
Variância cumulativa (%)	25.786	41.000	52.761	59.552

RESULTADOS

O padrão listrado de *Hypsiboas bischoffi* (Fig. 1A e Fig. 2A–B) foi encontrado exclusivamente nas localidades 1–16, nos estados de São Paulo e norte do Paraná, enquanto o padrão não listrado (Fig. 1B e Fig. 2C–F) foi observado nas populações ao sul do estado de São Paulo (localidades 17–34, Fig. 2). A coocorrência de indivíduos listrados e não listrados na mesma população não foi observada em nenhuma localidade.

A PCA com os dados brutos resultou em dois eixos principais que explicam aproximadamente 68% e 7% da variação total, respectivamente (Tab. 2). As médias dos fatores de pontuação das 19 populações estão representadas ao longo do primeiro e do segundo eixo da PCA (Fig. 4A). A PCA com os dados ajustados produziu um eixo que explica aproximadamente 26% da variação total. Os primeiros quatro eixos explicam 59% da variação total (Tab. 3). As médias dos fatores de pontuação das 19 populações estão representadas ao longo do primeiro e segundo eixos da PCA com os dados ajustados (Fig. 4B). Os fatores de pontuação individuais da PCA com os dados brutos e ajustados estão representados na figura 4.

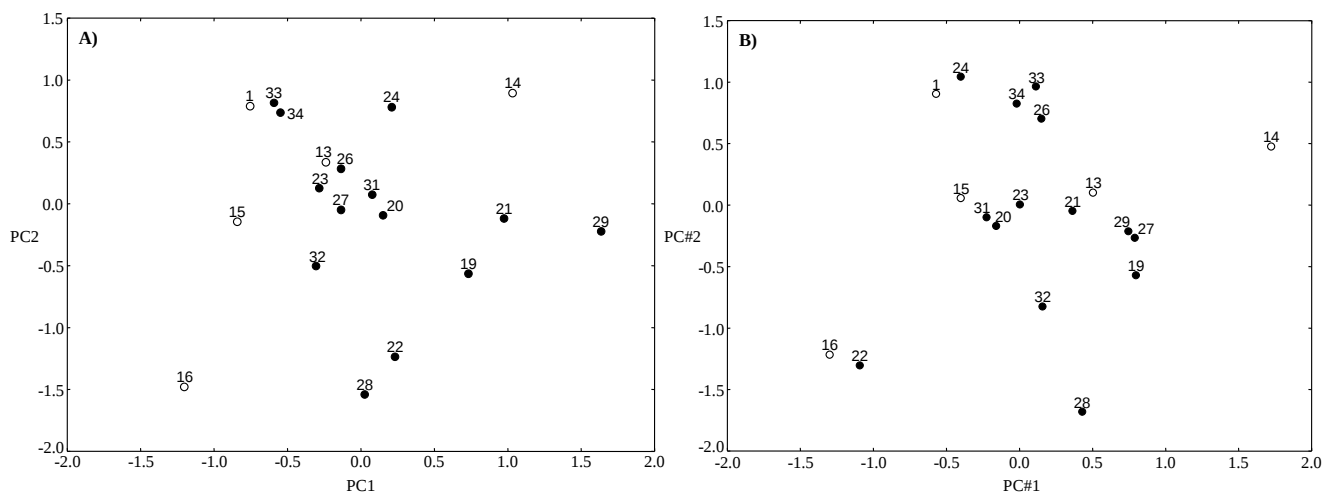


Figura 4. Média dos fatores de pontuação (centróides) para 19 populações analisadas de *Hypsiboas bischoffi*, nos primeiros dois eixos principais da PCA com dados brutos (A) e da #PCA com dados ajustados (B). As populações estão representadas por números, segundo um eixo norte-sul. Pontos abertos e sólidos representam populações com indivíduos listrados e não listrados, respectivamente.

A PCA morfométrica baseada nas distâncias entre populações não estão associadas com o grupo morfológico, distância geográfica, Altitude, Média da Temperatura Anual, Precipitação Anual e Precipitação do Trimestre Mais Quente (i.e. no verão), com exceção do PC1 ($\approx$ CRC) e CRC que estavam significativamente associados com a Precipitação no Trimestre Mais Quente ($P < 0,0001$; Tab. 4, Fig. 6).

A classificação correta dos indivíduos nos respectivos grupos de padrão de coloração, segundo DA com dados brutos e ajustados foi 79,5% e 75,0%, respectivamente (Fig. 7)

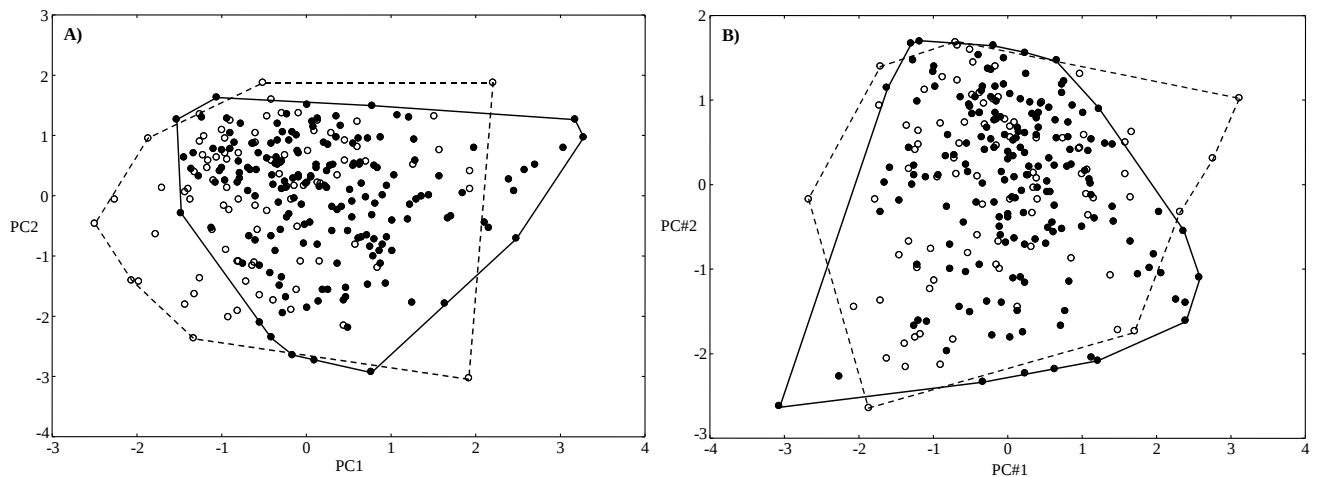


Figura 5. Fatores de pontuação para os indivíduos de 34 populações de *H. bischoffi*, no primeiro e segundo eixo principal da PCA com dados brutos (A) e da #PCA com dados ajustados (B). Pontos abertos e polígonos tracejados representam indivíduos listrados, enquanto pontos sólidos e polígonos com linhas contínuas representam indivíduos não listrados.

DISCUSSÃO

Análises morfológicas de populações de *H. bischoffi* em toda a área de distribuição da espécie mostraram a existência de duas formas geográficas: a forma listrada, que se distribui no estado de São Paulo e norte do Paraná; e a forma não listrada, distribuída ao sul, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Fig. 2). Apesar da transição entre as formas parecer pontual (i.e., padrões listrados e não listrados não foram observados sintopicamente), indivíduos não listrados de localidades próximas à fronteira de transição são um tanto quanto intermediários (padrões na Fig. 2C–D, das localidades 17 e 20), sugerindo a existência de uma zona de introgressão entre as duas formas (padrões na Fig. 2A–B, E–F).

Tabela 4. Resultados do Testes de Mantel Parcial para associação entre diferenciação morfológica em populações de *H. bischoffi* versus relação ao grupo de coloração, distância geográfica e quatro variáveis de distância ambiental. As variáveis dependentes são os dois primeiros eixos da PCA, os quatro primeiros eixos da #PCA com dados ajustados e o Comprimento Rostro-Cloacal. A correção de Bonferroni foi aplicada a seis testes com os dados da PCA (resultados significantes se $p < 0,01$), mas não ao teste com o CRC. Valores de correlação parcial estão dados onde estes são significantes (* = $p < 0,0001$; ns = não significativo)

Variável Dependente	Variáveis explicativas					
	Relação ao grupo	Distância geográfica	Altitude	TempAnnRge	AnnPrec	PrecWarmQt
PC1	ns	ns	ns	ns	ns	0.30*
PC2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CRC	ns	ns	ns	ns	ns	0.32*

A variação geográfica discreta entre duas formas de padrão de coloração não foi acompanhada por um padrão similar de variação morfométrica em *H. bischoffi* (Tab. 4). Apesar de serem observadas diferenças morfométricas entre populações, especialmente tamanho do corpo, a existência de um padrão de variação morfométrica não é aparente (Figs. 4, 5 e 7). Os maiores e menores indivíduos de *H. bischoffi* tendem a ser listrados e não listrados, respectivamente (uma tendência previamente notada por Lutz, 1973), mas a

distribuição dos valores de tamanho individual parecem se sobrepor amplamente entre os dois grupos de padrão de coloração. Adicionalmente, indivíduos não listrados das localidades mais ao sul (locs. 32–34) eram, em média, os maiores entre os não listrados (Fig. 4), explicando a alta proporção desses indivíduos classificados pela DA como pertencentes ao grupo listrado (Fig. 7), refutando a hipótese da existência de um gradiente geográfico para o tamanho do corpo. Em vez disso, a variação do tamanho do corpo parece seguir um gradiente ambiental de precipitação no verão (Fig. 6). Este padrão de variação do tamanho do corpo é diferente do reportado no único estudo comparável de anuros realizado na Mata Atlântica, em que uma série geográfica de cinco espécies do grupo *Rhinella crucifer* mostraram uma tendência de diminuição do tamanho do corpo nas populações ao sul (BALDISSERA et al., 2004).

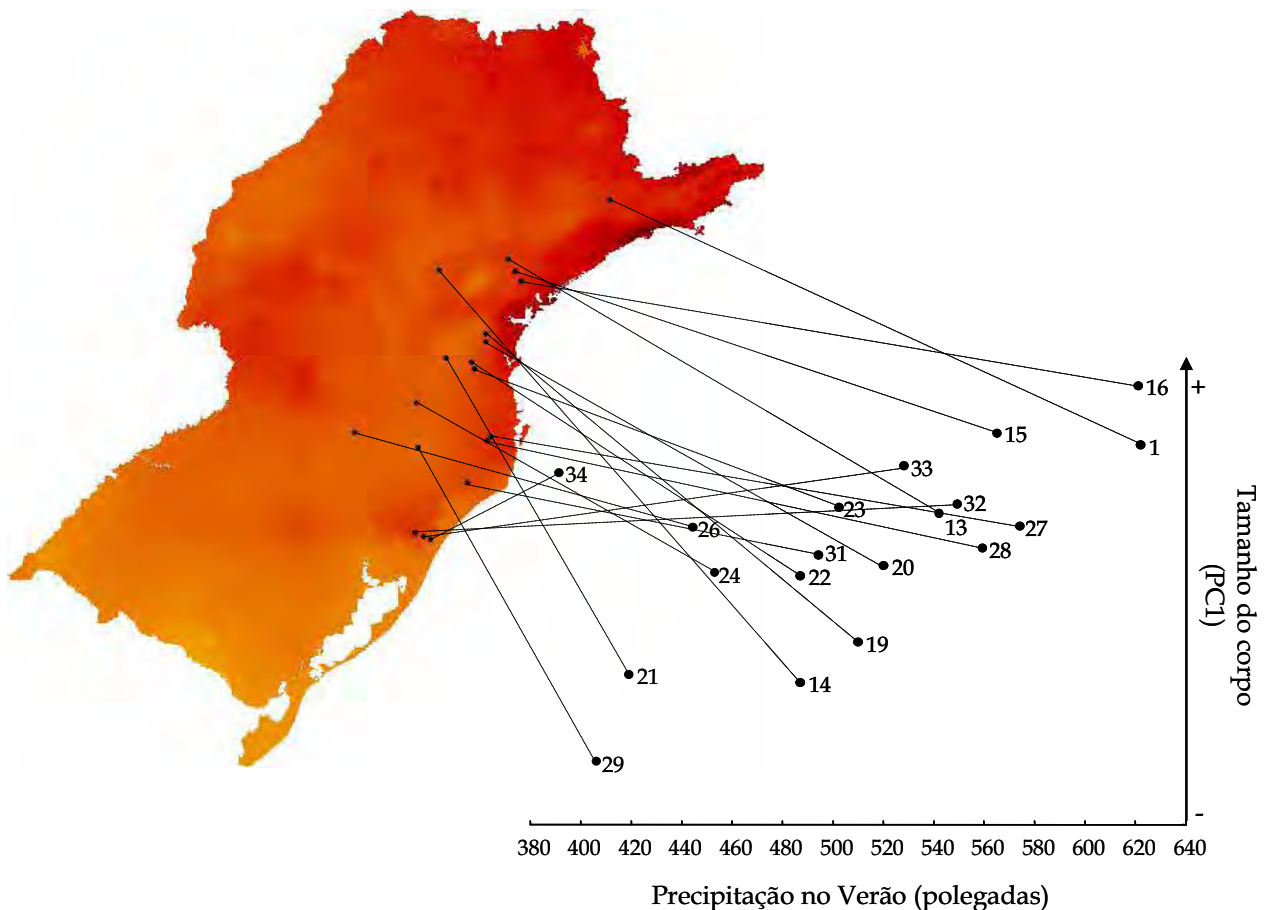


Figura 6. Associação entre Comprimento Rostro-Cloacal e precipitação no verão em 19 populações de *H. bischoffi*. Cores mais escuras representam maiores índices de precipitação.

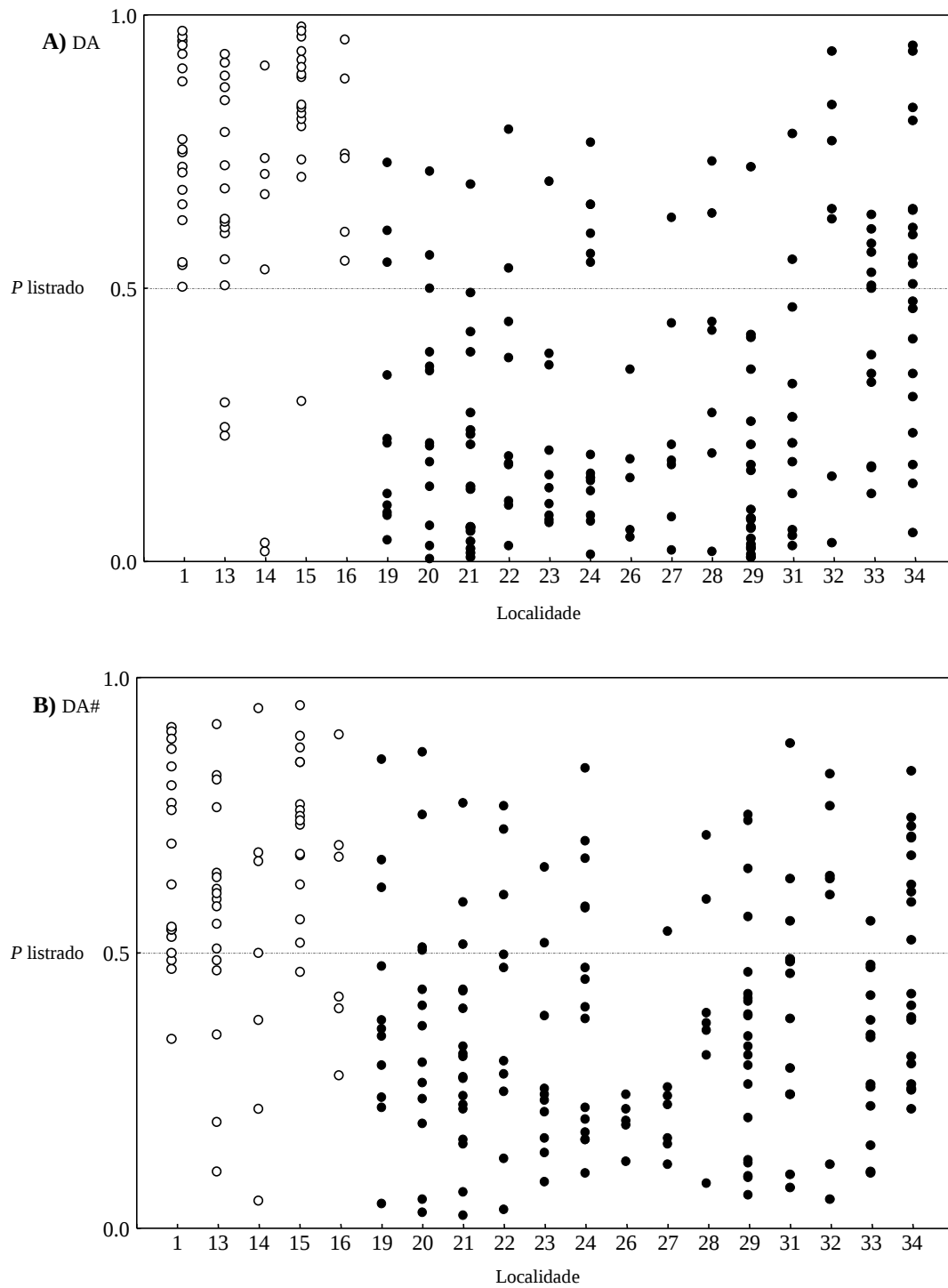


Figura 7. Probabilidade posterior da classificação de cada indivíduo ao grupo de padrão de coloração, a partir da Análise Discriminante dos dados morfométricos brutos (A) e ajustados (B), em 19 populações de *H. bischoffi*. Pontos abertos e sólidos representam indivíduos listrados e não listrados, respectivamente.

A confirmação de que duas formas geográficas existem para *H. bischoffi* não é suficiente para inferir que os dois grupos representam linhagens evolutivas distintas e, talvez, espécies distintas. Informações filogeográficas serão necessárias para examinar essa questão, especificamente testando se os dois grupos fenotípicos são linhagens genéticas distintas. Como os traços morfológicos são produtos tanto da genética quanto do ambiente, é relevante, de uma perspectiva evolutiva, determinar se a variação morfológica reflete isolamento histórico ou adaptação com fluxo gênico recorrente (e.g. ALEXANDRINO et al., 2005). Diferenciação decorrente de isolamento histórico de populações provavelmente resulta em padrões paralelos em caracteres de diferentes naturezas (e.g. genéticos e morfológicos), enquanto adaptação a gradientes de seleção não vai necessariamente gerar o mesmo padrão (veja também BELLIDO et al. 2002). Nossos resultados também mostram que há um efeito ambiental no tamanho do corpo que não é associado geograficamente à existência de dois grupos fenotípicos em *H. bischoffi*. Se os dois grupos de padrão de coloração forem linhagens evolutivas, a associação positiva entre tamanho do corpo com precipitação no verão nesse anuro poderia sugerir que a disponibilidade de água estaria tanto dirigindo a seleção sobre o tamanho ou atuando indiretamente, afetando a disponibilidade de recursos (e.g. alimento) e metabolismo em populações locais de *H. bischoffi*.

A zona de transição entre as formas listradas e não listradas, localizadas entre São Paulo e Paraná, é coincidente com transições entre espécies morfológicas nos complexos de espécies de anuros *Phyllomedusa burmeisteri* (POMBAL E HADDAD, 1992) e *Rhinella crucifer* (BALDISSERA et al., 2004; nome genérico usado após Chaparro et al., 2007) e com uma quebra filogeográfica antiga entre linhagens mitocondriais distintas da cobra *Bothrops jararaca* (GRAZZIOTIN et al., 2006). Tais padrões concordantes sugerem uma origem comum para os padrões de diferenciação geográfica em grupos de organismos distintos, que podem estar associadas com barreiras históricas (e.g., rios, montanhas) ou flutuações demográficas associadas com os ciclos de alterações climáticas do Terciário e Quaternário. Informações genéticas e morfológicas, em uma variedade de organismos, será necessária para esclarecer tais hipóteses, continuando a desvendar as origens da extraordinária diversidade biológica da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, J., N. FERRAND, AND J. W. ARNTZEN. *Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela).* **Contributions to Zoology**, v. 74, n. 3/4, p. 213–222. 2005.
- ARNTZEN, J. W., D. S. J. GROENENBERG, J. ALEXANDRINO, N. FERRAND, AND F. SEQUEIRA. *Geographical variation in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 and the description of a newly recognized subspecies.* **Journal of Natural History**, v. 41, p. 925–936. 2007.
- BALDISSERA, F. A., U. CARAMASCHI, AND C. F. B. HADDAD. *Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae).* **Arquivos do Museu Nacional**, v. 62, p. 255–282. 2004.
- BELLIDO, A., L. MADEC, J-F. ARNAUD, AND A. GUILLER. *Spatial structure of shell polychromatism in populations of *Cepaea nemoralis*: new techniques for an old debate.* **Heredity**, v. 88, p. 75–82. 2002.
- BENÍTEZ-DIAZ, H. *Geographic variation in coloration and morphology of the acorn woodpecker.* **Condor**, v. 95, p. 63–71. 1993.
- CHAPARRO, C. J., J. B. PRAMUK, AND A. G. GLUESENKAMP. *A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru.* **Herpetologica** v. 63, p. 203–212. 2007.
- DUELLMAN, W. E. **The Hylid Frogs of Middle America.** Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence. 1970.
- GRAZZIOTIN, F. G., M. MONZEL, S. ECHEVERRIGARAY, AND S. L. BONATTO. *Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest.* **Molecular Ecology** v. 15, p. 3969–3982. 2006.
- HADDAD, C. F. B., AND I. SAZIMA. Anfíbios Anuros da Serra do Japi. In Morellato, P. C. ed. **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil.** Campinas-SP. Editora UNICAMP/FAPESP. 1992. p. 188–211.
- HEYER, W. R., A. S. RAND, C. A. G. CRUZ, O. L. PEIXOTO, AND C. NELSON. **Frogs of Boracéia.** Arquivos de Zoologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v. 31, n. 4, p. 1–410. 1990.
- HIJMANS, R. J., S. E. CAMERON, J. L. PARRA, P. G. JONES, AND A. JARVIS. *Very high resolution 230 interpolated climate surfaces for global land areas.* **International Journal of Climatology**, v. 25, p. 1965–1978. 2005.

LUTZ, A., AND B. LUTZ. **New Hylidae from Brazil**. In *anais da academia brasileira de ciências*. 1939. v. 9, n. 1, p. 72–86.

LUTZ, B. **Brazilian species of *Hyla***. University of Texas Press. Austin and London. 1973.

MANLY, B. F. J. **RT, a Program for Randomization Testing, Version 2.0**. Centre for Applications of Statistics and Mathematics, University of Otago, New Zealand. 1996.

POMBAL JR., J. P., AND C. F. B. HADDAD. *Espécies de Phyllomedusa do grupo burmeisteri do Brasil Oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae)*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 217–229. 1992.

PUERTO, G., M. G. SALOMÃO, R. D. G. THEAKSTON, R. S. THORPE, D. A. WARRELL, AND W. WÜSTER. *Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae)*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, p. 527–538. 2001.

SCHLUTER, D. **The ecology of adaptive radiation**. Oxford University Press, New York. 2000.

STATSOFT, INC. **STATISTICA** (data analysis software system), v. 6. 2003. Disponível em: <www.statsoft.com>.

ANEXO I

Artigo Publicado no Periódico *Journal of Herpetology*

SHORTER COMMUNICATIONS

Journal of Herpetology, Vol. 43, No. 2, pp. 351–361, 2009
Copyright 2009 Society for the Study of Amphibians and Reptiles

Geographic Distribution and Morphological Variation of Striped and Nonstriped Populations of the Brazilian Atlantic Forest Treefrog *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae)

VANESSA R. MARCELINO, CÉLIO F. B. HADDAD, AND JOÃO ALEXANDRINO¹

Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 13506-900 Rio Claro, São Paulo, Brazil

ABSTRACT.—The treefrog *Hypsiboas bischoffi* is endemic to southern and southeastern Brazil occurring in submontane and montane areas of the Brazilian Atlantic Forest. Here, we focus on geographic variation in morphological traits of *H. bischoffi* by analyzing the distribution of two distinct color pattern forms (striped and nonstriped) to examine the hypothesis that color pattern is polymorphic within populations throughout its range. We additionally describe variation in several morphometric traits and examine their association with either color pattern or environmental gradients across the range. Our results show that the two color pattern forms are parapatric, with the striped and nonstriped forms occurring in the northern and southern parts of the species range, respectively. The two forms were not observed to co-occur, but nonstriped individuals appeared to present somewhat intermediate color patterns near the putative contact zone between the two forms. Multivariate analysis of morphometric variation showed that variation in body size explains most of the observed variation, but neither body size nor further morphometric variation was associated with color pattern or geographic distance between populations. Body size appeared instead to be associated with local levels of summer precipitation. The geographic differentiation pattern in *H. bischoffi* is apparently concordant with those observed for a few other codistributed organisms in the Brazilian Atlantic Forest.

Uncovering geographic patterns of phenotypic variation is one approach to examining population or species diversification. Studies of geographic variation can generate hypotheses about adaptation to different habitats, historical separation, and ecological isolation (e.g., Benítez-Díaz, 1993; Puerto et al., 2001; Alexandrino et al., 2005; Arntzen et al., 2007). Such studies are uncommon in the Neotropics where describing new taxa and their phylogenetic relationships largely surpasses unveiling patterns of within-species geographic variation to understand the microevolutionary processes that promote diversification.

The treefrog *Hypsiboas bischoffi* (Boulenger, 1887) is endemic to the Brazilian Atlantic Forest, strictly inhabiting submontane to montane rain forest and semideciduous forest areas, with their known range extending from Rio Grande do Sul to northern São Paulo, in southern and southeastern Brazil. The taxonomy of *H. bischoffi* has been under review because of dorsal color pattern variation across its range. Individuals from northern localities (*Hypsiboas bischoffi multilineata*, Lutz, 1973), in the state of São Paulo, have multiple longitudinal stripes that are absent in frogs from southern localities (*H. b. bischoffi*, Lutz, 1973) from the state of Paraná to the state of Rio Grande do Sul. This variation has been interpreted either as variation in a monotypic species (*Hyla bischoffi*, Haddad and Sazima, 1992), between two distinct subspecies (*Hyla bischoffi multilineata* and *H. b. bischoffi*, Lutz, 1973) or between two distinct species (*Hyla multilineata* and *Hyla bischoffi*, Lutz and Lutz, 1939; Heyer et al., 1990).

Unfortunately, insufficient geographic and population sampling (e.g., four and one localities were sampled by Lutz, 1973, and Heyer et al., 1990, respectively) has prevented adequate examination of the alternative hypotheses of polymorphism within conspecific populations versus discreteness of geographic groups of populations with distinct dorsal patterns. Here, we examine these hypotheses by describing the population and geographic distribution of striped and nonstriped forms of *H. bischoffi* throughout its range. Additionally, we search for parallels in the geographic variation of a variety of characters describing the species' size and shape. We explicitly test whether observed morphological variation is associated with color pattern group, geographic distance between populations and environmental gradients in the southern Atlantic Forest of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Sampling.—Individual adult frogs were obtained from the CFBH amphibian collection at Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP)—Rio Claro, SP, Brazil, and additional field collecting trips. A total of 286 specimens from 34 distinct localities throughout the species range was examined (localities numbered from north to south; Fig. 1, Table 1, Appendix 1). Individuals were collected during the breeding season, from February 2005 to February 2007. Specimens were fixed in a 10% formalin solution for a week and then preserved in 70% ethyl alcohol. They were deposited in the CFBH collection with accession numbers given in Appendix 2. Most of the available specimens (269 of 286) were males collected during their breeding call behavior.

¹ Corresponding Author. E-mail: jalex@rc.unesp.br

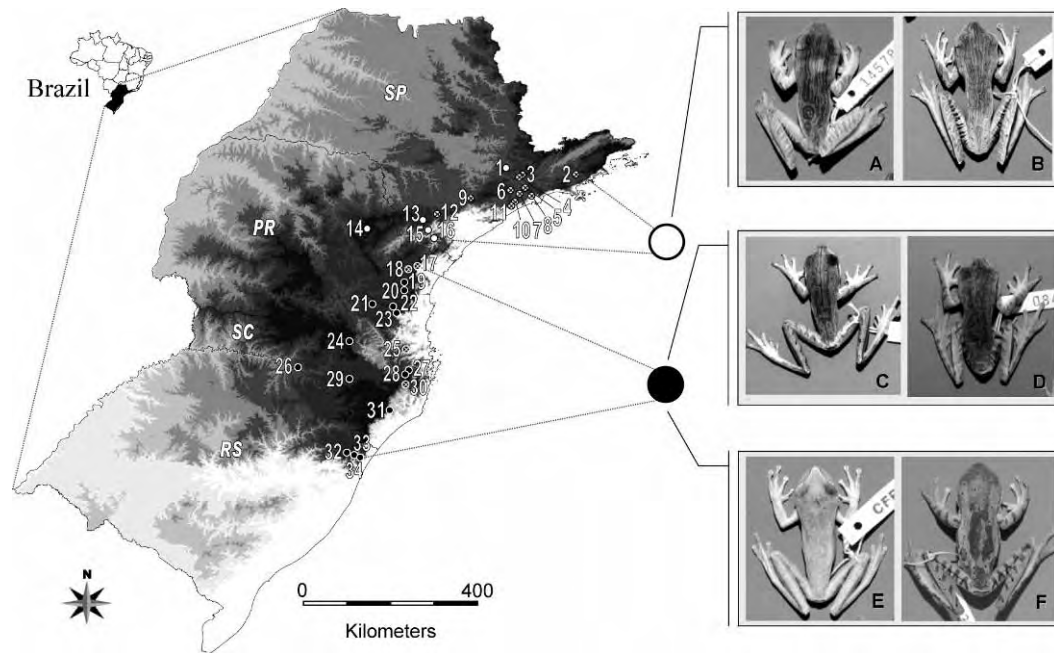


FIG. 1. Geographic distribution of *Hypsiboas bischoffi* in the southern Brazilian Atlantic Forest. Sampling localities are numbered from 1 to 34 along a north-south axis. White and black dots represent localities with striped and nonstriped individuals, respectively. Localities with sample size <5 are marked with a cross. On the right side are images representing distinct color patterns: (A–B) individuals with striped dorsal patterns from localities 10 and 15, in state of São Paulo (SP); (C–D) nonstriped individuals collected in locality 20, Paraná (PR), (E–F) nonstriped individuals collected in localities 26 and 28, Santa Catarina (SC).

Color Pattern Analysis.—The dorsal color pattern of each of the 286 *H. bischoffi* individuals was classified as belonging to one of two distinct categories: striped, with longitudinal stripes predominantly continuous (see Fig. 1A–B); and nonstriped, including disorganized striped patterns with few and interrupted stripes to completely solid light-grey, and sometimes blotched, dorsum (see Fig. 1C–F).

Populational Morphometric Analyses.—Only adult breeding male individuals were used given that there were too few female specimens available for analysis ($N = 17$). Seventeen morphometric measurements were taken from each adult male (Fig. 2): Measurements were taken to the nearest 0.01 mm with a digital calliper (Mitutoyo®) by one of the authors (VRM). Localities with sample size ≥ 5 were included in the population multivariate analyses ($N = 235$ individuals, from 19 localities; Fig. 1, Table 1). Morphometric data were log-transformed to reduce deviations from normality and distortion effects caused by allometric relationships. Population means were compared by multivariate analysis of variance (MANOVA). All measurements showed significant differences among populations (Wilks' lambda = 0.098, $P < 0.001$; univariate results all with $P < 0.001$). Subsequent morphometric analyses were performed by principal component analysis (PCA) with the software package Statistica v. 4.5 (StatSoft, 1993). Following confirmation that size explained most of the

observed variability (first axis explained approximately 68% of the variance, with all variables negatively correlated with the axis in the range of -0.58 to -0.96), the residuals of the regression of $\log(\text{character})$ against $\log(\text{SVL})$ were used, hereafter denoted by the symbol # linked to the variable name.

Morphological differentiation, expressed by pairwise euclidean distances between population means (both of scores of raw data PCA and of size adjusted PCA#) was tested against geographic distance (measured on 1:100,000 maps), environmental distance, and color pattern group membership (striped or nonstriped) by partial Mantel tests (RT 2.0; Manly, 1996), with 10,000 randomizations. Between-locality environmental distance was expressed by pairwise euclidean distances both for single variables and for scores along synthetic PCA axes for the following set of uncorrelated (Pearson $r < 0.70$) variables describing elevation and climate in the Brazilian Atlantic Forest (obtained from the bioclimatic database Worldclim, at a spatial resolution of 30 arc-sec; Hijmans et al., 2005): Altitude (Alt), Temperature Annual Range (TempAnnRge), Annual Precipitation (AnnPrec), and Precipitation of the Warmest Quarter (PrecWarmQt). We applied the Bonferroni correction to tests with the PCA and the PCA# data because the global null hypothesis of no association between morphological variation and the independent variables was being examined with multiple tests (P -level of $0.05/6 \approx$

TABLE 1. GPS coordinates for 34 sampled localities of *Hypsiboas bischoffi* (numbered along a north-south axis). Localities with sample size ≥ 5 are highlighted in bold.

Localities	Code	Longitude	Latitude
Jundiáí	1	-46.94395	-23.24967
Natividade da Serra, SP	2	-45.44190	-23.37560
Mairiporã, SP	3	-46.60860	-23.39860
Serra da Cantareira, SP	4	-46.65786	-23.42245
Santo André, SP	5	-46.53830	-23.66390
Itapecerica da Serra, SP	6	-46.84920	-23.71690
São Paulo, SP	7	-46.65242	-23.80865
Cubatão, SP	8	-46.39872	-23.84546
Pilar do Sul, SP	9	-47.69357	-23.89886
Curucutu, São Paulo, SP	10	-46.77446	-23.98822
Itanhaém, SP	11	-46.81837	-24.06059
Guapiara, SP	12	-48.44835	-24.23914
Ribeirão Branco, SP	13	-48.73861	-24.34500
Pirai do Sul, PR	14	-49.95739	-24.53918
Iporanga, SP	15	-48.62787	-24.57792
Barra do Turvo, SP	16	-48.50470	-24.75640
Morretes, PR	17	-48.87606	-25.36338
Piraquara, PR	18	-49.06330	-25.44170
São José dos Pinhais, PR	19	-49.14684	-25.72964
Tijucas do Sul, PR	20	-49.14826	-25.87041
Mafra, SC	21	-49.83327	-26.16793
São Bento do Sul, SC	22	-49.37860	-26.25030
Corupá, SC	23	-49.33680	-26.36455
Santa Cecília, SC	24	-50.35041	-26.99386
Botuverá, SC	25	-49.11480	-27.16404
Campos Novos, SC	26	-51.45786	-27.54602
Angelina, SC	27	-49.05056	-27.61675
Rancho Queimado, SC	28	-49.12464	-27.69843
Lages, SC	29	-50.34335	-27.80837
Anitápolis, SC.	30	-49.12169	-27.90849
Treviso, SC	31	-49.46888	-28.46893
São Francisco de Paula, RS	32	-50.38338	-29.39069
São Francisco de Paula II, RS	33	-50.23799	-29.46392
Itatí, RS	34	-50.10908	-29.51208

0.01). The Bonferroni correction was not used when testing specific hypotheses nested within the global null hypothesis (i.e., dependent variables such as SVL). To evaluate the a posteriori classification of individuals in each population to either the striped or the nonstriped group, Discriminant Analysis (DA) was performed on both log-transformed and size-adjusted (#) morphological measurements with Statistica/w 4.5 (StatSoft, 1993).

RESULTS

Striped color patterns of *Hypsiboas bischoffi* (Figs. 1A–B) were found exclusively at localities 1–16, in São Paulo state (SP) and northern Paraná (PR), whereas nonstriped color patterns (Figs. 1C–F) were observed in populations to the south of São Paulo (localities 17–34; Fig. 1). Striped and nonstriped individuals were not observed to co-occur at any of the sampled localities.

The PCA from raw data resulted in two main PCA axes that explained approximately 68% and 7% of the total variance, respectively (Table 2). The factor score means of 19 populations are represented along the first and second axes of PCA (Fig. 3A). PCA with the size-adjusted data yielded a first axis explaining

TABLE 2. Factor loadings for the first and second Principal Components axes for 17 morphometric measurements in 19 populations of *Hypsiboas bischoffi*.

Variables	PC1	PC2
Snout-vent length (SVL)	-0.954	0.030
Head length (HL)	-0.875	-0.271
Head width (HW)	-0.899	-0.003
Snout length (SL)	-0.861	0.164
Internasal distance (ND)	-0.579	-0.649
Interorbital distance (IOD)	-0.871	0.074
Eye diameter (ED)	-0.731	-0.461
Snout-eye distance (SED)	-0.742	0.328
Tympanum diameter (TD)	-0.579	-0.327
Forelimb length (FLL)	-0.708	0.231
Forearm length (FAL)	-0.945	-0.057
Third finger length (TFL)	-0.861	0.255
Axilla-groin length (AGL)	-0.744	0.147
Thigh length (TL)	-0.937	-0.005
Shank length (SL)	-0.857	-0.061
Foot length (FL)	-0.964	-0.010
Fourth toe length (FTL)	-0.823	0.356
Variance explained (%)	68.526	7.240
Cumulative variance (%)	68.526	75.766

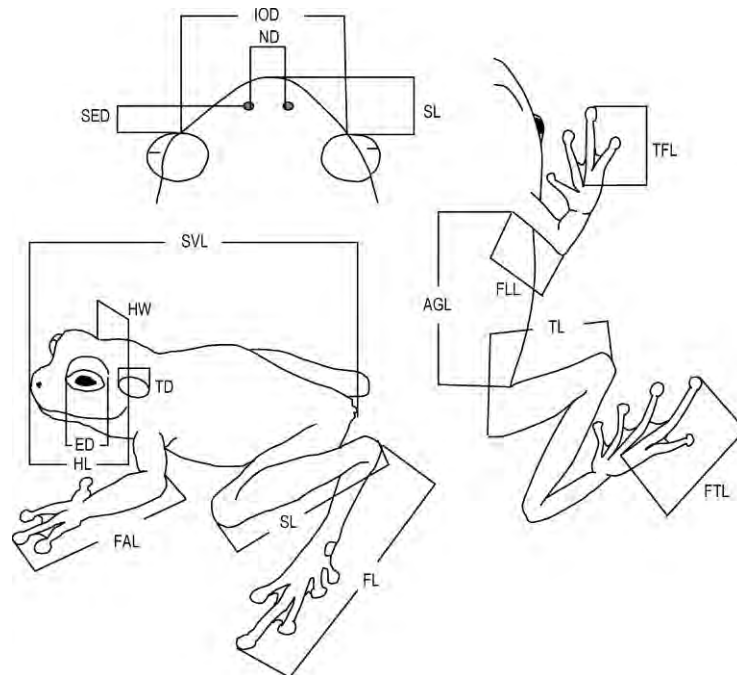


FIG. 2. Seventeen morphometric measurements taken in individuals of *Hypsiboas bischoffi*: snout-vent length (SVL); head length (HL); head width (HW); snout length (SL); internasal distance (ND); interorbital distance (IOD); eye diameter (ED); snout-eye distance (SED); tympanum diameter (TD); forelimb length (FLL); forearm length (FAL); third finger length (TFL); axilla-groin length (AGL); thigh length (TL); shank length (SL); foot length (FL); fourth toe length (FTL). Redrawn from Duellman (1970).

approximately 26% of the total variance. The first four PCA axes explained 59% of the total variance (Table 3). The factor score means of 19 populations are represented along the first and second axes of PCA (Fig. 3B). The individual factor scores from PCA with raw and size-adjusted data are represented in Figure 4.

Morphometrical PCA based distances among populations were not associated with group membership, geographic distance, Altitude, AnnTempRge, AnnPrec and PrecWarmQt, with the exception of PC1 ($\approx$ SVL) and SVL that were significantly associated with PrecWarmQt ($P < 0.0001$; Table 4, Fig. 5).

Correct classification of individuals in either color pattern group, following DA with raw and size-adjusted data was 79.5% and 75.0%, respectively (Fig. 6).

DISCUSSION

Morphological analyses of *H. bischoffi* populations across its whole range showed the existence of two geographic forms of *H. bischoffi*: the striped form is distributed in São Paulo and northern Paraná; and the nonstriped form is distributed to the south, across the states of Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul (Fig. 1). Although the transition between forms appears to be sharp (i.e., striped and nonstriped patterns were not observed syntopically), nonstriped individuals from localities near the transition zone are somewhat intermediate (patterns in Fig. 1C–D, from

localities 17–20), suggesting that an intergradation zone exists between the two extreme forms (patterns in Fig. 1A–B, E–F).

The discrete two-form geographic variation in color pattern was not followed by a similar geographic pattern of morphometric variation in *H. bischoffi* (Table 4). Despite morphometric differences that can be observed among populations, especially body size, the existence of a geographic pattern of morphometric variation was not apparent from the data (Figs. 3, 4, 6). The largest and the smallest individuals of *H. bischoffi* tended to be striped and nonstriped (a trend previously noted by Lutz, 1973), respectively, but the distributions of individual size values appeared largely overlapping between the two color pattern groups (Fig. 4). Additionally, nonstriped individuals at southernmost localities (32–34) were on average the largest in their group (Fig. 3), explaining the high proportion of these individuals that were classified by DA in the striped group (Fig. 6) and not supporting the existence of a geographic cline in body size. Body-size variation appeared instead to follow environmental gradients of summer precipitation (Fig. 5). This pattern of body-size variation is dissimilar to that reported in the only other comparable anuran study in the Brazilian Atlantic Forest, where a geographic series of five species of the *Rhinella crucifer* group showed a north-south trend of decreasing body size (Baldissera et al., 2004).

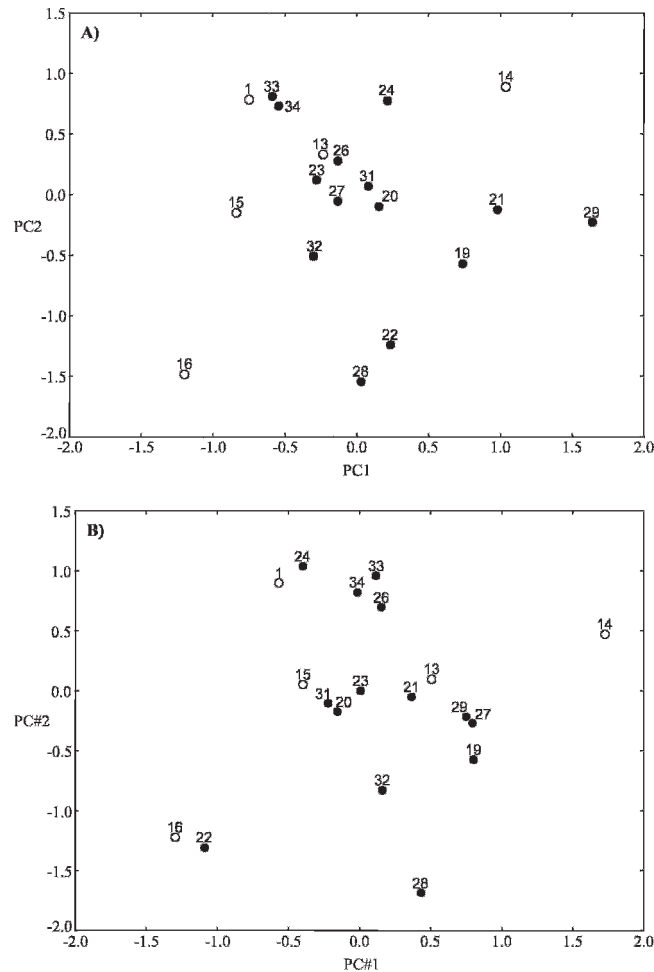


FIG. 3. Factor score means (centroids) for 19 populations of *Hypsiboas bischoffi* on the first two axes from (A) PCA with raw data and (B) PCA with size adjusted data (see text for details). The populations are represented by numbers along a north to south axis. Open and solid dots represent the striped and the nonstriped group populations, respectively.

The confirmation that two geographic forms exist within *H. bischoffi* is not sufficient to infer that the two morphological groups represent distinct evolutionary lineages and perhaps distinct species. Phylogeographic data will be needed to examine this question, specifically testing whether the two phenotypic groups are distinct genetic lineages. Because morphological traits are products of both genetics and the environment (e.g., Schluter, 2000), it is relevant, from an evolutionary perspective, to determine whether morphological variation reflects historical isolation or local adaptation despite recurrent gene flow (e.g., Alexandrino et al., 2005). Differentiation arising from historical isolation of populations will likely generate parallel patterns across characters of different nature (e.g., genetics and morphology), whereas adaptation across environmental selection gradients will not, or not necessarily so (see also Bellido et al., 2002). Our results also showed that there is an environmental effect on body size that is

geographically not associated to the existence of two phenotypic groups within *H. bischoffi*. If the two color pattern groups were distinct evolutionary lineages, the positive association of body size with summer precipitation in this anuran would suggest that water availability could be either driving selection upon size or acting inductively by affecting resource availability (e.g., food) and metabolism in local populations of *H. bischoffi*.

The transition zone between the striped and nonstriped forms, located between Paraná and São Paulo, is coincident with transitions between morphological species in the anuran complexes *Phyllomedusa burmeisteri* (Pombal and Haddad, 1992) and *Rhinella crucifer* (Baldiessa et al., 2004; generic name used after Chaparro et al., 2007) and with an ancient phylogeographic break between distinct mitochondrial lineages of the snake *Bothrops jararaca* (Grazziotin et al., 2006). These concordant patterns suggest a

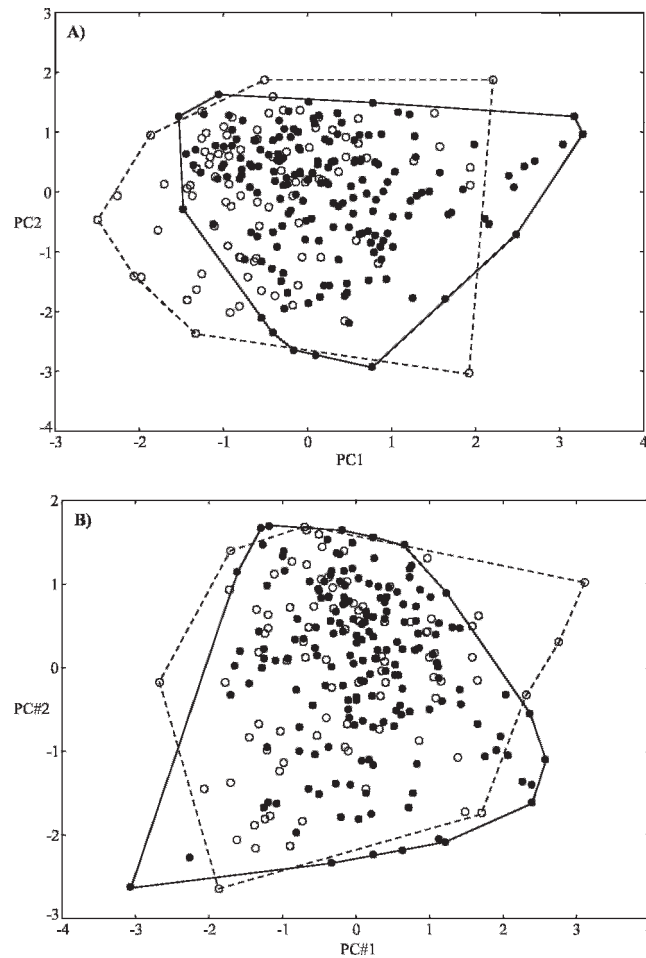


FIG. 4. Factor scores for individuals from 34 populations of *Hypsiboas bischoffi* on the first and second PCA axes from (A) PCA with raw data and (B) PCA with size adjusted data (see text for details). Open dots and dashed polygon lines represent striped individuals; solid dots and uninterrupted polygon lines represent nonstriped individuals.

TABLE 3. Factor loadings for the first four Principal Components axes for 16 size-adjusted (#) morphometric measurements in 19 populations of *Hypsiboas bischoffi*.

Variables	PC#1	PC#2	PC#3	PC#4
Head length (HL)	-0.545	-0.513	-0.231	0.138
Head width (HW)	-0.531	-0.008	-0.200	0.317
Snout length (SL)	-0.545	0.399	-0.470	0.093
Internasal distance (ND)	-0.391	-0.643	-0.097	0.059
Interorbital distance (IOD)	-0.597	0.247	-0.458	0.017
Eye diameter (ED)	-0.215	-0.639	-0.2119	-0.317
Snout-eye distance (SED)	-0.379	0.568	-0.470	-0.055
Tympanum diameter (TD)	-0.245	-0.256	-0.271	-0.710
Forelimb length (FLL)	-0.197	0.237	0.462	-0.411
Forearm length (FAL)	-0.728	-0.183	0.315	-0.081
Third finger length (TFL)	-0.548	0.483	0.102	-0.261
Axilla-groin length (AGL)	0.274	0.132	0.457	-0.062
Thigh length (TL)	-0.665	-0.079	0.373	0.029
Shank length (SL)	-0.528	-0.197	0.385	0.312
Foot length (FL)	-0.819	-0.076	0.351	0.023
Fourth toe length (FTL)	-0.394	0.590	0.257	-0.003
Variance explained (%)	25.786	15.215	11.760	6.791
Cumulative variance (%)	25.786	41.000	52.761	59.552

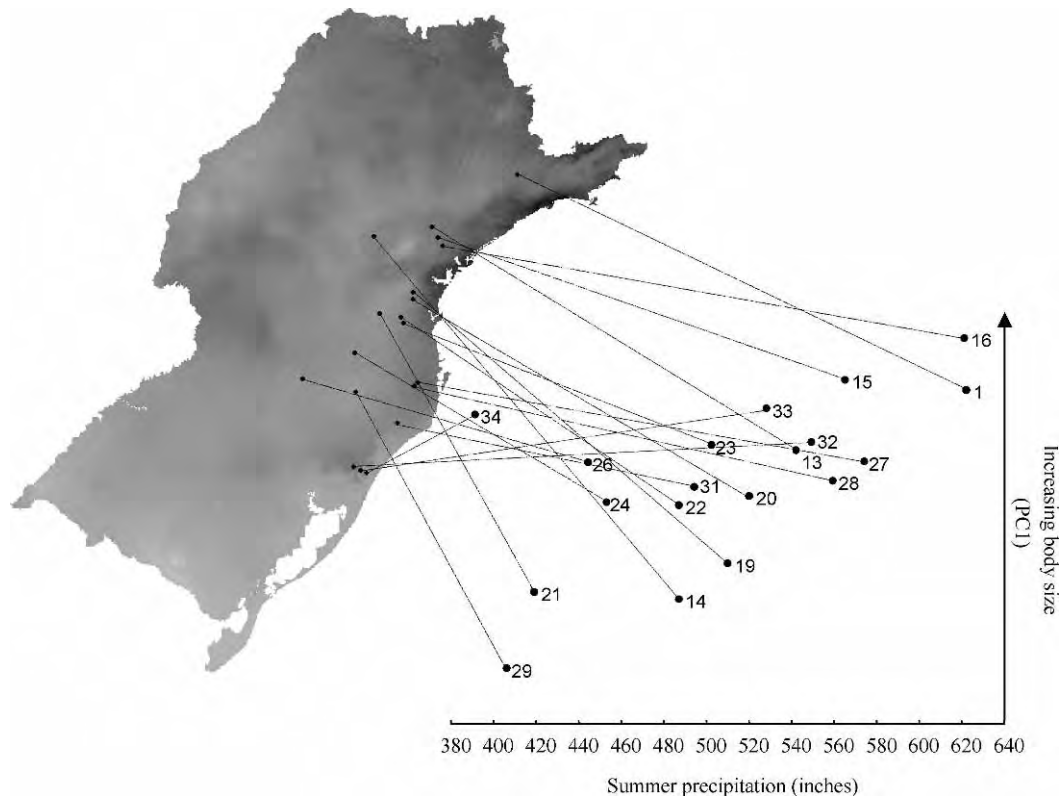


FIG. 5. Association between snout-vent length and summer precipitation in 19 populations of *Hypsiboas bischoffi*. Darker shading in the map represents higher precipitation values.

common origin for the geographic differentiation patterns in distinct groups of organisms that may be associated with historical barriers (e.g., rivers, mountains) or range fluctuations associated with cyclical climatic alterations of the Tertiary and Quaternary. Both phenotypic and genetic diversity data on a variety of organisms will be needed to address these general hypotheses while continuing to unveil the

origins of the extraordinary biological diversity of the Brazilian Atlantic Forest.

Acknowledgments.—We are grateful to A. C. Carnaval, A. P. Antunes, C. Brasileiro, C. P. A. Prado, G. Egito, J. G. Giovanelli, J. Z. P. Ramos, K. Zamudio, L. F. Toledo, L. O. M. Giasson, M. Guimarães, O. G. S. Araújo, and all that helped with the field trips and

TABLE 4. Partial Mantel test results for association between morphological differentiation across populations of *Hypsiboas bischoffi* versus group membership, geographic distance, and four environmental distance variables (see text for details). Dependent variables are the first two axes from PCA, the first four axes from size-adjusted PCA# and snout-vent length. The Bonferroni correction was applied to six tests with PCA data (significant result if $P < 0.01$) but not to the test with SVL. Partial correlation values are given where significant (* = $P < 0.0001$; ns = not significant).

Dependent variable	Explanatory variables					
	Group membership	Geographic distance	Altitude	TempAnnRge	AnnPrec	PrecWarmQt
PC1	ns	ns	ns	ns	ns	0.30*
PC2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC#4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SVL	ns	ns	ns	ns	ns	0.32*

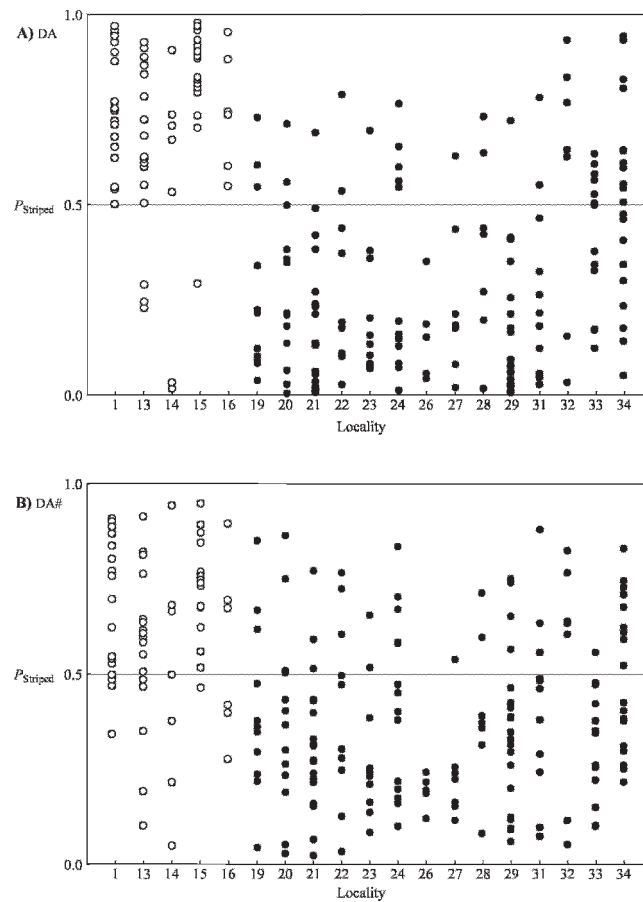


FIG. 6. The a posteriori probability of classification of each individual to the striped color pattern group, from Discriminant Analysis of raw (A) and size adjusted (B) morphometric variables in 19 populations of *Hypsiboas bischoffi*. Open and solid dots represent striped and nonstriped individuals, respectively.

collecting work. Collecting permits were provided by IBAMA to JA (IBAMA/RAN 0100/06). This work was supported by the FAPESP Research Grants proc. 05/52727-5 to JA, and CNPq and FAPESP proc. 01/13341-3 and 08/50928-1 research grants to CFBH. VRM and JA were supported by FAPESP scholarships, respectively, procs. 06/52398-4 and 06/56938-3. JA was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PRAXIS XXI/BD/5917/95).

LITERATURE CITED

- ALEXANDRINO, J., N. FERRAND, AND J. W. ARNTZEN. 2005. Morphological variation in two genetically distinct groups of the Golden Striped Salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Contributions to Zoology* 74:213–222.
- ARNTZEN, J. W., D. S. J. GROENENBERG, J. ALEXANDRINO, N. FERRAND, AND F. SEQUEIRA. 2007. Geographical variation in the Golden Striped Salamander, *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864 and the description of a newly recognized subspecies. *Journal of Natural History* 41:925–936.
- BALDISSERA, F. A., U. CARAMASCHI, AND C. F. B. HADDAD. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Arquivos do Museu Nacional* 62:255–282.
- BELLIDO, A., L. MADEC, J.-F. ARNAUD, AND A. GUILLER. 2002. Spatial structure of shell polychromatism in populations of *Cepaea nemoralis*: new techniques for an old debate. *Heredity* 88:75–82.
- BENÍTEZ-DÍAZ, H. 1993. Geographic variation in coloration and morphology of the acorn woodpecker. *Condor* 95:63–71.
- BOULENGER, G. A. 1887. Descriptions of new or little-known South American frogs of the genera *Paludicola* and *Hyla*. *Annals and Magazine of Natural History* 20:295–300.
- CHAPARRO, C. J., J. B. PRAMUK, AND A. G. GLUESENKAMP. 2007. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica* 63:203–212.
- DUELLMAN, W. E. 1970. The Hylid Frogs of Middle America. Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence.

- GRAZZIOTIN, F. G., M. MONZEL, S. ECHEVERRIGARAY, AND S. L. BONATTO. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15:3969–3982.
- HADDAD, C. F. B., AND I. SAZIMA. 1992. Anfíbios Anuros da Serra do Japi. In P. C. Morellato (ed.), *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*, pp. 188–211. Editora da UNICAMP/FAPESP, Campinas-São Paulo, Brazil.
- HEYER, W. R., A. S. RAND, C. A. G. CRUZ, O. L. PEIXOTO, AND C. NELSON. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* 31:1–410.
- HIJMAN, R. J., S. E. CAMERON, J. L. PARRA, P. G. JONES, AND A. JARVIS. 2005. Very high resolution 230 interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965–1978.
- LUTZ, A., AND B. LUTZ. 1939. New Hylidae from Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 9:72–86.
- LUTZ, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. University of Texas Press, Austin.
- MANLY, B. F. J. 1996. *RT*, a Program for Randomization Testing, Version 2.0. Centre for Applications of Statistics and Mathematics, University of Otago, New Zealand.
- POMBAL, J. P., JR., AND C. F. B. HADDAD. 1992. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil Oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 52:217–229.
- PUERTO, G., M. G. SALOMÃO, R. D. G. THEAKSTON, R. S. THORPE, D. A. WARRELL, AND W. WÜSTER. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology* 14:527–538.
- SCHLUTER, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, New York.
- STATSOFT, INC. 1993. *STATISTICA for Windows*, version 4.5. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.

Accepted: 30 September 2008.

APPENDIX 1. Sample size (N), mean, and standard deviation (in parenthesis) for 17 morphometric measurements taken in 19 populations of *Hypsiboas bischoffi*. For character codes, see Table 2; for localities, see Table 1 and Figure 1.

Locality	N	SVL	HL	HW	SL	ND	OD	ED	SED	TD	FLL	FAL	TFL	AGL	TL	SL	HFL	FTL	Color pattern
1	18	40.83 (2.09)	12.35 (0.72)	12.79 (0.70)	6.49 (0.35)	2.12 (0.19)	8.02 (0.40)	4.29 (0.42)	4.37 (0.26)	2.22 (0.17)	8.05 (0.88)	19.92 (0.95)	9.83 (0.67)	24.66 (1.41)	20.91 (1.16)	21.26 (1.20)	30.58 (1.45)	14.24 (0.85)	Striped
13	17	40.35 (2.61)	11.59 (0.77)	12.29 (0.82)	5.86 (0.38)	2.03 (0.22)	7.47 (0.49)	4.39 (0.34)	3.79 (0.30)	2.09 (0.21)	7.79 (0.60)	19.54 (1.36)	9.09 (0.82)	24.53 (1.91)	20.44 (1.30)	21.12 (1.47)	29.77 (1.23)	13.70 (1.23)	Striped
14	7	37.64 (2.29)	10.56 (0.98)	11.11 (0.65)	5.38 (0.52)	1.64 (0.21)	6.71 (0.69)	3.91 (0.47)	3.51 (0.43)	1.97 (0.28)	7.06 (0.50)	17.77 (1.25)	8.02 (1.05)	22.99 (1.48)	18.56 (1.34)	18.63 (1.21)	26.56 (1.96)	12.10 (0.86)	Striped
15	16	41.44 (1.56)	12.41 (0.69)	12.96 (0.75)	6.45 (0.41)	2.25 (0.21)	8.27 (0.47)	4.68 (0.33)	4.30 (0.29)	2.30 (0.21)	7.46 (0.70)	20.09 (1.20)	9.52 (0.69)	23.72 (1.41)	21.24 (1.51)	21.60 (1.44)	30.95 (1.80)	14.23 (1.15)	Striped
16	6	41.57 (1.27)	13.03 (0.58)	12.81 (0.88)	6.28 (0.12)	2.65 (0.25)	8.11 (0.29)	5.18 (0.40)	4.17 (0.19)	2.50 (0.24)	7.49 (0.39)	21.15 (1.19)	9.60 (0.59)	24.35 (2.09)	22.09 (1.31)	22.67 (1.30)	32.14 (1.93)	14.77 (1.01)	Striped
19	11	37.59 (1.58)	10.92 (0.48)	11.23 (0.57)	5.47 (0.26)	2.05 (0.16)	6.72 (0.28)	4.25 (0.25)	3.71 (0.25)	2.11 (0.16)	6.52 (0.28)	18.00 (0.71)	8.06 (0.30)	22.82 (1.50)	18.60 (1.44)	19.56 (1.33)	27.40 (2.28)	11.95 (1.10)	Nonstriped
20	13	38.29 (2.08)	11.35 (0.66)	11.92 (0.76)	5.59 (0.31)	2.04 (0.22)	6.95 (0.54)	4.49 (0.38)	3.73 (0.37)	2.16 (0.31)	7.54 (0.67)	18.84 (1.56)	8.95 (0.64)	23.74 (1.44)	19.48 (1.30)	20.08 (1.33)	28.97 (2.28)	13.31 (1.10)	Nonstriped
21	18	36.56 (2.12)	10.49 (0.73)	11.03 (0.69)	5.57 (0.28)	1.86 (0.22)	6.75 (0.37)	3.99 (0.30)	3.55 (0.26)	2.24 (0.18)	6.87 (0.69)	17.69 (0.83)	8.04 (0.66)	21.74 (1.33)	18.43 (1.19)	19.05 (0.95)	26.71 (1.33)	11.61 (0.81)	Nonstriped
22	10	37.61 (2.24)	11.82 (0.59)	11.59 (0.73)	5.48 (0.44)	2.15 (0.29)	7.05 (0.54)	4.48 (0.29)	3.47 (0.25)	2.35 (0.23)	7.28 (0.89)	19.24 (1.07)	8.77 (0.58)	21.42 (1.79)	19.69 (1.13)	20.82 (1.16)	29.16 (1.89)	12.57 (1.91)	Nonstriped
23	10	39.99 (2.06)	11.60 (0.43)	11.95 (0.55)	5.77 (0.34)	2.03 (0.16)	7.25 (0.30)	4.45 (0.23)	3.76 (0.28)	2.27 (0.18)	7.85 (0.55)	19.29 (0.78)	9.25 (0.47)	23.63 (1.92)	20.91 (1.09)	21.51 (1.23)	30.14 (1.73)	14.40 (0.98)	Nonstriped
24	15	37.94 (1.31)	10.95 (0.67)	11.56 (0.73)	5.85 (0.29)	1.82 (0.09)	7.44 (0.33)	4.30 (0.24)	4.12 (0.30)	2.28 (0.22)	7.45 (0.54)	18.44 (0.77)	9.21 (0.45)	22.41 (1.14)	19.49 (0.70)	19.18 (2.50)	28.34 (1.28)	13.45 (0.71)	Nonstriped
26	5	39.77 (2.27)	10.97 (1.06)	12.16 (0.86)	6.13 (0.41)	2.11 (0.32)	7.42 (0.37)	4.26 (0.26)	4.15 (0.12)	2.34 (0.10)	7.17 (0.91)	18.71 (1.31)	9.35 (0.64)	22.27 (1.03)	20.36 (1.50)	20.76 (1.56)	29.21 (2.52)	13.90 (1.13)	Nonstriped
27	7	40.13 (2.39)	11.36 (0.91)	11.80 (0.94)	5.69 (0.43)	2.03 (0.32)	7.19 (0.51)	4.48 (0.43)	3.70 (0.35)	2.28 (0.21)	7.88 (0.68)	19.32 (1.31)	8.99 (0.65)	25.03 (2.33)	20.26 (1.61)	21.02 (1.40)	29.84 (1.83)	13.23 (0.78)	Nonstriped
28	7	39.45 (1.27)	12.03 (0.69)	12.12 (0.66)	5.65 (0.38)	2.39 (0.38)	6.94 (0.46)	4.63 (0.18)	3.54 (0.35)	2.20 (0.22)	6.94 (0.36)	19.15 (0.81)	8.58 (0.66)	23.73 (1.49)	20.04 (1.06)	20.89 (0.93)	29.40 (1.32)	12.18 (0.66)	Nonstriped
29	21	35.02 (3.30)	9.95 (1.22)	10.42 (1.12)	5.02 (0.36)	1.85 (0.27)	6.38 (0.64)	3.92 (0.56)	3.37 (0.30)	2.07 (0.28)	6.47 (0.71)	16.92 (1.52)	7.61 (0.68)	21.87 (2.28)	17.61 (1.58)	17.80 (1.59)	25.46 (2.49)	11.06 (0.89)	Nonstriped
31	13	38.80 (1.63)	11.35 (0.69)	11.82 (0.59)	5.69 (0.44)	2.00 (0.33)	7.11 (0.51)	4.32 (0.24)	3.66 (0.27)	2.15 (0.17)	7.53 (0.72)	18.78 (1.00)	8.94 (0.82)	22.66 (1.97)	20.55 (1.12)	21.22 (1.06)	29.36 (1.62)	13.59 (1.38)	Nonstriped
32	8	40.05 (1.20)	11.83 (0.90)	12.05 (0.59)	5.83 (0.32)	2.19 (0.33)	7.33 (0.33)	4.41 (0.22)	3.67 (0.26)	2.14 (0.22)	7.55 (0.68)	19.92 (0.62)	9.09 (0.50)	24.68 (1.62)	20.69 (0.80)	21.34 (0.86)	30.28 (1.21)	13.12 (1.04)	Nonstriped
33	13	41.01 (1.36)	11.32 (0.51)	12.73 (0.64)	6.23 (0.21)	2.02 (0.15)	7.81 (0.32)	4.28 (0.20)	4.25 (0.26)	2.31 (0.14)	7.64 (0.69)	19.70 (0.79)	9.84 (0.57)	24.62 (0.67)	21.09 (0.87)	21.55 (0.79)	30.22 (1.46)	14.14 (0.93)	Nonstriped
34	20	40.74 (1.90)	11.71 (0.82)	12.21 (0.81)	6.30 (0.25)	1.97 (0.11)	7.86 (0.37)	4.40 (0.29)	4.31 (0.24)	2.28 (0.16)	7.63 (0.73)	19.48 (1.13)	9.50 (0.55)	24.20 (1.33)	20.87 (1.29)	21.50 (1.25)	30.38 (1.54)	14.23 (0.75)	Nonstriped

APPENDIX 2

Specimens of Hypsiboas bischoffi Examined

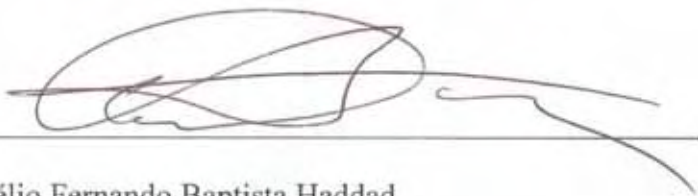
BRAZIL. RIO GRANDE DO SUL: Itatí (CFBH 14585–14587, 14592–14608); São Francisco de Paula (CFBH 3676–3683, 8537, 14539–14552). SANTA CATARINA: Treviso (CFBH 8489–8491, 8494, 10328–10329, 12400–12402, 12404–12407, 12413); Anitápolis (CFBH 9375); Lages (CFBH 8547–8550, 8555–8571); Rancho Queimado (CFBH 3355–3361); Angelina (CFBH 8472–8476, 8479–8480); Campos Novos (CFBH 13625, 14073–14076); Botuverá (CFBH 10957, 10959–10960, 10970); Santa Cecília (CFBH 14553–14567); Corupá (CFBH 12427–12430, 12446–12451); São Bento do Sul (CFBH 83–85, 3009–3011, 3013–3014, 4442, 10975–10976, 10986–10989);

Mafra (CFBH 8572–8590). PARANÁ: Tijucas do Sul (CFBH 8430–8443, 8601); São José dos Pinhais (CFBH 8447–8457); Piraquara (CFBH 11047, 11054); Morretes (CFBH 12411); Piraí do Sul (CFBH 8224–8230). SÃO PAULO: Barra do Turvo (CFBH 6339–6340, 6343–6345, 6347); Iporanga (CFBH 6302–6304, 6324–6325, 12096, 13863–13865, 14575–14583); Ribeirão Branco (CFBH 255–256, 1780, 2137, 6821–6823, 9578–9579, 11287–11297); Guapiara (CFBH 13458–13459); Itanhaém (CFBH 12207–12208, 12210); São Paulo (CFBH 9126–9127, 10133–10134, 11625); Pilar do Sul (CFBH 6213, 6216); Cubatão (CFBH 9225, 9242–9243); Itapeverica da Serra (CFBH 1010, 1498–1500); Santo André (CFBH 11627); Serra da Cantareira (CFBH 5689–5690); Mairiporã (CFBH 9505–9506); Natividade da Serra (CFBH 11636); Jundiá (CFBH 718, 802, 14429–14444, 14446–14447).



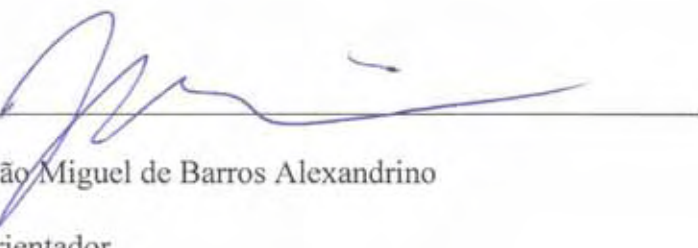
Vanessa Rossetto Marcelino

Aluna



Célio Fernando Baptista Haddad

Co-orientador



João Miguel de Barros Alexandrino

Orientador