



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**HISTÓRIA NATURAL DE PHYLLOMEDUSA AYEAYE (ANURA, HYLIDAE) NA
SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS**

MARÍLIA MERLI BORGES

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Zoologia)

Abril - 2015

597.8 Borges, Marília Merli
B732h História natural de Phyllomedusa ayeaye (Anura, Hylidae)
na Serra da Canastra, Minas Gerais / Marília Merli Borges. -
Rio Claro, 2015
63 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Cynthia Peralta de Almeida Prado

1. Anuro. 2. Herpetologia. 3. Reprodução. 4. Anfíbios. 5.
Bioacústica. I. Título.

MARÍLIA MERLI BORGES

História Natural de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura,
Hylidae) na Serra da Canastra, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientadora: Cynthia Peralta de Almeida Prado

Rio Claro

2015

MARÍLIA MERLI BORGES

História Natural de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura,
Hylidae) na Serra da Canastra, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Zoologia).

Comissão examinadora:

Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado (orientadora)

Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro

Dr. Délio Pontes Baêta da Costa

Rio Claro, 2 de abril de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo suporte, apoio, por acreditarem em mim e sempre me amarem e aceitarem meus defeitos. Especialmente agradeço ao meu pai Claudio, meu irmão Orlando e aos meus avós Irahí e José, por serem meu núcleo sempre. Também gostaria de agradecer à Kátia, pelas conversas e por muitas vezes me entender tão bem, e aos “tudinhos”, João e Luizinho, por serem meus “novos” irmãos e por saber que posso contar com eles.

Agradeço à minha orientadora Cynthia Prado, pela orientação, ensinamentos e paciência durante esse processo, e ao professor Célio Haddad, por ter aberto as portas do seu laboratório, onde sempre fui muito bem recebida. Também gostaria de agradecer, especialmente, ao Renato Nali, pela parceria e pelas inúmeras vezes em que me ajudou e corrigiu os meus textos, me deu dicas que foram de extrema importância para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço também às novas amigas, Cilene e Natália. Obrigada por sempre me receberem tão bem em Jaboticabal.

Agradeço a todos do laboratório de Herpetologia da UNESP de Rio Claro, especialmente ao Danilo (Jesus), por ter me ajudado desde a escrita do projeto até o final, e à todos que me ajudaram nos campos: Renato, Cilene, Luíza Cholak, Paulo (Callithrix), Délio Bâeta, João Galharde, Danilo (Jesus) e Bruno Piato.

Agradeço aos meus amigos, a família que escolhi em Rio Claro: Lídia (Brê), Luíza, Clara, Tainá, Rafael Borba (Mão), Carol (Baurú), Danilo (Jesus), Rafael (Fii), por estarem por perto desde a graduação, e às “Meninas de Minas”: Aline, Dri, Amanda (Doka), Bruna Rezende, Bruna Santine, Mari, Priscila e Stela por também serem meu porto seguro desde a infância. Agradeço ao meu namorado Guilherme Machado, pelo carinho, companhia e por tentar me ensinar a ser menos ansiosa (o que não é fácil).

Finalmente, agradeço ao CNPq, pela bolsa concedida, e à FAPESP, pelo apoio ao projeto e recursos, ao ICMBIO, pela autorização de coleta, e ao INMET, pela disponibilização dos dados meteorológicos da área de estudo.

*“Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim um atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.”
(Manoel de Barros)*

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract.....	7
Introdução Geral	8
Referências	11
Biologia reprodutiva de <i>Phyllomedusa ayeaye</i> (Hylidae, Phyllomedusinae) na Serra da Canastra, Minas Gerais.....	18
Resumo	19
Introdução	20
Material e Métodos	22
Resultados	26
Discussão	32
Referências.....	35
Apêndice: The advertisement and release calls of <i>Phyllomedusa ayeaye</i> (Anura: Hylidae), with comments on social context of emission	44
Abstract	47
Introduction.....	48
Materials e Methods.....	49
Results.....	50
Discussion	52
Acknowledgments.....	53
Literature cited	54
Considerações Finais	62

RESUMO

No Brasil, até hoje foram descritas 988 espécies de anfíbios anuros. O grupo dos anfíbios é um dos mais ameaçados atualmente, principalmente devido à perda e modificação de habitats e doenças. Este estudo sobre a história natural de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae) foi conduzido no Cerrado brasileiro, provavelmente a savana mais ameaçada do mundo. O riacho estudado está localizado na Serra da Canastra, Estado de Minas Gerais. Foram realizadas expedições mensais de outubro de 2013 à março de 2014 e foram incorporadas observações realizadas em dezembro de 2010, janeiro e fevereiro de 2011, abril à junho de 2011 e dezembro de 2014. *Phyllomedusa ayeaye* apresentou padrão reprodutivo intermediário entre explosivo e prolongado, amplexo do tipo axilar e modo reprodutivo típico do gênero. O número de machos cantando teve correlação positiva significativa com a temperatura do ar. Dos 41 machos amostrados, 14 foram recapturados entre uma e quatro vezes, totalizando 24 recapturas com um intervalo de tempo de até 13 meses e deslocamento máximo de 40 metros. Não houve diferença significativa no tamanho do corpo de machos capturados uma única vez e machos recapturados. Os machos cantaram sobre diversos substratos ao longo de um riacho temporário, principalmente sobre arbustos de *Leandra* sp. (Melastomataceae). As fêmeas foram significativamente maiores que os machos. As desovas foram encontradas em folhas dobradas de *Leandra* sp., contendo ovos amarelados e muitas cápsulas gelatinosas sem ovos. A média do N de ovos/desova foi de $29 \pm 2,38$ (N = 6) e a média do diâmetro dos ovos foi de $2,84 \pm 0,02$ mm (N = 109). O investimento reprodutivo (massa gônada/massa corpo*100) das fêmeas foi de $4,25 \pm 0,35\%$ (N = 3) e dos machos de $0,35 \pm 0,05\%$ (N = 14). Comportamentos agressivos incluindo de brigas e vocalizações foram registrados. Machos emitiram dois tipos de canto de anúncio, um canto simples, composto por uma sequência de notas curtas, e um canto composto, com uma sequência de notas curtas seguida de uma nota longa. Os cantos compostos foram emitidos quando a densidade de machos no local de reprodução foi maior. Sugerimos que a nota longa representa a parte agressiva do canto de anúncio misto. O canto de soltura também é composto por notas curtas, com maior variação de frequência e emitidos a uma taxa maior. A falta de informações sobre a história natural das espécies, como as aqui descritas, é o maior obstáculo na conservação da biodiversidade tropical.

Palavras chave: Phyllomedusinae, atividade reprodutiva, sítios reprodutivos, vocalização, Cerrado.

ABSTRACT

A total of 988 species of anuran amphibians are currently known for Brazil. Amphibians are among the most threatened groups nowadays, mostly due to loss and alteration of habitats and diseases. This study describes the natural history of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae) and was conducted in the Brazilian Cerrado, probably the most threatened savanna in the world. The studied stream is located in the Serra Canastra mountain range, Minas Gerais state. Field expeditions were conducted monthly from October 2013 to March 2014 and sporadic observations made in December 2010, January 2011, February 2011, April to June 2011, and December 2014 were considered here. Species' reproductive pattern was intermediate between explosive and prolonged, amplexus was axillary, and the species exhibited the reproductive mode typical for the genus. The number of males calling was significantly correlated with air temperature. From 41 males sampled, we recaptured 14 individuals from one to four times, totaling 24 recaptures in a time interval of 13 months and a maximum displacement of 40 meters. There was no significant difference in body size between males captured just once and recaptured males. Males called from a variety of calling substrates along a temporary stream, mainly from shrubs of *Leandra* sp. (Melastomataceae). Females were significantly larger than males. Clutches were found on folded leaves of *Leandra* sp., containing yellowish eggs with eggless gelatinous capsules. Mean eggs per clutch was 29 ± 2.38 ($N = 6$) and mean egg diameter was 2.84 ± 0.02 mm ($N = 109$). The reproductive investment (gonad mass/body mass*100) of females was $4.25 \pm 0.35\%$ ($N = 3$) and that of males was $0.16 \pm 0.05\%$ ($N = 14$). Aggressive behaviors including fights and aggressive calls were registered. Males emitted two types of advertisement calls: a simple call, composed by a sequence of short notes and a composite call, with a sequence of short notes followed by a long note. The composite calls were emitted at high male density. We suggest that the long note may represent the aggressive part of a mixed advertisement call. The release call is also composed by short notes, with a wider range of frequencies and emitted more rapidly. Lack of natural history information, such as those described here, represents the main problem for tropical biodiversity conservation.

Keywords: Phyllomedusinae, reproductive activity, reproductive sites, calling activity, Cerrado

INTRODUÇÃO GERAL

Até hoje foram descritas 7340 espécies de anfíbios no mundo, sendo 6449 anuros (Frost, 2014). A maior diversidade de anfíbios anuros é encontrada na região Neotropical (Duellman, 1988), onde apenas no Brasil são conhecidas 988 espécies de anuros, representando 19 famílias e 87 gêneros (Segalla *et al.*, 2014). Apesar desta grande diversidade, os anfíbios são atualmente um dos grupos animais mais ameaçados (Cushman, 2006). A perda e modificação de habitats, bem como doenças, estão entre as principais causas do declínio global de anfíbios (e.g. Cushman, 2006; Becker *et al.*, 2007; Skerratt *et al.*, 2007; Becker & Zamudio, 2011). A perda de habitats reduz a diversidade de anfíbios (Cushman, 2006; Becker & Zamudio, 2011), isola populações (Arens *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2007), aumenta a endogamia (Andersen *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2007) e interrompe o ciclo de vida dos anfíbios, quebrando os elos entre os habitats terrestres e aquáticos (Cushman, 2006; Becker *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2009; Becker & Zamudio, 2011). Além disso, perturbações na vegetação natural acarretam em mudanças na estrutura dos ecossistemas, alterando o clima (Costa & Foley, 1998; Becker & Zamudio, 2011) e os ciclos hidrológicos (Webb *et al.*, 2005; Becker & Zamudio, 2011), aumentando a susceptibilidade dos anfíbios a doenças (Patz *et al.*, 2000; Stuart *et al.*, 2004; Becker & Zamudio, 2011).

O Brasil possui dois dos 34 “hotspots” mundiais prioritários para a conservação biológica: o Cerrado e a Mata Atlântica (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2004). O Cerrado, onde este estudo foi realizado, é o segundo domínio morfoclimático em extensão, representando 23% do território nacional (Ratter *et al.*, 1997) e, provavelmente, a savana mais ameaçada do mundo (Ratter *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 2000; Silva & Bates, 2002; Klink & Machado, 2005). Uma das principais causas do desflorestamento no Cerrado é o desenvolvimento do agronegócio (Ratter *et al.*, 1997; Klink & Machado, 2005), porém, apenas uma pequena parcela da área deste domínio encontra-se protegida por Unidades de Conservação (Ratter *et al.*, 1997; Klink & Machado, 2005; Araújo & Almeida-Santos, 2011). Segundo Diniz-Filho *et al.* (2004), os esforços para a conservação dos anuros no Cerrado devem ser concentrados em pelo menos 10 diferentes regiões do Brasil Central, incluindo sete estados diferentes, dentre eles, o estado de Minas Gerais.

O efeito das mudanças no habitat sobre as espécies depende de traços da sua história natural (Becker *et al.*, 2007; Loyola *et al.*, 2007), por isso espécies com modos

de desenvolvimento diferentes, por exemplo, necessitam de diferentes estratégias de conservação para serem efetivamente protegidas (Loyola *et al.*, 2007). Informações insuficientes para direcionar os esforços de conservação são o maior obstáculo na conservação da biodiversidade tropical (Howard *et al.*, 1998; Loyola *et al.*, 2007; Loyola *et al.*, 2008). Deste modo, destacamos a importância destes estudos na conservação dos anuros, já que traços da história de vida das espécies não somente dependem de particularidades do habitat, mas também podem restringir o uso de habitat como um todo por cada grupo (Loyola *et al.*, 2007).

Segundo Salthe & Duellman (1973), modo reprodutivo é a combinação de características que incluem local de oviposição, características do ovo e desova, taxa e duração do desenvolvimento, estágio e tamanho das larvas recém-eclodidas e tipo de cuidado parental, se presente. A maior diversidade de modos reprodutivos é encontrada nos Neotrópicos (Haddad & Prado, 2005). A forte pressão de predação sobre ovos e larvas aquáticas, possibilidade de dessecação dos ovos, imprevisibilidade de chuvas, disponibilidade de oxigênio e recursos alimentares, temperatura adequada ao desenvolvimento de ovos e embriões, entre outros, são apontadas como possíveis forças seletivas relacionadas à evolução de modos reprodutivos especializados em anuros (ver Haddad & Prado, 2005). São conhecidos 39 modos reprodutivos em anfíbios anuros e este grupo exibe a maior diversidade reprodutiva que qualquer outro grupo de tetrápodes (Duellman & Trueb, 1994; Haddad & Prado, 2005).

Diferente de modo reprodutivo, uma estratégia reprodutiva pode ser vista como uma combinação de características fisiológicas, morfológicas e comportamentais que agem em conjunto para produzir o número ideal de filhotes em determinadas condições ambientais (Duellman & Trueb, 1994). Dentre as estratégias reprodutivas, temos o padrão de atividade reprodutiva, sendo que espécies diferentes respondem a diferentes estímulos, bióticos e abióticos, ou a uma combinação deles, para iniciar seu período reprodutivo (Oseen & Wassersug, 2002; Steen *et al.*, 2013). Entre os fatores abióticos, estudos apontam que a atividade reprodutiva dos anuros é fortemente influenciada pela pluviosidade e temperatura (e.g. Bertoluci & Rodrigues, 2002; Oseen & Wassersug, 2002; Saenz *et al.*, 2006; Steen *et al.*, 2013; Walls *et al.*, 2013). Nas regiões com clima sazonal, tais como o Cerrado e o Pantanal, a precipitação parece ser o principal fator relacionado à atividade reprodutiva dos anuros (Duellman & Trueb, 1994; Brasileiro *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005).

A comunicação acústica possui um papel central no comportamento reprodutivo dos anuros (Brenowitz & Rose, 1999) e, devido ao complexo repertório vocal frequentemente encontrado, é um dos tópicos mais estudados nesse grupo (Wells, 2007). Machos de uma única espécie, geralmente, emitem vários tipos de canto, cada um com um papel social diferente (Costa & Toledo, 2013; Toledo *et al.*, 2014). O canto de anúncio, por exemplo, é emitido por machos de muitas espécies de anuros que se agregam durante a noite na estação reprodutiva para formar um coro estável. As fêmeas visitam os coros e escolhem os machos baseadas nas características das vocalizações (Brenowitz & Rose, 1999). Além disso, vocalizações também são importantes para defesa de território e para evitar conflitos e, consequentemente, evitar injúrias (Bastos & Haddad, 2002).

A subfamília Phyllomedusinae, atualmente com 59 espécies (Frost, 2014), constitui uma das linhagens filogenéticas mais distintas dentre os Hylidae neotropicais, principalmente pela sua pupila vertical, colorido dorsal sempre verde, geralmente com cores vivas nas partes ocultas dos membros e da região inguinal (Caramaschi & Cruz, 2002). O gênero mais especioso da subfamília é *Phyllomedusa*, com 30 espécies (Frost, 2014), sendo que 22 ocorrem no Brasil (Segalla *et al.*, 2014). A espécie do presente estudo, *Phyllomedusa ayeaye* pertence ao grupo de *P. hypochondrialis*, composto por nove espécies de pequeno porte: *P. ayeaye*, *P. azurea*, *P. centralis*, *P. hypochondrialis*, *P. megacephala*, *P. nordestina*, *P. oreades*, *P. palliata* e *P. rohdei* (Caramaschi, 2006; Faivovich *et al.*, 2010).

A distribuição de *P. ayeaye* era conhecida como restrita à sua localidade tipo no Morro do Ferro (21°48' S, 46°35' O; 1400-1540 m), município de Poços de Caldas, em Minas Gerais, Brasil (Araújo *et al.*, 2007). Porém, foram encontrados indivíduos adultos no município de Pedregulho, no estado de São Paulo, e em São Roque de Minas, em Minas Gerais (Araújo *et al.*, 2007), ambas localidades na Serra da Canastra e imediações. Estes novos registros demonstraram que a espécie está distribuída a 175 km ao norte e à 200 km a noroeste da localidade tipo (Araújo *et al.*, 2007). Estas duas novas localidades de ocorrência estão inseridas em Unidades de Conservação, a primeira no Parque Furnas do Bom Jesus e a segunda no Parque Nacional da Serra da Canastra (Araújo *et al.*, 2007; Giovanelli *et al.*, 2008). Apesar de *Phyllomedusa ayeaye* constar como criticamente ameaçada na Lista Vermelha da IUCN (IUCN, 2014), estes novos registros, juntamente com a sinonimização da espécie *P. itacolomi* (Caramaschi *et al.*, 2006) à *P. ayeaye* (Baêta *et al.*, 2009), fizeram com que a espécie fosse retirada da nova Lista de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2014).

Apesar de existirem muitos trabalhos sobre biologia reprodutiva de espécies do gênero *Phyllomedusa* (e.g., Vaira, 2001; Abrunhosa & Wogel, 2004; Wogel *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010; Venancio & Melo-Sampaio, 2010; Oliveira *et al.*, 2012), estudos sobre *Phyllomedusa ayeaye* são raros (e.g., Caramaschi, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Giovanelli *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2011) e informações detalhadas sobre a ecologia, o comportamento e a distribuição desta espécie ainda são escassas (Giovanelli *et al.*, 2008).

Desta forma, este estudo teve como objetivos principais descrever o uso de hábitat, a biologia reprodutiva e o repertório vocal de *P. ayeaye*. O estudo foi realizado em um riacho temporário, localizado na área rural do município de Sacramento (19°51'S; 47°26'O), no estado de Minas Gerais, a aproximadamente 60 km do limite do Parque Nacional da Serra da Canastra. Tivemos como objetivos determinar o período de atividade reprodutiva da espécie, descrever os sítios de canto, uso de habitat, sítios de oviposição, bem como medir o investimento reprodutivo (IR), o número de ovos por desova, tamanho dos ovos e verificar dimorfismo sexual em tamanho de machos e fêmeas. Também fizemos alguns registros de comportamento reprodutivo e territorial. No apêndice, apresentamos a descrição dos cantos de anúncio e de soltura de *P. ayeaye*.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, P. A; WOGEL, H. 2004. Breeding behavior of the leaf-frog *Phyllomedusa burmeisteri* (Anura: Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, n. 2, p. 125 - 135.
- ANDERSEN, L. E.; FOG, K.; DAMGAARD, C. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 271, p. 1293 – 1302.
- ARAÚJO, C. O.; CONDEZ, T. H.; HADDAD, C. F. B. 2007. Amphibia, Anura, *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966): Distribution extension, new state record, and geographic distribution map. **Check List**, v. 3, p. 156 - 158.
- ARAÚJO, C. O.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. 2011. Herpetofauna in a Cerrado remnant in the state of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 47 – 62.

- ARENS, P.; SLUIS, T. VAN DER SLUIS, T.; VAN'T WESTENDE, W. P. C.; VOSMAN, B.; VOS, C. C.; SMULDERS, M. J. M. 2007. Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. **Landscape Ecology**, v. 22, p. 1489 – 1500.
- BAÊTA, D.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; POMBAL JR, J. P. 2009. *Phyllomedusa itacolomi* Caramaschi, Cruz & Feio, 2006, a junior synonym of *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966) (Hylidae, Phyllomedusinae). **Zootaxa**, v. 2226, p. 58 – 65.
- BASTOS, R. P. & HADDAD, C. F. B. 2002. Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 97 - 104.
- BECKER, C. G.; FONSECA C. R.; HADDAD, C. F. B.; BATISTA, R. F., PRADO, P. I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 319, p. 1775 - 1777.
- BECKER, C. G.; FONSECA, C. R.; HADDAD, C. F. B.; PRADO, P. I. 2009. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. **Conservation Biology**, v. 24, n. 1, p. 287 – 294.
- BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. 2011. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 9893 - 9898.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M. T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 161 - 167.
- BRASILEIRO, C. A.; SAWAYA, R. J.; KIEFER, M. C.; MARTINS, M. 2005. Amphibians of an open Cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1 - 17.
- BRENOWITZ, E. A. & ROSE, J. R. 1999. Female choice and plasticity of male calling behavior in the Pacific treefrog. **Animal Behaviour**, v. 57, p. 1337 - 1342.

- CARAMASCHI, U. & CRUZ, A. G. C. 2002. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, v. 1, n. 1, p. 5 - 10.
- CARAMASCHI, U. 2006. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1962 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 159 - 179.
- COSTA, M. H.; FOLEY, J. A. 1998. Combined Effects of Deforestation and Doubled Atmospheric CO₂ Concentrations on the Climate of Amazonia. **Journal of Climate**, v. 13, p. 18 - 34.
- COSTA, T. B.; GUIMARÃES, L. D.; BASTOS, R. P. 2010. Territorial and mating behavior in *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) at a temporary pond in west-central Brazil. **Phyllomedusa**, v. 9, n. 2, p. 99 - 108.
- COSTA, T. R. N.; TOLEDO, L. F. 2013. *Physalaemus spiniger* (Anura: Leiuperidae): a frog with an extensive vocal repertoire. **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 4, p. 530 - 538.
- CUSHMAN, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological conservation**, v. 128, p. 231 - 240.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M.; VIEIRA, C. M.; SOUZA, M. C.; BASTOS, R. P.; BRANDÃO, D.; OLIVEIRA, L. G. 2004. Spatial patterns in species richness and priority areas for conservation of anurans in the Cerrado region, Central Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 63 - 75.
- DUELLMAN, W. E. 1988. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American Tropics. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 79 - 104.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibians**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 670 p.

- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; BAÊTA, D.; JUNGFER, K.; ÁLVARES, G. F. R.; BRANDÃO, R. A.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, L. S.; BARRIO-AMÓROS, C. L.; CRUZ, C. A. G.; WHEELER, W. C. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics**, v. 26, p. 227–261.
- FROST, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference: Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. (Acessado em 08/01/2015).
- GIOVANELLI, J. G. R.; ARAÚJO, C. O.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. 2008. Modelagem do nicho ecológico de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae): previsão de novas áreas de ocorrência para uma espécie rara. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 2, p. 59 – 65.
- HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, p. 207 – 217.
- HOWARD, P. C.; VISKANIC, P.; DAVENPORT, T. R. B.; KIGENYI, F. W.; BALTZER, M.; DICKINSON, C. J.; LWANGA, J. S.; MATTHEWS, R. A.; BALMFORD, A. 1998. Complementarity and the use of indicator groups for reserve selection in Uganda. **Nature**, v. 394, p. 472 - 425.
- ICMBIO, INSTITUTO CHICO MENDES. 2014. Lista de Espécies Ameaçadas. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>. Acessado em 10 Fevereiro 2015.
- IUCN, 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 15 de Janeiro de 2015.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147 – 155.

- LOYOLA, R. F.; KUBOTA, U.; LEWINSOHN, T. M. 2007. Endemic vertebrates are the most effective surrogates for identifying conservation priorities among Brazilian Ecoregions. **Diversity and Distributions**, v. 13, p. 389 – 396.
- LOYOLA, R. F.; BECKER, C. G.; KUBOTA, U.; HADDAD, C. F. B.; FONSECA, C. R.; LEWINSOHN, T. M. 2008. Hung out to dry: Choice of priority ecoregions for conserving threatened neotropical anurans depends on life-history traits. **Plos one**, v. 3, n. 5, p. 1-8.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P.R.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J.; FONSECA, G.A.B. 2004. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, Cidade do México, 392 p.
- MONTEIRO, V. S.; IMAI, B.; PIRES, M. R. S. 2011. Comportamento postural de *Phyllomedusa ayeaye*. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço – MG.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853 – 858.
- OLIVEIRA F. F. R.; NOGUEIRA P. A. G.; ETEROVICK P. C. 2012. Natural history of *Phyllomedusa megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil, with descriptions of its breeding biology and male territorial behaviour. **Journal of Natural History**, v. 46, n. 1 - 2, p. 117 - 129.
- OSEEN, K. L.; WASSERSUG, R. J. 2002. Environmental factor influencing calling in sympatric anurans. **Oecologia**, v. 133, n. 133, p. 616 - 625.
- PATZ, J. A.; GRACZY, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, p.1 - 11.
- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. 2002. Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. **Copeia**, v. 4, p. 1128 – 1133.

- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. 2005. Breeding patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 211 - 221.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. 1997. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223 – 230.
- SAENZ, D. FITZGERALD, L. A., BAUM, K. A., CONNER, R. N. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature and season. **Herpetological Monographs**, v. 20, n. 1, p. 64 - 82.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F.B.; LANGONE, J.; GARCIA, P. C. A. 2014. *Brazilian amphibians: List of species*. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, p. 37-48.
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v. 52, p. 225 – 234.
- SKERRAT, L. F.; BERGER L.; SPEARE, R.; CASHINS, S. MCDONALD, K. R.; PHILLOT, A. D.; HINES, H. B.; KENYON, N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **Eco Health**, v. 4, p. 125 – 134.
- STEEN, D. A.; MCCLURE, C. J. W.; GRAHAM S. P. 2013. Relative influence of weather and season on anuran calling activity. **Canadian Journal Zoology**, v. 91, p. 462 – 467.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLERS, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science express**, p. 1 – 5.
- TOLEDO, L. F.; MARTINS I. A.; BRUSCHI, D. P.; PASSOS, M. A.; ALEXANDRE, C.; HADDAD, C.F.B. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta ethologica**, p. 1 – 13.

- VAIRA, M. 2011. Breeding biology of the leaf frog, *Phyllomedusa boliviana* (Anura: Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 22, n. 4, p. 421 - 429.
- VENANCIO, N. M.; MELO-SAMPAIO, P. R. 2010. Reproductive behavior of the giant leaf frog *Phyllomedusa bicolor* (Anura: Hylidae) in the western Amazon. **Phyllomedusa**, v. 9, n. 1, p. 63 - 67.
- WALLS, S. C.; BARICHIVICH, W. J.; BROWN, M. E. 2013. Drought, deluge and declines: the impact of precipitation extremes on amphibians in a changing climate. **Biology**, v. 2, p. 399 - 418.
- WEBB, T. J.; WOODWARD, F. I.; HANNAH, L.; GASTON, K. J. 2005. Forest cover-rainfall relationships in a biodiversity hotspot: The Atlantic forest of Brazil. **Ecological Applications**, v. 15, p. 1968 – 1983.
- WELLS, K. D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- WOGEL, H.; ABRUNHOSA, P. A.; POMBAL-JR, J. P. 2005. Breeding behaviour and mating success of *Phyllomedusa rohdei* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 22, p. 2035 - 2045.

Biologia reprodutiva de *Phyllomedusa ayeaye* (Hylidae, Phyllomedusinae) na
Serra da Canastra, Minas Gerais



Marília Merli Borges, Renato Christensen Nali, Bruno Ferreto Fiorillo e Cynthia Peralta
de Almeida Prado

RESUMO

Phyllomedusa ayeaye é uma espécie encontrada no Cerrado, o segundo domínio morfoclimático mais extenso do Brasil e, provavelmente, a savana mais ameaçada do mundo, e sua história natural ainda é desconhecida. Descrevemos aqui a biologia reprodutiva de uma população de *P. ayeaye*, estudada na região da Serra da Canastra, Minas Gerais. A atividade reprodutiva da espécie ocorreu de outubro de 2013 a março de 2014. A espécie apresentou padrão reprodutivo intermediário entre prolongado e explosivo, pois houve atividade durante toda a estação chuvosa, com alguns eventos explosivos. A atividade de vocalização dos machos foi positivamente correlacionada com a temperatura do ar. A espécie possui amplexo axilar e modo reprodutivo típico do gênero. Alguns indivíduos foram capturados mais de uma vez, em um intervalo de até 13 meses e ocorreu o deslocamento máximo de 40 metros. Não houve diferença significativa no tamanho de machos capturados apenas uma vez e dos machos recapturados. Machos vocalizaram sobre substratos variados ao longo de um riacho temporário, principalmente sobre arbustos de *Leandra* sp. (Melastomataceae). O CRC e a massa das fêmeas foram significativamente maiores que os dos machos. Encontramos desovas em folhas dobradas de *Leandra* sp., contendo ovos amarelados e muitas cápsulas gelatinosas vazias. A média do N de ovos por desova foi de $29 \pm 2,38$ (N = 6) e a média do diâmetro dos ovos foi de $2,84 \pm 0,02$ mm (N = 109). O investimento reprodutivo das fêmeas (massa das gônadas/massa do corpo*100) foi de $4,25 \pm 0,35\%$ (N = 3) e dos machos de $0,35 \pm 0,05\%$ (N = 14). Observamos comportamento agressivo, incluindo brigas ou vocalizações agressivas. Estudos sobre a história natural dos anfíbios anuros são extremamente importantes para podermos direcionar melhor as estratégias de conservação.

Palavras-chave: Anura, história natural, comportamento reprodutivo, sítios de reprodução, Cerrado

INTRODUÇÃO

A região Neotropical abriga a maior diversidade de anfíbios anuros do mundo (Duellman, 1988), a qual está associada a uma grande diversidade de modos reprodutivos (ver Haddad & Prado, 2005). O Brasil é o país com a maior riqueza de anuros do mundo, atualmente com 988 espécies descritas (Segalla *et al.*, 2014). Apesar disso, muito pouco se conhece sobre as espécies brasileiras, cuja história natural continua sendo descrita em pleno século XXI (e.g., Nali & Prado, 2012; Camurugi & Juncá, 2013). Aliado a esse desconhecimento, os anfíbios atualmente estão entre os animais mais ameaçados de extinção em decorrência, principalmente, de perda e modificação de habitats, bem como doenças (e.g. Cushman, 2006; Becker *et al.*, 2007; Skerratt *et al.*, 2007; Becker & Zamudio, 2011). O efeito das mudanças no habitat sobre as espécies depende de traços da sua história de vida (Becker *et al.*, 2007; Loyola *et al.*, 2007), por isso espécies com modos de desenvolvimento diferentes necessitam de diferentes estratégias de conservação para serem efetivamente protegidas (Loyola *et al.*, 2007). Desta forma, informações insuficientes para direcionar os esforços de conservação são o maior obstáculo atual para a conservação da biodiversidade tropical (Howard *et al.*, 1998; Loyola *et al.*, 2007; Loyola *et al.*, 2008).

No contexto das histórias de vida, uma estratégia reprodutiva pode ser vista como uma combinação de características morfológicas, fisiológicas e comportamentais que agem em conjunto para produzir um número ótimo de filhotes em determinadas condições ambientais (Duellman & Trueb, 1994). Alguns dos principais componentes das estratégias reprodutivas incluem o controle extrínseco e intrínseco do ciclo reprodutivo, fecundidade, incluindo número e tamanho dos ovos, e investimento reprodutivo (Duellman & Trueb, 1994). Em anfíbios anuros, o investimento reprodutivo, número e tamanho dos ovos são fortemente influenciados pelo tamanho da fêmea e o modo reprodutivo da espécie (e.g., Crump, 1974; Prado & Haddad, 2005). Além disso, tais medidas reprodutivas têm sido usadas para se estimar o custo energético da reprodução em fêmeas, bem como para se verificar as consequências desse investimento sobre a sobrevivência da prole e aptidão (e.g., Crump & Kaplan, 1979; Lemckert & Shine, 1993; Räsänen *et al.*, 2005; Dziminski & Roberts, 2006). Em relação aos machos de anuros, tamanho do corpo, comportamento territorial, fidelidade ao sítio de canto, persistência na atividade de vocalização, bem como o investimento em gônadas, são características relacionadas a variações na aptidão (e.g., sucesso reprodutivo) e sobrevivência, devido à exposição a predadores (e.g., Wells, 1977a; Wells, 1979; Hinshaw & Sullivan, 1990; Roithmair, 1992; Lemckert & Shine, 1993; Prado & Haddad, 2003).

Em relação ao controle extrínseco do ciclo reprodutivo, características fisiológicas, tais como a ectotermia e uma pele altamente permeável, e a alternância, na maioria das espécies, de uma fase larval aquática e uma adulta terrestre (Wells, 2007), faz com que a atividade reprodutiva dos anfíbios seja extremamente influenciada por fatores abióticos, tais como precipitação, umidade e temperatura (e.g. Bertoluci & Rodrigues, 2002; Oseen & Wassersug, 2002; Saenz *et al.*, 2006; Steen *et al.*, 2013; Walls *et al.*, 2013). Nas regiões com clima sazonal, tais como o Cerrado e o Pantanal, a precipitação parece ser o principal fator relacionado à atividade reprodutiva dos anuros (Duellman & Trueb, 1994; Brasileiro *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005).

Modos reprodutivos nos quais ovos são depositados em ambiente terrestre, e posteriormente girinos completam seu desenvolvimento na água, evoluíram independentemente em diferentes famílias de anuros (Haddad & Prado, 2005; Wells, 2007). Espécies de pererecas pertencentes ao gênero *Phyllomedusa*, por exemplo, depositam seus ovos sobre folhas pendentes acima da vegetação, as quais são enroladas ou dobradas sobre os ovos pelo casal, e os girinos caem na água, onde completam seu desenvolvimento (modo 24 *sensu* Haddad & Prado, 2005; Faivovich *et al.*, 2010). Apesar de existirem trabalhos sobre biologia reprodutiva de espécies do gênero *Phyllomedusa* (e.g. Vaira, 2001; Abrunhosa & Wogel, 2004; Wogel *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010; Venancio & Melo-Sampaio, 2010; Oliveira *et al.*, 2011), e sobre distribuição e taxonomia da espécie (e.g. Caramaschi, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Giovanelli *et al.*, 2008), informações detalhadas sobre a ecologia e o comportamento reprodutivo de *Phyllomedusa ayeaye* são inexistentes.

Diante do exposto, neste estudo, investigamos a biologia reprodutiva de uma população de *Phyllomedusa ayeaye* em um riacho da Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais. Nossos objetivos foram: (i) determinar o período de atividade reprodutiva e a influência de fatores abióticos (temperatura, precipitação e umidade relativa do ar); (ii) descrever e caracterizar os sítios de canto por parte dos machos; (iii) caracterizar os sítios de oviposição; (iv) medir o investimento reprodutivo (IR) em machos e fêmeas, número e tamanho dos ovos; e (v) verificar a existência de dimorfismo sexual em tamanho.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie de estudo

A espécie *Phyllomedusa ayeaye* pertence à família Hylidae, subfamília Phyllomedusinae, atualmente com 59 espécies (Frost, 2014). O gênero *Phyllomedusa* reúne 30 espécies (Frost, 2014) divididas em quatro grupos monofiléticos (Faivovich *et al.*, 2010). *Phyllomedusa ayeaye* pertence ao grupo de *P. hypochondrialis*, composto por nove espécies de pequeno porte: *P. ayeaye*, *P. azurea*, *P. centralis*, *P. hypochondrialis*, *P. megacephala*, *P. nordestina*, *P. oreades*, *P. palliata* e *P. rohdei* (Caramaschi, 2006; Faivovich *et al.*, 2010). A distribuição de *P. ayeaye* era conhecida como restrita à sua localidade tipo, no Morro do Ferro (21°48' S, 46°35' O; 1400-1540 m), município de Poços de Caldas, em Minas Gerais (Araújo *et al.*, 2007). Porém, foram registrados indivíduos adultos no município de Pedregulho, no estado de São Paulo, e em São Roque de Minas, em Minas Gerais (Araújo *et al.*, 2007). Estas novas localidades estão inseridas em Unidades de Conservação, a primeira no Parque Furnas do Bom Jesus e a segunda no Parque Nacional da Serra da Canastra (Araújo *et al.*, 2007; Giovanelli *et al.*, 2008). Além disso, a espécie *P. itacolomi* descrita por Caramaschi *et al.* (2006) da localidade de Lagoa Seca, Parque Estadual do Itacolomi, município de Ouro Preto, estado de Minas Gerais, foi sinonimizada a *P. ayeaye* (Baêta *et al.*, 2009), ampliando sua distribuição até outras duas Unidades de Conservação: Parque Estadual do Itacolomi (PEI) e Reserva Particular do Patrimônio Natural Ovídio Pires (Baêta *et al.*, 2009).

Área de estudo

O estudo foi realizado na área rural do município de Sacramento, MG (19°51'S; 47°26'O), em fazendas próximas à Represa de Peixoto, área localizada a aproximadamente 350 km da localidade-tipo, e 60 km do limite do Parque da Serra da Canastra (Figura 1A), o qual se encontra na mesma cadeia montanhosa e apresenta características fitofisionômicas e climáticas muito semelhantes às da área de estudo. As principais fitofisionomias encontradas são florestas mesófilas de encosta, capões, cerradão, cerrado, campo cerrado, campo limpo e campo rupestre (Romero & Nakajima, 1999). O clima da região é mesotérmico de inverno seco, com temperaturas variando entre 18 e 32°C no verão, e entre 3 e 13°C no inverno (Araújo *et al.*, 2009). As chuvas se concentram entre os meses de outubro e março, com precipitação total anual variando entre 1300 - 1700 mm (Queirolo & Motta-Junior, 2007). O relevo apresenta topos achatados e arredondados na parte superior, com encostas escarpadas em forma de cuevas e cânions, predominando os latossolos (Araújo *et al.*, 2009).



Figura 1. (A) Vista geral da área de estudo, mostrando a represa de Peixoto ao fundo, município de Sacramento, Minas Gerais. (B) Margens do riacho amostrado (dezembro de 2014), município de Sacramento, Minas Gerais.

A biologia reprodutiva de *P. ayeaye* foi estudada em um riacho temporário ($20^{\circ}13'09,9''\text{S}$; $47^{\circ}06'21''\text{O}$; altitude 880 m; Figura 1B), localizado a aproximadamente 7 km em linha reta da Represa de Peixoto. O riacho apresenta água cristalina, com leito rochoso, onde se formam poços. A vegetação nas margens é composta principalmente por vegetação herbácea e arbustiva, não ultrapassando 2,0 m de altura, e algumas árvores mais altas esparsas. O riacho permanece com água corrente por boa parte do ano, mas na seca é comum formarem-se poços de água parada. O riacho encontra-se em área elevada com leve declive, sendo mais estreito na parte superior e formando um alagado um pouco maior mais abaixo, próximo à estrada (Figura 1B). As amostragens foram realizadas ao longo do riacho, em um trecho de aproximadamente 75 metros.

Coleta de dados

Atividade reprodutiva, uso de habitat e fidelidade aos sítios de canto

As coletas e observações em campo foram realizadas em cerca de três noites por mês (2 – 4 noites), entre dezembro de 2010 e junho de 2011 e de outubro de 2013 a março de 2014, principalmente no período de chuvas, quando se concentra a atividade reprodutiva da espécie.

As observações começavam no entardecer, a partir das 18 h, e continuavam até que a atividade dos indivíduos diminuísse, entre 24 h e 1 h da manhã.

Os indivíduos foram localizados no local de reprodução, a partir de buscas auxiliadas pela vocalização dos machos, utilizando lanternas, evitando que o foco central fosse direcionado diretamente aos indivíduos (e.g., Nali & Prado, 2012; Toledo, 2004).

O número de machos em atividade de vocalização foi registrado a cada visita ao campo, sempre no mesmo horário, entre 20:30 h e 21:00 h. No momento do registro, foram medidas as temperaturas do ar e da água, com termômetro de mercúrio com precisão de 0,5°C, e a profundidade dos riachos, com trena com precisão de 0,5 cm. Dados de umidade relativa do ar, temperatura média mensal e precipitação total mensal foram obtidos a partir da estação meteorológica de Sacramento, fornecidos pelo INMET – Instituto Nacional de Meteorologia.

A ocupação de habitat pelos indivíduos de *P. ayeaye* foi registrada por caracterização dos microambientes utilizados para reprodução, tais como os sítios de vocalização e oviposição (e.g. Nali & Prado, 2012). Os sítios de canto utilizados pelos machos foram caracterizados de acordo com o tipo de substrato utilizado (e.g., folhas, galhos, solo), altura do poleiro e distância do poleiro até a margem do riacho. Os riachos foram também visitados durante o dia à procura de desovas.

Para verificar a fidelidade dos machos aos sítios de canto, a cada visita ao local de estudo, no período entre outubro de 2013 e março de 2014 e em dezembro de 2014, os machos (N = 33) eram capturados e pesados com dinamômetro (0,1 g) e medidos no comprimento rostro-cloacal (CRC) com paquímetro (0,01 mm). Os machos foram então fotografados com câmera digital NIKON Coolpix L310 para posterior reconhecimento individual feito por meio de marcas naturais nas coxas e nos flancos (Bradfield, 2004; Kenyon *et al.*, 2010). Os sítios de canto foram marcados com fita adesiva para facilitar as buscas nas noites subsequentes.

Investimento reprodutivo, desovas, ovos e dimorfismo sexual em tamanho

As desovas (N = 7) foram coletadas e fixadas em formalina 5%. O número de ovos por desova foi determinado e o diâmetro de todos os ovos de cada desova medidos sob estereomicroscópio Nikon SMZ 1500, utilizando o programa NIS-Elements AR. Adicionalmente, fêmeas grávidas foram capturadas, sacrificadas com xilocaína 10%, fixadas em formalina 10% e preservadas em álcool 70%, para contagem e medida dos ovócitos maduros (Prado & Haddad, 2005).

Fêmeas capturadas no campo e não coletadas foram pesadas com dinamômetro (0,1 g) e medidas no comprimento rostro-cloacal (CRC) com paquímetro (0,01 mm). No laboratório,

além do CRC, as fêmeas preservadas tiveram sua massa do corpo e ovários maduros pesados em balança de precisão (0,001 g) (Prado & Haddad, 2005). A porcentagem da massa dos ovários em relação à massa corporal foi utilizada como medida de investimento reprodutivo (IR). O mesmo procedimento foi feito para os machos, com relação aos testículos (Prado & Haddad, 2003; Prado & Haddad, 2005).

Análises Estatísticas

A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1999). Para testar a influência dos fatores climáticos sobre a atividade reprodutiva da espécie, utilizamos a análise não-paramétrica de correlação múltipla de Kendall (Zar, 1999). O número de machos observados em atividade reprodutiva a cada visita, por 33 noites, foi correlacionado com a temperatura da água e do ar medidos nas noites de coleta. O número máximo de machos em atividade a cada mês, totalizando 12 meses, foi correlacionado com a precipitação total mensal, temperatura média mensal e média da umidade relativa do ar mensal (e.g., Nali & Prado, 2012).

Para verificar a existência de dimorfismo sexual em tamanho, as médias de CRC e massa de machos e fêmeas foram comparadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 1999). Para verificar a influência do tamanho do corpo na fidelidade ao sítio de canto, comparamos o tamanho médio de machos (CRC e massa) recapturados no mesmo local, ou proximidades (aprox. raio de 2 m), com aquele de machos capturados apenas uma vez, utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 1999).

Os indivíduos (CFBH32772 - CFBH32779, CFBH36024 - CFBH36027, CFBH 36030 - CFBH36032, CFBH36050 - CFBH36052), gravações, desovas e girinos foram depositados na coleção de anfíbios CFBH do Departamento de Zoologia, I.B., UNESP de Rio Claro, São Paulo.

RESULTADOS

Atividade reprodutiva e influência de fatores climáticos

Machos cantaram de outubro de 2013 a fevereiro de 2014, mas houve um pico de atividade em novembro de 2013, o qual foi decrescendo até fevereiro de 2014 (Figura 2). O número de machos cantando por mês variou de dois indivíduos (fev/2014) a 13 indivíduos (nov/2013; Figura 2).

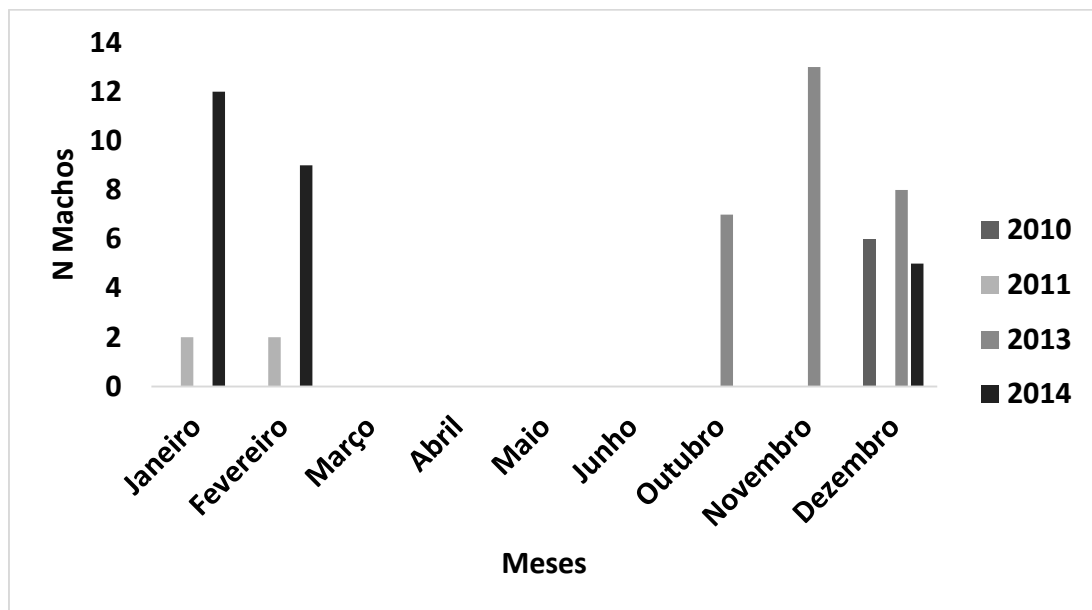


Figura 2. Abundância de machos de *Phyllomedusa ayeaye* cantando por mês, município de Sacramento, Minas Gerais.

Também foi observado um evento de reprodução explosiva de 14 a 16 de dezembro de 2010, onde encontramos uma fêmea e um casal em amplexo axilar (Figura 3).



Figura 3. Casal de *Phyllomedusa ayeaye* em amplexo axilar, município de Sacramento, Minas Gerais.

O número máximo de machos em atividade por mês amostrado teve correlação positiva significativa com a temperatura média mensal (Coeficiente de Kendall $r = 0,50$; $P < 0,05$; $N = 12$). Também houve correlação positiva entre o N de machos vocalizando a cada noite com a temperatura do ar na noite do registro (Coeficiente de Kendall $r = 0,35$; $P < 0,05$; $N = 33$). Não houve correlação entre número máximo de machos em atividade por mês amostrado e precipitação total mensal (Coeficiente de Kendall $r = 0,17$; $P > 0,05$; $N = 12$), bem como não houve correlação entre o número máximo de machos ativos por mês amostrado e média da umidade relativa do ar mensal (Coeficiente de Kendall $r = 0,016$; $P > 0,05$; $N = 12$). Também não houve correlação entre o número de machos ativos a cada noite com a temperatura da água registrada no local (Coeficiente de Kendall $r = 0,14$; $P > 0,05$; $N = 33$).

Caracterização do sítio de canto

Os machos de *Phyllomedusa ayeaye* cantaram principalmente sobre a vegetação às margens do riacho. Machos diferentes foram observados vocalizando no mesmo arbusto, mas nunca no mesmo galho. Os sítios de vocalização da espécie foram galhos, folhas, gramíneas, sobre o solo e sobre bromélias, principalmente galhos e folhas, incluindo gramíneas, localizados logo acima da água (Figura 4). A altura média acima da água foi de $62,19 \pm 4,72$ cm (amplitude = 0 - 164 cm; $N = 68$) e a maioria dos machos encontrava-se em poleiros na vegetação logo acima da água e com distância que variou de 0 cm a 1,5 m em relação à margem. Porém, encontramos dois indivíduos mais distantes da margem, um encontrado a 5,5 m da margem e outro a 8,3 m. Também observamos que os machos tenderam a cantar a partir de galhos e folhas de um arbusto da família Melastomataceae, do gênero *Leandra* (54,41%, $N = 37$), ou próximos de um desses arbustos, em um raio de aproximadamente dois metros (45,48%, $N = 31$).

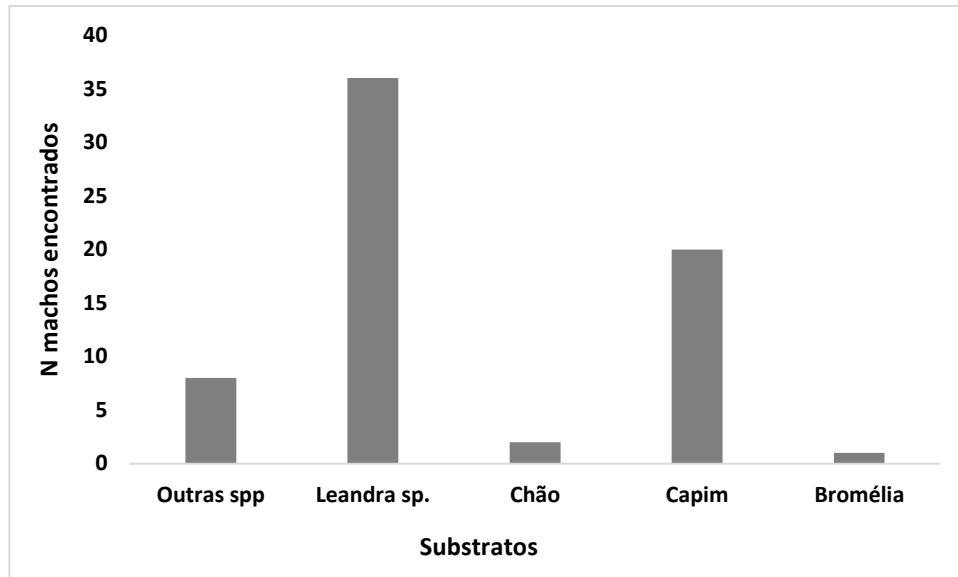


Figura 4. Utilização de substratos como sítios de vocalização por machos de *Phyllomedusa ayeyae* durante este estudo, município de Sacramento, Minas Gerais.

Foram amostrados 47 machos adultos, três fêmeas maduras e uma imatura. A partir dos métodos de amostragem, foi possível identificar cada indivíduo. Recapturamos um total de 14 machos entre uma e quatro vezes, totalizando 26 recapturas durante a estação reprodutiva (Tabela 1). Não houve recaptura de fêmeas.

Tabela 1: Datas, substrato e número de capturas de machos de *Phyllomedusa ayeaye* (números 1 a 14) durante este estudo, sendo B = bromélia, C = capim, L = *Leandra* sp. e O = outros substratos. Diferentes expedições de campo se alternam no sombreamento.

Datas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
19/10/2013	L													
21/10/2013	L	C												
05/11/2013	C	C	L	L	L	L	C	L	L					
06/11/2013	C				L	C	L	L	C					L
16/12/2013	B									C	O			
17/12/2013											O			
18/12/2013							O		L		L	C		
21/01/2014		C	C	C										
22/01/2014												O	C	
23/01/2014									L				C	
18/02/2014									L	L	L		C	
01/12/2014														C
03/12/2014														C
04/12/2014														L
Total capturas	5	3	2	2	2	2	3	2	5	2	4	2	3	4

Dentre os indivíduos recapturados, os indivíduos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13 e 14 foram recapturados apenas na mesma expedição, em dias subsequentes, mas outros foram recapturados por até quatro meses consecutivos (indivíduo 9 em novembro/2013, dezembro/2013, janeiro/2014, fevereiro/2014) (Tabela 1). O maior intervalo entre a primeira e a última captura foi do indivíduo 14, capturado em novembro de 2013 e recapturado em dezembro de 2014 (Tabela 1). O indivíduo 9 (Tabela 1), foi recapturado quatro vezes e manteve um mesmo arbusto de Melastomataceae, gênero *Leandra*, como território, porém o encontramos no final da estação reprodutiva a cerca de 2,20 m de distância deste arbusto. Dois machos (indivíduos 1 e 14) se deslocaram cerca de 40 metros, de um ponto onde o riacho forma um remanso até outro ponto próximo a uma fenda na rocha que margeia o riacho, que utilizamos para marcar o transecto. Não houve diferença significativa entre CRC e massa dos machos que foram capturados uma vez vs. machos que foram recapturados entre uma e quatro vezes (Tabela 2).

Tabela 2. Média $\pm$ DP do comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa do corpo de machos capturados e recapturados de *Phyllomedusa ayeaye*, município de Sacramento, Minas Gerais, Brasil. Amplitude e N entre parênteses. U o resultado de teste não-paramétrico de Mann-Whitney e P o nível de significância.

	Machos Capturados	Machos Recapturados	U	P
N	33	14	—	—
CRC (mm)	33,48 $\pm$ 0,33 (28,7 - 37,4; 33)	32,93 $\pm$ 1,02 (21,62 - 37,9; 14)	225	0,88
Massa (g)	2,30 $\pm$ 0,08 (1,1 - 3,4; 33)	2,28 $\pm$ 0,14 (1,7 - 3,7; 14)	208	0,59

Investimento reprodutivo, desovas e ovos e dimorfismo sexual em tamanho

Phyllomedusa ayeaye apresentou o modo reprodutivo número 24 (*sensu* Haddad & Prado, 2005). Os ovos foram depositados sobre folhas na vegetação logo acima de riachos, em ninhos compostos por uma folha dobrada; após a eclosão, as larvas completaram seu desenvolvimento no riacho, em remansos que formavam poços.

O CRC médio de fêmeas de *Phyllomedusa ayeaye* foi significativamente maior do que o dos machos, tendência também observada para massa corpórea (Tabela 3). Coletamos cinco desovas depositadas sobre folhas dobradas de *Leandra* sp. e uma que foi depositada no saco plástico por um casal coletado. As desovas tinham ovos ligeiramente amarelados e muitas cápsulas gelatinosas vazias (Figura 5A). Em alguns casos, eram visíveis embriões em estágios de pré-eclosão, sendo que alguns recém-eclodidos se encontravam na mesma folha (Figura 5B). A média do número de ovos por desova, do diâmetro dos ovos e do investimento reprodutivo (IR) de machos e fêmeas são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Média $\pm$ DP do comprimento rostro-cloacal (CRC), massa do corpo e investimento reprodutivo (IR) de machos e fêmeas de *Phyllomedusa ayeaye*, bem como o tamanho da desova e dos ovos coletados no município de Sacramento, Minas Gerais, Brasil. Amplitude e N entre parênteses. U o resultado do teste não-paramétrico de Mann-Whitney e P o nível de significância.

	Machos	Fêmeas	U	P
CRC (mm)	33,32 $\pm$ 0,35 (21,62 – 37,9; 47)	48.96 $\pm$ 1,34 (36,75 – 42,7; 4)	4	0,001
Massa do corpo (g)	2,28 $\pm$ 0,07 (1,1 – 3,7; 50)	3,44 $\pm$ 0,61 (1,89 – 4,9; 4)	44,5	0,06
IR (%)	0,35 $\pm$ 0,05 (0,16 - 0,80; 14)	4,25 $\pm$ 0,35 (3,65 - 4,88; 3)	—	—
N ovos por desova	—	29 $\pm$ 2,38 (20 – 35; 6)	—	—
Diâmetro dos ovos (mm)	—	2,84 $\pm$ 0,02 (2,19 – 3,70; 109)	—	—

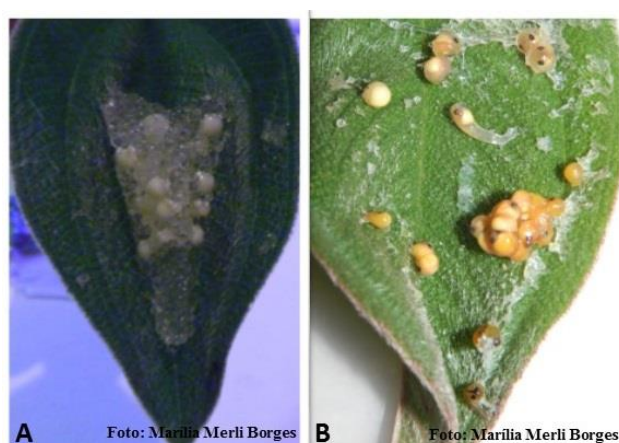


Figura 5. (A) Desova de *Phyllomedusa ayeaye*, evidenciando os ovos amarelados e as cápsulas gelatinosas vazias, município de Sacramento, Minas Gerais. (B) Ninho com embriões de *Phyllomedusa ayeaye* em avançado estágio de desenvolvimento e alguns já eclodidos, município de Sacramento, Minas Gerais. Note que ambas as desovas foram depositadas sobre

folhas de *Leandra* sp., as quais possuem tricomas. As folhas ficam dobradas, mas foram abertas para a visualização dos ovos e embriões.

DISCUSSÃO

Nossas observações sugerem que o padrão reprodutivo de *Phyllomedusa ayeaye* é intermediário entre explosivo e prolongado, pois apesar de os machos permanecerem cantando por muitos meses, observamos um evento explosivo de 14 a 16 de dezembro de 2010. O mesmo padrão intermediário também foi descrito para *P. megacephala* (Oliveira *et al.*, 2011), que pertence ao grupo de *P. hypochondrialis*, o mesmo de *P. ayeaye*. Diferentemente, *Phyllomedusa azurea*, outra espécie do grupo de *P. hypochondrialis*, apresenta padrão reprodutivo prolongado, já que ela se reproduz por seis meses seguidos (Prado *et al.*, 2005, referida como *P. hypochondrialis*; Freitas *et al.*, 2008). Embora muitas espécies de anuros possuam padrões reprodutivos claramente explosivos ou prolongados (e.g., Rodrigues *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005), estes padrões representam extremos de um contínuo (Wells, 1977b) e muitas espécies apresentam características intermediárias (e.g., Bastos & Haddad, 1999; presente estudo).

Apesar de não termos encontrado correlação positiva entre o número de machos de *P. ayeaye* em atividade reprodutiva e o total de precipitação mensal nos meses de coleta, encontramos correlação positiva com a temperatura. A combinação de fatores sazonais, endógenos e condições ambientais a curto prazo influenciam a atividade de vocalização, sendo que em espécies de região tropical sazonal, com pronunciada estação seca, as espécies de reprodução prolongada são mais prováveis de serem influenciadas pela precipitação e temperatura (Aichinger, 1987; Donnelly & Guyer, 1994; Prado *et al.*, 2005). *Phyllomedusa ayeaye* e outras espécies do gênero se reproduzem no período mais chuvoso do ano (e.g., De la Riva, 1999; Abrunhosa & Wogel, 2004; Freitas *et al.*, 2008), onde geralmente a temperatura e umidade são mais elevadas devido à maior precipitação (Duellman & Trueb, 1994). No caso do presente estudo, onde a região apresenta estação seca pronunciada, esperávamos encontrar tanto efeito da temperatura quanto da precipitação sobre a atividade de *P. ayeaye*. Porém, o fato do período de estudo ter se concentrado durante a estação chuvosa, aliado aos baixos índices pluviométricos na estação chuvosa de 2013/2014 (obs. pess.), poderiam explicar a ausência de efeito da precipitação aqui observada.

Os sítios de canto de *Phyllomedusa ayeaye* variaram quanto ao substrato, porém observamos uma maior frequência de machos sobre galhos e folhas do arbusto *Leandra* sp.

(Família Melastomataceae), geralmente pendentes sobre a água. A maior ocorrência sobre poleiros localizados logo acima da água também foi observada em outras espécies do gênero, como *P. centralis* (Brandão *et al.*, 2009), também pertencente ao grupo de *P. hypochondrialis*. Machos de *P. azurea* utilizam arbustos e árvores (Freitas *et al.*, 2008), porém também podem utilizar gramíneas do gênero *Brachiaria* como sítio de canto e oviposição, de acordo com o tipo de vegetação e sua disponibilidade no habitat (Costa *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2014). Também observamos alguns indivíduos de *P. ayeaye* utilizando gramíneas como sítio de vocalização, porém nenhuma desova foi encontrada em gramíneas (discutido mais adiante).

Em anuros, estudos mostram que machos que defendem sítios reprodutivos de melhor qualidade ou que permanecem no mesmo território por mais tempo podem obter um maior sucesso reprodutivo, características que podem ser influenciadas pelo tamanho do corpo (e.g., Wells, 1977a, Howard, 1978; Roithmair, 1992). Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre o tamanho de machos capturados e recapturados, obtivemos um grande número de recapturas, o que sugere que alguns machos de *P. ayeaye* tendem a permanecer em seus territórios. Machos foram recapturados de uma a cinco vezes e alguns foram capturados em até quatro meses consecutivos. Para *Phyllomedusa megacephala* também houve uma grande taxa de recaptura, o que foi atribuída a uma maior duração de vida dos indivíduos (Oliveira *et al.*, 2011). Antunes (2007) também obteve um maior número de recapturas de machos do hilídeo *Hypsiboas caipora* (Antunes, 2007) em comparação às fêmeas, provavelmente pelo fato dos machos serem territoriais. No presente estudo, o fato de ter ocorrido recapturas apenas de machos e nenhuma de fêmeas também pode estar relacionado ao comportamento territorial e de vocalização, ou ainda maior taxa de sobrevivência dos machos. Estudos futuros com esta espécie devem avaliar a relação entre permanência dos machos nos sítios reprodutivos, qualidade do sítio e sucesso reprodutivo (e.g., sucesso no acasalamento e/ou número de desovas).

A subfamília Phyllomedusinae é relativamente diversa em caracteres associados à reprodução. Apesar de todos os membros da subfamília possuírem desova terrestre, ocorre variação considerável em termos de onde a desova é depositada, incluindo troncos, fendas de rochas, raízes penduradas, lianas cobertas por musgos, folhas abertas ou folhas dobradas pelo casal durante a oviposição (Faivovich *et al.*, 2010). O modo reprodutivo observado aqui para *Phyllomedusa ayeaye*, com desovas depositadas sobre folhas enroladas acima da água e com girinos que se desenvolvem na água corrente (modo 24, *sensu* Haddad & Prado, 2005), é característico de espécies do gênero *Phyllomedusa* (Haddad & Sawaya, 2000; Haddad & Prado, 2005; Araujo *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2009). Todas as desovas de *P. ayeaye* foram

depositadas sobre folhas de *Leandra* sp. (Melastomataceae), as quais contêm tricomas. A escolha do substrato adequado para reprodução parece ser importante para o sucesso reprodutivo de espécies deste gênero (Freitas *et al.*, 2008). Por exemplo, diferentes espécies tem sido reportadas desovando sobre folhas de plantas que contêm estruturas como tricomas, acúleos e espinhos, tais como as das famílias Melastomataceae e Solanaceae (e.g., Pombal & Haddad, 1992; Rodrigues *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2014). Tais estruturas poderiam auxiliar na fixação da desova sobre as folhas, além de prover proteção e isolamento pelo aprisionamento de ar e manter a umidade para os ovos e embriões (Dias *et al.*, 2014). Desta forma, o uso de folhas com tricomas parece ser importante para garantir o desenvolvimento e a sobrevivência de ovos e embriões de espécies de *Phyllomedusa* (Dias *et al.*, 2014). Porém esta hipótese ainda precisa ser testada por meio de experimentos.

Dentro da subfamília Phyllomedusinae, ocorrem variações quanto ao local de desenvolvimento dos girinos, que pode ocorrer em lagoas, riachos, água entre raízes de árvores ou depressões em árvores caídas (Faivovich *et al.*, 2010). *Phyllomedusa ayeaye* se reproduz em riacho, onde posteriormente os girinos se desenvolvem, mas a maioria das espécies do gênero *Phyllomedusa* não mostra associação com riachos (Faivovich *et al.*, 2010). A reprodução em riachos parece ser uma característica restrita a um subclado dentro do grupo de *P. hypochondrialis*, formado pelas espécies *P. megacephala*, *P. centralis* e *P. oreades*, além de ocorrer em *P. vaillanti* (Faivovich *et al.*, 2010). Também ocorrem variações dentre espécies de Phyllomedusinae em relação às desovas, que podem ou não conter cápsulas gelatinosas vazias (Faivovich *et al.*, 2010). As desovas de *P. ayeaye* aqui observadas continham uma massa de cápsulas gelatinosas sem ovos, como observado também em outras espécies do gênero (Pyburn, 1980; Wogel *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Dentre as funções sugeridas para essas cápsulas, as principais seriam manter as superfícies das folhas dobradas, atuar na regulação dos níveis de umidade da desova antes da eclosão, evitando a desidratação e reduzindo a concentração de resíduos metabólicos, além de proteger os ovos contra radiação UVB (Pyburn, 1980; Faivovich, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

Shine (1979) sugeriu que machos são maiores que as fêmeas, ou de tamanho aproximado, quando ocorre combate físico. Porém, estudos recentes sobre evolução de dimorfismo sexual em tamanho em anuros indicam que a pressão para o aumento do corpo é maior nas fêmeas quando comparado aos machos, ainda que estes apresentem sinais de territorialidade, como observado aqui (Han & Fu, 2012; Nali *et al.*, 2014). Em *Phyllomedusa ayeaye*, apesar da pequena amostragem, fêmeas foram maiores e mais pesadas que machos, como também observado para outras espécies do grupo, como *P. megacephala* (Oliviera *et al.*,

2011) e *P. azurea* (Costa *et al.*, 2010). O fato de as fêmeas serem maiores e mais pesadas que os machos pode estar relacionado a uma maior pressão para o aumento do corpo da fêmea devido a "hipótese da vantagem da fecundidade"; i. e., um maior tamanho das fêmeas estaria relacionado à uma maior fecundidade (e.g., produção de mais ovos ou ovos maiores) (Shine, 1989; Nali *et al.*, 2014).

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, P. A.; WOGEL, H. 2004. Breeding behavior of the leaf-frog *Phyllomedusa burmeisteri* (Anura: Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, n. 2, p. 125-135.
- AICHINGER, M. 1987. Annual activity patterns of anurans in a seasonal Neotropical environment. **Oecologia**, v. 71, p. 583 - 592.
- ANTUNES, A. P. 2007. **Descrição taxonômica e história natural de uma nova espécie de *Hypsiboas* da Mata Atlântica do alto da Serra do Paranapiacaba, estado de São Paulo (Amphibia, Anura, Hylidae)**, Dissertação (Mestrado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- ARAÚJO, C. O.; CONDEZ, T. H.; HADDAD, C. F. B. 2007. Amphibia, Anura, *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966): Distribution extension, new state record, and geographic distribution map. **Check list**, v. 3, p. 156 - 158.
- ARAÚJO, C. O.; CONDEZ, T. H. ; SAWAYA, R. J. 2009. Anfíbios anuros do Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, sudeste do Brasil, e suas relações com outras taxocenoses no Brasil. **Biota Neotropica** (Ed. Portuguesa), v. 9, p. 1 - 22.
- BAÊTA, D.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; POMBAL JR, J. P. 2009. *Phyllomedusa itacolomi* Caramaschi, Cruz & Feio, 2006, a junior synonym of *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966) (Hylidae, Phyllomedusinae). **Zootaxa**, v. 2226, p. 58 – 65.
- BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B. 1999. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann) (Anura, Hylidae) na Floresta Atlântica, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, p. 409 - 421.

- BECKER, C. G.; FONSECA C. R.; HADDAD, C. F. B.; BATISTA, R. F., PRADO, P. I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 319, p. 1775 - 1777.
- BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. 2011. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 9893 - 9898.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M. T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 161 – 167.
- BRADFIELD, K. S. 2004. Photographic identification of individual Archey's frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings. **Doc Science Internal Series**, v. 191.
- BRANDÃO, R. A.; ÁLVARES, G. F. R.; CREMA, A.; ZERBINI G. J. 2009. Natural History of *Phyllomedusa centralis* (Anura: Hylidae: Phyllomedusinae): Tadpole and Calls. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 61 - 68.
- BRASILEIRO, C. A.; SAWAYA, R. J.; KIEFER, M. C.; MARTINS, M. 2005. Amphibians of an open Cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1 - 17.
- CAMURUGI, F.; JUNCÁ, F. 2013. Reproductive biology of *Hypsiboas atlanticus* (ANURA: HYLIDAE). **Herpetology Notes**. V. 6, p. 489 - 495.
- CARAMASCHI, U. 2006. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1962 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 159-179.
- CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. 2006. A new species of *Phyllomedusa* Wagler, 1830 from the State of Minas Gerais, Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia**, v. 524, p. 1 – 8.

- COSTA, T. B.; GUIMARÃES, L. D.; BASTOS, R. P. 2010. Territorial and mating behavior in *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) at a temporary pond in west-central Brazil. **Phyllomedusa**, v. 9, n. 2, p. 99 - 108.
- CRUMP, M. L. 1974. Reproductive strategies in a tropical anuran community. **Miscellaneous Publication of the Museum of Natural History, University of Kansas**, v. 61, p. 1 - 68.
- CRUMP, M. L.; KAPLAN, R. H. 1979. Clutch energy partitioning of Tropical tree frogs (Hylidae). **Copeia**, v. 1979, n. 4, p. 626 - 635.
- CUSHMAN, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological conservation**, v. 128, p. 231 - 240.
- DE LA RIVA, I. 1999. A new *Phyllomedusa* from southwestern Amazonia (Amphibia: Anura: Hylidae). **Revista Española de Herpetología**, v. 13, p. 123 - 131.
- DIAS, T. M.; MARAGNO, F. P.; PRADO, C. P. A.; CECHIN, S. Z. 2014. Reproductive site selection in the leaf-frog *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 (Anura: Hylidae) in altered areas of the Brazilian Cerrado. **Journal of Natural History**, [v. 48, p. 43 - 44](#).
- DONNELLY, M. A.; GUYER, C. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of Neotropical hylid frogs. **Oecologia**, v. 98, p. 291 - 302.
- DUELLMAN, W. E. 1988. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American Tropics. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 79-104.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibians**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 670 p.
- DZIMINSKI, M. A.; ROBERTS, J. D. 2006. Fitness consequences of variable maternal provisioning in quacking frogs (*Crinia georgiana*). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 19, p. 144 - 155.

- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; BAÊTA, D., JUNGFER, K.; ÁLVARES, G. F. R.; BRANDÃO, R. A.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, L. S.; BARRIO-AMÓROS, C. L.; CRUZ, C. A. G.; WHEELER, W. C. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics**, v. 26, p. 227–261.
- FREITAS, E. B.; DE-CARVALHO, C. B.; FARIA R. G., BATISTA, R. C.; BATISTA, C. C., COELHO, W. A.; BOCCIGLIERI, A. 2008. Ecological niche and aspects of the natural history of *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae, Phyllomedusinae) in the Cerrado of Central Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4.
- FROST, D. R. 2014. Amphibian Species of the World an Online Reference. Version 6.0 (08/01/2015). Eletronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> . American Museum of Natural History, New York, USA.
- GIOVANELLI, J. G. R.; ARAÚJO, C. O.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. 2008. Modelagem do nicho ecológico de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae): previsão de novas áreas de ocorrência para uma espécie rara. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 2, p. 59 – 65.
- HADDAD, C. F. B. & PRADO, C. P. A. 2005. Reproductive Modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, p. 207 – 217.
- HADDAD, C. F. B.; R. J. SAWAYA. 2000. Reproductive modes of Atlantic Forest hylid frogs: A general overview and the description of a new mode. **Biotropica**, v. 32, p. 862 - 871.
- HAN, X.; FU, J. 2013. Does life history shape sexual size dimorphism in anurans? A comparative analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13 n. 27.
- HINSHAW, S. H.; SULLIVAN, B. K. 1990. Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer* during reproduction. **Journal of Herpetology**, v. 24, p. 196-197.

- HOWARD, P. C.; VISKANIC, P.; DAVENPORT, T. R. B.; KIGENYI, F. W.; BALTZER, M.; DICKINSON, C. J.; LWANGA, J. S.; MATTHEWS, R. A.; BALMFORD, A. 1998. Complementarity and the use of indicator groups for reserve selection in Uganda. **Nature**, v. 394, p. 472-425.
- JANSEN, M. 2008. Intraspecific combat behavior of *Phyllomedusa boliviana* (Anura: Hylidae) and the possible origin of visual signaling in nocturnal treefrogs. **Herpetological Review**, v. 39, n. 3, p. 290 – 293.
- KENYON, N.; PHILLOTT, A. D.; ALFORD, R. 2010. A. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). **Herpetological Conservation and Biology** v.5 n.1, p.126-131.
- LEMCKERT, F. L.; SHINE, R. 1993. Costs of reproduction in a population of the frog *Crinia signifera* (Anura: Myobatrachidae) from Southeastern Australia. **Journal of Herpetology**, v. 27, p. 420 - 425.
- LOYOLA, R. F.; KUBOTA, U.; LEWINSOHN, T. M. 2007. Endemic vertebrates are the most effective surrogates for identifying conservation priorities among Brazilian Ecoregions. **Diversity and Distributions**, v. 13, p. 389 – 396.
- LOYOLA, R. F.; BECKER, C. G.; KUBOTA, U.; HADDAD, C. F. B.; FONSECA, C. R.; LEWINSOHN, T. M. 2008. Hung out to dry: Choice of priority ecoregions for conserving threatened Neotropical anurans depends on life-history traits. **Plos One**, v. 3, n. 5, p. 1 - 8.
- MONTEIRO, V. S.; IMAI, B.; PIRES, M. R. S. 2011. Comportamento postural de *Phyllomedusa ayeaye*. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço – MG.
- NALI, R. C., PRADO, C. P. A. 2012. Habitat use, reproductive traits and social interactions in a stream-dweller treefrog endemic to the Brazilian Cerrado. **Amphibia-Reptilia**, v. 33, p. 337 - 347.

- NALI, R. C., PRADO, C. P. A. 2014. Complex call with different messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a gladiator frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 48, p. 407 - 414.
- NALI, R.C., ZAMUDIO, K.R., HADDAD, C.F.B., PRADO, C.P.A. 2014. Size-dependent selective mechanisms on males and females and the evolution of sexual size dimorphism in frogs. **The American Naturalist**, v. 184, p. 727 - 740.
- OLIVEIRA F. F. R.; NOGUEIRA P. A. G.; ETEROVICK P. C. 2011. Natural history of *Phyllomedusa megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil, with descriptions of its breeding biology and male territorial behaviour. **Journal of Natural History**, v. 46, n. 1 - 2, p. 117 - 129.
- OSEEN, K. L., WASSERSUG, R. J. 2002. Environmental factor influencing calling in sympatric anurans. **Oecologia**, v. 133, n. 133, p. 616 - 625.
- POMBAL JR, J. P.; HADDAD, C. F. B. 1992. 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.
- PRADO, C. P. A., HADDAD, C.F.B. 2003. Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multiple spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 354 - 362.
- PRADO, C. P. A.; HADDAD, C. F. B. 2005. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, South-Western Brazil. **Herpetological Journal**, v. 15, p. 181 - 189.
- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. 2002. Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. **Copeia**, v. 2002, n. 4, p. 1128 - 1133.

- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. 2005. Breeding patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 211 - 221.
- PYBURN, W. F. 1980. The function of eggless capsules and leaf in nests of the frogs *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura: Hylidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 93 p. 153 - 167.
- QUEIROLO, D.; MOTTA-JUNIOR, J. C. 2007. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. **Acta Theriologica**, v. 52, p. 391 - 402.
- RÄSÄNEN, K.; LAURILA, A.; MERILÄ, J. 2005. Maternal investment in egg size: environment and population-specific effects on offspring performance. **Oecologia**, v. 142, p. 546-553.
- RODRIGUES, D. J.; LOPES, F. S.; UETANABARO, M. 2003. Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura: Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 93, n. 4, p. 365 - 371.
- ROITHMAIR, M. E. 1992. Territoriality and male mating success in the dart-poison frog, *Epipedobates femoralis* (Dendrobatidae, Auro). **Ethology**, v. 92, p. 331 - 343
- ROMERO, R. & NAKAJIMA, J. N. 1999. Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 259 - 265.
- SAENZ, D. FITZGERALD, L. A., BAUM, K. A., CONNER, R. N. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature and season. **Herpetological Monographs**, v. 20, n. 1, p. 64 - 82.

- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F.B.; LANGONE, J.; GARCIA, P. C. A. 2014. Brazilian amphibians: List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, p. 37 - 48.
- SHINE, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. **Copeia**, v. 1979, p. 297 – 306.
- SKERRAT, L. F.; BERGER L.; SPEARE, R.; CASHINS, S. MCDONALD, K. R.; PHILLOT, A. D.; HINES, H. B.; KENYON, N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **Eco Health**, v. 4, p. 125 – 134.
- STEEN, D. A.; MCCLURE, C. J. W.; GRAHAM S. P. 2013. Relative influence of weather and season on anuran calling activity. **Canadian Journal of Zoology**, v. 91, p. 462 – 467.
- TOLEDO, L. F. 2004. **Biologia reprodutiva de *Scinax fuscomarginatus* em um fragmento de cerrado no sudeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. 2010. Is it all death feigning? Case in anurans. **Journal of Natural History**, v. 44, n. 31, 1979 - 1988.
- VAIRA, M. 2001. Breeding biology of the leaf frog, *Phyllomedusa boliviana* (Anura: Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 22, n. 4, p. 421 - 429.
- VENÂNCIO, N. M.; MELO-SAMPAIO, P. R. 2010. Reproductive behavior of the giant leaf frog *Phyllomedusa bicolor* (Anura: Hylidae) in the western Amazon. **Phyllomedusa**, v. 9, n. 1, p. 63 - 67.
- WALLS, S. C.; BARICHIVICH, W. J.; BROWN, M. E. 2013. Drought, deluge and declines: the impact of precipitation extremes on amphibians in a changing climate. **Biology**, v. 2, p. 399 - 418.
- WELLS, K. D. 1977a. Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). **Ecology**, v. 58, n. 4, p. 750-762.

- WELLS, K. D. 1977b. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p. 666 - 693.
- WELLS, K. D. 1979. Reproductive behavior and male mating success in a Neotropical toad, *Bufo typhonius*. **Biotropica**, v. 11, p. 301-307.
- WELLS, K. D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- WOGEL, H.; ABRUNHOSA, P. A.; POMBAL-JR, J. P. 2005. Breeding behaviour and mating success of *Phyllomedusa rohdei* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 22, p. 2035 - 2045.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. New Jersey, Prentice Hall.

APÊNDICE

The advertisement and release calls of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae),
with comments on social context of emission



Renato Christensen Nali, Marília Merli Borges e Cynthia Peralta de Almeida Prado

(Aceito para publicação na revista Zoologia: An International Journal for Zoology)

The advertisement and release calls of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae), with comments on social context of emission

Renato C. Nali^{1,*}, Marília M. Borges¹, Cynthia P. A. Prado²

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author, e-mail: r_nali@yahoo.com.br

Abstract

Male calls play different roles in anuran social organization, such as female attraction, territoriality, and spacing between males. However, calls and associated behaviors remain poorly described for many anuran species. Here we describe the advertisement and release calls of the treefrog *Phyllomedusa ayeaye* and report on social context of emissions and a physical combat. Approximately 35 minutes of digital recordings from 34 hours of observations were obtained at one breeding site in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. Bioacoustic analysis showed that males emitted two types of advertisement calls: (1) simple call (a sequence of short pulsed notes) and (2) composite call (a sequence of short pulsed notes followed by a long pulsed note). Composite calls were emitted more frequently during more intense chorus activity, with various active males at the breeding site. The release call was also composed by short pulsed notes, with a wider spectrum of frequencies and emitted more rapidly than the advertisement calls. Our observations on the species' behavior indicate that the composite call may be a mixed advertisement call, with an aggressive component directed to males (long notes), and an advertisement component directed to females (short notes). However, future studies need to be conducted to test this hypothesis. The description of *P. ayeaye* calling repertoire in the light of social context will be useful for further behavioral and taxonomic studies on this poorly known species.

Keywords: Aggressive behavior, bioacoustics, Cerrado, composite call, Phyllomedusinae.

Introduction

Calling activity is one of the most remarkable topics in anuran behavior because of the complex vocal repertoire often found (WELLS 2007). Males of a single species generally emit more than one type of call, and each one can be associated with different social roles (TOLEDO *et al.* 2014, BRUNETTI *et al.* 2015). The opposite situation is also possible, in which a single type of call may carry more than one message, i.e., a mixed call (WELLS 1988, GERHARDT 1992). For instance, the advertisement call, the most studied reproductive call (TOLEDO *et al.* 2014), may attract females, warn conspecifics about the male's position, signal body size, and serve for individual recognition (LESBARRÈRES & LODÉ 2002, NALI & PRADO 2014a). Moreover, in species with extensive calling seasons, the advertisement call may stimulate the reproductive physiology of females, maintaining their reproductive condition (LEA *et al.* 2001).

The release call is another type of reproductive call, and it signals lack of reproductive receptivity (TOLEDO *et al.* 2014). In general, anuran males emit release calls when mistakenly amplexed by other males during reproductive events (WELLS 2007), but they can also emit release calls during physical aggressive interactions (BASTOS & HADDAD 1995; BRUNETTI *et al.* 2015). In some species, both males and non-receptive females may display release vibrations when amplexed by other males, rather than producing audible sounds (BOGERT 1960, PENNA & VELOSO 1982). Release calls can be used as a diagnostic character in closely related species (GRENAT & MARTINO 2013). Moreover, it has been suggested that advertisement calls of frogs may have evolved from simple release calls (RAND 1988, SCHMIDT *et al.* 1990), but scarce information on anuran release calls have precluded a phylogenetic analysis of this hypothesis (WELLS 2007). Altogether, the description of both advertisement and release calls for anuran species is highly relevant (GRENAT & MARTINO 2013, TOLEDO *et al.* 2014).

The genus *Phyllomedusa* (Anura: Hylidae) currently includes 30 recognized treefrogs (FROST 2014). The species *Phyllomedusa ayeaye* (LUTZ 1966) belongs to the *P. hypochondrialis* group (*sensu* FAIVOVICH *et al.* 2010), and was described from Morro do Ferro (21°48' S, 46°35' W; 1400-1540 m elevation), municipality of Poços de Caldas, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. This species occurs at the Atlantic forest and adjacent Cerrado, among the most threatened formations in Brazil, suffering from major threats such as habitat loss caused by deforestation, fire, mining and pollution (SILVA & BATES 2002, HADDAD & SAZIMA 2008, RIBEIRO *et al.* 2009). Currently, there is a discrepancy in the

conservation status of *P. ayeaye*, since it is classified as Critically Endangered (CR) by the IUCN (CARAMASCHI *et al.* 2010), while it is no longer considered endangered by the new List of Threatened Species of the Brazilian Fauna (ICMBIO, 2014). Indeed, an ecological niche modeling uncovered a theoretical broader geographic distribution for the species (GIOVANELLI *et al.* 2008). Following, *P. itacolomi* CARAMASCHI, CRUZ & FEIO 2006 and *P. ayeaye* were synonymized based on morphology, which expanded *P. ayeaye* distribution area (BAËTA *et al.* 2009). However, little is known about the natural history of this species, including calling behavior and repertoire, precluding inference on the real population status. Thus, herein, we describe the advertisement and release calls of *Phyllomedusa ayeaye* recorded from the state of Minas Gerais, southeastern Brazil, and report on male-male fight and social functions of the different notes emitted.

Materials and Methods

The study was conducted in the municipality of Sacramento, Minas Gerais state, southeastern Brazil, in the Cerrado of the Serra da Canastra mountain range. The region has a markedly seasonal regime, with a dry winter (April – September) and a hot and rainy summer (October – March); the topography is mountainous (up to 1,500 m elevation), with deep valleys and many streams, and the landscape is composed of savannas, grassland fields, gallery forests alongside streams, and small regions of semideciduous forest (DIETZ 1984). Individuals of *P. ayeaye* were active in a pond associated with a temporary stream (20°13'09.9"S; 47°06'21"W; 880 m elevation), distant ca. 180 km in straight line from the type locality.

Fieldwork was conducted from October 2010 to January 2011, and in February 2014, obtaining approximately 35 minutes of digital recordings from 34 hours of direct observations. Males were located at night at the breeding site guided by their calls and focal males were observed to investigate social functions of the calls emitted (e.g. NALI & PRADO 2014a). Six males were collected, anesthetized with 10% lidocaine, fixed in 10% formalin, preserved in 70% ethanol (MCDIARMID 1994), and deposited at Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoologia, I.B., Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo state, Brazil (voucher numbers: CFBH32772 – 32775, CFBH32777, CFBH32779). Body sizes (snout-vent length, SVL) of these six specimens were measured with a digital caliper to the nearest 0.01 mm, as well as the body sizes of five other males captured in the field and released at the same site. Air temperature was measured every night with a digital thermo-hygrometer to the nearest 0.1°C.

For the recordings, we used a Marantz Professional PMD-660 digital recorder, with unidirectional microphone Sennheiser ME66, at 16 bit resolution and 44,100 Hz sampling rate. Bioacoustic analyses were made in the software Raven Pro 1.3 (Cornell Lab of Ornithology), using FFT = 512 (Fast Fourier Transformation). Short notes of the simple call, short notes of the composite call, and long notes were analyzed separately. We gently simulated an axillary amplexus, characteristic of the species (R. C. NALI, pers. obs.), to record the release calls of each male either in the field at the same night or in the laboratory the day after male collection. We adopted the following terminology (adapted from MARTINS & JIM 2003, TOLEDO *et al.* 2014): (1) call: a sequence of sounds produced and emitted in a temporal pattern; (2) note: temporally discrete vocalization units composing the call; (3) pulse: subdivision of the note in smaller temporal units. We measured the following bioacoustic parameters: number of short notes emitted in sequence, number of pulses/note, note duration (s), interval between notes (s), and minimum, maximum and dominant frequencies (Hz). We then tested for statistical differences between parameters of the short notes of the simple and composite calls using Student's *t*-tests (ZAR 1999).

Additionally, to evaluate male aggressive responses, we stimulated resident males acoustically and visually. The acoustic stimulus was a recording in WAV format (approximately one minute), containing four simple advertisement calls with an average of 9 short notes emitted in sequence (air temperature of recording = 21.8°C). This recording was broadcasted to a resident calling male at a distance of 40 cm, using a digital recorder connected to a mini-speaker. The visual stimulus consisted on placing an intruder male ca. 15 cm distant from the resident male; in this case, a video was recorded using a Canon 7 digital camera.

Results

Males of *Phyllomedusa ayeaye* had an average SVL of 33.17 ± 1.94 mm (31.28 – 36.6 mm; $N = 11$), and mostly called from leaves and branches of small trees and bushes surrounding the stream, about 1.5 to 2 m above water or soil. We recorded the advertisement calls of two collected males (10 Oct 2010, air temperature = 18.5°C; 15 Dec 2010, air temperature = 21.4°C) and four uncollected males (17 Nov 2010, air temperature = 22.2°C; 19 Feb 2014, air temperature = 23.5°C). Males of *P. ayeaye* emitted (1) simple advertisement calls with an average of six short pulsed notes, or (2) composite advertisement calls with a sequence of an average of six short pulsed notes followed by one long pulsed note (Fig. 1, Table 1). We noticed that the composite calls were mostly emitted during more intense chorus

activity, with various active males at the breeding site. Short notes of the simple call were statistically different from those of the composite call regarding N pulses/note (Student's $t_{116} = 9.1$, $P < 0.001$), note duration ($t_{131} = 3.8$, $P < 0.001$), maximum frequency ($t_{112} = 16.9$, $P < 0.001$), minimum frequency ($t_{112} = 7.3$, $P < 0.001$), and dominant frequency ($t_{112} = 5.2$, $P < 0.001$; Table 1); on the other hand, the two types of short notes were similar regarding N notes emitted in sequence ($t_{44} = -0.7$, $P = 0.49$) and interval between notes ($t_{121} = 1.4$, $P = 0.16$; Table 1).

We recorded the release calls of five collected males (14–15 Nov 2010, air temperature = 23°C; 17 Jan 2011, air temperature = 21°C) and one uncollected male (10 Oct 2010, air temperature = 18.5°C). The release call of *P. ayeaye* was also composed by short pulsed notes, but somewhat different from the short notes of the advertisement call (Fig. 2, Table 2). For instance, the mean interval between the short notes of the advertisement calls was about three times longer than that of the short notes of the release call. In general, spectral parameters of the release calls varied more and showed a wider spectrum of frequencies than the advertisement calls. We did not count the number of short notes emitted in sequence for the release calls, because it depended on how long we stimulated the male. This type of call was audibly more vigorous than the short notes of the advertisement calls.

We concentrated on behavioral observations on 18 Feb 2014 (air temperature = 23.2°C). We observed a fight already in progress between two uncollected males (SVLs = 36.6 and 33.1 mm, Fig. 3). At 9:26pm, they were found hanging from a branch and holding each other, remaining still for 7 minutes. Afterwards, one of the males started moving towards a nearby branch, and 2 minutes after reaching this branch with its front limbs, it managed to escape from the opponent. No calls were emitted during the time we observed the fight. The acoustic stimulation of one resident calling male (SVL = 35 mm) triggered an aggressive response, in which the individual moved towards the speaker and responded vigorously with short notes followed by long notes (composite call). When we visually stimulated a resident male (SVL = 36.38) by placing another male (SVL = 33.2 mm) on the same branch, they started moving around the branches, first quietly, then calling aggressively to each other, using the composite call. No physical interactions were observed at this time, but males emitted approximately three short notes followed by a long note, rather than six short notes followed by a long note (Table 1). Similar acoustic aggressive interactions were observed in natural conditions, in which two males called vigorously to each other using both short and long notes.

Discussion

At the beginning of the calling activity or when individuals called isolated, simple advertisement calls (short notes only) were commonly emitted. During more intense chorus activity, with various active males at the breeding site, males emitted mostly composite advertisement calls (short and long notes). The short notes of both simple and composite calls were similar in number of notes emitted in sequence and interval between notes, but differed in number of pulses per note, note duration, maximum, minimum and dominant frequencies. We suggest that the composite advertisement call emitted by *P. ayeaye* is a mixed call, with one part possibly directed to females (short notes, advertisement) and the other directed to males (long notes, aggressiveness; see below). Male territoriality and reproductive success are often related in anurans (e.g. WELLS 1977; URSPRUNG *et al.* 2011), even though the emission of aggressive territorial signals might represent energy expenditure that could be used to attract females (WELLS 1988, LINGNAU *et al.* 2004). Males of *P. ayeaye* tend to maintain territories along the stream (M. M. BORGES, unpublished data), so mixed calls could be an efficient strategy used by males to convey messages on both female attraction and spacing between males, mainly in situations of high density (WELLS 1988; NALI & PRADO 2014a).

We observed one physical combat in progress between males of *P. ayeaye*, a behavior known for other species in this genus (ABRUNHOSA & WOGEL 2004, WOGEL *et al.* 2004, COSTA *et al.* 2010, VILAÇA *et al.* 2011). Fighting calls are common during anuran male fights, but they can be emitted sporadically and/or at the beginning of the fight (COSTA *et al.* 2010; NALI & PRADO 2014b; TOLEDO *et al.* 2014); thus, we may have failed to observe this type of call for this species. Acoustic aggressive interactions have also been reported for other congeners; for instance, *P. nordestina* has a territorial call emitted intercalated with advertisement calls (VILAÇA *et al.* 2011), which is very similar to the long note of the composite call described here for *P. ayeaye*. A similar long note was also described for *P. centralis*, emitted by males as a response to playbacks (BRANDÃO *et al.* 2009). Males of *P. ayeaye* did not emit long notes alone, but always after a sequence of short notes (fig 2B), and that was observed (a) without our interference, (b) when we acoustically stimulated a resident male, and (c) when we placed an intruder male next to a resident male, in which case they emitted less short notes and more long notes to each other. These evidences support that in *P. ayeaye* (1) the long note of the composite advertisement call is probably aggressive and directed to males, and (2) this type of note might be a part of a mixed advertisement call, and not an aggressive call itself. We encourage further systematic experiments in the field using

acoustic and visual stimulation on males to confirm social function of notes, and test whether their parameters can change in escalated aggressive interactions (e.g. MARTINS & HADDAD 1988, NALI & PRADO 2014a).

Release call descriptions are scarce compared to those of advertisement calls (TOLEDO *et al.* 2014). The release call of *P. ayeaye* was composed by short pulsed notes, which are similar to those of the advertisement calls. However, the average interval between notes was shorter than that of the advertisement calls, and spectral parameters varied much more, with a wider spectrum of frequencies (Table 2). Short pulsed notes are also characteristic of the release call of *P. rohdei*, similar to its territorial call type 1, but with lower intensity (WOGEL *et al.* 2004). Release calls composed by short pulsed notes may represent a shared phylogenetic trait, as both species belong to the *P. hypochondrialis* group (FAIVOVICH *et al.* 2010), but more studies with this type of call are needed. Besides phyllomedusines, the release call of the hyliid *Hypsiboas goianus* showed harmonic structure similar to the advertisement call, although some acoustic parameters differed on average from those of the advertisement and aggressive calls (DIAS *et al.* 2014). The release call of the toad *Rhinella jimi* (family Bufonidae) was composed by several randomly spaced and distributed notes, with variable amplitude and dominant frequency similar to its advertisement call (GARDA *et al.* 2010). In addition to what we found for *P. ayeaye*, these examples highlight a number of similar traits between release and advertisement calls, which strengthens the idea that the advertisement calls of anurans may have originally evolved from simple release signals (RAND 1988, SCHMIDT *et al.* 1990).

Descriptive aspects of natural history are crucial to applied biologists because they underlie many aspects of conservation, management and nature appreciation (BROOKS & MCLENNAN 2002, DAYTON 2003). Herein we provide the first description of the calling repertoire of *Phyllomedusa ayeaye*, which may be helpful in future taxonomic studies (e.g. BAËTA *et al.* 2009). Furthermore, our observations on male aggressiveness and comments on the social aspects of the composite call in *P. ayeaye* will be useful for further behavioral studies on this species and closely related ones that did not have their calls described and/or not properly classified (TOLEDO *et al.* 2014).

Acknowledgements

The authors are grateful to B. F. Fiorillo, I. A. Martins, the editors and two anonymous reviewers for the comments on this manuscript; B. F. Fiorillo, D. Baêta, B. Piato, D. B.

Delgado, C. M. Mazzarelli and L. Cholak for help with fieldwork; Neotropical Grassland Conservancy for the field equipments. R. C. Nali received graduate fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq proc. # 130737/2010-0) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP proc. # 2010/03656-6 and proc. # 2012/06228-0). M. M. Borges received a graduate fellowship from the CNPq (proc. # 130278/2013-0). C. P. A. Prado is CNPq research fellow (proc. # 301125/2013-9), and received grants from CNPq (proc. # 471106/2010-0) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP proc. # 2009/12013-4). Capture of individuals was authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, permit # 19269-1).

Literature Cited

- ABRUNHOSA, P. A & H. WOGEL. 2004. Breeding behavior of the leaf-frog *Phyllomedusa burmeisteri* (Anura, Hylidae). **Amphibia-Reptilia** **25**:125-135
- BAÊTA, D.; U. CARAMASCHI; C. A. CRUZ & J. P. POMBAL-JR. 2009. *Phyllomedusa itacolomi* Caramaschi, Cruz & Feio, 2006, a junior synonym of *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966) (Hylidae, Phyllomedusinae). **Zootaxa** **2226**: 58-65.
- BASTOS, R. P. & C. F. B. HADDAD. 1995. Vocalizações e interações acústicas de *Hyla elegans* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. **Naturalia** **20**: 165–176.
- BOGERT, C. M. 1960. The influence of sound on the behavior of amphibians and reptiles, p. 137-320. In: W. E. LANYON & W. N. TAVOLGA (Eds.). *Animal sounds and communication*. Washington, AIBS.
- BRANDÃO, R. A.; G. F. R. ÁLVARES; A. CREMA & G. J. ZERBINI. 2009. Natural history of *Phyllomedusa centralis* Bokermann 1965 (Anura: Hylidae: Phyllomedusinae): Tadpole and calls. **South American Journal of Herpetology** **4**: 61-68.
- BROOKS, D. R. & D. A. MCLENNAN. 2002. **The Nature of Diversity: An Evolutionary Voyage of Discovery**. Chicago, University of Chicago.
- BRUNETTI, A. E.; C. TABOADA & J. FAIVOVICH. 2015. Extended vocal repertoire in *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology** **49**: 46-52.
- CARAMASCHI, U.; C. A. G. CRUZ; R. LIMA & R. BRANDÃO. 2010. *Phyllomedusa ayeaye*. In: The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Accessible online at: www.iucnredlist.org. [Accessed: 13 February 2012].
- COSTA, T. B.; L. D. A. GUIMARÃES & R. P. BASTOS. 2010. Territorial and mating behavior in *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) at a temporary pond in west-central Brazil. **Phyllomedusa** **9**: 99-108.

- DAYTON, P. K. 2003. The importance of the natural sciences to conservation. **The American Naturalist** **162**: 1-13.
- DIAS, T. M.; R. P. BASTOS; M. N. SIQUEIRA & A. R. MORAIS. 2014. The release call of *Hypsiboas goianus* (B. Lutz, 1968) (Anura: Hylidae) from Central Brazil. **Herpetology Notes** **7**: 215-217.
- DIETZ, J. M. 1984. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions to Zoology** **392**:1-51.
- FAIVOVICH, J.; C. F. B. HADDAD; D. BAÊTA; K. H. JUNGFER; G. F. R. ÁLVARES; R. A. BRANDÃO; C. SHEIL; L. S. BARRIENTOS; C. L. BARRIO-AMOROS; C. A. G. CRUZ & W. C. WHEELER. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics** **26**:227-261.
- FROST, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Accessible online at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. [Accessed: 10 February 2015].
- GARDA, A. A.; V. A. S. PEDRO & M. B. LION. 2010. The advertisement and release calls of *Rhinella jimi* (Anura, Bufonidae). **South American Journal of Herpetology** **5**: 151-156.
- GERHARDT, H. C. 1992. Multiple messages in acoustic signals. **Seminars in Neuroscience** **4**: 391-400.
- GIOVANELLI, R. G. J.; C. O. ARAUJO; C. F. B. HADDAD & J. ALEXANDRINO. 2008. Modelagem do nicho ecológico de *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae): previsão de novas áreas de ocorrência para uma espécie rara. **Neotropical Biology and Conservation** **3**: 59-65.
- GRENAT, P. R. & A. L. MARTINO. 2013. The release call as a diagnostic character between cryptic related species *Odontophrynus cordobae* and *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae). **Zootaxa** **3635**: 583-586.
- ICMBIO, INSTITUTO CHICO MENDES. 2014. **Lista de Espécies Ameaçadas**. Available online at: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>. [Accessed: 10 February 2015].
- LEA, J.; M. DYSON & T. HALLIDAY. 2001. Calling by male midwife toads stimulates females to maintain reproductive condition. **Animal Behavior** **61**: 373-77.
- LESBARRÈRES, D. & T. LODÉ. 2002. Variations in male calls and response to an unfamiliar advertisement call in a territorial breeding anuran, *Rana dalmatina*: evidence for the “dear enemy” effect. **Ethology Ecology & Evolution** **14**: 287-95.
- LINGNAU, R.; L. D. GUIMARÃES & R. P. BASTOS. 2004. Vocalizações de *Hyla wernerii* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. **Phyllomedusa** **3**: 115-120.

- MARTINS, I. A. & J. JIM. 2003. Bioacoustic analysis of advertisement call in *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) in Botucatu, São Paulo Brazil. **Brazilian Journal of Biology** **63**: 507-516.
- MARTINS, M. & C. F. B. HADDAD. 1988. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). **Amphibia-Reptilia** **9**: 49-60.
- MCDIARMID, R. W. 1994. Preparing amphibians as scientific specimens, p. 289-297. In: W. R. HEYER; M. A. DONNELLY; R. W. MCDIARMID; L. C. HAYEK & M. S. FOSTER (Eds.). Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians. Washington, Smithsonian.
- NALI, R. C. & C. P. A. PRADO. 2014a. Complex call with different messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a gladiator frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology** **48**: 407-414.
- NALI, R. C. & C. P. A. PRADO. 2014b. The fight call of *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura: Hylidae): first record for the genus. **Salamandra** **50**: 181-184.
- PENNA, M. & A. VELOSO. 1982. The warning vibration of *Pleurodema thaul*. **Journal of Herpetology** **16**: 408-410.
- RAND, A. S. 1988. An overview of anuran acoustic communication, p. 415-431. In: B. FRITZSCH; M. J. RYAN; W. WILCZYNSKI; T. E. HETHERINGTON & W. WALKOWIAK (Eds.). The evolution of the amphibian auditory system. New York, Wiley.
- RIBEIRO, M. C.; J. P. METZGER; A. C. MARTENSEN; F. J. PONZONI & M. M. HIROTA. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** **142**: 1141-1153.
- SCHMIDT, R. S.; C. P. KEMNITZ & W. R. HUDSON. 1990. Origin of anuran calling: description of toad releasing. **Journal of Experimental Zoology** **254**: 338-342.
- SILVA, J. M. C. & J. M. BATES. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience** **52**: 225-233.
- TOLEDO, L. F.; I. A. MARTINS; D. P. BRUSCHI; M. A. PASSOS; C. ALEXANDE & C. F. B. HADDAD. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethologica** **2014**: 1-13.
- URSPRUNG, E.; M. RINGLER; R. JEHL & W. HÖDL. 2011. Strong male/male competition allows for nonchoosy females: High levels of polygynandry in a territorial frog with paternal care. **Molecular Ecology** **20**: 1759-1771.

- VILAÇA, T. R. A.; J. R. S. SILVA & M. SOLÉ. 2011. Vocalization and territorial behaviour of *Phyllomedusa nordestina* Caramaschi, 2006 (Anura: Hylidae) from southern Bahia, Brazil. **Journal of Natural History** **45**: 1823-1834.
- WELLS, K. D. 1977. Territoriality and mating success in the green frog (*Rana clamitans*). **Ecology** **58**: 750-762.
- WELLS, K. D. 1988. The effects of social interactions on anuran vocal behavior, p. 433-454. In: B. FRITZSCH; M. J. RYAN; W. WILCZYNSKI; T. E. HETHERINGTON & W. WALKOWIAK (Eds.). The Evolution of the Amphibian Auditory System. New York, Wiley.
- WELLS, K. D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago, University of Chicago.
- WOGEL, H.; P. ABRUNHOSA & J. P. POMBAL-JR. 2004. Vocalizations and aggressive behavior of *Phyllomedusa rohdei* (Anura, Hylidae). **Herpetological Review** **35**: 239-243.
- ZAR, J. 1999. **Bioestatistical Analyses**. New Jersey, Prentice Hall.

Figures

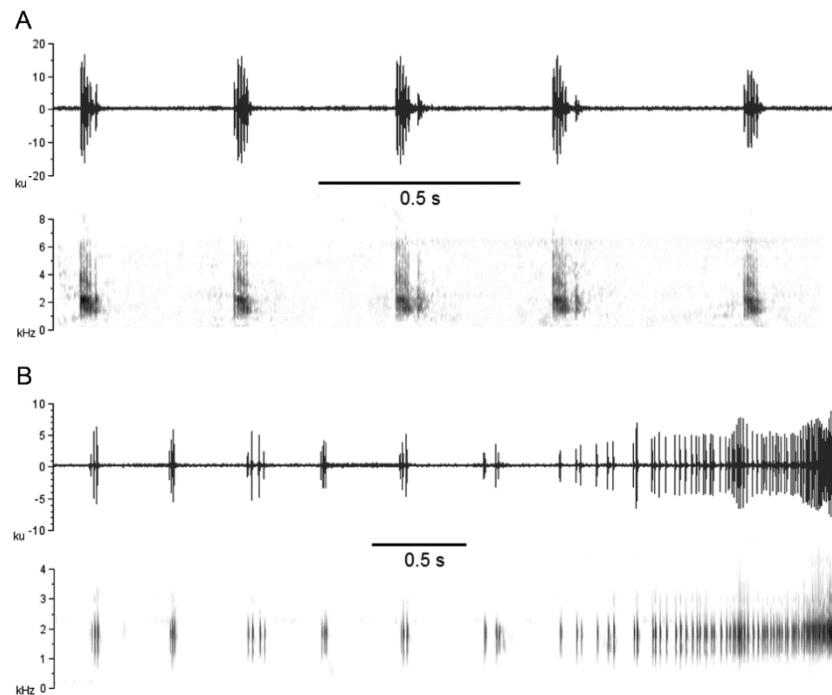


Figure 1. The two types of advertisement calls emitted by males of *Phyllomedusa ayeaye*, municipality of Sacramento, southeastern Brazil: (A) simple advertisement call, with only short notes (voucher specimen = CFBH32772, SVL = 31.84 mm, air temperature = 18.5°C); (B) composite advertisement call, with six short notes followed by one long note (unvouchered male, air temperature = 22.2°C). For each call, we show the oscillogram above and the spectrogram below (FFT = 256, contrast = 70 and brightness = 70).

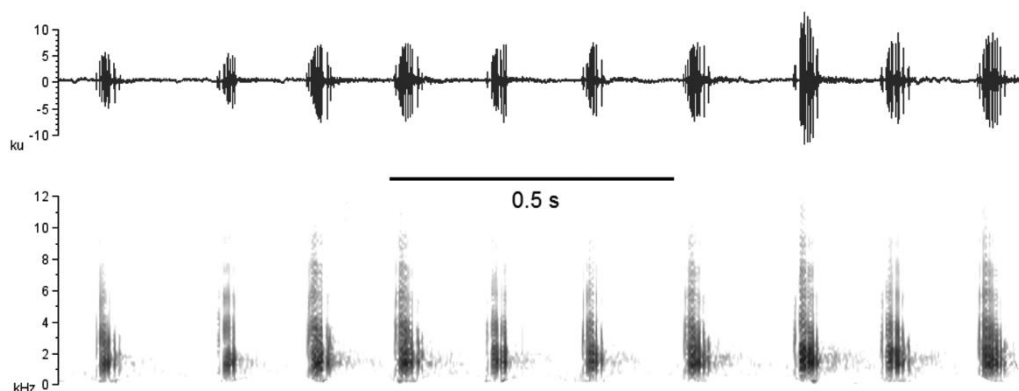


Figure 2. Sequence of *Phyllomedusa ayeaye* release call notes, municipality of Sacramento, southeastern Brazil (voucher specimen = CFBH32773, SVL = 32.08 mm, air temperature = 23°C; oscillogram above and spectrogram below, FFT = 256, contrast = 70 and brightness = 70). The call was emitted as we simulated an axillary amplexus with our fingers.



Figure 3. Physical combat between two males of *Phyllomedusa ayeaye*, municipality of Sacramento, southeastern Brazil (photograph by Bruno Piato).

Tables

Table 1. Acoustic parameters of the simple and composite advertisement calls of *Phyllomedusa ayeaye*, municipality of Sacramento, state of Minas Gerais, Brazil. Statistically different parameters are shown in bold (see text for details). *N*: sample size; SD: standard deviation.

	Mode	Mean	SD	Range	<i>N</i>
SHORT NOTES OF THE SIMPLE CALL					
<i>N</i> notes emitted in sequence	5	5.7	2.6	2 – 11	33
<i>N</i> pulses/note	7	6.3	1.5	3 – 11	78
Minimum frequency (Hz)	995.1	917.1	174.3	464.4 – 1209.2	82
Maximum frequency (Hz)	4858.7	5865.5	807.4	4450.3 – 7609.8	82
Dominant frequency (Hz)	1894.9	1986.3	145.4	1636.5 – 2239.5	82
Note duration (s)	0.068	0.080	0.021	0.045 – 0.132	101
Interval between notes (s)	0.442	0.388	0.075	0.279 – 0.674	76
SHORT NOTES OF THE COMPOSITE CALL					
<i>N</i> notes emitted in sequence	7	6.3	3.4	2 – 13	13
<i>N</i> pulses/note	3	3.9	1.0	3 – 6	40
Minimum frequency (Hz)	612.8	676.1	108.6	459.7 – 919.3	32
Maximum frequency (Hz)	3370.7	3379.1	285.1	2922.4 – 4119.7	32
Dominant frequency (Hz)	1808.8	1849.2	48.8	1808.8 – 1981.1	32
Note duration (s)	0.055	0.064	0.022	0.043 – 0.121	32
Interval between notes (s)	0.302	0.367	0.084	0.244 – 0.710	47
LONG NOTES OF THE COMPOSITE CALL					
<i>N</i> pulses/note	74.0	69.2	14.2	48 – 84	16
Minimum frequency (Hz)	830.3	765.9	69.9	649.8 – 899.5	16

Maximum frequency (Hz)	4428.5	4144.0	300.1	3820 – 5051.3	16
Dominant frequency (Hz)	1894.9	1890.6	109.9	1722.7 – 2239.5	20
Note duration (s)	—	1.198	0.323	0.655 – 1.747	23

Table 2. Acoustic parameters of the release call of *Phyllomedusa ayeaye*, municipality of Sacramento, state of Minas Gerais, Brazil.

	Mode	Mean	SD	Range	<i>N</i>
<i>N</i> pulses/note	9	9.5	2.7	5 – 17	108
Minimum frequency (Hz)	490.0	501.5	113.9	294.0 – 895.1	113
Maximum frequency (Hz)	7301.0	8433.2	1806.9	4668.5 – 11946.9	113
Dominant frequency (Hz)	1550.4	1651.8	612.9	861.3 – 4651.2	113
Note duration (s)	0.050	0.051	0.008	0.031 – 0.072	113
Interval between notes (s)	0.095	0.129	0.044	0.077 – 0.344	90

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A população de *Phyllomedusa ayeaye* apresentou padrão reprodutivo intermediário entre o explosivo e o prolongado, com atividade durante toda a estação chuvosa e alguns eventos explosivos.
- ✓ A atividade reprodutiva foi influenciada pela temperatura do ar e a ausência de correlação com a precipitação poderia ser explicada pelo fato do estudo ter sido conduzido, principalmente, durante uma estação chuvosa atípica, com baixos índices de pluviosidade.
- ✓ Machos utilizaram principalmente folhas e galhos de arbustos de *Leandra* sp. (Melastomataceae) como sítios de canto, onde também as desovas foram encontradas. A altura média dos sítios de canto em relação à água foi de 62,19 cm.
- ✓ O modo reprodutivo de *P. ayeaye* (modo 24, *sensu* Haddad & Prado, 2005) pode ser considerado típico entre espécies do gênero *Phyllomedusa*.
- ✓ Os girinos de *Phyllomedusa ayeaye* se desenvolvem em riachos temporários, porém a maioria das espécies do gênero não mostra associação com riachos, exceto algumas outras espécies do grupo *P. hypochondrialis* e *P. vaillantii*.
- ✓ As desovas foram encontradas em folhas dobradas de *Leandra* sp. e, além dos ovos, possuíam cápsulas gelatinosas sem ovos, as quais podem, juntamente com a folha pilosa, desempenhar um papel importante de propiciar um microambiente protegido e úmido para ovos e embriões.
- ✓ O tamanho (CRC e massa) do corpo das fêmeas foi significativamente maior que o dos machos, assim como o investimento reprodutivo em gônadas (fêmeas = 4,25%; machos = 0,35%). A média do N de ovos por desova foi de $29 \pm 2,38$ e o diâmetro médio dos ovos foi de $2,84 \pm 0,02$.

- ✓ Observamos que podem ocorrer combates físicos entre os machos, assim como vocalizações agressivas.
- ✓ Machos de *Phyllomedusa ayeaye* podem emitir dois tipos de canto de anúncio: (1) o canto simples, composto por uma sequência de notas curtas e (2) o canto composto, com uma sequência de notas curtas seguidas de uma nota longa.
- ✓ O canto de soltura da espécie é composto por notas curtas pulsadas, com maior amplitude de frequência e emitidos mais rapidamente em comparação ao canto de anúncio.