

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Zoologia  
Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Caroliny Helena Moreira Fernandes

**Status taxonômico de *Ololygon rizibilis* (Bokermann, 1964)**

**(Anura: Hylidae)**

Belo Horizonte  
2020

Caroliny Helena Moreira Fernandes

**Status taxonômico de *Ololygon rizibilis* (Bokermann, 1964) (Anura: Hylidae)**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchietta Garcia

Belo Horizonte

2020

043

Fernandes, Caroliny Helena Moreira.

Status taxonômico de *Oloolygon rizibilis* (Bokermann, 1964) (Anura: Hylidae) [manuscrito] / Caroliny Helena Moreira Fernandes. – 2020.

49 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchietta Garcia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Zoologia. 2. Taxonomia. 3. Anuros. I. Garcia, Paulo Cristiano de Anchietta. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caroliny Helena Moreira Fernandes**

Ao sexto dia do mês de julho do ano de dois mil e vinte, às quatorze horas, ocorreu a defesa de Mestrado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria da Mestranda Caroliny Helena Moreira Fernandes intitulada: “**Status taxonômico de *Ololygon rizibilis* (Bokermann, 1964) (Anura: Hylidae)**”. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para a candidata para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Rafael Félix de Magalhães, Rubens Pasa, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata.

Após a arguição, apenas os Srs. Examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: a dissertação foi:

- Aprovada sem alterações  
 Aprovada com alterações (observações em anexo)  
 Reprovada

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 06 de julho de 2020.

| Comissão Examinadora                                       | Assinatura |
|--|------------|
| Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia (orientador) |            |
| Prof. Dr. Rafael Félix de Magalhães                        |            |
| Prof. Dr. Rubens Pasa                                      |            |



Observações:

Solicitação de alterações propostas pela Banca

1. Reestruturação do texto, com delimitação clara de Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão;
2. Padronização das citações;
3. Correção dos objetivos;
4. Redefinição dos grupos amostrais, tendo em vista o protocolo de taxonomia integrativa escolhido;
5. Readequação das metodologias e texto em relação aos grupos redefinidos; 6. Reanálise de dados morfométricos.

A candidata terá três meses (até 06 de outubro do presente) para fazer a readequação e entregar nova cópia ao Programa. A verificação das modificações ficará aos encargos do Orientador.

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Paulo que abriu as portas do laboratório de Herpetologia e aceitou me orientar e ensinar sobre anuros. Obrigada aos professores Mônica Rodrigues, Rubens Pasa e Karine Kavalco que são inspiração a muitos alunos da UFV- CRP e que me incentivaram a encarar o mestrado na UFMG.

Gostaria de agradecer ao meu tio Pe. Januário que, junto a Vó Elza, me acolheu em BH e sempre me incentiva a buscar o crescimento pessoal todos os dias.

Aos meus pais que me ensinaram a buscar independência e conhecimento para enfrentar o mundo. À minha irmã Ana que, como grande conselheira que é, me todos os dias me incentivava a não desistir agora para “ficar rica e chorar em Paris amanhã”.

Ao Bruno por todo amor, pelas horas a fio no telefone discutindo sobre biologia, vida, o universo e tudo mais e pelo suporte emocional, companheirismo e apoio. Obrigada também por ter me ensinado bioacústica, e a utilizar o Raven.

Ao Nathan que se tornou meu psicólogo amador, a Luh e Gustavo, obrigada pelo carinho e por me receberem em BH.

Aos amigos que a pós-graduação me trouxe e que vou levar para vida: Amandinha, Ju, Junior, Lucas, Lewi, Snaydia, Pedro e Babi. Obrigada por todas as risadas, cervejas, choros e conversas aleatórias. Vocês tornaram essa etapa menos maçante e divertida. Espero com ansiedade o dia que vamos ter nosso laboratório e a mesa de RPG com personagens inspirados nessa nossa saga.

Aos colegas do laboratório de Herpetologia que são incríveis em perceber se você precisa de um café ou de uma boa prosa. Obrigada por amparar essa pobre ex-peixes. Especialmente a Carol que me acompanhou em uma aventura (de ônibus) a Ilha do Arvoredo em Santa Catarina, me ensinou a trabalhar com análise molecular e a coletar. Ao Rafael por me ensinar sequenciamento, pelas prosas e por ter orientado a Brenda que virou uma ótima tutora de PCR. À Camila pelos almoços na copinha, desabafos e extração de DNA junto a Maria Eugênia. Ao Mol pelas conversas sobre a vida e pela chave do Word que apareceu quando achei que o mundo ia acabar. À Dani pipa, por ter me ensinado a medir girinos e pelas massagens no ombro, à Raíla por ter o melhor sotaque do mundo e por ter me ajudado a fotografar os girinos.

Ao Igãõ por sempre aparecer dizendo que eu precisava dormir me oferecendo um café que renovava minhas forças, e à Babi por todos os abraços.

A todos os professores da Pós- graduação em Zoologia que contribuíram para o meu crescimento e aprendizado.

À professora Mariana Lyra, da UNESP Rio Claro/SP, que gentilmente disponibilizou material para dar continuidade ao trabalho e se prontificou em elucidar dúvidas sobre molecular.

Ao professor Jânio Moreira que me ajudou a entender as estatísticas da morfometria e a utilização do Statistica 7.

Ao professor Fabrício Rodrigues dos Santos, por permitir o uso de seu laboratório para os procedimentos moleculares.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por nos levar a Ilha do Arvoredo e nos acompanhar durante a estadia. Obrigada a Camila e ao Estevão que nos acompanharam e fizeram dessa viagem um grande aprendizado.

Obrigada a todos que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho de forma direta ou não.

Aos curadores e técnicos das coleções zoológicas que enviaram material para ser examinado: Juliano e Professor Santiago Castroviejo-Fisher (MCT/PUCRS), Patrick Colombo (MCN-FBZ/RS), Camila (CCT-UFMG), Mariana Lyra (CFBH).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelos 24 meses de bolsa.

## Resumo

Diversas decisões taxonômicas usualmente são tomadas apenas a partir do reconhecimento de caracteres morfológicos, metodologia esta que tem dominado a delimitação de espécies há anos e ainda hoje é utilizado como principal ferramenta para identificação em anuros, assumindo um papel importante como base em diversos trabalhos. No entanto, muitas descrições e revisões falham em descrever as variações geográficas, concentrando o estudo apenas em caracteres morfológicos e tomando como evidências poucos indivíduos resultando em espécies, principalmente aquelas neotropicais. Espécies crípticas são negligenciadas quando se emprega apenas o método morfológico, uma vez que, para estes casos as divergências morfológicas são inexistentes. Para se entender a pluralidade das espécies é vantajoso para sistemática o uso da taxonomia integrativa, onde mais de uma linha metodológica é aplicada, principalmente no estudo de grupos onde a ocorrência de espécies morfológicamente parecidas é comum, como é caso de anuros, tornando as descrições e sinonimizadas mais precisas e objetivas. O objetivo foi verificar se as populações atribuídas a *Oloolygon rizibilis* da região continental e das ilhas de Santa Catarina e do Arvoredo, correspondem a uma ou mais unidades evolutivas independentes a partir de estudos da taxonomia integrativa. A análise do presente estudo foi estruturada em três linhas de evidências: morfometria, bioacústica e molecular. As populações foram separadas em cinco unidades amostrais ao longo da distribuição. Para morfometria foi considerado que a alometria associada ao tamanho pode acarretar alterações na forma assim o efeito do tamanho foi retirado e, sucessivamente, uma manova seguida de análise de variância canônica foram realizados. Uma bioacústica comparativa também foi realizada, com parâmetros espectrais e temporais e por fim uma análise com dados mitocondriais com o fragmento CO1 a partir de distâncias genéticas. Através desta abordagem observamos que *O. rizibilis* para indivíduos que ocorrem na ilha do arvoredo, os dados morfométricos não apontaram uma diferença significativa em relação as populações do continente. Em contrapartida a população da localidade tipo é destacada das demais. A análise molecular mitocondrial uniu todas as unidades em um clado monofilético, porém evidenciou Itati/RS em um clado a parte com uma distância molecular de 19% em relação as outras unidades, sendo uma possível espécie candidata. A acústica evidenciou algumas diferenças sutis entre a localidade tipo e as demais localizações do continente que, junto a morfometria, também sugere uma linhagem distinta. Concluímos diante dos resultados que as populações de *O. rizibilis* consiste em três unidades taxonômicas distintas: *O. rizibilis* referente a localidade tipo, *O. aff. rizibilis* com distribuição do sul de São Paulo a Santa Catarina, incluindo ilhas do arvoredo e Santa Catarina e população referente a Itati/RS. Porém maiores estudos, como uma revisão bioacústica da espécie, devem de ser abordados futuramente.

**Palavra-chave:** taxonomia integrativa, espécies crípticas

## Abstract

Several taxonomic decisions are usually taken from the recognition of morphological characters, a methodology that has dominated the delimitation of species for years and is still used today as the main tool for identification in anurans, assuming an important role as the basis for several studies. However, many descriptions and reviews fail to describe geographic variations, concentrating the study only on morphological characters and taking as evidence few individuals resulting in species, mainly neotropical ones. Cryptic species are neglected when using only the morphological method, since, for these cases, the morphological divergences are non-existent. To understand the plurality of species, it is advantageous for systematically the use of integrative taxonomy, where more than one methodological line is applied, mainly in the study of groups where the occurrence of morphologically similar species is common, as is the case of anurans, making with more accurately descriptions and synonymizing. The objective was to verify if the populations attributed to *Oloolygon rizibilis* from the continental region and from the islands of Santa Catarina and Arvoredo, correspond to one or more independent evolutionary units from studies of integrative taxonomy. The analysis of the present study was structured in three lines of evidence: morphometry, bioacoustic and molecular. The populations were separated into five sample units throughout the distribution. For morphometry it was considered that the allometry associated with the size can cause changes in the shape so the effect of the size was removed and, successively, a manova followed by canonical analysis of variance were performed. A comparative bioacoustics was also performed, with spectral and temporal parameters and finally an analysis with mitochondrial data with the CO1 fragment from genetic distances. Through this approach, we observed that *O. rizibilis* for individuals that occur in the island of the grove, the morphometric data didn't point out a significant difference in relation to the populations of the continent. In contrast, the population of the typical location is highlighted from the others. The mitochondrial molecular analysis united all the units in a monophyletic clade, however it was evident that Itati / RS in a separate clade with a molecular distance of 19% in relation to the other , being a possible candidate species. The acoustics showed some subtle differences between the typical location and the other locations on the continent, which, along with morphometry, also suggests a distinct lineage. We conclude from the results that the populations of *O. rizibilis* consist of three distinct taxonomic units: *O. rizibilis* referring to the type locality, *O. rizibilis* with distribution from the south of São Paulo to Santa Catarina, including grove islands and Santa Catarina and population referring to Itati / RS. However, further studies, such as a bioacoustic review of the species, should be addressed in the future

**Keyword:** integrative taxonomy, cryptic species

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Mapa representando as localizações nas unidades amostrais primariamente separadas..... 18
- Figura 2 - Análise de variáveis canônicas das medidas morfométricas onde: vermelho unidade 1; rosa, unidade 2; amarelo, unidade 3; verde, unidade 4; azul, unidade 5. .... 25
- Figura 3- **A-** Canto A+B de Corupá/SC. **B-** Canto A+B de Campo Grande/SP. **C-** Detalhes das notas do canto A referentes a Corupá/SC. **D-** Notas do canto A referentes a Campo Grande/SP. **E-** Notas do canto A Itapema/SC. **F-** Notas do Canto de São Bento do Sul/SC.... 29
- Figura 4- Árvore de sequências com a relação da espécie *O. rizibilis* e grupos externos. Os números dos nós referentes a probabilidade obtida pelo programa. O clado 1 (Rosa): SP- São Paulo, Santo André; SC - Florianópolis, Arvoredo, São Bento do Sul, Corupá, São francisco do Sul, três Barras; RS- São Francisco de Paul; e o clado 2 (Azul): RS – Itati. As barras coloridas a frente representam a disposição das unidades amostrais onde: Unidade 1: vermelho, Unidade 2: rosa, Unidade 3: amarelo, Unidade 4 Verde, Unidade 5: Azul ..... 31
- Figura 5- Rede de sequências obtida pelo programa PopArt, com o método de inferência TCS. Os passos mutacionais estão representados entre parênteses ao longo dos ramos..... 32

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Medidas morfométricas correspondentes aos machos de *O. rizibilis*: Comprimento rostro-cloacal (CRC), Comprimento da cabeça (CC), Largura da cabeça (LC), Diâmetro do olho (DO), Diâmetro do tímpano (DT), Distância olho-narina (DON), Distância narina-focinho (DNF), Distância internarinas (DNI), Largura da pálpebra (LP), Comprimento da perna (tíbia) (CPER), Comprimento do antebraço (CA), Distância anterior entre olhos (DAM), Comprimento da mão (CMA), Comprimento da coxa (CCXTHL), Comprimento do tarso (CTA), Comprimento do pé (PE), Diâmetro do disco do terceiro dedo (DD3D), Diâmetro do disco do quarto artelho (DD4A). segundo a notação min – máx, média; SD = desvio padrão.....22
- Tabela 2- Razões das medidas morfométricas calculadas, segundo a notação min – máx, média; SD = desvio padrão.....23
- Tabela 3- Parâmetros dos cantos analisados correspondente às regiões de Paranapiacaba/ SP, São Bento do Sul/ SC, Itapema/ SC e Corupá/ SC. Dados apresentados como “n,  $X \pm SD$  (min – máx)” onde n número de indivíduos, X= média e SD= desvio padrão. ....27
- Tabela 4- Parâmetros dos cantos analisados por Pombal Jr et al, 1995, Bastos e Haddad 2002, Bevier et al. 2008, Magrini 2013, correspondente às regiões de Ribeirão Branco/ SP, Pirabeiraba / SC e Terra de Areia/RS. Dados apresentados como “n,  $X \pm SD$  (min- max).....28
- Tabela 5- Distâncias genéticas entre unidades calculadas no programa MEGA..... 30

## Sumário

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>         | <b>11</b> |
| <b>2. OBJETIVO</b>           | <b>15</b> |
| 2.1 Objetivos específicos    | 15        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> | <b>16</b> |
| 3.1 Morfometria              | 16        |
| 3.2 Bioacústica              | 19        |
| 3.3 Dados moleculares        | 20        |
| <b>4. RESULTADOS</b>         | <b>22</b> |
| 4.1 Morfometria              | 22        |
| 4.2 Vocalização              | 25        |
| 4.3 Molecular                | 30        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>          | <b>34</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>          | <b>39</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>           | <b>41</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Muitas decisões taxonômicas normalmente são tomadas apenas a partir do reconhecimento de caracteres morfológicos (McLeod, 2010), metodologia esta que tem dominado a delimitação de espécies há anos (Fujita et al., 2012) e ainda hoje é utilizada como principal ferramenta para identificação em anuros, assumindo um papel importante como base em diversos trabalhos (e.g., Bickford, 2007, Andrade et al., 2018, Leal et al., 2020). No entanto, muitas descrições e revisões falham em identificar as variações geográficas, concentrando o estudo apenas em caracteres morfológicos e tomando como evidências poucos indivíduos e resultando em espécies subamostradas (Mângia et al., 2020). Espécies crípticas são negligenciadas quando se emprega apenas o método morfológico uma vez que, para estes casos, as divergências morfológicas são inexistentes. As diferenças interespecíficas poderiam ser detectadas a partir outros tipos de caracteres, tais como comportamentos distintos e diferenças moleculares (McLeod 2010, Struck et al., 2018), que podem ficar incógnitos unindo duas espécies em uma.

Alguns estudos mostram que uma análise morfológica pode ser associada a estudos genômicos, resultando em informações robustas viabilizando analisar espécies em diferentes níveis (Jungfer et al., 2010, McLeod, 2010, Hillis, 2019). Uma forma comum de análise molecular é a construção de uma árvore gênica baseada em haplótipos diagnósticos das espécies, por meio de dados do DNA mitocondrial. Contudo, este tipo de análise pode ser falha para identificar algumas informações que podem ser chave em algumas situações, já que se trata de um material originado de apenas das fêmeas (Hillis, 2019).

A atividade do canto também é considerado como um mecanismo primordial na identificação dos anuros (Ryan, 2001; Gerhardt and Huber, 2002, Toledo & Haddad, 2005) por representar diversas funções sociais em diferentes contextos, como acasalamento, agressividade territorial, avisar a posição de um indivíduo para outros, agonia perante ao predador e outras (Wells, 2007; Hepp et al., 2017). Vários estudos têm mostrado a importância de sinais acústicos como parâmetros específicos para delimitações de novas espécies (e.g., Haddad & Pombal 1998; Canedo & Pombal 2007; Hepp et al., 2017) por ser fator de isolamento reprodutivo nas espécies. Desta forma, o uso da bioacústica comparativa expõe resultados promissores, principalmente na descoberta de anfíbios que são morfológicamente crípticos, mostrando que o número de

espécies dentro do grupo é muito maior do que o esperado (Glaw & Köhler, 1998; Köhler et al., 2005 a; Vences & Köhler 2008; Köhler et al., 2017).

Empregar uma taxonomia com mais de uma linha metodológica é importante para se entender a pluralidade das espécies (Mângia et al., 2020), principalmente no estudo de grupos onde a ocorrência de espécies morfologicamente parecidas é comum, como é caso de anuros (Stuart, et al., 2006, Jungfer, et al., 2010, McLeod, 2010, Vacher et al., 2017). A integração de diferentes tipos de dados, considerando várias linhas de evidência, como morfologia, genética, ecologia, comportamento entre outras, esclarecem padrões biogeográficos, filogenéticos e evolutivos (Padiál et al., 2010) e tornam as descrições e sinonimizadas mais precisas e objetivas (Steiner et al., 2006, Leal et al., 2020, Mângia et al., 2020).

O gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843 (Scinaxinae), é um dos mais diversificados na família Hylidae Rafinesque, 1815, com 50 espécies descritas (Frost, 2020). Recentemente ele foi removido da sinonímia com *Scinax* Wagler, 1830 por Duellman et al. (2016) para alocar as espécies do clado de *Scinax catharinae* sensu Faivovich et al (2005). Algumas das espécies que hoje integram o gênero, inicialmente foram descritas como *Hyla* e reconhecidas no grupo *Hyla rubra* por Dunn 1933. Em 1964, Bokermann descreveu a espécie *Hyla rizibilis* a partir de exemplares provenientes do município de Santo André/SC. A espécie foi diagnosticada com caracteres intermediários aos dos grupos de “*Hyla rubra*” e de “*Hyla catharinae*”, sendo este último proposto por Bertha Lutz (1954). Posteriormente, Lutz (1972) descreveu a espécie *Hyla mirim*, proveniente da localidade de Rio Vermelho, São Bento do Sul/SC e sugeriu o uma relação próxima a *Hyla rizibilis*. Por fim, Lutz (1973) reuniu as duas espécies como formas adicionais do complexo de *Hyla catharinae* Boulenger, 1888.

Com base nos estudos acústicos e morfológicos, Andrade & Cardoso (1987) colocaram *H. mirim* como um sinônimo de *H. rizibilis*. Neste mesmo trabalho, descreveram a espécie *Hyla ranki* da localidade de Morro do Ferro, Poços de Caldas/MG e propuseram o grupo de *Hyla rizibilis* com base no caráter do saco vocal subgular expandido lateralmente. O gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843 foi revalidado por Fouquette & Delahoussaye em 1977, para as espécies de *Hyla* dos grupos de *H. rubra* e *H. catharinae*. Porém, segundo Pombal e Gordo (1991) a espécie tipo do gênero, *Hyla aurata*, teria sido usada, antes de *Ololygon* na combinação *Scinax auratus* por Wagler (1830). Assim, o gênero *Scinax* teria prioridade sobre *Ololygon*, o que mais tarde foi corrigido por Duellman & Wiens (1992) que revalidaram o gênero *Scinax* incluindo as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Ololygon*.

Pombal, Bastos e Haddad (1995) invalidaram o grupo *Scinax rizibilis* acrescentando as espécies ao grupo *Scinax catharinae*, embasados no único caráter que definia o primeiro grupo, o saco subgular lateralizado, que também eram compartilhados com alguns membros do grupo de espécies de *Scinax catharinae*. Faivovich (2002) realizou a primeira análise cladística morfológica envolvendo o gênero *Ololygon*, confirmando o seu monofiletismo e recuperando dois clados: “ruber” e “catharinae”. Incluída no clado catharinae, *Ololygon rizibilis* foi recuperada como grupo irmão de um agrupamento composto por *Ololygon berthae* (Barrio, 1962) + *Ololygon* sp. (= *Ololygon aromothyella* Faivovich, 2005). *Ololygon ranki* não foi utilizada na análise. Duellman e colaboradores (2016) por meio de dados moleculares removeram *Scinax* da sinonímia, revalidando o gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843 para abrigar as espécies do “clado catharinae”. Assim a espécie passou ser chamada de *Ololygon rizibilis*.

A espécie *Ololygon rizibilis* é caracterizada pelo tamanho diminuto, saco vocal subgular expandido lateralmente, machos com coloração amarelo vivo e presença de uma mancha interocular. As populações estão distribuídas na Mata Atlântica, com registros nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo do nível do mar até em torno dos 800m na faixa litorânea (Haddad et al., 2008, Duellman et al., 2016) e a oeste do Paraná em Mata atlântica sem-decídua (Figueiredo et al., 2014). Reproduzem-se em áreas inundadas pela chuva em clareiras das matas. No acasalamento, os machos vocalizam entre gramíneas a aproximadamente 50 cm de altura (Duellman et al., 2016) e sua vocalização pode ser diferenciada considerando a estrutura do canto, o número de pulsos e notas e o contexto social em que eles se encontram (Bastos & Haddad, 2001). Durante sua exibição, os machos ficam distribuídos uniformemente no sítio de vocalização (Bastos & Haddad, 1999). Os indivíduos da espécie depositam seus ovos em ninhos de espuma nas poças d’água temporárias e apresentam período reprodutivo entre setembro e fevereiro (Bastos & Haddad, 1999). Os girinos são exotróficos e ocupam corpos d’água lênticos (Pombal Jr. & Haddad, 2005).

Devido a sua ampla distribuição e ocupação de diferentes habitats, indivíduos da espécie apresentam variações a nível morfológico, molecular e comportamentais que são consideráveis em alguns casos. Por exemplo, uma população de *O. rizibilis* encontrada na ilha do Arvoredo em Santa Catarina possuem espécimes que são consideravelmente maiores que os indivíduos encontrados no continente e a sua reprodução ocorre em áreas de remanso de pequenos córregos (Garcia obs. pess.), contrastando com população continental que se reproduz em alagados ou poças temporárias (Bastos & Haddad, 1999; Brassaloti et al., 2010). E estudos mostram que

populações em ilhas que divergem morfológicamente do continente podem apresentar também alguma diferença molecular, onde fatores como pressão ambiental e a diminuição do fluxo gênico levariam a especiação (Bell et al., 2012).

A união de diferentes métodos da sistemática pode ser utilizada no estudo de *O. rizibilis* (Fujita et al., 2012) já que a espécie apresenta, junto a sua ampla distribuição (Figueiredo et al., 2014) diferenças sutis entre populações que carecem de atenção. Assim um estudo integrado contribuiria para o conhecimento da espécie, elucidando sobre suas possíveis diferenças no âmbito molecular, bioacústico e morfológico, e questões sobre seu monofiletismo.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo foi verificar se as populações atribuídas a *Ololygon rizibilis*, da região continental e das ilhas de Santa Catarina e do Arvoredo, correspondem a uma ou mais unidades monofiléticas a partir de estudos da taxonomia integrativa.

### **2.1 Objetivos específicos**

- 1) Identificar variações morfológica, acústica e genética entre populações de *O. rizibilis*
- 2) Identificar se as populações correspondem às características atribuídas a espécie e se apresentam diferenças que justifiquem a separação das unidades propostas;
- 3) Caso as diferenças não sejam significativas, apontar quais as variações encontradas nas análises; e se significativas indiquem a possibilidade de novas linhagens.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A análise do presente estudo foi estruturada seguindo protocolo de consenso para taxonomia integrativa (Padial et al., 2010). As unidades foram separadas conforme a distribuição geográfica e as diferenças na morfometria, bioacústica e molecular foram observadas, a fim de revisar o status taxonômico das populações de *O. rizibilis*,

#### 3.1 Morfometria

Foram examinados 116 indivíduos do *O. rizibilis*, sendo 87 machos e 29 fêmeas. Os indivíduos foram separados em cinco unidade amostrais conforme distribuição geográfica (Figura 1):

Unidade 1- Abrange os indivíduos com distribuição correspondente a serra do Mar até as proximidades da região da serra de Paranapiacaba no estado de São Paulo sendo inclusos região de Santo André (localidade tipo da espécie), Bertioga e São Paulo; Alguns autores registraram diferenças moleculares e morfológicas em populações de anuros da mata atlântica costeira localizados entre o norte e sul de São Paulo, sugerindo uma possível barreira geográfica na região do Vale do Ribiera (Fitzpatrick et al., 2009, Thomé et al., 2010, Bell et al. 2012).

Unidade 2- Corresponde a populações próximas, também correspondentes a serra do Mar, mas que não apresentam grandes barreiras geográficas ao longo da distribuição. O grupo engloba Sul de São Paulo (Ribeirão Branco e proximidades), Paraná (Piraquara), nordeste de Santa Catarina (São Bento do Sul, Corupá, São Francisco do Sul, Três Barras, Jaraguá do Sul e Joinville até o Vale do Itajaí. Estas populações não apresentam barreiras geográficas detectáveis visualmente e apresentam morfologia bastante similar, que caso fossem consideradas como distintas de outras populações, teriam um nome a ser atribuído: *H. mirim*, descrita de São Bento do Sul, SC e hoje considerada sinônimo júnior de *Ololygon rizibilis*. Assim, estamos testando também a validade da sinonímia.

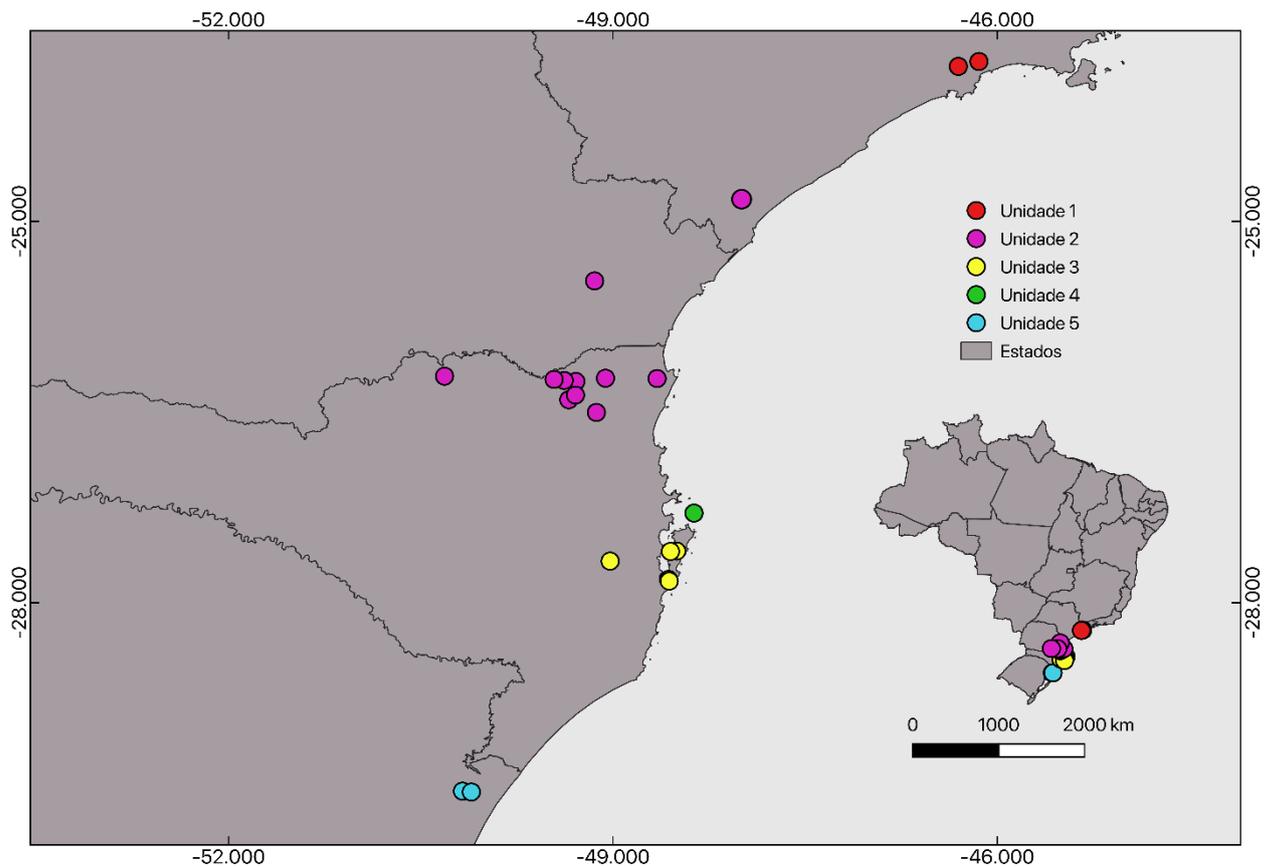
Unidade 3- A partir do Vale do Itajaí e as serras do leste catarinense (IBGE, 2001), envolvendo o parque nacional da Serra do Tabuleiro e regiões de Rancho Queimado e a Ilha de Santa Catarina, onde se localiza a capital do Estado, Florianópolis. As espécies desta região tem morfologia similar às da unidade 2, mas as vocalizações não foram comparadas. Alguns

trabalhos mostram que o vale funciona como barreira geográfica para algumas populações de anfíbios delimitando a ocorrência de espécies crípticas no leste de Santa Catarina (Lourenço et al., 2003, Oswald 2016).

Unidade 4- Composto apenas por indivíduos da Ilha do Arvoredo que estão separados geograficamente dos demais, sem ponte terrestre; Os exemplares da Ilha do Arvoredo apresentam duas características distintas das demais populações, o visível maior tamanho e a capacidade de se reproduzirem em pequenos córregos de água limpa, diferente das demais populações da espécie, que reproduzem-se em alagados temporários.

Unidade 5- Rio Grande do Sul (Itati) referente a Reserva Biológica Mata Paludosa que é caracterizada pela transição entre encostas da Serra Geral e baixadas litorâneas. Registros de Magrini (2013) propõe diferenças bioacústicas significativas entre as populações deste ponto amostral e as demais localizações supracitadas.

Os espécimes avaliados estão depositados nas coleções biológicas: Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS - Porto Alegre/RS (MCP/RS), Museu de Ciências Naturais- Fundação Zoobotânica/ RS (MCN- FZB/RS) e Centro de Coleções Taxonômicas- UFMG (CCT- UFMG- Belo Horizonte/MG), CFBH, Coleção Célio Haddad depositado na Unesp, SP.



As medidas morfométricas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess) de precisão 0,01mm. Foram analisados dezoito caracteres morfométricos de acordo com os trabalhos de: **A)** Duellman (2001): 1. Comprimento rostro-cloacal (CRC), 2. Comprimento da cabeça (CC), 3. Largura da cabeça (LC), 4. Diâmetro do olho (DO), 5. Diâmetro do tímpano (DT), 6. Distância olho-narina (DON), 7. Distância narina-focinho (DNF), 8. Distância internarinas (DNI), 9. Largura da pálpebra (LP), 10. Comprimento da perna (tíbia) (CPER); **B)** Duellman et al., (1997): 11. Comprimento do antebraço (CA); **C)** Garcia et al., (2003): 12. Distância anterior entre olhos (DAO); **D)** Heyer et al., (1990): 13. Comprimento da mão (CMA), 14. Comprimento da coxa (CCX), 15. Comprimento do tarso (CTA), 16. Comprimento do pé (PE); **E)** Napoli (2005): 17. Diâmetro do disco do terceiro dedo (DD3D), 18. Diâmetro do disco do quarto artelho (DD4A).

Os valores da estatística descritiva foram apresentados segundo a notação “ $X \pm SD$  (min – máx)” onde,  $X$  = média;  $SD$  = desvio padrão. A razão entre as medidas supracitadas foi

utilizada nas análises estatísticas como parâmetros, sendo elas: CC/CRC, LC/CRC, CA/CRC, CMA/CRC, CCX/CRC, CPER/CRC, CTA/CRC, PE/CRC, LC/CC, DO/CC, DT/CC, DON/CC, DNF/CC, DIN/CC, LP/CC, DAO/CC, DT/DO, DD3D/CMA e DD4D/DD3D.

Foi considerado que a forma do corpo poderia ser influenciada diretamente pela alometria associada ao crescimento, assim o efeito de tamanho foi removido das variáveis logaritmizadas pelo Método alométrico de Burnaby (Allometric Burnaby's method). Posteriormente todos os valores morfométricos obtidos foram submetidos à uma avaliação por Manova (ANálise De VAriância Multivariada) e CVA (Análise de Variáveis Canônicas) para analisar as variações morfométricas entre as localidades, utilizando o programa PAST version 2.17c. Os dados da estatística descritiva serão apresentados por unidade amostral segundo a notação min – máx, média; SD = desvio padrão.

### 3.2 Bioacústica

As vocalizações foram recebidas por meio de doações de outros pesquisadores e pela Fonoteca Neotropical Jacques Viellard, Universidade Federal de Campinas (FNJV). São provenientes das localidades Santo André/SP (2 gravações e 7 cantos); São Bento do Sul/ SC (2 gravações e 7 cantos), Corupá/SC (1 gravação e 6 cantos) e Itapema/SC (1 gravação e 6 cantos). Análises da literatura também foram utilizados para comparar os resultados, apenas com registros das unidades 2 (Pombal Jr et al, 1995, Bastos & Haddad, 2002 e Bevier et al., 2008) e unidade 5 (unidade criada a partir dos dados de Magrini, 2013), deste modo para a unidade 4, ilha do arvoredo, o registro bioacústico ainda é desconhecido.

As análises acústicas foram realizadas com o auxílio do programa Raven Pro 1.5 (64-bit version) do Cornell Laboratory of Ornithology (Bioacoustics Research Program, 2014). Tipo de janela = Hann, tamanho da janela = 512 amostras, largura da banda de filtro de 3dB = 135 Hz, sobreposição = 50%, tamanho DFT = 256 amostras, espaçamento da grade = 172 Hz, brilho = 50% e contraste = 50%.

Para análise comparativa, os parâmetros espectrais utilizados foram: frequência dominante (Hz), frequência máxima (95%), frequência mínima (5%), e os parâmetros temporais foram: duração do canto (s), número de notas duração de notas taxa de notas número de pulsos. Os

espectrogramas foram gerados com auxílio do programa Rstudio versão 3.5.1 (2018) com os pacotes seewave e tuneR.

### 3.3 Dados moleculares

A extração do DNA para os procedimentos moleculares foi realizada a partir dos tecidos preservados em álcool absoluto (PA), por meio de doações das coleções zoológicas da CCT-UFMG, MCP/RS e MCN-FZB/RS. Foram inseridas também 16 amostras de *O. catharinae*, 8 amostras de *O littoralis* e 1 amostra de *O hiemalis*, 2 amostras *O. obtriangulatus* e 2 fragmentos de *O. ruber* e *O. perereca* provenientes do Genbank, acrescentadas como grupo externo na análise. Para extração das amostras foi utilizado o protocolo de fenol-clorofórmio (adaptado de Sambrook & Russel, 2001 por Santos Júnior et al., 2015).

O método de reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizado para se obter a amplificação do fragmento mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (CO1), utilizando 0.06 µL de Platinum™ TAQ DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), 0.7 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5 µL de Tampão de reação (Buffer PCR), 0.3 µL de cada iniciador (T3-ANF1 forward e T7- ANR1 reverse), 1.2 µL dNTP, 1µL de DNA genômico e 9.94 de água ultra pura completando 15µL de solução.

A reação de amplificação iniciou com um ciclo de desnaturação à 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 20 segundos. O anelamento dos iniciadores se deu a 50°C por 20 segundos e extensão a 68°C por 60 segundos. Adicionou-se um passo final de 72°C por 5 minutos para uma extensão mais completa.

Após a amplificação pela PCR, os produtos obtidos foram purificados por polietileno glicol 20% (PEG) (modificado de Sambrook & Russel, 2001 por Santos Júnior et al., 2015 com alterações). Os fragmentos de DNA obtidos foram submetidos a reação de sequenciamento utilizando os mesmos iniciadores das reações de PCR e o kit BigDye Terminator v.3.1 (Life Technologies) através do ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems). Como resultado cromatogramas foram gerados, posteriormente revisados e editados através do programa SeqScape v. 2.6.0 (Applied Biosystems).

Foram geradas 24 sequências para CO1 da espécie estudada. Para as demais espécies escolhidas como grupo externo foram: *O. catharinae*: 12 sequências, *O. hiemalis*: 1 sequência; e *O. littoralis*: 4 sequências. *O. perereca*: 1; *O. ruber*: 1.

As sequências revisadas foram alinhadas pelo algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1996) conduzido no software MegaX v10.0.5 (Kumar et al., 2018). Posteriormente com o software JModelTest v2.1.7 (Darriba et al., 2012) uma análise para seleção do melhor modelo de substituição foi realizada através do critério Bayesiano e o resultado, em seguida, aplicado ao programa Beauti v 2.6.0 (Bayesian *Evolutionary Analysis Utility*), onde o arquivo de controle do BEAST foi programado. O JModeltest sugeriu o TRN+I+ $\Gamma$  como melhor modelo, porém, como essa opção não consta no Beauti então foi substituído pelo TN93 como sugerido por Justin C. Bagley (2016) com os valores para shape= 1,89, gamma = 4 e proportion invariant = 0,59.

No programa Beauti (Bouckaert et al., 2019) a opção relógio molecular relaxado do tipo lognormal foi selecionado, onde se assume que as variações das taxas da evolução molecular são independentes nos diferentes ramos (Drummond et al., 2006). O Birth Death Model, modelo de diversificação, foi escolhido assumindo que todas as ramificações da árvore são explicadas tanto por processos de especiação quanto de extinção. A análise ainda foi programada para 40 milhões de gerações e os primeiros 1,6 milhões de árvores obtidas (4%) foram descartadas (pré-burning). Foram realizadas três análises independentes no Beast 2.6 (Bouckaert et al., 2019) com diferentes valores iniciais de random seed e as árvores resultantes foram anotadas pelo programa TreeAnnotator v. 1.7.5 (Drummond et al., 2012) e combinadas no programa LogCombiner v.2.6 (Drummond AJ & Rambaut A, 2007) gerando uma árvore consenso.

Baseado na topologia da árvore final gerada pelo LogCombiner, foram agrupados os indivíduos que eram mais próximos molecularmente e foram calculadas pelo Mega X as distâncias entre grupos, que é a média aritmética de todas as distâncias em pares de grupos nas comparações intergrupos. O resultado ilustra as diferenças entre as sequências analisadas. Para verificar graficamente a distribuição das populações e a relação entre elas, foi aplicado o método de inferência TCS Network no programa PopART (<[www.popart.otago.ac.nz](http://www.popart.otago.ac.nz)>) (Bandelt et al., 1999; Clement et al., 2002; Leigh e Bryant 2015).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Morfometria

Foram amostrados no total 116 indivíduos onde 87 machos foram analisados. Os dados brutos dos indivíduos medidos dentro de cada unidade são apresentados a seguir na Tabela 1 e as razões calculadas, Tabela 2. Após remover o efeito do tamanho das variáveis pelo método alométrico de Burnaby as medidas logaritmizadas, as análises geraram dois eixos significativos (critério de Pillai = 1,141;  $F = 1,463$ ;  $p < 0.05$ ). O primeiro eixo (que é referente ao tamanho) explicou 69,8% da variação total com maior contribuição das variáveis: Comprimento rostro-cloacal (CRC) e Largura Cabeça (LC). O segundo eixo (referente a forma) explicou 48,5% com maior contribuição das variáveis: Comprimento do pé (PE) e Comprimento da Coxa (CCX) (figura 2).

Observa-se na figura 2 que apesar da população da Ilha do Arvoredo apresentar medidas brutas maiores que as das populações do continente, ela não se diferenciou das demais populações quando se retira o efeito do tamanho. Em contrapartida a população da unidade 1, referente a localidade-tipo de *O. rizibilis* e leste de São Paulo, segrega das demais populações.

Tabela 1- Medidas morfométricas correspondentes aos machos de *O. rizibilis*: Comprimento rostro-cloacal (CRC), Comprimento da cabeça (CC), Largura da cabeça (LC), Diâmetro do olho (DO), Diâmetro do tímpano (DT), Distância olho-narina (DON), Distância narina-focinho (DNF), Distância internarinas (DNI), Largura da pálpebra (LP), Comprimento da perna (tíbia) (CPER), Comprimento do antebraço (CA), Distância anterior entre olhos (DAM), Comprimento da mão (CMA), Comprimento da coxa (CCXTHL), Comprimento do tarso (CTA), Comprimento do pé (PE), Diâmetro do disco do terceiro dedo (DD3D), Diâmetro do disco do quarto artelho (DD4A). segundo a notação min – máx, média; SD = desvio padrão

| Medidas | Unidade 1<br>(n=06)             | Unidade 2<br>(n=29)          | Unidade 3<br>(n=23)             | Unidade 4<br>(n=18)             | Unidade 5<br>(n=9)             |
|---------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| CRC     | 24,61 ± 0,96<br>(23,74 - 26,16) | 24,04 ± 1,36<br>(20 - 26,55) | 24,30 ± 1,17<br>(21,94 - 26,69) | 28,88 ± 2,26<br>(25,18 - 33,93) | 22,75 ± 0,68<br>(21,7 - 23,62) |
| CC      | 8,76 ± 0,28<br>(8,29 - 9,11)    | 8,50 ± 0,47<br>(7,32 - 9,14) | 8,71 ± 0,26<br>(8,01 - 9,17)    | 10,35 ± 0,54<br>(9,67 - 12,06)  | 8,32 ± 0,26<br>(7,8 - 8,86)    |
| LC      | 7,34 ± 0,42<br>(6,8 - 7,91)     | 7,27 ± 0,40<br>(6,2 - 7,82)  | 7,46 ± 0,39<br>(6,39 - 8)       | 9,4 ± 0,62<br>(8,36 - 11)       | 7,02 ± 0,19<br>(6,72 - 7,3)    |
| DO      | 3,11 ± 0,42<br>(2,68 - 3,11)    | 2,7 ± 0,32<br>(2,12 - 3,2)   | 3,02 ± 0,27<br>(2,44 - 3,59)    | 3,57 ± 0,33<br>(2,75 - 4,28)    | 2,82 ± 0,25<br>(2,3 - 3,04)    |
| DT      | 1,25 ± 0,22<br>(0,91 - 1,58)    | 1,28 ± 0,17<br>(0,85 - 1,51) | 1,25 ± 0,22<br>(0,94 - 1,97)    | 1,7 ± 0,3<br>(1,19 - 2,3)       | 1,11 ± 0,08<br>(1,01 - 1,28)   |
|         | 2,6 ± 0,4                       | 2,54 ± 0,27                  | 2,63 ± 0,24                     | 3,13 ± 0,3                      | 2,41 ± 0,27                    |

|             |                                 |                                 |                                |                                 |                                 |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>DON</b>  | (2,03 - 3,09)                   | (2,04 - 2,98)                   | (2,15 - 3,04)                  | (2,71 - 3,71)                   | (2,13 - 2,95)                   |
| <b>DNF</b>  | 0,96 ± 0,16<br>(0,75 - 1,17)    | 1,10 ± 0,17<br>(0,66 - 1,34)    | 1,15 ± 0,14<br>(0,89 - 1,47)   | 1,34 ± 0,21<br>(1,12 - 1,91)    | 1,07 ± 0,14<br>(0,9 - 1,28)     |
| <b>DIN</b>  | 1,9 ± 0,19<br>(1,5 - 2,08)      | 1,91 ± 0,24<br>(1,35 - 2,35)    | 1,92 ± 0,16<br>(1,63 - 2,26)   | 2,34 ± 0,26<br>(1,72 - 2,83)    | 1,93 ± 0,15<br>(1,64 - 2,17)    |
| <b>LP</b>   | 2,2 ± 0,31<br>(1,69 - 2,53)     | 1,93 ± 0,29<br>(1,23 - 2,44)    | 2,03 ± 0,28<br>(1,49 - 2,68)   | 2,18 ± 0,29<br>(1,55 - 2,77)    | 1,8 ± 0,22<br>(1,29 - 2,08)     |
| <b>DAO</b>  | 3,6 ± 0,38<br>(3,10 - 4,09)     | 3,65 ± 0,45<br>(2,65 - 4,42)    | 3,76 ± 0,64<br>(2,12 - 4,58)   | 5,05 ± 0,48<br>(3,99 - 5,77)    | 3,7 ± 0,18<br>(3,43 - 3,94)     |
| <b>CA</b>   | 4,77 ± 0,49<br>(4,12 - 5,27)    | 4,57 ± 0,38<br>(3,88 - 5,46)    | 4,45 ± 0,28<br>(3,74 - 4,92)   | 5,20 ± 0,55<br>(4,36 - 6,47)    | 4,58 ± 0,29<br>(4,24 - 5,19)    |
| <b>CMA</b>  | 6,71 ± 0,21<br>(6,39 - 7,03)    | 6,72 ± 0,46<br>(5,58 - 7,84)    | 6,79 ± 0,33<br>(6,11 - 7,50)   | 8,46 ± 0,52<br>(7,69 - 9,63)    | 6,53 ± 0,25<br>(6,15 - 6,84)    |
| <b>DD3D</b> | 1,25 ± 0,07<br>(1,1 - 1,34)     | 1,13 ± 0,17<br>(0,70 - 1,41)    | 1,14 ± 0,14<br>(0,88 - 1,44)   | 1,39 ± 0,16<br>(1,17 - 1,79)    | 1,07 ± 0,1<br>(0,91 - 1,23)     |
| <b>CCX</b>  | 11,98 ± 0,35<br>(11,5 - 12,38)  | 11,66 ± 0,70<br>(9,35 - 13,09)  | 12,0 ± 0,7<br>(10,19 - 13,09)  | 14,48 ± 1,14<br>(12,81 - 18,07) | 11,33 ± 0,23<br>(10,95 - 11,74) |
| <b>CPER</b> | 12,93 ± 0,27<br>(12,39 - 13,16) | 12,55 ± 0,63<br>(10,67 - 13,77) | 12,92 ± 0,49<br>(11,86 - 13,9) | 15,51 ± 1,03<br>(14,72 - 19,34) | 12,15 ± 0,25<br>(11,70 - 12,61) |
| <b>CTA</b>  | 7,14 ± 0,38<br>(6,69 - 7,78)    | 7,11 ± 0,46<br>(5,83 - 7,11)    | 7,27 ± 0,36<br>(6,53 - 7,94)   | 8,47 ± 0,52<br>(7,66 - 10,17)   | 6,84 ± 0,36<br>(6,33 - 7,35)    |
| <b>PE</b>   | 10,40 ± 0,15<br>(10,21 - 10,60) | 9,8 ± 0,52<br>(8,14 - 10,52)    | 9,8 ± 0,5<br>(8,96 - 10,97)    | 12,53 ± 0,68<br>(11,58 - 14,54) | 9,62 ± 0,33<br>(9,06 - 10,16)   |
| <b>DD4D</b> | 1,15 ± 0,09<br>(1,00 - 1,28)    | 1,08 ± 0,17<br>(0,62 - 1,44)    | 1,08 ± 0,15<br>(0,75 - 1,34)   | 1,31 ± 0,18<br>(1,04 - 1,63)    | 1,04 ± 0,13<br>(0,82 - 1,18)    |

Tabela 2- Razões das medidas morfométricas calculadas, segundo a notação min – máx, média; SD = desvio padrão.

| <b>Razões</b>  | <b>Unidade 1<br/>(n=06)</b>  | <b>Unidade 2<br/>(n=29)</b>  | <b>Unidade 3<br/>(n=23)</b>  | <b>Unidade 4<br/>(n=18)</b>  | <b>Unidade 5<br/>(n=9)</b>   |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>CC/CRC</b>  | 0,36 ± 0,01<br>(0,34 - 0,37) | 0,35 ± 0,02<br>(0,33 - 0,39) | 0,36 ± 0,02<br>(0,34 - 0,39) | 0,36 ± 0,02<br>(0,33 - 0,40) | 0,37 ± 0,01<br>(0,36 - 0,38) |
| <b>LC/CRC</b>  | 0,30 ± 0,02<br>(0,28 - 0,33) | 0,30 ± 0,02<br>(0,27 - 0,34) | 0,31 ± 0,01<br>(0,28 - 0,33) | 0,33 ± 0,02<br>(0,30 - 0,38) | 0,31 ± 0,01<br>(0,30 - 0,33) |
| <b>CA/CRC</b>  | 0,19 ± 0,02<br>(0,17 - 0,22) | 0,19 ± 0,02<br>(0,16 - 0,22) | 0,18 ± 0,01<br>(0,16 - 0,2)  | 0,18 ± 0,02<br>(0,15 - 0,23) | 0,20 ± 0,01<br>(0,19 - 0,22) |
| <b>CMA/CRC</b> | 0,27 ± 0,01<br>(0,26 - 0,30) | 0,28 ± 0,02<br>(0,24 - 0,32) | 0,28 ± 0,01<br>(0,25 - 0,31) | 0,29 ± 0,02<br>(0,27 - 0,32) | 0,29 ± 0,01<br>(0,27 - 0,30) |
| <b>CCX/CRC</b> | 0,49 ± 0,01                  | 0,49 ± 0,02                  | 0,5 ± 0,03                   | 0,50 ± 0,03                  | 0,50 ± 0,01                  |

|                  |                              |                              |                              |                              |                              |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                  | (0,48- 0,51)                 | (0,44- 0,53)                 | (0,42- 0,53)                 | (0,46- 0,57)                 | (0,48- 0,51)                 |
| <b>CPER/CRC</b>  | 0,53 ± 0,02<br>(0,50- 0,55)  | 0,52 ± 0,02<br>(0,48- 0,58)  | 0,54 ± 0,02<br>(0,49 – 0,56) | 0,54 ± 0,03<br>(0,48 -0,59)  | 0,53± 0,02<br>(0,52-0,56)    |
| <b>CTA/CRC</b>   | 0,29 ± 0,02<br>(0,27- 0,31)  | 0,30 ± 0,02<br>(0,25-0,35)   | 0,30 ± 0,01<br>(0,25 – 0,32) | 0,29 ± 0,03<br>(0,26 - 0,34) | 0,30 ± 0,02<br>(0,29 -0,33)  |
| <b>PE/CRC</b>    | 0,42 ± 0,02<br>(039- 0,44)   | 0,41 ± 0,03<br>(0,35- 0,41)  | 0,41 ± 0,02<br>(0,38 – 0,45) | 0,44 ± 0,03<br>(0,38-0,49)   | 0,42 ± 0,02<br>(0,40-0,45)   |
| <b>LC/CC</b>     | 0,84 ± 0,4<br>(0,77- 0,89)   | 0,86 ± 0,04<br>(0,79 – 0,95) | 0,86 ± 0,03<br>(0,79 – 0,92) | 0,91 ± 0,03<br>(0,85-0,97)   | 0,84 ± 0,02<br>(0,82 – 0,87) |
| <b>DO/CC</b>     | 0,35 ± 0,05<br>(0,31- 0,42)  | 0,33 ± 0,03<br>(0,26 – 0,41) | 0,34 ± 0,03<br>(0,29- 0,41)  | 0,34 ± 0,03<br>(0,28-0,4)    | 0,34 ± 0,03<br>(0,27 – 0,37) |
| <b>DT/CC</b>     | 0,14 ± 0,02<br>(0,11- 0,18)  | 0,15 ± 0,02<br>(0,10 – 0,18) | 0,14 ± 0,03<br>(0,11-0,22)   | 0,16 ± 0,02<br>(0,12-0,19)   | 0,13 ± 0,01<br>(0,12-0,15)   |
| <b>DON/CC</b>    | 0,30 ± 0,04<br>(0,24 – 0,36) | 0,30 ± 0,02<br>(0,24- 0,33)  | 0,30 ± 0,03<br>(0,27- 0,35)  | 0,30 ± 0,03<br>(0,27- 0,37)  | 0,29 ± 0,03<br>(0,26- 0,34)  |
| <b>DNF/CC</b>    | 0,11 ± 0,02<br>(0,09- 0,13)  | 0,13 ± 0,02<br>(0,08- 0,16)  | 0,13 ± 0,02<br>(0,11 – 0,17) | 0,13 ± 0,02<br>(0,11- 0,18)  | 0,13 ± 0,01<br>(0,10- 0,15)  |
| <b>DIN/CC</b>    | 0,21 ± 0,02<br>(0,18- 0,23)  | 0,22 ± 0,02<br>(0,16- 0,26)  | 0,22 ± 0,02<br>(0,19 -0,26)  | 0,23 ± 0,02<br>(0,17-0,27)   | 0,23 ± 0,02<br>(0,20 -0,26)  |
| <b>LP/CC</b>     | 0,25 ± 0,03<br>(0,20- 0,25)  | 0,23 ± 0,03<br>(0,15- 0,27)  | 0,23 ± 0,03<br>(0,17- 0,29)  | 0,21 ± 0,03<br>(0,14-0,27)   | 0,22 ± 0,03<br>(0,16- 0,25)  |
| <b>DAO/CC</b>    | 0,40 ± 0,04<br>(0,35- 0,46)  | 0,43 ± 0,04<br>(0,33 – 0,49) | 0,43 ± 0,07<br>(0,25- 0,53)  | 0,49 ± 0,05<br>(0,40-0,56)   | 0,44 ± 0,02<br>(0,42- 0,47)  |
| <b>DT/DO</b>     | 0,40 ± 0,7<br>(0,32- 0,49)   | 0,46 ± 0,07<br>(0,37- 0,61)  | 0,42 ± 0,06<br>(0,31-0,61)   | 0,47 ± 0,07<br>(0,38 -0,60)  | 0,40 ± 0,05<br>(0,35- 0,50)  |
| <b>DD3D/CMA</b>  | 0,19 ± 0,01<br>(0,17 – 0,2)  | 0,17 ± 0,02<br>(0,13 -0,21)  | 0,17 ± 0,02<br>(0,12 -0,22)  | 0,16 ± 0,02<br>(0,13 -0,20)  | 0,16 ± 0,02<br>(0,13- 0,19)  |
| <b>DD4D/DD3D</b> | 0,92 ± 0,06<br>(0,84 – 1,01) | 0,96 ± 0,11<br>(0,76 -1,28)  | 0,95 ± 0,12<br>(0,74- 1,27)  | 0,94 ± 0,12<br>(0,79-1,10)   | 0,97 ± 0,09<br>(0,87- 1,11)  |

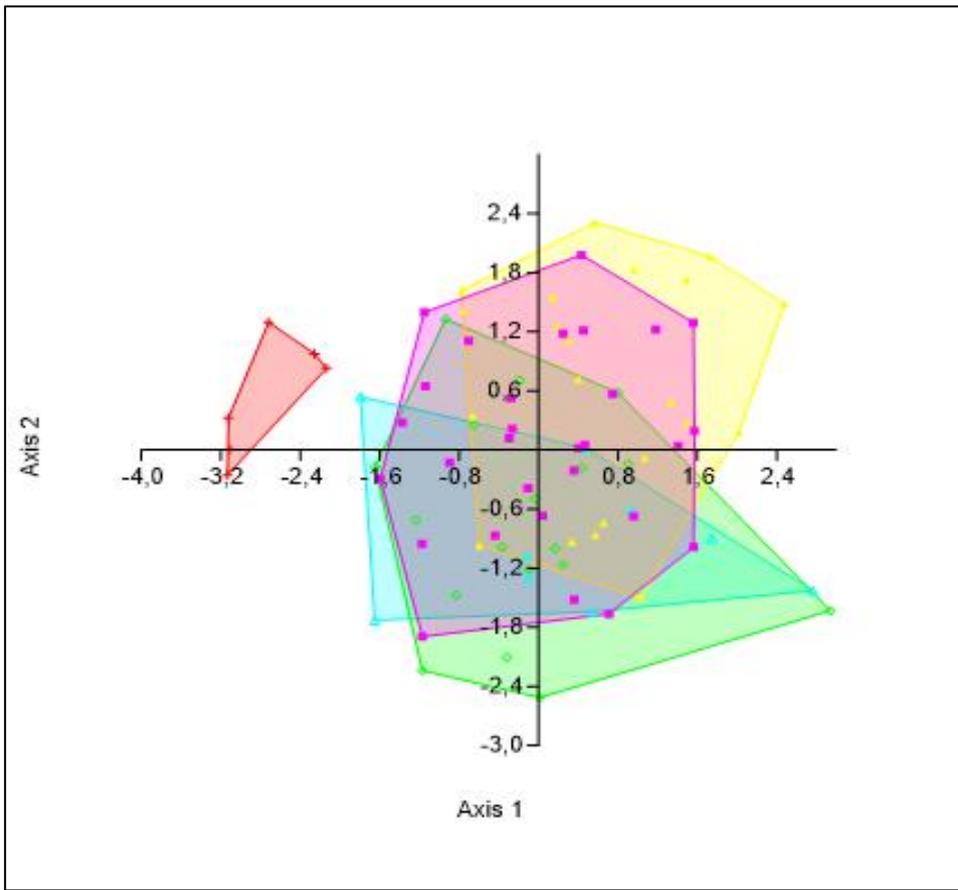


Figura 2 - Análise de variáveis canônicas das medidas morfométricas onde: vermelho unidade 1; rosa, unidade 2; amarelo, unidade 3; verde, unidade 4; azul, unidade 5.

#### 4.2 Vocalização

Foram analisados 26 cantos de três unidades: 7 cantos em Paranapiacaba (Santo André)/SP (Unidade 1); 7 cantos em Corupá/SC e 6 cantos São Bento do Sul/SC (Unidade 2) e 6 cantos Itapema/SC (Unidade 3) (Tabela 4).

Os sonogramas mostram as sequências de cantos reproduzidos pelos indivíduos amostrados nas gravações. O canto de anúncio de *O. rizibilis* é composto por um canto A constituído por uma sequência de notas alinhadas em um curto intervalo (Figura 4). Pode ser sucedido por um canto B composto também por uma nota ou uma sequência de notas ao final (Figura 4), e ainda ser precedido de uma nota introdutória também presente ou ausente. No espectrograma foram analisadas apenas os cantos A, sem as notas introdutórias.

A Tabela 5 mostra análises de cantos feitos por Bastos e Haddad 2002 (Ribeirão Branco/SP) e Magrini 2013 (Pirabeiraba/SC; Itati/RS), ambos consideraram em seus trabalhos nota como pulso.

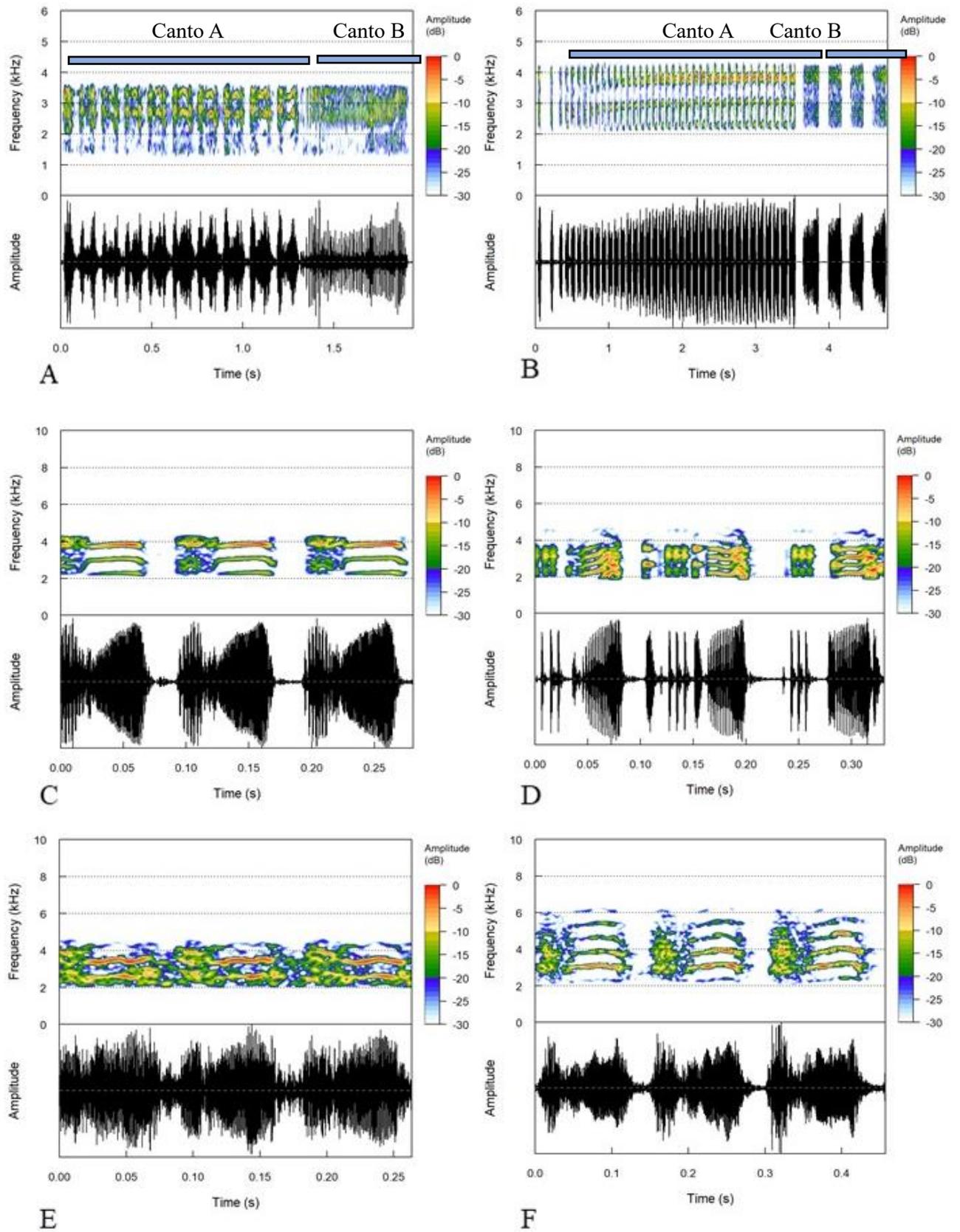
Magrini 2013 apresenta para Itati/RS (área que o autor se refere como Terra de Areia) uma possível espécie candidata, e discutiu sobre o comprimento do canto ser maior que nas localidades de Ribeirão Branco/SP e Pirabeiraba/SC, com uma faixa de 2,91s. Porém, analisando os dados no presente estudo, esse comprimento do canto e a contagem de notas está na média de Itapema/SC que apresenta cantos tão longos quanto Itati, com uma média de 3,27s.

Tabela 3- Parâmetros dos cantos analisados correspondente às regiões de Paranapiacaba/ SP, São Bento do Sul/ SC, Itapema/ SC e Corupá/ SC. Dados apresentados como “n, X ± SD (min – máx)” onde n número de indivíduos, X= média e SD= desvio padrão.

| <b>Código</b>               | <b>FNJV7177/ FNJV31871 (n=7)</b>  | <b>FNJV31431/ JVAL_222 (n=7)</b>  | <b>FNJV31430 (n=6)</b>            | <b>FNJV31429 (n=6)</b>             |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>Local</b>                | Paranapiacaba (Santo André) / SP  | São Bento do Sul / SC             | Corupá/ SC                        | Itapema / SC                       |
| <b>Unidades amostrais</b>   | Unidade 1                         | Unidade 2                         | Unidade 2                         | Unidade 3                          |
| <b>Freq. Dominante (Hz)</b> | 2937,4 ± 282,18 (2625 – 3375)     | 3558,09 ± 246,28 (3344 – 4031,2)  | 3421,9 ± 364,3 (3000 – 3843,8)    | 2843,73 ± 378,1 (2531,2 – 3375)    |
| <b>Freq. Máxima (95%)</b>   | 3431,06 ± 115,2 (3281,2 – 3617,6) | 4866,52 ± 403,39 (4031,2 – 5250)  | 3890,63 ± 114,8 (3750 – 4031,2)   | 3843,78 ± 59,29 (3750 – 3937,5)    |
| <b>Freq. Mínima (5%)</b>    | 1985,13 ± 172,5 (1781,2 – 2156,2) | 2343,8 ± 183,28 (2343,8 – 2756,2) | 2265,63 ± 92,22 (2156,2 – 2343,8) | 2326,46 ± 148,78 (2062,5 – 2437,5) |
| <b>Duração do Canto (s)</b> | 1,63 ± 0,37 (1,16 – 2,081)        | 2,16 ± 0,79 (1,2 – 3,6)           | 3,27 ± 0,59 (2,3 – 4,1)           | 2,27 ± 0,29 (2,0 – 2,7)            |
| <b>Nº de notas</b>          | 14,71 ± 3,4 (10 – 18)             | 20,42 ± 5,6 (12 – 27)             | 33,5 ± 3,4 (30 – 38)              | 28 ± 3,22 (25 – 33)                |
| <b>Duração das notas</b>    | 0,094 ± 0,016 (0,065 – 0,115)     | 0,08 ± 0,018 (0,07- 0,12)         | 0,076 ± 0,0013 (0,06- 0,09)       | 0,0702 ± 0,009 (0,05 – 0,08)       |
| <b>Taxa de notas</b>        | 9,18 ± 2,2 (7,6 – 13,8)           | 9,75 ± 1,4 (6,9 – 10,99)          | 10,4 ± 1,3 (9,2 – 12,7)           | 12,32 ± 0,3 (12 – 12,8)            |
| <b>Nº Pulsos</b>            | 32,22 ± 12,05 (14,6 – 49)         | 88,37 ± 4,9 (82 – 95,4)           | 84,23 ± 5,51 (76,4 – 89,2)        | 78,76 ± 5,6 (70,2 – 86)            |

Tabela 4- Parâmetros dos cantos analisados por Pombal Jr et al, 1995, Bastos e Haddad 2002, Bevier et al. 2008, Magrini 2013, correspondente às regiões de Ribeirão Branco/ SP, Pirabeiraba / SC e Terra de Areia/RS. Dados apresentados como “n, X ± SD (min- max).

|                               | <b>Local</b>       | <b>Unidade amostral</b> | <b>Freq. Dom (Hz)</b> | <b>Freq. Max (95%)</b> | <b>Freq. Min (5%)</b> | <b>Duração do canto (s)</b> | <b>Nº de notas</b> | <b>Duração das notas</b> | <b>Taxa de notas (s)</b> | <b>Nº de pulsos</b> |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| <b>Pombal Jr et al., 1995</b> | Ribeirão Branco/SP | 2                       | (2800- 4000)          | -                      | -                     | 1,79 ±0,58 (0,7-2,95)       | -                  | (1- 4,7)                 | 12,39 ± 3,91 (7- 23)     | -                   |
| <b>Bastos e Haddad, 2002</b>  | Ribeirão Branco/SP | 2                       | 3650 ± 30             | -                      | -                     | 1,92 ± 0,8 (1,3 – 3,15)     | 14,8 – 4,6 (8-22)  | -                        | 7,7                      | -                   |
| <b>Bevier et al., 2008</b>    | Ribeirão Grande/SP | 2                       | 3250 ±130             | -                      | -                     | 2,16 ± 0,22                 | -                  | -                        | 15,6 ± 1                 | -                   |
| <b>Magrini, 2013</b>          | Pirabeiraba/SC     | 2                       | 3080± 8               | -                      | -                     | 2,10 ±0,3 (1,52- 2,48)      | 20,3 ±3,8 (14-25)  | -                        | 9,6                      | -                   |
| <b>Magrini, 2013</b>          | Itati/ RS          | 5                       | 2660 ±4,2             | -                      | -                     | 2,91 ± 2 (2,68- 3,13)       | 30,3 ±1,5 (29-32)  | -                        | 10,44                    | -                   |



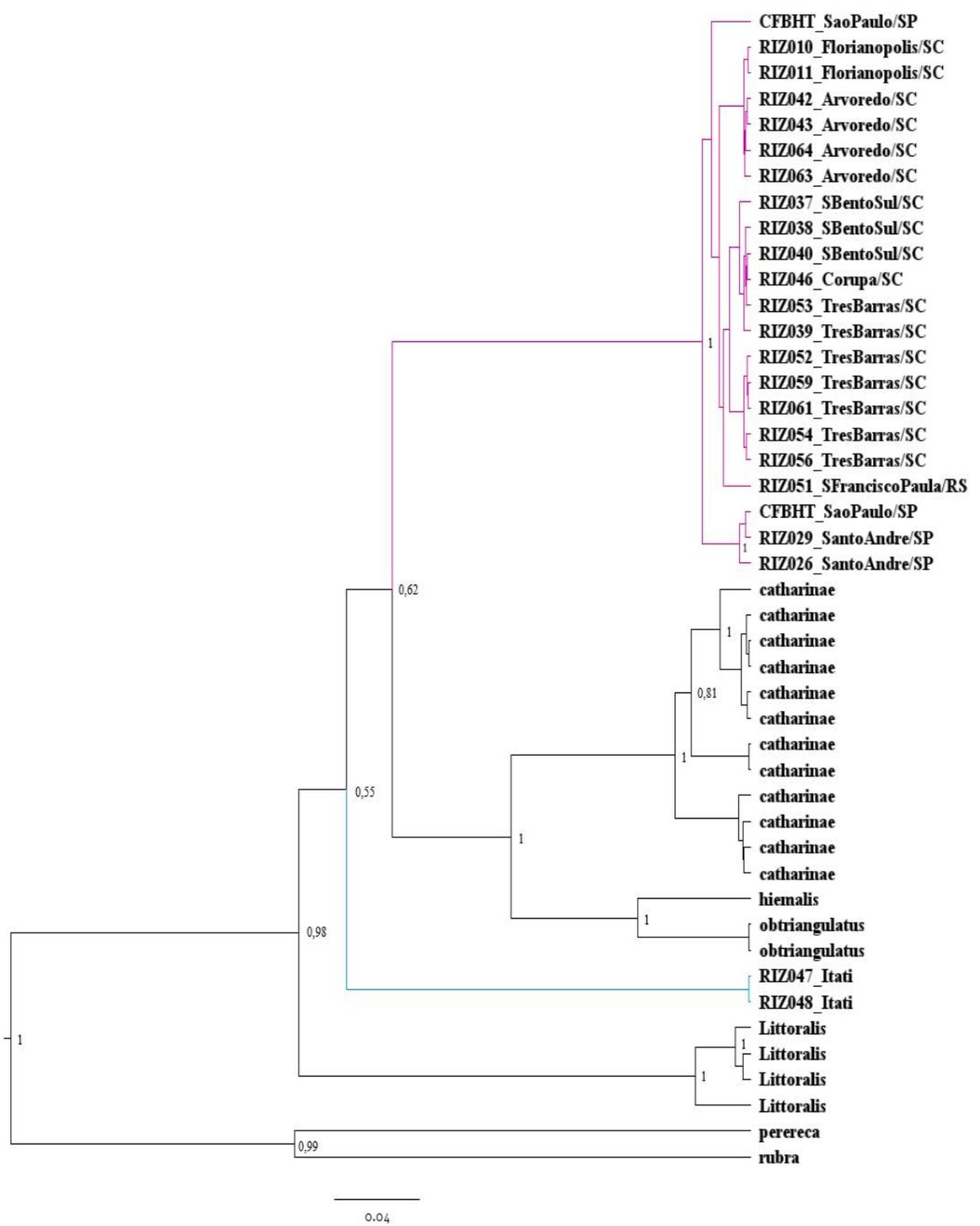
### 4.3 Molecular

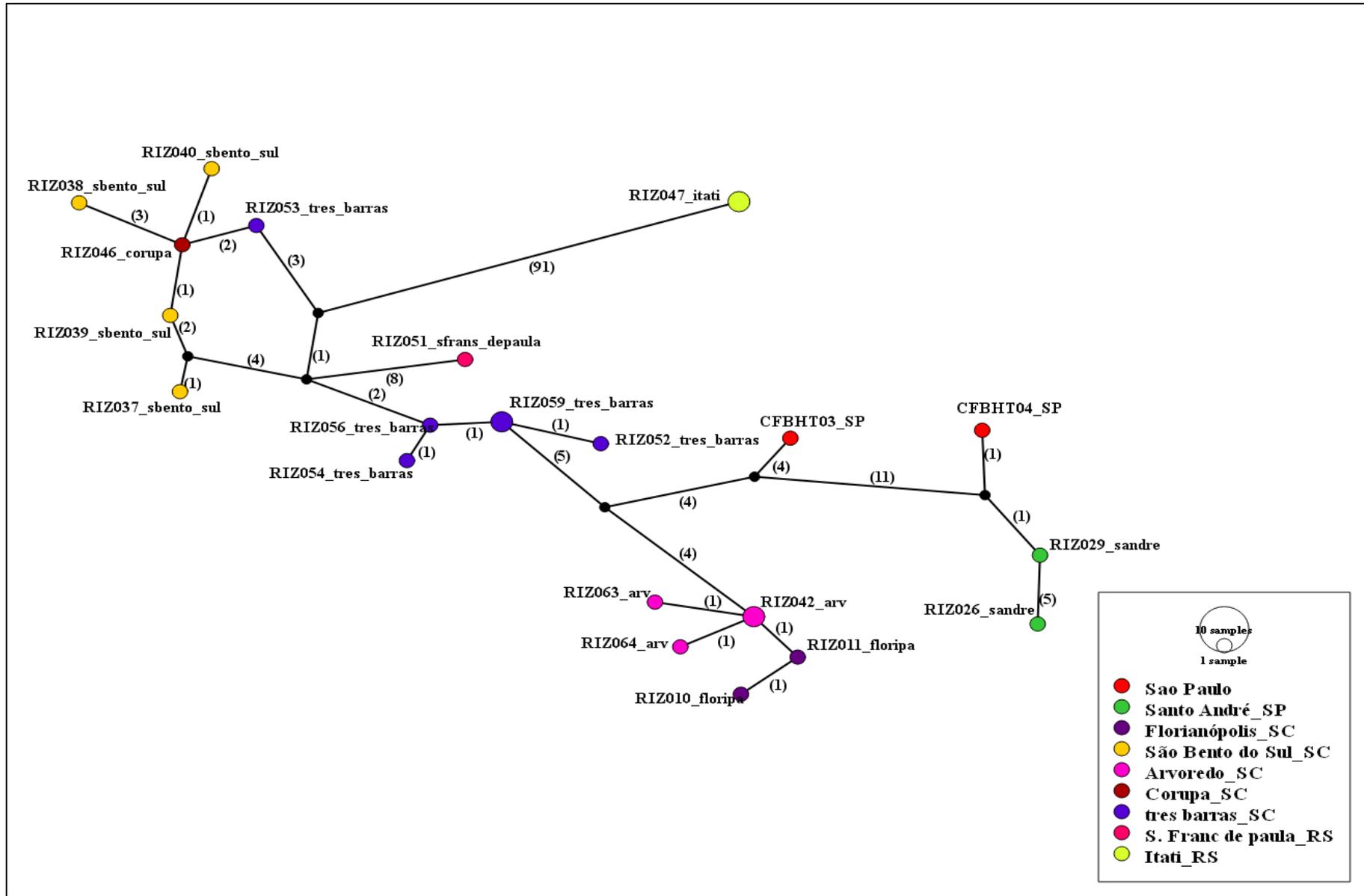
A Figura 4 apresenta o resultado da análise pelo programa Beast com as relações entre a espécie de estudo e os grupos externos, bem como a probabilidade posterior Bayesiana dos nós. A espécie *O. rizibilis* da unidade referente a Ilha do Arvoredo (Unidade 4) é sustentada como grupo irmão dos indivíduos referentes a Florianópolis, em conjunto com as demais populações de Santa Catarina, um espécime da localidade de São Francisco de Paula/RS e as populações referentes a cidade de São Paulo e Santo André/SP, que se diferenciam morfometricamente (Figura 2). O que também pode ser observado na rede de sequências (Figura 5) onde todos os indivíduos do clado *O. rizibilis* apresentam poucos eventos mutacionais, ou seja, uma diferença genética pequena.

Em contrapartida os indivíduos de Itati/RS, que anteriormente não se diferenciavam morfometricamente das demais populações, formaram um clado externo (Figura 5 e 7). A Figura 6 mostrou que essa população apresenta 91 passos mutacionais, indicando uma diferença significativa com os demais indivíduos de *O. rizibilis* amostrados que apresentam entre eles menos de 11 passos.

Tabela 5- Distâncias genéticas entre unidades calculadas no programa MEGA

|           | Unidade_1 | Unidade_2 | Unidade_3 | Unidade_4 | Unidade_5 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Unidade 1 |           |           |           |           |           |
| Unidade 2 | 0,03146   |           |           |           |           |
| Unidade 3 | 0,03383   | 0,00921   |           |           |           |
| Unidade 4 | 0,03469   | 0,02193   | 0,02315   |           |           |
| Unidade 5 | 0,19540   | 0,19271   | 0,18998   | 0,18481   |           |







## 5. DISCUSSÃO

A partir dos resultados apresentados acima podemos observar que a utilização de diferentes métodos nos proporcionou resultados mais precisos para se entender a relação entre as populações de *O. rizibilis*, com detalhes que não seriam conclusivos se cada método fosse observado individualmente.

O gráfico da morfometria (Figura 2) nos mostra que na unidade 1, referente aos indivíduos do nordeste de São Paulo, se separa das demais unidades mesmo apresentando padrões semelhantes no tamanho em relação as outras populações (Tabela 1). Como o efeito do tamanho foi retirado das análises, a forma corporal se mostra distinta sugerindo se tratar de outro táxon ou uma variação geográfica. Esta unidade também diferencia-se na vocalização, onde a quantidade de notas é menor em relação aos outros cantos (Santo André/SP 14,71 notas e Rio Branco/SP 14,8 notas segundo Bastos e Haddad 2002) (Tabela 3) e o espectrograma de Campo Grande/SP (Figura 3B) mostra um conjunto de notas mais espaçadas que os demais cantos, o que também é observado por Bastos e Haddad 2002 e Pombal Jr et al 2005 para Rio Branco/SP, de 1,92s e 1,79s respectivamente.

Fitzpatrick et al., (2009) encontraram diferenças moleculares entre populações de *Thoropa miliaris* ao longo da costa Atlântica na região de São Paulo e relacionou essas diferenças à heterogeneidade regional e estabilidade do habitat devido eventos locais no pleistoceno. Bell et al., (2012) indicaram também, através de um estudo de filogeografia mitocondrial para *Scinax perpusillus* que ao longo das costas norte e sul do estado de São Paulo, são possíveis variações taxonômicas entre populações devido a uma provável barreira filogeográfica complexa, que ocorre na floresta costeira da Serra do Mar.

Segundo Thome et al., (2010) mostraram que variados mecanismos podem ter contribuído para a diversificação e que o habitat deste bioma não é homogêneo em nenhum aspecto com barreiras que coincidem com a formação de novas linhagens em anuros. Gehara et al., (2013) encontram quatro linhagens para *Ischnocnema guentheri* também na região de São Paulo estando de acordo com os paleomodelos propostos para a Mata Atlântica (Carnaval et al., 2009; Thome et al., 2010).

Esta barreira geográfica pode explicar também as diferenças encontradas na unidade 1 que, apesar de formar um clado com as unidades 2, 3 e 4 pela a análise molecular (CO1), difere em canto e morfologia. Segundo DeSalle et al., (2005) se basear em apenas um marcador

molecular para uma inferência taxonômica pode ser conflitante com as abordagens atuais dos sistemas taxonômicos, onde a necessidade de outras abordagens metodológicas se faz necessária pois, sozinho o fragmento escolhido pode não responder de forma efetiva.

Apesar das unidades 1,2, 3 e 4 formarem um clado na análise molecular (Figura 4), as medidas morfométricas apresentadas (Tabela 1) destacaram com precisão os indivíduos da Ilha do Arvoredo, unidade 4, que são claramente maiores que as populações do continente. Porém, após a retirada do efeito do tamanho das variáveis observamos que a população referente a Ilha é sobreposta com as demais unidades (Figura 2), ou seja, as medidas aumentaram proporcionalmente em relação as variações encontradas no continente. Da mesma forma a análise molecular (CO1) (Figura 4), não diferencia a população insular das demais, onde a mesma é apresentada como grupo irmão dos indivíduos de Florianópolis (unidades 3), constituindo um clado da espécie, descartando a possibilidade de uma nova linhagem.

Segundo Lomolino (2005, 2012) um padrão geral, como o tamanho, pode se diferenciar em algumas populações isoladas devido a uma combinação de forças relacionadas ao desenvolvimento da espécie, bem como ao contexto da ilha. A população colonizadora enfrenta uma série de fatores como competição intra e interespecífica, predação, disponibilidade e a capacidade de explorar os recursos e clima (Castellano, S. & Giacoma, C. 1998; Lomolino 2012), elevando a taxa de mortalidade. Com isso, respostas fenotipicamente plásticas determinam a proporção maior ou menor do corpo em relação a população inicial do continente (Palkovacs, 2003, Rebouças et al., 2018). Van Valen (1973) discutiu estes padrões para mamíferos e propôs como regra da Ilha, onde indivíduos pequenos ocorrentes no continente tendem a aumentar o tamanho em ilha e vice-versa.

O padrão encontrado na Ilha do Arvoredo é similar ao documentado por Mageski (2015), que ao estudar *Phyllodytes luteolus* (Wied-Neuwied, 1824) registrou gigantismo para a população insular através de dados morfológicos (peso e CRC). A espécie pode ser encontrada em bromélias tanque, tanto no continente como em ilhas e, assim como *O. rizibilis*, é caracterizada pelo pequeno porte em indivíduos encontrados no continente (CRC: 21 mm) e ilha (CRC: 24mm). Rebouças et al., (2018), registraram que indivíduos da espécie *Ololygon trapicheiroi* (A. Lutz and B. Lutz, 1954) (CRC: 26,2 mm) presentes em ilhas apresentam nanismo (em Ilha da Marambaia: 25,9 mm e Ilha Grande: 25,1 mm) quando comparadas aos indivíduos do continente, logo, o padrão corporal pode depender diretamente do ambiente variando para maior ou menor em relação ao continente.

Em outros trabalhos foi observado que o surgimento do gigantismo e nanismo em ilhas se deve a uma série de fatores, destacando a competição e disponibilidade de recurso (Wu et al., 2006, Meiri 2007, Lomolino 2012, Montesinos 2012, Rebolças 2018). O aumento de recursos diminui a competição interespecífica e a necessidade de explorar territórios para obtenção de alimento, poupando energia e, conseqüentemente, proporcionando crescimento corporal (Lossos & Ricklefs 2010; Lomolino 2012, Mageski, 2015) que, segundo Wu (2006) pode levar também a competição intraespecífica, como, por exemplo, competição territorial, sobressaindo indivíduos maiores, conduzindo ao gigantismo em *O. rizibilis*. A predação também pode ser um fator de impacto, uma vez que, em uma ilha onde as populações devem de ser limitadas, os predadores se deparam com indivíduos especializados, apresentando ou um tamanho corporal menor, permitindo que encondam-se, ou maior contribuindo assim com agilidade para fuga ou defesa, como observado por Palkovacs (2003) em mamíferos, o que explica o tamanho corporal em *O. rizibilis*.

Rebouças et al., (2018) ressaltaram que os padrões corporais são reflexo das características ecológicas específicas das ilhas, assim há necessidade de mais estudos que apresentem outros mecanismos que expliquem essas mudanças, principalmente para anfíbios, afim de entender de forma efetiva como o ambiente insular e a relação entre as populações influencia na mudança corporal (Mageski et al., 2015).

Bell et al., (2012) observaram que populações insulares de *Scinax faivovichii* diferenciavam da população do continente em morfometria e canto, além de exibir diferenças nos marcadores mitocondriais utilizados, concluindo que houve especiação. Por outro lado, para *Scinax peixotoi* os autores relataram que não houve separação genética entre populações do continente e ilha, apesar de consideráveis diferenciações morfométricas. Eles ressaltaram que para ilhas de pontes terrestres a diversificação fenotípica nem sempre pode estar associada à diferenciação genética através de marcadores neutros, onde mudanças genéticas em nível populacional podem ocorrer de forma mínima, não ressaltando a verdadeira diversidade populacional de sistemas mais fechados como ilhas.

A unidade 2 e 3 não se diferenciam em canto (Tabela 3 e 4), exibindo padrões similares em todas as medidas. Bevier et al. (2008) apresentaram em seu estudo o canto de anúncio da espécie em Ribeirão Grande/SP (unidade 2) e o denomina como canto multi-notas ressaltando que a variação dentro da espécie é enorme. A duração do canto se aproxima do que foi observado no presente estudo para localizações referentes a unidade 2, como São Bento do

Sul/SC (2,16s) e Corupá/SC (3,27s) e do que foi observado por Magrini 2013 para Pirabeiraba/SC (2,10s), sendo registrado pela autora uma média de 2,16s, contrastando um pouco com as outras populações referentes a São Paulo. Porém a denominação multi-notas não deixa claro a metodologia utilizada na análise do canto de anúncio, se o trabalho considera o canto inteiro, ou se é dividido em canto A e canto B, como proposto por Kohler et al., (2017).

A vocalização é um fator importante na identificação de anuros e sua eficiência depende dos padrões ambientais que muitas vezes diferenciam populações de uma mesma espécie (Castellano et al., 2000; Macedonia & Clark, 2003, Tessarolo, 2016). As diferenças abordadas anteriormente entre as populações de São Paulo e Santa Catarina são interessantes pois não condizem com os dados moleculares. Padrões clinais na bioacústica, ou seja, ligados a diferença latitudinal da distribuição são relatados em outras espécies de Hylidae, com variações espectrais e temporais nos parâmetros (Baraquet et al., 2015, Tessarolo, 2016). Tessarolo (2016), analisou o canto de *Dendropsophus cruzi* e observou que a duração e repetição do canto de anúncio aumentava do sul para norte, sugerindo que populações mais ao norte modificam os parâmetros temporais, devido à pressões ambientais, para melhor atrair a fêmea. Nos dados apresentados aqui é possível observar que a frequência dominante oscila entre as populações e, apesar de ser menor em Itati/RS, não é possível afirmar que se trata de um padrão clinal nesse parâmetro.

A unidade 5, referente a Itati/RS, apresentara diferenças significativas na análise molecular, corroborando Magrini (2013), que propõe, com dados bioacústicos, uma possível linhagem independente para esta unidade. A análise molecular agrupa as unidades 1, 2, 3 e 4 em apenas um clado e a unidade 5 em um clado distinto.

Apesar do baixo suporte, tanto para a probabilidade bayesiana posterior gerada no Beast (Figura 2), as distâncias moleculares calculadas entre os dois clados formados foram significativas no qual Itati apresentou 19% de diferença com o grande clado de *O. rizibilis* (tabela 5) e, como observado por Lyra et al., (2017), pode-se considerar divergência suficiente para espécie candidata distâncias a partir de 6%. O baixo suporte pode ser explicado pela escolha do fragmento de DNA para o estudo (Lyra et al., 2017, Struck et al., 2018). Assim análises do grupo com outros fragmentos nucleares ou mitocondriais e um número amostral maior poderiam ser efetivos para justificar os dois clados (DeSalle et al., 2005).

Essa elevada diferença molecular, não sustentada por alguma diferença morfológica, pode ser observada em alguns estudos (e.g., Vacher et al., 2017, Jungfer et al., 2010, Stuart et al.,

2006) e muitas vezes pode ser um problema. Espécies que classificamos com ampla distribuição podem se tratar na verdade de duas ou mais espécies crípticas, colocando em jogo sua conservação devido a ampla urbanização e a diminuição de ambientes propícios a sobrevivência.

A partir da revisão de Struck et al., (2017) sobre processos evolutivos relacionados com a críspse morfológica, quando se tem um caso de divergência recente entre as espécies, diferenças morfológicas e morfométricas podem ser imperceptíveis contrastando apenas diferenças moleculares, sendo ambas espécies irmãs na árvore analisada. Entre Itati e as demais populações do clado *O. rizibilis* não se observa uma relação de ancestralidade próxima, assim o paralelismo, também discutido pelo autor, poderia explicar essa relação onde a semelhança morfológica entre o clado de *O. rizibilis*, então monofilético, e a população de Itati seria devido a ancestrais morfológicamente semelhantes, justificando os dados morfométricos não significativos.

Magrini (2013) caracteriza o canto de Itati/RS (unidade 5) como mais longo do que o das demais populações analisadas por ele (2,91s contra 2,10s Pirabeiraba/SP), com uma média de notas maior (30,3 notas contra 25), além de menores valores na frequência dominante (Tabela 4). Porém o que se observa é que Corupá/SC apresenta um canto tão longo quanto o registrado por Magrini (2013) (3,27 s) e que tanto Corupá/SC quanto Itapema/SC apresentam uma média de notas alta (22 e 28 notas respectivamente).

Kohler et al., (2017) apontaram que diferenças no canto entre populações geograficamente separadas podem ser explicadas por fatores como deriva genética, seleção natural para adaptação em diferentes habitats ou ainda seleção sexual. Kohler et al., (2017) observaram que se as populações de determinada espécie estão distribuídas amplamente sem uma barreira geográfica que impeça o fluxo gênico, provavelmente apresentarão um canto único em todas as populações, no entanto se houver uma barreira geográfica, provavelmente unidades genéticas surgiriam por vicariância e junto a elas uma diferenciação no canto.

Alguns estudos ainda sugerem que a relação entre a molecular e a bioacústica, não necessariamente trazem resultados de maneira efetiva. Prohl et al., 2007, ao estudar 25 populações da espécie *Physalaemus pustulosus* na Costa Rica e Panamá, a partir de um transecto de 550 km, concluíram que a bioacústica entre as populações varia mais que as diferenças moleculares, não estando correlacionados diretamente. Este resultado é parecido

com o que foi observado para as populações de São Paulo (unidade 1) quando comparadas com as de Santa Catarina (unidade 2).

Heyer & Reid (2003) mostraram que *Leptodactylus fuscus*, através de um estudo de 32 sapos em 25 localidades, possuem uma variabilidade genética não condizente com a bioacústica, cujos dados não diferenciam as populações. O mesmo pode ser observado para os indivíduos de Itati/RS que molecularmente são apresentados como uma linhagem independente, entretanto, os dados bioacústicos não apresentam diferenças suficientes para que, sozinhos, apontem uma relação de espécies crípticas como sugerido por Magrini (2013).

A descoberta de uma segunda linhagem neste trabalho (unidade 5) e uma provável linhagem em São Paulo (unidade 1), mostra como a integração de diferentes métodos podem convergir em uma taxonomia acurada com respostas a situações complexas, como os padrões variáveis dentro de uma espécie.

## 6. CONCLUSÃO

A taxonomia integrativa nos permite explorar as diversas relações entre espécies e intra espécie (Padial et al., 2010). Através desta abordagem observamos que *O. rizibilis* apresenta uma complexidade em relação às suas populações.

A regra da Ilha de Van Valen (1973) se aplica aos indivíduos da ilha do Arvoredo se diferenciando apenas nas medidas sendo a forma corporal semelhante (gigantismo). Esta unidade apresenta-se também como grupo irmão das demais populações no continente, pois respostas morfológicas podem ser mais rápidas que mutações a nível molecular devido a plasticidade fenotípica dos indivíduos (Rebouças et al., 2018).

A unidade 1, região nordeste da mata atlântica paulista, é isolada na análise morfométrica, uma vez que apresenta diferença no aspecto corporal, além de se diferenciar também na bioacústica, sugerindo uma linhagem diferente. Como se trata da localidade tipo da espécie, esta unidade poderia ser considerado como *O. rizibilis* verdadeira, e as unidades 2 e 3 como *H. mirim* proposto por Bertha Lutz (1972)

As populações referentes a Unidades 1, 2, 3 e 4 formam um clado na análise CO1, separando-se de Itati/RS (Unidades 5) que se destaca com uma distância molecular de 19% de diferença (tabela 5), também sugerindo uma espécie candidata. Apesar de estatisticamente não

apresentarem diferenças morfológicas significativas com as demais populações do continente, apesar do n baixo, outros métodos podem ser empregados para se confirmar maiores diferenças entre *O. rizibilis* e a espécie *candidata*, como citogenética e morfologia interna.

Magrini (2013) cita em seu trabalho uma diferença no canto dessa população (Itati/RS), sugerindo uma relação de espécie críptica. Contudo, nós não observamos a diferença reportada por Magrini. Com os dados de Santo André/SP ainda observamos divergências em relação as outras localizações que pode estar relacionado com a morfologia descrita anteriormente. Sugerimos uma revisão bioacústica da espécie com uma análise mais aprofundada, e gravações mais atuais, em toda a extensão da distribuição comparando principalmente as regiões de Rio Grande do Sul e São Paulo. Assim as diferenças entre São Paulo (Unidade 1) e as demais localizações do sul (Unidades 2 e 3), podem ser melhor reportadas e o canto dos indivíduos da Ilha do Arvoredo descrito.

Trabalhar apenas com um fragmento de DNA pode omitir alguma informação entre as relações observadas ou deixar algum ramo com a confiabilidade baixa, como é o caso de Itati/RS (figuras 5 e 7), então sugerimos também uma análise complementar com as populações incluindo outros fragmentos nucleares.

Assim, com base nos dados analisados, das unidades amostrais propostas no início são sustentadas pelos resultados dos critérios adotados a unidade 1 e unidade 5. Onde as populações da região de Santo André/SP, unidade 1, e Itati/RS referentes a Unidade 5 são apontados como linhagens distintas.

## REFERÊNCIAS

- Bandelt H, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37–48.
- Barrio, A. (1962). Los Hylidae de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires. *Physis*, 23(65), 129-142.
- Baraquet, M., Grenat, P. R., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *acta ethologica*, 18(1), 79-86.
- Bastos, R. P., & Haddad, C. F. (2001). Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 23(1), 97-104.
- Bell, R. C., Brasileiro, C. A., Haddad, C. F., & Zamudio, K. R. (2012). Evolutionary history of *Scinax* treefrogs on land-bridge islands in south-eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, 39(9), 1733-1742.
- Bertoluci, J., & Rodrigues, M. T. (2002). Utilização de habitats reprodutivos e micro-habitats de vocalização em uma taxocenose de anuros (Amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 42(11), 287-297.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., ... & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 148-155.
- Bokermann, W. C. A. (1964). Uma nova espécie de *Hyla* da Serra do Mar em São Paulo (Amphibia, Salientia). *Revista Brasileira de Biologia*, 24(4), 429-434.
- Bouckaert, Remco, Vaughan, T. , Barido-Sottani, J. Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., et al.,. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* 15, no. 4 (2019): e1006650.
- Brassaloti, R. A., de Cerqueira Rossa-Feres, D., & Bertoluci, J. (2010). Anurofauna da floresta estacional semidecidual da Estação Ecológica dos Caetetus, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 10(1), 275-291.
- Canedo, C., & Pombal Jr, J. P. (2007). Two new species of torrent frog of the genus *Hylodes* (Anura, Hylodidae) with nuptial thumb tubercles. *Herpetologica*, 63(2), 224-235.

- Castellano, S., & Giacoma, C. (1998). Stabilizing and directional female choice for male calls in the European green toad. *Animal Behaviour*, 56(2), 275-287.
- Clement M, Snell Q, Walke P, Posada D, Crandall, K (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp* 2:184.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D. 2012 "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8): 772.
- De, S. A., Santos, D. L., Rocha, C. F., Pombal, J. P. J., & Vaz-Silva, W. (2018). A new species of the *Oloolygon catharinae* species group (Anura: Hylidae) from the Cerrado biome, State of Goiás, Central Brazil. *Zootaxa*, 4425(2), 283-303.
- DeSalle, Rob, Mary G. Egan, and Mark Siddall. "The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding." *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences* 360.1462 (2005): 1905-1916.
- Diniz-Filho, J. A. F., Jardim, L., Rangel, T. F., Holden, P. B., Edwards, N. R., Hortal, J., ... & Raia, P. (2019). Quantitative genetics of body size evolution on islands: an individual-based simulation approach. *Biology letters*, 15(10), 20190481.
- Duellman, W. E. (1970). *The hylid frogs of Middle America*. University of Kansas Press, Lawrence (1970) 2 vols.
- Duellman, W. E., & Wiens, J. J. (1992). The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas* 151:1-23
- Duellman, W. E., Riva, I. D. L., & Wild, E. R. (1997). Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* Groups in the Andes of South America, with Definitions and Analyses of Phylogenetic Relationships of Andean Groups of *Hyla*. *Scientific Papers of the Natural History Museum, The University of Kansas* 3: 1-41
- Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104 (1): 1-109.
- Faivovich, J. (2002). A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18(4), 367-393.

- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2005 (294), 1-240.
- Fitzpatrick, S.W., Brasileiro, C.A., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, 18: 2877–2896.
- Frost, Darrel R. 2020. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27(9), 480-488.
- Glaw, F. R. A. N. K., & Kohler, J. (1998). Amphibian species diversity exceeds that of mammals. *Herpetological Review*, 29(1), 11-11.
- Gerhardt, H. C., & Huber, F. (2002). Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. University of Chicago Press.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology*, 59(3):307-21, 2010.
- Haddad, C. F., & Pombal Jr, J. P. (1998). Redescription of *Physalaemus spiniger* (Anura: Leptodactylidae) and description of two new reproductive modes. *Journal of Herpetology*, 557-565.
- Hammer, Øyvind, David AT Harper, and Paul D. Ryan. "PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis." *Palaeontologia electronica* 4.1 (2001): 9.
- Hepp, F., Lourenço, A. C. C., & Pombal Jr, J. P. (2017). Bioacoustics of four *Scinax* species and a review of acoustic traits in the *Scinax catharinae* species group (Amphibia: Anura: Hylidae). *Salamandra*, 53, 212-230.
- Hey, J. (2010). Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 905-920.

- Heyer, W. R., & Reid, Y. R. (2003). Does advertisement call variation coincide with genetic variation in the genetically diverse frog taxon currently known as *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Leptodactylidae)?. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(1), 39-54.
- Hillis, D. M. (2019). Species Delimitation in Herpetology. *Journal of Herpetology*, 53(1), 3-12.
- Jungfer, K. H., Reichle, S., & Piskurek, O. (2010). Description of a new cryptic southwestern Amazonian species of leaf-gluing treefrog, genus *Dendropsophus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Salamandra*, 46(4), 204-213.
- Justin C. Bagley. Setting DNA substitution models in BEAST. 11 de out. 2016. Disponível em <<https://tecnoblog.net/247956/referencia-site-abnt-artigos/>> Acesso em: 12 de mar. 2020.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodriguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F., Emmrick, M., FRANK GLAW9, Haddad, C. F. B., Rödel, M. R. & Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1),1.
- Köhler, J., Vieites, D. R., Bonett, R. M., García, F. H., Glaw, F., Steinke, D., & Vences, M. (2005). New amphibians and global conservation: a boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *BioScience*, 55(8), 693-696.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Leal, F., Leite, F. S., Da Costa, W. P., Nascimento, L. B., Lourenço, L. B., & Garcia, P. C. (2020). Amphibians from Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. VI: A New Species of the *Physalemus deimaticus* Group (Anura, Leptodactylidae). *Zootaxa*, 4766(2), 306-330.
- Leigh, JW, Bryant D (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.
- Lomolino, M. V. (1985). Body size of mammals on islands: the island rule reexamined. *The American Naturalist*, 125(2), 310-316.
- Lyra, M. L., Haddad, C. F., & de Azeredo-Espin, A. M. L. (2017). Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 966-980.

- Macedonia J.P. & Clark, D.L. (2003). Headbob display structure in the naturalized *Anolis* lizards of Bermuda: sex, context, and population effects. *Journal of Herpetology* 37, 266–276.
- Mageski, M., Ferreira, R. B., Jesus, P. R., Costa, L. C. da, Roper, J. J., & Ferreira, P. D. (2015). *The island rule in the Brazilian frog Phyllodytes luteolus (Anura: Hylidae): incipient gigantism?* *Zoologia (Curitiba)*, 32(5), 329–333. doi:10.1590/s1984-46702015000500001
- Magrini, L. (2013). Caracterização acústica e padrão de evolução do canto de anúncio em pererecas neotropicais do clado *Scinax* (Hylidae): Implicações taxonômicas, sistemáticas e macroevolutivas. Doctoral Thesis, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto. doi:10.11606/T.59.2013.tde-03012014-160237. Retrieved 2020-04-27, from [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)
- McCormack, J. E., Huang, H., & Knowles, L. L. (2009). Maximum likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic biology*, 58(5), 501-508.
- McLeod, D. S. (2010). Of least concern? Systematics of a cryptic species complex: *Limnonectes kuhlii* (Amphibia: Anura: Dicroglossidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(3), 991-1000.
- Michonneau, F. (2017, August). Using GMYC for species delineation. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.838260> ( acesso 28/10/2019)
- Pombal Júnior, J. P., Bastos, R. P., & Haddad, C. F. B. (1995). Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G and Suchard MA (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. Syy032.
- Rebouças, R., da Silva, H. R., & Sole, M. (2018). Frog size on continental islands of the coast of Rio de Janeiro and the generality of the Island Rule. *PloS one*, 13(1).
- Rohlf, J.F (2005). tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (2015). tpsUtil, file utility program. version 1.61. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, J.F (2015). The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 26:1-4

- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsis, S.E., Sanchez-Gracia, A. (2017) DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299- 3302 (2017).
- Steiner, F. M., Schlick-Steiner, B. C., Konrad, H., Moder, K., Christian, E., Seifert, B., ... Buschinger, A. (2006). No sympatric speciation here: Multiple data sources show that the ant *Myrmica microrubra* is not a separate species but an alternate reproductive morph of *Myrmica rubra*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 777–787.
- Stuart, B. L.; Inger, R. F.; Voris, H. K. (2006). High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters*, 2 (3): 470-474.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16. doi:10.1186/1742-9994-7-16
- Pröhl, H., Hagemann, S., Karsch, J., & Höbel, G. (2007). Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 113(9), 825-837.
- Ryan, M. J. (2001). *Anuran communication*. Smithsonian Institution Press.
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksbj, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., ... Dimitrov, D. (2018). Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 153–163. doi:10.1016/j.tree.2017.11.007
- Tessarolo, G., Maciel, N. M., Ribeiro Morais, A., & Bastos, R. P. (2016). Geographic variation in advertisement calls among populations of *Dendropsophus cruzi* (Anura: Hylidae). *The Herpetological Journal*, 26(3), 219-227.
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera, F.A. & Alexandrino, J. (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 1018–1031
- Toledo, L. F., & Haddad, C. F. (2005). Acoustic repertoire and calling behavior of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*, 39(3), 455-465.
- Vacher, J. P., Kok, P. J., Rodrigues, M. T., Lima, J. D., Lorenzini, A., Martinez, Q., ... & Dewynter, M. (2017). Cryptic diversity in Amazonian frogs: integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112, 158-173.

Vences, M., & Köhler, J. (2007). Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 569-580). Springer, Dordrecht.

Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. (The University of Chicago Press: Chicago, IL.).