

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Reavaliação da posição taxonômica de *Boana multilineata* (Lutz & Lutz 1939) em relação a
Boana bischoffi (Boulenger 1887) (Anura, Hylidae)

Ana Clara Monte Teixeira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Novembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Reavaliação da posição taxonômica de *Boana multilineata* (Lutz & Lutz 1939) em relação a
Boana bischoffi (Boulenger 1887) (Anura, Hylidae)

Ana Clara Monte Teixeira

Dr. Ariovaldo Antonio Giaretta

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Novembro – 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Ariovaldo A. Giaretta, pelo empenho em acompanhar de perto a minha formação profissional ao longo desses anos, quem sempre me influenciou positivamente na convivência no âmbito acadêmico e entendimento científico. Agradeço também pela confiança, amizade e oportunidade de me iniciar como pesquisadora.

Ao Dr. Axel Kwet que cedeu suas gravações de *Boana bischoffi*.

Aos colegas de laboratório (LTSAN) pelo auxílio e amizade, especialmente ao Davi L. Bang que colaborou com as gravações de *B. bischoffi*.

Aos membros da banca Bernardo F. V. Teixeira e Vanessa R. Marcelino pelos comentários e avaliação.

Aos amigos do PET BIO Pontal, pelo aprendizado e experiência, especialmente a Tutora Dra. Gabriela Lícia S. Ferreira que sempre me apoiou desde os anos iniciais da graduação, por ter me direcionado a pesquisa científica.

À minha família, especialmente aos meus pais, Elias e Priscilla, minha irmã, Roberta, a “turma do barulho”, Josefina, Eliane, Julia e João Pedro, pelo apoio incondicional, compreensão, confiança e incentivos.

Ao Felipe F. Naves, que sempre esteve disposto a me oferecer coisas que por vezes me faltaram, tranquilidade e, acima de tudo, paciência. Agradeço também por todo o companheirismo, o apoio e o incentivo que foram essenciais para eu concluir essa etapa.

Aos meus amigos, especialmente Bruna Capuano, Catharine Momenti, Iury Bianchini, Larissa Fernandes, Lucas Rodrigues, Luiza Lopes, Maria Luiza Ferroni, Rafaella Rodrigues, Sandy Duque, Thamires Pereira e Waleska Manzan com os quais pude contar em diversos momentos ou simplesmente quando precisei de companhia, otimismo e outras perspectivas.

Ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, especialmente aos docentes do curso de Ciências Biológicas.

E por fim, ao CNPQ e a FAPEMIG de onde advêm os recursos financeiros do nosso laboratório.

RESUMO

Boana bischoffi foi originalmente descrita do Rio Grande do Sul e tem como sinônimo *Hyla multilineata* de Paranapiacaba, São Paulo. O histórico da nomenclatura dessas espécies reflete o conflito de interpretação do padrão de cor dorsal das populações. Visando uma reavaliação da taxonomia de *B. multilineata* em relação a *B. bischoffi*, conduzimos uma reanálise de dados morfométricos e acústicos. Nenhum caráter morfométrico ou acústico se mostrou diagnóstico na distinção entre as espécies. Multivariadamente, porém, os dados morfométricos claramente as discriminaram; houve também uma relação alométrica diferencial entre ambas em relação a largura da cabeça. Em canto encontramos elementos de distinção entre ambas como frequência dominante e intervalo entre pulsos. As diferenças morfológicas e acústicas entre ambas as espécies se somam a outras evidências de isolamento e diferenciação como cor e distâncias gênicas as quais, em conjunto, suportam a aceitação de ambas como espécies plenas.

Palavras-chave: *Boana bischoffi*, *Boana multilineata*, taxonomia.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS.....	9
MATERIAIS E MÉTODOS	11
RESULTADOS.....	14
Morfologia.....	14
Canto.....	17
Canto de <i>B. bichoffi</i>	17
Canto de <i>B. multilineata</i>	17
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICES	32
Apêndice I	32
Apêndice II:.....	33
Apêndice III:	34
ANEXO I.....	35

INTRODUÇÃO

A taxonomia é o processo científico que identifica, classifica, descreve e nomeia grupos naturais existentes e extintos (Padial *et al.* 2010), tornando possível reconhecer a dimensão da biodiversidade. Numa definição moderna, se reconhecem que espécies são linhagens metapopulacionais que estão evoluindo separadamente (de Queiroz 2007). A taxonomia tradicional, baseada unicamente em morfologia, pode ser limitada em revelar a riqueza de espécies de um grupo, principalmente em relação àqueles que abrigam uma diversidade críptica, e esta só pode ser revelada considerando-se bases de dados mais amplas, como molecular, acústica, e comportamental (Vences *et al.* 2005, Dayrat 2005, Bickford *et al.* 2007). Neste contexto, a necessidade de uma abordagem integrativa em taxonomia (*sensu* Dayrat 2005) tem sido enfatizada.

Os Anura (Lissamphibia) apresentam ampla distribuição ao redor do globo, estando ausentes somente de regiões de latitudes extremas e de muitas ilhas oceânicas (Frost 2018). Entre os Anura, a comunicação acústica é amplamente difundida e é um mecanismo importante de reconhecimento intra-específico na corte/paramento e estabelecimento de territórios (Blair 1958). Dentre as vocalizações emitidas pelos anuros, o canto de anúncio é frequentemente utilizado como um mecanismo de isolamento reprodutivo (Duellman and Trueb 1986) e é fonte importante de informação taxonômica.

Hoje são reconhecidas cerca de 6900 espécies de Anura, das quais aproximadamente 710 são Hylidae (Rafinesque 1815) (Frost 2018), popularmente conhecidas como pererecas. Os hílideos estão distribuídos pela América do Norte e do Sul, Índias Ocidentais, região Australo-Papuana e da Eurásia temperada até o norte da África (Frost 2018). Os hílideos compõem a segunda maior família de anuros e estão agrupados em sete subfamílias, entre elas os Hylinae (Rafinesque 1815), com 166 espécies (Frost 2018). Os Hylinae foram revisados em termos taxonômicos em função de filogenias moleculares e, como definidos hoje, são

encontrados na América, Eurásia temperada e extremo norte da África (Faivovich *et al.* 2005, Duellman 2001). Antes das redefinições internas de Hyliinae a maioria das espécies estava incluída em *Hyla* Laurenti 1768. Os Hylidae também são particularmente diversificados na região Neotropical, com um alto número de espécies endêmicas na Mata Atlântica, onde ainda existem questões taxonômicas mal-resolvidas com implicações na avaliação da distribuição geográfica e situação de conservação das espécies (Haddad *et al.* 2008).

Em Hyliinae hoje se reconhece 15 gêneros, como *Boana* Gray 1825 (aproximadamente igual ao até a pouco aceito *Hypsiboas*, Wagler 1830) o qual abriga formas Centro e Sul Americanas (Faivovich *et al.* 2005, Dubois 2017, Frost *et al.* 2017). *Boana* abriga hoje aproximadamente 92 espécies alocadas em sete sub-grupos, entre eles o de *Boana pulchella* (Faivovich *et al.* 2005, Frost 2018).

O grupo de *B. pulchella* (Duméril and Bibron 1841) compreende ca. de 36 espécies (Frost 2011, Köhler *et al.* 2010, Lehr *et al.* 2010, 2011), distribuídas no Sudeste do Brasil e no Paraguai, Uruguai e nas regiões leste ao norte da Argentina (Frost 2018).

Dentro do grupo de *B. pulchella*, *Boana bischoffi* (Boulenger, 1887) (Figura 1A) é endêmica do leste do Brasil e tida como amplamente distribuída em áreas de Mata Atlântica do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro. *Boana bischoffi* foi originalmente descrita do Rio Grande do Sul e tem como sinônimo bem aceito *Hyla vittigera* Werner 1894 de Santa Catarina e, putativamente, *Hyla multilineata* Lutz and Lutz 1939 (Figura 1B) do Alto da Serra de Cubatão, São Paulo. O histórico da nomenclatura de *B. bischoffi* reflete o conflito de interpretação do padrão de coloração dorsal das diferentes populações. Os indivíduos das populações Sul, ocorrentes do estado do Paraná ao Rio Grande do Sul, tem padrão liso (não listrados), com variantes com linhas escassas e interrompidas até dorso completamente cinza e, algumas vezes, manchado (Marcelino 2009). As populações do Norte (*Hyla multilineata*) foram caracterizadas por apresentarem múltiplas linhas dorsais longitudinais (Marcelino

2009). No estado do Paraná ocorrem espécimes com coloração dorsal intermediária. Todavia, espécimes listrados e não listrados nunca foram observados em sintopia.

Cochran (1955), Duellman (1977) e outros, consideraram *H. multilineata* uma subespécie de *H. bischoffi*. Heyer *et al.* (1990) adotaram o nome *H. multilineata* para os espécimes de Boracéia (SP) em função da proximidade da localidade tipo, porém, ressaltaram que não entrariam no mérito da relação de ambas. Marcelino *et al.* (2009) encontraram que dados morfométricos também não distinguem ambas as formas.

Existem descrições de canto para espécimes do norte (Bokermann 1967, Heyer *et al.* 1990, Toledo *et al.* 2007, Pombal 2010) e do sul (Kwet 2001) (compilação no Apêndice 1), porém, essas descrições são breves e se baseiam em baixos tamanhos amostrais de forma que não é possível uma avaliação mais aprofundada da existência de e eventuais diferenças entre elas.

OBJETIVOS

Visando uma re-avaliação da problemática do reconhecimento taxonômico de *Boana multilineata* em relação a *B. bischoffi*, apresentamos aqui uma reanálise comparativa dos dados morfométricos de Marcelino *et al.* (2009) e acústicos de Kwet (2001) e novas gravações de nossa base de dados.

A)

Foto: A. Kwet

B)

Foto: A. Giaretta

Figura 1. *Boana bischoffi* (Corupá-SC) (A) e *Boana multilineata* (Apiaiá-SP) (B) ilustrando os padrões de coloração dorsal não listrado e listrado, respectivamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados morfométricos se referem a 17 variáveis de morfologia externa e são os mesmos analisados em Marcelino (2009), que inclui 60 espécimes de *B. multilineata* e 172 de *B. bischoffi*.

As bases de dados acústicos são do Laboratório de Taxonomia, Sistemática e Ecologia Comportamental de Anuros Neotropicais (LTSAN), Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Ituiutaba, MG (Apêndice II) e do Dr. Alexander Axel Kwet, Museu Estadual de História Natural Stuttgart, Alemanha (Apêndice III), que representam a base de dados descritos em Kwet (2001).

Para ambas as espécies se reconhecem dois tipos de notas, na literatura chamadas de “A” e “B” (Bokermann 1967, Kwet, 2001). Apenas gravações de machos que apresentaram ambas as notas (“A” e “B”) foram consideradas, sendo oito do Estado de São Paulo (municípios de Apiaí, Atibaia e Salesópolis), os quais representam a população do norte e 16 machos de localidades sulinas dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (municípios de Guaratuba, Jaraguá do Sul, Porto Belo, Rio Branco do Sul, São Francisco de Paula, São Martinho, Santo Amaro da Imperatriz, Seara e Terra de Areia). Foram considerados valores médios de cada variável para cada indivíduo na matriz conjunta (notas “A” e “B”).

As gravações da coleção AAG foram feitas com gravadores digitais Marantz PMD 670 e 671 e microfone Sennheiser K6/ME67; as do Dr. A. Kwet foram obtidas com microfone Sennheiser K6/ME66 acoplado a um gravador de fita K7 Sony WM-D6C e posteriormente digitalizada no software Cool Edit Pro (Kwet, comunicação pessoal).

Os cantos foram analisados no programa Raven Pro 1.5, versão 64-bit (Bioacoustics Research Program 2014), com as seguintes configurações: *Window Type* = *Hann*, *DFT* e *Window Size* = 256 *samples*, *Grid Spacing* (resolução espectral) = 46,9 Hz, *Overlap*

(sobreposição) = 89,1%, *Hop Size* (resolução temporal) = 0,583ms, *Bandfilter* (filtro de janela) até 587 Hz e *Brightness* e *Contrast* (brilho e contraste de janela) = 55% e 50% respectivamente. As definições e terminologia dos caracteres acústicos seguem Köhler *et al.* (2017) e estão listadas na Tabela 1.

Considerando-se que não houve significância estatística na diferença entre as medianas de temperatura entre localidades do norte (20°C) e sul (21°C) ($Z = 1,70$; $p = 0,09$), esta variável não foi levada em conta como fator correlato nas análises discriminantes.

Tabela 1. Variáveis acústicas (conforme Köhler *et al.* 2017) utilizadas na caracterização dos cantos “A” e “B” de *Boana bischoffi* e *Boana multilineata* no presente trabalho. Para definição de cantos “A” e “B” ver Resultados.

Caracteres acústicos e unidades	Definição
Duração dos cantos (s)	Tempo entre o início e o final da emissão de um canto.
Intervalo entre cantos (s)	Tempo entre o final de um canto ao começo do próximo.
Número de pulsos por canto	Pulsos correspondem à menor unidade temporal de um canto.
Duração do primeiro pulso (s)	Tempo do começo ao final do primeiro pulso de um dado canto.
Duração do pulso mediano (s)	Tempo do começo ao final do pulso da porção mediana do canto
Duração do último pulso (s)	Tempo do começo ao final do último pulso.
Intervalo do primeiro pulso (s)	Tempo do final do primeiro pulso ao começo do seguinte. Somente em cantos “B”.
Intervalo do pulso mediano (s)	Tempo do final de um pulso da porção mediana do canto ao começo do seguinte. Somente em cantos “B”.
Intervalo do último pulso (s)	Tempo do final do pulso anterior ao começo do último pulso. Somente em cantos “B”.
Frequência a 5% (Hz)	Energia correspondente a 5% da energia total selecionada no espectrograma.
Frequência a 95% (Hz)	Energia correspondente a 95% da energia total selecionada no espectrograma.
Frequência dominante (Hz)	Pico de maior energia do canto
Taxa de repetição de pulsos (Pulsos/s)	Número de pulsos emitidos por segundo. Esses valores serão obtidos a partir do número de pulsos dividido pelo tempo de duração do respectivo canto.

Buscamos por discriminação nos caracteres morfométricos e acústicos entre ambas as espécies pela aplicação de duas funções de análises discriminantes: “randomforest” (pacote *radomForest* (Liaw and Wiener 2002)) e “dapc” (*adegenet* (Jombart *et al.* 2008, 2010, Jombart and Collins 2015), ambos pacotes da plataforma R (3.5.0, versão 64-bit, R Core Team 2017). As análises do *randomForest* (não-paramétricas) geram muitas (*e.g.* 500) árvores classificatórias usando reamostragens da base de dados e então geram classificadores e agregam os resultados por voto em classes (Breiman 2001). A Análise Discriminante sobre Componentes Principais (*dapc*) identifica e descreve agrupamentos (Jombart and Collins 2015). As variáveis indicadas como importantes nas análises discriminantes foram testadas quanto a significância estatística das diferenças através do Asymptotic Wilcoxon-Mann-Whitney Test (Z) usando o pacote “*coin*” (Hothorn *et al.* 2008), em R. Realizamos uma análise de variância (ANOVA) sobre os escores de uma Análise de Componentes Principais sobre os dados morfológicos e modelamos a largura da cabeça tendo o Comprimento Rosto-Cloacal (CRC) como covariável e as localidades (norte x sul) como fator (ANCOVA, função “*av*” em R).

As figuras de audioespectograma e oscilogramas foram geradas no pacote *Seewave* v.1.6 (Sueur *et al.* 2008) em R, com a seguinte configuração: FFT=256 pontos de resolução, janela *Hanning* e *Overlap* = 85%.

RESULTADOS

Morfologia

Nenhum caráter morfométrico isolado se mostrou diagnóstico na distinção entre as duas espécies. A *randomForest* resultou em uma pobre discriminação, com taxa de erro global de 26% (78% erro para *B. multilineata*) e (0,08% para *B. bischoffi*). Nesse modelo, porém, se o padrão de cor (variável discreta) é incluído no modelo a discriminação entre

ambas é total ao longo do Eixo I do Escalonamento Multidimensional (matriz de distancia resultante do RF). No dapc, 38 (60 originalmente) espécimes de *B. multilineata* tiveram maior probabilidade de pertencer a *B. bischoffi*, a qual, por sua vez, foi dos 172 originais para 194 com maior probabilidade de pertencimento ao grupo. Houve, porém, significância estatística na análise de variância sobre os escores dos indivíduos ao longo do Eixo I da Análise de Componentes Principais ($F = 13,6$; $p = 0,0003$), o qual diz respeito a tamanho, mas não nos demais eixos ($p > 0,05$) (forma); concordantemente, há diferença significativa no CRC entre as espécies (CRC *B. multilineata* média = 40,4; DP = 2,91; $n = 60$; *B. bischoffi* média = 38,9; DP = 2,86; $n = 172$; $F = 11,2$; $p = 0,001$). A análise de covariância revelou uma relação alométrica entre CRC e a largura da cabeça, com indicada pela presença de diferença na inclinação das retas de regressão ($F = 6,94$; $p = 0,009$) (Figura 2).

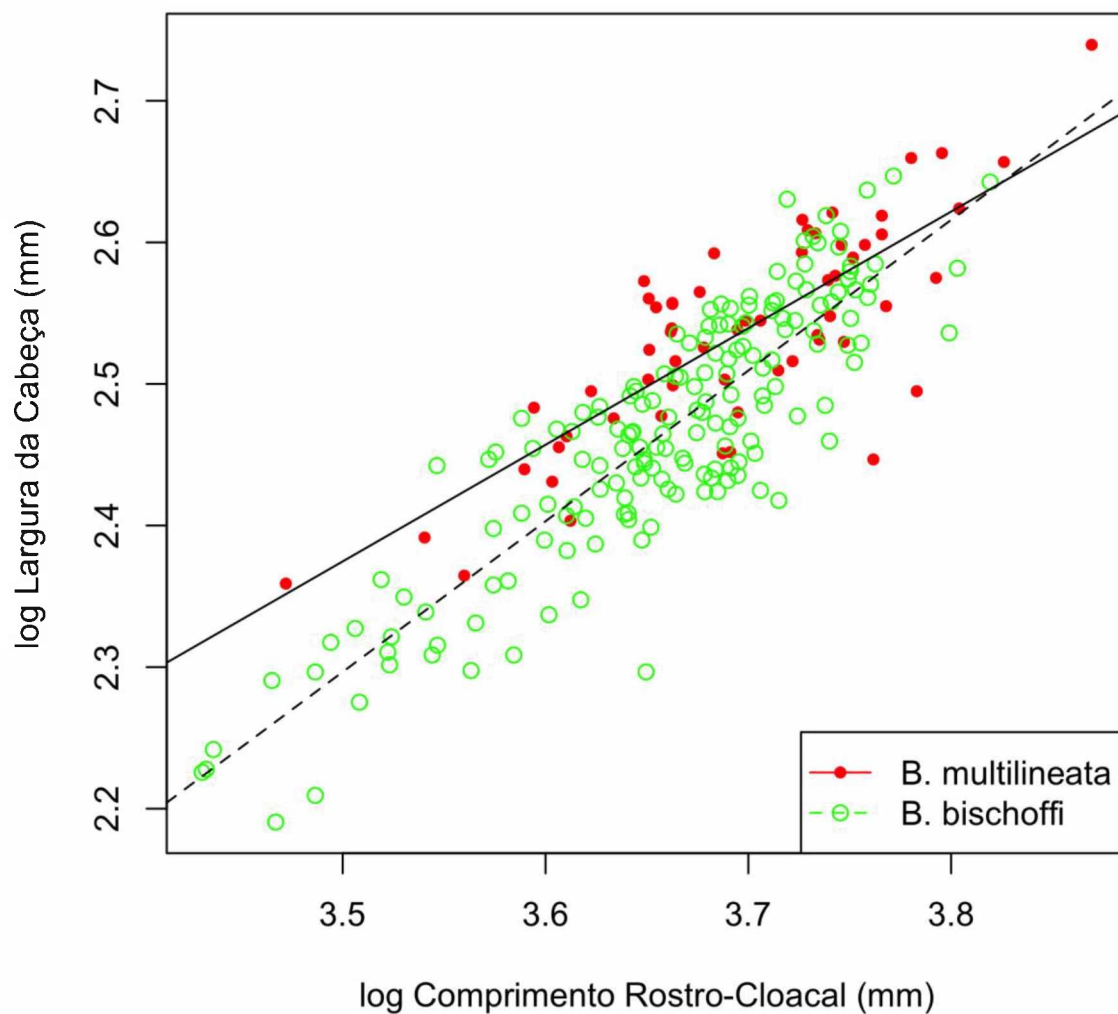


Figura 2. Relação entre tamanho total (CRC) e largura da cabeça entre espécimes de *Boana multilineata* e *B. bischoffi*. A diferença nas inclinações das retas é significativa ($F = 6,94$; $p = 0,009$).

Canto

Para ambas as espécies encontramos os ambos tipos de canto esperados (“A” e “B”). O canto “A” sempre esteve presente, porém, o “B” não foi emitido em sete das 32 gravações (ausente em cinco de 21 arquivos de *B. bischoffi* e em dois de 11 de *B. multilineata*). O canto “A” tem pulsos concatenados e pode ser emitido sozinho ou em pares (Figura 3) e em intervalos irregulares de tempo. O canto “B” é composto por uma série de pulsos bem definidos (Figura 4), geralmente emitido após o canto A. Nenhum caráter acústico isolado se mostrou diagnóstico na distinção entre as duas espécies.

Canto de *B. bischoffi*. — A nota “A” tem duração entre 0,045–0,101s, é composta por 7,2–14,8 pulsos e é emitida a uma taxa de 135–216 pulsos/segundo; a frequência dominante está entre 1641–2158 Hz. O canto B, dura entre 0,685–1,432s, tem 8,2–19,0 pulsos por nota e tem taxa entre 8–24 de pulsos/segundo; com frequência dominante entre 1583–2110 Hz.

Canto de *B. multilineata*. — A nota “A” tem duração entre 0,042–0,066s, é composta por 6,6–10,0 pulsos e é emitida a uma taxa de 139–193 pulsos/segundo; a frequência dominante está entre 1519–1861 Hz. O canto “B”, dura entre 0,644–1,295s, tem 12,0–22,0 pulsos por nota e tem taxa entre 14–26 de pulsos/segundo; com frequência dominante entre 1406–1883 Hz.

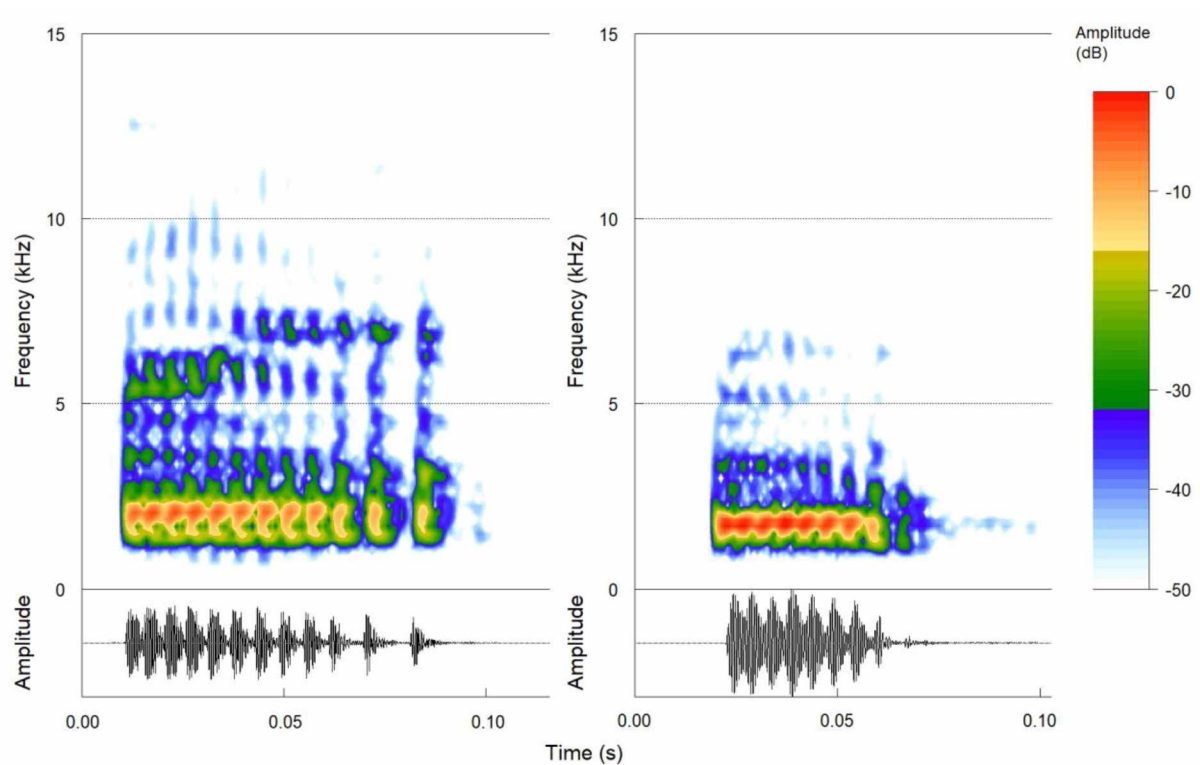


Figura 3. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) dos cantos “A” de *B. bischoffi* (esquerda) (São Fr. de Paula, RS, ar 15°C) e de *B. multilineata* (direita) (Atibaia, SP, ar 21°C) numa mesma escala de tempo. Notar a diferença na frequência dominante que é elementos importante na discriminação de ambas (ver Resultados).

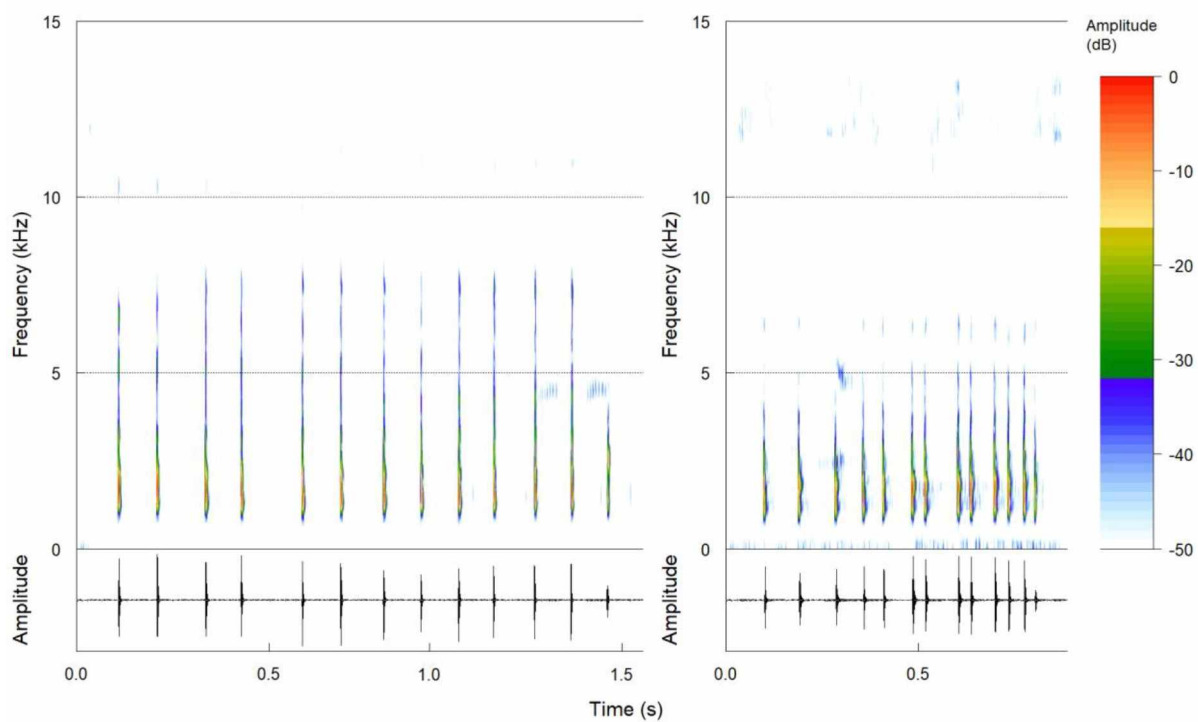


Figura 4. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) dos cantos “B” de *B. bischoffi* (esquerda) (São Fr. de Paula, RS, ar 15°C) e de *B. multilineata* (direita) (Atibaia, SP, ar 21°C) numa mesma escala de tempo. Notar a diferença na frequência dominante que é elemento importante na discriminação de ambas (ver Resultados).

A análise discriminante (dapc) resultou numa separação completa entre as espécies (Figura 5), com cada indivíduo classificado como pertencente ao seu próprio grupo com probabilidade maior que 0,95. Dentre as variáveis apontadas pelo dapc como importantes na separação, houve significância estatística nas diferenças em frequência dominante do canto “A” ($Z = -2,63$; $p = 0,008$), número de pulsos do “A” ($Z = -2,60$; $p = 0,009$), duração do primeiro pulso do “A” ($Z = 2,90$; $p = 0,003$) (Figura 6), intervalo de pulso do “B” ($Z = -2,02$; $p = 0,043$) e a taxa de pulso do “B” ($Z = 1,96$; $p = 0,048$) (Figura 7). A diferença na frequência dominante do “B” foi marginalmente significativa ($Z = -1,59$; $p = 0,111$) (Figura 7). Na análise *randomForest* (resultados mais frequentes com erro de 17%) a maioria dos espécimes foi recuperado como pertencente ao seu próprio grupo (Norte = 5 de 8 e Sul = 15 de 16).

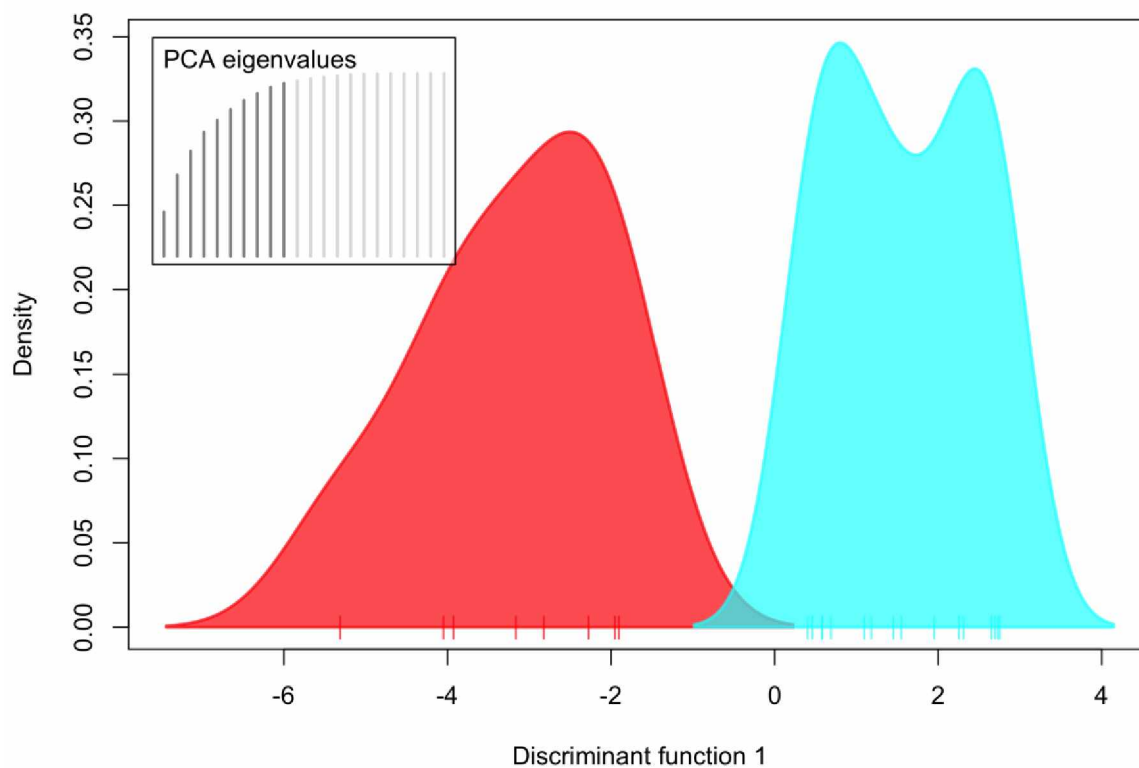


Figura 5. Função de densidade do primeiro eixo discriminante (dapc) considerando caracteres acústicos de *Boana multilineata* (vermelho) e *Boana bischoffi* (azul). Note a baixa sobreposição entre as espécies. Eixo X = Escores dos indivíduos ao longo do eixo. O quadro interno (esquerda superior) mostra o percentual de variância explicada em relação ao número de variáveis (dez = 95%).

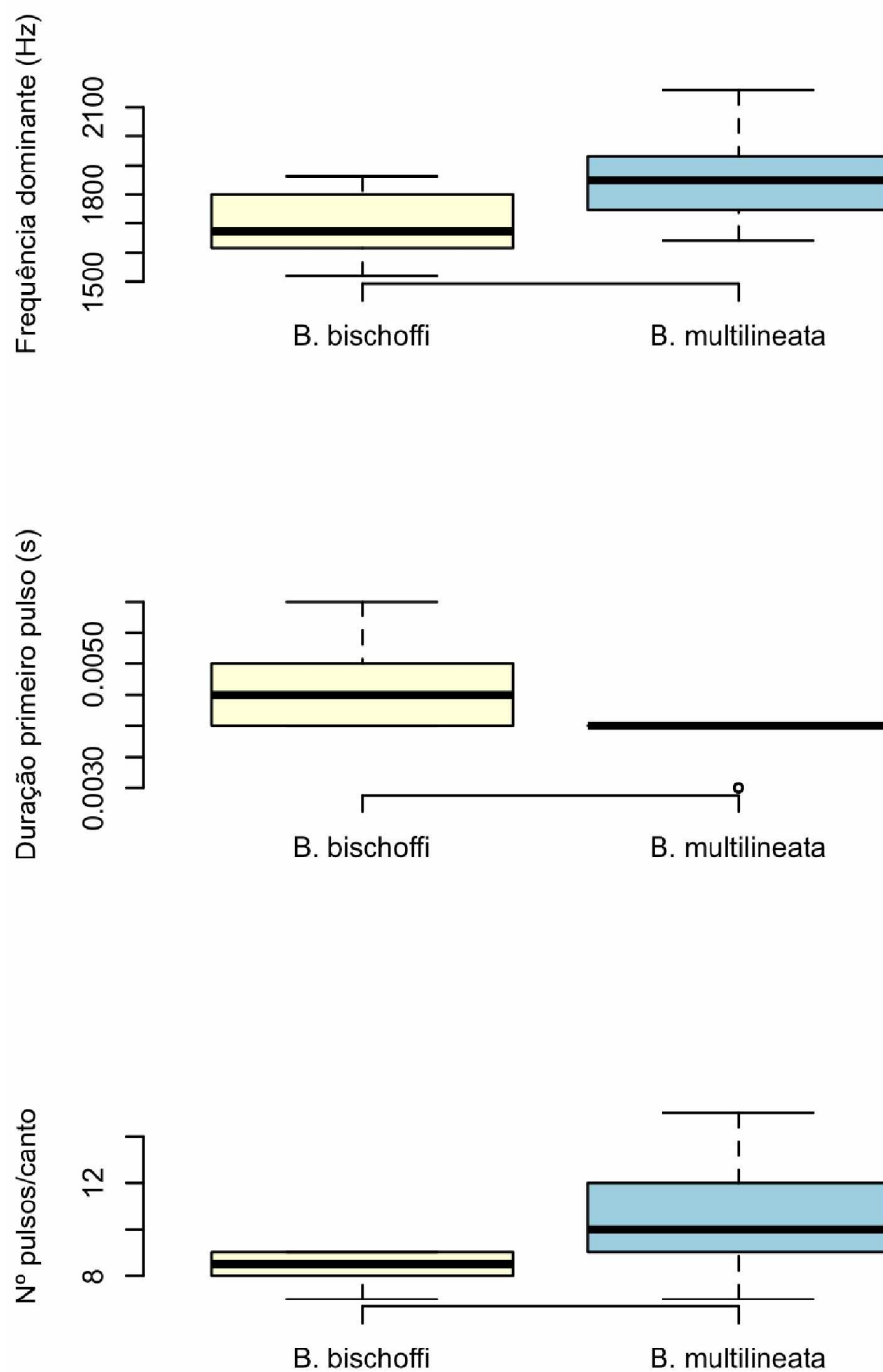


Figura 6. *Boxplot* (mediana, 1º e 3º quartís e valores máximos e mínimos) de três variáveis do canto “A” com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre ambas as espécies.

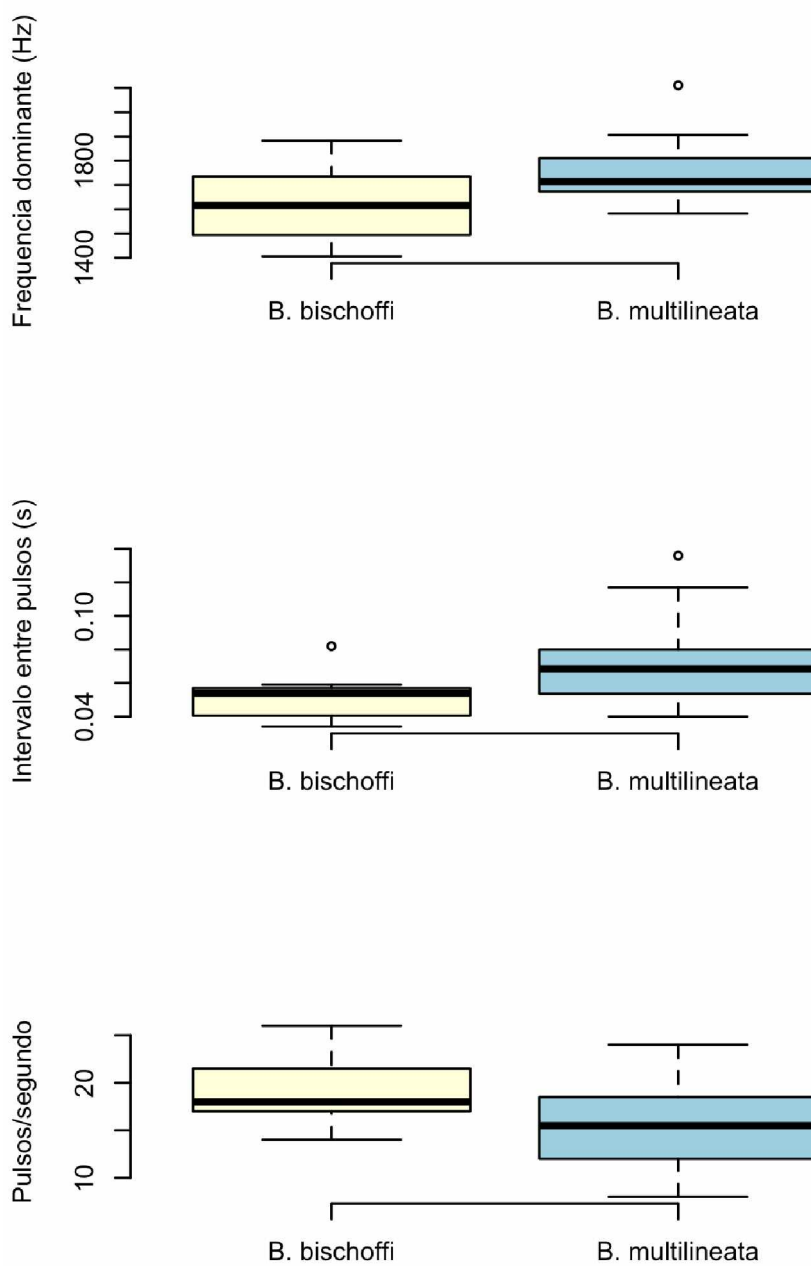


Figura 7. *Boxplot* (mediana, 1° e 3° quartil e valores máximos e mínimos) de três variáveis do canto “B” para ambas as espécies. As diferenças em intervalo entre pulsos e taxa de pulsos são significativas ($p < 0,05$); a diferença entre as frequências dominantes é marginalmente significativa ($p = 0,11$).

DISCUSSÃO

As análises morfométricas revelaram elementos de diferenciação entre as espécies em termos de tamanho e padrão de crescimento da cabeça, padrões que não foram detectados em estudos anteriores (Marcelino 2009), inclusive, quando os dados morfométricos são tomados em conjunto com o de cor resultam em plena discriminação (modelo *randomForest*).

Para ambas as espécies, a presença de dois tipos de canto (“A” e “B”) e o padrão de emissão (“A” sozinho ou em pares e “B” menos frequente e mais emitido mais comumente depois de “A” ou isolado) corresponde ao previamente reportado em Bokermann (1967), Heyer *et al.* (1990), Kwet (2001), Toledo *et al.* (2007) e Pombal (2010). Os valores das variáveis de cada canto também correspondem aos previamente reportados (Apêndice I). Em função provavelmente dos baixos tamanhos amostrais, da falta da consideração de variáveis importantes e de medições padronizadas, os dados literários não permitiam encontrar, como obtido no presente estudo, elementos de distinção entre ambas as espécies, como no caso da frequência dominante (em “A” e “B”), um elemento importante na distinção taxonômica de espécies (Gerhardt & Huber 2002).

Marcelino *et al.* (2009) apresentaram análises de morfometria e coloração e, pelo menos em relação a cor, confirmam a realidade da existência das duas formas geográficas (listrada x não-listrada). Ressalte-se, porém, que também reconheceram a existência de uma zona de introgressão no sul do estado de São Paulo e norte do Paraná. Posteriormente, Alexandrino *et al.* (2011; comunicação pessoal) encontraram baixos níveis de fluxo gênico (DNA mitocondrial) entre ambas as espécies atribuíveis a barreiras geográficas (*e.g.* rios, montanhas) suportando as duas linhagens como distintas uma da outra.

Embora sem fatores determinantes claros, um padrão de quebra filogeográfico no sul do estado de São Paulo, como visto entre *B. multilineata* e *B. bischoffi*, tem sido reconhecido para outros anuros como *Vitreorana* (Centrolenidae) (Paz *et al.* 2018), *Thoropa*

(Cycloramphidae), *Phyllomedusa* (Phyllomedusidae) e *Proceratophrys* (Odontophrynidae), (Fitzpatrick *et al.* 2009, Brunes *et al.* 2010, Amaro *et al.* 2012). Outros táxons animais nesse padrão incluem Aves e Serpente (Grazziotin *et al.* 2006). Ressalte-se que, diferentemente do encontrado para as espécies do presente estudo, dentro de *Vitreorana uranoscopa*, a divergência genética não foi seguida de diferenciação em canto (Haga *et al.* 2014).

Dentro de um contexto taxonômico, o grau de diferenciação que encontramos para ambas as espécies aqui estudadas é maior do que o aceito para espécies tidas como plenas como *Aplastodiscus perviridis* e *A. cochranæ* (Anura Hylidae), espécies cuja identidade específica é suportada pela cor (verde e avermelhada, respectivamente) (Garcia *et al.* 2001) e distância genética (Berneck *et al.* 2017).

Sumarizando, as diferenças morfológicas e acústicas que encontramos para *B. multilineata* e *B. bischoffi* se somam a outras evidências de isolamento e diferenciação como cor e distâncias gênicas as quais, em conjunto, suportam a aceitação de ambas como espécies plenas, de diferenciação taxonômica mais fácil, inclusive, do que de outras espécies plenamente aceitas de Hylidae.

CONCLUSÃO

Nenhum caráter morfométrico ou acústico isolado se mostrou diagnóstico na distinção entre *Boana multilineata* e *Boana bischoffi*. As análises morfométricas revelaram elementos de diferenciação entre as espécies em termos de tamanho e padrão de crescimento da cabeça, padrões que não foram detectados em estudos anteriores.

Para ambas as espécies encontramos os ambos tipos de canto esperados (“A” e “B”) e o padrão de emissão. Em função provavelmente dos baixos tamanhos amostrais, da falta da consideração de variáveis importantes e de medições padronizadas, os dados literários não permitiam encontrar, como obtido no presente estudo, elementos de distinção entre ambas as espécies, como no caso da frequência dominante, elemento importante na distinção

taxonômica de espécies. As diferenças morfológicas e acústicas que encontramos para *B. multilineata* e *B. bischoffi* se somam a outras evidências de isolamento e diferenciação como cor e distâncias gênicas as quais, em conjunto, suportam a aceitação de ambas como espécies plenas.

REFERÊNCIAS

(Estruturado nas normas da revista *Phyllomedusa*. Anexo I).

Alexandrino, J., V. R. Marcelino, J. Giovanelli, and C. F. B. Haddad. 2011. The evolutionary diversification of a Neotropical forest endemic treefrog and the Quaternary persistence of southern Brazilian Atlantic Forest. Unpublished thesis. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Brasil.

Amaro, R. C., M. T. Rodrigues, Y. Yonenaga-Yassuda, and A. C. Carnaval. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 880–888.

Berneck, B. V. M., A. A. Giaretta, R. A. Brandão, C. A. G. Cruz and C. F. B. Haddad. 2017. The first species of *Aplastodiscus* endemic to the Brazilian Cerrado (Anura, Hylidae). *ZooKeys* 642: 115–130.

Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, and I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.

Bioacoustics Research Program. 2014. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software. Version 1.5. URL: <http://www.birds.cornell.edu/raven>.

Blair, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American Naturalist* 92: 27–51.

- Bokermann, W. C. A. 1967. Notas sobre cantos nupciais de anfíbios brasileiros. III. (Anura). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 39: 489–493.
- Breiman, L. 2001. Random Forests. *Machine Learning* 45: 5–32.
- Brunes, T. O., F. Sequeira, C. F. B. Haddad, and J. Alexandrino. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1120–1133.
- Cabanne, G. S., F. M. D’Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos, and C. Y. Miyaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.
- Cochran, D. M. 1955 "1954". Frogs of southeastern Brazil. *Bulletin of the United States National Museum* 206: 1–423.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- de Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56: 879–886.
- Dubois, A. 2017. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina*. 11: 1–48.
- Duellman, W. E. 1977. Liste der rezenten amphibien und reptilien. Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. *Das Tierreich* 95: 1–225.
- Duellman, W. E. and L. Trueb. (eds). 1986. *Biology of Amphibians*. New York, USA. McGraw-Hill. 670 pp.

- Duellman, W. E. (ed.). 2001. The Hylid Frogs of Middle America. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*. New York, USA. 1250 pp.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. Frost, J. A. Campbell, and W. C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294:1–240.
- Fitzpatrick, S. W., C. A. Brasileiro, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology* 18: 2877–2896.
- Frost, D. R. (ed.). 2011. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.5. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D. R., E. M. Lemmon, R. W. McDiarmid, and J. R. Mendelson. 2017. Scientific and standard english names of amphibians and reptiles of North America North of Mexico, with comments regarding confidence in our understanding. Herpetological Circular no. 43. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles* 43: 6–21.
- Frost, D. R. (ed.). 2018. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6.0. (April 2018) Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garcia, P. C. A., U. Caramaschi, and A. Kwet. 2001. The taxonomic status of the *Hyla cochranae* Mertens and recharacterization of *Aplastodiscus* A. Lutz (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 1197–1218.
- Gerhardt, H. C. and F. Huber. 2002. Acoustic communication in insects and anurans: Common problems and diverse solutions. Chicago: University of Chicago Press.

- Grazziotin, F. G., M. Monzel, S. Echeverrigaray, and S. L. Bonatto. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15: 3969–3982.
- Haddad, C. F. B., J. G. R. Giovanelli, and J. Alexandrino. (eds.). 2008. *O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios*. In: Marcos S. Buckeridge. (Org.). *Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil*. São Carlos, São Paulo. Rima Editora. 206pp.
- Haga, I. A., F. S. Andrade, N. P. Toscano, A. Kwet, and A. A. Giaretta. 2014. Advertisement call and habitat of *Vitreorana uranoscopa* (Anura, Centrolenidae) in Brazil. *Salamandra* 50: 236–240.
- Heyer, W. R., A. S. Rand, C. A. G. Cruz, O. L. Peixoto, e C. E. Nelson. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia, São Paulo* 31: 231–410.
- Hothorn, T., K. Hornik, M. A. van de Wiel, and A. Zeileis. 2008. Implementing a class of permutation tests: the coin package. *Journal of Statistical Software* 28: 1–23.
- Jombart, T. 2008. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.
- Jombart T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 1–15.
- Jombart T. and C. Collins. 2015. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.0. *Imperial College London*: 1–43.
- Köhler J., D. Kosciński, J. M. Padial, J. C. Chaparro, P. Hand-Ford, S. C. Lougheed, and I. De La Riva. 2010. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). *Zoologica Scripta* 39: 1–19.

- Köhler, J., M. Jansen, A. Rodríguez, P. J. R. Kok, L. F. Toledo, M. Emmrich, F. Glaw, C. F. B. Haddad, M. O. Rödel, and M. Vences. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251: 1–124.
- Kwet, A. (ed.). 2001. *Frosche im Brasilianischen Araukarienwald - anurengemeinschaft des Araukarienwaldes von Rio Grande do Sul: diversitat, reproduktion und ressourcenaufteilung*. Munster, Germany. Natur und Tier – Verlag. 192pp.
- Lehr, E., J. Faivovich, and K. H. Jungfer. 2010. A new andean species of the *Hypsiboas pulchellus* group: adults, calls and phylogenetic relationships. *Herpetologica* 66: 296–307.
- Lehr, E., J. Faivovich and K. H. Jungfer. 2011. Description of the tadpoles of *Hypsiboas aguilari* and *H. melanopleura* (Anura: Hylidae: *Hypsiboas pulchellus* group). *Salamandra* 47: 30–35.
- Liaw, A. and M. Wiener. 2002. Classification and regression by randomForest. *R News* 2: 18–22.
- Lutz, A. and B. Lutz. 1939. New Hylidae from Brazil/Hylideos novos do Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 11: 67–89.
- Marcelino, V. R. 2009. Distribuição geográfica e variação morfológica em populações do anuro *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae). Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Brasil.
- Marcelino, V. R., C. F. B. Haddad, and J. Alexandrino. 2009. Geographic distribution and morphological variation of striped and nonstriped populations of the brazilian Atlantic Forest treefrog *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae). *J herpetol* 43: 351–361.
- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva, and M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology* 7: 1–14.

- Paz, A., Z. Spanos, J. L. Brown, M. Lyra, C. Haddad, M. Rodrigues, and A. Carnaval. 2018. Phylogeography of Atlantic Forest glassfrogs (*Vitreorana*): when geography, climate dynamics and rivers matter. *Heredity*. Published online: 24 October 2018.
- Pombal, J. P., Jr. 2010. O espaço acústico em uma taxocenose de anuros (Amphibia) do sudeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional* 68: 135–144.
- R Core Team 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Sueur, J., T. Aubin, and C. Simonis. 2008. Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics* 18: 213–226.
- Toledo, L. F., O. G. S. Araújo, L. Guimarães, R. Lingau, and C. F. B. Haddad. 2007. Visual and acoustic signaling in three species of brazilian nocturnal tree frogs (Anura, Hylidae). *Phyllomedusa* 6: 61–68.
- Vences, M., M. Thomas, R. M. Bonett, and D. R. Vieites. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1859–1868.

APÊNDICES

Apêndice I. Compilação dos dados descritos na literatura sobre as vocalizações de *Boana bischoffi* e *B. multilineata*. (Anura: Hylidae). Valores representam Amplitude e/ou Médias±Desvios Padrão.

Canto tipo A	Bokermann 1967 (<i>H.multilineata</i>)	Heyer <i>et al.</i> 1990 (<i>H.multilineata</i>)	Kwet 2001 (<i>Hyla bischoffi</i>)	Toledo <i>et al.</i> 2007 (<i>Hypsiboas bischoffi</i>)	Pombal 2010 (<i>Hypsiboas bischoffi</i>)
Localidade	Paranapiacaba, SP	Boraceia, SP	Taquara (Mundo Novo, RS)	Iporanga, SP	Ribeirão Branco e Apiai, SP
Duração (ms)	(100±-)	70–100(-)	80–110(-)	-	50–100(73,3±13,1)
Notas por canto	1	1–2	1	-	1–2
Intervalo entre cantos (ms)	300–400 (-)	(400±-)	-	-	-
Pulsos por notas	-	08–11	-	-	-
Pulsos/Seg	-	100–200(-)	140–180(-)	-	-
Frequência Dominante (Hz)	-	1100–2000(-)	1040–2880(-)	1572–2092(1894±-)	1400–2100(-)
N machos	-	-	7	8	-
Canto tipo B	Bokermann 1967 (<i>H.multilineata</i>)	Heyer <i>et al.</i> 1990 (<i>H.multilineata</i>)	Kwet 2001 (<i>Hyla bischoffi</i>)	Toledo <i>et al.</i> 2007 (<i>Hypsiboas bischoffi</i>)	Pombal 2010 (<i>Hypsiboas bischoffi</i>)
Localidade	Paranapiacaba, SP	Boraceia, SP	Taquara (Mundo Novo, RS)	Iporanga, SP	Ribeirão Branco e Apiai, SP
Duração (ms)	800–1000(-)	-	800–900(-)	-	(1260± -)
Notas por canto	1	1	1	1	1
Intervalo entre cantos (ms)	-	-	40–200(-)	112–119(147 ±22,9)	-
Pulsos por notas	-	9–14	10–18	-	-
Pulsos/Seg	15–20(-)	16–33(-)	8–14(-)	15–20(-)	(21±-)
Frequência Dominante (Hz)	1300–2,100(-)	1200–2200(-)	1000–2900(-)	1290–1550 (1470 ±0,06s?)	1,700–2,000 (-)
N machos	-	-	7	2	-

Apêndice II: Arquivos sonoros da coleção de anuros da UFU que foram utilizados na execução da presente proposta.

Gravação	Localidade	Ano	Ar-(Água) °C
Hypsib_bischoffiApiaiSP1aAAGm671	Apiai-SP	2015	20-(21)
Hypsib_bischoffiApiaiSP2aAAGm671	Apiai-SP	2015	20-(21)
Hypsib_bischoffiApiaiSP3abcIV_AAGm670	Apiai-SP	2015	20-(21)
Hypsib_bischoffiAtibaiaSP1abcAAGm671	Atibaia-SP	2011	21-(22)
Hypsib_bischoffiAtibaiaSP2abAAGm671	Atibaia-SP	2013	21-(22)
Hypsib_bischoffiAtibaiaSP5aAAGm671	Atibaia-SP	2015	22-(26)
Hypsib_bischoffiAtibaiaSP7abcIAG_AAGmt	Atibaia-SP	2015	24,6-(24)
Hypsib_bischoffiSalesopolisSP2abAAGm671	Salesópolis-SP	2015	22-(23)
Hypsib_bischoffiRioBrancoDoSulPR1aDLB_AAGm671	Rio Branco do Sul-PR	2017	21,5-(-)
Hypsib_bischoffiRioBrancoDoSulPR2aDLB_AAGm671	Rio Branco do Sul-PR	2017	21,5-(-)
Hypsib_bischoffiRioBrancoDoSulPR3aDLB_AAGm671	Rio Branco do Sul-PR	2017	21,5-(-)

Apêndice III: Arquivos sonoros da coleção do Dr. Alexander Axel Kwet que foram utilizados na execução da presente proposta.

Gravação	Localidade	Ano	Ar (°C)
bischoffi_1B12abRS_kwet	São Fran. Paula – RS	1995	15
bischoffi_2B11RS_kwet	São Fran. Paula – RS	1995	13
bischoffi_3B04abRS_D-minutus_kwet	São Fran. Paula – RS	1995	18
bischoffi_5A07RS_S-perereca_kwet	São Fran. Paula – RS	1996	15
bischoffi_9A08RS_kwet	Terra de Areia – RS	1997	22,5
bischoffi_13B17RS_kwet	São Fran. Paula – RS	2002	16
bischoffi_14A02SC_kwet	São Martinho – SC	2002	21
bischoffi_14A06SC_kwet	São Martinho – SC	2002	20,5°
bischoffi_19A02aPA_kwet	Guaratuba – PR	2003	19,5
bischoffi_20A01SC_kwet	Porto Belo – SC	2003	20,5
bischoffi_21B18SC_kwet	Seara – SC	2004	20
bischoffi_22A13SC_kwet	Jaraguá do Sul – SC	2004	20
bischoffi_23A02SC_kwet	Santo Amaro da Imperatriz – SC	2004	20

ANEXO I. Normas da revista *Phyllomedusa*.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

General Information. *Phyllomedusa* publishes articles dealing with the entire field of herpetology. The journal also maintains sections for Short Communications and Book Reviews. Manuscripts are considered on the conditions that they: (1) have not been published elsewhere; (2) are not under consideration for publication, in whole or in part, in another journal or book; and (3) are submitted by the authors in the format and style of *Phyllomedusa* and in accordance with the specifications included in the Instructions to Authors. Manuscripts should be submitted as a Microsoft Word document via e-mail or via surface delivery on a CD. High-quality color images are accepted. Manuscripts must be written in English with appropriate abstracts in alternate languages. If English is not your primary language, arrange to have your manuscript reviewed for English usage before you submit it. Direct any questions about manuscript submission to the primary editor. Publication in *Phyllomedusa*, including color images, is free of charge.

Scope. Manuscripts must contain significant new findings of fundamental and general herpetological interest. Surveys and taxonomic descriptions are published only if there is sufficient new biological information or taxonomic revision to render the paper of general herpetological interest. Lower priority is accorded confirmatory studies, investigations primarily of localized interest, range extensions, technique papers with narrow application, descriptions of phenomena based on insufficient data, and descriptive work that is not placed in a significant context. Manuscripts should include a clear statement of the purpose of the study or the hypothesis that was tested.

Peer Review. At least two referees, an Associate Editor, and the Editor will review each manuscript that is deemed to fall within the scope of *Phyllomedusa*. Authors will be notified of the status of their manuscript within 90 days. Revised manuscripts accepted for publication will be edited for English usage and syntax prior to final acceptance for publication.

Manuscript Style and Format. Use the active voice when possible; thus, you should write "I/we studied the frog," rather than "The frog was studied by me/us" (passive voice). Use American spelling and punctuation. Double space the entire manuscript, including references, tables, table captions, and legends for illustrations. Use Times New Roman 12-point font, and set up document with margins of at least 2.54 cm (1 in.) on each side. Do not justify the text; it should be left aligned and ragged right. Number manuscript pages consecutively and lines continuously, following the arrangement and format outlined below exactly.

- **Title:** Bold-faced caps and lower-case Roman; sentence capped, left aligned; use colons to separate ranked taxonomic names.
- **Name(s) of author(s):** Bold-faced caps and lower-case Roman; left aligned; use serial commas. Follow example:
José Wellington Alves dos Santos^{1,2}, Roberta Pacheco Damasceno^{1,3}, and Pedro Luís Bernardo da Rocha^{2*}
- **Institutional affiliation(s):** Light-faced caps and lower-case Roman; left aligned. Follow example:
¹ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: wly@ib.usp.br.
² Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia Universidade Federal da Bahia, 40170-210, Salvador, Bahia, BA, Brazil. E-mail: peurocha@ufba.br.
³ Current address: Department of Ecology and Evolutionary Biology, The University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045-7580, USA.
- **Abstract:** Should not exceed 350 words (including lead title) and one paragraph and only is included in regular articles. Alternate-language abstracts may be included, but these must match the content of the English abstract. See example:

Abstract

Title of paper in bold-faced Roman. Content of abstract follows in light-faced Roman; left alignment.

- **Keywords:** Light-faced Roman; separate words with commas; capitalize only proper nouns; include descriptors not contained in the title in alphabetical order.
- **Body of Article:** The text of the article will include the following parts indicated by **primary headings in bold-faced Roman aligned to the left (except for References, which should be centered).**

Introduction**Materials and Methods****Results****Discussion****Acknowledgments****References**

Secondary headings within major sections are title-capped, italics aligned left. **Tertiary headings** follow a paragraph indentation; they are sentence capped, and set in italics. Tertiary headers are followed by a point and an em-dash. Follow example:

Material and Methods [Primary header]*Study Site* [Secondary header]

Selection of site.—This is a Tertiary, or third-level, heading. Note that it is indented and lacks a hard return. The heading is followed by a point or period and a long (em-dash).

- **Body of Short Communication or Book Review:** These shorter articles do not include the primary headings Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. "Acknowledgments" is treated as a third-level, or tertiary header.
 - **Tables:** Number tables consecutively with Arabic numerals. Refer to tables in text as Table 1, Tables 2 and 3, and Tables 2-5. Exceedingly long tables should be placed in appendices. Table captions should be placed above the table. Horizontal rules may be used in the table header and at the foot of the table. No rules (horizontal or vertical) should appear in the body of a table. Consult Vol. 9 (1) of *Phyllomedusa* for proper format of table captions and contents.
 - **Appendices:** Number appendices consecutively with Roman numerals. Refer to tables in text as Appendix I, Appendices II and III, and Appendices II-V. Appendix captions should be placed above the appendix content. Most appendices should follow the format instructions for tables. Extensive lists of specimens examined should be included as an appendix. Consult Vol. 9 (1) of *Phyllomedusa* for proper format and arrangement of specimens examined.
 - **Figure captions or legends:** All figures must be numbered consecutively and their legends or captions formatted in *Phyllomedusa* style (Vol. 9, No. 1). The captions should be listed in order separate from the images. Refer to figures in text as Figure 1, Figures 2 and 3, Figures 2-5, Figure 4A, and Figure 4A. B. "Figure" or "Figures" are always spelled out—even in parentheses. Figures must be cited in order in the text. See specific instructions for preparation of figures.
 - **Figures for review:** Embed all figures in order at the end of the Word document as PNG (Portable Network Graphic) files. Identify each with the figure number and a short caption, and **indicate whether the figure is intended for reproduction at column or page width, or as a broadside.**
- Preparation of Figures for Publication.** All figures should be submitted digitally as TIF files with LZW compression, **separately from the files embedded in the manuscript** for review. Each figure should be submitted at the **exact size** intended for publication. There are three choices: **page width** (34 picas, 145 mm, 5 and 11/16 in.), **column width** (16.5 picas, 70 mm, 2 and 3/4 in.), or **broadside** (193 mm x 145 mm). All illustrations must **allow room for a caption to be printed below the figure**, while conforming to these measurements.
- **Labeling figures:** Labels must be consistent on a figure and among all figures included in the article. Use a **sans serif font** that is common to Windows and Macintosh platforms (e.g., Arial). Subunits of multipart figures must be labeled with capital letters (A, B, C) placed in the **upper, left-hand area** of each unit. The letters **should be about 10 points large** (not to exceed 12 pt); they must be identical in size and typeface on each figure included in the manuscript.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Labeling within figures (e.g., anatomical parts, legends on axes of graphs, etc.) should be in the range of 8–9 pt and in a sans serif font, such as Arial. Scale bars should be labeled with their values on the face of the figure (e.g., 5 mm); the minimal size of lettering that may be used is 7 points in a sans serif font for scale bars, longitude and latitude on maps, etc.

- **Vector graphics:** Maps, graphs, and line drawings should be prepared with an illustration program such as Adobe Illustrator, CorelDRAW, or Deneba Canvas. Graphs and maps generated in other programs (e.g., Sigma Plot, Excel) can be imported into these illustration programs and manipulated (or used as a template to produce a new drawing) to produce an acceptable figure at the size intended for publication. Similarly, drawings executed by hand, should be scanned (300–600 dpi) and imported into an illustration program in which they can be sized and labeled for publication. Follow the instructions for labeling provided above, along with the following guidelines for illustrations at column and page widths.
 - ✓ Sized for publication, lines (strokes) should be between 0.25 and 2 points wide.
 - ✓ Tick marks on graphs should be on the outside of the axis line. Sized for publication, they are between 3 and 5 points in length and 0.25 pt in weight. Longitude and latitude marks should be on the inside of the map border.
 - ✓ All maps must have an appropriate scale in kilometers.
 - ✓ Overlapping symbols and lines must be counter shadowed with white.
 - ✓ Export completed image as a TIF document for submission.
 - **Raster graphics:** Photographs (color and gray-scale [black & white]) and tone (gray-scale) renderings should be submitted as a RGB document in TIF format sized for publication (described above) at a resolution between 300 and 600 dpi (after reduction/sizing). To label raster images, import them into a vector graphic program, follow the directions above, and export the completed image as a TIF document for submission.
- Editorial conventions.**
- **Taxonomy.** All generic and specific names must appear in italics. At the first mention of a species in any paragraph, provide its complete binomial name; in subsequent references to the same species, the generic name may be abbreviated. The first citation of a species must include the authority and date, but the authority does not have to be cited in the References. Hierarchical taxa are separated with colons (e.g., Anura: Leptodactylidae). New taxonomic names should not appear in the Abstract or Keywords.
 - **Dashes.** There are three kinds of dashes. Short dashes (–) are used as hyphens. En-dashes (–) are used to denote ranges (e.g., 5–10, May–September) and the minus sign in mathematics. Em-dashes (—) are used in Tertiary Headings, and frequently as a substitute for parentheses and colons. There should be no space on either side of any of these dashes.
 - **Numbers and units.** All measurements are noted in Arabic, unless the number starts a sentence.
 - ✓ Measurements include distances, areas, dimensions, volumes, weights, time (e.g., hours, days, seconds, minutes), temperatures, etc. **Standard SI units are used**—e.g., time: 08:16 h; distances and areas: 7 km, 12.5 mm, 17,840 ha; geographic coordinates: 04°43'23" S; temperature: 24°C. To indicate degrees, use a degree sign (°), not a superscript oh (°). Note that degrees and minutes are straight quotation marks or prime signs; do not use curly quotes.
 - ✓ Use the **double-digit rule** for numbers other than measurements. Numbers less than 10 are spelled out—e.g., "... nine animals were sampled"; numbers of 10 and more are denoted in Arabic—e.g., "... but 10 larvae were collected."
 - **Citations.** Authorities are cited in text as follows. Single: (Caballero 1944); double: (Bursey and Goldberg 2006); three or more (Goldberg *et al.* 2002). Note use of "and" and italics for "et al." Multiple text citations should be listed in chronological order and separated by commas—thus: (Crump 1974, Duellman 1978a–c, 1980, Duellman and Trueb 1986). Two or more publications by the same author should be cited in the following pattern: (Vanzolini 1991, 1992) or Cadle (1984a, b, 1985).
 - **References.** All publications cited in the text (except taxonomic authorities) must be included in the References in alphabetical order. "Gray literature" (e.g., technical reports, theses, dissertations that have limited distribution or are difficult to identify and acquire) should be avoided. Follow the formats shown below.
 - ✓ **Normal journal articles:**
Vanzolini, P. E. 1993. A new species of turtle, genus *Trachemys*, from the state of Maranhão, Brazil (Testudines, Emydidae). *Revista Brasileira de Biologia* 55: 111–125.
 - ✓ **Two authors in a journal series:**
Zamudio, K. R. and H. W. Greene. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for Neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 62: 421–442.
 - ✓ **More than two authors in a journal series:**
Hero, J.-M., W. E. Magnusson, C. F. D. Rocha, and C. P. Catterall. 2001. Antipredator defenses influence the distribution of amphibian prey species in the central Amazon rain forest. *Biotropica* 33: 131–141.
 - ✓ **Chapter in an edited volume:**
Hedges, S. B. 1999. Distribution patterns of amphibians in the West Indies. Pp. 211–254 in W. E. Duellman (ed.), *Patterns of Distribution of Amphibians. A Global Perspective*. Baltimore and London. The Johns Hopkins University Press.
 - ✓ **Unpublished thesis or dissertation:**
Verdade, V. K. 2001. Revisão das espécies de *Colosteiurus* Cope, 1866 da Mata Atlântica (Anura, Dendrobatidae). Unpublished M.Sc. Dissertation. Universidade de São Paulo, Brazil.
 - ✓ **Book:**
McDiarmid R. W. and R. Altig (eds.). 1999. *Tadpoles. The Biology of Anuran Larvae*. Chicago and London. The University of Chicago Press. 633 pp.
 - ✓ **Material from the World Wide Web:**
Frost, D. R. (ed.). 2010. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA. Captured on 22 August 2010.
 - ✓ **Software:**
Maddison, W. P. and D. R. Maddison. 2010. Mesquite. A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 2.73. URL: <http://mesquiteproject.org>
 - **Animal care and permits.** The editorial staff of *Phyllomedusa* subscribes to humane and ethical treatment of all animals; all contributors to the journal must comply with this principle. In addition, all required state and federal permits (IBAMA license for Brazil) must have been obtained and must be cited in the Acknowledgments.
 - **Proofs.** The publisher will undertake proofreading, unless specifically advised otherwise by the corresponding author when the contribution is accepted for publication.
 - **Reprints.** Authors will receive a PDF of their contribution, and the senior author will receive a hardcopy of the issue of *Phyllomedusa* in which the paper appeared.
 - **Submission.** Send manuscripts as Microsoft Word (.doc or .docx) via e-mail to the Editor (phyllomedusa@usp.br) or through the homepage (www.phyllomedusa.esalq.usp.br). Manuscript may also be submitted by surface mail (CD-ROM) to:

Jaime Bertoluci
Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ – USP
Av. Pádua Dias, 11 – 13418-900 – Piracicaba – SP
BRAZIL