



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e
Biodiversidade

**O CANTO DE ANÚNCIO COMO CARÁTER
DIAGNÓSTICO DE LINHAGENS DE *Dendropsophus*
microcephalus (ANURA: HYLIDAE) NA SUA ÁREA DE
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.**

Danny Josue Ordoñez Bautista

2023

Danny Josue Ordoñez Bautista

**O canto de anúncio como caráter diagnóstico de linhagens de
Dendropsophus microcephalus (Anura: Hylidae) na sua área de
distribuição geográfica.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia Conservação e Biodiversidade.

Orientador

Prof. Dr. Nicolás Pelegrin

UBERLÂNDIA

Julho – 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O65c Ordoñez Bautista, Danny Josue, 1993-
2023 O canto de anúncio como caráter diagnóstico de linhagens de *Dendropsophus microcephalus* (Anura: Hylidae) na sua área de distribuição geográfica [recurso eletrônico] / Danny Josue Ordoñez Bautista. - 2023.

Orientador: Nicolás Pelegrin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7077>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ecologia. I. Pelegrin, Nicolás, 1975-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. III. Título.

CDU: 574

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047

Danny Josue Ordoñez Bautista

**O canto de anúncio como caráter diagnóstico de
linhagens de *Dendropsophus microcephalus* (Anura:
Hylidae) na sua área de distribuição geográfica.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia, Conservação e Biodiversidade”.

APROVADA em 12 de julho de 2023

Prof. Dr. Reuber Albuquerque Brandão, ICB-UnB

Prof. Dr. Celine de Melo, I N B I O - UFU

Prof. Dr. Nicolás Pelegrin
I N B I O - UFU (Orientador)

UBERLÂNDIA Julho – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e
Biodiversidade

Av. Pará, 1720, Bloco 2D, Sala 26 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-320
Telefone: (34) 3225-8641 - www.ppgeco.ib.ufu.br - ecologia@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ecologia, Conservação e Biodiversidade				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 326, PPGEGB				
Data:	doze de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	12122ECR001				
Nome do Discente:	Danny Josue Ordoñez Bautista				
Título do Trabalho:	O canto de anúncio como carácter diagnóstico de linhagens de <i>Dendropsophus microcephalus</i> (Anura: Hylidae) na sua área de distribuição geográfica				
Área de concentração:	Ecologia				
Linha de pesquisa:	Ecologia de populações				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ecologia, conservação e biodiversidade de vertebrados no Brasil				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade assim composta pelos doutores: Celine de Melo - INBIO/UFU; Reuber Albuquerque Brandão - UnB e Nicolás Pelegrin - INBIO/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Nicolás Pelegrin, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Nicolás Pelegrin, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/07/2023, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celine de Melo, Membro de Comissão**, em 20/07/2023, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reuber Albuquerque Brandão, Usuário Externo**, em 08/08/2023, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4570982** e o código CRC **141D6EAB**.

Dedicatória

Aos meus pais Concepcion Bautista e Franklin Ordoñez por serem exemplo de superação, humildade e sacrifício; também pelo esforço que fizeram ao longo de suas vidas para me dar uma boa educação, ensinando-me a valorizar tudo o que tenho. Grande parte das minhas conquistas pessoais e acadêmicas devo a eles, inclusive esta.

Aos meus irmãos Yovany Ordoñez e Marilyn Ordoñez que sempre foram peça fundamental e motivação para continuar alcançando meus objetivos e sonhos. E sei que sempre me apoiarão em todas as decisões da minha vida.

Ao meu irmão Franklin Isaac Ordoñez porque você me fez feliz no pouco tempo de vida que compartilhamos juntos. E embora você não esteja mais fisicamente conosco, sempre estive em todos esses momentos importantes da minha vida e assim será até o dia em que nos encontrarmos novamente. Obrigada por me ensinar muito sobre a vida e a valorizar mais a vida e a família. Espero que você esteja muito orgulhoso de mim onde você estiver.

A eles dedico este trabalho com muito carinho pois foram peças fundamentais para poder concluir meu mestrado com sucesso.

Obrigado família.

Agradecimentos

Esta dissertação não teria sido possível sem a inestimável colaboração de muitas pessoas e instituições no longo processo de sua realização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Uberlândia, especificamente ao programa de Mestrado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade, por me dar a oportunidade de fazer meu mestrado em uma das melhores universidades do Brasil. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida nestes dois anos.

Ao meu orientador Nicolás Pelegrin por compartilhar comigo novos conhecimentos e me ajudar muito na minha formação profissional e pessoal. A cada um dos professores que fazem parte do PPGECO, por compartilharem seus conhecimentos em cada aula e serem parte importante da minha formação profissional. Ao laboratório REPTAN-UFU e a todos os seus integrantes por me abrirem as portas e estarem sempre disponíveis para me ajudar.

A cada uma das bibliotecas de sons que me forneceram as gravações necessárias para esta dissertação: TheCornellLab; Fonoteca Neotropical Jacques Viellard (FNJV); Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Anuros Neotropicais (LTSAN), Fonoteca de Anfíbios e o grupo Ixchel Centro América. Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos em Honduras e Costa Rica pela atenção e por me darem todo o seu apoio neste processo. Gostaria também de agradecer a todos os meus novos amigos brasileiros e estrangeiros que conheci em Uberlândia e que foram uma parte importante deste trabalho.

E por último, gostaria de agradecer à minha família, meus pais e irmãos que foram parte importante deste processo desde o início, apoiando-me incondicionalmente até o último dia do mestrado.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1. Introdução	1
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Material e métodos	7
3.1 Origem dos dados	7
3.2 Análises dos cantos	9
3.3 Variáveis acústicas	10
3.4 Análise de dados	11
4. Resultados	13
4.1 Descrição de variáveis acústicas.	14
4.1.1 <i>D. m. underwoodi</i>	14
4.1.2 <i>D. m. microcephalus</i>	15
4.1.3 <i>D. m. misera</i>	15
4.1.4 <i>D. microcephalus</i> ssp.	16
4.2 Comparações entre os cantos das linhagens	18
4.3 Análises de agrupamento das linhagens baseadas nas variáveis dos cantos	25
4.4 Análises da relação do PCA 1 com a latitude	28
5. Discussão	30
6. Conclusões	35
7. Referências bibliográficas	36
8. Anexos	46

Índice de figuras

Figura 1.1. Indivíduos das diferentes linhagens de <i>D. microcephalus</i>	6
Figura 3.1. Localização das gravações de <i>D. microcephalus</i> analisadas.	8
Figura 3.2. Canto de anúncio de <i>D. microcephalus</i> de um indivíduo do Panamá.....	11
Figura 4.1. Espectrogramas comparativos (acima) e oscilogramas (abaixo) que exemplificam a diferença em algumas variáveis dos cantos de anúncio entre as linhagens de <i>D. microcephalus</i>	14

Figura 4.2. Comparação das variáveis do canto de anúncio de <i>D. microcephalus</i> entre linhagens.....	18
Figura 4.3. Comparação das variáveis das notas primárias do canto de anúncio de <i>D. microcephalus</i> entre linhagens.....	21
Figura 4.4. Comparação das variáveis das notas secundárias do canto de anúncio de <i>D. microcephalus</i> entre linhagens.....	24
Figura 4.5. Ordenação de 117 gravações dos indivíduos das linhagens de <i>D. microcephalus</i> identificadas neste estudo com base na análise de componentes principais (PCA).....	27
Figura 4.6. Correlação entre latitude e as variáveis do PCA 1.....	29

Índice de tabelas

Tabela 4.1. Parâmetros acústicos do canto de anúncio de <i>D. microcephalus</i>	17
Tabela 4.2. Resultados das análises comparativas em pares da duração do canto (DC) e o número de notas (NN) dos cantos de anúncio entre linhagens de <i>D. microcephalus</i> realizadas com os testes de Tukey.....	19
Tabela 4.3. Resultados das análises comparativas em pares de todas as variáveis das notas primárias.....	20
Tabela 4.4. Resultados das análises comparativas em pares de todas as variáveis das notas Secundárias.....	23
Tabela 4.5. Resultados da análise de componentes principais (PCA) para as variáveis dos cantos de anúncio de <i>D. microcephalus</i> analisadas.....	26

Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CBE: conceito biológico de espécie

DC: duração do canto

NN: número de notas do canto

DN: Duração da nota

PN: Pulso por notas

IEN: Intervalo entre notas

FP: Frequência de pulso

FD: Frequência dominante

DNs: Duração das notas Secundárias

PNs: Pulso por notas das notas Secundárias

IENs: Intervalo entre notas Secundárias

TRNs: Taxa de repetição entre notas Secundárias

FPs: Frequência de pulso das notas Secundárias

FDs: Frequência dominante das notas Secundárias

FFT: Transformação rápida de Fourier

ms: Milissegundos

Hz: Hertz

MALI: Macaulay Library, The Cornell Lab of Ornithology

FNJV: Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard

LTSAN: Ariovaldo A. Giaretta (AAGm)

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de Mexico

Resumo

Ordoñez-Bautista, D. J. 2023. O canto de anúncio como caráter diagnóstico de linhagens de *Dendropsophus microcephalus* (Anura: Hylidae) na sua área de distribuição geográfica. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. UFU. Uberlândia-MG. 50 f.

O isolamento reprodutivo pode ser estudado através de vários de abordagens, incluindo o isolamento pós-zigótico e pré-zigótico. O canto de anúncio em anuros atua como um fator pré-zigótico e é importante para fins taxonômicos, devido à sua importância no reconhecimento específico e na escolha do parceiro. A variação no canto de anúncio tem sido crucial para a compreensão da evolução dos sinais de acasalamento e na descrição de novas espécies em anuros. O objetivo foi analisar a utilização dos cantos de anúncio como ferramenta para o reconhecimento das linhagens de *Dendropsophus microcephalus*. Analisei 117 gravações de diferentes localidades desde o México até o Brasil. Os cantos foram obtidos das bibliotecas de cantos: Macaulay Library, The Cornell Lab of Ornithology; Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard; Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Anuros Neotropicais; Fonoteca de Anfíbios-UNAM e do grupo Ixchel Centro América. As notas primárias e secundárias dos cantos foram analisadas de forma independente. As variáveis dos cantos analisados foram: duração do canto (DC), número de notas (NN), duração das notas (DN), pulso por notas (PN), intervalo entre notas (IEN), taxa de repetição de notas (TRN), frequência de pulso (FP) e frequência dominante (FD). Os cantos foram atribuídos a cada linhagens de acordo com as distribuições determinadas pelo Dr. W. Duellman (1970): *D. m. underwoodi* (do México até Costa Rica), *D. m. microcephalus* (da Costa Rica até a Colômbia), *D. m. misera* (Venezuela até a bacia amazônica) e os cantos do centro do Brasil foram consideradas como *D. m. ssp*. Os cantos considerados “outliers” foram retirados das análises. O canto de anúncio das linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. misera* e *D. m. underwoodi* tem a mesma estrutura básica, começando com uma nota primária, seguida por várias notas secundárias com dois grupos de pulsos que pode ter até dezessete notas. Em *D. m. ssp* não se apreciam os dois grupos de pulsos, além disso, a maioria das variáveis acústicas do canto de anúncio tem diferença entre as linhagens, exceto para as FDs das notas secundárias. Nos PCA as variáveis com maior influência em geral foram DC, DN, (primárias e secundárias), e FD (primárias e secundárias). As linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. underwoodi* e alguns indivíduos

de *D. m. misera* estão agrupados em extremos opostos do PC1 em relação aos indivíduos de *D. m. ssp.* com distribuição no centro do Brasil. Também encontramos a relação positiva do PC1 e PC3 com latitude, ou seja, as variáveis aumentam de sul para norte. Nossos resultados mostram que as populações de *D. m. misera* do Brasil e os indivíduos de *D. m. ssp.* diferem na estrutura e nas variáveis do canto em relação as outras linhagens. Essa diferença na vocalização poderia estar indicando que as populações do Brasil estão isoladas reprodutivamente das outras linhagens de *D. microcephalus*, sugerindo que as populações do Brasil são espécie diferente de *D. microcephalus*. É necessária abordagem taxonômica integrativa para determinar o status taxonômico das populações do Brasil.

Palavras-chave: comunicação acústica, canto de anúncio, isolamento reprodutivo, *Dendropsophus microcephalus*.

Abstract

Ordoñez-Bautista, D. J. 2023. The advertisement calls as a diagnostic character of lineages of *Dendropsophus microcephalus* (Anura: Hylidae) in its geographic distribution area. Master dissertation. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. UFU. Uberlândia-MG. 50 p.

Reproductive isolation can be studied considering different approaches, including post-zygotic and pre-zygotic reproductive isolation. The advertisement calls in frogs acts as a prezygotic factor in reproductive isolation and is important for taxonomic purposes, mainly due to its importance in specific recognition and mate choice. Studies on advertisement call variation have been crucial for understanding the evolution of mating signals and for describing new species of anurans. The objective was to analyze the use of the advertisement call as a tool for recognizing the lineages of *Dendropsophus microcephalus*. I analyzed 117 recordings from different locations from Mexico to Brazil were analyzed. The calls were obtained from calls libraries: Macaulay Library, The Cornell Lab of Ornithology; Jacques Vielliard Neotropical Phonoteca; Laboratory of Taxonomy and Systematics of Neotropical Anurans; Amphibian Phonoteca-UNAM and the Ixchel group Centro América. The primary and secondary notes of the calls were analyzed independently. The calls variables analyzed were call duration (DC), number of notes (NN), note duration (DN), pulse per note (PN), note interval (IEN), note repetition rate (TRN), pulse frequency (FP), and dominant frequency (FD). Calls were assigned to each lineage according to the distributions determined by Dr. W. Duellman (1970): *D. m. underwoodi* (from Mexico to Costa Rica), *D. m. microcephalus* (from Costa Rica to Colombia), *D. m. misera* (Venezuela to the Amazon basin) and the corners of central Brazil were considered as *D. m. ssp*. Calls considered "outliers" were removed from the analyses. The advertisement call of the lineages *D. m. microcephalus*, *D. m. misera* and *D. m. underwoodi* has the same basic structure, starting with a primary note, followed by several biphasic secondary notes that can have up to seventeen notes. In *D. m. ssp* the biphasic notes are not appreciated, moreover, most acoustic variables of the advertisement call have difference between the lineages, except for the FDs of the secondary notes. In the PCAs the variables with the greatest influence overall were DC, DN, (primary and secondary), and FD (primary and secondary). The lineages *D. m. microcephalus*, *D. m. underwoodi* and some individuals of *D. m. misera* are grouped at opposite endpoint of PC1 in relation to individuals of *D. m. ssp*. with distribution in

central Brazil. We also found a positive relationship between PC1 and PC3 between the latitudinal clines, therefore, the variables increase from south to north. Our results show that populations of *D. m. misera* from Brazil and the individuals from *D. m. ssp* differ in structure and vocalization properties in relation to the other lineages. This difference in vocalization could indicate that populations from Brazil are reproductively isolated from the other lineages of *D. microcephalus*; suggesting that populations from Brazil are a different species from *D. microcephalus*. Further analysis with an integrative taxonomic approach is needed to determine the taxonomic status of populations from Brazil.

Keywords: acoustic communication, advertisement call, reproductive isolation, *Dendropsophus microcephalus*.

1. Introdução

Espécie é a categoria fundamental da classificação biológica (Mayer 1982; Rosell et al. 2010). Elas são reconhecidas por suas semelhanças, formando grupos e subgrupos de acordo com sua maior ou menor afinidade.

Um dos problemas que surgem na definição de uma espécie é a diversidade de conceitos existentes e as formas de delimitá-los (De Queiroz 2007). Consideramos que o conceito biológico de espécie (CBE) proposto por Ernst Mayr Mayr (1969) fornece uma clara delimitação do que é uma espécie e como ela poderia ser delimitada. Para Mayr, uma espécie é "um grupo de indivíduos que se reproduzem uns com os outros e que estão reprodutivamente isolados de outros grupos semelhantes e que têm descendência viável e fértil".

Nos anuros o isolamento reprodutivo pode ser estudado através de várias abordagens, incluindo o isolamento reprodutivo pós-zigótico (híbrido não viável ou de viabilidade reduzida; híbrido estéril ou de viabilidade reduzida) e pré-zigótico (isolamentos de habitat; temporário ou sazonal; etológico ou comportamental; mecânico e cinegético) (Köhler et al. 2017). O canto de anúncio em anuros atua como um fator pré-zigótico no isolamento reprodutivo, principalmente devido à sua importância no reconhecimento específico e na escolha do parceiro (Duellman & Trueb 1994; Gerhardt & Huber 2002; Searcy & Nowicki 2006; Wells 2007).

O canto de anúncio é a vocalização mais comum em anuros e possui o maior valor taxonômico (Wells 1977; Köhler et al. 2017). Praticamente todos os machos incorporam alguma forma de canto de anúncio em seu repertório vocal, que muitas vezes desempenha um papel fundamental. Por um lado, o canto de anúncio permite a atração de fêmeas da mesma espécie, sendo importante no cortejo sexual na maioria das espécies de anuros

(Duellman & Trueb 1994; Gerhardt & Huber 2002; Wells & Schwartz 2007; Bastos et al. 2011; Llusia-Genique 2013). Por outro lado, esse mesmo tipo de canto também pode ser usado como um sinal territorial, alertando os machos vizinhos sobre a posição e o tamanho do macho competidor (Wilczynski & Brenowitz 1988; Gerhardt et al. 1989; Brenowitz & Rose 1994; Murphy e Floyd 2005). Para fins taxonômicos, as análises de vocalização se concentram quase exclusivamente nos cantos de anúncio, principalmente porque são os cantos mais frequentes na maioria das espécies e são fáceis de registrar e são emitidos no contexto do acasalamento; portanto, espera-se que transmitam informações específicas da espécie envolvidas no isolamento pré-zigótico (Köhler et al. 2017).

Embora o papel dos cantos dos anuros como mecanismo de isolamento pré-zigótico seja de grande importância sistemática (Duellman 1963; Blair 1964; Littlejohn 1969), este aspecto tem recebido menos atenção nos estudos contemporâneos. Existem alguns estudos que analisaram a variação geográfica do canto ou diferenças latitudinais e/ou longitudinais (Bernal et al. 2005; Pröhl et al. 2007; Magrini et al. 2010; Faria et al. 2013; Baraquet et al. 2015; Forti et al. 2016) e demonstraram diferenças intraespecíficas no canto de anúncio entre populações de espécies amplamente distribuídas. O estudo desta variação provou ser crucial para compreender a evolução dos sinais de acasalamento em anuros (Loftus-Hills & Littlejohn 1992; Boul et al. 2007).

O gênero *Dendropsophus* Fitzinger 1843, estava anteriormente dentro do gênero *Hyla* Laurenti, 1768. No entanto, estudos de Faivovich, et al. (2005) determinaram transferi-lo para o gênero ressuscitado *Dendropsophus*. Atualmente se reconhecem 109 espécies dentro do gênero *Dendropsophus* agrupadas por suas relações monofiléticas em nove grupos (Faivovich, et al. 2005): grupo *Dendropsophus ruschii*, grupo *Dendropsophus decipiens*, grupo *Dendropsophus parviceps*, grupo *Dendropsophus*

molitor, grupo *Dendropsophus columbianus*, grupo *Dendropsophus marmoratus*, grupo *Dendropsophus minutus*, grupo *Dendropsophus leucophyllatus*, grupo *Dendropsophus microcephalus* (Faivovich, et al. 2005; Orrico et al. 2021). A identificação das espécies de *Dendropsophus* geralmente é considerada difícil principalmente devido à alta semelhança em morfologia e à limitada informação disponível para muitas espécies, o que significa que muitas espécies ainda têm relações pouco definidas ou incertas (Duellman 1982; Gehara et al. 2014; Duellman et al. 2016; Orrico et al. 2021).

O grupo *D. microcephalus* tem espécies que cobrem amplas áreas de distribuição e representam um grande desafio taxonômico (Gehara et al. 2014). Os tempos de divergência sugerem que o grupo *D. microcephalus* foi representado pela primeira vez na América Central por um tronco ancestral do tipo *D. microcephalus* que migrou da América do Sul e se separou em meados do Mioceno 11.2 (8.6-13.8) Mya (Duellman et al. 2016). Uma das complexidades do grupo *D. microcephalus* são as poucas diversidades de caracteres diagnósticos morfológicos que os espécimes apresentam nas fases adulta e larval; existem apenas pequenas diferenças nas estruturas das mãos e pés nos adultos e algumas pequenas diferenças na coloração dos girinos (Duellman 1970). Isso torna a posição filogenética de várias espécies dentro do grupo *D. microcephalus* ainda altamente controversa (Pyron e Wiens 2011; Fouquette et al. 2011; Madeiros et al. 2013; Orrico et al. 2021). Em algumas espécies, a coloração e os cantos de anúncio aparentemente fornecem os meios mais fáceis de identificação das espécies (Duellman, 1970).

Inicialmente, Duellman & Fouquette (1968) definiram o grupo de *D. microcephalus* a partir de bases morfológicas, representando assim um grupo com oito espécies, quatro ocorrendo na América Central (*D. microcephalus*, *D. phlebodes*, *D. robertmertensi* e *sartori*) e quatro sul-americanos (*D. elongata*, *D. minuta*, *D. nana* e *D. werneri*) com ampla distribuição a leste dos Andes. No entanto, nos últimos anos, o monofiletismo do

grupo *D. microcephalus* tem sido estudado usando dados moleculares (Faivovich et al. 2005; Pyron e Wiens 2011; Orrico et al. 2021), razão pela qual novas espécies foram descritas, sendo reconhecidas atualmente 37 espécies dentro do grupo *D. microcephalus* (Orrico et al. 2021), distribuídas desde as baixas elevações de Jalisco e Veracruz, México, até o sudeste da América do Sul; do nível do mar até 1700 m de altitude (Duellman, 2001; Orrico et al. 2021).

Dendropsophus microcephalus Cope 1886 é uma das espécies pertencentes ao grupo *D. microcephalus* (Faivovich et al. 2005). Inicialmente Duellman & Fouquette (1968), reconheceram duas linhagens de *D. microcephalus*: *D. m. underwoodi* Cope 1886 e *D. m. microcephalus* Boulenger 1889. Posteriormente, Fouquette (1968) após da análise do canto, história de vida e cor na vida de indivíduos das planícies da Venezuela, mostrou que *D. misera* Werner 1903 é conespecífico com *D. microcephalus* da costa norte do sul América e América Central.

A linhagens *D. m. microcephalus* está distribuída desde as planícies do Pacífico do sudeste da Costa Rica até a Colômbia, ocorrendo em altitudes abaixo de 560 m, na Colômbia (Duellman 1970, 2001; Savage 2002; Bolaños et al. 2008); *D. m. misera* é encontrada desde o norte da América do Sul até a bacia amazônica; *D. m. underwoodi* tem distribuição desde México ao noroeste da Costa Rica; não é encontrado em elevações acima de 350 m no México e na Guatemala, mas é encontrado em altitudes mais altas nas regiões mais ao sul (Duellman 1970, 2001; Savage 2002; Bolaños et al. 2008). Por exemplo, foi coletado a 780 m em Silencio, Costa Rica; a 830 m na Serra de Guaimaca, Honduras; a 960 m em Finca Tepeyac, Nicarágua, e a 1.200 m em Finca Renecia, Nicarágua (Duellman 2001).

Duellman (1970) menciona que existem pequenas diferenças em algumas medidas, proporções e em certos parâmetros dos cantos de acasalamento entre as populações das distintas linhagens. No entanto, o padrão de coloração é o único diagnóstico que fornece diferenças entre as linhagens (Duellman 1970, 2001). A linhagem leste-oeste (*D. m. microcephalus*) tem padrão dorsal de duas linhas escuras contínuas e sem marcas escuras interorbitais (**Fig. 1.1-B**), enquanto a linhagem noroeste (*D. m. underwoodi*) tem um padrão dorsal misto e tem uma marca interorbital escura (**Fig. 1.1-A**) (Duellman 1970, 2001). Além disso, existem pequenas diferenças nas pernas de *D. m. microcephalus*, pois estão marcadas com uma linha longitudinal, enquanto a linhagem *D. m. underwoodi* tem pernas marcadas por faixas transversais estreitas. Por outro lado, *D. m. misera* (**Fig. 1.1 - C**) difere de *D. m. microcephalus* por não ter as distintas listras dorsais e por ter barras transversais em vez de uma linha longitudinal ou manchas nas pernas. Não difere marcadamente no padrão de cores básico de *D. m. underwoodi*, mas é separado dessa população pela raça nominal, que se estende do sul da Costa Rica, através do Panamá, e no noroeste da Colômbia (Fouquette 1968).

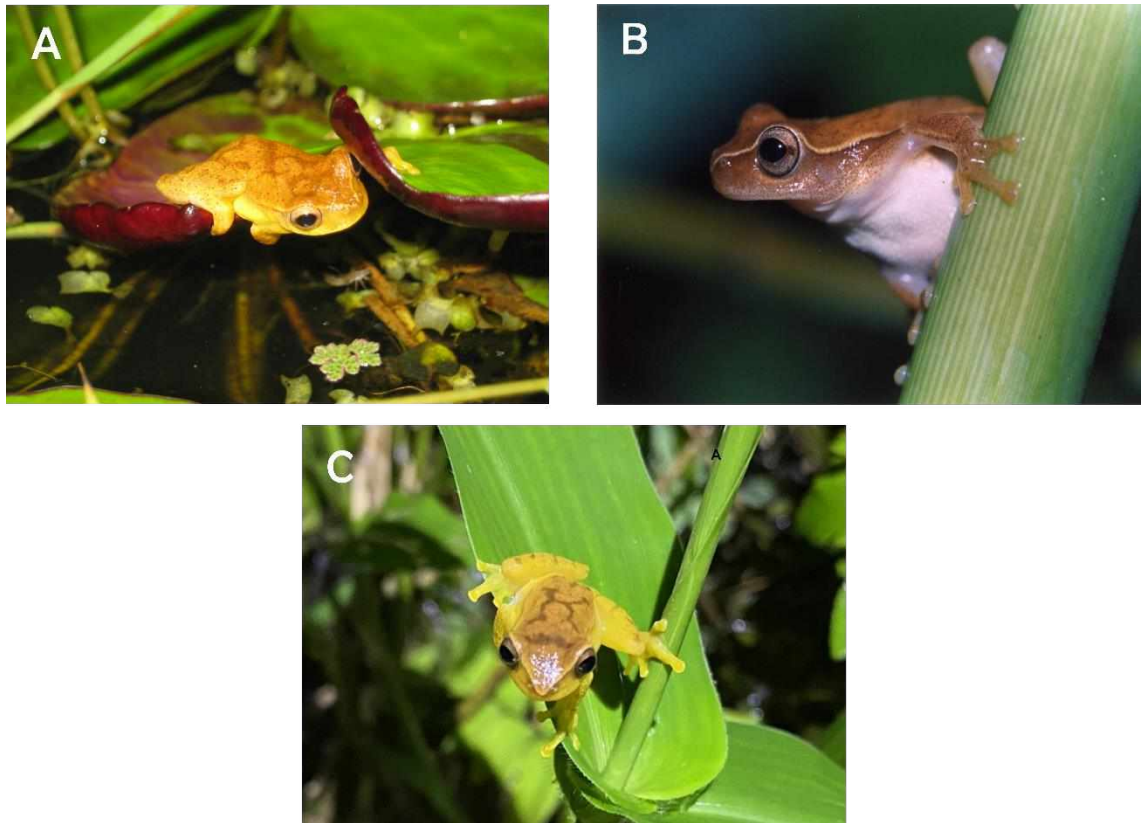


Figura 1.1. Individuos das diferentes linhagens de *D. microcephalus*. **A)** Indivíduo de *D. m. underwoodi* de Honduras, foto: ©Danny Ordoñez. **B)** Indivíduo de *D. m. microcephalus* da Costa Rica, foto: ©Eduardo Boza. **C)** Indivíduos de *D. m. misera* do Trinidad e Tobago, foto: ©Hukaymah Ali, obtida de <https://www.inaturalist.org/>.

A estrutura dos cantos de anúncio nas linhagens de *D. microcephalus* já foi descrita (Duellman & Fouquette 1968; Fouquette 1968; Duellman 1970). No entanto, a variação interpopulacional não foi estudada. Considerando a importância da comparação das variáveis acústicas entre diferentes espécies e populações para a interpretação e compressão das interações ecológicas, a posição taxonômica e as relações filogenéticas entre as espécies (Hartmann et al. 2002) utilizamos os cantos de anúncio como caráter diagnóstico das linhagens de *D. microcephalus* ao longo de sua distribuição. Para isso testamos a hipótese que as variáveis do canto de anúncio de diferentes populações de *D. microcephalus* na sua distribuição dão suporte às linhagens propostas por Duellman (1970, 2001) de acordo com às características da coloração.

2. Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

Analisar a utilização dos cantos de anúncio como ferramenta para o reconhecimento das linhagens de *D. microcephalus* na sua distribuição geográfica.

2.2 *Objetivos específicos*

(i) Comparar as variáveis do canto do anúncio (notas primárias e secundárias) entre as diferentes populações de *D. microcephalus*.

(ii) Verificar se as variáveis do canto de *D. microcephalus* agrupam as populações estudadas de acordo com as linhagens propostas por Duellman (1970, 2001).

(iii) Analisar a variação do canto do anúncio de *D. microcephalus* com relação à sua distribuição latitudinal.

3. Material e métodos

3.1 *Origem dos dados*

Analisamos 117 gravações de diferentes populações de *Dendropsophus microcephalus*. Analisamos até oito cantos por indivíduo, no final analisei as médias de cada variável de canto por gravação. As gravações abrangem grande parte da faixa de distribuição, essas incluem cantos do México (N=29), Guatemala (N=4), Honduras (N=5), Nicarágua (N=6), Costa Rica (N=17), Panamá (N=32), Colômbia (N=1), Venezuela (N=6), Trinidad e Tobago (N=1) e Brasil (N=16) (**Anexo 1. Fig. 3.1**).

O conjunto de dados foi construído com gravações pessoais e de diferentes bibliotecas de cantos nas que se incluem Macaulay Library, The Cornell Lab of

Ornithology (MALI); Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard (FNJV); Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Anuros Neotropicais (LTSAN) do professor Ariovaldo A. Giaretta (AAGm), Fonoteca de Anfíbios – UNAM, o grupo Ixchel Centro América. Alguns dos cantos incluídos aqui foram usados anteriormente em outros estudos (Duellman & Fouquette 1968; Duellman 1970, 2001; Duellman 1997; Teixeira, 2018) (**Anexo 1**).



Figura 3.1. Localização das gravações de *D. microcephalus* analisadas. As figuras no mapa indicam a localização das gravações analisados de cada linhagens.

Como o padrão de canto básico de *D. microcephalus* consiste em um grupo de notas formado por uma nota principal longa (nota primária), seguida por uma série de notas secundárias mais curtas (Duellman 1970; Savage 2002; Tárano 2000), decidiu-se analisar as notas primárias e secundárias de forma independente, principalmente porque as notas

secundárias podem ter diferenças com as primárias em alguns parâmetros (Duellman & Fouquette 1968). Embora atualmente existam muitas terminologias que podem ser usadas para definir os sons emitidos pelos animais, neste estudo os termos técnicos e definições dos cantos seguem a Köhler et al. (2017).

Köhler et al. (2017) define os cantos como a principal unidade acústica na vocalização dos anuros e é a categoria funcional dos cantos mais relevante para a taxonomia. Por outro lado, as notas são identificadas como subunidade principal dos cantos, separadas umas das outras por pequenos intervalos. As notas podem ser subdivididas em pulsos, que é uma única explosão de energia sonora separada por forte modulação de amplitude de outros pulsos (Köhler et al. 2017).

A terminologia utilizada para a descrição dos cantos de anúncio de *D. microcephalus* neste estudo tem uma abordagem centrada nas notas. Assim, o canto é composto por várias notas, ou seja, uma unidade de som coerente, e essa unidade é subdividida em subunidades separadas por períodos (longos ou curtos) de silêncio, essas subunidades podem ser organizadas em séries de notas (Köhler et al. 2017). As séries de notas dos cantos de *D. microcephalus* serão denominados cantos neste estudo.

3.2 Análises dos cantos

As variáveis acústicas foram analisadas com o programa Raven Pro 1.6 (Bioacoustics Research Program, 2014) através de duas representações visuais básicas: oscilogramas e espectrogramas (Fig. 2.2). Os ajustes utilizados foram: tipo de janela = Hann, tamanho = 512 FFT (Transformação rápida de Fourier) amostras, sobreposição de 50%, largura de banda do filtro 3 dB 124 Hz. Todas as outras configurações seguiram os valores por defeito do Raven. Fizemos as figuras do som de *D. microcephalus* com o software R (R Development Core Team, 2022) utilizando os pacotes TuneR versão 1.0

(Ligges et al. 2013) e Seewave versão 1.7.3 (Sueur et al. 2008), usando a função janela de Hann, tamanho = 512 pontos de resolução FFT, sobreposição de 90%.

3.3 Variáveis acústicas

Para este trabalho considere analisar oito variáveis acústicas: **duração do canto** (DC): tempo desde o início da série de notas até o final da série de notas, em milissegundos (ms); **número de notas** (NN): número de notas que há na série de notas o no canto); **duração das notas** (DN): duração da nota emitida em um período de tempo definido, em milissegundos (ms); **pulso por notas** (P/N): número de pulsos em uma nota; **intervalo entre notas** (IEN): o intervalo entre duas notas consecutivas dentro do mesmo canto, em milissegundos (ms); **taxa de repetição de notas** (TRN): número de notas que se repetem num período definido dentro de uma série de notas; **frequência de pulso** (FP): número de pulsos repetidos em um período definido dentro de uma nota; e **frequência dominante do canto** (FD): frequência que contém a maior energia sonora, em Hz (Hertz).

A DC e o NN ficaram como variáveis gerais (considerando nota primária e secundárias). Cabe ressaltar que só nas notas secundárias se calculou a TRN. As variáveis das notas secundárias se identificam com uma “s” no final da sigla. A média aritmética de todas as variáveis dos cantos foi obtida para cada gravação (=individual) e, portanto, usada para análises estatísticas.

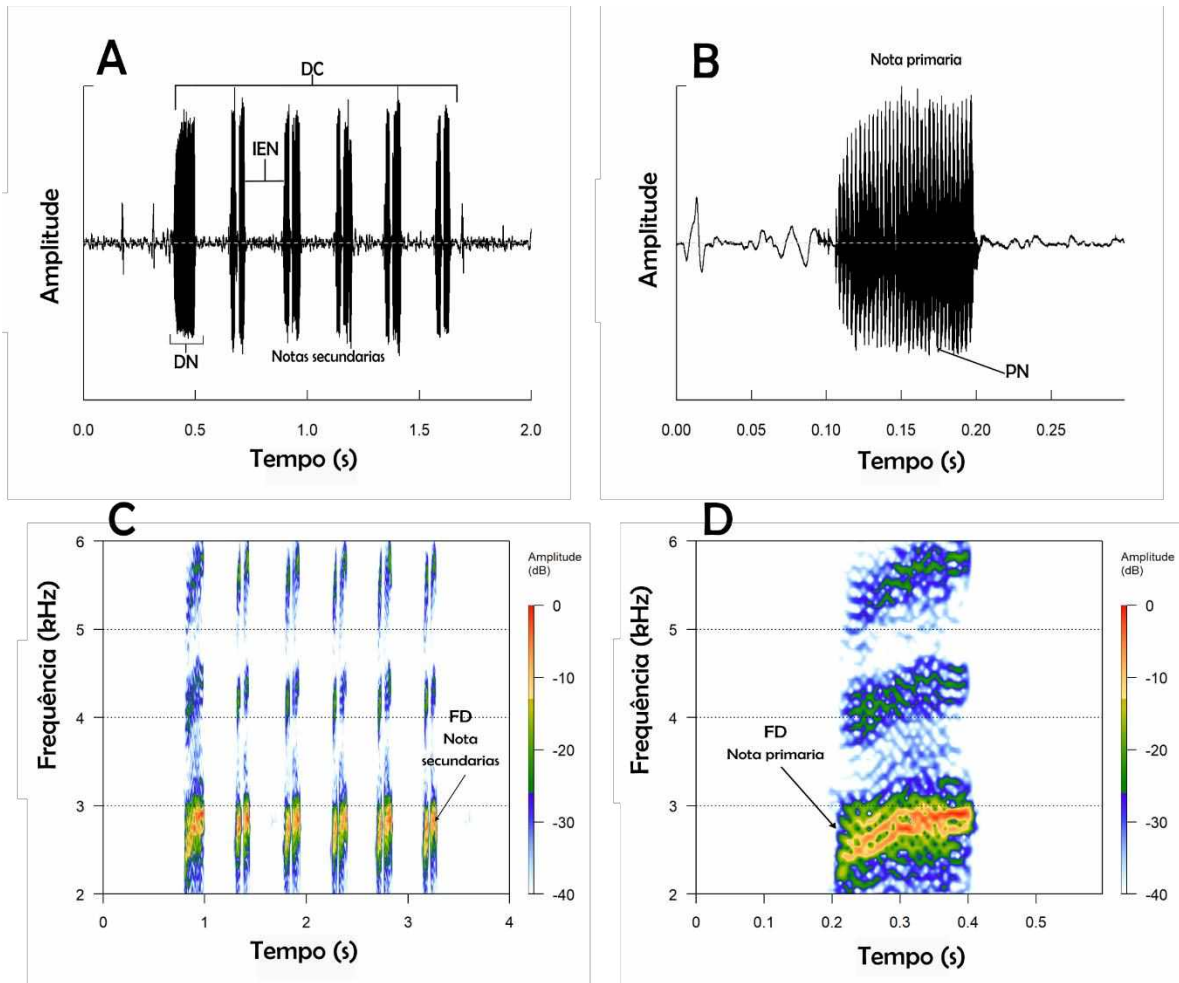


Figura 3.2. Canto de anúncio de *D. microcephalus* de um indivíduo do Panamá. **A)** Oscilograma de um canto composto por uma série de notas (notas primárias e secundárias) indicando as variáveis temporais medidas (DC= duração do canto; DN= duração da nota; IEN= intervalo entre nota). **B)** Oscilograma de uma nota primária indicando as variáveis temporais medidas (PN= pulsos por nota). **C)** Espectrograma de um canto composto por uma série de notas (notas primárias y secundárias) indicando a variável espectral medida (FD= Frequência dominante notas Secundárias). **D)** Espectrograma de uma nota primaria indicando a variável espectral medida (FD= Frequência dominante notas primárias). O oscilograma (A, B) é apresentado como eixo de amplitude (y) em função do eixo tempo em segundos (x) e nos espectrogramas (C, D) a frequência é apresentada em kHz (y) em função do eixo tempo em segundos (x). Oscilograma e espectrogramas feitos com o pacote Seewave de R (Sueur et al. 2008) com função de janela de Hann, resolução de 512 bandas.

3.4 Análise de dados

Para realizar as análises estatísticas, em primeiro lugar, os cantos foram atribuídos de acordo com as distribuições das linhagens descritas por Duellman (1970, 2001), ou seja, os cantos que se estendem do México ao noroeste da Costa Rica correspondem a *D.*

m. underwoodi (N=50); os indivíduos com gravações que se distribuem desde as planícies do Pacífico no sudeste da Costa Rica até a Colômbia, foram considerados como sendo da linhagem *D. m. microcephalus* (N=44); cantos de localidades encontradas desde o norte da América do Sul (incluindo Trinidad & Tobago) até a bacia amazônica correspondem à linhagem *D. m. misera* (N=14);. Analisamos também cantos registrados no Brasil que estão fora da área de distribuição das demais linhagens, e que alguns autores estão identificando como *D. microcephalus*; essas populações foram consideradas como uma nova linhagem *D. m. ssp.* (N=9).

Estatísticas descritivas foram calculadas para cada variável do canto das linhagens. Posteriormente, as linhagens (variáveis preditoras) foram comparadas usando as variáveis de canto (variáveis respostas) disponíveis para todos os indivíduos, sete temporais (DC, NN, DN, PN, IEN, TRN, FP) e uma espectral (FD). Para comparações entre populações, foram realizadas Modelos Lineares Generalizados (GLM) com a família Gamma. Nas análises em que as comparações foram significativas ($P < 0.05$), foi realizado um teste de Tukey usando o pacote multcomp (Hothorn et al. 2008) para determinar quais grupos diferiram significativamente.

Com o fim de verificar se as variáveis do canto de *D. microcephalus* agrupam às populações estudadas de acordo com as linhagens propostas por Duellman (1970, 2001), foi realizada análise de componentes principais (PCA) usando as variáveis dos cantos de forma conjunta (cantos de notas primárias com cinco variáveis vs notas secundárias com seis variáveis) para todas as linhagens de *D. microcephalus*. As análises de PCA foram feitos utilizando os pacotes “FactoMineR” (Kassambara & Mundt 2020) e “factoextra” (Le et al. 2008), “vegan” (Oksanen et al. 2022), “lattice” (Sarkar & Deepayan 2008) e “permute” (Simpson 2002).

Os três PCs que explicaram a maior variância foram extraídos para descrever as diferenças nas variáveis dos cantos de anúncio de *D. microcephalus*. Além disso, verificamos a variação dos cantos comparando os PCs ao longo de gradientes latitudinais usando regressão linear com modelos lineares generalizados (GLM) usando a família Gaussian. Todos os gráficos foram gerados com o pacote “ggplot2” do R (Wickham 2016). Todas as análises foram feitas no software R versão 4.2.1 (R Core Team, 2022).

4. Resultados

Foram analisadas 428 notas primárias e 1331 notas Secundárias do canto de anúncio de *D. microcephalus*. O canto de anúncio das linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. misera* (populações de Venezuela e Trinidad & Tobago) e *D. m. underwoodi* tem a mesma estrutura básica. O canto consiste em uma série de notas pulsadas que se repetem em intervalos longos. Sempre começa com uma nota primária, seguida por várias notas secundárias que variam em três, quatro, cinco ou até dezessete notas em *D. m. misera* e *D. m. underwoodi*, alternam-se regularmente, o que significa que o mesmo indivíduo pode produzir cantos com diferentes números de notas, essas notas secundárias têm dois grupos de pulsos, ou seja, possuem dois grupos de pulsos seguidos, o primeiro mais curto que o segundo (**Fig. 4.1-A, B e C**).

A estrutura do canto para a linhagem *D. m. misera* indivíduos do Brasil e *D. m. ssp* difere em algumas características (**Fig. 4.1-D**) em relação com as outras linhagens. Por exemplo, a nota primária estruturalmente não tem muita diferença com as notas secundárias. Também as notas secundárias não têm dois grupos de pulsos como nos cantos das outras linhagens.

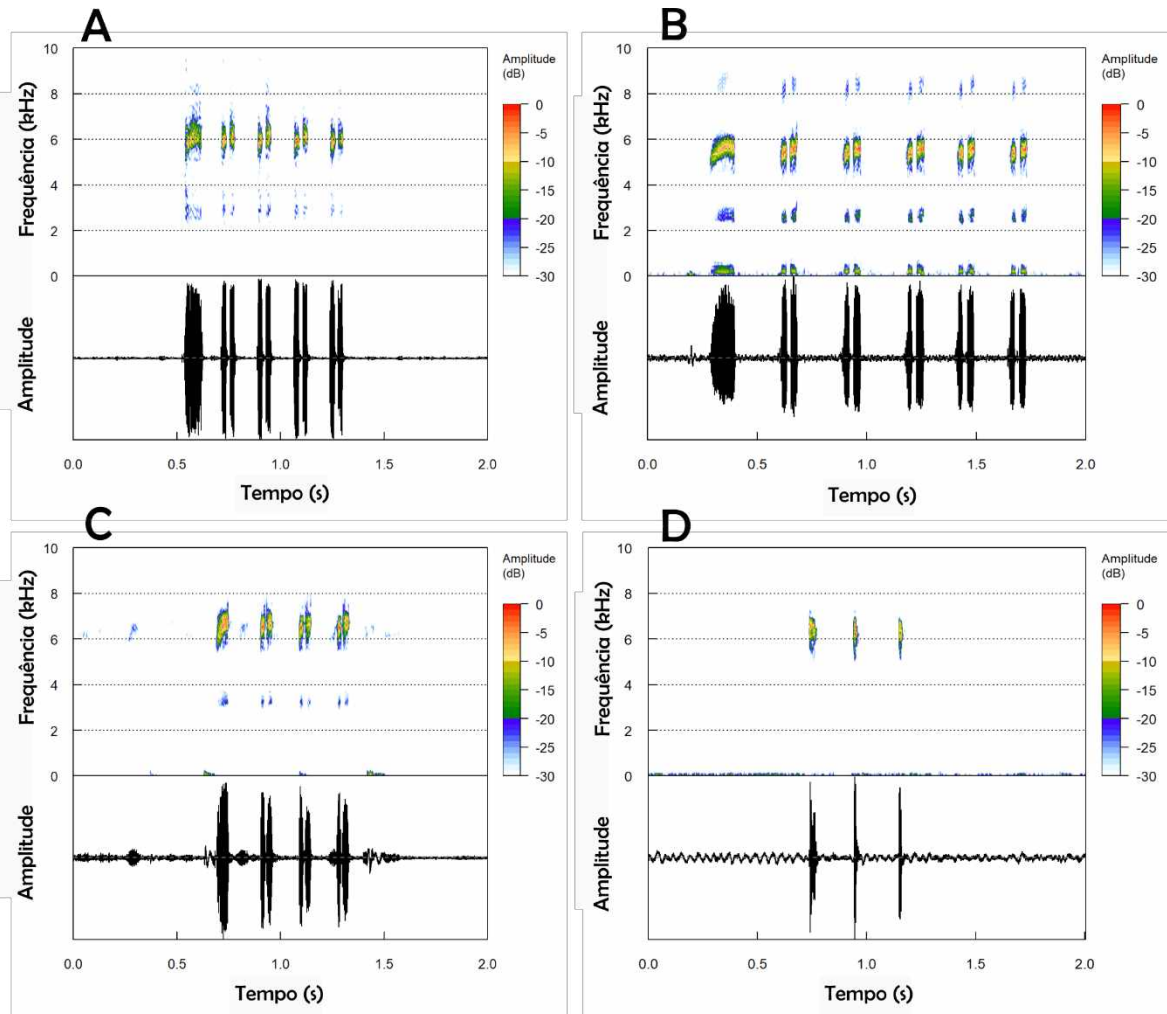


Figura 4.1. Espectrogramas comparativos (acima) e oscilogramas (abaixo) que exemplificam a diferença em algumas variáveis dos cantos de anúncio entre as linhagens de *D. microcephalus*. **A)** Canto de anúncio de um indivíduo de *D. m. underwoodi* da Costa Rica. **B)** Canto de anúncio de um indivíduo de *D. m. microcephalus* do Panamá. **C)** Canto de anúncio de um indivíduo de *D. m. misera* da Venezuela. **D)** Canto de anúncio de um indivíduo de *D. m. ssp* do Brasil. Os espectrogramas foram feitos com o pacote R Seewave (Sueur et al. 2008a) com a função de janela Hanning em resolução FFT de 512 bandas.

4.1 Descrição de variáveis acústicas.

A descrição de algumas variáveis acústicas medidas para cada linhagem neste estudo são descritas em seguida:

4.1.1 *D. m. underwoodi*

A duração do canto em média é de $618,50 \pm 203,7$ ms, o aumento ou diminuição da duração vai variar de acordo com a quantidade de notas. Em média, o número de notas é

$2,07 \pm 1,168$. A nota primária tem duração maior que as notas secundárias (primárias= $97,79 \pm 14,76$ ms e $85,36 \pm 11,96$ ms nas secundárias). O número de pulsos por nota em média é $21,53 \pm 4,18$ nas notas primárias e $17,06 \pm 2,93$ nas secundárias. O intervalo entre a nota primária e a primeira secundária é de $140,1 \pm 30,61$ ms e entre as notas secundárias em média é de $141,92 \pm 27,00$ ms. Da mesma forma que as outras linhagens, as notas primárias e secundárias são espectralmente semelhantes. A frequência dominante em média é $5216 \pm 1114,62$ Hz nas notas primárias e $5185 \pm 1116,24$ Hz nas notas secundárias (**Tabela 4.1**).

4.1.2 *D. m. microcephalus*

O canto desta linhagem dura em média $910,21 \pm 344,53$ ms, sendo que a duração pode aumentar ou diminuir dependendo do número de notas executadas. Em média o número de notas é $2,88 \pm 2,22$. A nota primária tem duração maior que as secundárias (primárias= $100,85 \pm 20,33$ ms e $82,61 \pm 15,62$ ms nas secundárias). O número de pulsos por nota em média é $21,88 \pm 6,25$ nas notas primárias e $14,77 \pm 2,62$ nas secundárias. O intervalo entre a nota primária e a primeira secundária é de $152,34 \pm 28,86$ ms e entre as notas secundárias em média é de $147,26 \pm 28,04$ ms. As notas primárias e secundárias são espectralmente semelhantes. A frequência dominante (FD) é a variável com menor diferença, sendo de $5383 \pm 763,23$ Hz nas notas primárias e $5422 \pm 571,64$ Hz nas notas secundárias (**Tabela 4.1**).

4.1.3 *D. m. misera*

A duração do canto nesta linhagem em média é de $897,8 \pm 628,48$ ms, também o aumento ou diminuição da duração dependerá do número de notas. Em média o número de notas é $4,04 \pm 3,31$. A nota primária tem duração maior que as notas secundárias (primárias= $55,28 \pm 39,58$ ms e $51,92 \pm 33,86$ ms nas secundárias). O número de pulsos por nota em média é $8,00 \pm 4,21$ nas notas primárias e $7,41 \pm 4,25$ nas secundárias. O

intervalo entre a nota primária e a primeira secundária é de $181,80 \text{ ms} \pm 72,07 \text{ ms}$ e entre as notas secundárias em média é de $188,6 \pm 79,10 \text{ ms}$. As notas primárias e secundárias são espectralmente semelhantes. A frequência dominante é a variável com menor diferença, sendo de $4860 \pm 1035,49 \text{ Hz}$ nas notas primárias e $4961 \pm 1016,39 \text{ Hz}$ nas notas secundárias (**Tabela 4.1**).

4.1.4 *D. microcephalus* ssp.

A duração do canto nesta linhagem é a maior em relação às demais linhagens, com média de $1136,00 \pm 889,24 \text{ ms}$, também o aumento ou diminuição da duração irá variar de acordo com o número de notas. Em média o número de notas é $3,27 \pm 2,35$. Em média a nota primária tem duração maior que as notas secundárias (primárias= $27,11 \pm 13,59 \text{ ms}$ e $21,70 \pm 9,52 \text{ ms}$ nas secundárias). O número de pulsos por nota em média é $5,69 \pm 2,71$ nas notas primárias e $5,00 \pm 1,93$ nas secundárias. O intervalo entre a nota primária e a primeira secundária é de $238,30 \pm 112,05 \text{ ms}$ e entre as notas secundárias em média é de $218,91 \pm 109,38 \text{ ms}$. Da mesma forma que as outras linhagens, as notas primárias e secundárias são espectralmente semelhantes. A frequência dominante média é $5724 \pm 694,28 \text{ Hz}$ nas notas primárias e $5703 \pm 666,24 \text{ Hz}$ nas notas secundárias (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1. Parâmetros acústicos do canto de anúncio de *D. microcephalus*. Os valores estão expressos como médias, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos (Min – Max). As variáveis temporais (DC, DN, IEN, DNs, IENs, TRs) estão expressos como milissegundos (ms) e as variáveis espectrais (FD, FDs) estão expressos como Hz (Herzt).

	<i>D. m. underwoodi</i> (N=50)		<i>D. m. microcephalus</i> (N=44)		<i>D. m. misera</i> (N=14)		<i>D. m. ssp</i> (N=9)	
	Média ± DP	Min - Max	Média ± DP	Min - Max	Média ± DP	Min - Max	Média ± DP	Min - Max
DC	618,50 ± 203,75	273,70 - 1084,60	910,20 ± 344,53	356,00 - 2230	897,80 ± 628,49	235,80 - 2423,3	1136,00± 889,24	447,50 - 2784,50
NN	2,08 ± 1,17	1,00 - 7,00	2,88 ± 2,22	1,00 - 17,00	4,04 ± 3,31	1,00 - 17,00	3,27 ± 2,35	1,00 - 12,00
Variáveis das notas primárias								
DN	97,79 ± 14,78	63,42 – 127,98	100,85 ± 20,33	40,29 - 133,20	55,28 ± 39,58	18,38 - 128,20	27,11 ± 13,59	8,00 – 44,55
PN	21,53 ± 4,18	12,75 - 35,00	21,87 ± 6,25	9,11 – 46,00	8,00 ± 4,21	3,14 - 14,25	5,69 ± 2,71	2,00 - 9,25
IEN	140,10 ± 30,61	89,50 - 281,40	152,34 ± 28,86	65,97 - 211,80	181,80 ± 72,07	102,60 - 348,40	238,30 ± 112,04	165,20 - 459,40
FP	0,22 ± 0,03	0,14 - 0,30	0,22 ± 0,04	0,09 - 0,31	0,18 ± 0,04	0,10 - 0,22	0,22 ± 0,04	0,17 - 0,28
FD	5216 ± 1114,62	2541 - 6219	5383 ± 763,24	2584 - 6230	4860 ± 1035,49	3375 - 7215	5724 ± 694,27	4500 - 6503
Variáveis das notas Secundárias								
DNs	85,36 ± 11,96	65,23 - 113,60	82,61 ± 15,62	36,66 - 133,20	51,92 ± 33,86	18,38 - 114,90	21,704 ± 9,52	7,70 - 34,03
PNs	17,06 ± 2,93	10,50 - 23,00	14,76 ± 2,62	9,11 - 20,33	7,41 ± 4,25	1,00 - 14,81	5,00 ± 1,93	2,00 - 7,31
IENs	141,92 ± 27,00	87,62 - 248,01	147,26 ± 28,04	65,97 - 196,90	188,60 ± 79,1	92,80 - 341,50	218,91 ± 109,38	99,32 - 410,79
TRNs	0,37 ± 0,18	0,00 - 0,79	0,22 ± 0,17	0,00 - 0,75	0,39 ± 0,27	0,08 - 0,94	0,2189 ± 0,13	0,04 - 0,42
Fps	0,20 ± 0,03	0,14 - 0,27	0,18 ± 0,03	0,09 - 0,28	0,16 ± 0,05	0,06 - 0,24	0,24 ± 0,04	0,21 - 0,32
FDs	5185 ± 1116,24	2567 - 6169	5422 ± 571,64	3204 - 6225	4961 ± 1017	3638 - 7215	5703 ± 666,24	4482 - 6403

4.2 Comparações entre os cantos das linhagens

Existe diferença na maioria das variáveis de canto, exceto para as FDs das notas secundárias. A DC difere entre as linhagens ($\chi^2 = 26,08$, $df = 3$, $p < 0,001$), com *D. m. ssp* e *D. m. microcephalus*, tendo em média DC maior. A DC de *D. m. underwoodi* é a única que difere das outras linhagens ($<0,05$). Também houve diferença entre as linhagens no NN por canto ($\chi^2 = 9,45$, $df = 3$, $p < 0,02$). Em média *D. m. misera* tem um maior NN por canto em comparação com as outras linhagens. No NN por canto há apenas diferença entre *D. m. microcephalus* e *D. m. misera* ($<0,05$). Todas as comparações pareadas entre as linhagens realizadas com os testes de Tukey são apresentadas na **Tabela 4.2**, **Fig. 4.2**.

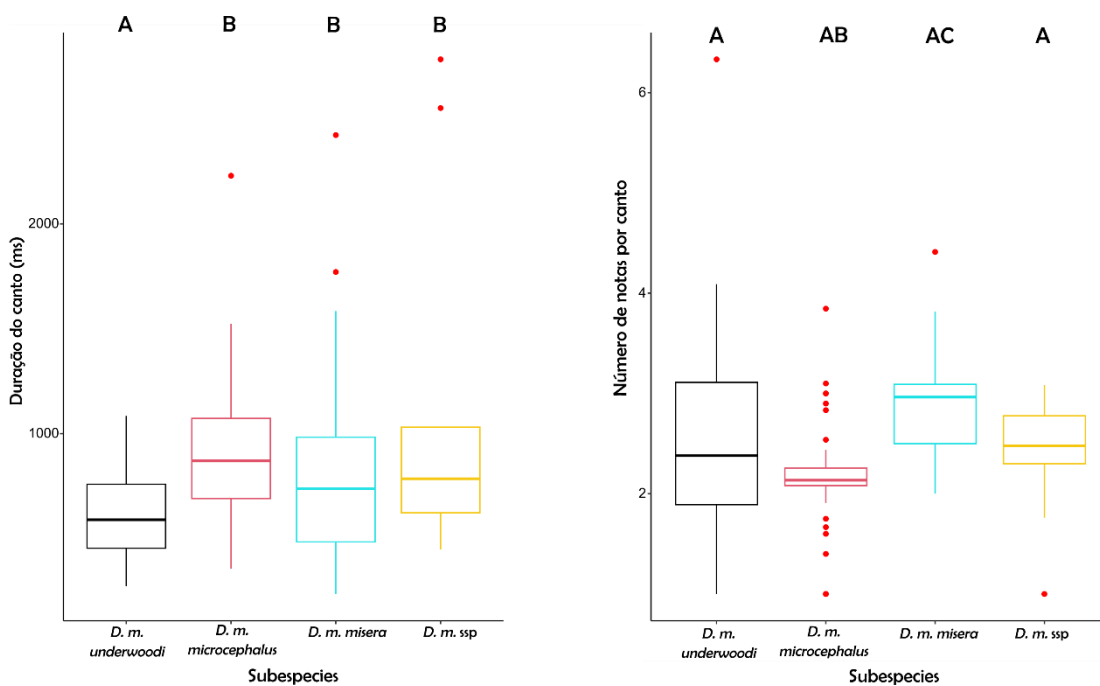


Figura 4.2. Comparação das variáveis do canto de anúncio de *D. microcephalus* entre linhagens. As letras que estão compartilhadas entre linhagens indicam que não há diferença, as letras que não compartilham entre linhagens indicam diferença. A barra horizontal indica a mediana, cada bloco representa 50% dos dados, a linha vertical o intervalo de 95% e os pontos vermelhos representam outliers.

Tabela 4.2. Resultados das análises comparativas em pares da duração do canto (DC) e o número de notas (NN) dos cantos de anúncio entre linhagens de *D. microcephalus* realizadas com os testes de Tukey. Os valores são expressos como χ^2 = estatística qui-quadrado, P = valor estatístico do teste (< 0.05 = significativo). Os valores marcados em negrito são variáveis que diferem significativamente entre as linhagens.

Linhagens /Variáveis	DC		NN	
	χ^2	P	χ^2	P
<i>D. m. misera</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	0,099	0,99	-3,06	0,01
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	-1,44	0,46	-0,67	0,91
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	4,09	<0,001	-1,92	0,21
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. misera</i>	-1,24	0,59	1,47	0,45
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. misera</i>	2,99	0,01	1,67	0,33
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. ssp</i>	4,41	<0,001	-0,44	0,97

Todas as variáveis das notas primárias diferem entre linhagens, exceto entre *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus*. No caso da DN ($\chi^2 = 136,73$, $df= 3$, $p <0,001$), há diferença entre *D. m. misera* e *D. m. ssp* ($<0,05$) e essas duas linhagens diferem com *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* ($<0,05$). Nos PN ($\chi^2 = 222,13$, $df= 3$, $p <0,001$) as linhagens *D. m. ssp* e *D. m. misera* não diferem entre eles ($>0,05$), mas se diferem com *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* ($<0,05$). Na FD ($\chi^2 = 8,11$, $df= 3$, $p <0,001$) apenas a linhagem *D. m. misera* difere com as linhagens *D. m. microcephalus* e *D. m. ssp* ($<0,05$). Em todas essas variáveis a média é mais alta em *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* em comparação com as outras linhagens. No caso do intervalo entre a nota primária e a primeira nota secundária ($\chi^2 = 52,36$, $df= 3$, $p <0,001$) a duração é maior em *D. m. ssp* e difere das outras linhagens ($<0,05$). Entre *D. m. misera* e *D. m. underwoodi* também há diferença ($<0,05$). Também a FP difere entre linhagens ($\chi^2 = 19,85$, $df= 3$, $p <0,001$), sendo *D. m. misera* a únicas linhagens que difere entre as outras ($<0,05$) tendo uma menor FP em comparação com as outras linhagens. Todas as comparações em pares entre linhagens realizadas com os testes Tukey são apresentadas na **Tabela 4.3, Fig. 3.3**.

Tabela 4.3. Resultados das análises comparativas em pares de todas as variáveis das notas primárias (DN= duração da nota; PN= pulsos por nota; IEN= intervalo entre a nota primaria e a primera secundaria; FP= Frequência de pulso e FD= Frequência dominante) dos cantos de anúncio entre linhagens de *D. microcephalus* realizadas com os testes de Tukey. Os valores são expressos como χ^2 = estatística qui-quadrado, P = valor estatístico do teste ($< 0,05$ = significativo). Os valores marcados em negrito são variáveis que diferem significativamente entre as linhagens.

Linhagens /Variáveis	DN		PN		IEN		FP		FD	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
<i>D. m. misera</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	5,39	<0,001	8,18	<0,001	-2,27	0,10	3,72	< 0,001	2,39	< 0,05
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	7,09	<0,001	7,55	<0,001	-5,57	<0,001	-0,41	0,98	-0,68	0,90
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	0,89	0,78	0,69	0,88	2,41	0,07	-0,64	0,92	1,34	0,52
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. misera</i>	4,59	<0,001	2,20	0,10	-2,70	0,03	-3,23	0,006	-2,38	< 0,05
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. misera</i>	-5,03	<0,001	-7,99	<0,001	4,13	<0,001	-4,14	< 0,001	-1,56	0,38
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. ssp</i>	-6,95	<0,001	-7,44	<0,001	7,43	<0,001	0,05	0,99	1,48	0,43

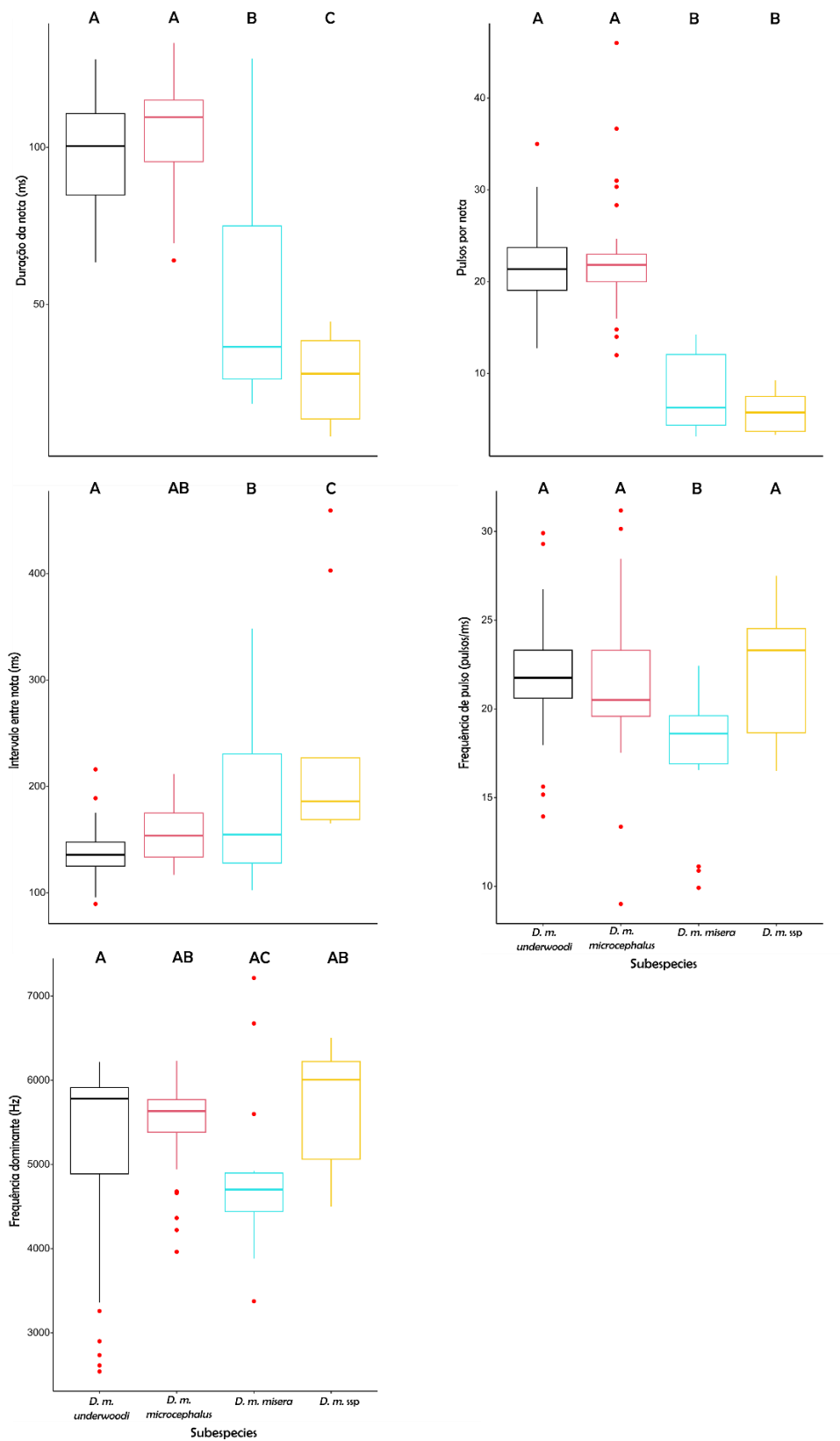


Figura 4.3. Comparação das variáveis das notas primárias do canto de anúncio de *D. microcephalus* entre linhagens. As letras que estão compartilhadas entre linhagens indicam que não há diferença, as letras que não compartilham entre linhagens indicam diferença. A barra horizontal indica a mediana, cada bloco representa 50% dos dados, a linha vertical o intervalo de 95% e os pontos vermelhos representam outliers.

No caso das notas secundárias, na maioria das variáveis há diferença entre as linhagens, apenas na FDs não houve diferença ($\chi^2 = 5,77$, $df= 3$, $p = 0,12$). Na DNs ($\chi^2 = 159,13$, $df= 3$, $p < 0,001$) as linhagens *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* tem maior DNs e difere com *D. m. misera* e *D. m. ssp* ($< 0,05$). Nos PNs ($\chi^2 = 201,09$, $df= 3$, $p < 0,001$) todas as linhagens variam entre todas ($< 0,05$). Nos IENs ($\chi^2 = 38,16$, $df= 3$, $p < 0,001$) a duração é maior em *D. m. misera* e *D. m. ssp* e diferem com as linhagens *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* ($< 0,05$). Na TRNs também há diferença entre as linhagens ($\chi^2 = 24,70$, $df= 3$, $p < 0,001$) *D. m. underwoodi* difere com *D. m. microcephalus* e *D. m. ssp* ($< 0,05$), além disso *D. m. microcephalus* difere com *D. m. misera* ($< 0,05$). Na FPs há diferenças entre as linhagens ($\chi^2 = 49,12$, $df= 3$, $p < 0,001$) apenas *D. m. misera* e *D. m. microcephalus* não tem diferença ($> 0,05$). Todas as comparações em pares entre linhagens realizadas com os testes Tukey são apresentadas na **Tabela 4.4, Fig. 4.4**.

Tabela 4.4. Resultados das análises comparativas em pares de todas as variáveis das notas Secundárias (DNs= duração das notas Secundárias; PNs= pulsos por nota das notas Secundárias; IENs= intervalo entre notas Secundárias; TRNs= Taxa de repetição das notas Secundárias; FPs= Frequência de pulso das notas Secundárias e FDs= Frequência dominante das notas Secundárias) dos cantos de anúncio entre linhagens de *D. microcephalus* realizadas com os testes de Tukey. Os valores são expressos como χ^2 = estatística qui-quadrado, P = valor estatística do teste ($< 0,05$ = significativo). Os valores marcados em negrito são variáveis que diferem significativamente entre as linhagens.

Linhagens /Variáveis	DNs		PNs		IENs		TRNs		FPs		FDs	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
<i>D. m. misera</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	4,83	< 0,001	7,15	<0,001	-3,24	0,007	-2,94	0,02	1,41	0,48	1,75	0,28
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	7,84	< 0,001	7,47	<0,001	-4,72	<0,001	0,28	0,99	-6,21	< 0,001	-0,71	0,89
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. microcephalus</i>	-0,16	0,99	-2,40	0,05	1,23	0,60	-4,31	<0,001	-3,55	0,002	1,43	0,47
<i>D. m. ssp</i> vs <i>D. m. misera</i>	5,86	< 0,001	2,84	0,02	-1,44	0,47	2,05	0,16	-5,92	< 0,001	-1,92	0,21
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. misera</i>	-4,94	< 0,001	-8,07	<0,001	4,25	<0,001	-0,30	0,99	-3,68	0,001	-0,84	0,83
<i>D. m. underwoodi</i> vs <i>D. m. ssp</i>	-7,87	< 0,001	-7,99	<0,001	5,68	<0,001	-2,42	0,05	3,92	< 0,001	1,58	0,38

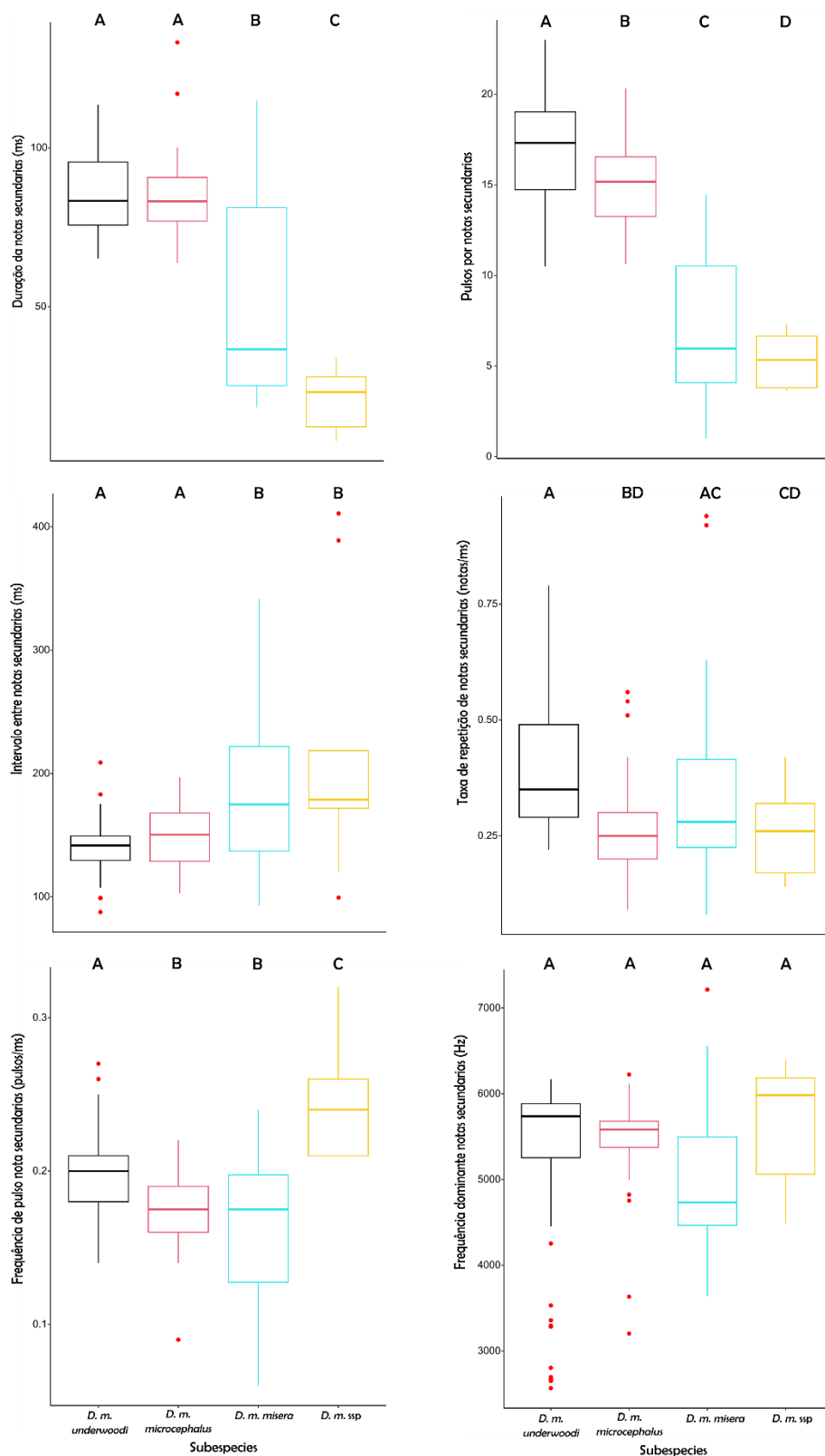


Figura 4.4. Comparação das variáveis das notas secundárias do canto de anúncio de *D. microcephalus* entre linhagens. As letras que estão compartilhadas entre linhagens indicam que não há diferença, as letras que não compartilham entre linhagens indicam diferença. A barra horizontal indica a mediana, cada bloco representa 50% dos dados, a linha vertical o intervalo de 95% e os pontos vermelhos representam outliers.

4.3 Análises de agrupamento das linhagens baseadas nas variáveis dos cantos

Análises quantitativas dos cantos baseadas em variáveis acústicas de notas primárias e secundárias nas linhagens de *D. microcephalus* mostraram variação significativa entre as linhagens. Os três primeiros PCAs explicaram 65% da variância total representada pelas variáveis dos cantos. O primeiro eixo do PC capturou 33.89%, o eixo 2 capturou 16.77% e o eixo 3 capturou 14.32%.

As variáveis com maior influência em geral foram a DC, DN, DN_s, FD, FD_s. A DN e DN_s, assim como os PN, PN_s e os IEN, IEN_s foram as variáveis mais influentes no eixo 1 do PCA. No caso do eixo 2, as variáveis que tiveram maior influência foram a FP e FP_s, assim como a FD e FD_s. A DC em conjunto com a TRN e a FD_s influenciaram o eixo 3 (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Resultados da análise de componentes principais (PCA) para as variáveis dos cantos de anúncio de *D. microcephalus* analisadas. Os valores são expressos como % de contribuição, correlação, *P* (< 0.05= significativo). Os valores marcados em negrito são as variáveis com maior contribuição em cada PC.

Variáveis do canto com N = 117 observações	PC1			PC2			PC3		
	Contrib (%)	Corr	<i>P</i>	Contrib (%)	Corr	<i>P</i>	Contrib (%)	Corr	<i>P</i>
DC	4,048	-0,422	< 0,001	2,007	-0,209	< 0,001	33,961	0,795	< 0,001
NN	0,020	0,029	-	2,190	0,219	< 0,001	0,913	-0,130	-
DN	17,389	0,875	< 0,001	4,869	-0,326	< 0,001	3,976	0,272	< 0,001
PN	15,433	0,824	< 0,001	0,026	0,024	-	5,207	0,311	< 0,001
IEN	12,497	-0,741	< 0,001	0,725	-0,126	-	5,166	0,310	< 0,001
FP	0,539	0,154	-	17,879	0,624	< 0,001	0,575	0,103	-
FD	0,584	0,160	-	23,077	0,709	< 0,001	6,786	0,355	< 0,001
DNs	17,553	0,879	< 0,001	4,815	-0,324	< 0,001	1,545	0,169	-
PNs	18,069	0,892	< 0,001	0,205	0,067	-	0,299	0,074	-
IENs	12,952	0,755	< 0,001	0,901	-0,140	-	4,274	0,282	< 0,001
TRNs	0,251	0,105	-	0,075	0,040	-	26,109	-0,697	< 0,001
FPs	0,378	-0,129	-	23,137	0,710	< 0,001	2,434	-0,213	< 0,001
FDs	0,285	0,112	-	20,093	0,661	< 0,001	8,754	0,404	< 0,001

Os dois primeiros eixos do PCA agrupam um grande grupo formado pelas linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. underwoodi* e alguns indivíduos de *D. m. misera* com alta semelhança nas variáveis DC, DN, PN, IEN, DNs, PNs, IENs (**Fig. 4.5 – A**). A maioria dos indivíduos da linhagem *D. m. microcephalus*, *D. m. underwoodi* e alguns indivíduos de *D. m. misera* com distribuição na Venezuela, estão localizados em extremos opostos do PC1 em relação aos indivíduos de *D. m. misera* do Brasil e aos indivíduos da linhagem *D. m. ssp.* com distribuição mais para o centro do Brasil (**Fig. 4.5-B**). As linhagens estão localizadas ao longo do PC2 de acordo com DC, NN, DN, FP, FD, DNs, FPs, FDs. No PC3 as linhagens estão localizadas de acordo com DC, DN, PN, IEN, FD, IENs, TRNs, FPs e FDs (**Fig. 4.5**).

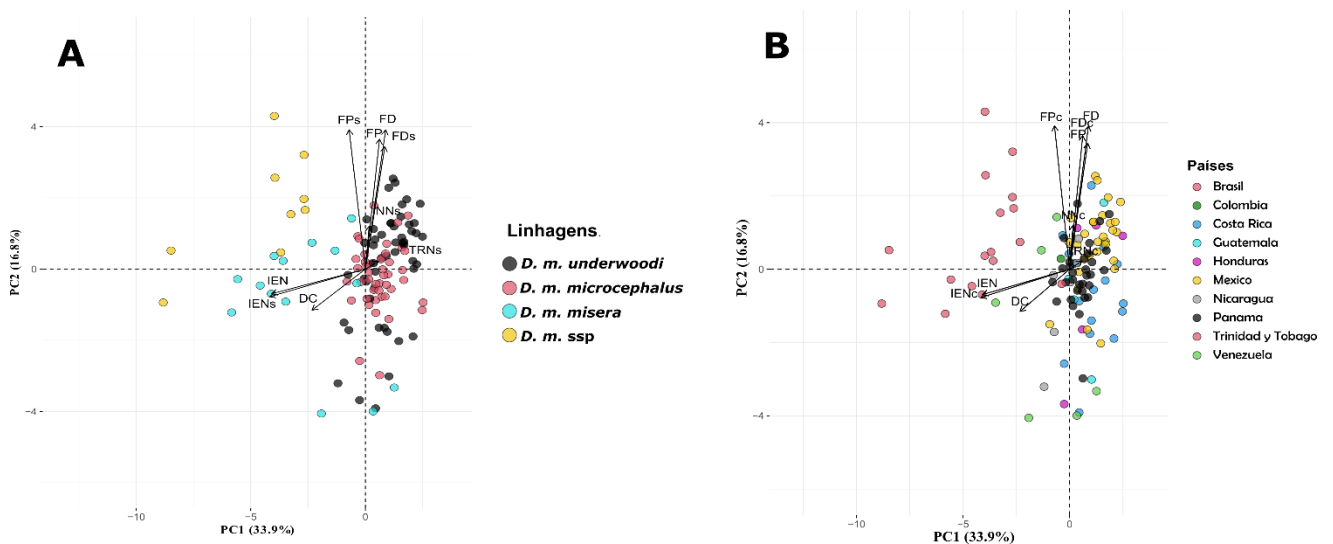


Figura 4.5. Ordenação de 117 gravações dos indivíduos das linhagens de *D. microcephalus* identificadas neste estudo com base na análise de componentes principais (PCA). **A)** PCAs do agrupamento segundo as variáveis de canto das linhagens de *D. microcephalus*. **B)** PCAs do agrupamento segundo a localização por país de cada gravação *D. microcephalus*.

Com a exclusão dos cantos de indivíduos do Brasil considerados dentro da linhagem *D. m. misera*, as variáveis de canto dos indivíduos de *D. m. misera* da Venezuela (N=6) e Trinidad & Tobago (N=1) têm em média DC= 1108,1 (341,8 - 2423,3) ms; NN=

2,85 (2,00 - 17); para as notas primárias, os valores são: DN= 82,79 (32,23 - 128,20) ms; PN= 11,48 (6,33 - 14,25); IENs= 146,4 (102,6 - 240,1) ms; FP= 0,16 (0,09 - 0,22) pulsos/ms; FD= 4638 (3375 - 6675) Hz; e para as notas secundárias os valores são: DN_s= 76,48 (29,22- 114,90) ms; PN_s= 10,94 (5,92 - 14,46); IEN_s= 136,9 (92,8 - 206,1) ms; TRN_s= 0,23 (0,08 - 0,38) notas/ms; FP_s= 0,16 (0,10- 0,24) pulsos/ms; FD_s=4841 (3638 - 6556) Hz.

4.4 Análises da relação do PCA 1 com a latitude

Ao testar a variação do canto do anúncio ao longo dos gradientes latitudinais (de sul para norte), verificamos que existe correlação positiva entre as variáveis do PCA 1 (DC, DN, PN, IEN, DN_s, PN_s, IEN_s) e os cines latitudinais, as variáveis aumentam de sul para norte ($r= 0,40$, $P < 0,001$) (**Fig. 4.6**). Por outro lado, as variáveis do PCA 2 e PCA3 não tem relação significativa com a latitude (PCA 2= $P > 0,503$ e PCA 3= $P > 0,066$).

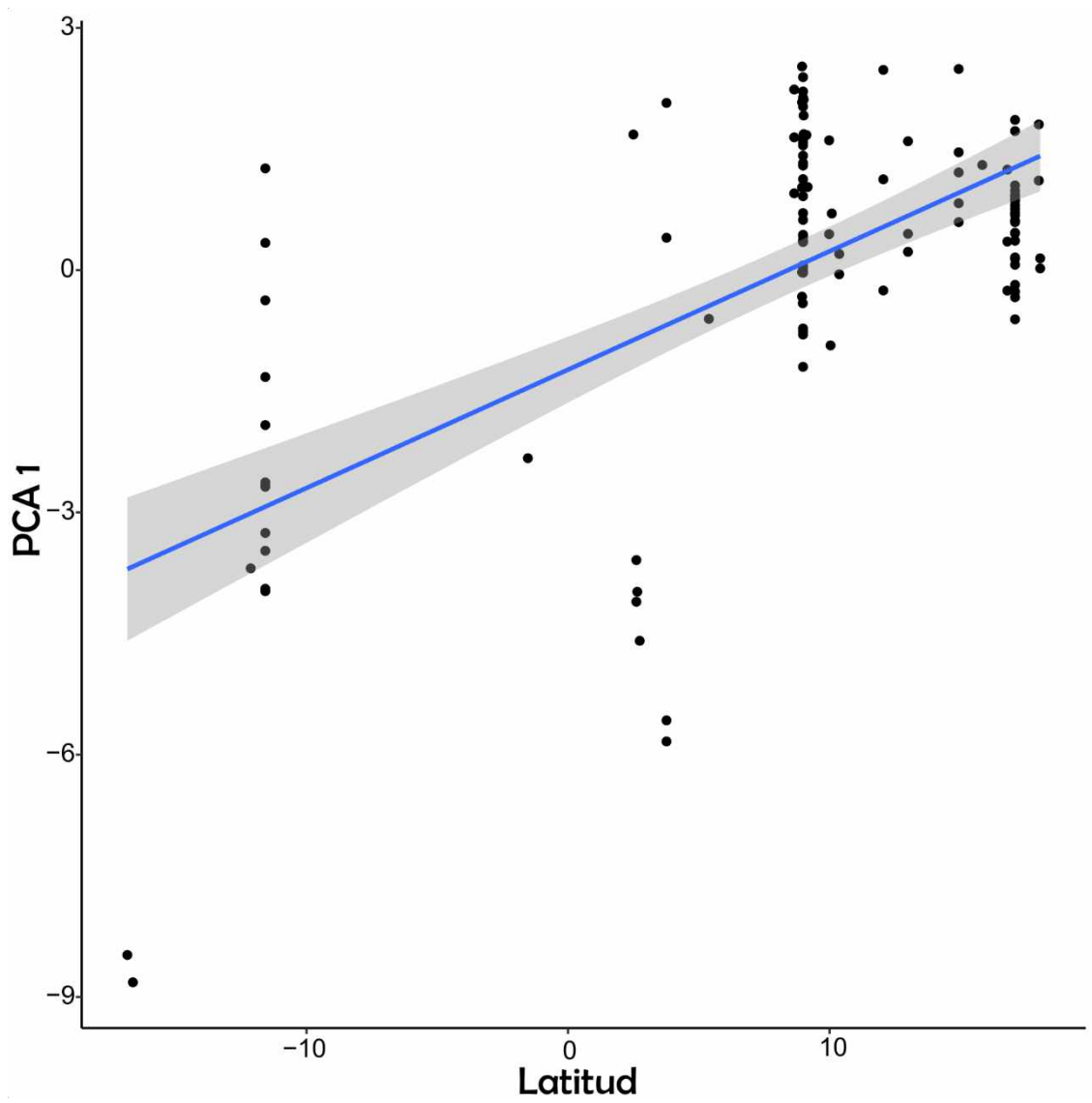


Figura 4.6. Correlação entre latitude e as variáveis do PCA 1. O sombreado cinza corresponde a intervalo de confiança de 95%.

5. Discussão

As variáveis do canto de anúncio de *D. microcephalus* mostram variação geográfica significativa entre as linhagens em sua área de distribuição. As análises de comparação indicam que há variação na maioria das variáveis do canto entre as linhagens de *D. microcephalus*. Consequentemente, as análises de PCA agrupam duas grandes populações de acordo com as variáveis de canto DN, DN_s, PN, PN_s, IEN, IEN_s. Os indivíduos das linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. underwoodi* e os indivíduos da linhagem *D. m. misera* da Venezuela estão em extremos opostos da PCA 1 em relação aos indivíduos de *D. m. misera* do Brasil e aos indivíduos da linhagem *D. m. ssp*. Além disso, as variáveis que mais influenciam os PCAs variam latitudinalmente de norte a sul, as linhagens do sul (*D. m. misera*) têm variáveis de canto mais baixas e aumentam nas espécies do norte (*D. m. microcephalus* e *D. m. underwoodi*).

Nossos resultados confirmam que a estrutura do canto de anúncio entre as linhagens *D. m. microcephalus*, *D. m. misera* (indivíduos da Venezuela e Trinidad & Tobago) e *D. m. underwoodi* é consistente com as descrições em outros estudos (Duellman & Fouquette 1968; Fouquette 1968; Duellman 1970 e 2001; Tárano 2000; Savage 2002). Os cantos consistem em série de notas pulsadas repetidas em intervalos longos. O canto começa com nota introdutória ou primária (não pareada), que é seguida por várias notas secundárias (pareadas) compostas por dois grupos de pulsos, os cantos podem chegar a 17 ou mais notas secundárias (geralmente de 1 a 4), esse padrão básico é o mesmo em todas as três linhagens. No entanto, a estrutura do canto das populações do Brasil central identificadas como *D. microcephalus* por Bernarde (2007) e Texeira (2018) e denominadas neste estudo como *D. m. ssp* difere estruturalmente em relação às outras linhagens. A nota primária é semelhante à nota secundária, elas têm a mesma estrutura,

ou seja, as notas secundárias não têm dois grupos de pulsos como nas outras linhagens. Texeira (2018) menciona essa diferença na estrutura dos cantos analisados de *D. microcephalus*.

A duração das notas (primárias e secundárias), o número de pulsos (notas primárias e secundárias), o intervalo entre as notas (primárias e secundárias) e a frequência de pulsos (notas secundárias) foram as variáveis do canto de anúncio que mais diferem entre as linhagens. Ryan (1988) menciona que as variáveis temporais evolutivamente têm mais variação, principalmente porque estão sob controle fisiológico ou comportamental. Por outro lado, as variáveis espectrais, que estão sob controle morfológico têm menos variação. Vários estudos mostraram que as variáveis abióticas, como temperatura e umidade do ar, são as que mais influenciam as variáveis temporais de diferentes anuros (Platz 1988; Ryan & Wilczynski 1991; Guimarães & Bastos 2003; Lingnau & Bastos 2007; Morais et al. 2012; Bee et al. 2013). Schneider (1977) até considera que a duração do canto ou da nota depende da temperatura. Embora as variáveis temporais sejam mais influenciadas pelo ambiente, as variáveis morfológicas, como o tamanho do corpo, também podem influenciar os parâmetros temporais do canto, conforme já documentado em alguns estudos. Por exemplo, Pröhl (2003); Gasser et al. (2009) registram influência nas taxas de canto; Toledo & Haddad (2009) na duração do canto e Gambale et al. (2014) no número de pulsos e na duração das notas.

Não descartamos que a temperatura, o tamanho do corpo ou outros aspectos sociais influenciem as variáveis do canto entre as linhagens, principalmente porque todas essas variáveis variam com a latitude (Ashton 2004). Essas variáveis poderiam explicar a variação dos cantos de anúncio entre as linhagens ao longo do gradiente latitudinal, principalmente porque as variáveis DN, PN e IEN da nota primária e a DNs, PNs e IENs das notas Secundárias tem menor duração na linhagem que se encontra no sul *D. m.*

misera e aumentam nas linhagens *D. m. microcephalus* e *D. m. underwoodi* que se encontram no norte. No entanto, entre essas últimas linhagens *D. m. microcephalus* tem variáveis do canto maiores quando comparada com *D. m. underwoodi*. Vale ressaltar que Duellman (1970,2001) já tinha observado que as variáveis do canto são maiores em *D. m. microcephalus* e registrou variação na duração das notas primárias entre indivíduos da linhagem de *D. m. underwoodi*, onde as notas primárias das populações do México tiveram maior duração que as das populações do sul (e.g., Nicarágua, Costa Rica etc.).

As análises exploratórias com PCAs sugerem que há dois grupos bioacústicos, um grupo composto pelas linhagens existentes: *D. m. underwoodi*, *D. m. microcephalus* e *D. m. misera* (só as populações de Venezuela e Trinidad & Tobago), e outro grupo formado por os indivíduos de *D. m. misera* provenientes do Brasil e os indivíduos identificados neste estudo como *D. m. ssp.* Os resultados obtidos fornecem evidências de que os cantos de *D. m. underwoodi*, *D. m. microcephalus* e *D. m. misera* (populações da Venezuela) têm cantos qualitativa e quantitativamente diferentes do que *D. m. misera* do Brasil e de *D. m. ssp.* Existem diferentes mecanismos de isolamento reprodutivo que podem estar envolvidos entre as linhagens de *D. microcephalus* estudadas. Um desses mecanismos é o isolamento etológico, que já foi estudado em diferentes espécies de anuros da América Central (Blair 1972; Duellman 1963b; Duellman & Trueb 1966; Duellman & Fouquette 1968), incluindo espécies do grupo *D. microcephalus*. Fouquette (1960) encontrou que o canto de anúncio é o principal mecanismo de isolamento que opera entre as espécies *D. ebraccatus*, *D. microcephalus* e *D. phlebodes*. Esse mecanismo de isolamento também pode estar relacionado com as diferenças no canto de anúncio entre as linhagens incluídas neste estudo, levando a diferenças no comportamento de acasalamento que podem reduzir a capacidade de se reproduzir entre indivíduos das diferentes linhagens de *D. microcephalus*. Isso se deve à capacidade das fêmeas em distinguir os cantos de sua

própria espécie dos cantos de outras espécies, como já relatado em diferentes espécies da família Hylidae (Martof & Thompson 1958; Little-john & Michaud 1959; Snyder & Jameson 1965; Duellman 1967) o que pode ser aplicável às linhagens.

Como os cantos de anúncio podem atuar como mecanismo pré-zigótico de isolamento reprodutivo e podem ser fator importante na formação de novas espécies ao longo do tempo, consideramos que os cantos de anúncio dos indivíduos do Brasil (tanto os identificados como *D. m. misera* como os *D. m. ssp*) analisados neste estudo provavelmente correspondem a espécie não descrita. Para definir a inclusão dessa espécie dentro do gênero *Dendropsophus* são necessários novos estudos que incluam um maior número de indivíduos, maior cobertura espacial e a análise de dados não só de cantos, mas dados morfológicos e moleculares.

Os parâmetros DN, DN_s, IEN, IEN_s encontrados em nosso estudo para as populações da Venezuela e Trinidad & Tobago são coincidentes com os descritos anteriormente por Fouquette (1968), Duellman (1997) e Tárano (2010) para diferentes populações de Venezuela (Acarigua, El Dorado e Km 13 e da Planície Central), enquanto o número de PN é mais baixo nas nossas análises para as notas primárias e mais alto para as notas secundárias. Os FD das notas (primárias e secundárias) apresentam valores inferiores em nossa análise aos relatados por Fouquette (1968), Duellman (1997) e Tárano (2010). Da mesma forma, o TRNs é menor em nossa análise do que o relatado por Fouquette (1968).

Embora apresentem a mesma estrutura de canto, foram identificadas diferenças em certas variáveis temporais do canto entre *D. m. underwoodi*, *D. m. microcephalus* e *D. m. misera*. *D. m. misera* varia de *D. m. microcephalus* em NN, PN, FP e FPs e de *D. m. underwoodi* na DC, PN, PN_s, FP e FPs. Com relação à variável espectral FD, não foi

registrada diferença nem na nota primária nem secundárias entre as linhagens. Em nossa análise, não encontramos diferenças significativas entre *D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus* para as variáveis temporais e espectrais de canto da nota primária. No entanto, a DC e os parâmetros das notas secundárias PN, TRN e FP diferiram entre as linhagens. A diferença na duração do canto na linhagem *D. m. underwoodi* em relação às outras linhagens é explicada pela relação entre o número de notas que influenciam a duração do canto. Estudos prévios reportaram até 18 notas por canto para *D. m. underwoodi* (Duellman & Fouquette, 1968; Duellman, 1970, 2001), enquanto neste estudo os cantos analisados de *D. m. underwoodi* atingiu sete notas e 17 notas em *D. m. microcephalus* e *D. m. misera*. Os cantos designados aqui como pertencentes a *Dendropsophus m. ssp.* identificados como *D. microcephalus* foram registrados em Espigão d'Oeste, no estado de Rondônia (Bernarde 2007; Texeira 2018), no estado de Goiás e no estado de Mato Grosso. Texeira (2018) estudou os cantos das populações de Rondônia e encontrou valores para duração da nota, número de pulsos, duração do pulso e frequência dominante que estão dentro dos intervalos relatados para as outras linhagens identificadas. No entanto, neste estudo encontramos diferenças na maioria das variáveis temporais, por exemplo, *D. m. microcephalus* varia na DN, DN_s, PN, PN_s, IEN, IEN_s, FP_s e FP_s; e em *D. m. underwoodi* varia na DC, DN, DN_s, PN, PN_s, IEN, IEN_s, FP_s e TRN_s; com *D. m. misera* varia na DN, DN_s, IEN, IEN_s, FP_s, FP, FP_s e FD. Unicamente *D. m. misera* variou na variável espectral FD. Apesar de encontrar similaridade em algumas variáveis acústicas, Texeira (2018) também conclui que esses cantos são diferentes daquelas características de *D. microcephalus*.

A reavaliação de muitas espécies já foi realizada usando apenas a análise morfológica ou bioacústica (Haddad & Pombal 1998; Kwet & Solé 2005; Kwet 2007; Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2008). No entanto, devido à semelhança morfológica e às

informações limitadas disponíveis sobre as espécies do grupo *D. microcephalus*, é difícil fazer identificação precisa de algumas espécies, razão pela qual consideramos que elas precisam ser estudadas com uma abordagem taxonômica integrativa, conforme já aplicado em outros estudos (e.g., Vaz-Silva & Maciel 2011). Esses estudos podem incluir várias fontes de evidência, desde análises morfológicas, bioacústica, caracteres moleculares e comportamentais, para revelar a diversidade de linhagem ou organismo, incluindo espécies crípticas (Padial et al. 2010). Também é necessária uma amostragem adicional em áreas existentes e novas para entender melhor a taxonomia dos indivíduos de *Dendropsophus* ssp do Brasil.

6. Conclusões

Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que os cantos de anúncio das diferentes populações de *D. microcephalus* são estruturalmente semelhantes, mas apresentam variação nos parâmetros quantitativos ao longo de sua distribuição geográfica, portanto, os cantos parecem variar de acordo com as linhagens propostas por Duellman (1970, 2001). Entre as linhagens *D. m. underwoodi*, *D. m. microcephalus* e *D. m. misera* existem variáveis acústicas que as diferenciam umas das outras e que poderiam dar suporte à diferenciação de linhagens feita por Duellman com base na análise da coloração. Além disso, os cantos variam latitudinalmente, ou seja, as populações do sul (*D. m. misera*) tem variáveis do canto mais curtas que as populações do norte (*D. m. underwoodi* e *D. m. microcephalus*) que apresentam variáveis de cantos maiores.

As análises mostraram separação total dos cantos de anúncio dos indivíduos identificados como *D. m. ssp* e *D. m. misera* do Brasil, indicando que os cantos são diferentes em estrutura e parâmetros acústicos dos cantos das linhagens *D. m. underwoodi*, *D. m. microcephalus* e *D. m. misera* (da Venezuela e Trinidad & Tobago). Os cantos de anúncio poderiam estar atuando como mecanismo pré-zigótico de isolamento reprodutivo nessas populações e, portanto, concluímos que os cantos dos indivíduos brasileiros analisados neste estudo provavelmente correspondem a outra espécie de *Dendropsophus*. As diferenças mais importantes são encontradas na estrutura e nas variáveis acústicas dos cantos. É necessária análise mais aprofundada com abordagem taxonômica integrativa para determinar o status taxonômico das populações brasileiras. Esses estudos podem incluir várias fontes de evidência, desde análises morfológicas, bioacústica, caracteres moleculares e comportamentais.

7. Referências bibliográficas

- Ashton, K.G. (2004): Sensitivity of Intraspecific Latitudinal Clines of Body Size of Tetrapods to Sampling Latitude and Body Size. *Integrative and Comparative Biology* 44: 403–412. <https://doi.org/10.1093/icb/44.6.403>
- 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, 79–86. <https://doi.org/10.1007/s10211-014-0188-2>
- Bastos R. P, Alcantara M. B, Morais A. R, Lingnau R, Signorelli L. (2011). Vocal behavior and conspecific call response in *Scinax centralis* (Anura, Hylidae). *Herpetological Journal* 21(1): 43–50.
- Bee, M.A., Suyesh, R. & Biju, S.D. (2013). Vocal behavior of the Ponmudi Bush Frog (*Raorchestes graminirupes*): repertoire and individual variation. *Herpetologica*, 69, 22–35. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00042>

- Bernal, X.E., Guarnizo, C. & Lüddecke, H. (2005). Geographic variation in the advertisement call and genetic structure of the Andean frog *Colostethus palmatus*. *Herpetologica*, 61, 395–408. <https://doi.org/10.1655/04-87.1>
- Bernarde, P. S. (2007). Ambientes e temporada de vocalização da anurofauna no Município de Espigão do Oeste, Rondônia, Sudoeste da Amazônia: Brasil (Amphibia: Anura). *Biota Neotropica*, 7, 87-92. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000200010>
- Bioacoustics Research Program. (2014). Raven Pro: Interactive sound analysis software. Version 1.5. Ithaca, NY: Cornell Lab of Ornithology. Available from: <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Blair, W. F. (Ed.) (1972). *Evolution in the Genus Bufo*. University of Texas Press, Austin, TX.
- Blair, W.F. (1964). Isolating mechanisms and interspecies interactions in anuran amphibians. *The Quarterly Review of Biology*, 39, 334–344. <https://doi.org/10.1086/404324>
- Bolaños, F., Santos-Barrera, G., Solís, F., Ibáñez, R., Wilson, L. D., Savage, J., Lee, J., Rodrigues, M. T., Caramaschi, U., Mijares, A., and Hardy, J. (2008). *Dendropsophus microcephalus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. www.iucnredlist.org. Downloaded on 05 February 2023.
- Boul, K.E., Funk, W.C., Darst, C.R., Cannatella, D.C. & Ryan, M.J. (2007). Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 274, 399–406. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3736>
- Brenowitz E. A, Rose G.J. (1994). Behavioural plasticity mediates aggression in choruses of the Pacific treefrog. *Animal Behaviour*, 47: 633–641. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1086>
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Duellman W. E. (1967). Courtship isolating mechanisms in Costa Rican hyloid frogs. *Herpetologica* 23:169-183.

- Duellman, W. E. (1963). A new species of tree frog, genus *Phyllomedusa*, from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 11(1), 1-23.
- Duellman, W. E. (1997). Amphibians of La Escalera region, southeastern Venezuela: taxonomy, ecology, and biogeography. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16166>
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1966). Neotropical hylid frogs, genus *Smilisca*. USA: University of Kansas.
- Duellman, W. E. (1970). The hylid frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas (1): 1-753. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.2835>
- Duellman, W. E. (1982). A new species of small yellow *Hyla* from Peru (Anura: Hylidae). *Amphibia-Reptilia*, 3(2), 153-160. <https://doi.org/10.1163/156853882X00383>
- Duellman, W.E. (2001). *The Hylid Frogs of Middle America*. Ithaca, New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 1180 p.
- Duellman, W. E. and M. J. Fouquette. (1968). Middle American frogs of the *Hyla microcephala* Group. University of Kansas Publications. Museum of Natural History 17(12): 517-557. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.7137>
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 670 pp. <https://doi.org/10.56021/9780801847806>
- Duellman, W.E. (1963) Importance of breeding call in amphibian systematics. *Proceedings of the International Congress of Zoology*, 16, 106–110.
- 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. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>
- Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., and Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SR0TFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SR0TFF]2.0.CO;2)

- Faria, D.C. do C., Signorelli, L., de Moraes, A.R., Bastos, R.P. & Maciel, N.M. (2013). Geographic structure and acoustic variation in populations of *Scinax squalirostris* (A. Lutz, 1925) (Anura: Hylidae). *North-Western Journal of Zoology*, 9, 329–336.
- Forti, L.R., Costa, W.P., Martins, L.B., Nunes-de-Almeida, C.H.L. & Toledo, L.F. (2016) Advertisement call and genetic structure conservatism: good news for an endangered Neotropical frog. *PeerJ*, 4, e2014. <https://doi.org/10.7717/peerj.2014>
- Fouquet, A., Noonan, B.P., Blanc, M. and Orrico, V.G.D., (2011). Phylogenetic position of *Dendropsophus gaucheri* (Lescure and Marty 2000) highlights the need for an in-depth investigation of the phylogenetic relationships of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3035, 59–67. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3035.1.3>
- Fouquette, M. J. (1960). Isolating mechanisms in three sympatric treefrogs in the canal zone. *Evolution*, 14(4), 484 – 497. <https://doi.org/10.2307/2405997>
- Fouquette, M. J. (1968). Some frogs from the Venezuelan Llanos, and the status of *Hyla misera* Werner. *Herpetologica*, 24(4), 321 – 325.
- Frost, D.R. «*Dendropsophus*». *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.1. (ingles). Nueva York, EEUU: American museum of natural History. Consulted on June 6, 2023.
- Gambale, P.G., Signorelli, L. & Bastos, R.P. (2014). Individual variation in the advertisement calls of a Neotropical treefrog (*Scinax constrictus*). *Amphibia-Reptilia*, 3, 271–281. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002949>
- Gasser, H., Amézquita, A. & Hödl, W. (2009). Who is calling? Intraspecific call variation in the arboreal frog *Allobates femoralis*. *Ethology*, 115, 596–607. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01639.x>
- Gehara, M., Crawford, A. J., Orrico, V. G., Rodriguez, A., Lötters, S., Fouquet, A., Barrientos, L. S., Brusquetti, F., De la Riva, I., Ernst, R., Urrutia, G. G., Glaw, F., Guayasamin, J. M., Hölting, M., Jansen, M., Kok, P. J. R., Kwet, A., Lingnau, R., Lyra, M. L., Moravec, J., Pombal, J. P., Jr, Rojas-Runjaic, F., Schulze, A., Señaris, J. C., Sol e, M., Rodrigues, M. T., Twomey, E., Haddad, C. F. B., Vences, M. & Köhler, J. 2014. High levels of diversity uncovered in a widespread nominal

- taxon: continental phylogeography of the Neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. PloS one, 9(9), e103958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103958>
- Gerhardt H. C, Diekamp B, Ptacek M. (1989). Inter-male spacing in choruses of the spring peeper, *Pseudacris* (Hyla) *crucifer*. Animal Behaviour, 38: 1012–1024. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(89\)80140-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(89)80140-X)
- Gerhardt, H.C. & Huber, F. (2002). Acoustic Communication in Insects and Frogs: Common Problems and Diverse Solutions. University of Chicago Press, Chicago, 542 pp.
- Guimarães L.D, Bastos R. P. (2003). Vocalizações e interações acústicas em *Hyla raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. Iheringia, Série Zoologia 93(2): 149–158. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212003000200005>
- 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. <https://doi.org/10.2307/1565210>
- Hartmann, M. T., Hartmann, P. A., & Haddad, C. F. (2002). Advertisement calls of *Chiasmocleis carvalhoi*, *Chiasmocleis mehelyi*, and *Myersiella microps* (Microhylidae). Journal of herpetology, 509-511. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2002\)036\[0509:ACOCCC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2002)036[0509:ACOCCC]2.0.CO;2)
- Hothorn, T.; Bretz, F.; Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometrical Journal, 50(3):346-363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Izecksohn, E., & Carvalho-e-Silva, S. P. D. (2008). As espécies de *Gastrotheca* Fitzinger na Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia: Anura: Amphignathodontidae). Revista Brasileira de Zoologia, 25, 100-110. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752008000100014>
- Kassambara A, Mundt F. (2020). _factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses_. R package version 1.0.7, <<https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>>.
- Kwet, A. (2007). Bioacoustic variation in the genus *Adenomera* in southern Brazil, with revalidation of *Leptodactylus nanus* Müller, 1922 (Anura, Leptodactylidae).

Zoosystematics and evolution, 83(S1), 56-68.
<https://doi.org/10.1002/mmnz.200600027>

Kwet, A., & Solé, M. (2005). Validation of *Hylodes henselii* Peters, 1870, from Southern Brazil and description of acoustic variation in *Eleutherodactylus guentheri* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 39(4), 521-532.
<https://doi.org/10.1670/53-04A.1>

Köhler J., Jansen M., Rodriguez A., Kok P. J. R., Toledo L. F., Emmrich M., Glaw F., Haddad C. F. B., Rödel M. O. & Vences M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251 (1): 001–124. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>

Le S, Josse J, Husson F (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>

Lingnau, R. & Bastos, R.P. (2007). Vocalizations of the Brazilian Torrent Frog *Hylodes heyeri* (Anura: Hylodidae): repertoire and influence of temperature on advertisement call variation. *Journal of Natural History*, 41, 1227–1235.
<https://doi.org/10.1080/00222930701395626>

Littlejohn, M. J., & Michaud, T. C. (1959). Mating call discrimination by females of Strecker's chorus frog (*Pseudacris streckeri*). *Texas Journal of Science*, 11, 86-92.

Littlejohn, M.J. (1969). The systematic significance of isolating mechanisms. In: *Systematic Biology: Proceedings of an International Conference*. National Academy of Sciences, Washington D.C., pp. 459–482.

Llusia-Genique, D. (2013). Comunicación acústica en anuros ibéricos: influencia del clima, hábitat y ambiente sonoro. Tesis doctoral. Madrid, España.

Loftus-Hills, J.J. & Littlejohn, M.J. (1992). Reinforcement and reproductive character displacement in *Gastrophryne carolinensis* and *G. olivacea* (Anura: Microhylidae): a reexamination. *Evolution*, 46, 896–906.
<https://doi.org/10.2307/2409744>

Magrini, L., Facure, K.G., Giaretta, A.A., Silva, W.R. & Costa, R.C. (2010). Geographic call variation and further notes on habitat of *Ameerega flavopicta* (Anura,

- Dendrobatidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 45, 89–94.
<https://doi.org/10.1080/01650521.2010.494025>
- Martof, B. S., & Thompson Jr, E. F. (1958). Reproductive behavior of the chorus frog, *Pseudacris nigrita*. *Behaviour*, 243-258.
<https://doi.org/10.1163/156853957X00038>
- Mayer E. (1982). *The growth of biological thought: diversity, evolution and inheritance*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press. 992 pp. ISBN 9780674364462
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press. Reimpresión de Harvard University Press. ISBN 0-674-86250-3.
- Mayr, E. (1969). *Principles of Systematic Zoology*. McGraw-Hill, New York, 428 pp.
- Medeiros, L.R., Louren co, L.B., Rossa-Feres, D.C., Lima, A.P., Andrade, G.V., Giaretta, A.A., Egito, G.T. and Recco-Pimentel, S.M., (2013). Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. *BMC Genet.* 14, 1–18.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-59>
- Morais, A.R., Batista, V.G., Gambale, P.G., Signorelli, L. & Bastos, R.P. (2012). Acoustic communication in a Neotropical frog (*Dendropsophus minutus*): vocal repertoire, variability and individual discrimination. *Herpetological Journal*, 22, 249–257.
- Murphy C. G, Floyd S. B. (2005). The effect of call amplitude on male spacing in choruses of barking treefrogs, *Hyla gratiosa*. *Animal behaviour*, 69: 419–426.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.03.016>
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlenn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J. (2022). *_vegan: Community Ecology Package_*. R package version 2.6-4, <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.

- Orrico, V.G.D., Peloso, P.L.V., Suraro, M.J., Silva-Filho, H.F., Neckel-Oliveira, S., Gordo, M., Faivovich, J. & Haddad, C.F.B. (2014). A new bat-voiced species of *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 (Anura, Hylidae) from the Amazon basin, Brazil. *Zootaxa*, 3881 (4), 341–361. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3881.4.3>
- Orrico, V. G., Grant, T., Faivovich, J., Rivera-Correa, M., Rada, M. A., Lyra, M. L., Cassini, C. S., Valdujo, P. H., Schargel W. E., Machado, D. J., Wheeler W. C., Barrio-Amorós C., Loebmann D., Moravec J., Zina J., Solé M., Sturaro, M. J., Peloso, P. L. V., Suarez P. & Haddad, C. F. (2021). The phylogeny of Dendropsophini (Anura: Hylidae: Hylinae). *Cladistics*, 37(1), 73-105. <https://doi.org/10.1111/cla.12429>
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Pröhl, H. (2003). Variation in male calling behaviour and relation to male mating success in the strawberry poison frog (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 109, 273–290. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2003.00863.x>
- Pröhl, H., Hagemann, S., Karsh, J. & Höbel, G. (2007). Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 113, 1669–1679. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2007.01396.x>
- Pyron, R.A. and Wiens, J.J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 543–583. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.012>
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rosell JA, Olson ME, Weeks A, De-Nova JA, Medina LR, Pérez CJ, Feria TP, Bómez-Bermejo R, Montero JC, Eguiarte LE. (2010). Diversification in species complexes: Test of species origin and delimitation in the *Bursera simarouba* clade

- of tropical trees (Burseraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 798-811. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.004>
- Ryan, M.J. & Wilczynski, W. (1991). Evolution of intraspecific variation in the advertisement call of a cricket frog (*Acris crepitans*, Hylidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 44, 249–271. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00619.x>
- Ryan, M.J. (1988): Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. pp. 637–677. In: Frittsch, B., Ryan, M.J., Wilczynski, W., Walkowiak, W., Hetherington, T. (eds.), *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Sarkar, Deepayan. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York. ISBN 978-0-387-75968-5. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-75969-2>
- Savage, J. M. (2002). *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA and London.
- Schneider, H. (1977). Acoustic behavior and physiology of vocalization in the European tree frog, *Hyla arborea* (L.). *The reproductive biology of amphibians*, 295-335. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6781-0_9
- Searcy, W.A. and Nowicki, S. (2006). *The Evolution of Animal Communication: Reliability and Deception in Signaling Systems*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 288 pp.
- Simpson G. (2022). `_permute: Functions for Generating Restricted Permutations of Data_`. R package version 0.9-7, <<https://CRAN.R-project.org/package=permute>>.
- Snyder, W. F., & Jameson, D. L. (1965). Multivariate geographic variation of mating call in populations of the Pacific tree frog (*Hyla regilla*). *Copeia*, 129-142. <https://doi.org/10.2307/1440714>
- Sueur, J., Aubin, T., & Simonis, C. (2008). Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics*, 18(2), 213e226. <https://doi.org/10.1080/09524622.2008.9753600>

- Tárano, Z. (2010). Advertisement calls and calling habits of frogs from a flooded savanna of Venezuela. *South American Journal of Herpetology*, 5(3), 221-240. <https://doi.org/10.2994/057.005.0308>
- Teixeira, B. F. D. V. (2018). Caracterização acústica de populações e espécies de *Dendropsophus* do grupo *D. microcephalus* (Anura, Hylidae): implicações taxonômicas e distribucionais (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Toledo, L.F. & Haddad, C.F.B. (2009). Defensive vocalizations of Neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology*, 4, 25–42. <https://doi.org/10.2994/057.004.0104>
- Vaz-Silva, W., & Maciel, N. M. (2011). A new cryptic species of *Ameerega* (Anura: Dendrobatidae) from Brazilian Cerrado. *Zootaxa*, 2826(1), 57-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2826.1.3>
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, 1148 pp. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226893334.001.0001>
- Wells, K.D. & Schwartz, J.J. (2007). The behavioral ecology of anuran communication. In: Narins, P.M. & Feng, A.S. (Eds.), *Hearing and sound communication in amphibians*. Springer Verlag, New York, pp. 44–86. https://doi.org/10.1007/978-0-387-47796-1_3
- Wells, K.D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, 666–693. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(77\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90118-X)
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wilczynski W, Brenowitz E. A (1988). Acoustic cues mediate inter-male spacing in a neotropical frog. *Animal Behaviour*, 36: 1054–1063. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80065-4)

8. Anexos

Anexo 1. Cantos de anúncios das linhagens de *D. microcephalus* analisados, país de registro, localidades, coleções em que os registros foram depositados e o número de catálogo, autor do registro e o ano de coleta.

Linhagens	País	Localidade	Coleções – No de catálogo	Autor	Ano de coleta
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	Gamboa	MALI_0183790	H C Gerhardt	1978
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	Palmar Sur	MALI_0193611	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193612	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193613	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193614	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193615	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	1,6 km WNW of Villa Neily	MALI_0193616	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193618	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Costa Rica	-	MALI_0193619	William E. Duellman	1961
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	3,0 km W of Chepo	MALI_0193626	William E. Duellman	1963
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	Panamá Canal Zone; Road K-2, 7,8 miles from K-55 junction	MALI_0208450	Texas Natural History Collections	1956
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	Panamá Canal Zone; K-2, 4,7 miles from K-55	MALI_0208476	Texas Natural History Collections	1956
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	Panamá Canal Zone; K-2, 4,7 miles from K-55	MALI_0208477	Texas Natural History Collections	1956
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	Panamá Canal Zone; Road K-2, 6,5 miles from K-55	MALI_0208484	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208485	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208489	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208490	Texas Natural History Collections	1958

<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208491	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208492	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208494	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0208498	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209000	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209001	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209002	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209003	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209004	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209005	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209006	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209011	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209016	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209017	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209018	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209019	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209020	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209021	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209022	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209023	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209024	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209025	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Panamá	-	MALI_0209026	Texas Natural History Collections	1958
<i>D. m. microcephalus</i>	Colombia	Caldas	EARB_0000001	Edgar Andres Restrepo Bermudez	2014
<i>D. m. misera</i>	Venezuela	Fazenda Cucuchica - Tovar-ME	FNJV_0007688	Nancy Sierre	1995
<i>D. m. misera</i>	Venezuela	-	FNJV_0007689	Nancy Sierre	1995
<i>D. m. misera</i>	Venezuela	-	FNJV_0007690	Nancy Sierre	1995

<i>D. m. misera</i>	Venezuela	Rio Dorada, Usina Hidrelétrica Uribante-Caparo, 650 m	FNJV_0030764	Adão José Cardoso	1990
<i>D. m. misera</i>	Venezuela	6 km antes do Hato Fernando Corrales da UNELLEZ	FNJV_0030766	Adão José Cardoso	1990
<i>D. m. misera</i>	Venezuela	Cerca de 2 km do aeroporto em direção ao Canal Colon	FNJV_0030767	Adão José Cardoso	1990
<i>D. m. misera</i>	Brazil	Alojamento do Juruá da Usina Kararahô, próximo à sonda	FNJV_0030768	Adão José Cardoso	1986
<i>D. m. misera</i>	Brazil	Lagoa Embrapa	FNJV_0031717	Marcio R. Martins	1986
<i>D. m. misera</i>	Brazil	Estrada do Cantá	FNJV_0031721	Marcio R. Martins	1986
<i>D. m. misera</i>	Brazil	-	FNJV_0031723	Marcio R. Martins	1986
<i>D. m. misera</i>	Brazil	Tepequém	MALI_0196974	W. Ronald Heyer	1993
<i>D. m. misera</i>	Brazil	-	MALI_0203591	W. Ronald Heyer	1993
<i>D. m. misera</i>	Brazil	Colonia Apiiau	MALI_0204217	Ronald I. Crombie	1988
<i>D. m. misera</i>	Trinidad and Tobago	St, Patrick; Bonasse on southern main road	MALI_0204284	Ronald I. Crombie	1991
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	Próximo à cidade	FNJV_0030787	Adão José Cardoso	1989
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	Estação Florestal de Experimentação	FNJV_0032717	Rogério Pereira Bastos	1995
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	Brejo do Lixão	FNJV_0032730	Rogério Pereira Bastos	1996
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	Espigão d'Oeste	AAGm_0000002	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	-	AAGm_0000003	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	-	AAGm_0000004	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	-	AAGm_0000005	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	-	AAGm_0000006	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. ssp</i>	Brazil	-	AAGm_0000007	Ariovaldo A. Giaretta	2017
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	Nahá	FONM_0000001	FONM	2010
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	Laguna Victorino	IXCHEL_STE0021	Eduardo Boza	2013
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	Laguna	IXCHEL_STE0054	Eduardo Boza	2013
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	-	IXCHEL_STE0055	Eduardo Boza	2013

<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	-	IXCHEL_STE0056	Eduardo Boza	2013
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	3,0 km SW of Santo Tomás	MALI_0193605	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	-	MALI_0193606	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	-	MALI_0193607	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	Hacienda La Cumplida	MALI_0193608	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	-	MALI_0193609	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Nicaragua	-	MALI_0193610	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	10,0 km NW of Esparta	MALI_0193622	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	-	MALI_0193623	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	16,0 km SSE of Las Cañas	MALI_0193624	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	-	MALI_0193625	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Guatemala	Toocog	MALI_0193627	William E. Duellman	1960
<i>D. m. underwoodi</i>	Guatemala	-	MALI_0193628	William E. Duellman	1960
<i>D. m. underwoodi</i>	Guatemala	-	MALI_0193629	William E. Duellman	1960
<i>D. m. underwoodi</i>	Honduras	Lago de Yojoa	MALI_0193630	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Honduras	-	MALI_0193631	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Honduras	-	MALI_0193632	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Honduras	-	MALI_0193633	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Honduras	-	MALI_0193634	William E. Duellman	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Guatemala	28,3 km N of Campur	MALI_0193637	Jerome B. Tulecke	1961
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0193993	William E. Duellman	1964
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0193994	William E. Duellman	1964
<i>D. m. underwoodi</i>	Costa Rica	10,0 km ENE of Esparta	MALI_0194004	Charles J. Cole	1964
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210718	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	3,7 km NE of Minititlan	MALI_0210719	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	111,0 km S of Acayucan; Highway 185	MALI_0210724	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210728	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210731	Texas Natural History Collections	1959

<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210733	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210736	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210741	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210743	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210744	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210745	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210746	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210748	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0210749	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218071	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218072	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218078	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218080	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218081	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218082	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218083	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218084	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218085	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218086	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218087	Texas Natural History Collections	1959
<i>D. m. underwoodi</i>	Mexico	-	MALI_0218088	Texas Natural History Collections	1959

D. = *Dendropsophus*, *m.* = *microcephalus*. MALI = Macaulay Library, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, U.S.A. (<https://www.macaulaylibrary.org/>); FNJV = Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard, São Paulo, Brasil (<https://www2.ib.unicamp.br/fnjv/>); FONM = Fonoteca de Anfíbios, Facultad de ciencias-UNAM (<http://cantosanuros.fcencias.unam.mx/>); IXCHEL= Grupo de investigación y formación; AAGm= Ariovaldo A. Giaretta; EARB = Edgar Andres Restrepo Bermude.