

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Posição taxonômica de populações de *Scinax* Wagler, 1830 (Anura,
Hylidae) relacionadas à *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925) de Uberlândia:
avaliações morfométricas e acústicas**

André Gomes Lopes

Uberlândia

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Posição taxonômica de populações de *Scinax* Wagler, 1830 (Anura,
Hylidae) relacionadas à *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925) de Uberlândia:
avaliações morfométricas e acústicas**

André Gomes Lopes

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

Orientador: Dr. Ariovaldo Antonio Giaretta

Co-orientador: Msc. Davi Lee Bang

Uberlândia

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Posição taxonômica de populações de *Scinax* Wagler, 1830 (Anura,
Hylidae) relacionadas à *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925) de Uberlândia:
avaliações morfométricas e acústicas**

André Gomes Lopes

Aprovado pela banca examinadora em / /

Dra. Katia Gomes Facure Giaretta

Msc. Davi Lee Bang

Msc. Izadora Costa Vidigal de Freitas

Taxonomy, the scientific process by which natural groups are identified, described, named, and classified is an exciting research pursuit, not only because it makes an indispensable contribution to biodiversity science but, at a more basic level, because it satisfies the human enjoyment of discovery. (Kaiser et al., 2013, p.8)

AVISO DE RESPONSABILIDADE NOMENCLATORIAL

A alteração taxonômica apresentada neste documento, especificamente a revalidação de um táxon, é rejeitada como ato nomenclatural e não estão disponíveis, de acordo com o Artigo 8.3 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.

NOMENCLATORIAL DISCLAIMER

The taxonomic change presented herein, specifically the revalidation of a taxon, is disclaimed as nomenclatural act and is not available, in accordance with Article 8.3 of the International Code of Zoological Nomenclature.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, Sidney Gomes Lopes, por todo o suporte fornecido durante a minha graduação, além do apoio constante à minha pesquisa no Laboratório.

Ao meu orientador Dr. Arioaldo Antonio Giaretta, que me iniciou no meio científico e sempre me influenciou positivamente a produzir com qualidade. Dentre as inúmeras coisas que aprendi com ele, pude adquirir um maior senso crítico no âmbito da ciência, aprendi a redigir com maior clareza e objetividade, e também a ser mais metódico em relação às minhas análises, buscando sempre maior precisão. Agradeço pela sua disponibilidade em realizar chamadas pelo *TeamViewer* para discutirmos questões importantes. Sou grato também pelas inestimáveis oportunidades concebidas, as quais com certeza foram e serão fundamentais para o meu crescimento no meio acadêmico.

Ao meu co-orientador Msc. Davi Lee Bang por todo o apoio fornecido durante o desenvolvimento do presente trabalho, e em outros trabalhos externos também. Com ele aprendi bastante de bioacústica, sobre redações de textos científicos, além de ter me influenciado a ser mais questionador quanto aos resultados de análises. Sou grato também pelas inúmeras discussões que tivemos, muitas vezes que por mensagens, e que com certeza foram muito úteis em cada momento. Reconheço também a sua pronta disponibilidade em comparecer para presidir a presente banca, sendo de enorme ajuda.

Agradeço também à Dra. Katia Gomes Facure Giaretta e à Msc. Izadora Costa Vidigal de Freitas, uma vez que ambas receberam cortesmente o meu convite para compor a banca de defesa e de prontidão o aceitaram, sendo de enorme ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por me fornecer uma bolsa de Iniciação Científica durante todo o ano de desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) por fornecer suporte financeiro que foi necessário para a realização de trabalhos de campo.

Agradeço também ao Laboratório de Ornitologia da Universidade de Cornell (*Cornell Lab of Ornithology*) em Ithaca (NY), por fornecer uma licença grátis para o uso do *software* Raven Pro 1.5, o qual foi essencial para a realização das análises acústicas.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela concessão das licenças de coleta (#30059-8; #30059-12) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

Agradeço aos seguintes colegas (e ex-colegas) de Laboratório pela contribuição com coletas e/ou gravações de espécimes: A.A. Giaretta, D.L. Bang, I. Vidigal, T.R. de Carvalho, P. Marinho, B.F.V. Teixeira, A. Carrijo, M.N.C. Kokubum, C.S. Bernardes, F.S. Andrade, e I.A. Haga.

Posição taxonômica de populações de *Scinax* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) relacionadas à *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925) de Uberlândia: avaliações morfométricas e acústicas

Resumo

Scinax fuscomarginatus é uma espécie amplamente distribuída no Brasil e que acreditava-se representar um complexo de espécies, devido a variações morfológicas apresentadas. Em contraponto, uma recente revisão taxonômica baseada em morfologia, bioacústica e genética, desestrutura essa ideia de complexo de espécies e designa quatro nomes como sinônimos de *S. fuscomarginatus*, dentre esses *S. pusillus*, espécie descrita recentemente e endêmica do Cerrado. Em trabalhos de campo no município de Uberlândia (MG) verificamos a ocorrência sintópica de duas populações relacionadas à *S. fuscomarginatus*, morfológicamente semelhantes porém com canto de anúncio distinto, destacando assim a ideia de que *S. pusillus* possa representar uma espécie válida. Portanto o estudo aqui apresentado objetiva esclarecer a real identidade taxonômica dessas duas populações, a partir de análises acústicas e morfométricas de dados provenientes do município de Uberlândia e de Rio Verde (GO) (localidade tipo de *S. pusillus*). Os resultados das análises mostraram que diferenças morfométricas e acústicas encontradas entre os dois morfótipos são suficientes para suportar a revalidação de *S. pusillus*. Caracteres acústicos como período de pulso, taxa de pulso, frequência mínima e frequência máxima, e também caracteres morfométricos como largura da cabeça, comprimento da mão e comprimento rostro-cloacal, foram importantes na discriminação das espécies.

Palavras-chave: Anura. Bioacústica. Biodiversidade. Cerrado. Taxonomia.

Taxonomic position of populations of *Scinax* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) related to *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925) from Uberlândia: morphometric and acoustic evaluations

Abstract

Scinax fuscomarginatus is a widely distributed species in Brazil, which was believed to represent a species complex, due its substantial morphological variation. Otherwise, a recent taxonomic change based in morphology, bioacoustics and mainly genetics, discards this species complex idea, and synonymizes four species with *S. fuscomarginatus*, including *S. pusillus*, a recently described species and endemics of the Brazilian Cerrado. In fieldworks in the municipality of Uberlândia (MG), we verified the syntonic occurrence of two populations closely related to *S. fuscomarginatus*, morphologically similar but with distinct advertisement calls, highlighting the idea that *S. pusillus* may represent a valid species. Therefore, the study herein presented aims to clarify the real taxonomic identity of these two populations, based on acoustic and morphometric analysis of data from municipalities of Uberlândia and Rio Verde (GO) (type locality of *S. pusillus*). The results of the analysis show that morphometric and acoustic differences detected between the two morphotypes are sufficient to support the revalidation of *S. pusillus*. Acoustic features such as pulse period, pulse rate, minimum and maximum frequency, and also morphometric traits such as head width, hand length and snout-vent length, were important in species discrimination.

Key-words: Anura. Bioacoustics. Biodiversity. Brazilian Cerrado. Taxonomy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1	Análises acústicas	12
2.2	Análises morfométricas	15
2.3	Análises estatísticas	18
3	RESULTADOS	18
3.1	Dados acústicos	18
3.2	Dados morfométricos	26
3.3	Comparações estatísticas	28
4	DISCUSSÃO	34
5	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICE A – BASE DE DADOS ACÚSTICOS UTILIZADA	41
	APÊNDICE B – LISTA DE ESPÉCIMES EXAMINADOS	43

INTRODUÇÃO

A taxonomia é a área da biologia pela qual os grupos são identificados, descritos, nomeados e classificados (KAISER et al., 2013), sendo portanto a base para a formalização da biodiversidade. A taxonomia baseada somente em caracteres morfológicos pode ser limitada na identificação de espécies pois podem existir espécies morfológicamente crípticas (BICKFORD et al., 2007), o que aponta para a necessidade de uma abordagem integrativa, a qual envolve o uso de diferentes conjuntos de dados, como morfométricos, acústicos, comportamentais e moleculares (KAISER et al., 2013).

De modo geral, a vocalização consiste em sons que são produzidos através do sistema respiratório de um vertebrado, usualmente por meio da ação das cordas vocais (KÖHLER et al., 2017). Em Anura (Lissamphibia) a vocalização é o modo primário de comunicação, sendo o canto de anúncio o principal tipo, o qual tem como funções básicas: *i*) atração de fêmeas coespecíficas (BLAIR, 1958; DUELLMAN; TRUEB, 1986), exercendo assim um papel no isolamento reprodutivo entre espécies (WELLS, 2007), e *ii*) manutenção do espaço entre machos que estão vocalizando (NARINS et al., 2007). Dada essas especificidades, o canto de anúncio tem sido amplamente utilizado em delimitações taxonômicas (KÖHLER et al., 2017), ajudando a revelar diversidades crípticas dentro de diferentes grupos (CARVALHO et al., 2012; CARVALHO; GIARETTA, 2013; CAMINER; RON, 2014).

O gênero *Scinax* Wagler, 1830 consiste atualmente de cerca de 73 espécies distribuídas desde o leste e sul do México até a Argentina e Uruguai, e em algumas ilhas do Caribe (FROST, 2017). As espécies de *Scinax* possuem histórico taxonômico complexo (FAIVOVICH et al., 2002), devido seu conservatismo morfológico, alta diversidade (FERRÃO et al., 2016; FOUQUET et al., 2007) e confusões causadas pela não especificação de espécimes-tipo no século 19 (DUELLMAN; WIENS, 1992). As espécies do antigo grupo de *Hyla rubra* (atualmente *Scinax*) foram transferidas para o gênero *Oloolygon* Fitzinger, 1843 com base na morfologia do espermatozoide (FOUQUETTE; DELAHOUSSE, 1977). Posteriormente, Almeida e Cardoso (1985) consideraram que esses caracteres eram substancialmente variáveis, questionando assim esse uso da morfologia do espermatozoide na sistemática do grupo. Visto que *Hyla aurata* Wied, 1821 (espécie-tipo de *Scinax*) apresentava prioridade sobre *Hyla strigilata* Spix, 1824 (espécie-tipo de *Oloolygon*) (DUELLMAN; WIENS, 1992; POMBAL; GORDO, 1991), o gênero *Scinax* foi reconhecido como tendo prioridade sobre *Oloolygon* por Duellman e Wiens (1992).

Estudos posteriores utilizando morfologia (FAIVOVICH, 2002) e dados moleculares (FAIVOVICH et al. 2005) corroboraram o monofiletismo de *Scinax* com base em *i*) genes nucleares, mitocondriais e ribossômicos, *ii*) padrão de membrana entre os artelhos e *iii*)

miologia (FAIVOVICH, 2002; FAIVOVICH et al. 2005). Até uma recente revisão com base em dados moleculares (DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016), *Scinax* era composto por dois grandes clados, o de *S. ruber* e o de *S. catharinae*. No entanto, o gênero *Oloolygon* foi ressuscitado por Duellman, Marion e Hedges (2016) para abrigar as espécies do antigo clado de *S. catharinae*, enquanto que as espécies do grupo de *S. uruguayus*, anteriormente inseridas no clado de *S. ruber*, foram alocadas em *Julianus* Duellman, Marion e Hedges, 2016. Entretanto, alguns autores discordam dessas mudanças e argumentam que as mesmas foram realizadas sob critérios pouco discutidos, sendo desnecessárias para a manutenção do arranjo monofilético já existente (ver LOURENÇO et al., 2019). Portanto, atualmente para o gênero *Scinax* não se reconhece clados ou grupos, sendo que o gênero atualmente é composto essencialmente pelas espécies do antigo clado de *S. ruber*.

Scinax fuscomarginatus (Lutz, 1925) é uma espécie tida como amplamente distribuída no Brasil (BRUSQUETTI et al. 2014) pertencente ao antigo grupo de *S. staufferi* (*sensu* DUELLMAN; WIENS, 1992). Cardoso e Pombal (2010) ressaltam que *S. fuscomarginatus* pode apresentar variações quanto ao formato do rosto, tamanho do saco vocal e o tamanho dos tubérculos metatarsais, sugerindo assim que *S. fuscomarginatus* represente um complexo de espécies. No entanto, Brusquetti et al. (2014) conduziram uma extensa revisão taxonômica de *S. fuscomarginatus* e espécies relacionadas, concluindo que essas espécies não representavam um complexo, mas sim uma única espécie amplamente distribuída com consideráveis variações morfológicas. Na revisão de Brusquetti et al. (2014) foram sinonimizadas com *S. fuscomarginatus*: *Scinax parkeri*, *S. trilineatus*, *S. lutzorum* e *S. pusillus*. No mesmo trabalho esses autores reconheceram como válida *S. madeirae* (antes sinônimo de *S. fuscomarginatus*) e ainda descreveram *S. villasboasi*, ambas amazônicas. A revisão de Brusquetti et al. (2014) foi conduzida com base em dados morfológicos, moleculares e acústicos, porém com poucos detalhes e breves comparações ao reportar o canto de *S. fuscomarginatus* e das espécies relacionadas. Haja visto que, apesar de até certo ponto estereotipados (*i.e.* estruturalmente semelhantes) ao longo da distribuição da espécie nominal, os cantos podem apresentar diferenças (e.g. taxa de repetição de pulsos) que até agora são assumidas como variações (BRUSQUETTI et al., 2014).

Em termos distribucionais, para o Brasil Central (Cerrado) reconhece-se apenas a presença de *Scinax fuscomarginatus*, porém em trabalhos de campo em Uberlândia (MG) constatamos a co-ocorrência de dois morfótipos associados a dois tipos de cantos de anúncio, indicando assim que duas espécies ocorrem em sintopia no Bioma Cerrado, contrariando a literatura. Partindo do pressuposto da existência de mais de uma espécie na região, ou seja, que realmente há uma população relacionada à *S. fuscomarginatus* que não represente a espécie

nominal, retomamos a ideia de que uma das espécies sinonimizadas por Brusquetti et al. (2014) possa de fato representar uma espécie válida, especificamente *S. pusillus*, espécie com registros para o estado de Goiás e uma localidade do Mato Grosso (MELO et al., 2014; POMBAL et al., 2011).

Dado isso, através da combinação de dados acústicos e morfométricos, buscamos no presente trabalho esclarecer a posição taxonômica das duas populações de Uberlândia relacionadas à *Scinax fuscomarginatus*

MATERIAL E MÉTODOS

Análises acústicas

Para as comparações acústicas consideramos gravações de cantos de anúncio feitas especificamente para este projeto, e dados da base de cantos da Coleção de Anuros da Universidade Federal de Uberlândia. Consideramos dados de 46 indivíduos e analisamos 467 cantos; 29 machos (277 cantos) de Uberlândia (MG), 15 (171 cantos) de Rio Verde (GO), 1 (9 cantos) de Caiapônia (GO) e 1 (10 cantos) de Ituiutaba (MG). Detalhes de hora, data e temperatura das gravações estão dispostos no Apêndice A.

Os cantos foram gravados com equipamentos digitais (Marantz PMD661; PMD671, ajustados para 44,100 Hz e resolução de 16 bits) acoplados a microfones direcionais (Sennheiser K6/ME67 e ME66). As gravações (Apêndice A) estão depositadas na coleção sonora da Coleção de Anuros da Universidade Federal de Uberlândia (AAG-UFU). Analisamos os cantos utilizando o software Raven Pro 1.5 (Bioacoustics Research Program, 2014), ajustado para as seguintes configurações: tipo de janela = Hann; *overlap* = 89,8 (locked); tamanho de janela: 256 pontos de resolução (FFT); brilho = 60%; contraste = 70%; tamanho do DFT: 1024 pontos de resolução (locked); espaçamento de grade (resolução espectral) = 43.1 Hz. Medidas temporais foram medidas nos oscilogramas e as espectrais nos espectrogramas. A frequência dominante foi medida através da função “Peak Frequency”, e os valores de frequência mínima (5%) e frequência máxima (95%) foram obtidos automaticamente pelo programa através das funções “Frequency 5% (Hz)” e “Frequency 95% (Hz)”, respectivamente. O instante de amplitude máxima do canto, utilizado para o cálculo do valor da variável *call rise time*, foi obtido através da função “Peak time (s)”. Aplicamos um filtro de 500 Hz previamente às análises com o objetivo de reduzir ruídos de fundo como vento. Geramos figuras de aspectos dos cantos usando o pacote seewave v. 1.7.6 (SUEUR; AUBIN; SIMONIS, 2008) da plataforma R versão 3.5.2 (R Development Team, 2018). As variáveis acústicas consideradas estão caracterizadas na Tabela 1. Dividimos as amostras em quatro grupos: *S. fuscomarginatus* e *S. cf. pusillus* de Uberlândia (populações foco principal/inicial do estudo); *S. pusillus* de Rio

Verde (população topotípica da espécie problema/sinonimizada); *S. fuscomarginatus* de várias localidades (Ituiutaba (MG), Rio Verde (GO) e Caiapônia (GO)). Compilamos dados acústicos da descrição original de *S. pusillus* (POMBAL et al., 2011) para fins de comparação. Para cada variável acústica calculamos médias para cada indivíduo, e então a média geral para a espécie foi calculada com base nesses valores; valores de desvio padrão, máximo e mínimo foram calculados com base nos valores da amostra total.

Dada a modulação de amplitude incompleta (i.e. sem intervalo de silêncio) entre pulsos, medimos apenas o período de pulso (definição na Tabela 1) ao invés da duração deles (ver Marinho et al. (2018)). A “taxa de emissão de pulsos” (ver Tabela 1) foi obtida considerando os pulsos compreendidos em um intervalo de 100 ms na porção central de cada canto.

Tabela 1. Variáveis acústicas utilizadas nas análises dos cantos de anúncios. Terminologias e definições baseadas essencialmente em Bang et al. (2017) e Marinho et al. (2018). Abreviações: s = segundos; Hz = hertz.

Variável bioacústica	Definição
Duração do canto (s)	Tempo compreendido entre o início e o fim de um canto (= uma única nota); canto definido como sendo um som produzido durante um único ciclo de expiração.
Período de pulso (s)	Tempo compreendido entre o início de um pulso até o início do próximo pulso.
<i>Call rise time</i> (%)	Tempo compreendido entre o início de um canto até o ponto em que atinge a sua amplitude máxima, dado em uma porcentagem em relação à duração total do canto
Frequência dominante (Hz)	Pico com a maior energia sonora do canto.
Frequência mínima (Hz)	Menor frequência do canto.
Frequência máxima (Hz)	Maior frequência do canto.
Taxa de emissão de pulso (pulsos/s)	$(\text{Número total de pulsos} - 1) / \text{tempo de início do primeiro pulso até o início do último pulso}$.
Taxa de emissão de canto (cantos/min)	$(\text{Número total de cantos} - 1) / \text{tempo de início do primeiro canto até o início do último canto}$.
Intervalo entre cantos (s)	Tempo decorrido entre o fim de um canto e o início do próximo canto.

Análises morfométricas

Nas análises morfométricas consideramos 67 machos adultos (Figura 1) provenientes das seguintes localidades: Uberlândia (MG), Rio Verde (GO), Ituiutaba (MG), Caiapônia (GO), Cuiabá (MT), Alto Paraíso (GO), Pontal do Araguaia (MT), Costa Marques (RO), Guarapes (SP), São Romão (MG) e Nova Ubatã (MT). Medimos de cada indivíduo 15 caracteres de morfologia externa conforme Watters et al., (2016). As variáveis morfométricas utilizadas e suas respectivas definições estão sumarizadas na Tabela 2. O comprimento rostro-cloacal, comprimento da coxa e comprimento da tíbia foram medidos com um paquímetro digital Mitutoyo, as demais medidas foram tomadas sob estereomicroscópio Zeiss Stemi 305 com ocular micrométrica. Dividimos as amostras em quatro grupos: *Scinax fuscomarginatus* e *S. cf. pusillus* de Uberlândia (populações foco principal/inicial do estudo); *S. pusillus* de Rio Verde (população topotípica da espécie problema/sinonimizada); *S. fuscomarginatus* de várias localidades (Ituiutaba (MG), Rio Verde (GO) e Caiapônia (GO), Cuiabá (MT), Alto Paraíso (GO), Pontal do Araguaia (MT), Costa Marques (RO), Guarapes (SP), São Romão (MG) e Nova Ubatã (MT)). Compilamos dados morfométricos da descrição original de *S. pusillus* (POMBAL et al., 2011) para fins de comparação.

Os indivíduos utilizados no estudo (Apêndice B) estão depositados na Coleção de Anuros do Museu de Biodiversidade do Cerrado (AAG-UFU) da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. As coletas foram realizadas com as permissões do ICMBio/SISBIO (#30059–8); (#30059-12).



Figura 1. Espécimes machos adultos em vida: (Acima) *Scinax fuscomarginatus* de Uberlândia-MG (Scinax_fuscomUberlandiaMG3aAAGmt); (Meio) *S. pusillus* de Rio Verde-GO (Scinax_pusillusRioVerdeGO3aAGL_AAGm671); (Abaixo) *S. pusillus* de Uberlândia-MG (Scinax_pusillusUberlandiaMG1aAAGb). Acima e abaixo: fotos de A. A. Giaretta. Meio: foto de D. L. Bang.

Tabela 2. Variáveis morfométricas utilizadas para caracterizar os espécimes. Terminologias e definições baseadas em Watters et al. (2016).

Variável	Definição
Comprimento rostro-cloacal	Comprimento em linha reta desde a ponta do rostro à extremidade posterior da cloaca.
Largura da cabeça	Medida da largura da cabeça a partir do ponto mais largo (ângulo mandibular).
Comprimento da cabeça	Medida do comprimento da cabeça a partir da parte posterior do ângulo mandibular até a ponta do rostro.
Comprimento da tíbia	Distância da superfície externa do joelho flexionado à inflexão tibiotarsal/do calcanhar.
Comprimento da coxa	Distância da cloaca até o joelho.
Comprimento do pé	Medida do comprimento do pé a partir da base do tubérculo metatarsal interno à ponta do artelho IV.
Comprimento da mão	Distância entre a base do tubérculo palmar externo à ponta do artelho IV.
Diâmetro do olho	Distância horizontal que vai desde a extremidade posterior até a extremidade anterior do olho.
Diâmetro do tímpano	Distância que consiste na maior largura horizontal do tímpano.
Distância interorbital	A menor distância entre as extremidades anteriores das duas órbitas.
Distância entre as narinas	A menor distância entre as margens internas das narinas.
Distância olho-narina	Distância da extremidade anterior do olho até a margem posterior da narina.
Distância narina-rostro	Distância do centro externo da narina até a ponta do rostro.
Largura do disco do IV dedo do pé	Maior distância horizontal entre as extremidades do disco do IV dedo do pé.
Largura do disco do III dedo da mão	Maior distancia horizontal entre as extremidades do disco do III dedo da mão.

Análises estatísticas

Eventuais discriminações com base em caracteres morfométricos e acústicos entre os grupos considerados, foram buscadas pela aplicação de duas funções de análises discriminantes: “randomforest” (pacote randomForest (LIAW; WIENER, 2002)) e “dapc” (adegenet (JOMBART, 2008; JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010; JOMBART; COLLINS, 2015), ambos pacotes da plataforma R (3.5.2, versão 64-bits) (R Development Team, 2018). As análises do *randomForest* (não-paramétricas) geram muitas (*e.g.* 500) árvores classificatórias usando reamostragens da base de dados e então geram classificadores e agregam os resultados por voto em classes (BREIMAN, 2001). A função dapc (Análise Discriminante sobre Componentes Principais) identifica e descreve agrupamentos (JOMBART; COLLINS, 2015). As variáveis indicadas como importantes nas análises discriminantes foram testadas quanto a significância estatística das diferenças através do lmp usando o pacote “lmPerm” no R. Diferenças entre populações e temperatura do ar também foram testadas por lmp.

RESULTADOS

Dados acústicos

Os cantos dos indivíduos de todas as populações audivelmente se assemelham a um zumbido, tendo amplitude ascendente na porção inicial e descendente a partir do terço final do canto. Os valores obtidos para as variáveis acústicas das diferentes populações estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores das variáveis acústicas do canto de anúncio das diferentes populações de *Scinax fuscomarginatus*. Média±desvio padrão (mínimo–máximo). N = número de indivíduos gravados/número de cantos analisados.

	<i>S. fuscomarginatus</i> localidades* (N = 5/52)	<i>S. fuscomarginatus</i> Uberlândia (N = 14/136)	<i>S. cf. pusillus</i> Uberlândia (N = 15/141)	<i>S. cf. pusillus</i> Rio Verde (N = 138)	<i>S. pusillus</i> Pombal et al. (2011) (N = 15)
Duração do canto (s)	0,51±0,08 (0,32–0,62)	0,55±0,06 (0,36–0,69)	0,74±0,071 (0,52–0,85)	0,54±0,05 (0,42–0,7)	0,54±0,05 (0,37–0,70)
Período de pulso (s)	0,005±0 (0,005–0,006)	0,006±0,001 (0,005–0,007)	0,008±0,001 (0,007–0,010)	0,008±0,000 (0,007–0,008)	8,8±0 (2–13)
<i>Call rise time</i> (%)	60,3±7,1 (40,6–78,8)	59,0±10,0 (33,2–79,6)	59,9±11,2 (23,6–83,7)	60,9±12,4 (17,6–84,3)	-
Frequência dom. (Hz)	3770±645 (3230–4781)	3955±227 (3281–4500)	5059±251 (4479–5513)	4956±309 (4350–5469)	4837±384 (2517–5975)
Frequência mín. (Hz)	2860±96 (2713–3000)	3248±214 (2756–3618)	4324±218 (3876–4737)	4051±256 (3488–4522)	3031±450 (1808–3789)
Frequência máx.(Hz)	4606±408 (4177–5063)	4711±309 (3747–5168)	6166±157 (5814–6503)	5987±369 (5082–6546)	6981±536 (6115–9646)
Taxa de pulsos (pulsos/s)	181,5±4,5 (178,9–193,9)	172,0±11,3 (154,6–193,9)	119,6±4,9 (111,1–132,7)	127,7±3,1 (120,9–138,3)	-
Taxa de canto (cantos/min)	15,3±7,0 (6,8–22,4)	15,5±6,6 (8,6–33)	30,4±7,1 (20,6–47,5)	48,5±16,6 (48–62)	15,91±4,97 (5–24)
Intervalo entre cantos (s)	5,71±11,09 (0,36–68,20)	3,80±3,09 (0,52–25,38)	1,36±1,35 (0,45–8,00)	1,49±5,14 (0,38–41,22)	-
Temperatura do ar	24,4 °C (22–25,6°C)	23,6 °C (21–27,9°C)	22,4 °C (21–25°C)	24,4 °C (22–25,6°C)	19,5–25,5°C
Temperatura da água	26,6 °C (24–27,7°C)	26,5 °C (25–27,6°C)	25,8 °C (23–30°C)	27,2 °C (27,7–27,7°C)	-

*Localidades: Caiapônia - GO, Ituiutaba - MG; Rio Verde – GO. Há diferença significativa em temperatura entre nossas amostras de *S. pusillus* e *S. cf. pusillus* (F = 15, gl = 1; 24, p < 0,001).

No geral, o canto de anúncio dos machos das populações estudadas possui apenas uma banda de frequência enfatizada (Figura 2). Como exceção, alguns machos de *Scinax fuscomarginatus* de Rio Verde apresentaram duas bandas de frequência com quantidades comparáveis de energia (Figura 3), com a frequência dominante alternando-se entre elas ao longo das emissões dos cantos. O canto de anúncio de *S. fuscomarginatus* (Figura 2, 3) consiste em uma única nota multipulsada com duração de 0,32–0,69 s, sendo emitido a uma taxa de 6,8–33 cantos/min. O período de pulso dura de 0,005–0,007 s, e os pulsos são emitidos a uma taxa de 154,6–193,9/s. O canto tem frequência dominante de 3230–4781 Hz, enquanto que sua frequência mínima é de 2713–3618 Hz e sua frequência máxima de 3747–5168 Hz.

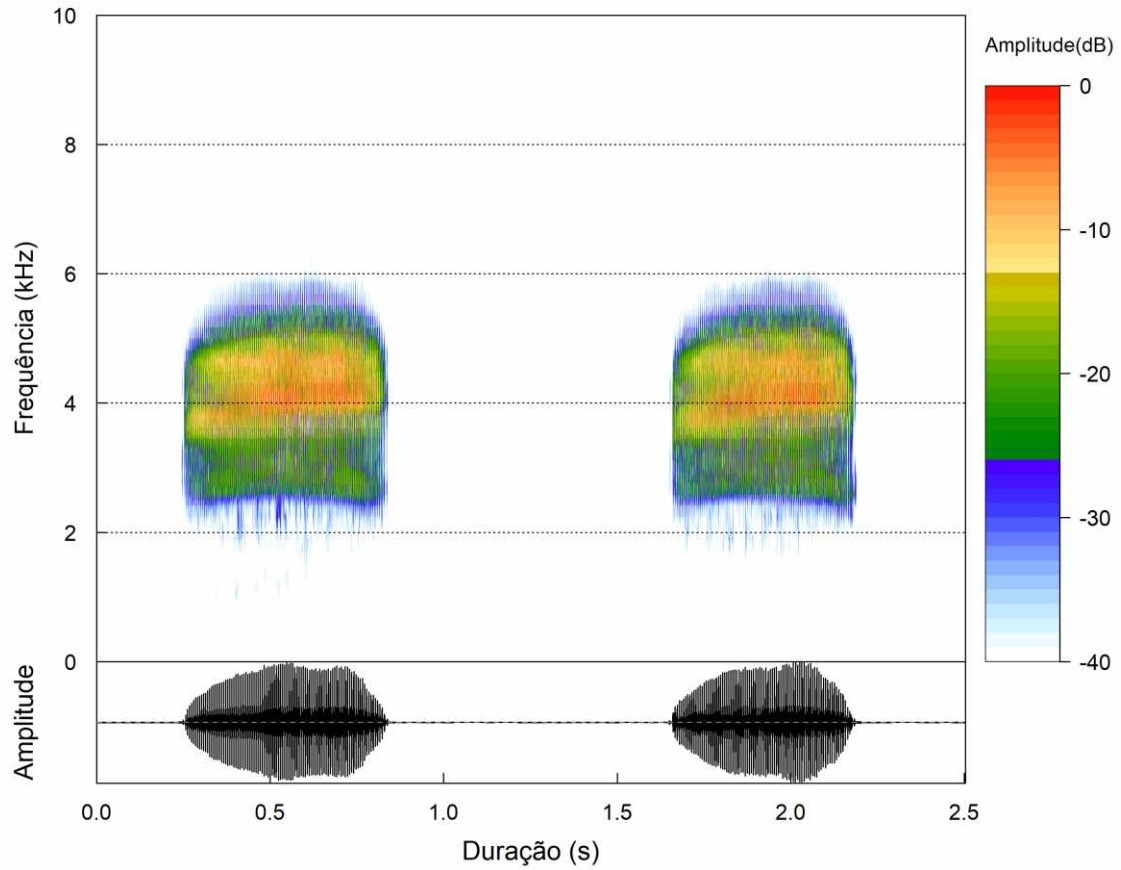


Figura 2. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) de dois cantos de anúncio sequenciais emitidos por um macho de *Scinax fuscomarginatus* de Uberlândia-MG. Arquivo sonoro: Scinax_fuscomUberlandiaMG18bAAGm661MK2. 11 de novembro de 2017, temperatura do ar 22°C, temperatura da água 25°C.

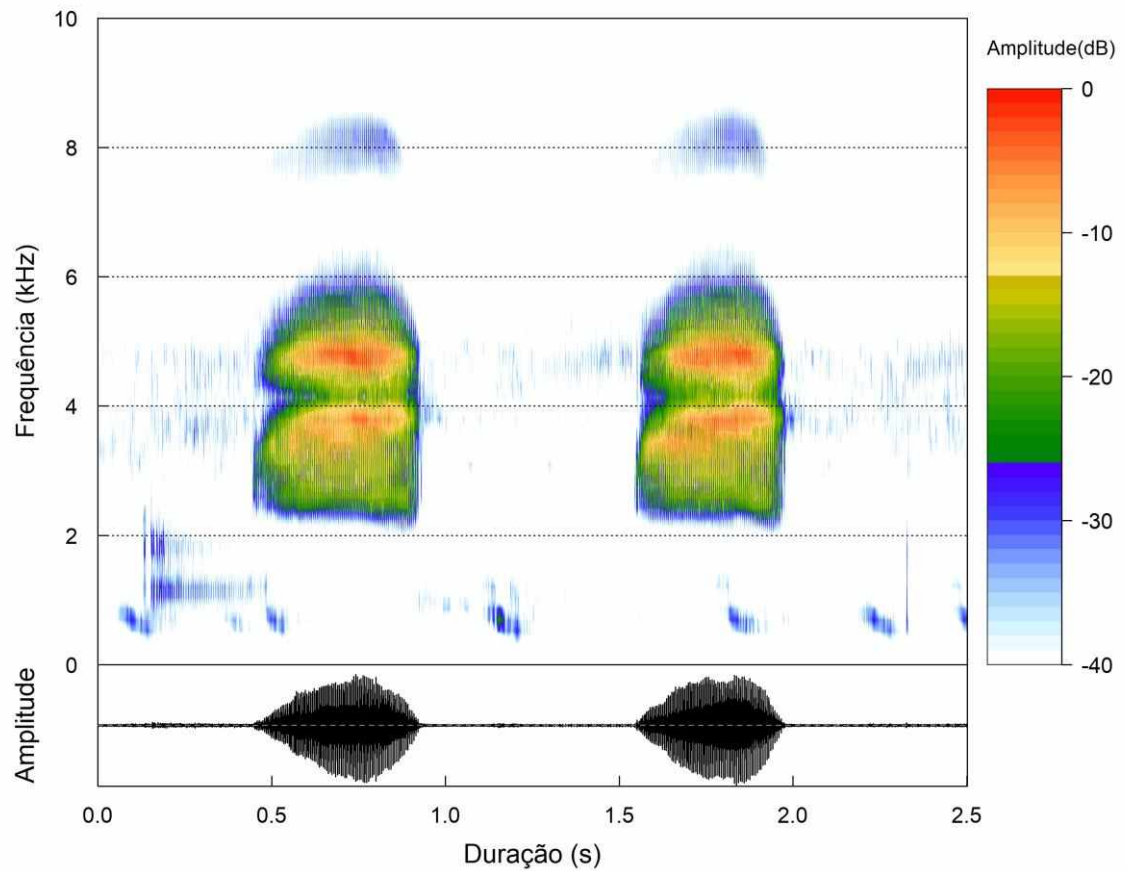


Figura 3. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) de dois cantos de anúncio sequenciais emitidos por um macho de *Scinax fuscomarginatus* de Rio Verde-GO. Arquivo sonoro: Scinax_fuscomRioVerdeGO1cAGL_AAGm671. 07 de janeiro de 2019, 19:54hs temperatura do ar 25,6°C, temperatura da água 27,7°C.

O canto de anúncio de *Scinax cf. pusillus* (Figura 4) e *S. pusillus* (Figura 5) consiste em uma única nota multipulsada com duração de 0,42–0,85 s, sendo emitido a uma taxa de 20,6–62 cantos/min. O período de pulso do canto possui uma duração de 0,007–0,010 s, e esses pulsos são emitidos a uma taxa de 111,1–138,3 pulsos/s. O canto tem frequência dominante de 4350–5513 Hz, enquanto que sua frequência mínima é de 3488–4737 Hz e sua frequência máxima de 5082–6546 Hz. Todos os dados acústicos de topótipos de *S. pusillus* de que dispomos foram coletados em uma única noite e houve diferença significativa nas temperaturas do ar em relação a Uberlândia (mediana = 22, N = 14) (Rio Verde (mediana = 24.2, N = 12); (F = 15; gl = 1, 24, $p < 0.001$).

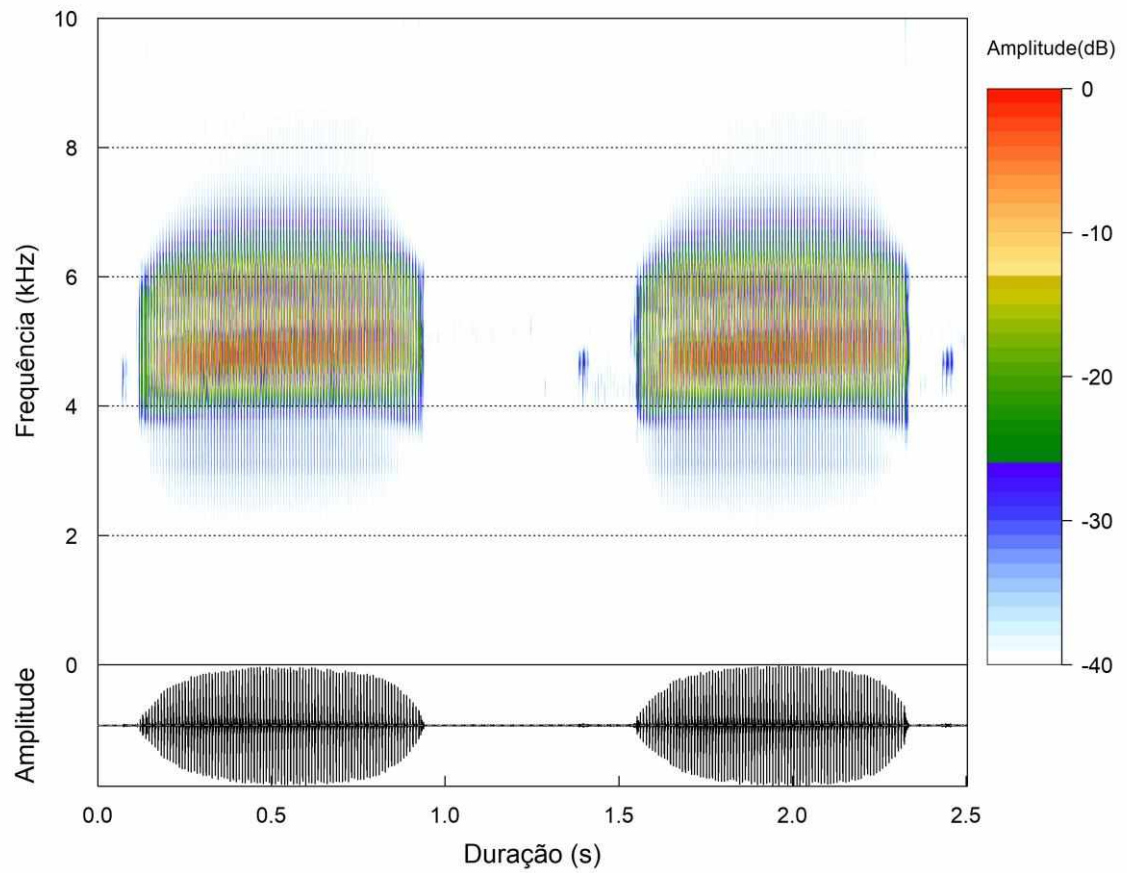


Figura 4. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) de dois cantos de anúncio sequenciais emitidos por um macho de *Scinax* cf. *pusillus* de Uberlândia-MG. Arquivo sonoro: *Scinax_pusillusUberlandiaMG5aAAGmt*. 19 de janeiro de 2009, 20:42hs temperatura do ar 22°C, temperatura da água 27.6°C.

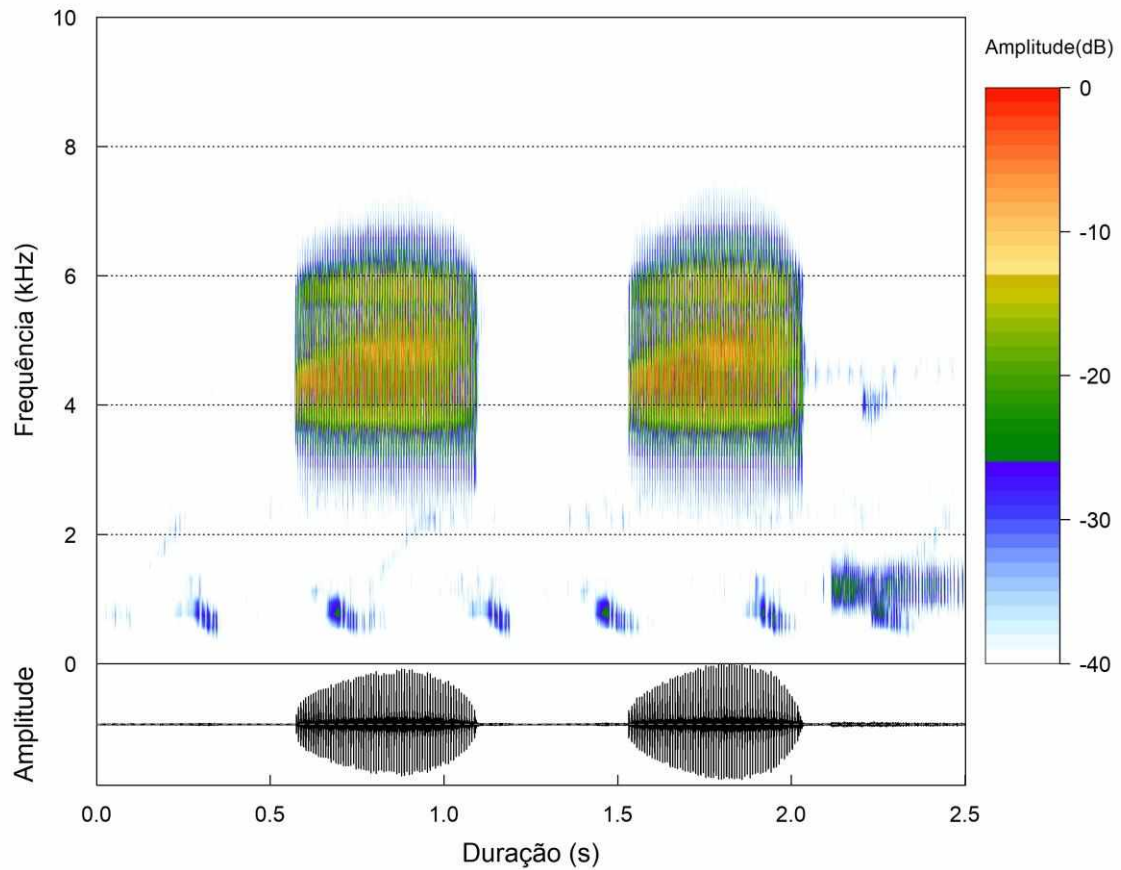


Figura 5. Audioespectrograma (acima) e oscilograma (abaixo) de dois cantos de anúncio sequenciais por um macho de *Scinax pusillus* de Rio Verde-GO. Arquivo sonoro: Scinax_pusillusRioVerdeGO1aPM_AAGm671. 07 de janeiro de 2019, 20:22hs temperatura do ar 25.6°C, temperatura da água 27.7°C.

Dados morfométricos

Os dados morfométricos das diferentes populações estudadas estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Morfometria (mm) de machos adultos das diferentes populações de *Scinax fuscomarginatus* (lato sensu). Média±desvio padrão (mínimo–máximo). N = número de indivíduos analisados/medidos.

Variáveis	<i>S. fuscomarginatus</i> localidades (N = 36)*	<i>S. fuscomarginatus</i> Uberlândia (N = 13)	<i>S. cf. pusillus</i> Uberlândia (N = 8)	<i>S. cf. pusillus</i> Rio Verde (N = 10)	<i>S. pusillus</i> Pombal et al. 2011 (N = 16)
Comprimento rostro-cloacal	21,83±1,65 (18,78–24,86)	20,90±0,93 (19,62–22,45)	17,75±0,52 (17,02–18,51)	17,48±0,80 (16,58–19,08)	17,00±0,70 (15,90–18,60)
Largura da cabeça	7,07±0,59 (6,2–8,3)	6,95±0,38 (6,30–7,60)	5,50±0,21 (5,20–5,90)	5,38±0,20 (5,00–5,60)	5,00±0,30 (4,40–5,40)
Comprimento da cabeça	7,65±0,62 (6,3–8,8)	7,24±0,49 (6,40–8,00)	6,56±0,31 (6,10–7,00)	6,66±0,39 (6,00–7,30)	4,50±0,40 (3,50–5,00)
Comprimento da tíbia	10,76±0,67 (9,70–12,38)	10,50±0,50 (9,70–11,17)	9,26±0,25 (9,00–9,70)	9,45±0,38 (8,90–10,13)	8,40±0,50 (7,60–9,30)
Comprimento da coxa	9,70±0,63 (8,0–10,74)	9,56±0,47 (8,60–10,20)	8,22±0,19 (8,00–8,50)	8,29±0,41 (7,80–9,00)	6,90±0,40 (6,00–7,80)
Comprimento do pé	9,09±0,68 (7,70–10,37)	8,91±0,43 (8,00–9,50)	7,57±0,28 (7,30–8,20)	7,49±0,27 (7,10–7,90)	6,40±0,50 (5,80–7,30)
Comprimento da mão	5,39±0,52 (4,60–7,00)	5,37±0,32 (4,80–5,90)	4,25±0,17 (4,10–4,60)	4,21±0,20 (3,80–4,50)	-
Diâmetro do olho	2,04±0,17 (1,80–2,30)	1,89±0,10 (1,80–2,10)	1,66±0,12 (1,50–1,80)	1,72±0,08 (1,60–1,80)	1,70±0,10 (1,60–1,90)
Diâmetro do tímpano	0,97±0,08 (0,80–1,10)	0,88±0,09 (0,70–1,00)	0,84±0,10 (0,70–1,00)	0,81±0,09 (0,70–0,90)	0,80±0,10 (0,60–1,20)
Distância interorbital	2,24±0,25 (1,80–2,80)	2,18±0,09 (1,90–2,30)	1,82±0,04 (1,80–1,90)	1,76±0,10 (1,60–1,90)	1,90±0,20 (1,70–2,10)
Distância entre as narinas	1,56±0,14 (1,30–1,90)	1,44±0,08 (1,30–1,60)	1,36±0,07 (1,30–1,50)	1,41±0,03 (1,40–1,50)	1,30±0,10 (1,20–1,40)
Distância olho-narina	1,89±0,18 (1,50–2,30)	1,70±0,08 (1,60–1,80)	1,64±0,12 (1,40–1,80)	1,75±0,07 (1,70–1,90)	1,50±0,30 (0,40–1,80)
Distância narina-rostro	0,46±0,08 (0,30–0,60)	0,42±0,04 (0,40–0,50)	0,50±0,05 (0,40–0,60)	0,50±0 (0,50–0,50)	0,60±0,10 (0,40–0,70)
Largura do disco do IV dedo do pé	0,90±0,13 (0,60–1,10)	0,84±0,08 (0,70–1,00)	0,72±0,04 (0,70–0,80)	0,62±0,08 (0,50–0,70)	-
Largura do disco do III dedo da mão	0,89±0,12 (0,70–1,10)	0,84±0,07 (0,80–1,00)	0,67±0,07 (0,60–0,80)	0,57±0,07 (0,50+0,70)	-

*Localidades: : Rio Verde – GO; Ituiutaba - MG; Caiapônia - GO; Guararapes - SP; Alto Paraíso de Goiás - GO; Pontal do Araguaia - MT; Costa Marques - RO; São Romão - MG; Cuiabá - MT; Nova Ubiratã - MT.

Comparações estatísticas

A análise multivariada sobre os dados acústicos aponta para existência de dois grupos principais, sendo um contendo as populações de *Scinax cf. pusillus* de Uberlândia e *S. pusillus* de Rio Verde, e outro contendo *S. fuscomarginatus* (Uberlândia e demais localidades). No eixo 1 de ambas as análises discriminantes, *S. pusillus* e *S. cf. pusillus* não se distinguiram uma da outra, porém ambas se discriminaram de *S. fuscomarginatus* nesse mesmo eixo. No RandomForest (500 árvores, duas variáveis por divisão) a estimativa OOB de taxa de erro foi de 6,4%, sempre em relação a *S. fuscomarginatus* em relação às outras duas.

Na DAPC (quatro eixos retidos) (Figura 6) *Scinax fuscomarginatus* se separou totalmente de *S. pusillus* e *S. cf. pusillus* no eixo 1. No eixo 2, *S. pusillus* e *S. cf. pusillus* se separaram ligeiramente. As variáveis apontadas como importantes na separação de *S. fuscomarginatus* de *S. pusillus/S. cf. pusillus* foram: taxa de emissão de pulso, período de pulso, frequência mínima, frequência máxima, frequência dominante e taxa de emissão de canto. Houveram diferenças significativas entre *S. pusillus* e *S. cf. pusillus* em taxa de emissão de canto ($F = 75$, $gl = 1$, 26 , $p < 0,001$); período de pulso $F = 12$, $gl = 1$, 26 ; p -value: $p < 0,001$ e em taxa de pulso ($F = 24$, $gl = 1$, 26 DF, $p < 0,001$)

A DAPC sobre os dados de morfometria (Figura 7) também revelou dois grupos no eixo 1, sendo um contendo as populações de *Scinax cf. pusillus/S. pusillus*, e outro contendo *S. fuscomarginatus*, com o tamanho (eixo 1) e não forma (eixo 2) sendo o fator relacionado a discriminação.

Período de pulso, taxa de pulso e frequência máxima são variáveis que permitiram completa diagnose, separando acusticamente as duas espécies. As análises estatísticas mostraram que existe diferenciação acústica de *Scinax fuscomarginatus* e *S. cf. pusillus/S. pusillus* (Figura 8). A variável “taxa de emissão de canto” apresentou valores que além de separarem *S. fuscomarginatus* de *S. cf. pusillus*, acabou separando também a população de *S. cf. pusillus* de Uberlândia e a população de *S. pusillus* de Rio Verde. A variação da taxa de emissão de canto entre indivíduos coespecíficos está aliada com a motivação do macho que está vocalizando, e essa motivação vai depender de alguns fatores, como por exemplo condições climáticas e/ou contexto social em que o indivíduo se encontra (ex.: macho vocalizando em coro provavelmente estará mais motivado do que se estivesse cantando isoladamente) (KÖHLER et al., 2017). Sendo assim, a variação na taxa de emissão de canto aqui encontrada para populações coespecíficas, provavelmente pode ser explicada pelos fatores extrínsecos supracitados.

A estatística também aponta para 4 importantes variáveis morfométricas que podem diferenciar *Scinax fuscomarginatus* de *S. cf. pusillus*/*S. pusillus* (Figura 9).

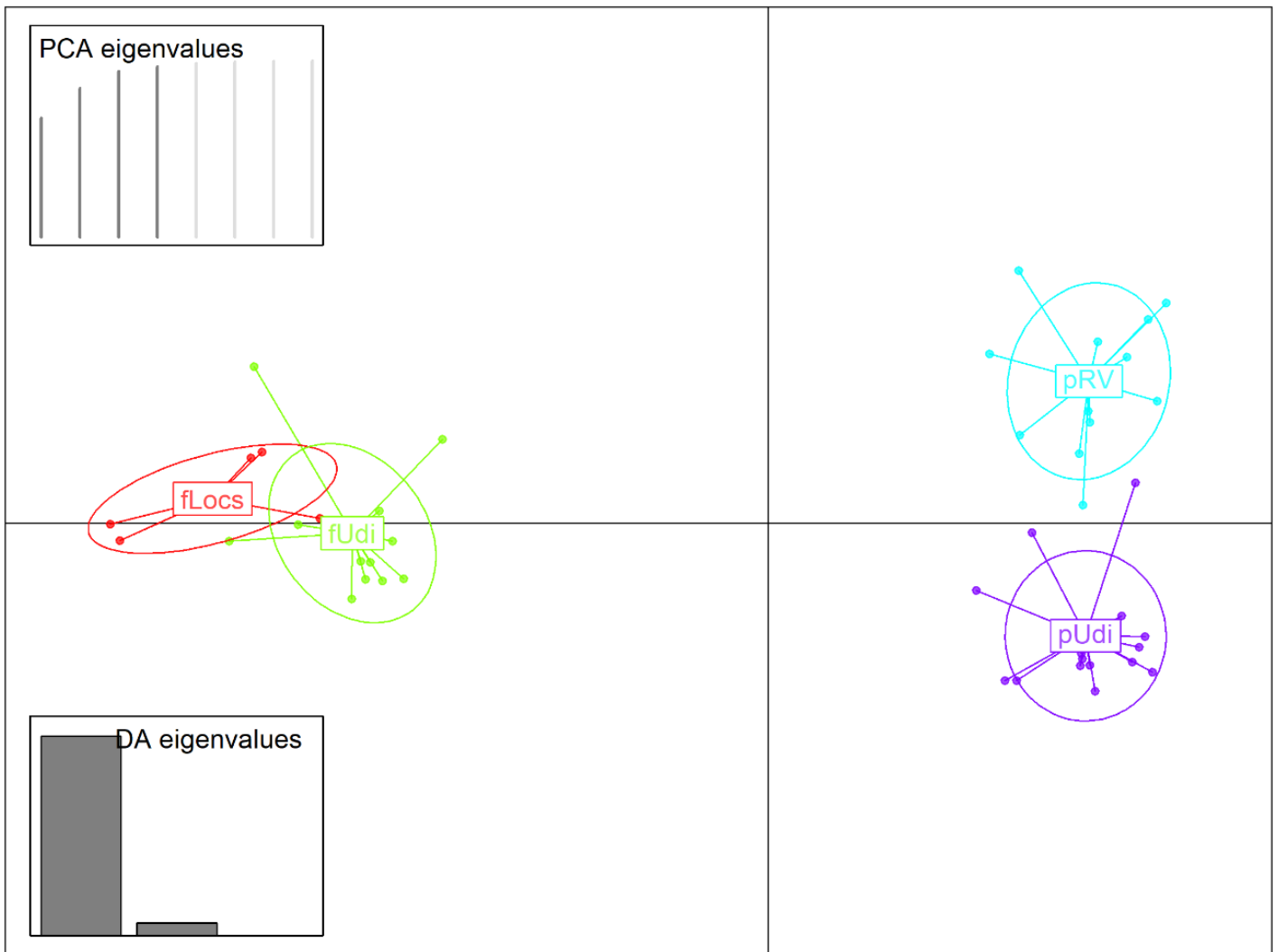


Figura 6. Gráfico de dispersão da análise discriminante (DAPC) sobre os dados de canto das populações estudadas. Abreviações: fUdi = *Scinax fuscomarginatus* de Uberlândia; fLocs = *S. fuscomarginatus* de demais localidades; pUdi = *S. cf. pusillus* de Uberlândia; pRV = *S. pusillus* de Rio Verde.

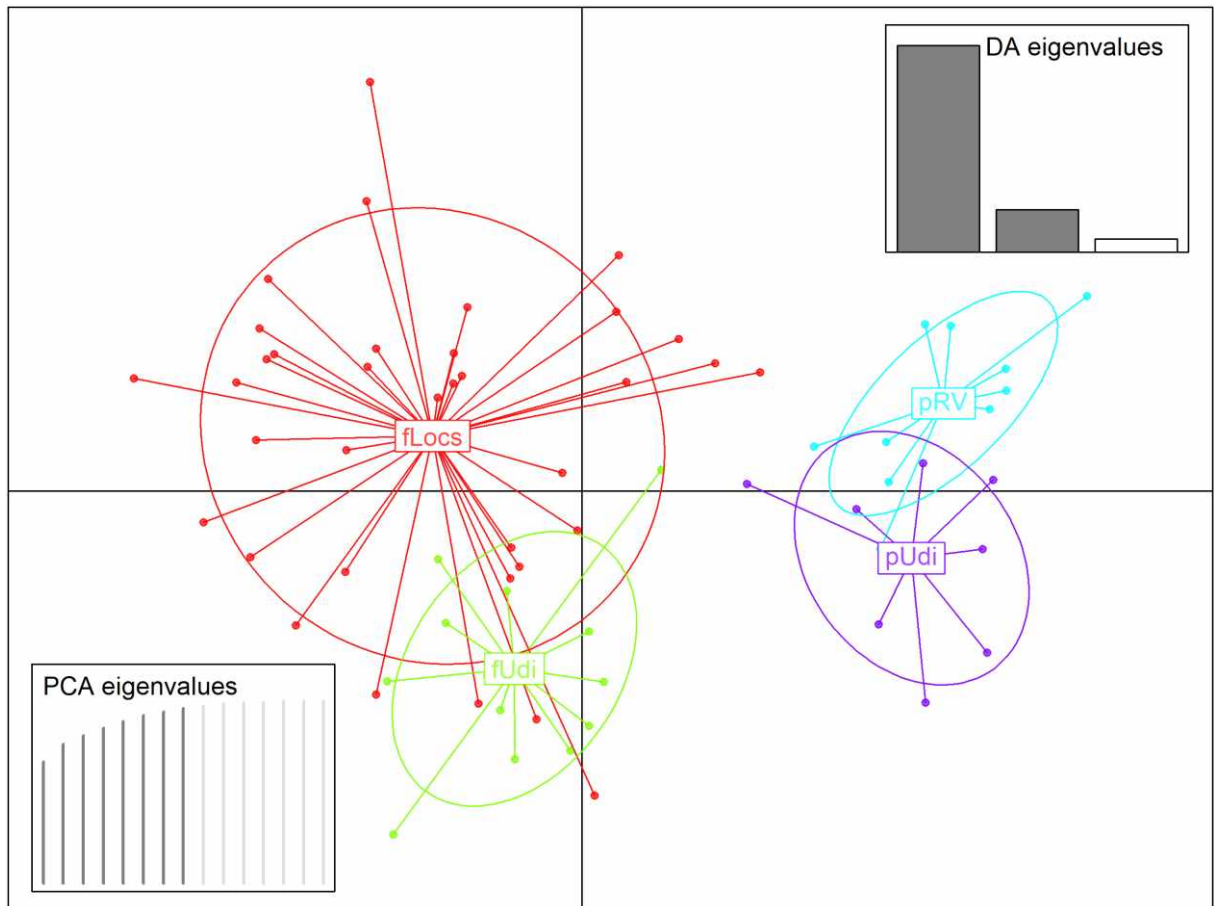


Figura 7. Gráfico de dispersão da análise de discriminante (DAPC) sobre os dados morfométricos das populações estudadas. Abreviações: fUdi = *Scinax fuscomarginatus* de Uberlândia; fLocs = *S. fuscomarginatus* de demais localidades; pUdi = *S. cf. pusillus* de Uberlândia; pRV = *S. pusillus* de Rio Verde.

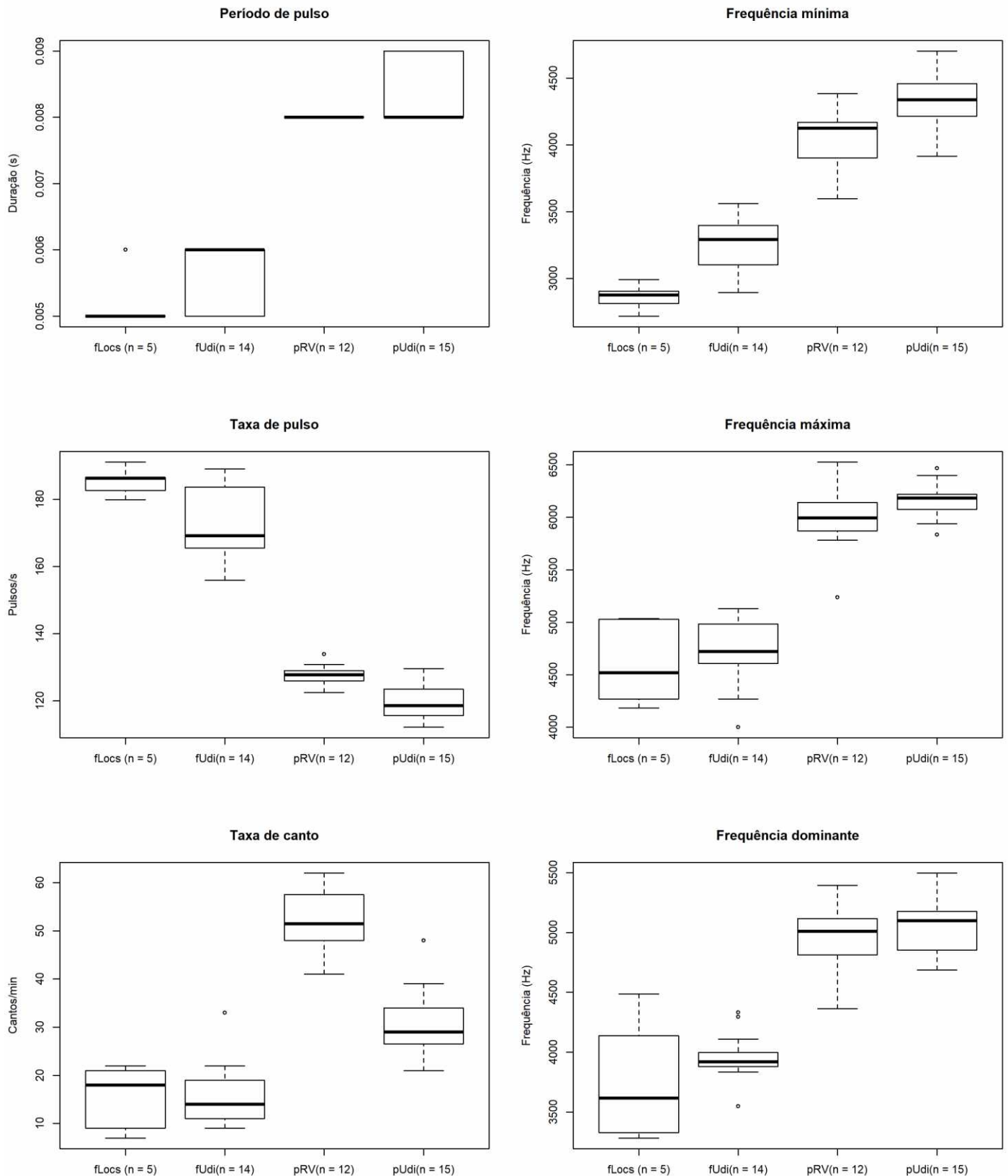


Figura 8. Boxplots de variáveis acústicas importantes na diferenciação de *Scinax fuscomarginatus* e *S. pusillus*/ *S. cf. pusillus*. Localidades e o respectivo número de indivíduos gravados, presentes no eixo X. Abreviações: fUdi = *S. fuscomarginatus* de Uberlândia; fLocs = *S. fuscomarginatus* de demais localidades; pRV = *S. pusillus* de Rio Verde; pUdi = *S. cf. pusillus* de Uberlândia. Apenas os valores médios de cada indivíduo foram considerados.

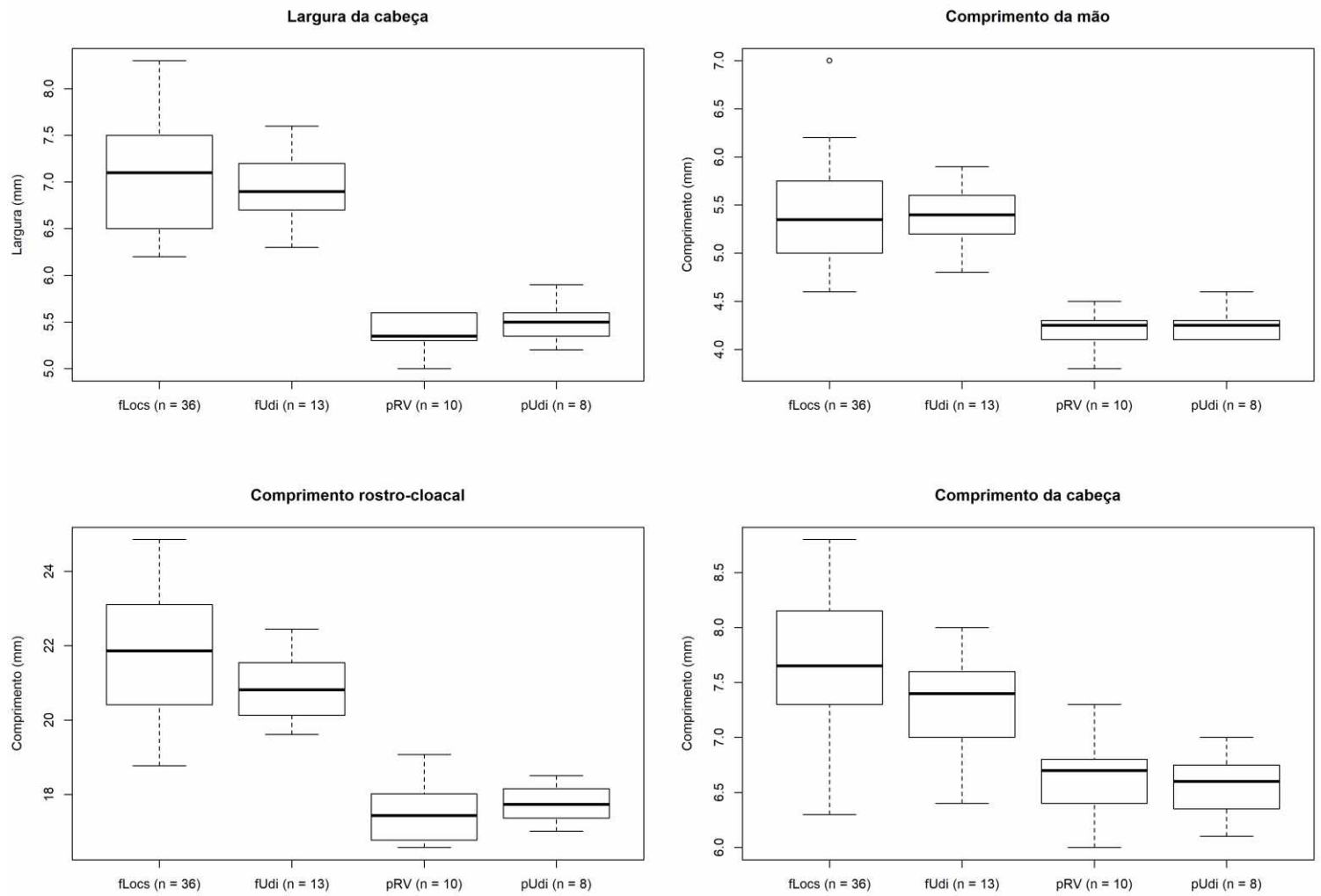


Figura 9. Boxplots de quatro variáveis morfométricas potenciais para a distinção entre *S. fuscomarginatus* e *S. pusillus*/*S. cf. pusillus*. Localidades e o respectivo número de indivíduos analisados, presentes no eixo X. Abreviações: fUdi = *S. fuscomarginatus* de Uberlândia; fLocs = *S. fuscomarginatus* de demais localidades; pRV = *S. pusillus* de Rio Verde; pUdi = *S. cf. pusillus* de Uberlândia; n = número de espécimes analisados.

DISCUSSÃO

Como indicado pelas análises discriminantes, os espécimes que referimos como *Scinax fuscomarginatus* corresponderam à espécie nominal, diferindo das populações de *S. cf. pusillus* de Uberlândia e de *S. pusillus* de Rio Verde-GO. A caracterização de topótipos de *S. pusillus* permite reconhecê-la como distinta de *S. fuscomarginatus*, ambas inclusive ocorrendo em sintopia na localidade-tipo de *S. pusillus*. Portanto, como sugerido por Cardoso e Pombal (2010), *S. fuscomarginatus* pode realmente representar um complexo de espécies. Nossos dados demonstram que a sinonimização de *S. pusillus* com *S. fuscomarginatus* feita por Brusquetti et al. (2014), não se justifica e seu *status* de espécie plena deve ser retomado. Os espécimes de Uberlândia que denominamos *S. cf. pusillus*, até então referidos como *S. fuscomarginatus* na literatura (BRUSQUETTI et al., 2014) corresponderam morfométrica e acusticamente à *S. pusillus*, sendo que diferenças significativas encontradas entre *S. pusillus* de Rio Verde e *S. cf. pusillus* de Uberlândia correspondem à variáveis temporais, as quais são mais influenciadas pelo contexto climático e social (KÖHLER et al., 2017), com a maior taxa de emissão de canto dos topótipos sendo coerente com a maior temperatura no dia da obtenção das gravações. Assim como em Rio Verde, em Uberlândia *S. fuscomarginatus* e *S. cf. pusillus* ocorrem sintopicamente, reforçando o caráter de espécie plena de cada uma.

Em relação ao canto de anúncio, variáveis espectrais (frequência mínima, frequência máxima e frequência dominante) e temporais (período de pulso, taxa de pulso e taxa de emissão de canto) foram importantes no diagnóstico acústico das espécies. Em relação à morfometria, quatro variáveis (largura da cabeça, comprimento da mão, comprimento rostro-cloacal e comprimento da cabeça) apresentaram importância para a distinção morfométrica entre as duas espécies. Os dados morfométricos aqui apresentados se mostraram mais conservados que os dados acústicos, sendo esses últimos muito mais eficazes para a discriminação das espécies em questão. Portanto, tal fato evidencia a necessidade de uma abordagem taxonômica integrativa, incorporando dados bioacústicos à análises morfológicas, morfométricas, entre outros conjuntos de dados.

Além disso, testes estatísticos multivariados baseados na morfometria e bioacústica corroboram fortemente a ideia de que existem duas espécies diferentes. A maioria dos intervalos de valores aqui reportados correspondentes tanto às variáveis acústicas, quanto às variáveis morfométricas, condizem com os respectivos intervalos de valores reportados no trabalho de descrição original de *Scinax pusillus* (POMBAL et al., 2011). Considerando a árvore filogenética proposta por Brusquetti et al. (2014) para o grupo, a revalidação de *S. pusillus* resultaria em *S. fuscomarginatus* parafilética, havendo assim a necessidade de uma nova e

extensa revisão taxonômica de *S. fuscomarginatus*, para esclarecer quais populações correspondem à linhagem nominal, se alguma delas correspondem a nomes indevidamente sinonimizados ou se necessitam receber novos nomes. A considerável distância genética ($> 3\%$) entre os subclados de *S. fuscomarginatus* na filogenia de Brusquetti et al. (2014), somada a algumas diferenças morfométricas e acústicas entre populações que foram por eles consideradas apenas variações intraespecíficas, evidenciam que alguns desses subclados na verdade possam representar outros nomes que não sejam *Scinax fuscomarginatus*.

Divergindo do padrão até então reportado para a espécie, o canto de anúncio de todos os espécimes de *S. fuscomarginatus* de Rio Verde-GO apresentaram duas bandas de frequência com energia substancial em cada (Figura 2), sendo que a frequência dominante alternou a sua correspondência entre as bandas durante as emissões de cantos. Várias espécies de *Scinax* possuem o canto composto por duas bandas de frequência enfatizadas (não-harmônicas), podendo alternar a correspondência da frequência dominante entre ambas as bandas durante a vocalização (MAGRINI et al., 2011; BANG et al., 2017; CARVALHO et al., 2017). Tal fato poderia ter relevância no reconhecimento espécie-específico (GERHARDT, 2005; MAGRINI et al., 2011), porém estudos mais aprofundados sobre processos biomecânicos e fisiológicos são necessários para compreender, como as espécies são capazes de alternar a dominância entre essas bandas de frequência ao longo do canto, e para avaliar a real relevância exercida.

Dado isso, é de suma importância realizar gravações de qualidade em campo, obter uma alta amostragem acústica (o que permite comparações e aplicações de um maior número de variáveis) e efetuar análises de canto padronizadas (seguindo, por exemplo, KÖHLER et al., 2017).

CONCLUSÕES

As análises acústicas e morfométricas, corroboradas por análises estatísticas, demonstram que as populações que estudamos correspondem a duas espécies: *Scinax fuscomarginatus* e *S. pusillus*. Ambas ocorrem em sintopia tanto em Uberlândia quanto em Rio Verde (localidade-tipo de *S. pusillus*), refutando assim a literatura quanto à sinonímia de *S. pusillus* em relação à *S. fuscomarginatus*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. G. de; CARDOSO, A. J. Variabilidade em medidas dos espermatozóides de *Hyla fuscovaria* (Amphibia, Anura) e seu significado taxonômico. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 45, n. 3, p. 387-391, 1985.
- BANG, D. L. et al. Vocalization of *Scinax haddadorum* (Anura: Hylidae), with further notes on the vocalization of the morphologically similar *Scinax rupestris*. *Neotropical Biodiversity*, v. 3, n. 1, p. 117-124, 2017.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.
- BIOACOUSTICS RESEARCH PROGRAM. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.5), 2014 [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- BLAIR, W. F. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American Naturalist*, v. 92, n. 862, p. 27-51, 1958.
- BREIMAN, L. Random forests. *Machine learning*, v. 45, n. 1, p. 5-32, 2001.
- BRUSQUETTI, F. et al. Taxonomic review of *Scinax fuscomarginatus* (Lutz, 1925) and related species (Anura; Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 171, n. 4, p. 783-821, 2014.
- CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. *Zookeys*, n. 370, p. 1, 2014.
- CARDOSO, M. W.; POMBAL JR, J. P. A new species of small *Scinax* Wagler, 1830 (Amphibia, Anura, Hylidae) of the *Scinax ruber* clade from Cerrado of central Brazil. *Amphibia-Reptilia*, v. 31, n. 3, p. 411 – 418, 2010.
- CARVALHO, T. R. de et al. A reassessment of the vocalization and distribution of *Scinax exiguus* (Duellman, 1986) (Anura: Hylidae) in the Amazonian savanna of Roraima, northern

Brazil, with the description of its aggressive call. *Neotropical Biodiversity*, v. 3, n. 1, p. 196-202, 2017.

CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A. Taxonomic circumscription of *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956)(Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) with the recognition of a new cryptic taxon through a bioacoustic approach. *Zootaxa*, v. 3701, n. 2, p. 207-237, 2013.

CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; MAGRINI L. A new species of the *Bokermannohyla circumdata* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with bioacoustic data on seven species of the genus. *Zootaxa*, v. 3321, n. 2012, p. 37-55, 2012.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, v. 4104, n. 1, p. 1 – 109, 2016.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. Biology of amphibians. JHU press, 1994.

DUELLMAN, W.E.; WIENS, J. J. The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. Occasional Papers of the Museum of Natural History. University of Kansas. n. 151, p. 1 – 23, 1992.

FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, v. 18, n. 4, p. 367 – 393, 2002.

FAIVOVICH, J. et al. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of natural History*, n. 294, p. 1 – 240, 2005.

FERRÃO, M. et al. High species richness of *Scinax* treefrogs (Hylidae) in a threatened Amazonian landscape revealed by an integrative approach. *PloS one*, v. 11, n. 11, p. e0165679, 2016.

FOUQUET, A. et al. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular phylogenetics and Evolution*, v. 43, n. 2, p. 567-582, 2007.

FOUQUETTE JR, M. J.; DELAHOUSSE, A. J. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. *Journal of Herpetology*, p. 387 – 396, 1977.

FROST, D. R. 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (10 Junho 2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

GERHARDT, H. C. Acoustic spectral preferences in two cryptic species of grey treefrogs: implications for mate choice and sensory mechanisms. *Animal Behaviour*, v. 70, n. 1, p. 39-48, 2005.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2008.

JOMBART, T.; COLLINS, C. A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0. 0. London: Imperial College London, MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling, 2015.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.

KAISER, H. et al. Best practices: in the 21st century, taxonomic decisions in herpetology are acceptable only when supported by a body of evidence and published via peer-review. *Herpetological Review*, v. 44, n. 1, p. 8 – 23, 2013.

KÖHLER, J. et al. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, v. 4251, n. 1, p. 1 – 124, 2017.

LIAW, A.; WIENER, M. et al. Classification and regression by randomForest. *R news*, v. 2, n. 3, p. 18-22, 2002.

- Lourenço A.C.C; et al. A New Species of the *Scinax catharinae* Group (Anura: Hylidae) from the Highlands of Santa Catarina, Brazil. South American Journal of Herpetology, v. 14, p. 163–176, 2019.
- MAGRINI, L. et al. Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura: Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. Zootaxa, v. 3066, p. 37-51, 2011.
- MARINHO, P. et al. Advertisement calls, intraspecific variation and species diagnosis of six Brazilian species of *Elachistocleis* (Anura: Microhylidae: Gastrophryninae). Zootaxa, v. 4521, n. 3, p. 357-375, 2018.
- MELO, M. et al. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax pusillus* Pombal, Bilate, Gambale, Signorelli & Bastos, 2011: Distribution extension. September 2014. Check List 10(4):965-967, 2014.
- NARINS, P. M.; FENG, A. S. Hearing and sound communication in amphibians: Prologue and prognostication. In: Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York, NY, 2007. p. 1-11.
- POMBAL JR, J. P. et al. A new miniature treefrog of the *Scinax ruber* clade from the Cerrado of central Brazil (Anura: Hylidae). Herpetologica, v. 67, n. 3, p. 288-299, 2011.
- POMBAL JR, J. P.; GORDO, M. Duas novas espécies de *Hyla* da Floresta Atlântica no estado de São Paulo (AMPHIBIA, ANURA). Mem. Inst. Butantan, v. 53, n. 11, p. 135 – 144, 1991.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Versão 3.5.2. Vienna (AU): R Foundation for Statistical Computing, 2015.
Disponível em: <http://www.R-project.org>.
- SUEUR, J.; AUBIN, T.; SIMONIS, C. Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. Bioacoustics, v. 18, n. 2, p. 213-226, 2008.
- WATTERS, J. L. et al. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. Zootaxa, v. 4072, n. 4, p. 477-495, 2016.

WELLS, K. D.; SCHWARTZ, J. J. The behavioral ecology of anuran communication. In: Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York, NY, 2007. p. 44-86.

APÊNDICE A – BASE DE DADOS ACÚSTICOS UTILIZADA

Label	Localidade	Hora	Data (dd/mm/aaaa)	Temperatura do ar (°C)
Scinax_pusillusRioVerdeGO1aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	19:30	07/01/2019	22
Scinax_pusillusRioVerdeGO1dDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	19:30	07/01/2019	22
Scinax_pusillusRioVerdeGO1aPM_AAGm671	Rio Verde-GO	20:22	07/01/2019	25.6
Scinax_pusillusRioVerdeGO2bAGL_AAGm671	Rio Verde-GO	20:37	07/01/2019	25.6
Scinax_pusillusRioVerdeGO2aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	19:45	07/01/2019	22
Scinax_pusillusRioVerdeGO3aAGL_AAGm671	Rio Verde-GO	20:57	07/01/2019	25.6
Scinax_pusillusRioVerdeGO3aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	19:55	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO3bDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	19:55	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO4aAGL_AAGm671	Rio Verde-GO	21:12	07/01/2019	25.6
Scinax_pusillusRioVerdeGO4aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	20:00	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO4bDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	20:00	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO5aAGL_AAGm671	Rio Verde-GO	21:27	07/01/2019	25.6
Scinax_pusillusRioVerdeGO5aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	20:16	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO6aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	20:18	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusRioVerdeGO7aDLB_AAGm671	Rio Verde-GO	20:39	07/01/2019	24.2
Scinax_pusillusUberlandiaMG2aAAGmt	Uberlândia-MG	20:30	19/01/2009	22
Scinax_pusillusUberlandiaMG3aAAGmt	Uberlândia-MG	20:32	19/01/2009	22
Scinax_pusillusUberlandiaMG5aAAGmt	Uberlândia-MG	20:42	19/01/2009	22
Scinax_pusillusUberlandiaMG6aAAGmt	Uberlândia-MG	20:50	19/01/2009	22
Scinax_pusillusUberlandiaMG7aAAGmt	Uberlândia-MG	21:00	19/01/2009	22
Scinax_pusillusUberlandiaMG9aAAGmt	Uberlândia-MG	19:30	22/01/2009	21.4
Scinax_pusillusUberlandiaMG10aAAGb	Uberlândia-MG	20:40	05/01/2010	25
Scinax_pusillusUberlandiaMG13aAAGGm	Uberlândia-MG	20:09	03/11/2017	25
Scinax_pusillusUberlandiaMG14aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	19:20	09/11/2017	23
Scinax_pusillusUberlandiaMG15aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	19:12	11/11/2017	21
Scinax_pusillusUberlandiaMG16aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	19:31	11/11/2017	21
Scinax_pusillusUberlandiaMG17aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	19:36	11/11/2017	21

Scinax_pusillusUberlandiaMG18aAAG661MK2	Uberlândia-MG	19:32	14/12/2017	23
Scinax_pusillusUberlandiaMG19aAAG661MK2	Uberlândia-MG	19:49	14/12/2017	23
Scinax_pusillusUberlandiaMG20aAGL_AAGm671	Uberlândia-MG	20:30	14/12/2018	-
Scinax_fuscomUberlandiaMG1aAAGb	Uberlândia-MG	19:15	11/01/2005	27.9
Scinax_fuscomUberlandiaMG2aAAGb	Uberlândia-MG	19:10	-	25
Scinax_fuscomUberlandiaMG3aAAGmt	Uberlândia-MG	21:05	19/01/2009	22
Scinax_fuscomUberlandiaMG10aTRC_AAGmt	Uberlândia-MG	21:02	10/11/2010	21
Scinax_fuscomUberlandiaMG11aAAGGm661Mk2	Uberlândia-MG	19:19	28/10/2017	23
Scinax_fuscomUberlandiaMG12aAAGGm661Mk2	Uberlândia-MG	19:38	28/10/2017	23
Scinax_fuscomUberlandiaMG13aAAGGm661Mk2	Uberlândia-MG	19:40	28/10/2017	23
Scinax_fuscomUberlandiaMG14aAAGGm661Mk2	Uberlândia-MG	19:45	28/10/2017	23
Scinax_fuscomUberlandiaMG15aAAGGm	Uberlândia-MG	19:55	03/11/2017	25
Scinax_fuscomUberlandiaMG16aAAGGm	Uberlândia-MG	20:01	03/11/2017	25
Scinax_fuscomUberlandiaMG17aAAGGm	Uberlândia-MG	20:04	03/11/2017	25
Scinax_fuscomUberlandiaMG18bAAGm661MK2	Uberlândia-MG	-	11/11/2017	22
Scinax_fuscomUberlandiaMG19aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	18:51	11/11/2017	22
Scinax_fuscomUberlandiaMG20aAAGm661MK2	Uberlândia-MG	19:10	09/12/2017	24
Scinax_fuscomargRioVerdeGO1aPM_AAGm671	Rio Verde-GO	19:50	07/01/2019	25.6
Scinax_fuscomargRioVerdeGO1bPM_AAGm671	Rio Verde-GO	19:51	07/01/2019	25.6
Scinax_fuscomargRioVerdeGO2bPM_AAGm671	Rio Verde-GO	20:15	07/01/2019	25.6
Scinax_fuscomRioVerdeGO1cAGL_AAGm671	Rio Verde-GO	19:54	07/01/2019	25.6
Scinax_fuscomargCaiapôniaGO1aPM_AAGm671	Caiapônia-GO	20:48	05/02/2018	22
Scinax_furcomItuiutabaMG1aAAGm661MK2	Ituiutaba-GO	19:46	05/12/2017	23

APÊNDICE B – LISTA DE ESPÉCIMES EXAMINADOS

Espécimes testemunho por localidade: Uberlândia - MG (AAG-UFU 4957, AAG-UFU 6054–57, AAG-UFU 6075–82, AAG-UFU 6118–21, AAG-UFU 6125–26, AAG-UFU 6440–41); Rio Verde - GO (AAG-UFU 6448, AAG-UFU 6451–60); Ituiutaba - MG (AAG-UFU 6127, AAG-UFU 6432–36); Caiapônia - GO (AAG-UFU 6320–23, AAG-UFU 6423–27); Guararapes - SP (AAG-UFU 2023); Alto Paraíso de Goiás - GO (AAG-UFU 3337); Pontal do Araguaia - MT (AAG-UFU 3468, AAG-UFU 3471–72, AAG-UFU 3474, AAG-UFU 5251, AAG-UFU 5374–76); Costa Marques - RO (AAG-UFU 5302, AAG-UFU 5328); São Romão - MG (AAG-UFU 5692–93); Cuiabá - MT (AAG-UFU 5730, AAG-UFU 5960–61); Nova Ubiratã - MT (AAG-UFU 6532–34).